



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**ÜÇLÜ-FAZ AYIRMA TEKNİĞİ İLE
SAFLAŞTIRILAN SELÜLAZIN
ENKAPSULASYONU, KARAKTERİZASYONU VE
IN VITRO KULLANILABİLİRLİĞİ**

Yüksek Lisans Tezi

Derya ÇAMURLU

Biyokimya Anabilim Dalı

İzmir
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**ÜÇLÜ-FAZ AYIRMA TEKNİĞİ İLE
SAFLAŞTIRILAN SELÜLAZIN
ENKAPSULASYONU, KARAKTERİZASYONU VE
IN VITRO KULLANILABİLİRLİĞİ**

Derya ÇAMURLU

Danışman : Prof. Dr. Seçil ÖNAL

Biyokimya Anabilim Dalı
Biyokimya Yüksek Lisans Programı

İzmir
2019

Derya ÇAMURLU tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Üçlü-Faz Ayırma Tekniği ile Saflaştırılan Selülozın Enkapsülasyonu, Karakterizasyonu ve *In Vitro* Kullanılabilirliği” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve ..26.11.2019... tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

: Prof. Dr. SEĞİL ÖNAL Sevil Onal

Raportör Üye

: Prof. Dr. Hilma Boz Kaya Hilma Boz Kaya

Üye

: Prof. Dr. Seray Şahin Seray Şahin

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Üçlü-Faz Ayırma Tekniği ile Saflaştırılan Selülozın Enkapsülasyonu, Karakterizasyonu ve *In Vitro* Kullanılabilirliği” başlıklı bu tezin, kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

26 / 11 / 2019

Derya ÇAMURLU

ÖZET

ÜÇLÜ-FAZ AYIRMA TEKNİĞİ İLE SAFLAŞTIRILAN SELÜLAZIN ENKAPSULASYONU, KARAKTERİZASYONU VE IN VITRO KULLANILABİLİRLİĞİ

ÇAMURLU, Derya

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Seçil ÖNAL

Kasım 2019, 113 sayfa

Bu tez çalışmasında, ticari arenada sıklıkla kullanılan *Trichoderma reesei* selülazının üçlü-faz ayırma (TPP) metodu ile saflaştırılması ve kalsiyum aljinat jelde enkapsülasyonu çalışılmıştır. Bu iki temel deneme tüm değişkenleriyle optimize edilmiş ve sonuçta hem saflaştırma hem de enkapsülasyon çalışmaları için optimum koşullar belirlenmiştir.

T. reesei selülazının saflaştırılmasında ideal TPP koşulu; %50 (w/v) amonyum sülfat doygunluğu, 1:1 (v/v) enzim: t-bütanol oranı, pH 4,5 ve 0,1 mg protein olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda selülaz enzimi, %113 aktivite verimi ve 1,42 saflaştırma katı ile başarı ile saflaştırılabilmektedir.

Enkapsülasyon çalışmaları neticesinde ise ticari selülaz enziminin immobilizasyonu için optimum koşullar; 0,5 mg enzim (protein miktarı) ve %2 (w/v) aljinat, %0,5 (w/v) kitosan içeren 0,15 M CaCl₂, 3 saat immobilizasyon, %2,0 (v/v) glutaraldehit ile 2 saat çapraz bağlama olarak belirlenmiştir. Bu optimum koşullarda Selülaz enzimi %53 aktivite verimi ile başarı ile immobilize edilmiştir. TPP orta fazında deriştirilen selülaz enzimi ise belirlenen optimum koşullarda %10 aktivite verimi ile immobilize edilebilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Trichoderma reesei*, selülaz, üçlü-faz ayırma (TPP), immobilizasyon, kalsiyum aljinat, kitosan, enkapsülasyon.

ABSTRACT

ENCAPSULATION, CHARACTERISATION AND *IN VITRO* USEABILITY OF CELLULASE PURIFIED WITH THREE-PHASE PARTITIONING TECHNIQUE

ÇAMURLU, Derya

Master in Biochemistry Department

Supervisor: Prof. Dr. Seçil ÖNAL

November 2019, 113 pages

In this thesis, the purification of *Trichoderma reesei* cellulase which is frequently used in commercial arena by three-phase partitioning (TPP) method and encapsulation in calcium alginate gel was studied. These two basic experiments were optimized with all variables, and finally optimum conditions for both purification and encapsulation studies were determined.

Ideal TPP condition for the purification of *T. reesei* cellulase was determined as; 50% (w/v) ammonium sulfate saturation, 1:1 (v/v) enzyme: t-butanol ratio, pH 4.5 and 0.1 mg of the protein. Under optimum conditions, the cellulase enzyme was successfully purified with 113% activity yield and 1.42 purification fold.

As a result of the encapsulation studies, optimum immobilization conditions for commercial cellulase enzyme were determined as; 0.5 mg enzyme (protein amount) and 2% (w/v) alginate, 0.5% (w/v) chitosan in 0.15 M CaCl₂, 3 hours, 2.0% (v/v) glutaraldehyde 2 hour cross-linking time. The cellulase enzyme was successfully immobilized with 53% activity yield with this optimum conditions. The cellulase enzyme, which was concentrated in the middle phase of TPP, could be immobilized with 10% activity yield under these optimal conditions.

Keywords: *Trichoderma reesei*, cellulase, three-phase partitioning (TPP), immobilization, calcium alginate, chitosan, encapsulation.

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, bir enzim meraklısının özenli çalışmaları ile tamamlanmıştır. Yıllardır enzimlere karşı olan çalışma tutkum, lisans dönemimde hocam Sn. Prof. Dr. Seçil Önal önderliğinde başlamış ve yüksek lisans hayatım boyunca da aynı hızla devam etmiştir. Bu çalışmanın asıl amacı sağlık ve yem sektörlerine yararlı bir enzim formülasyonu geliştirebilmektir.

Çalışmada selüloz enzimi ilk olarak %80 (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi metoduyla deriştirilmiştir. Daha sonra TPP metodu ile orta fazda başarı ile saflaştırılmıştır. Ayrıca tuz çöktürmesi yapılarak deriştirilen selüloz enzimi, tutuklama metodu ile oldukça inert bir polimer olan aljinat ile kalsiyum klorür varlığında immobilize edilmiştir. Ardından, immobilize selülozdan kaçakların engellenmesi ve daha kararlı mikroküre eldesi hedefi ile medikal alanda sıkça ve güvenle kullanılan glutaraldehit ile çapraz bağlama gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın neticesinde, selüloz enziminin TPP metodu ile saflaştırılmasındaki optimum koşullar; %50 (w/v) amonyum sülfat, 0,1 mg başlangıç proteini, 1:1 (v/v) enzim/t-bütanol oranı ve kendi pH'ı şeklinde belirlenmiştir. Ardından tuz çöktürmesi yapılan selüloz enziminin, tutuklama metodu ile immobilizasyonunda; 0,5 mg enzim (protein miktarı) ve %2 (w/v) aljinat, %0,5 (w/v) kitosan içeren 0,15 M CaCl₂ içerisine damlatılarak mikroküreler oluşturulmuş ve 3 saatte immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. %2,0 (v/v) glutaraldehit ile 2 saat çapraz bağlanan enzim ile verimli sonuçlar alınmıştır. Geliştirilen bu sistem ile *Trichoderma reesei* kaynaklı selüloz, optimum koşullarda maksimum %82 aktivite verimi ile immobilize edilmiştir. Immobilize selüloz, üç kez ard-arda kayda değer düzeyde başarı ile kullanılabilmiştir.

İZMİR

26 / 11 / 2019

DERYA ÇAMURLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK	ii
KABUL ONAY SAYFASI	iv
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	vi
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	x
ÖNSÖZ	xii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xx
TABLolar DİZİNİ	xxiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Selüloz ve Selülazlar	3
2.1.1. Selüloz	3
2.1.2. Selülozun Hidroliz Mekanizması ve Selülazlar	4
2.1.3. Selüloz Bağlayıcı Domain (CBD) ve Katalitik Domain (CD)	6

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.1.4. Selülozların Biyokimyasal Özellikleri	10
2.1.5. Selülozın Endüstriyel Kullanım Alanları	11
2.2. Üçlü-Faz Ayırma Tekniği (Three-Phase Partitioning, TPP)	32
2.3. İmmobilize Enzimler	34
2.3.1. Enzim İmmobilizasyonunun Tarihçesi	36
2.3.2. Taşıyıcıların Seçimi	37
2.3.3. Polimerik Taşıyıcılar ile Enzim İmmobilizasyonu Metodları	39
2.3.4. İmmobilize Enzimlerin Avantaj ve Dezavantajları.....	50
3. GEREÇ VE YÖNTEM	51
3.1. Gereç	51
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	51
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	51
3.2. Yöntem	52
3.2.1. Selüloz Aktivite Tayini (DNS Metodu)	52
3.2.2. Protein Miktarı Tayini (Bradford Metodu)	53

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.3. Selülağın Tuz (Amonyum Sülfat, AS) Çöktürmesi Metoduyla Kısmi Deriştirilmesi	54
3.2.4. Selülağın TPP Metodu ile Deriştirilmesi	55
3.2.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Moleküler Kütle Tayini	57
3.2.6. Selülağın Tutuklama Metodu ile İmmobilizasyonu	60
3.2.7. İmmobilize ve Serbest Selülağların Karakterizasyonu	63
3.2.8. Tuz Çöktürmesi ile Deriştirilmiş ve TPP ile Kısmi Saflaştırılmış Selülağlarla Hazırlanan İmmobilize Enzimlerin Salınım Özellikleri	65
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	67
4.1. Selülağın Tuz (AS) Çöktürmesi Metoduyla Kısmi Deriştirilmesi	67
4.2. Selülağın TPP Metodu ile Kısmi Saflaştırılması	69
4.2.1. Amonyum Sülfat (AS) Konsantrasyonu Optimizasyonu	70
4.2.2. Enzim: T-Bütanol (v/v) Oranı Optimizasyonu	71
4.2.3. Sistem pH'ı Optimizasyonu	72
4.2.4. Protein Miktarı Optimizasyonu	73
4.2.5. Tekrarlanabilirlik Denemesi	74

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.2.6. Ölçek Büyütme Denemesi	75
4.2.7. TPP Optimum Sonuçları	76
4.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Moleküler Kütle Tayini	79
4.4. Selülağın Tutuklama Metodu ile İmmobilizasyonu	81
4.4.1. Aljinat Konsantrasyonu Optimizasyonu	82
4.4.2. Kalsiyum Klorür (CaCl ₂) Konsantrasyonu Optimizasyonu	83
4.4.3. Kitosan Konsantrasyonu Optimizasyonu	84
4.4.4. İmmobilizasyon Süresi Optimizasyonu	85
4.4.5.Çapraz Bağlayıcı Olarak Glutaraldehit (GA) Konsantrasyonu Optimizasyonu	86
4.4.6. Çapraz Bağlanma Süresi Optimizasyonu	87
4.4.7. Protein Miktarı Optimizasyonu	88
4.4.8. Tekrarlanabilirlik Denemesi	89
4.4.9. Selülağ Enziminin İmmobilizasyon Sonuçları	90
4.5. İmmobilize ve Serbest Selülağların Karakterizasyonu	93
4.5.1. Optimum Sıcaklık	93

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.5.2. Optimum pH	94
4.5.3. pH Kararlılığı	95
4.5.4. Termal Kararlılık	96
4.5.5. Zamana Bağlı Termal Kararlılık	97
4.6. Tuz Çöktürmesi ile Deriştirilmiş ve TPP ile Kısmi Saflaştırılmış Selülozlarla Hazırlanan İmmobilize Enzimlerin Salınım Özellikleri.....	100
4.6.1. pH'ya Bağlı Salınım Özellikleri	101
4.6.2. Tekrar Kullanılabilirlik	103
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	105
KAYNAKLAR DİZİNİ	106
TEŞEKKÜR	112
ÖZGEÇMİŞ	113

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Selülozun genel yapısı	3
2.2 Selülazların atak noktaları	5
2.3 <i>Trichoderma reesei</i> kaynaklı selülitik enzimlerin üç boyutlu yapıları (a); sellobiyohidrolaz II ve (b); endoglukanaz I	6
2.4 Hastaya ilişkin karın tomografisi (ileumun uç kısmında oldukça hacimli bezoar birikmesine bağlı olarak ince bağırsaklarda ciddi boğumlanma)	31
2.5 Bir biyokatalizatörün taşıyıcıya adsorpsiyon metodu ile immobilizasyonu	40
2.6 Bir biyokatalizatörün taşıyıcıya iyonik bağ ile bağlanması	41
2.7 Bir biyokatalizatörün taşıyıcıya uzatıcı kol (spacer) varlığında (a) ve uzatıcı kol olmadan kovalent bağ ile bağlanması (b)	43
2.8 Bir biyokatalizatörün taşıyıcıya çapraz bağlayıcı varlığında (a) ve çapraz bağlayıcının aracı moleküllerle de bağlandığı ko-çapraz bağlanma metoduyla (b) immobilizasyonu	44
2.9 Bir matriks (a), fiber (b) ve kapsül (c) içerisinde enzim enkapsülasyonu ...	46
2.10 Biyokatalizatörlerin katı yüzeylere, afinite ligantlarının protein füzyonu metodu (a) ve transglutaminaz destekli enzimatik konjugasyon metodu (b) ile immobilizasyonu	48
3.1 Glukozun Dinitrosalisilik asit (DNS) reaktifi ile reaksiyonu	52

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
4.1 Amonyum sülfat (AS) çöktürmesi sonrası pelletin diyalizi	67
4.2 Üçlü-faz ayırma (TPP) sistemi	69
4.3 Amonyum sülfat (AS) konsantrasyonunun selüloz enziminin saflaştırılmasına etkisi	70
4.4 Enzim: t-bütanol oranının selüloz enziminin saflaştırılmasına etkisi	71
4.5 TPP ortam pH'ının selüloz enziminin saflaştırılmasına etkisi	72
4.6 TPP başlangıç protein miktarının, selüloz enziminin saflaştırılmasına etkisi	73
4.7 TPP sisteminin tekrarlanabilirliği	74
4.8 TPP'de ölçek büyütme	75
4.9 <i>Trichoderma reesei</i> selülozına ilişkin SDS-PAGE jel görüntüsü	80
4.10 Ca-Aljinat mikroküreler (a) ve immobilizasyonda kullanılan Nuçe erleni ve beherinden oluşan yıkama sistemi (b)	81
4.11 Aljinat konsantrasyonunun immobilizasyon verimine etkisi	82
4.12 Farklı konsantrasyondaki aljinatlar kullanılarak elde edilen selüloz mikroküreler	82
4.13 CaCl_2 konsantrasyonunun immobilizasyon verimine etkisi	83

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

4.14	Farklı konsantrasyonda CaCl_2 çözeltileri kullanılarak elde edilen selüloz mikroküreler	83
4.15	Kitosan konsantrasyonunun immobilizasyon verimine etkisi	84
4.16	Farklı konsantrasyondaki kitosan çözeltileri kullanılarak elde edilen selüloz mikroküreler	84
4.17	İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon verimine etkisi	85
4.18	Farklı sürelerde immobilize edilen selüloz mikroküreler	85
4.19	Glutaraldehit konsantrasyonunun immobilizasyon verimine etkisi	86
4.20	Farklı konsantrasyonda glutaraldehit kullanılarak elde edilen selüloz mikroküreler	86
4.21	Çapraz bağlanma süresinin immobilizasyon verimine etkisi	87
4.22	Farklı sürelerde çapraz bağlanarak elde edilen selüloz mikroküreler	87
4.23	Protein miktarının immobilizasyon verimine etkisi	88
4.24	Farklı protein miktarlarıyla kurulan sistemlerden elde edilen selüloz mikroküreler	88
4.25	Optimum koşullarda immobilizasyonun tekrarlanabilirliği	89
4.26	Optimum sıcaklık	93
4.27	Optimum pH	94

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.28 pH kararlılığı	95
4.29 Termal kararlılık	96
4.30 Zamana bağlı termal kararlılık	97
4.31 Selülozın TPP ile değiştirilmemiş ve değiştirilmiş formlarının optimum koşullardaki immobilizasyon verimi	100
4.32 Mikrokürelerin pH'ya bağlı salınım potansiyelleri	101
4.33 pH'ya bağlı salınım sonrası mikrokürelerde mevcut aktivite değerleri	101
4.34 Tekrar kullanılabilirlik	103

TABLÖLER DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Selülaz üretiminde kullanılan mikroorganizmalar	9
2.2 Fungal selülaz komponentleri ile bakteriyel selülaz sistemlerinin karşılaştırılması	10
2.3 Bitki hücre duvarı yıkım enzimleri ve selülitik mikroorganizmaların zirai alandaki araştırma ve geliştirme örnekleri	18
2.4 Gastrik fitobezoarlar için tedavi protokolleri	28
2.5 İmmobilize enzimlerin geliştirilme aşamaları	37
2.6 Enzimlerin immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar ve sınıflandırılmaları	38
4.1 %80 (w/v) Amonyum sülfat çöktürmesinin ham ekstrakta etkisi	67
4.2 Selülaz enziminin TPP ile saflaştırılmasına ait sonuçlar	76
4.3 Selülaz enziminin immobilizasyon sonuçları	90
4.4 AS-mikrokürelerin pH'ya bağlı salınım ve salınım sonrası kalan aktivite değerleri	102
4.5 TPP-mikrokürelerin pH'ya bağlı salınım ve salınım sonrası kalan aktivite değerleri	102

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
dk	Zaman birimi (dakika)
L	Hacim birimi (litre)
mL	Hacim birimi (mililitre)
μL	Hacim birimi (mikrolitre)
μmol	Miktar birimi (mikromol)
N	Konsantrasyon birimi (normal)
M	Konsantrasyon birimi (molar)
mM	Konsantrasyon birimi (milimolar)
g	Ağırlık birimi (gram)
mg	Ağırlık birimi (miligram)
nm	Dalga boyu (nanometre)
U	Aktivite birimi (Unit)
α, β, γ	Yunan Alfabesi'nde 1, 2 ve 3 (alfa, beta, gama)
$^{\circ}C$	Sıcaklık birimi (Celcius)

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CBM/CBD	Carbohydrate binding module/domain (karbohidrat bağlayıcı birim)
CD	Katalitik domain
BG	Beta glukozidaz
TG	Transglutaminaz
TPP	Three-phase partitioning (Üçlü-faz ayırma)
CBH	Sellobiyohidrolaz
FFA	Serbest yağ asiti (Free fatty acid)
LMWC	Düşük molekül kütleli kitosan
NAD ⁺ /NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
BSA	Sığır serum albümini (Bovine serum albumin)
AS	Amonyum sülfat
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
DNS	3,5-dinitrosalisilik asit
EC	Enzim Komisyon Numarası (Enzyme Commission Number)

1. GİRİŞ

Selüloz, yeryüzünde en çok bulunan biyokütledir. Biyosferde geri dönüşümlü olarak en yüksek oranda üretilen biyokaynaktır ve karasal ortamdaki fotosenteze bağlı üretilen birincil üründür (Sethi et al., 2013). Doğal selüloz, β -1,4-glikozidik bağ ile birbirine bağlanmış D-glukoz ünitelerinden oluşan, dallanmamış bir homopolisakkarittir (Miettinen-Oinonen, 2004). Selülazlar, selüloz zincirinde yer alan β -1,4-glikozidik baği hidrolizlemekten sorumlu enzimlerdir. Funguslar, bakteriler, protozoalar, bitkiler ve hayvanlar tarafından üretilirler. Selülaz enzimi, farklı aminoasit dizileri ve kristal yapıları olan, farklı enzim sınıflarından olan katalitik alt birimlere sahiptir. Selülazlar, katalitik aktivite göstermeyen non-katalitik karbohidrat bağlayan uç (Noncatalytic carbohydrate-binding modules-CBMs) ve fonksiyonu bilinen ya da bilinmeyen ve C- ve N- uçlarında bulunabilen katalitik uçlara sahiptir (Zhang and Zhang, 2013).

Doğada selüloz hidrolizi endoglukanazlar (EC 3.2.1.4.), sellobiyohidrolazları (CBHs) (EC 3.2.1.91) da içeren ekzoglukanazlar ve β -glukozidaz (BG) (EC 3.2.1.21) olmak üzere üç tip enzimin birlikte çalışması ile gerçekleşmektedir (Zhang and Zhang, 2013).

Günümüzde, üçlü-faz ayırma tekniği (TPP) ile polisakkaritler, proteinler, enzimler, enzim inhibitörleri, yenilebilir yağlar ve küçük moleküller gibi pekçok biyoaktif bileşik; ucuz, hızlı ve “yeşil” bir metodla ve etkin bir şekilde ekstrakte edilip ayrıştırılabilmektedir. Dahası, metod oda sıcaklığında gerçekleştirilebilmekte ve ölçek büyötmeye olanak sağlamaktadır (Wang et al., 2019). Üçlü-faz ayırma tekniği (TPP), tuz çöktürmesi, izoelektrik nokta çöktürmesi ve solvent çöktürmesi metodlarını kombinleyerek çalışan bir ayırma ve saflaştırma tekniğidir (Liu et al., 2019).

Enzimler, bir reaksiyon ortamında, tek başına bir molekül olarak, diğer enzimlerle koordineli ya da bir başka moleküle yüzeyden tutunmuş/bağlanmış vaziyette olmak üzere farklı pozisyonlarda aktivite gösterebilmektedir. Enzimlerin bu bağlanmış vaziyetteki (immobilize) konumları ve görevleri de teknoloji

alanında onlardan yararlanmak amacıyla geliştirilmeye çalışılan noktadır (Brena and Batista-Viera, 2006). İmmobilize enzimler normal koşullar altında serbest enzimlere kıyasla stabilizasyon, lokalizasyon ve yönelim özellikleri açısından üstündürler. Bu üstün özellikleri ile de daha kolay kullanılırlar, tekrarlı kullanılabilirler ve maliyeti düşürürler (Costa et al., 2004).

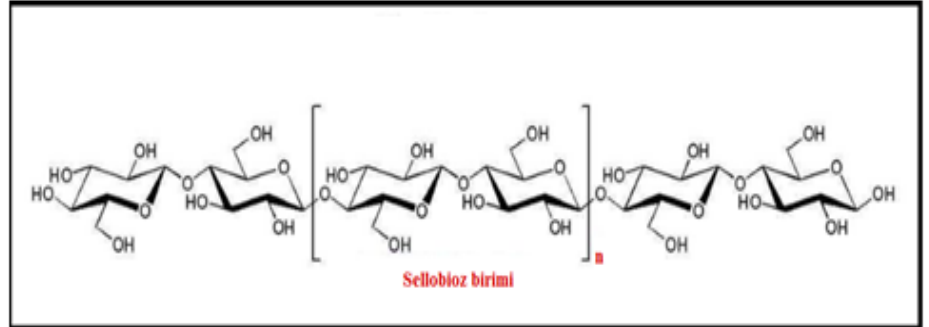
Bu çalışma kapsamında iki temel metod çalışılmış ve optimize edilmiştir. İlk olarak *Trichoderma reesei* kaynaklı ticari selüloz enzimi TPP metodu ile değiştirilmiştir. Bir sonraki denemede ise yine ticari selüloz, kalsiyum aljinat jelde tutuklama metodu ile immobilize edilmiştir. Son olarak da TPP ile değiştirilen selüloz, belirlenen optimum koşullarda immobilize edilip, Ca-Aljinat mikrokürelerden salınım potansiyelleri araştırılmıştır. Serbest ve immobilize selüloz enzimlerinin genel biyokimyasal özellikleri belirlenmiş ve kararlılık çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Selüloz ve Selülazlar

2.1.1. Selüloz

Selüloz, yeryüzünde en çok bulunan biyokütledir. Biyosferde geri dönüşümlü olarak en yüksek oranda üretilen biyokaynaktır ve karasal ortamdaki fotosenteze bağlı üretilen birincil üründür (Sethi et al., 2013). Doğal selüloz, β -1,4-glikozidik bağ ile birbirine bağlanmış *D*-glukoz ünitelerinden oluşan, dallanmamış bir homopolisakkarittir. Selülozun en küçük tekrarlı birimi, iki glukozun birbirine bağlanmasıyla oluşan sellobiozdur (Şekil 2.1). Doğada, selüloz zincirinin polimerizasyon derecesi (D.P) incelendiğinde, ağaç selülozunda yaklaşık 10000 glukoz birimi mevcutken, doğal pamuk selülozunda 15000 glukoz birimi bulunur (Miettinen-Oinonen, 2004).



Şekil 2.1 Selülozun genel yapısı (The University of Waikato, <http://sci.waikato.ac.nz/farm/content/plantstructure.html>, Erişim tarihi: 30.07.2019).

Pamuk selülozu incelendiğinde, bir pamuk fiberinin 15000 mikrofibrilden ve her mikrofibrilin 400 temel alt birimden oluştuğu görülmektedir. Bununla birlikte, her temel alt birim ise 6-8’li paketler halinde bütünleşmiş, 100’er adet selüloz zincirinden oluşmaktadır. Pamuk fiberleri, yapısında amorf ve düzensiz yapıları içeren kristalin fibrillerden oluşmaktadır. Pamuk fiberlerinin yaklaşık %70’i kristalin yapıdadır (Miettinen-Oinonen, 2004).

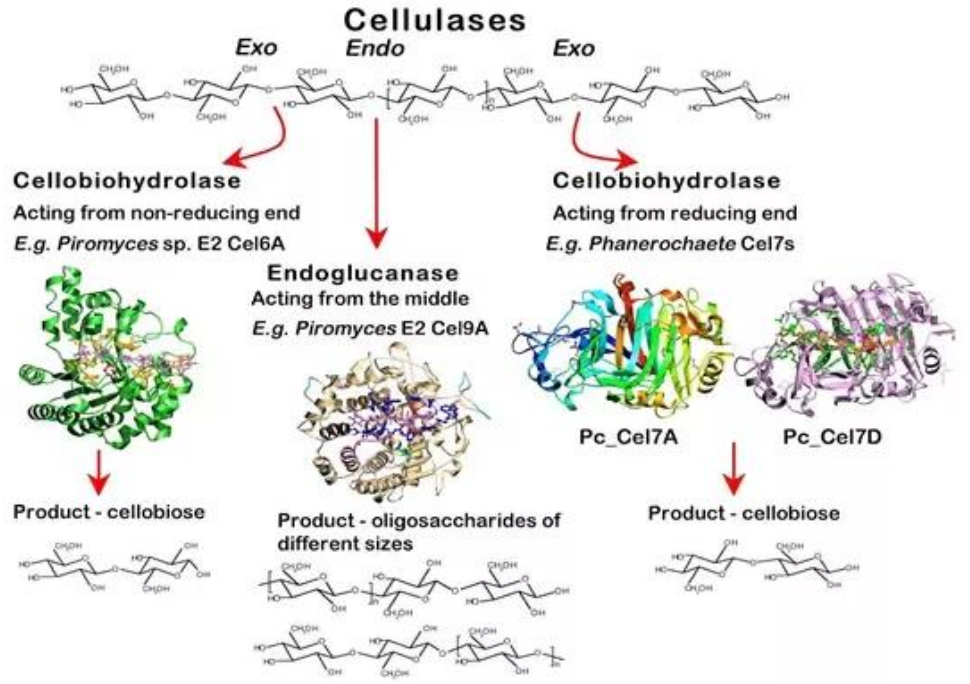
Selüloz, biyopolimerler arasında pek sık görülen bir özellik olmayan kristalin yapıda olma özelliğini içerir. Kristalin yapıdaki selüloz zincirleri, zincir içi ve zincirler arası hidrojen bağları ve zayıf Van-der Waals kuvvetleri ile istiflenmiş, yani sert ve sıkıca şekillenmiştir. Doğada selüloz bazı kaynaklarda oldukça saf halde bulunurken, çoğu kaynakta hemiselüloz ve lignin gibi yapıların arasına gömülü vaziyette konumlanır. Selülozun bu kristalin yapısının en önemli özelliklerinden biri, enzimler gibi yüksek moleküllü yapıların yanı sıra su gibi küçük moleküllü bileşenlere dahi kısmi geçirgen davranabilmesidir. Polimerin yapısında bulunan kristalin ve amorf yani düzenli olmayan yapılar neticesinde, molekül yüzeyinde de farklı çeşitlilikler oluşur. Yüzeydeki bu heterojenite sayesinde, sulu ortamda şişme sonucu mikro gözenekler oluşabilmekte ve bu oluşan kaviteler enzim gibi büyük moleküllerin geçişine müsaade etmektedir (Sukumaran et al., 2005). Özetle, doğal selüloz ile kristalin selüloz kıyaslandığında, doğal selüloz daha az oranda ve dizilimde amorf ve parakristalin yapılar içerir.

Miettinen-Oinonen (2004)'e göre altı farklı polimorfik selüloz (I, II, III₁, III₂, IV₁ ve IV₂) saptanmıştır. Selüloz I, doğada bulunan doğal selüloz olup, zamanla selüloz I α ve selüloz I β olmak üzere iki kristalin formu oluşturmaktadır. Selüloz II, selüloz I'in rejenerasyonu ile oluşan farklı bir formudur. Selüloz III₁ ve selüloz III₂, selüloz I ve II'nin sıvı amonyak ile muamelesi sonucu elde edilen formlarıdır. Son grup olan selüloz IV₁ ve selüloz IV₂ ise selüloz III₁ ve selüloz III₂'nin ısıtılma işlemiyle elde edilen formlarıdır (Miettinen-Oinonen, 2004).

2.1.2. Selülozun Hidroliz Mekanizması ve Selülazlar

Selülazlar, selüloz zincirinde yer alan β -1,4-glikozidik bağı hidrolizlemekten sorumlu enzimlerdir. Funguslar, bakteriler, protozoalar, bitkiler ve hayvanlar tarafından üretilirler. Selülaz enzimi, farklı aminoasit dizileri ve kristal yapıları olan, farklı enzim sınıflarından olan katalitik alt birimlere sahiptir. Selülazlar, katalitik aktivite göstermeyen non-katalitik karbohidrat bağlayan uç (Noncatalytic carbohydrate-binding modules-CBMs) ve fonksiyonu bilinen ya da bilinmeyen ve C- ve N- uçlarında bulunabilen katalitik uçlara sahiptir.

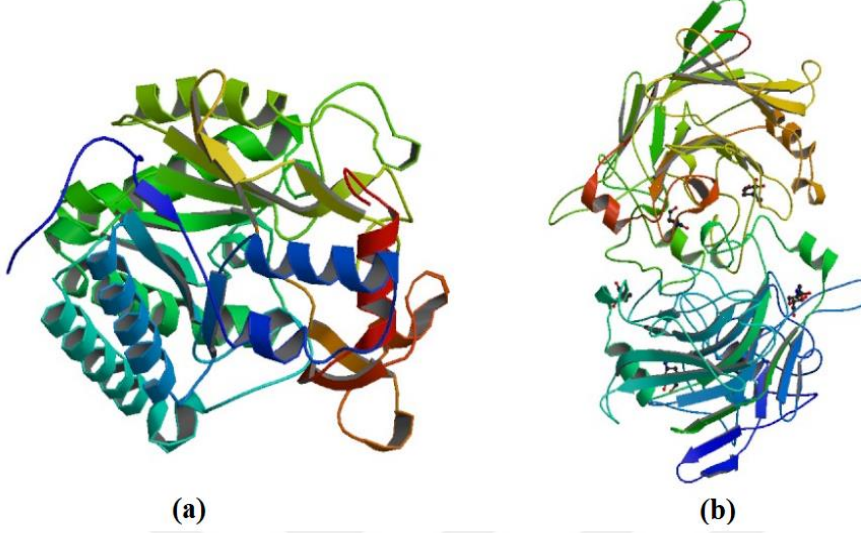
Doğada selüloz hidrolizi endoglukanazlar (EC 3.2.1.4.), sellobiyohidrolazları (CBHs) (EC 3.2.1.91) da içeren ekzoglukanazlar ve β -glukozidaz (BG) (EC 3.2.1.21) olmak üzere üç tip enzimin birlikte çalışması ile gerçekleşmektedir (Zhang and Zhang, 2013). Endoglukanazlar, selüloza rastgele noktalardan atak yaparak, uzun glukoz zincirlerini daha kısa zincirlere hidrolizlemektedir. Böylelikle her yeni kısa zincirin aktif iki ucu meydana çıkmış olmaktadır. Ardından ekzoglukanazlar bu aktif uçlara saldırıp hidrolizasyonu sağlar ve neticede sellobioz ve glukoz üniteleri açığa çıkarır. En son olarak ise β -glukozidazlar sellobiozları ve diğer küçük oligo-sakkaritleri glukoz moleküllerine hidrolizler (Gaur and Tiwari, 2015). Şekil 2.2’de selülozun ekzo ve endo hidrolizasyon aşamaları verilmiştir.



Şekil 2. 2 Selülazların atak noktaları (<https://www.quora.com/What-does-cellulase-break-cellulose-down-into>. Erişim tarihi: 31.07.2019).

Druzhinina ve Kubicek (2017) yaptıkları araştırma sonucunda, *Trichoderma reesei*'nin beş farklı glikozid hidrolaz (GH) ailesine ait selülitik enzimleri üretebildiğini belirtmişlerdir. Bunlar, endo- β -1,4-D-glukanaz ailesine ait GH5, GH7, GH12 ve GH45; sellobiyohidrolaz ailesine ait GH6 ve GH7'den oluşmaktadır. GH7 her iki gruba da ait tek üyedir ve GH7A (eski adı ile

sellobiyohidrolaz 1) ve GH7B (eski adı ile endoglukanaz 1)'den oluşmaktadır (Druzhinina and Kubicek, 2017). *T. reesei* kaynaklı sellobiyohidrolaz II ve endoglukanaz I enzimlerinin üç boyutlu yapıları Şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2. 3 *Trichoderma reesei* kaynaklı selülitik enzimlerin üç boyutlu yapıları (a); sellobiyohidrolaz II ve (b); endoglukanaz I ((a); <https://www.rcsb.org/structure/3CBH> ve (b); <https://www.rcsb.org/structure/1EG1>, Erişim tarihi: 31.07.2019).

2.1.3. Selüloz Bağlayıcı Domain (CBD) ve Katalitik Domain (CD)

Temelde tüm enzimler substratlarına atak yaparken iki farklı bağlanma bölgesi üstünden hareket eder. Birincisi katalitik domain (Catalytic domain, CD) dediğimiz enzimin aktif bölgesidir, diğeri ise fonksiyonel ve yapısal farklılıkları olan karbohidrat/selüloz bağlama noktasıdır (Carbohydrate binding domain, CBD). Bu iki domain birbirine, esnek bir kol görevi gören bir peptid bağı ile bağlı konumdadır. Özellikle selülazların yapısı incelendiğinde, büyük bir kısmında bir adet selüloz bağlayıcı domain (CBD) ve bir adet katalitik domain (CD) içerdikleri belirlenmiştir.

1940'ların sonuna doğru Reese ve arkadaşları, kristalin selülozun hidrolizi sırasında işlevsel yolağı bilinmeyen ve katalitik-olmayan bir bölgenin (C_1) (bugün karbohidrat bağlayan domain (CBD) diye adlandırdığımız) varlığını tespit etmiş olup, bu bölgenin, substratın aktif katalitik bölgeye (C_x) (bugün katalitik domain (CD) dediğimiz bölge), yaklaşmasını kolaylaştırdığını ifade etmişlerdir. Bunun

neticesinde, CBD karbohidrat hidrolizleyen enzimlerde bulunan ve karbohidrat bağlama görevi üstlenen aminoasit dizisi olarak tanımlanmıştır (Lakhundi et al., 2015). 2015 yılındaki verilere bakıldığında, 50 farklı canlı grubundan izole edilen 500'den fazla CBD dizi incelendiğinde; CBD'ler aminoasit sıralamasına, yapısına ve bağlama kapasitesine göre 64 farklı familyaya sınıflandırılmıştır. Ancak tüm CBD'ler selüloza bağlanabilir özellikte değildir. Bazı familyalara ait CBD'ler, kitin, nişasta ve ksilan gibi diğer karbohidratlara spesifik bağlanma özelliğine sahiptir. Kimi CBD'ler ise bir ya da daha fazla polimere spesifik bağlanma özelliği gösterebilirler. Özetle CBD'ler, karbohidrat hidrolizleyen enzimlere özgü bir yapı bileşenidir (Lakhundi et al., 2015).

Selülazların yapısında bulunan en uzun dizi, katalitik aktiviteye sahip domainidir. Gen delasyonu (silme) ve proteolitik trankasyon (kesme) gibi işlemler, katalitik domainlerin (CD), katalitik aktiviteden sorumlu ve özel substrat spesifiklikleri olan yapılar olduğunu göstermiştir. Selülazlara ait CD'ler önemli ölçüde çeşitliliğe sahip olmalarının yanı sıra, sahip oldukları protein dizisi benzerliği neticesinde glikozid hidrolaz grubuna da girmektedirler. Glikozid hidrolazlar, karbohidratların kendi arasındaki ya da karbohidrat ve karbohidrat olmayan bileşiklerin arasında bağı hidrolizlemekten sorumlu enzim grubudur.

Aynı familyadaki enzimler sahip oldukları aminoasit dizileri ve katlanmaları ile benzer oldukları için sınıflandırılır. Buradan hareketle örneğin, enzim familyası 5 (selülazlar, ksilanazlar ve mannazları içeren aile) aynı aileye ait farklı üyelerin, farklı protein spesifiklikleri geliştirmesi sonucu, evrim sürecinde farklı görevler de kazanarak ilerlediğinin bir göstergesidir. Bir de tam tersi açıdan baktığımızda, benzer substrat spesifiklikleri olan enzimler, farklı ailelerde bulunabilir. Buna örnek olarak selülazlar; familya 5, 6, 7, 8, 9, 12, 44, 45, 48, 61 ve 74'ün tamamında yer almakta ve toplamda 11 familyanın içerisinde sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırma, 5000'den fazla glikozil hidrolazın 130 ayrı familyaya sınıflandırılmasını da içermektedir (Lakhundi et al., 2015).

CBD'lerin proteolitik trankasyonu (kesme) sonrası X-ray kristalografi ölçümleri ile CD'lerin 3 boyutlu yapılarının gözlenmesi mümkündür. Örneğin, glikozil hidrolaz 6 familyasında bulunan ve *Trichoderma reesei* türüne ait

sellobiyohidrolaz II (CBH II) enzimi incelendiğinde, 5 α -heliks ve 7 β -katlanmasına sahip olduğu ve α/β katlanmasına sahip büyük bir protein olduğu tespit edilmiştir (Lakhundi et al., 2015).

Selülitik mikroorganizmalar, genelde büyümeleri esnasında lipidleri ve proteinleri kullanamayan/sindiremeyen canlılardır ve dolayısı ile öncelikli enerji kaynakları karbohidratlardır. Başta *Cellulomonas* ve *Cytophaga* bakterileri ve pek çok fungus olmak üzere selülitik mikroorganizmalar, selüloz dahil pek çok çeşitteki karbohidratı sindirebilirler. Ancak buna rağmen anaerobik selülitik türler, selüloz ve diğer hidrolitik yan bileşenleri olmak üzere sınırlı enerji kaynağına sahiptir. Fungusların belli bir kısım türü ve bazı diğer mikrobiyal türler, yüksek miktarda ekstraselüler protein salınımı gerçekleştirmektedir. Bu salınım kabiliyetindeki türlerde, ekstraselüler selüloz sentezi de oldukça uygundur. Bu türlerden, selüloz ve türevi bileşikleri glukoza hidrolizleyen ve en çok çalışılmış olanı *Trichoderma reesei*'dir. Yapılan çalışmalarda en çok kullanılan fungal türler; *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium*, *Aspergillus* iken bakteriyel ve basil türler ise; *Pseudomonadlar*, *Cellulomonaslar*, ve son olarak *Actinomycete* ve *Streptomyces* türlerinden de *Actinomucor* ve *Streptomyces*'lerdir (Sukumaran et al., 2005).

Pek çok fungus türü selülozu enerji kaynağı olarak kullanabilmektedir ancak bununla birlikte tüm türler selülaz enzimler kompleksinin tamamını üretememektedir. *T. reesei* ile birlikte ayrıca, *Humicola*, *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri oldukça yüksek kapasitede ekstraselüler selülazlar üretebilmektedirler. Ayrıca *Cellulomonas*, *Cellovibrio* ve *Cytophaga* türündeki bakteriler ise saf kültür ortamlarında selüloz hidrolizleme etkinliği göstermektedirler. Selülaz üretimi için, ticari arenada kullanılan mikroorganizmalar ise *T. reesei*, *H. insolens*, *A. niger*, *T. fusca*, *Bacillus sp.* ve birkaç diğer türdür. Ticari alanda selülaz üretimi için kullanılan türler aşağıda Çizelge 2.1.'de verilmiştir (Sukumaran et al., 2005).

Çizelge 2. 1 Selülaz üretiminde kullanılan mikroorganizmalar (Sukumaran et al., 2005).

TÜR	GENUS	ALT TÜRLER
FUNGUS	<i>Aspergillus</i>	<i>A.niger</i> , <i>A.nidulans</i> , <i>A.oryzae</i> (rekombinant)
	<i>Fusarium</i>	<i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i>
	<i>Humicola</i>	<i>H. insolens</i> , <i>H. grisea</i>
	<i>Melanocarpus</i>	<i>M. albomyces</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>P. brasilianum</i> , <i>P. occitanis</i> , <i>P.decumbans</i>
	<i>Trichoderma</i>	<i>T. reesei</i> , <i>T. longibrachiatum</i> , <i>T. harzianum</i>
BAKTERİ	<i>Acidothermus</i>	<i>A. cellulolyticus</i>
	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp</i> , <i>B. subtilis</i>
	<i>Clostridium</i>	<i>C.acetobutylicum</i> , <i>C. thremocellum</i>
	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. cellulosa</i>
	<i>Rhodothermus</i>	<i>R. marinus</i>
AKTİNOMİSETLER	<i>Cellulomonas</i>	<i>C.fimi</i> , <i>C. bioazotea</i> , <i>C. uda</i>
	<i>Streptomyces</i>	<i>S. drozdowiczii</i> , <i>S. Sp</i> , <i>S. Lividans</i>
	<i>Thermononospora</i>	<i>T. fusca</i> , <i>T. curvata</i>

2.1.4. Selülaazların Biyokimyasal Özellikleri

Mikrobiyal selülaazlar genellikle, biyokimyasal nitelikleri bakımından kaynağından bağımsız olarak benzer optimum çalışma karakteri göstermektedir. Çizelge 2.2’de verildiği üzere selülaazlar için optimum çalışma pH’ı 4,0-6,5 arasında olmakla birlikte optimum çalışma sıcaklığı ise 44-65 °C arasında değişmektedir (Liao et al., 2011).

Çizelge 2.2 Fungal selülaaz komponentleri ile bakteriyel selülaaz sistemlerinin karşılaştırılması (Liao et al., 2011).

	EC #	Moleküler Ağırlık (kDa)	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)
Fungal Selülaazlar				
<i>T. reesei</i> sellobiyohidrolaz I (Cel7A)	3.2.1.91	54.1	4	60
<i>T. reesei</i> sellobiyohidrolaz II (Cel6A)	3.2.1.91	49.6	5	44
<i>T. reesei</i> endoglukanaz I (Cel7B)	3.2.1.4	48.2	5	60
Bakteriyel Selülaazlar				
<i>C. phytofermentans</i> (Cel48)	3.2.1.91	98.5	5-6	60
<i>C. phytofermentans</i> (Cel9)	3.2.1.4	104.8	6.5	65
<i>B. subtilis</i> (Cel5)	3.2.1.4	52.4	6	60

Selülozların stabilite açısından nitelikleri incelendiğinde; pH 5-10 arasında stabil oldukları söylenebilmektedir. Yine pek çok çalışma sonucunda, termostabil selülozların 60-100 °C arasında stabil olduğu, hatta 100 °C’de hala %50 aktivite gösterdiği ifade edilmektedir (Gaur and Tiwari, 2015).

Gaur ve Tiwari 2015’de yaptıkları çalışmada, *Bacillus vallismortis* RG-07 selülozının 10 mM konsantrasyondaki Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Na^{1+} iyonları tarafından aktive olduğunu belirlemişlerdir. Yine aynı çalışmada, selüloz enziminin Mn^{2+} ve Hg^{2+} iyonları varlığında ise şiddetli inhibisyona uğradığını belirtmişlerdir. Hg^{2+} iyonunun selülozı inhibe ettiği reaksiyona ilişkin ise literatürdeki veri; Hg^{2+} iyonunun enzimin protein zincirinde yer alan tiol gruplarına, triptofan uzantılarına ya da karboksil gruplarına bağlanması sonucunda inhibe ettiği yönündedir (Gaur and Tiwari, 2015).

Selüloz enziminin aktivitesine organik solventlerin etkisinin incelenmesi amacıyla 2015 yılında Gaur ve Tiwari *Bacillus vallismortis* RG-07 selülozunu n-dodekan, n-dekan, ksilen, izo-oktan, toluen, n-hekzan, n-bütanol, aseton, metanol ve siklohekzan ile muamele etmişlerdir. Tüm organik solventler, selüloz enzimini aktive etmiştir. Herhangi bir inhibisyon etkisi gözlenmemiştir (Gaur and Tiwari, 2015).

Surfaktanların selüloz enziminin aktivitesine etkisini inceleyen Gaur ve Tiwari, *Bacillus vallismortis* RG-07 selülozının %1 (w/v) SDS varlığında hala aktivitesinin %95’ini koruyabildiğini saptamışlardır. Ayrıca Ariel marka deterjan varlığında, bir saat 65 °C’de ön inkübasyonun ardından aktivitesinin %89’unu koruyarak deterjanlar içinde en iyi performansı bu markada gösterdiğini belirlemişlerdir (Gaur and Tiwari, 2015).

2.1.5. Selülozın Endüstriyel Kullanım Alanları

Selülozlar kağıt hamuru ve kağıt endüstrisi, tekstil ve deterjan endüstrisi, gıda ve hayvan yemi endüstrileri, bira ve şarap endüstrileri, zirai endüstriler, biyoetanol ve biyoyakıt endüstrileri ile sağlık/medikal endüstrisi başta olmak üzere pek çok alanda kullanılmaktadır. Bu kullanım alanları ile de endüstriyel

enzim piyasasında oldukça önemli bir paya sahiptir. Selüloz pazarı büyük bir hızla büyümeye devam edecektir (Zhang and Zhang, 2013).

2.1.5.1. Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisi

Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde selülazların kullanımı son 10 yıllık süreçte oldukça hızlanmıştır. Ahşap metaryellerin arıtılması ve öğütülmesi için gerçekleştirilen mekanik hamurlaştırma/presleme sistemleri, hamur oluştururken ayrıca çok küçük, çok büyük ve sert parçalar da meydana getirmektedir. Aksine, selülazların kullanıldığı biyomekanik sistemler ile yapılan arıtma işlemlerinde % 20-40 gibi yüksek bir enerji kazancı sağlanırken, yaprak kalitesinde de iyileşmeler elde edilir (Kuhad et al., 2011).

Endoglukonaz I ve II'lerin ve hemiselülazların karışımı olan selülaz karışımları ile hamurlaştırma esnasında kağıt millerinin akış hızını ve dövülme gücünü artırmak amacı ile fiber kalitesi geliştirme çalışmaları gerçekleştirilmektedir. Mansfield ve arkadaşları, Kaliforniya ladininden elde edilen farklı kağıt hamuru fraksiyonlarını, ticari selülazlar ile muamele etmiştir. Yaptıkları çalışma neticesinde, selülazların fiber kalınlığını azaltarak defibrilasyon oranını düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Endoglukonazlar düşük hidrolizasyon derecelerinde bile hamur viskozitesini düşürürken, ayrıca selülazların ksilanazlar ile kıyaslandığında, çam ağacı kağıt hamurunu ağartma oranının çok yüksek olduğu bilinmektedir (Kuhad et al., 2011).

2.1.5.2. Tekstil ve deterjan endüstrileri

Selülazlar, tekstil endüstrisinde genelde denim kumaşlarda taşlanmış görüntüyü oluşturmak için biyopolisaj işlemlerinde ve ayrıca ev deterjanlarında, pamuklu kumaşlarda yumuşaklığı ve parlaklığı artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Renklerin korunması, ürünün temizlenmesi ve renk kaçağının önlenmesi uygun bir yıkama tozu ya da deterjanı ile mümkündür. Selülazların tekstil ve deterjan sanayinde kullanımı, yapılan karışımdaki enzimin alkali ortamda çalışabiliyor olması ve sıcaklığa dayanıklılığı ile mümkün olmaktadır ve selülazların çalışması bu şartların sağlanmasına bağlıdır (Menendez et al., 2015).

Tekstil sanayinde selüloz kaynağı olarak, en sık kullanılan mikroorganizma funguslardan *Trichoderma reesei*'dir. Bununla birlikte bazı bakteriyel kaynaklar da tercih edilmektedir. Örnek olarak; *Actinomyces* genusuna ait *Streptomyces* ve *Thermobifida* ve diğer genuslardan olan *Pseudomonas* ve *Sphingomonos*, tekstil sektöründe boyanın uzaklaştırılması ve parçalanmasında güvenle kullanılan selüloz kaynaklarıdır (Menendez et al., 2015).

Bazı diğer enzimler ile kombinlenmiş selülozlar, termal ve/veya alkali koşullar altında ve su varlığında kimyasal bağları katalizlemesi amacıyla deterjanlara eklenmektedirler. Denim fiberlerinin enzimatik prosesi için alkali ya da nötral koşulların daha uygun olduğu tespit edildikten sonra, Anish ve arkadaşları yaptıkları çalışmalar neticesinde, fungal kaynaklı ticari enzimlerin aksine *Thermomonospora sp.* kaynaklı endoglukanazın alkalın-stabil özelliğinden ötürü tercih edilmesini önermişlerdir. Ayrıca *Bacillus* genusunun selülozları ve/veya endoglukanazları yüksek potansiyelde üretme kapasitelerinin olduğunu belirtmişlerdir. Ladeira ve arkadaşları ise termofilik bir bakteri genusu olan *Bacillus sp.* SMIA-2'nin selüloz üreticisi olduğunu saptamışlardır. Yaptıkları çalışmada, farklı sıcaklıklar ve farklı markalara ait ticari deterjanların bulunduğu ortamlar ile muamele ettikleri enzimin, işlem sonrası hala aktivitesini koruyabildiğini gözlemlemişlerdir (Menendez et al., 2015).

Deterjan endüstrisinde yaygın olarak kullanılan selülozlar, endoglukanaz III ve selobiyohidrolaz I'dir. Pekçok raporda *T. reesei* kaynaklı endoglukanaz III'ün deterjan sanayinde kullanıldığı ifade edilmektedir. Ayrıca *T. viride*, *T. harzianum* ve *A. niger* de doğal selüloz kaynağı olarak tercih edilen mikroorganizmalar arasındadır. Bu kaynaklara ilave olarak, *Humicola* (*H. insolens* ve *H. grisea* var. *thermoidea*) türlerinden elde edilen selüloz karışımlarının, hafif alkali ve yüksek sıcaklıklarda aktivitesini koruyabilme potansiyelinden ötürü, yıkama tozlarına ve deterjanlara yaygın olarak ilave edildiği ifade edilmiştir (Sukumaran et al., 2005).

2.1.5.3. Gıda ve hayvan yemi endüstrileri

Selülozlar gıda sektöründe; sebze ve meyve sularının üretiminde ekstraksiyon ve berraklaştırmak amacıyla, meyve nektar ve pürelerinin üretimi proseslerinde ve zeytinyağı ekstraksiyonu sırasında kullanılmaktadır. Glukanazlar, bira üretiminde arpanın maltlaşması/çimlenmesi için kullanılırken, şarap endüstrisinde ise sindirime hazır forma getirmek ve renk ekstraksiyonu esnasında eksojen hemiselülozlar ile birlikte kullanılır. Selülozlar ayrıca, gıda boya maddesi üretmek için karatenoid ekstraksiyonu proseslerinde de kullanılmaktadır (Sukumaran et al., 2005).

Hemiselülozları ve pektinazları içeren enzim preparatları hazırlanarak, yem sanayinde besinin içeriğinin zenginleşmesi amacıyla kullanılmaktadır. Selülozların kullanıldığı yemlerin verildiği hayvanlarda hem performans hem de sindirilebilme açısından gelişmeler olduğu bildirilmiştir. Bedford ve arkadaşları tahıl temelli beslenme koşullarında, *Trichoderma* kaynaklı selülozların gıda katkı maddesi olarak kullanıldığında, besin dönüşüm oranını geliştirdiğini ve sindirilebilirliği artırdığını ifade etmişlerdir (Sukumaran et al., 2005).

β -Glukanazlar ve ksilanazlar ayrıca tek mideli hayvanların nişasta içermeyen β -glukanlar ve arabinoksilanları sindirebilmesini sağlamak amacıyla kullanılmaktadırlar. Selülozlar proteazlarla birlikte özellikle büyük ölçüde domuz etinin niteliklerinin gelişmesi amacıyla, yem katkı maddesi olarak kullanılırlar. Glukanazlar yine ksilanazlar ile birlikte domuz ve kümes hayvanlarının besininde, çavdar ve arpa içeren yüksek fiberli yemlerin sindirimini kolaylaştırmak amacıyla kullanılmaktadırlar. Bu enzimler ayrıca tavuklar ve domuz yavrularında daha zengin beslenmeyi sağlayarak kilo artışını da sağlamaktadır.

Hayvan yemi sanayinde kullanılan düşük kaliteli yemler, yüksek kaliteli yemlere kıyasla daha yüksek miktarda selüloz, düşük miktarlarda yağ ve protein ve nispeten yüksek kül oranı içermektedir. Selülozlar ayrıca, büyükbaş hayvanların, yüksek miktarlarda ve tamamı sindirilebilir içerikte ve enerji kaynağı olarak kullanılabilen bununla birlikte küçük miktarlarda suda çözünen karbohidratlar içeren çimleri daha kolay sindirebilmeleri amacıyla

kullanılabilmektedirler. Geviş getiren hayvanların besinleri; selüloz, hemiselüloz, pektin ve lignin içerikleri dolayısı ile kümes hayvanları ve domuzların tahıl bazlı beslenmelerine kıyasla daha kompleks bir yapıya sahiptir. Yemlerde besleyiciliği artırmak üzere selülaz, hemiselülaz ve pektinaz karışımlarını içeren enzim preparatları kullanılmaktadır. Ancak, selülaz, hemiselülaz ve pektinaz içerikli enzim preparatlarının geviş getirenlerin beslenmesinde her zaman aynı başarıyla çalışmadığı sonuçlar da bildirilmiştir.

Hayvan yemi üretimi sektöründe, muhtemel viral ve mikrobiyal kontaminasyonlara karşı ısıtma işlemi uygulanmaktadır. Yine bu sektörde termofilik selülaz kullanımı ise patojenleri azaltırken diğer bir yandan sindirilebilirliği artırmaktadır. Bu işlem sayesinde hem ısıtma işlemi ile patojenitenin azaltılması hem de sindirilebilirliğin artırılması tek adımda gerçekleştirilmiş olmaktadır. Selülazlar ve hemiselülazlar, ligninoselülozik materyallerin kısmi hidrolizinde de kullanılmaktadırlar. Bu kısmi hidrolizlere örnek olarak; tahıl tanelerinin kabuklarının çıkarılması, β -glukanların hidrolizi ve hayvan yemlerinin besinsel içeriğinin gelişimini sağlayan daha iyi emülsifiye olma ve esneklik kabiliyetlerinin geliştirilmesi aşamaları söylenebilmektedir. Dahası bu enzimler sayesinde, yeşil ya da kuru saman haldeki yemlerin stoklama esnasında bitkisel hücre duvarlarının hidrolizasyonu da gerçekleşmiş olmaktadır (Kuhad et al., 2011).

2.1.5.4. Bira ve şarap endüstrileri

Mikrobiyal glukanazlar ve beraberinde polisakkaritler bira ve şarap gibi alkollü içeceklerin üretiminde, fermentasyon aşamasında önemli görevler üstlenirler. Bu enzimler fermente ürünlerin hem kalitesini hem de üretim verimini artırmaktadır. Glukanazlar, sisteme hem mayşeleme/ezme esnasında hem de glukanların hidrolizasyon aşaması olan primer fermentasyonda eklenmektedir. Bu eklemeler sayesinde hem bitki viskozitesi düşürülürken hem de filtrelenebilirlik özelliği geliştirilmiş olmaktadır.

Şarap endüstrisinde pektinazlar, hemiselülazlar ve glukanazlar gibi enzimler; renk elde edilmesi, yüzey maserasyonu, sıra durulanması, filtrasyon ve

en son olarak da şarap kalitesinin ve stabilizasyonunun sağlanması amacıyla oldukça aktif ve önemli roller üstlenirler. β -glukozidazlar, şarabın aromasını geliştirmek amacıyla glikozil türevli bileşiklerin modifiye edilmesinde kullanılırlar. Maserasyon enzimleri ayrıca şarap fermentasyonu esnasında, üzümün preslenebilirliğini ve çöktürülebilirliğini geliştirirken üzüm suyunun verimini de artırmaktadır. Belirli birtakım enzim preparatları mevcutta şarap endüstrisinde kullanılmaktadır. Bu enzimlerin şarap endüstrisinde temel kullanım sebepleri; daha iyi maserasyonun sağlanması, rengin geliştirilmesi, daha kolay berraklaştırma, daha kolay filtreleme ile kalite ve stabilizasyonun korunmasıdır (Kuhad et al., 2011).

Bira endüstrisi, çimlendirme/ maltlaştırma ve fermentasyon aşamalarında enzimlerin aktifleşmesi esasına dayanır. Arpanın maltlaşması, tohumun çimlenmesini sağlamak amacıyla sentezlenen ve aktive edilen α - ve β -amilazlar, karboksipeptidazlar ve β -glukanazlar ile gerçekleştirilmektedir. Oksanen ve arkadaşları *Trichoderma* kaynaklı endoglukanaz II ve ekzoglukonaz II ile kurulan sistemde hem polimerizasyon değerinin düştüğünü hem de bitki vizkozitesinin azaldığını saptamışlardır (Kuhad et al., 2011).

Galante ve arkadaşları şarap üretimi konusunda yaptıkları çalışmada, bazı maserasyon enzimlerini birlikte kullanarak üzüm preslenebilirliğinde, çöktürme oranında ve total üzüm suyu veriminde önemli ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmeyi amaçlamışlardır. Bu noktada pektinazlar, hemiselülazlar ve selülazlar arasında doğru birleştirme oranını kullanmaya çalışmışlardır. Soave, Chardonnay ve Sauvignon cinslerinde üç farklı beyaz üzüm kaynağı ile ve Cytolase 219 isimli selülaz, pektinaz ve ksilanaz içerikli ticari enzim ile çalışmışlardır. Yaptıkları çalışma neticesinde; ilk sıra üretimi esnasında ekstrakt miktarında %10-35 oranında artış, sıra filtrasyon oranında %70-80 oranında artış, presleme süresinde 50-120 dk kısalma, sıra viskozitesinde %30-70 oranında düşme ve fermentörün soğutulması için kullanılan enerjide %20-40 oranında tasarruf sağlanmış olup bununla birlikte şarap stabilitesinde de oldukça belirgin bir gelişme kaydedilmiştir. Gelecekte, selülaz ve pektinazların geliştirilmesi ile elde edilen ve mevcut sistemlere haricen eklenebilen enzimatik süreçler ile üretimsel verimliliklerin artırılması ümit edilmektedir (Kuhad et al., 2011).

2.1.5.5. Zirai endüstriler

Selülaazlar, hemiselülaazlar ve pektinazlardan oluşan enzim karışımları Çizelge 2.3'te verildiği üzere geniş bir araştırma alanında kullanılmaktadır. Ayrıca bu enzimler ve funguslar zirai alanda bitki büyümesi ve gelişimini sağlayan, hastalıklarla mücadele çalışmalarında önemli kullanım potansiyeline sahiptirler (Bhat, 2000).

Trichoderma ve *Penicillium* gibi fungal türlerden elde edilen selülaazlar ile diğer polisakkaridazların karışımları, bitkisel ve fungal protoplastların üretiminde kullanılmaktadır. Bu protoplastlar istenen niteliklere sahip hibrit ya da mutant türlerin oluşumunda kullanılabilirler. Ayrıca selülaazlar ve benzer enzimler, ticari çıkarlar doğrultusunda yüksek enzim üretme potansiyeline sahip yeni jenerasyonlar elde etmek için de kullanılabilirler (Bhat, 2000).

1986 yılında Brown ve arkadaşları, *Penicillium* türüne ait bazı mutant ve doğal fenotipli protoplastları elde etmek amacıyla, bir dizi ticari ve firma içi selülaazla çalışmışlardır. Çalışma neticesinde, katı formdaki buğday kepeği ortamında büyütülen *Trichoderma viride* Persoon (strain BIA) ile *P. Pinphilum* hücre duvarlarının katman halinde dizilip su altına konduğu besiyerinde yetişen *Penicillium pinophilum* 87160iii sekanslarından elde edilen enzimlerin fungal protoplast üretiminde en iyi kaynaklar olduğunu saptamışlardır. Özetle, selülaaz ve hemiselülaaz aktivitesine sahip karışımlar, bitkisel ve fungal protoplast üretiminde başarı ile kullanılabilmektedir (Bhat, 2000).

Bazı bilinen funguslardan elde edilen selülaazlar ve benzer enzimler, bitki hastalıklarıyla mücadelede bitki patojenlerinin hücre duvarının yıkımında kullanılmaktadır. *Trichoderma harzianum* P1 straininden izole edilen β -1,3-glukanaz ve N-asetil-glukozaminin sinerjetik çalışması neticesinde, *B. cinerea* türünün sporlanması ve çimlenme yolağının inhibe edildiği raporlanmıştır. Başka bir çalışmada, *Trichoderma harzianum* CECT 2413 kaynaklı β -1,3-glukanazın *R. solani* ve *Fusarium sp.* türlerini hifsel şişme gibi morfolojik değişikliğe uğrattığı, sitoplazmasında sızıntıya sebep olduğu, çeşitli bölmeler oluşturduğu ve ayrıca

Çizelge 2. 3 Bitki hücre duvarı yıkım enzimleri ve selülitik mikroorganizmaların zirai alandaki araştırma ve geliştirme örnekleri (Bhat, 2000).

Enzim/ Mikroorganizma	Fonksiyon	Uygulamalar
Selülaazlar, hemiselülaazlar ve pektinazların karışımı	Bitki ya da funguslara ait hücre duvarı yıkımı	Bitki ya da fungus protoplastları ile hibrit ve mutant çalışmalar
Selülaazlar ve <i>Trichoderma</i> sp. ve <i>Geocladium</i> kaynaklı β -1,3 ve β -1,6 glukanaazlar gibi ilintili enzimler	Germ tüpünün uzaması, fungal büyüme ve sporların çimlenmesi proseslerinin inhibisyonu	Bitki patojenleri ve hastalıklarıyla mücadele
<i>Trichoderma</i> sp., <i>Geocladium</i> sp., <i>Chaetomium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>Fusarium roseum</i>	Tohum çimlenmesinin artırılması, bitki büyümesi ve çiçeklenmesi, kök sisteminin geliştirilmesi, mahsul veriminin artırılması	Tarım
Selülaazlar ve selülozomlara (selülitik kompleks yapılar) ait CBD'ler; dokerinler, kohezinler ve selülozomun bağlantıları	Afinite tag, afinite sistemleri, konjugasyon ve gen füzyonu	Proteinlerin, enzimlerin ve antibadilerin afinite saflaştırılmaları, immobilizasyonu ve füzyonu; çeşitli uygulamalar için hibrit moleküllerin üretimi
Doğal enzimler, selülozomun altbirimleri ya da rekombinant enzimler	Özel çalışmalara ait verim artırılması çalışmaları	Tasarım selülozomların üretimi
<i>T. reesei</i> kaynaklı sellobiyohidrolaz I başlatıcı ve <i>A. niger</i> kaynaklı glukaoamilaz başlatıcısı	Heterolog enzim ve proteinlerin ekspresyonu	Yüksek miktarlarda protein, enzim ve antibadi üretimi

büyümelerini inhibe ettiği sonuçlarına ulaşılmıştır. Yapılmış olan bir başka çalışmada ise *Trichoderma harzianum* CECT 2413 kaynaklı β -1,3- ve β -1,6-glukanazların test edilen fungusun hücre duvarını hidrolizlediği ve büyümesine engel olduğu bildirilmiştir (Bhat, 2000).

Trichoderma sp., *Geocladium sp.*, *Chaetomium sp.* ve *Penicillium sp.* başta olmak üzere pekçok fungus türünün tohum çimlenmesini iyileştirerek, bitki büyümesi ve çiçeklenmeyi hızlandırarak ve kök sistemini geliştirerek ürün verimini artırdığı ve tarımsal alanda önemli roller üstlendiği bilinmektedir. Tam olarak reaksiyon yolağı henüz bilinmemekle birlikte bu fungusların bitkilere direkt ya da indirekt bir etkisi olduğu gözlenmektedir. Zirai alanda yapılacak yeni çalışmalarla da bu yolakların tespiti ümit edilmektedir (Bhat, 2000).

2.1.5.6. Biyoetanol ve biyoyakıt endüstrileri

Son yıllardaki en önemli çalışmalardan biri de ligninoselülozik atıklardan biyoyakıt üretimidir. Ligninoselülozik kalıntılar, insanlık için en büyük kitlesel yenilenebilir kaynağı ifade etmektedir ancak bu kalıntıların işlenmesi oldukça maliyetli prosesleri içermektedir. Bu konuda selülozik atığın glukoz ve diğer fermente edilebilir şeker türevlerine dönüşümü için selülazların kullanılması yüksek potansiyele sahip seçenektir. Bu işlem sayesinde etanol gibi bazı fermentasyon ürünleri ile tek hücre proteinleri elde edilebilmektedir. Selülaz üretim mekanizmasına sahip organizmalarda biyoatıkların direkt olarak alkole çevirilebildiği bilinmektedir. Ancak bu sistemlerden hiçbiri tek başına ticari proseslerde yeterli aktiviteyi gösterememektedir. Şu an aktif olarak kullanılan biyoetanol üretim prosesleri çok aşamalı olarak gerçekleştirilmektedir. İlk ve ön aşama olarak ligninoselülozik kalıntılardan lignin ve hemiselüloz fraksiyonları elde edilir, 50 °C’de selülazla inkübe edilerek selülozik uzantılardan fermente edilebilir şekerler elde edilir ve en son olarak da selülozik metaryelden alkol elde edebilecek fermentatif mikroorganizmalar ortama ilave edilir. Biyoetanol üretiminde selülaz hazırlama aşamalarında her zaman aynı öncül kaynaklar kullanılmaktadır. Bunlar, substrat olarak aynı ligninoselülozik artıklar ve genelde hep aynı tür olan *T. reesei* ‘dir. Biyoyakıt üretiminde daha etkili sistemlerin oluşturulması, çalışmaların biyokimyasal ve genetik açıdan araştırılması ve

geliştirilmesine bağlıdır. Biyokalıntılardan etanol ya da fermentatif ürünlerin eldesinde saf enzim kullanmak, çok fazla ticari kaynak tüketmek anlamına geldiğinden çok ekonomik bir tercih olmamaktadır. Daha etkili sonuçlar elde etmek üzere yeni araştırma ve girişimler başlamış ve devam etmektedir. Hepsini özetlersek, selülozik biyokalıntılar katma değeri yüksek metabolitlerin üretiminde önemli ve ilgi çekici bir konumdur, bu da selülazların önemini bir kez daha vurgulamaktadır.

Selülazlar bu yaygın çalışma alanlarının dışında bir de endüstriyel tortuların giderilmesi amacıyla üretim proseslerinde kullanılmaktadır. Bu proseslerden en başta gelenler; protoplast üretimi çalışmaları, gıda koruyucusu olarak kullanılan antibakteriyel kitooligosakkaritlerin üretimi ve antitümör ajan etkisine sahip immüno-modulasyon çalışmalarıdır (Sukumaran et al., 2005).

2.1.5.7. Zeytinyağı ekstraksiyonu prosesleri

Son yıllarda dünya pazarında, çeşitli sağlık faydaları tespit edilen zeytinyağına ilgi oldukça artmıştır. Zeytinyağı ekstraksiyonu üç temel basamakta gerçekleştirilir. İlk basamakta zeytinler bir taş ya da çekiçli değirmen içerisinde öğütülür ya da ezilir, daha sonra ezilmiş zeytin hamuru bir dizi karıştırıcıdan geçirilir ve yatay durultma kolonlarında bekletilir. En son olarak da yüksek hızlı santrifugatörlerde yağ elde edilir. Genelde 100 kg zeytinden ortalama 16-20 kg zeytinyağı elde edilir. Zeytinyağları içeriğindeki serbest yağ oranına (FFA) göre adi, virjin (%1-3 FFA) ve ekstra virjin (<%1 FFA) olmak üzere üç sınıfa ayrılır. Kaliteli zeytinyağı elde etmek için, taze toplanmış, temizlenmiş kısmen ham zeytinlerin soğuk presleme koşullarında işlenmesi gerekmektedir. Aynı işlem tamamen olgunlaşmış meyve ile ve daha yüksek sıcaklıklarda da yüksek verimle gerçekleştirilebilmektedir. Ancak, bu koşullarda elde edilen zeytinyağı ekşi bir tada ve yüksek asiditeye sahip olup, aroma açısından da oldukça zayıftır. Bu sebeplerden ötürü, zeytinyağı üretimi prosesinde müşterinin ihtiyacına göre bir işlem prosesi planlanmalıdır (Bhat, 2000).

Zeytinyağı ekstraksiyonunda kullanılan ilk ticari enzim Olivex (düşük düzeyde *Aspergillus aculeatus* kaynaklı selülaz ve hemiselülaz içeren pektinaz

karişımı)'dir. 1980'li yıllarda yapılan çalışmalar neticesinde zeytinden yağ eldesinde etkili bir maserasyon ve ekstraksiyon için tek bir enzimin yeterli olmadığı saptanmıştır. Bu konuda yapılan çalışmalarda pektinazlar, hemiselülozlar ve selülozlar en etkin enzim grupları olarak belirlenmiştir. Ayrıca tek bir mikroorganizmadan izole edilen enzim karışımı ile *Aspergillus* kaynaklı pektinazlar ile *Trichoderma* kaynaklı selüloz ve hemiselülozlardan oluşan karışımın daha başarılı olduğu belirlenmiştir. 1998 yılında Güney İtalya'da yapılan bir çalışmada ticari bir enzim olan Cytolase O kullanılarak, ton başı ortalama %1-2 kg zeytinyağı verim artışı sağlanmıştır. Ayrıca maserasyon enzimlerinin kullanılmasıyla, eksta-virjin sınıfındaki bu yağda antioksidan içeriği artmış ve asidite düşmüştür. Maserasyon enzimlerinin zeytinyağı ekstraksiyonundaki faydaları; (1) soğuk presleme koşullarında gerçekleştirildiğinde her 100 kg zeytinde maksimum 2 kg yağ kazancı sağlamaktadır, (2) santrifügasyon esnasında daha yüksek yağ kazanımı sağlamaktadır, (3) daha yüksek oranlarda anti-oksidan ve vitamin E içeren yağ oluşumunu sağlamaktadır, (4) ekşimeyi yavaşlatmaktadır, (5) bitki etkinliğini artırmaktadır ve (6) atık suda daha düşük oranda yağ kaybı sağlamaktadır. Böylelikle diğer zirai ürünlere kıyasla, zeytinden yağ ekstraksiyonu maserasyon enzimleri sayesinde önemli ve kaydadeğer bir konum elde etmektedir (Bhat, 2000).

2.1.5.8. Unlu mamullerin kalitesinin artırılması

Amilaz ve proteaz sınıfı ekzojen enzimler unlu mamül sektöründe yıllardır kullanılmaktadır. Geçtiğimiz yıllarda hamur, ekmek, bisküvi, kek ve diğer fırıncılık ürünlerinde hemiselülozların özellikle de endo-ksilanazların etkin bir şekilde kullanılabildiği kaydedilmiştir. Ayrıca tam olarak mekanizması açıklanamamış olsa da endo-ksilanazların hamur yoğurma ve pişirme aşamalarında pek çok faydası olduğu bilinmektedir. Endo-ksilanazların hamurda bulunan arabinoksilanları hidrolizleyerek, hamur ve ekmek arasında suyun yeniden dağılım düzenlemesini gerçekleştirdiği, dolayısı ile hamuru hafiflettiği, bu işlem neticesinde de hamur yoğurma; ekmek hacmi, dokusu ve stabilitesi üzerinde olumlu etkileri olduğu fikri baskındır. Üstelik hamur işleme esnasında endo-ksilanazlar eklendiğinde, insan sağlığı için önemli faydaları bulunan arabino

ksilo-oligosakkaritlerin, ekmekteki konsantrasyonunu arttırdığı düşünülmektedir. Geçtiğimiz yıllarda arabinazların, α -L-arabinofuranozidazların, arabinoksilan α -L-arabinofuranohidrolazların ve esterazların unlu mamüllerin dokusal, kalitesel ve duyusal anlamdaki niteliklerini önemli düzeyde etkilediği tespit edilmiştir. Özetlemek gerekirse bu enzimlerden oluşan doğru enzim karışımı, hamur işleme ve pişirme prosesleri için hayati boyutta önem arz etmektedir (Bhat, 2000).

2.1.5.9. Sağlık/Medikal endüstrisi

Günümüz teknolojisinde bakteriyel kaynaklı selülozların medikal alanda direkt ya da indirekt olarak kullanıldığı alanlar mevcuttur. İndirekt olan çalışmaların çoğu fungal kaynaklı, kitosanı degrade edebilen ve kitinazlar ve lizozimler gibi koordine enzimlerle beraber çalışılan alanlardır. Kitosanı elde etmek için kitinin bir dizi hidroliz prosesinden geçmesi gerekmektedir. Kitin de selüloz gibi yapısal integrasyon, stabilizasyon ve korunmada görev almak üzere deniz canlıları ve böcekler gibi pek çok hayvan için oldukça öneme sahip bir polisakkarittir, ayrıca fungusların da hücre duvarının temel bileşenidir. Kitin poli- β -1-4-N-asetil-D-glukozamin ünitelerinden meydana gelen ve mikrofibriler yapıdaki bir biyomoleküldür ve bu yapısı sayesinde dış iskelet ve hücre duvarı görevleri üstlenir. Kitosan ise kitinin alkali koşullarda kısmi deasetilasyonu sayesinde ya da enzimatik hidrolizi yoluyla elde edilen bir türevidir. Kitosan ve türevi moleküller; cerrahi dikişler, kemik yenilenmesi, yapay deri üretimi, antikoagulant, antibakteriyel ajan, hemostatik pansuman, metallerle kombinlenerek anti-kanser ve anti-diyabetik ajan, hipokolesterolemik efektörler (LMWCs), kozmetik ürünlerin üretimi, biyofarmasötiklerin üretimi ve çeşitli moleküllerin kapsülasyonu başta olmak üzere pek çok kullanım alanına sahiptir (Menendez et al., 2015).

Selülozlar, kitosanazlar ve lizozimlerden oluşan karışımlar sayesinde, kitosan molekülleri daha küçük moleküler ağırlığa sahip kitosanlara hidrolizlenmektedir. Bu küçük moleküllü kitosanlar (LMWC), biyomedikal alanda pekçok yararlı amaçla kullanılabilir. Aşağıda bu amaçla çalışılmış kitosan hidroliz mekanizmaları ve potansiyel biyomedikal yararları üzerine örnekler verilmiştir (Menendez et al., 2015).

Qin ve arkadaşları fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, selülozla muamele edilmiş kitosanın %30-50 oranında inhibitör etkisine sahip antitümör ajan olarak çalıştığını saptamışlardır. Lin ve arkadaşları ise *Trichoderma* kaynaklı ticari selüloz kullanarak, LMWC'lerin antibakteriyel etkinliğe sahip olduğunu saptamışlardır. Selülozla muamele edilmiş kitosan hidrolizatlarında (sıvı çözeltilerinde), yoğun hidrolizlenmeden kaynaklı olduğu düşünülen, antibakteriyel etkinlik kapasitesinin düştüğü saptanmıştır. İşte bu sebepten ötürü önemli bir proses olan sistemin optimize edilmesi ve daha ekonomik yolların incelenmesi gerekmektedir (Menendez et al., 2015).

Kitosanın işlenmesinde kullanılan bazı mikrobiyal selülozlar fungal kaynaklıdır. 2006 yılında Liu ve Xia *Trichoderma viridae*'den kitosanolaz ve selüloz aktivitesi gösteren bifonksiyonel bir enzim saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Yine Xie ve arkadaşları kitosanın depolimerizasyonu için farklı kaynaklardan elde edilen selülozlar ile çalışmışlar ve çalışma sonucunda reaksiyona ve hıza spesifik olmaması sebebiyle, *Aspergillus* kaynaklı selülozın LMWC'lerin üretiminde en ekonomik ve etkili kaynak olduğunu saptamışlardır (Menendez et al., 2015).

Selülozların direkt olarak kullanıldığı medikal alanlardan biri fitobezoar tedavisidir. Fitobezoar, gastrointestinal (sindirim sistemi) alanda sıkışıp kalmış olan sebze ya da meyve bütünü olup, şişmiş bir tıkanılıktır. Genelde cerrahi müdahale ile çözülebilen bu vakalar, diyet kola ve selülozlar ya da bu ikisinin kombine kullanımı ile ameliyatsız da çözülebilmektedir. Selüloz ile çözülmesi ise birincil çözüm yolu olmalıdır. Fitobezoar tedavisinde bakteriyel kaynaklı selülozın kullanıldığına dair hiç vaka raporu bulunmazken, fungal kaynaklı selülozların kullanıldığı pek çok vaka raporu mevcuttur (Menendez et al., 2015).

İnsan bağırsak mikrobiyotası ve insan fecesi *Bacteroides cellulosilyticus* ve *Ruminococcus champanellensis* gibi yeni ve selülitik aktiviteye sahip mikroorganizmalarla doludur. Gelecekteki çalışmalardan, önemli derecede fitobezoar ve diğer hastalıkları tedavi ederken, selülitik performansın artırılabilmesine de katkı sağlaması beklenmektedir.

Bakteriyel selülaazların diğerk bir kullanım alanı da patojen hücrelerin hücre duvarının yıkımı ve bakteriyel biyofilm yapıların yıkımıdır. Selülaazlar kimi protislerin, örneğın *Acanthamoeba* gibi, sebep olduğı körleştiren kornea iltihabı ve granülamatöz amibik ansefalit (beyin iltihabı) gibi hastalıklarda, patojen hücre duvarının yıkımı için kullanılabilmektedir. Geçtiğimiz yıllarda Lakhundi ve arkadaşları, bu hastalıkla mücadelede selülotitik bakterilerden izole edilen spesifik selülaazlar ile müdahalenin uygun olduğunu hatta bu işlem ile hastanın sağlıklı hücrelerinin zarar görmediğini ileri sürmüşlerdir. Buradan yola çıkarak da *Acanthamoeba* ve diğerk olası patojenlere karşı farklı selülaaz kaynakları ile çalışmaların devam etmesi gerektiğı söylenebilmektedir.

Selülaazlar biyofilm yapılarının matriksini oluşturan ve temel komponenti olan selülozları hidrolizlemekle görevli enzimdir. Biyofilmler bakteriler için bir yaşam alanı olup, ekstraselüler matrikse gömülü ve çoğunluğunu polisakkaritlerin oluşturduğu bakteriyel kominitelerdir. Ayrıca patojenik mikroorganizmalar, biyofilmleri yüzeysel yayılabilmek amacıyla da oluştururlar. Bu sebeptendir ki bu biyofilm yapısı, bazı ilaçlar tarafından kırılmamakta ve bu durum sorun teşkil etmektedir. Medikal implantlarda anti-biyofilm ajan olarak, çeşitli prostetik materyallerde, kistik fibrozis tedavisinde özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ve *Burkholderia cepacia* kaynaklı enzimlerle ve nosokomiyal (hastane kaynaklı) enfeksiyonlar başta gelmek üzere pek çok çalışma ve patentte fungal ve bakteriyel, özellikle de *Bacillus* kaynaklı selülaazlar kullanılmaktadır. Tüm bu çalışmalarda selülaazlar, farklı biyofilm yüzeylerinde aktif olup farklı substratlara müdahale ederek biyofilm konsantrasyonunu kontrol altında tutmaktadır. Bu alanda gelecekteki çalışmalardan beklenti, selülaazların farklı enzimlerle kombinlenerek daha yüksek etkinlikte çalışabilirliğinin sağlanmasıdır (Menendez et al., 2015).

Bezoar, çoğunlukla midede olmak üzere sindirim sisteminde birikmiş ve yığılmış halde bulunan ve sindirilebilir olmayan yabancı maddelerin oluşturduğu yumru şeklindeki tıkanıklıklara verilen isimdir. Bezoarlar; gıda, saç, ilaçlar ve sakız gibi maddeler başta olmak üzere pek çok maddeden meydana gelebilmektedir. Özofagustan rektuma kadar tüm sindirim yollarında görülebilmekle birlikte en çok midede rastlanmaktadır. Hastalarda hastalığın

sürecine bağlı olarak, erken doyma ve ani kusmalara sebep olarak ciddi kilo kayıplarına sebep olabilen bir durumdur. Hastaların genel çoğunluğunu fiziksel ve anatomik açıdan normal kişiler oluştururken, rahatsızlığın temel oluşum faktörünü ise hastaların bir önceki mide ameliyatları ya da gastrik asitliğin azalması, peristaltik aktivitenin düşmesi veya tehlikeli boyuttaki pilora fonksiyonunun bozulması gibi mide aktivitelerinin değişimi oluşturmaktadır. Bezoarlarda hastalığın teşhisi, tedavinin yönetilmesi ve oluşumunun ve tekrarlanmaların önlenmesi için hastanın ve durumun patofizyolojisinin çok iyi belirlenmesi ve tanımlanması yüksek önem arz etmektedir (Sanders, 2004).

Asırlardan beri bezoarlar bazı keçiler, koyunlar, lama türleri ve antiloplar başta olmak üzere geviş getiren kimi hayvanların ve insanların; mide ve bağırsağında bulunan maddeler olarak tanımlanmışlardır. Orijinal bezoar tanımı, Batı İran dağlarında yaşayan keçilerin midesinden yola çıkılarak yapılmıştır. “Bezoar” sözcüğünün ise İran Ulusu’nun kullandığı “pahnzehr” ya da Arapların kullandığı “badzehr” kelimelerinden ortaya çıktığı düşünülmektedir ve her iki kelime de “zehir-karşıtı” ve “antidot” anlamlarına gelmektedir (Sanders, 2004).

Bezoarlar; fitobezoarlar, trikobezoarlar, laktobezoarlar ve farmakobezoarlar (medikal bezoarlar) olmak üzere dört genel sınıfta değerlendirilirler. Fitobezoarlar, günümüzde bezoarlar arasındaki en yaygın türdür. Fitobezoarda, insanlarda tıkanıklığı oluşturan yapı selüloz, hemiselüloz, lignin ve meyve taninleri (lökoantosiyeninler ve kateşinler) başta olmak üzere sindirilemeyen gıda maddelerini içermektedir. Bu sindirilemeyen gıdalara kereviz, kabak türleri, üzüm kabukları, kuru erik, kuru üzüm ve çok sıkça görülen Trabzon hurması örnek verilebilir. Trabzon hurması kaynaklı fitobezoarlar ise tıpta diospyrobezoar olarak adlandırılırlar. Meyve taninlerinin yüksek konsantrasyonda tüketilmesi, mide asiditesi içerisinde pıhtı şeklinde kümelenmesine sebep olabilmektedir (Sanders, 2004).

Trikobezoarlar en çok çocuklarda ve genç yaştaki kızlarda görülen ‘saç bezoarı’ diye de adlandırılan bezoardır. Sıklıkla psikiyatrik düzensizlikler ve sorunlar yaşayan bireylerde görülen bu hastalık; saç, halı fiberleri, ip, bağcık veya

giysi yutma sonucu gerçekleşir. Saç fiberleri mide içerisinde karışıp, peristaltik ilerleme ve harekete engel olmaya başlar. Beraberinde sindirilemeyen yağ ve mukus içeriği fiberlere yapışarak tiksindirici bir kokuya sebep olur. Mide asiti saç proteinlerini denatüre eder ve saç ne renkte olursa olsun kararır. Triko bezoarlar genellikle mide içerisinde hapsolmuş vaziyette kalır ancak bazen de mide çıkışından ince bağırsağa doğru bir kuyruk uzantısı ile uzanabilmektedir. Triko bezoarların bazılarında ince bağırsak boyunca saçın uzadığı vakalar belirtilmiştir ve bu vakalara ‘Rapunzel sendromu’ adı verilmektedir (Sanders, 2004).

Laktobezoarlar sindirim sisteminde oluşan ve sindirilemeyen süt bileşenlerinden kaynaklanan tıkanıklıklardır. Bu bezoar türü prematüre doğan bebeklerde, sütün yeterli sindirilememesi neticesinde ve henüz birkaç haftalıkken görülmektedir. Henüz gelişmemiş yenidoğan mide hareketliliği, dehidrasyon, sütün konsantre formda olması ve kazein gibi yoğun içerik sebebiyle laktobezoarlar oluşmaktadır. Bununla birlikte karşılaşılan vakalar, inek sütü tüketimine bağlı olarak üç yaş grubuna kadar olan çocuklarda da laktobezoarların mevcut olabileceğini göstermektedir. Laktobezoarların iyileştirilmesinde mevcut tedavi yöntemi damar içi su takviyesi ve ağızdan beslenmenin durdurulması şeklinde gerçekleştirilmektedir (Sanders, 2004).

Farmakobezoarlar ilaçlar ya da tıbbi cihazlardan kaynaklanan sindirim sistemindeki tıkanıklıklardır. Kolestiramin, sukralfat, nifedipin, enterik kaplanmış aspirin ve alüminyum hidroksit gibi bazı antasitler bezoara sebep olan ilaçlara örnek verilebilirler. Farmakobezoara ilişkin vakaların çoğunda nifedipin ve verapamil gibi salınım süresi uzun ilaçlara rastlanmaktadır. İlaçlarda tablet şekline getirilen kaplamalarda yarı geçirgen kılıf özellik gösteren selüloz asetat kullanılmaktadır, böylelikle ilaç kontrollü şekilde zamana bağlı salınmaktadır. Ancak selüloz asetat insanlar için sindirilebilir bir besin değildir. Bununla birlikte sindirim sistemine anatomik müdahale yapılmış ya da hareketliliği değiştirilmiş kişilerde bu ilaçlar bezoara sebebiyet verebilmektedir. Ayrıca perdium ve pysillium (karnıyarık otu) gibi laksatifler (bağırsak açıcı bitkiler) de kitlesel bezoara sebep olabilmektedirler (Sanders, 2004).

Bezoarların teşhisinde genelde hastalar belirgin bir semptom göstermezler ya da diğer sindirim sistemi hastalıklarında da görülebilen ve şüpheli nitelikteki semptomları gösterirler. Hastaların yaklaşık %80'inde, midelerinde tam tanımlayamadıkları garip rahatsızlık hissi oluşmaktadır. Bunun dışında belirgin semptomlar gösteren vakalarda, karın içinde şişme, bulantı, kusma, erken doyma, yemek sonrası aşırı şişkinliğe bağlı rahatsızlık, ağız kokusu, anoreksiya, konuşma güçlüğü ve kilo kaybı gibi durumlar meydana çıkmaktadır (Sanders, 2004).

Bezoarların teşhisinde fiziksel muayene çok da net bir sonuç vermemektedir. Nadir olarak vakalarda karın bölgesindeki kitle elle teşhis edilebilmektedir ya da koku sayesinde midede sorun olduğu tespit edilebilmektedir. Bununla birlikte bu belirtiler tamamen özgün olmadığından bezoar olduğu fikri sezilemeyebilmektedir. Triko bezoarı olan hastalarda ise hastadaki saç eksikliğine bağlı olarak 'trikotilomani' psikiyatrik teşhisi konularak da saptanabilmektedir (Sanders, 2004).

Bezoarların teşhisinde düz karın grafisi ile midede oluşan gaz tespit edilebilirken, açık mide ameliyatıyla da tıkanıklığın sebebi saptanabilmektedir. Baryum çalışmaları ise tıkanıklığı oluşturan yumrunun içine sızarak spesifik hareketini ya da damarlı yapısını, kontrast kaplama yolu ile gösterebilmektedir. Baryum çalışmaları, teşhis esnasında yardımcı olabildiği gibi bezoar ve mide içi mukozanın görüntülediği endoskopik veya cerrahi durumlarda teşhis ve tedaviyi zorlayacak şekilde görüntüleme sonucunu değiştirebilmektedir. Bağırsak obstrüksiyonu (tıkanması) ve perforajı (delinmesi) gibi potansiyel komplikasyonların teşhisi ve değerlendirilmesinde kanıtlanmış metod 'karın bilgisayarlı tomografisi'dir. Özofagus ve midedeki bezoarların görüntülenmesi için ideallığı tespit edilmiş metod endoskopidir. Baryum çalışmaları endoskopik tespitlerle kıyaslandığında, endoskopik olarak belirlenen bezoarların yalnızca %25'i baryum metodu ile de tespit edilebilmektedir. Dahası endoskopi metodu, özellikle fitobezoarlarda, hangi potansiyel tedavi yolunun izlenmesi gerektiğini de öngörmeyi sağlamaktadır. Endoskopi yapılan fitobezoarlar, midenin fundus (en dip) ya da antrum (oyuk) kısmında dağınık halde ve koyu kahve ya da yeşil bir top halinde görüntülenmektedir. Triko bezoarlar ise mide asidi ve enzimler

tarafından hidrolizlendiğinden (protein kısımları) siyah renkte görüntülenmektedir (Sanders, 2004).

Çizelge 2.4 Gastrik fitobezoarlar için tedavi protokolleri (Sanders, 2004).

Kullanılan kimyasal	Kullanım şekli
Selüloz	300-500 mL suda 3-5 gram çözülerek hazırlanır. Hastaya 2 ile 5 gün arası oral yoldan verilir.
Papain (Adolph's Meat Tenderizer)	250 mL suda 1-2 teaspoon/s ($4.92892159 \times 10^{-6} \text{ m}^3/\text{s}$) olacak şekilde hazırlanır. Hastaya 2 ile 5 gün arası günde 3 kez oral yoldan verilir.
Asetilsistein	%0,9'luk hazırlanmış 50 mL NaCl çözeltisine 15 mL eklenerek hazırlanır. Hastaya 2 gün boyunca, günde 3 kez verilir ve düzenli gastrik lavaj işlemi yapılır.
Metoklopramid	Hastaya akşamüzeri yemekle birlikte ve oral yoldan 10 mg metoklopramid içeren çözeltiden verilir.
Coca-Cola Nazogastrik Lavajı	Hastaya 12'şer saatlik aralarla, 3'er litre Coca-Cola verilir ve düzenli gastrik lavaj işlemi yapılır.

Fitobezoarlar sebzeler ve meyvelerin karışımından oluşmaktadır, dolayısı ile de proteolitik enzimler ve selülozlar tarafından hidrolizlenebilme niteliğine sahiptir. Gastrik fitobezoarlar için tıpta kullanılmakta olan tedavi yöntemleri Çizelge 2.4'te verilmiştir. Carica papaya ağacından elde edilen proteolitik papain enzimi, fitobezoar tedavisinde farklı kaynaklara göre %0 ile %100 arasında farklı

başarı oranları ile kullanılmıştır. Enzimin reaksiyon mekanizması tam olarak halen çözülememiş olmakla birlikte, fitobezoar içerisindeki protein bağlarını hidrolizleyerek tedavi ettiği düşünülmektedir. Fitobezoarların tedavisinde alternatif tedavi yöntemi ise selülozların kullanımıdır. Selülozların kullanımı oldukça yaygın olup, tıkanıklığa sebep olan kitledeki lökoantosiyanidin-hemiselüloz-selülozlar arasındaki bağı hidrolizlediği kabul edilmektedir. Bazı raporlarda selülozların 2 ile 7 gün arası kullanıldığı tedavilerde %100 başarı elde edilirken, hiçbir olumsuz yan etkisi olmadığı da belirtilmiştir. Bazı araştırmacılar tarafından, piyasadaki ilaç statüsündeki selülozdan 3-5 gram tartılarak 300-500 mL arasındaki suda hazırlanan çözeltinin oral yolla alındığı ve 2 ile 5 gün süre arasında yapılan tedavinin yeterli olduğu ifade edilmektedir. Hastalar, solüsyonu aldıktan sonraki 20-30 dk'lık süreçte sol tarafına dönük pozisyonunda yatırılırken, sonraki 30 dk'lık süreçte sırt üstü yatırılarak tedavi edilmektedir. Selüloz ile tedavilerde elde edilen yüksek başarı oranları ve herhangi bir olumsuz vakanın yaşanmamış olması, medikal terapi yöntemi olarak selülozun fitobezoar tedavisinde önemli rolü olduğunu göstermektedir (Sanders, 2004).

Bezoarların tedavisinde önerilen bir diğer tedavi yöntemi de lavaj terapisi. Son zamanlarda midesinde büyük bezoarlar tespit edilen beş farklı hastanın Coca-Cola ile yapılan nasogastrik lavajında etkili sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Dahası 12 saatlik periyotlar ile verilen 3 L Coca-Cola ile hastaların midelerindeki fitobezoarların tamamen çözündüğü ve hiçbir yan etkisinin olmadığı ifade edilmiştir. Ardından da hastalar bezoarın tekrarlamaması için 3-15 ay arası her gün günde iki bardak Coca-Cola içmeleri konusunda uyarılmıştır. Fiberlerin midedeki sindirimi için asidiklik oldukça önemlidir. Midenin normal pH'ı 1.0 – 2.0 civarındadır. Coca-Cola ise karbonik ve fosforik asit içeriği sayesinde pH'ı 2.6 olan yüksek asiditedeki bir içecektir. Buradan sebeple yazarlar, Coca-Cola'nın mide asitliğini artırarak karbondioksit salınımını sağladığını ve fitobezoarın parçalanmasının gerçekleştiğini ifade etmektedirler. Kola ürünlerinden şeker içermeyen Diet Coca-Cola ise diyabet hastalarının tedavisinde aynı etkinlikle önerilmektedir (Sanders, 2004).

Pinos ve arkadaşlarına (2015) ait vaka raporunda 53 yaşında ve özafagus kanserine yakalanmış bir erkek hastanın fitobezoar tedavisinden bahsedilmiştir.

Vakada, hasta gastropласти ve piloroplasti ameliyatları geçirdikten altı ay sonra hiporeksiya (hepatit sendromu), yutma zorluğu ve nefes darlığı şikayetleri ile doktoruna danışmış ve doktoru hastanın rahatlaması için 3 ay süre ile aloe vera ve bal içerikli doğal bir ilaç tedavisine başlamıştır. Daha sonra rahatsızlığı devam eden hasta tekrar hastaneye gelmiştir. Teşhis için hastanın göğüs radyografisi ve bilgisayarlı tomografisi çekilmiştir. Filmlerde sağ akciğerde bir kitle tespit edilmiştir. Ardından gerçekleştirilen endoskopiyle de akciğerdeki yapının aloe vera kaynaklı gıda bileşenleri olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu hastaya ilk olarak Coca-Cola tedavisi başlatılmış ve günde 2 L oral yolla verilmiştir. Üç gün boyunca hiçbir gelişme elde edilemeyince keskin bir tedavi yöntemi olan selülozla tedaviye başlanmıştır. Sekizer saatlik aralar ile ve ikişer saatlik enjeksiyon süreleri ile 5'er gram selüloz, nazogastrik bir tüp aracılığıyla hastaya verilmiştir. 48 saatin ardından da hastadaki tüm semptomlar kaybolmuş ve fitobezoar temizlenebilmiştir. Selüloz sayesinde fitobezoar giderilmiş ve bir daha tekrarlama yaşanmamıştır (Pinos et al., 2015).

Delgado ve arkadaşlarına (2014) ait vaka raporunda tekrarlanan fitobezoar probleminin selülozla çözüldüğünden bahsedilmiştir. Vaka, 58 yaşındaki, geçmişinde vagotomi, kanamalı peptik ülseri, apandisit ameliyeti, septoplasti ve artroskopik menisküsü olan ve vaka anında ise hipertansiyon, hiperürisemi yaşayan ve tip-2 diyabeti olan bir erkek hastaya aittir. Hasta ince bağırsağında iki kez fitobezoar problemi yaşamış olup, her ikisinde de tıkanıklık enterotomi (bağırsağın açılması) yolu ile giderilmiştir. Hasta acil servise son 36 saat içerisinde oluşan karın şişliği, mide bulantısı, kusma ve bağırsak tıkanıklığı şikayetleri ile gelmiştir. Hastanın karın tomografisi çekildiğinde bağırsağın tıkanmış durumda olduğu ve gaz ile dolduğu saptanmıştır. Vakaya ilişkin karın tomografisi Şekil 2.4'te verilmiştir. Hasta bir hafta, selüloz enzimi tıp merkezi tarafından temin edilene kadar, damar yolu ile beslenmiş olup bağırsakları nazogastrik tüple boşaltılmaya çalışılsa da tam tıkanık bağırsak hali devam etmiştir. Selüloz temin edilince 6 saat aralıklarla 500 mL suda hazırlanmış 5 gram selüloz nazogastrik tüp ile hastaya verilmiştir. Tedavinin ikinci gününden itibaren gelişme kaydedilmiş olup oral sindirim mümkün olduğu andan itibaren 5 gün boyunca oral yolla selüloz alımı gerçekleştirilmiştir. Yapılan rektal muayenede, bezoarın tamamen parçalanmış olduğu tespit edilmiş olup tedavinin

sonlandırılmasına karar verilmiştir. Selülaz bu vakada iki kez enterotomi yapılan bir hastanın aynı sorun tekrarlandığında ameliyatsız bir şekilde ve oldukça pratik yoldan tedavisini mümkün kılmıştır (Delgado et al., 2014).



Şekil 2. 4 Hastaya ilişkin karın tomografisi (ileumun uç kısmında oldukça hacimli bezoar birikmesine bağlı olarak ince bağırsaklarda ciddi boğumlanma).

Gayà ve arkadaşlarının (2002) vaka raporunda, üç yıl boyunca hastanelerine gelen 10 trabzon hurması bezoarı yaşayan hastanın selülaz, sistein ve metaklopramid ile tedavisinden bahsedilmiştir. Yapılan araştırma dahilinde 7 erkek, 3 kadın olmak üzere yaş ortalaması 46.4 olan on kişi incelenmiş ve tedavi edilmiştir. Hastalardan sekizinin fitobezoarı enzim terapisi ile tamamen iyileşirken, ikisinin tedavi süreci bir yıllık süreçte tamamlanmıştır. Söz konusu hastaların hepsi gastrik bezoara sahip ve Trabzon hurması tüketimine bağlı olarak rahatsızlanmıştır. Hastalarda teshiş, endoskopi yoluyla konulmuş ve yumuşak tıkanık bezoar noktaları tespit edilmiştir. Doktorlar ilk olarak bezoarların midede parçalanması için endoskopik metodlarla ve cihazlarla bezoarları küçük parçalara bölmüşlerdir. Daha sonra da hastalara 1 ay boyunca; 20 mg L-sistein, 100 mg selülaz ve 5 mg metaklopramid içeren karışımdan günde 3'er kez olmak üzere verilmiştir. Enzim terapisinin sonunda sekiz hasta tamamen iyileşmiş olup, endoskopik müdahalesi biraz geç gerçekleştirilen ve dolayısı ile bezoarı bağırsağa

kayan iki hastanın ise tedavisi uzun süre devam etmiş ve ardından kalan iki hasta da 1 yıllık süreç içerisinde iyileşmiştir (Gayà et al., 2002).

Kramer ve Pochapin (2012) yayınladıkları raporda üç ileri yaştaki bezoar hastasına selüloz ve diyet kola ile ikili bir tedavi uyguladıklarından ve üç hastada da başarılı olduklarından bahsetmişlerdir. Aynı kliniğe yakın zamanlarda gelmiş, birincisi 68 yaşında ve diyabetik gastroparezi (midede sindirim problemi rahatsızlığı) olan erkek, ikincisi 76 yaşında ve diyabet hastası olan erkek ve üçüncüsü ise 83 yaşında ve 45 yıl önce Billroth I gastrektomi (midenin bir kısmının kesilip atılması) ameliyatı geçirmiş olan kadın hastadan oluşan 3 kişilik bu grubun hepsine de fitobezoar tanısı konmuştur. Her hasta günde iki kez olmak üzere 354,8 ml (12-oz) diyet Coca-Cola içerek tedaviye başlatılmıştır. Ancak Birleşik Devletler’de tıbbi selüloz enzimi olmadığı için hastalardan selüloz, takviye gıda maddesi satıcılarından temin etmeleri istenmiştir. Birinci ve ikinci hasta aynı selüloz tabletlerinden kullanmıştır. Üçüncü hasta farklı kaynaklı bir selüloz tableti kullanmıştır. Üçüncü hastaya ait selülozun tam içeriği bilinmezken, ilk iki hastanın kullandığı tabletin (Enzymedica) glukoamilaz, alfa-galaktozidaz, fitaz/pektinaz, ksilanaz, hemiselüloz ve beta-glukanaz içeren bir karışım olduğu kaydedilmiştir. Hastalar ilgili selüloz tabletlerinden günde iki kez 1’er tablet şeklinde kullanmışlardır. Eş zamanlı olarak diyet Coca-Cola içmeye de devam etmişlerdir. Birinci ve üçüncü hasta 8 haftanın, ikinci hasta ise 6 haftanın ardından fitobezorların tamamen yok olması neticesinde iyileşmişlerdir. Bezoarların giderildiği endoskopik yolla teyit edilmiştir (Kramer and Pochapin, 2012).

2.2. Üçlü-Faz Ayırma Tekniği (Three-Phase Partitioning, TPP)

Çok sayıda bileşenden oluşan ham preparatlarda, proteinlerin ayırma ve izolasyonu oldukça zordur ve bu nedenle günümüzde bu amaçlar için yeni biyoayırma yöntemleri geliştirilmektedir. Mevcutta kullanılan geleneksel yöntemlerin çoğu hem pahalı, hem de zaman alıcıdır. Ayrıca çoğu kez ön işlemlere gereksinim duyulmaktadır. Son elli yıldır, araştırmacılar protein geri kazanımı ve saflaştırılması için sıvı-sıvı ekstraksiyon sistemlerine ilgi duymaktadırlar. İkili ve üçlü faz ayırma sistemleri proteinlerin etkin bir şekilde

yüksek verimle saflaştırılabilmesine olanak sağlayan ve çok geniş kullanım alanı olan yeni sıvı-sıvı biyoayırma teknikleridir (Çamurlu ve Çavuş, 2015).

Günümüzde, üçlü-faz ayırma tekniği (TPP) ile polisakkaritler, proteinler, enzimler, enzim inhibitörleri, yenilebilir yağlar ve küçük moleküller gibi pek çok biyoaktif bileşik; ucuz, hızlı ve “yeşil” (naturel) bir metodla ve etkin bir şekilde ekstrakte edilip, ayrıştırılabilmektedir. Dahası, metod oda sıcaklığında gerçekleştirilebilmekte ve ölçek büyötmeye olanak sağlamaktadır. Üstelik sıcaklığa duyarlı moleküller bile oda sıcaklığında başarılı bir şekilde ekstrakte edilip saflaştırılabilmektedir (Wang et al., 2019).

Üçlü-faz ayırma tekniği (TPP), tuz çöktürmesi, izoelektrik nokta çöktürmesi ve solvent çöktürmesi metodlarını kombinleyerek çalışan bir ayırma ve saflaştırma tekniğidir. Sistemde protein örneği, bir organik solvent (genelde t-bütanol) ve bir tuz çözeltisi ile muamele edilir ve ardından karışım vortekslenir (Liu et al., 2019). 1 saatten daha kısa sürede üç ayrı faz gözlemlenir (Duman and Kaya, 2013). Geçen sürenin ardından örnek santrifüjlenir ve fazlar elde edilir. Örnekte oluşan üst faz organik faz, alttaki faz sulu tuz fazı ve ortadaki faz protein fazı olmak üzere fazlar elde edilir (Liu et al., 2019). Ham ekstraktlardan ve/veya süspansiyonlardan biyoaktif moleküllerin ayrılmasını sağlayan üçlü-faz ayırma metodunda, inorganik tuz fazında genelde amonyum sülfat tuzu, organik fazda ise *tert*-bütanol kullanılmaktadır. *Tert*-bütanol özellikle sahip olduğu yüksek kaynama noktası, düşük yanıcılığı ve önemli derecedeki kozmotropik etkileri sebebiyle sıklıkla tercih edilmektedir (Wang et al., 2019). Pigmentler, lipidler ve hidrofobik moleküller üst fazda konsantre olurken; sakkaritler ve diğer polar bileşikler alt fazda konsantre olmaktadır. Üçlü-faz ayırma tekniğinde diğer iki faza hiçbir kaçak olmadan hedef protein orta fazda toplanabilmektedir (Liu et al., 2019). Bazı çalışmaların neticesinde üçlü-faz ayırma metodu ile deriştirilen enzimlerin katalitik aktiviteleri yükselebilmektedir. Uygulanan TPP işlemi ile proteinlerin konformasyonel esneklikleri arttığından daha yüksek katalitik aktiviteye sahip olmaktadırlar (Duman and Kaya, 2013). Üçlü-faz ayırma metodu özellikle ve sıklıkla ticari öneme sahip proteinlerin ve yağların izolasyonunda kullanılmaktadır. Sharma ve Gupta (2001) *Aspergillus niger* ve domates ile yaptıkları çalışmada üçlü-faz ayırma metodunu kullanarak pektinaz enzimini

saflaştırmışlardır. *Aspergillus niger* kaynaklı pektinaz %76 saflaştırma verimi ve 10 kat saflaştırma katı ile saflaştırılabilmişken; domates kaynaklı pektinaz ise %183 saflaştırma verimi ve 9 kat saflaştırma katı ile saflaştırılabilmıştır. Kulkarni ve arkadaşları (2017), keten tohumu yağı elde etmek için ticari accelerase (*T. reesei* kaynaklı selüloz) kullanmıştır. Enzimle örneği muamele etmeden önce ise ticari selülozı ön saflaştırma/deriştirme işlemine tabi tutmuşlar ve bu amaçla da bir üçlü-faz ayırma sistemi kurmuşlardır. Kurdukları sistem neticesinde ticari selüloz %86,62 protein kazanımı ile deriştirmişler ve deriştirilmemiş enzimle çalışılan sisteme kıyasla daha yüksek kalitede yağ elde etmişlerdir (Liu et al., 2019).

Duman ve Kaya (2013) üçlü-faz ayırma tekniği ile nohuttan β -galaktozidaz enzimini saflaştırmışlardır. Lokal marketten aldıkları kuru nohuttan ham ekstraktlarını hazırlamışlar ve t-bütanol ve amonyum sülfat ile TPP sistemlerini kurmuşlardır. Sisteme başlangıçta uygulanan ham ekstraktın 1 mL'sinde 0,49 U aktivite ölçülmüştür. Sistem amonyum sülfat yüzdesi, ham ekstrakt:t-bütanol oranı ve ortam pH'ı basamakları için optimize edilmiştir. Projenin sonucunda, nohuttan β -galaktozidaz enzimi, %60 (w/v) amonyum sülfat varlığında, ortam pH'ı 6,8'de ve ham ekstrakt:t-bütanol oranı 1:0,5 (v/v) olduğu optimum saflaştırma koşullarında %133 aktivite verimi ve 10.1 saflaştırma katı ile başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır (Duman and Kaya, 2013).

2.3. İmmobilize Enzimler

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal olayları katalizleyen ve gerçekleşmesini sağlayan biyomoleküllerdir. Binlerce atomdan oluşmuş bu düzenli yapıdaki moleküller, canlı hücrelerde meydana gelen pek çok farklı reaksiyonu katalizleyebilmektedir. Enzimlerin sağlık ve hastalıklar noktasındaki rolleri oldukça kapsamlı olarak yapılmış olan incelemeler arasındadır. Gıdaların sindirilmesi gibi pek çok atasal insani faaliyetlerdeki görevleri, henüz fonksiyonları ve yapıları dahi çözümlenemediği tespit edilmiştir.

Enzimler, reaksiyonları oldukça ılımlı koşullarda ve yüksek substrat spesifiklikleri ile gerçekleştirdiği için, reaksiyon esnasında yan ürün oluşumunu

da minimize etmektedir. Organik kimyada düzenli bir metodla gerçekleştirilemeyecek düzeyde, pek çok sayıdaki makromoleküller arası reaksiyonları katalizleme kapasitesine sahiptirler. Bu özellikleri de biyoteknolojik kullanım açısından oldukça ilgi görmelerini sağlamaktadır. Yirminci yüzyılın başlarında enzimlerin fermentasyon proseslerindeki görevleri anlaşılmış olup, bu tarihten itibaren kimyasal içerikleri ve yapısal özellikleri incelenmeye başlanmıştır. Görevleri ve önemleri anlaşılan enzimler zamanla da tekstil, farmasötik ve kimya endüstrileri gibi farklı teknolojik alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Mevcut pek çok çalışmaya rağmen, enzimler hala kısmi stabiliteye sahip, saflaştırma prosesleri pahalı ve bir reaksiyonda kullanıldığında geri kazanılamayan molekülüdür (Brena and Batista-Viera, 2006).

Enzimler, bir reaksiyon ortamında, tek başına bir molekül olarak, diğer enzimlerle koordineli ya da bir başka moleküle yüzeyden tutunmuş/bağlanmış vaziyette olmak üzere farklı statülerde aktivite gösterebilmektedir. Enzimlerin bu bağlanmış vaziyetteki (immobilize) konumları ve görevleri de teknoloji alanında onlardan yararlanmak amacıyla geliştirilmeye çalışılan noktadır. İmmobilize enzim terimi, enzimlerin tekrarlı ve sürekli kullanılabilmesi amacıyla, fiziksel hareketinin sınırlandırıldığı ya da katalitik aktivite için uygun belirli konumun verildiği prosesi ifade etmektedir. İmmobilize katalizatörler, endüstriyel proseslerde hem teknik performansı geliştirirken hem de ekonomik açıdan kazanımlar sağlayabilmektedir (Brena and Batista-Viera, 2006).

Tarihte ilk kullanılan endüstriyel immobilize enzim, sentetik rasemik D-L amino asit ayrımı için gereken ve 1967 yılında Chibata ve arkadaşları tarafından saflaştırılan *Aspergillus oryzae* aminoasitazıdır. İmmobilize enzimlerin sıkça kullanıldığı diğer endüstriyel alanlar; şekerlerin, aminoasitlerin ve farmasötiklerin kullanıldığı alanlardır. Bazı endüstri alanlarında ise hedef enzimi taşıyan hücre tamamen immobilize edilip kullanılmaktadır (Brena and Batista-Viera, 2006).

İmmobilizasyon tekniği endüstriyel kullanımların dışında; tanılamada, biyoafinite kromatografisinde ve biyosensörlerde kullanılmaktadır. Terapötik uygulamalar ise immobilize enzimlerin vücut dışı işlemler için de kullanılabileceğini öngörmektedir.

Geçtiğimiz son 30-40 yıllık süreçte immobilizasyon teknolojisi oldukça hızlı gelişmiş olmakla birlikte hala yeni gelişmelere muhtaçtır. İmmobilize enzim kullanım alanlarının kapsamının genişlemesiyle de yeni ve farklı metodolojilerin geliştirilmesi umut edilmektedir (Brena and Batista-Viera, 2006).

2.3.1. Enzim İmmobilizasyonunun Tarihçesi

Biyokatalizatörlerin immobilizasyonu temelde üç adımda gerçekleşmiştir denilebilir. İlk adım olarak 19. yüzyılın başlarında endüstriyel alanlarda, mikroorganizmaların immobilizasyonu deneysel düzeyde çalışılmaya başlanmıştır. Bu ilk denemelere, sirke üretimi ve süzme filtresinin geliştirilmesi örnek olarak gösterilebilir. Sirke üretimi esnasında immobilize mikroorganizmalarla kaplı talaşların üzerinden alkol içerikli solüsyon geçirerek sistem kurulmuştur. Süzme filtresi ise atık suların berraklaştırılması amacıyla immobilize hücrelerle dolu bir hat şeklinde geliştirilmiştir (Brena and Batista-Viera, 2006).

Modern anlamdaki enzim immobilizasyonu 1940'ların sonlarına doğru başlamıştır ancak bu tarihten daha önce yapılmış bazı çalışmalar alan dışı dergilerde yayınlandığı için biyokimyagerler tarafından gözardı edilmişlerdir. Günümüzdeki teknolojinin temeli 1960'larda oluşturulmuş olup, bu tarihten itibaren bu alandaki yayınlarda ciddi artış görülmüştür. İkinci büyük adım ise tek enzimli immobilize sistemlerden kompleks enzim sistemlerine geçişi ifade eder ki 1970'li yıllarda gerçekleşmiştir. İlk çalışma ko-faktörü rejenere olabilen iki enzimle kurulmuş olup canlı hücreleri içermektedir. İkinci adım gelişmeye ait ikinci örnek olarak; α -keto asitlerin, L-aminoasit dehidrogenaz enzimi sayesinde stereoselektif redüktif aminasyonu neticesinde L-aminoasitlerin üretimi gösterilebilmektedir. Bu reaksiyon prosesinde, ilk olarak nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) yıkılır ve beraberinde formik asit enzimatik hidrolizlenirken karbondioksit oluşumu gözlenir. Daha sonra da format dehidrogenaz vasıtasıyla NAD^+ , NADH'a redüklenir.

İmmobilize enzim sistemleri ile ilgili üç temel gelişme aşaması Çizelge 2.5'te verilmiştir.

Çizelge 2.5 İmmobilize enzimlerin geliştirilme aşamaları (Brena and Batista-Viera, 2006).

Adım	Tarih	Kullanım
1	1815	Asetik asit (sirke) üretimi ve atık su berraklaştırılması amacıyla deneysel çalışmalar.
2	1960'lar	Tek enzim immobilizasyonları; L-aminoasitlerin üretimi ve glukozun izomerizasyonu gibi çalışmalar.
3	1985 – 1995	Ko-faktörün rejenerasyonunu içeren hücre immobilizasyonu ile kombine çalışılmış multi-enzim immobilizasyonları. Örneğin; membran reaktör sistemlerinde keto-asitlerden L-aminoasitlerin üretimi gibi.

İmmobilize sistemlerde temel önemli parametreler; enzim, matriks ve enzimle matriksin bağlanma şeklidir. Bu noktada katı-faz desteği, taşıyıcı ve matriks kelimeleri aynı temel kavramı ifade etmektedir (Brena and Batista-Viera, 2006).

2.3.2. Taşıyıcıların Seçimi

İmmobilize enzim sistemleri için taşıyıcı seçimi oldukça yüksek düzeyde önemlidir. İdeal bir taşıyıcıda olması gereken temel özellikler; fiziksel baskılara karşı dirençli olması, hidrofilitik düzeyinin uygunluğu, biyoyumlu olması, mikrobiyal ataklara karşı dirençli olması ve düşük maliyetli olmasıdır.

Taşıyıcılar kimyasal yapılarına göre organik ve inorganik taşıyıcılar olarak sınıflandırılırlar. Taşıyıcılara ilişkin veriler Çizelge 2.6'da verilmiştir. Organik taşıyıcılar da doğal ve sentetik polimerler olmak üzere iki alt sınıfta toplanmaktadır.

Çizelge 2.6 Enzimlerin immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar ve sınıflandırılmaları (Brena and Batista-Viera, 2006).

Organik Taşıyıcılar		İnorganik Taşıyıcılar	
Doğal Polimerler	Sentetik Polimerler	Doğal Mineraller	İşlenmiş Materyaller
<u>Polisakkaritler</u> ; selüloz, dekstranlar, agar, agaroz, kitin, aljinat <u>Proteinler</u> ; kollajen, albümin Karbon	Polistren <u>Diğer polimerler</u> ; poliakrilat, polimetakrilatlar, poliakrilamid, poliamidler, vinyl, alil polimerler	Bentonit Silika	Cam (poröz olmayan ve kontrollü gözenek boyutuna sahip), metaller, kontrollü gözenek boyutuna sahip metaloksitler

Matrikslerin ortalama partikül boyutu, şişme kapasitesi, mekanik gücü ve sıkıştırılabilirlik kapasitesi gibi fiziksel özellikleri, immobilizasyon sistemlerindeki verimi etkileyen primer faktördür. Matriksin sahip olduğu özelliklere göre de karıştırmalı tank reaktörü, akışkan sistemler ya da sabit yataklar şeklinde reaktör sistemleri seçilip uygulanmaktadır. Özellikle por genişliği ve total partikül yüzeyi parametreleri, bu taşıyıcıların enzim bağlama kapasitesini etkileyen temel birimlerdir. Poröz olmayan taşıyıcılar düşük difüzyonel sınırlamalara sahipken düşük yükleme kapasitesine de sahiptirler. Bu sebeple, immobilize sistemlerde

daha çok poröz taşıyıcılar tercih edilir ki bu taşıyıcılar, daha fazla yüzey alanına sahiptirler, daha fazla enzim bağlama kapasitesine sahiptirler ve immobilize enzimler için daha korunaklı bir yapı teşkil ederler. Poröz taşıyıcılar, ortalama bir kapasiteye sahip olması ve düzenli akış sağlaması amacı ile kontrollü dağılım/yerleşim gösteren porlar içermelidirler. İnorganik taşıyıcıların fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal tehditlere karşı yüksek direnç sağlayabilme kapasitelerine rağmen, endüstride daha çok organik taşıyıcılar tercih edilmektedir. Taşıyıcının hidrofilik özellikleri de immobilize enzimin aktivite gösterebilmesinde önem arz eden faktörlerden biridir (Brena and Batista-Viera, 2006).

Kullanılan en iyi matrikslerin başında agaroz gelmektedir. Agaroz, yapısındaki yüksek porözite sayesinde yüksek protein bağlama kapasitesine sahiptir. Ayrıca hidrofilik özelliği istenen düzeylerde, türevlendirilmesi kolay, aktif yan grupları az ve ticari olarak kolay temin edilebilir bir taşıyıcıdır. Bununla birlikte hem agaroz hem de diğer taşıyıcılar için olumsuz faktör yüksek maliyetleridir. Bu sorunu ise yeniden kullanılabilir matriksler geliştirerek, yeni çalışmalarla aşabiliriz (Brena and Batista-Viera, 2006).

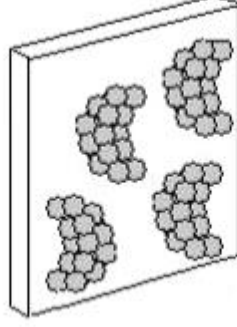
Biyokatalizatörlerin immobilizasyonunda çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler fiziksel, kimyasal, enzimatik ve genetik mühendisliği uygulamaları başlıklarında kategorize edilebilmektedir.

2.3.3. Polimerik Taşıyıcılar ile Enzim İmmobilizasyonu Metodları

2.3.3.1. Adsorpsiyon (Yüzeve tutunma)

Bir enzimin bir taşıyıcı ya da film matriks üzerine adsorpsiyonu, enzim immobilizasyonu metodlarının en basit olanıdır. Temel olarak, enzim taşıyıcıya kovalent olmayan bağlar ile bağlanır ve taşıyıcı yüzeyinde herhangi bir ön-aktivasyon göstermez. Bu metodda, enzim ile taşıyıcı arasındaki bağlar, taşıyıcının yüzeyinin kimyasal yapısına ve enzimin yüzeyinde bulunan aminoasit türlerine bağlı olarak oluşmaktadır. Enzim ile taşıyıcı arasında; iyonik ve hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetleri gibi zayıf

bağlar oluşmaktadır. Şekil 2.5'te adsorpsiyon metodu ile immobilize edilmiş bir enzim gösterilmektedir.



Şekil 2. 5 Bir biyokatalizatorün taşıyıcıya adsorpsiyon metodu ile immobilizasyonu (Costa et al., 2004).

Taşıyıcıların büyük çoğunluğunun yüzeyi adsorpsiyon metodu için uygun yük dağılımı göstermektedir. Adsorpsiyon için uygun taşıyıcılara; seramik, alüminyum, aktif karbon, kaolinit (hidratlı alüminyum silikat), bentonit (yumuşak balçık) ve poröz cam gibi inorganik taşıyıcılar; naylon ve polistren gibi organik sentetik taşıyıcılar ve kitosan, dekstran, jelatin, selüloz ve nişasta gibi organik taşıyıcılar örnek verilebilir. Metod oldukça basit bir, enzim solüsyonu ile taşıyıcı materyalin belirli bir süre muamele edilmesi adımı ile gerçekleştirilir. İlgili bağlanma süresinin ardından, taşıyıcıya bağlanmış immobilize enzimler arasındaki fazlalık ve bağlanmayan enzimler yıkanarak uzaklaştırılır. Bağlanma esnasında enzime ve yüzeye ait aktif uçların olumsuz etkilenmemesi adına, işlem süresi boyunca ortam pH'ı ve iyonik şiddeti mutlak suretle kontrol edilmelidir. pH'daki küçük bir oynama iyonik bağı bozarak taşıyıcı ile enzim arasındaki bağları koparabilmektedir (Costa et al., 2004).

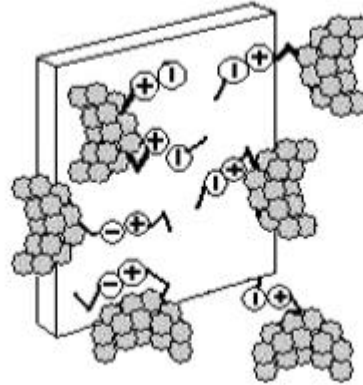
Adsorpsiyonla immobilizasyonun temel avantajları; metodun basit olması, enzimin aktif pozisyonu üzerinde çok küçük bir konformasyon değişikliğine sebep olması ve yüzeydeki zamanla inaktif olan enzimlerin yeni ve taze enzimlerle değiştirilebilir olmasıdır. Sistemin olumsuz yanı ise enzim ile yüzey arasındaki bağların, küçük değişimlerle dahi bozulabilir olmasıdır. Taşıyıcıya bağlanmış immobilize enzimler, pH'ta, sıcaklıkta, çözgüde veya iyonik

şiddetteki küçük değişimlerle dahi kolaylıkla ayrılabilir (Costa et al., 2004).

Adsorpsiyon metodunda kullanılan taşıyıcılardan biri olan kitosan, doğada en çok bulunan biyopolimer olan kitinden türevlendirilmektedir. Kitosanın mevcutta aktif olarak kullanıldığı ve kullanılma potansiyeli yüksek olan pek çok uygulama alanı söz konusudur. Kitosanı bu denli önemli yapan özelliği ise poli katyonik oluşudur. Bu yapısal artışının yanı sıra kitosanın; toksik olmayan, biyobozunur, biyofonksiyonel, biyouyumlu ve antimikrobiyal nitelikleri kanıtlanmıştır. Bu ilgi çekici özelliklerinden ötürü kitosanın ilaç geliştirme, bitki koruma, antibakteriyel özellikleri, DNA biyosensörleri, doku mühendisliği, gıda katkı maddeleri, su arıtımı, gıda paketlenme ve pek çok diğer alanda kullanımı mevcuttur (Liu et al., 2011). Bu niteliklerinden ötürü kitosan oldukça geniş kullanım alanına sahip bir taşıyıcıdır.

2.3.3.2. İyonik bağlanma

İyonik bağlanma ile immobilizasyon metodu, enzim moleküllerinin ya da aktif moleküllerin iyonik yüklere sahip katı taşıyıcılara iyonik bağlar ile tutunması prensibine dayanır. Bu methodda immobilize olabilecek enzim miktarı ve immobilizasyon sonrası bağlı enzimin aktivitesi, taşıyıcının yüzey özelliklerine bağlı olarak gelişmektedir. İyonik bağlanma metoduna ait şematik görsel Şekil 2.6'da verilmiştir.



Şekil 2. 6 Bir biyokatalizatörün taşıyıcıya iyonik bağ ile bağlanması (Costa et al., 2004).

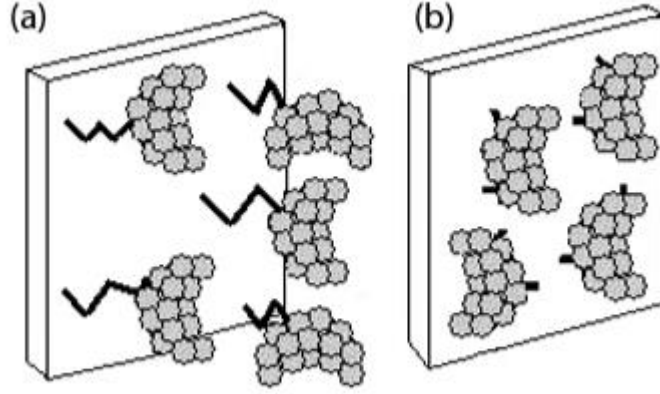
Bazı durumlarda fiziksel bağlanma da görülmektedir. Fiziksel bağlanma ile iyonik bağlanmanın arasındaki fark şöyle ifade edilebilir; fiziksel bağlanma iyonik bağlanmadan güçlü ancak kovalent bağlanmadan zayıftır. Ayrıca fiziksel bağlanma ile immobilizasyon metodu, iyonik bağlanma ile olan immobilizasyon metoduyla aynı prosedüre sahiptir.

İyonik bağlanmada enzim ile taşıyıcı arasındaki etkileşimler; pH değişimlerine, taşıyıcının yüküne, enzimin konsantrasyonuna ve bağlanma sıcaklığına göre şekillenmektedir. İyonik bağlanma metodu ile immobilizasyonda kullanılacak taşıyıcılara; dietilaminoetilselüloz, dekstran, kitosan ve karboksimetilselüloz gibi polisakkarit bileşikler; polistren türevleri ve polietilen vinilalkol gibi sentetik polimerler ve amberlit (iyon değiştirici bir ticari reçine), alüminyum, silikatlar, bentonit, sepiolit (lüle taşı) ve silika jel gibi inorganik materyaller örnek verilebilir. İyonik bağlanma ile immobilizasyonun avantajı, enzimin konformasyonunda büyük değişikliklerin olmamasına bağlı olarak, immobilizasyon sonrası aktivitenin yüksek olmasıdır. Yöntemin temel dezavantajı ise istenmeyen bağlanmaların gözlenmesidir ve bunu engellemek amacıyla bağlanma çok doğru bir iyonik şiddet ve pH koşulları altında gerçekleştirilmelidir (Costa et al., 2004).

2.3.3.3. Kovalent bağlanma

Kovalent bağlanma metodu, bir enzim ya da aktif bir bileşiğin bir taşıyıcıya kovalent bağlarla tutunduğu immobilizasyon sistemlerini ifade eder. Bağlanma prosesi, taşıyıcının yüzeyindeki fonksiyonel gruplar ile enzimlerin bağlanma yüzeylerindeki aminoasit uzantıları arasında gerçekleşmektedir. Enzim yüzeyindeki kovalent bağlantıya katılan protein grupları genelde; lizin ya da arjinine ait amino grubu (NH_2), aspartik ya da glutamik asitlere ait karboksil grubu (COOH), serin ya da treonine ait hidroksil grubu (OH) ve sisteine ait sülfidril grubu (SH)'dur. Kovalent bağlanma metodunda; diazolama, amino bağı, Schiff bazı oluşumu, amidasyon reaksiyonları, tiol-disülfid homeostazı, peptid bağı ve alkilasyon reaksiyonları gibi pek çok kovalent bağlanma metodu ile enzim ve taşıyıcı birbirine bağlanmaktadır. Taşıyıcı ile biyokatalizör arasındaki bağlantı direkt olabildiği gibi belli uzantılarda olabilen ve 'spacer' ya da 'kol' diye

adlandırılan ara uzantıların her iki bileşene de tutunması sonucu da gerçekleşebilmektedir. Biyokatalizatörün bir aracı vasıtasıyla taşıyıcıya bağlanması ise enzimin daha hareketli olmasını ve dolayısı ile daha rahat konformasyon gösterip yüksek aktivite göstermesini sağlayabilmektedir. Şekil 2.7’de kovalent bağlanma metodu şematize edilmiştir (Costa et al., 2004).



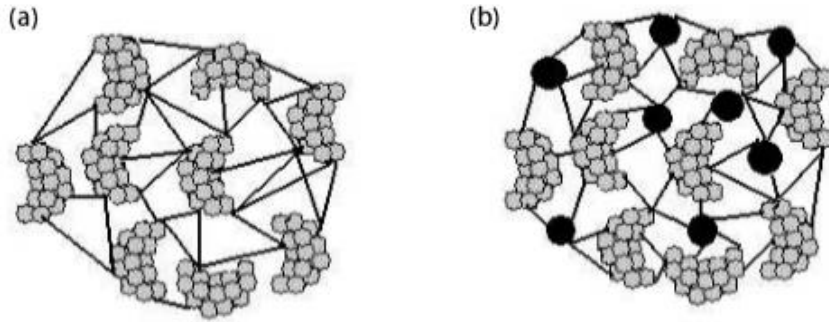
Şekil 2. 7 Bir biyokatalizatörün taşıyıcıya uzatıcı kol (spacer) varlığında (a) ve uzatıcı kol olmadan kovalent bağ ile bağlanması (b) (Costa et al., 2004).

Bu metotta en önemli noktalardan biri kovalent bağlanmanın enzimin aktif bölgesinden gerçekleşmemesi gerektiğidir. Aksi durumda kovalent bağlı enzim hareket edemez, substratına bağlanamaz ve inaktif halde kalır. Enzimlerin taşıyıcıya kovalent bağlanması iki temel adımda gerçekleştirilir. İlk adım olarak taşıyıcının yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, siyanojen bromür, karbodiimid, aminoalkiletoksilan, izotiosiyanat ve epiklorohidrin gibi özel ajanlarla aktifleştirilir. Kovalent bağlama metodunda pek çok matriks ile çalışılabildiğinden ötürü ideal matriks diye bir kavram kullanmak mümkün değildir. Bu sebeple de yöntemin avantaj ve dezavantajları kullanılan enzim ve taşıyıcıya göre farklılık göstermektedir. Yapılan bir takım çalışmalar, kovalent bağlarla immobilize edilen enzimlerin, yüksek sıcaklık, denatüre edici ajanlar ve organik solventlere karşı dirençli olduğunu göstermiştir. Yine kovalent bağlanma metodunda da, immobilizasyon verimi ve kapasitesi, enzimin türüne, taşıyıcının türüne ve bağlama metoduna göre değişmektedir. Bunun dışında da taşıyıcının maliyeti, piyasada bulunabilmesi, bağlanma kapasitesi, hidrofillik düzeyi, yapısal stabilitesi ve dayanıklılığı temel seçilme sebepleri arasındadır. Naturel polimerler

içeriğindeki hidroksil grupları (OH) sebebi ile (hidrofillik sağlar) öncelikli tercih edilen taşıyıcılardır. Kovalent bağlanma ile immobilizasyon metodunda en sık karşılaşılan problem, enzimin yüksek stres altında olmasıdır. Bu teknikte bağlanma prosedürü gereği enzim ciddi derecede konformasyonel sıkılık/sabitlik halindedir ve dolayısıyla bu durum aktivitesinin düşmesine sebep olabilmektedir (Costa et al., 2004).

2.3.3.4. Çapraz bağlanma

Çapraz bağlanma metodu ile immobilizasyon prosedürü yine enzim ya da aktif moleküllerin taşıyıcıya kovalent bağlarla bağlandığı ancak iki ya da daha fazla fonksiyona sahip ajanların kullanıldığı sistemlerdir. Enzimler, organeller ya da bütün hücreler gibi biyokatalistler taşıyıcıya glutardialdehit, glutaraldehit, glioksal, diizosiyanatlar, hekzametilen diizosiyanat, toluen diizosiyanat gibi multi fonksiyonel ajanlar aracılığı ile bağlanmaktadır. Enzimlere ait bağlanma noktası genelde lizinin amino grubu olmakla birlikte nadir durumlarda, sisteinin sülfidril grupları, tirozinin fenolik hidroksil grupları ve histidinin imidazol grubu bağlantıya katılmaktadır. Bu durumlara ilişkin görsel Şekil 2.8’de verilmiştir (Costa et al., 2004).



Şekil 2. 8 Bir biyokatalizörün taşıyıcıya çapraz bağlayıcı varlığında (a) ve çapraz bağlayıcının aracı moleküllerle de bağlandığı ko-çapraz bağlanma metoduyla (b) immobilizasyonu (Costa et al., 2004).

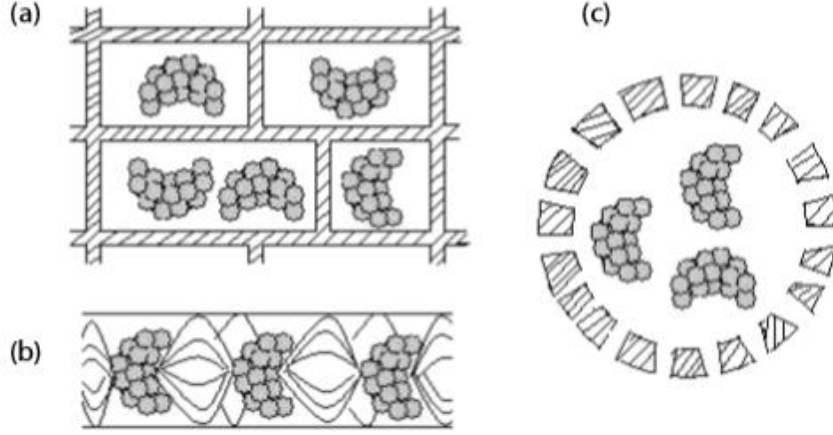
Her farklı enzim için avantajlar ve dezavantajlar sistemin nasıl kurulduğuna göre değişmektedir. Prosesin genel avantajlarından biri işlemin

kolaylığıdır. Sistemin temel olumsuz yönleri ise bazı durumlarda partiküllerin kırılğan olması ve difüzyonel sınırlamalardır. Çapraz bağlanma ile immobilizasyonda sıklıkla yaşanan durumlar arasında enzimin konformasyonel açıdan değişikliğe uğraması ve bu durumun aktiviteyi düşürmesi mevcuttur. Endüstride bu teknikten kaynaklı yaşanan oldukça önemli bir sorun olarak, glutaraldehit ile çapraz bağlanan enzim kullanıldığında glukoz izomerizasyonunun gözlenmesi gösterilebilmektedir. Sanayideki iyi bir örnek olarak ise pek çok büyük ölçekli üretimde bakteriyel hücrelerin glutaraldehit ile çapraz bağlanarak çok iyi partiküller elde edilmesi verilebilir (Costa et al., 2004).

Bu metotta sıklıkla kullanılan glutaraldehit, beş karbonlu zincirinin her iki ucunda da birer aldehit uzantısı içeren bir homobifonksiyonel çapraz bağlayıcı moleküldür. Öncül atak olarak amin gruplarına bağlanırken, birden fazla mekanizma ile de reaksiyon göstermektedir. Bu bağlanma şekli ile glutaraldehit, stabil ikincil amin bağlarını oluşturarak proteinleri çapraz bağlar. Glutaraldehit suda hemiasetal bir yapıya bürünebileceği gibi karbon-karbon çifte bağlarını içeren dallanmamış α - ve β - katlanmaları ile aldol halkası formuna da bürünebilmektedir. Ortamda indirgeyici ajanlar olmasa bile bu çifte bağlı yapı, aminlerle kovalent bağlanma reaksiyonu gerçekleştirebilmektedir. Eğer sulu ortamda yüksek alkali koşullara maruz bırakılmazsa, taze glutaraldehit kendi içinde küçük polimerler oluşturabilmektedir. Eğer elinizde eskiden hazırlanmış bir glutaraldehit çözeltisi varsa, oluşan polimerler gözle görülecek düzeyde saptanabilmektedir. Bu bağlanma profili sebebiyle de glutaraldehitin kullanıldığı ortamlarda belirsiz bağlanan ürünler meydana gelip, herhangi bir metodun ölçek büyütmesi zorlaşabilmekte veya mümkün olamamaktadır (Hermanson, 1996).

2.3.3.5. Tutuklama ve enkapsülasyon

Tutuklama metodu, aktif bir bileşiğin bir film, jel ya da fiber üzerine tuzaklandığı ya da kaplama ve mikroenkapsülasyon metodlarının kullanıldığı teknikleri içermektedir. Enkapsülasyon metoduna ilişkin şema Şekil 2.9'da verilmiştir.



Şekil 2. 9 Bir matriks (a), fiber (b) ve kapsül (c) içerisinde enzim enkapülasyonu (Costa et al., 2004).

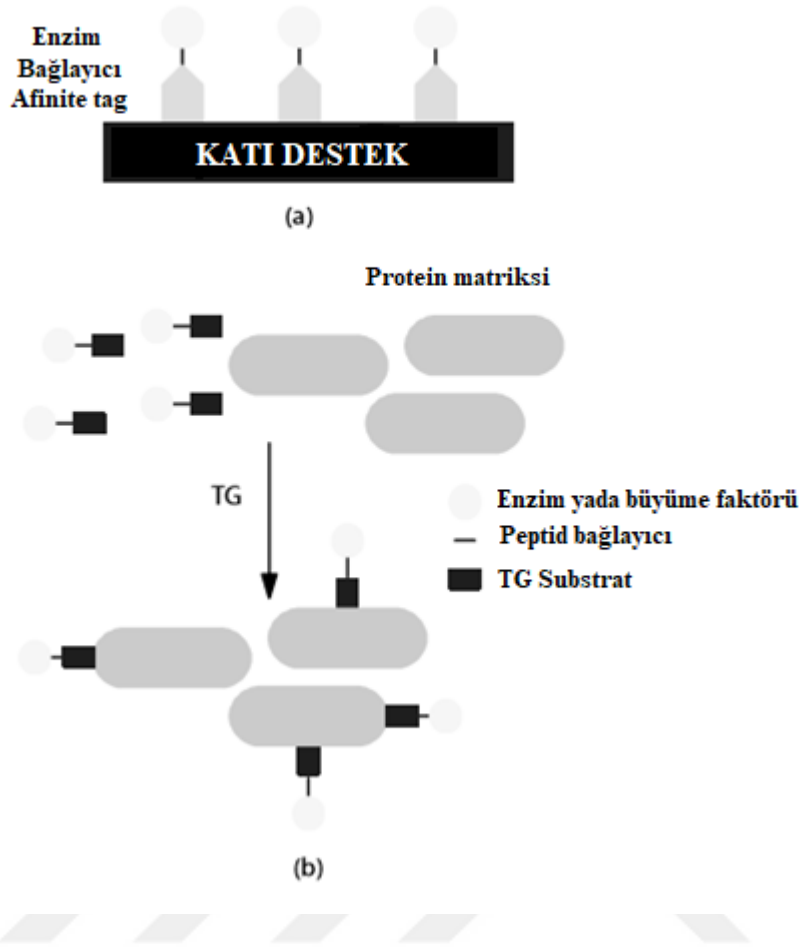
Bu metod bir enzim ya da aktif bir bileşiğin bir polimerle birlikte, bir çapraz bağlayıcı molekülle muamelesi sonucu gerçekleşmektedir. İşlem neticesinde enzim bir kafes ağına hapsedilmiş olmaktadır. Mikroenkapsulasyon prosedürü bir enzim solüsyonunun yarı geçirgen sferik bir polimerle çevrenmesi yoluyla gerçekleştirilmektedir (Costa et al., 2004).

Boyalarn, ilaçların ve diğer kimyasalların mikroenkapsülasyonu 1960'ların ortasında yapılmakta olan çalışmalar arasında olmasına rağmen, enzim mikroenkapsulasyonu bu tarihten itibaren denenmeye başlanmıştır. Bu tarihten sonra da günümüze dek pek çok enzim, farklı metodlar ve kimyasallar kullanılarak başarı ile mikroenkapsulasyon metoduyla geliştirilmiştir. Mikroenkapsulasyon ile immobilizasyon metodunun temel avantajı ise küçük hacimli partiküller elde edilebilen, eş zamanlı çalışılabilirliği olan ve oldukça geniş enzim-substrat çeşitliliğinde çalışılabilir bir yöntem olmasıdır. Metodun olumsuz yanı ise bazı çalışmalarda gözlenen ve immobilizasyon esnasında oluşan enzim aktivitesi kaybıdır. Böyle durumlarda daha yüksek konsantrasyonda enzim yüklemesi gerekmektedir. İlave olarak, bu sistemde enzim kaçığı olmaması için por genişliğini ilgili aralıkta tutmak gerekmektedir, bu durum da sistemde difüzyonel anlamda sınırlandırmalara sebebiyet verebilmektedir (Costa et al., 2004).

2.3.3.6. Afinite ligantlarına protein füzyonu (birleşme) ve enzimatik konjugasyon (eşleşme)

Daha önce de bahsedildiği üzere bazı protein immobilizasyonu metodlarında matriksin kimyasal modifikasyonu gerekmektedir. Bu durum özellikle biyobozunur moleküller için ciddi önem arz etmektedir. Enzimle matriksin bağlanması için modifikasyon gereken işlemlerde bazı toksik bileşenler de oluşmaktadır ve bu bileşenler enzim aktivite kaybına sebep olabilmektedir. Bu toksisite sebebiyle de özellikle biyomedikal alanda kullanılacağı zaman, immobilize sistem ortamı toksinlerden arındırılmalıdır. Bu tip uygulamalarda, immobilize enzimlerin üreme ve yayılma gibi spesifik hücre uyarılarına karşı verdiği yanıtın etkinliği, modülatörlerin hedef hücreyle nasıl ilişkilendirildiğine bağlı olarak değişmektedir. Bu tür çalışmalarda immobilize edilen enzimin aktivitesinin korunabilmesi için bağlanma oryantasyonu çok önemlidir. Yine kimyasal bağlarla kovalent bağlanma prosesinde de ligant-reseptör etkileşiminin engellenmesi, reseptörün dimerizasyonu ve hedef hücreye ulaşması engellenebilmektedir (Costa et al., 2004).

Doğada bulunan lektinler, avidin (biotin bağlayıcı protein), G ve A proteinlerine ait immünoglobulin bağlayıcı protein (IgG) ve karbohidrat bağlayıcı modüller gibi bazı yapılar, kimi katı yüzeylere oldukça yüksek afinite ve spesifikle bağlanabilirler. Bu domainler, proteinlerin afinite adsorbanlarına (yüzey) bir afinite tagi (başlığı) gibi bağlanmasında kullanılabilirler. Bu metodla, ilgili gene bir DNA kodlama afinite tagi eklenirse gen ekspresyonu sağlanabilmektedir. Böyle bir füzyon proteini, afinite taginin, afinite yüzeyine spesifik bağlanması ile immobilize edilebilmektedir. İlgili bağlanma Şekil 2.10'da şematize edilmiştir.



Şekil 2. 10 Biyokatalizatörlerin katı yüzeylere, afinite ligantlarının protein füzyonu metodu (a) ve transglutaminaz destekli enzimatik konjugasyon metodu (b) ile immobilizasyonu (Costa et al., 2004).

Bu metodla immobilize protein üzerindeki konformasyonel değişiklikler minimum olmakta ve enzim aktivite kaybı da minimum olmaktadır. Ayrıca füzyon proteinlerinin taşıyıcıya spesifik bağlandığı bu immobilizasyon metodunda, yüksek miktarda ligant bağlanabilmekte ve bu da prosedürü kolaylaştırmaktadır (Costa et al., 2004).

Genetik mühendisliği tekniği kullanılarak oluşturulan kimerik proteinler (farklı yapıların birleşmesiyle oluşan moleküler yapılar), bir afinite domaini ile bağlanırsa biyoaktivite gösterebilmektedir. Bu da katı materyal yüzeyine biyomoleküllerin immobilizasyonunda oldukça kullanışlı bir methodur. Enzimler, antitadiler, sitokinler ve streptavidin gibi proteinler, selüloz bağlayıcı domain

özelliğine sahip proteinlerle birleştirilerek, selülozik yapıdaki materyallerin yüzeyine immobilize edilebilmişlerdir (Costa et al., 2004).

Protein füzyon teknolojisi kullanılarak, aktiviteleri ve bağlanma özellikleri değiştirilen enzimlere bifonksiyonellik kazandırılabilir. Bu yaklaşım biyoteknoloji, diyagnostik ve ilaç sektöründe, biyolojik aktif proteinlerin saflaştırılması ve immobilizasyonu için çeşitli metodların geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Örneğin, kimi memeli hücrelerinin farklı yüzeylere tutunması amacıyla; peptidler, büyüme faktörleri ve sitokinlerin spesifik bağlanma domainleri ile füzyonu neticesinde, progenitör hücrelerin kültür içinde büyümesi ve aktivasyonu sağlanabilmektedir (Costa et al., 2004).

Kovalent olmayan bağlardan bilinen en kuvvetli bağ, biyotin ve streptavidin arasındadır ($K_p = 10^{-15}$ M). Bu sebeple biyomateryal ve biyosensör yüzeylerinde farklı biyomoleküllerin immobilizasyonu için bu çok güçlü biyotin-avidin sistemi kullanılabilmektedir. Bu sistemde, biyotinlenmiş yüzey ve biyotinlenmiş kısa ligant molekülleri arasında avidin köprüsü kullanılmaktadır (Costa et al., 2004).

Biyomoleküllerin protein matrikse immobilizasyonu transglutaminaz (TG) enzimi aracılığı ile de gerçekleştirilebilmektedir. TG enzimi, çeşitli proteinlerin primer amino grubu ile peptid-bağı ile bağlı glutamin uzantılarının γ -karboksiimin grubu arasındaki açıl transfer reaksiyonunu katalizlemektedir. Reaksiyon sonunda geri dönüşsüz çapraz bağlanmış ve çözünmez bir supramoleküler (çok moleküllü) yapı elde edilmektedir. Ayrıca TG enzimi, NH_2 yüzeylere peptid ve polipeptid içeren glutaminlerin bağlanmasında kullanılabilmektedir. Bu reaksiyona ilişkin şema yine Şekil 2.10'da verilmiştir. Bu yaklaşım Sakiyama ve arkadaşları (1999; 2001) tarafından, bir büyüme faktörü geliştirme sistemi içerisinde, heparin bağlayıcı peptidler için kullanılmıştır. Bir sonraki çalışmalarında ise β -sinir (nerf) büyüme faktörü ve ekzojen faktör XIIIa (çapraz bağlayıcı için substrat)'dan oluşan çift domainli peptid sistemini içeren büyüme faktörü füzyon proteinini geliştirmişlerdir (Costa et al., 2004).

2.3.4. İmmobilize Enzimlerin Avantaj ve Dezavantajları

İmmobilize enzimler normal koşullar altında serbest enzimlere kıyasla stabilizasyon, lokalizasyon ve yönelim özellikleri açısından üstündürler. Bu üstün özellikleri ile de daha kolay kullanılırlar, tekrarlı kullanılabilirler ve maliyeti düşürürler. Terapötik immobilize enzimlerin kimi avantajları ise şöyle sıralanabilir; kan dolaşım sisteminde uzun süre kalırlar, aktivite kaybı minimumdur ve düşük immunojenisite (bağışıklık karakteri) gösterirler. Bu özelliği ile de enzim yenileme terapisine alternatif bir metod olduğu ifade edilebilmektedir. Pek çok olumlu özelliğinin yanısıra immobilize enzimler biyomedikal alanda, substratın girişi ve ürünün çıkışı sırasında kütle transferi problemi oluşabilen, hücre içi ya da dışı taşıyıcı yüzeyinde yanlış biyolojik cevaplar oluşturabilen, diğer moleküller tarafından kirlenebilen, ürün inhibisyonuna sebep olabilen ve sterilizasyona ilişkin sorunlar gözlemlenebilen bir alternatif enzim ürünüdür. Bununla birlikte tüm reaktanların ve protein solüsyonlarının 0,2 µm filtrelerden geçirildiği ve üretim prosesi aseptik koşullar altında gerçekleştirilen steril immobilizasyon sistemleri mümkündür (Costa et al., 2004).

Biyolojik ve teknolojik yollarla geliştirilen enzimlerin ve diğer ürünlerin medikal alanda kullanımına ilişkin en önemli noktalardan biri, toksinler ve pirojen materyaller gibi enfeksiyon yapabilir nitelikteki yan etkilere sebep olmaması gerektiğidir. Bu sebeple de medikal kullanımlar için üretilen tüm immobilize enzimler, diğer medikal ürünlere uygulandığı gibi lokal tolerans, toksisite, karsinojenite ve immunojenite testlerinden geçirilmelidir. Medikal alanda kullanılacak bu enzimlerde son aşama da hastaların güvenliği için, tüm olası yan ürünler hesaplanarak ve prosese ilişkin herhangi bir belirsizlik ya da kuşku var ise gerekli mevzuatları çıkararak, medikal güvenlik koşullarının belirlenmesidir (Costa et al., 2004).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan tüm kimyasallar Ege Üniversitesi Biyokimya Bölümü bünyesindeki stoklardan temin edilmiştir. Aşağıda, kullanılan kimyasallara ait liste verilmiştir.

Kullanılan kimyasal maddeler; Coomassie-Brilliant Blue G-250 CA, Sığır Serum Albumini (BSA), Etanol, Na/K Tartarat, 3,5-Dinitrosalisilik Asit (DNS), Karboksimetilselüloz Sodyum Tuzu (CMC), Hidroklorik Asit, Amonyum Sülfat, Tert-Butanol, Glisin ($C_2H_5NO_2$), Kahverengi Alg Kaynaklı Aljinik Asit Sodyum Tuzu, % 25 grade I Glutaraldehit, Kitosan (Düşük Molekül Kütlesi), D-Glukoz ve Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (%15 SDS-PAGE) ile Moleküler Kütle Standartları Sigma Chem. Co (St. Louis, CA)'dan; NaOH, NaH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 Fosforik Asit, Asetik Asit E. Merck (Almanya)'den, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ise J.T. Baker'dan temin edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan ve immobilize edilen selülaz enzimi ise Orba Biyokimya Sanayi Tic. AŞ. (Türkiye) firmasından hibe yolu ile temin edilmiştir. İlgili selülaz (Cellulase I) *Trichoderma reesei* kaynaklı olup yem sanayine yönelik ticari amaçlı üretilen kuru formda bir enzimdir.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında aşağıda sıralı halde verilen cihazlar kullanılmıştır; santrifüj cihazı (Hettich Universal 30 RF, Almanya), mini jel sistemi (Biorad, Amerika), derin dondurucu (Uğur, Türkiye), orbital karıştırıcı (IKA Labortechnik KS 260 basic, Almanya), vorteks (IKA MS 2, Almanya), lineer karıştırılmalı su banyosu (Memmert, Almanya), spektrofotometre (Perkin-Elmer Lambda 35 UV/Vis, ABD), inkübatör (New Brunswick Scientific, ABD), pH-metre (Hana Instrument, ABD), Nuçe erleni (250 mL) ve por size:3 Filtreli Nuçe hunisi (Isolab

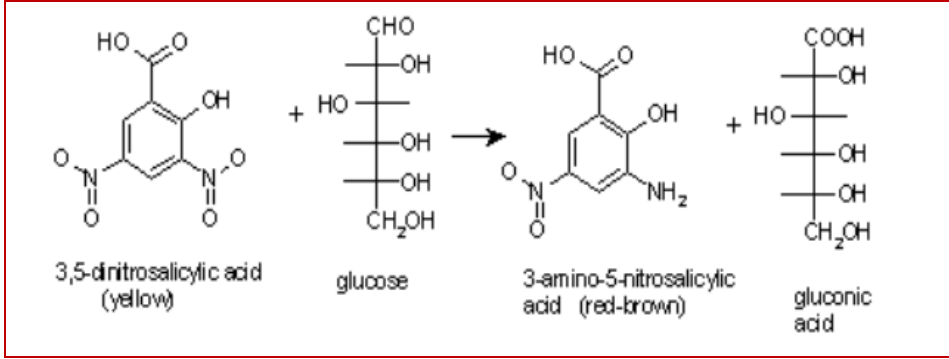
Laborgeräte GmbH), Inject steril enjektör (5 mL), distile su cihazları (Fistream, England ve Milli-Q Milipore, ABD).

3.2. Yöntem

3.2.1. Selüloz Aktivite Tayini (DNS Metodu)

Selüloz enziminin aktivite tayini, El-Naggar ve Abdelwahed'in kullandıkları DNS metodu modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Yöntemde selüloz aktivitesinin tespiti için, literatürde çok yaygın olan substratı karboksimetil selüloz (CMC) kullanılmıştır. Reaksiyon neticesinde ortaya çıkan glukoz molekülleri ise 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) ile boyama reaksiyonuna uğratılıp spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (El-Naggar and Abdelwahed, 2012).

Reaksiyona ilişkin prosedür Şekil 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.1 Glukozun Dinitrosalisilik asit (DNS) reaktifi ile reaksiyonu.

(<https://cynthialearnsthings.wordpress.com/2016/07/13/dns-assay/>, Erişim tarihi: 01/08/2019)

DNS Reaktifinin hazırlanışı; 20 mL 2 N NaOH çözeltisine 1 g DNS yavaş yavaş eklenmiştir. Ekleme esnasında çözelti kaynatılmamak koşuluyla sürekli karıştırılmıştır. DNS tamamen çözündükten sonra, balonjojede toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır. Sonra, karışımın üzerine 30 g Na/K Tartarat ilave edilip, tamamen çözündükten sonra, toplam hacim yine distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti maksimum 2 hafta süre ile karanlık alanda muhafaza edilerek kullanılmıştır.

CMC çözeltisinin hazırlanışı; 1 gram karboksimetilselüloz (CMC) sodyum tuzu total hacim 100 mL olacak şekilde distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Çözelti +4 °C’de depolanarak kullanılmıştır.

Selülaaz aktivite prosedüründe kör çözelti için distile su kullanılmıştır. Prosedüre göre 0,25 mL serbest enzim üzerine 0,25 mL %1’lik (v/v) CMC çözeltisi eklenmiştir. İmmobilize enzim prosedüründe ise 3 adet Ca-Aljinat mikroküre üzerine 0,25 mL 50 mM, pH 4,5 Na-asetat tamponu eklenmiş ve yine 0,25 mL CMC eklenmiştir. Daha sonra reaksiyon tüpleri 50 °C’deki su banyosunda 5 dakika inkübe edilmiştir. (İmmobilize enzim prosedüründe bu süre tamamlanınca mikroküreler ortamdan uzaklaştırılmıştır.) İnkübasyon süresi tamamlanınca reaksiyon tüplerine 0,5 mL DNS reaktifi eklenip, 10 dakika kaynar su banyosunda enzimatik reaksiyonun durması ve DNS boyama reaksiyonunun gerçekleşmesi için beklenmiştir. En son olarak da tüplere 10’ar mL distile su eklenip 546 nm’de spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir. Tüm örnekler üçlü setler halinde çalışılmıştır.

Selülaaz aktivitesinin hesaplanması için 0,5–10 µmol aralığında D-glukoz kullanılarak hazırlanan ‘DNS standart grafiği’ kullanılmıştır. Bir selülaaz aktivite birimi, yukarıda gerçekleştirilen koşullar altında dakikada 1 µmol glukoz açığa çıkaran enzim miktarıdır (Unite).

3.2.2. Protein Miktarı Tayini (Bradford Metodu)

Tüm serbest enzim preparatlarında protein miktarı tayini Bradford metodu ile gerçekleştirilmiştir (Bradford, 1976). Metod lizin, arjinin gibi bazik gruplara sahip protein gruplarının, Coomassie Brilliant Blue G-250 asidik yapıdaki boya ile etkileşerek renklenmesine ve spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır.

Bradford reaktifinin hazırlanışı; 40 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası, % 95’lik (v/v) 50 mL etanol içerisinde çözülmüştür. Çözünme tamamlanınca üzerine 55 mL %88’lik (v/v) fosforik asit çözeltisi eklenmiştir. 30 dk’lık karışma süresinin ardından, çözelti hacmi balonjojede 1 L’ye

tamamlanmıştır. Son olarak, hazırlanan reaktif filtre edilmiş ve kullanım süresi boyunca karanlık alanda muhafaza edilmiştir.

Tayin prosedürü oldukça basittir. 100 µl örnek üzerine 2 mL Bradford reaktifi eklenir. 10 dk karanlık odada reaksiyon gerçekleştirilir. Ardından 595 nm’de spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilir. Kör çözeltide örnek yerine distile su kullanılır. Tüm örnekler üçlü setler halinde çalışılır.

Sığır serum albumununin (BSA), distile suda hazırlanmış 1 mg/mL’ lik stok standart çözeltisinden yola çıkarak, 0,02–0,25 mg/mL konsantrasyon aralıklarında çözeltiler oluşturulmuştur. Bu çözeltiler kullanılarak ‘BSA standart grafiği’ hazırlanmış ve örnek protein konsantrasyonları bu grafiğe göre hesaplanmıştır.

3.2.3. Selülazın Tuz (Amonyum Sülfat, AS) Çöktürmesi Metoduyla Kısmi Deriştirilmesi

Bu tez çalışmasında kullanılan ticari selülaz yem sanayisi için üretilen ve kullanılan bir enzimdir. Bu sebeple de yüksek saflıkta olmadığı için tuz çöktürmesi metodu ile deriştirilmiştir. İlk olarak 500 mg Cellulase-I enzimi tartılıp son hacim 25 mL olacak şekilde 50 mM, pH 4,5 Na-Asetat tamponunda çözülmüştür. 15 dk 4000 rpm devirde +4 °C’de santrifüjlenmiştir. Bu işlem olası safsızlıkların ve katkı maddelerinin uzaklaştırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan pellet ayrılmış ve süpernatant başlangıç enzim çözeltisi olarak kabul edilmiştir. Daha sonra süpernatanta %80 (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır. İlgili miktardaki amonyum sülfat süpernatanta yavaş yavaş olmak suretiyle +4 °C’de eklenmiş ve karıştırılmıştır. Tuz tamamen çözündükten sonra, karışım 2 saat bekletilmiş ve 30 dk, 9000 rpm hızda +4 °C’de santrifüjlenmiştir. Pelletler 50 mM, pH 4,5 Na-Asetat tamponu ile çözülüp birleştirilmiş ve selüloz tabanlı diyaliz membranı kullanılarak yine pH 4,5 Na-Asetat tamponuna karşı diyalizlenmiştir. Diyaliz ile tuzun uzaklaştırılmasının ardından elde edilen örnek, diyaliz sonrası kısmi saf enzim çözeltisi olarak kabul edilmiş ve porsiyonlanarak -20 °C’de depolanmıştır. Bundan sonraki bütün denemelerde kısmi saf selülaz enzimi olarak kullanılmıştır. Selülaz enziminin

aktivitesi 233 (U/mL), protein miktarı 9,76 (mg/mL) ve spesifik aktivitesi 24 (U/mg)'dır.

3.2.4. Selülazın TPP Metodu ile Deriştirilmesi

Selülaz enzimi (24 U/mg), içerisinde 0,2 mg protein olacak şekilde 2 mL pH 4,5 Na-Asetat tamponunda hazırlanmıştır. İçine %50 (w/v) konsantrasyonda olacak şekilde amonyum sülfat eklenmiştir. Tuzun çözünmesinin ardından ortama 1:1 (v/v) oranında 2 mL *tert*-bütanol eklenmiştir. Örnekler vortekslenip oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. Bir saatin ardından reaksiyon tüpleri 10 dk oda sıcaklığında 4000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Oluşan üçlü-faz sisteminde alt ve üst fazlar pastör pipeti yardımı ile ayrılmıştır. Orta faz 0,5 mL 50mM, pH 4,5 Na-Asetat tamponunda çözülmüştür. Üst alkol fazı dekanete edilip, alt faz ölçümler için ayrılmıştır. Son olarak da alt ve orta fazda aktivite ve protein tayinleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.1. Amonyum sülfat (AS) konsantrasyonu optimizasyonu

Amonyum sülfat konsantrasyonu optimizasyonunda, TPP sistemi 0,2 mg enzim, 1:1 (v/v) enzim:t-bütanol oranı ve 1 saat reaksiyon süresi ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Bu optimizasyonda denemeler, enzime eklenen amonyum sülfat miktarı %30, %40, %45, %50, %55, %60 ve %70 (w/v) olmak üzere farklı konsantrasyonda tuz eklenerek gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.2. Enzim: t-bütanol (v/v) oranı optimizasyonu

Enzim: t-bütanol oranı optimizasyonunda, TPP sistemi yine 0,2 mg enzim, %50 (w/v) amonyum sülfat oranı ve 1 saat reaksiyon süresi ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Bu optimizasyonda denemeler, enzim: t-bütanol oranı 1:0,5, 1:0,75, 1:1, 1:1,5 ve 1:2 (v/v) olmak üzere farklı miktarlarda *tert*-bütanol eklenerek gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.3. Sistem pH'ı optimizasyonu

Sistem pH'ı optimizasyonunda, TPP sistemi yine 0,2 mg enzim ile, %50 (w/v) amonyum sülfat konsantrasyonu içerecek şekilde, 1:1 (v/v) enzim: t-bütanol oranı, 1 saat reaksiyon süresi ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. pH optimizasyonunda kullanılan selüloz, farklı pH'daki tamponlarda seyreltilmiş ve ortam pH'ı ilgili değerlere NaOH ve HCl ilavesi yapılarak ayarlanmıştır. pH ayarlamaları $\pm 0,04$ hassasiyetle gerçekleştirilmiştir.

Burada ortam pH'ı olarak pH: 3; 4; 4,5; 5; 5,5; 6,5 ve 7 ile çalışılmıştır. pH 3 için glisin-HCl tamponu, pH 4 ile pH 5,5 arasında Na-Asetat tamponu, ve pH 6 ile pH 7 arasında da Na-fosfat tamponu kullanılmıştır. Hiçbir pH müdahalesi yapılmayan selülazın pH'sı 4,5 olarak tespit edilmiştir.

3.2.4.4. Protein miktarı optimizasyonu

Protein miktarı optimizasyonunda, TPP sistemi yine %50 (w/v) amonyum sülfat konsantrasyonu, 1:1 (v/v) enzim: t-bütanol oranı, kendi pH'sında (pH:4,5) ve 1 saat reaksiyon süresi ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Protein miktarının optimize edildiği bu çalışmada, sisteme başlangıçta eklenen enzimin protein miktarları değiştirilerek sistemler kurulmuştur. Enzimler sisteme 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 ve 0,5 mg protein içerecek şekilde eklenmiştir.

Tüm optimizasyonlara ait denemeler üçlü setler halinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.5. Tekrarlanabilirlik denemesi

Tekrarlanabilirlik denemeleri, önceki denemelerle tespit ettiğimiz optimum koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Bu denemede sistemler; 0,1 mg enzim, %50 (w/v) amonyum sülfat konsantrasyonu, 1:1 (v/v) enzim: t-bütanol oranı ile pH 4,5'da hazırlanmış ve 1 saat reaksiyon süresi ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Sistem 5 tekrarlı çalışılmıştır.

3.2.4.6. Ölçek büyütme denemesi

Ölçek büyütme çalışması, belirlenen optimum koşullardaki (0,1 mg protein, %50 (w/v) AS, 1:1 e/t oranı (v/v), pH 4,5) sistemin (0,2 ml'lik); 2, 3, 4 ve 5 kat hacimsel katlarıyla TPP sistemleri kurularak gerçekleştirilmiştir. Ölçek sistemlerine sırası ile 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 ve 1 mL enzim eklenmiş olup, ilgili oranlarda tuz ve t-bütanol eklemeleri yapılmıştır.

3.2.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Moleküler Kütle Tayini

SDS-PAGE, poliakrilamid jel elektroforezi metodları arasındaki en yaygın kullanılan metoddur ve proteinin molekül boyutuna göre ayırım yapması nedeniyle bağıl molekül kütlesi tayininde kullanılır (Bıçak Çelem, 2013). Bu çalışmada ticari *T. reesei* kaynaklı selülozazın, saflığını kontrol etmek ve sinerjetik çalıştığı bilinen 3 farklı enzimin (endo-glukanazlar (EC 3.2.1.4.), sellobiyohidrolazları (CBHs) (EC 3.2.1.91) da içeren ekzoglukanazlar ve β -glukozidaz (BG) (EC 3.2.1.21)) molekül kütlelerini belirlemek için SDS-PAGE kullanılmıştır.

Poliakrilamid jel elektroforezi, Laemmli (1970) tarafından geliştirilen yöntemle göre mini jel sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Yöntem heterojen tampon sistemi temeline göre çalışmaktadır. Ayırma kapasitesi oldukça iyi olan bu yöntemde, çalışılan proteinler yürütücü jelle girmeden önce düzenleyici jelle, elektroferez tamponu ve jel arasındaki pH ve iyonik şiddet aracılığıyla dengelenerek konsantre edilmektedirler. Yöntemde aşağıdaki çözeltiler hazırlanmış ve kullanılmıştır;

Akrilamid/bis : 30 g Akrilamid ve 0,8 g bis-N,N'-Metilenbisakrilamid distile suda çözülerek son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Ardından filtre edilip amber renkli şişede +4°C'de saklanmıştır.

Alt Tris : 18,2 g Tris hidroksiaminometan, 2 mL % 20 (w/v) SDS içeren distile suda çözülüp, pH'sı derişik HCl ile 8,8'e ayarlanmıştır, ardından distile su ile total hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Kullanım süresince 4°C'de saklanmıştır.

Üst Tris : 6,06 g Tris, 2 mL % 20'lik (w/v) SDS içeren distile suda çözülmüştür, pH'sı derişik HCl ile 6,8'e ayarlanıp, total hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Kullanım süresince 4°C'de saklanmıştır.

Amonyum persülfat : 100 mg/mL'lik sulu çözeltisi taze hazırlanmıştır.

Reservuar tamponu : 7,58 g Tris, 36 g Glisin ve 2,5 g SDS 250 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

3.2.5.1. Polimerizasyon prosesi

Poliakrilamid jeller akrilamid monomerlerinin bir çapraz bağlayıcı ajan ile kopolimerizasyonu sonucu oluşur. Poliakrilamid jeller için en çok kullanılan çapraz bağlayıcı ajan da N,N'-metilenbisakrilamid(Bis)'dir. Akrilamid polimerizasyonu serbest radikal katalize bir örnektir. Reaksiyon, amonyum persülfat ve N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED) ile başlatılır. TEMED, persülfat iyonunun dekompozisyonunu katalizleyerek serbest bir radikal oluşumunu sağlar. Aktif monomer, aktiflenmemiş monomer ile reaksiyon verir ve polimer zincirin uzaması başlar. Uzayan polimer zincir çapraz bağlı metilen bisakrilamid ile birlikte yapılır. Oksijen, serbest radikalleri uzaklaştırdığından ve polimerizasyonu engellediğinden tüm jel çözeltileri kullanılmadan önce vakumlanmalı ve oksijen uzaklaştırılmalıdır.

Kaliteli bir SDS-PAGE için; oldukça yüksek saflıktaki reaktifler, doğru başlangıç konsantrasyonları (yürütücü jel için % 0,04 ve düzenleyici jel için % 0,1), sıcaklık (polimerizasyon için genellikle 23°C), çözeltilerin gazsızlaştırılması

(oksijen polimerizasyonunun inhibitörüdür) ve jel oluşturma tamponlarının pH'ı faktörlerine dikkat etmek gerekmektedir.

T. reesei selülozuna ait SDS-PAGE için, % 15' lik akrilamid monomeri kullanılmıştır. Polimerizasyon protokolü (iki jel için) aşağıda verilmiştir:

- Çözelti 1, 2 ve 3 karıştırılarak oda sıcaklığına getirilir.
- 5 dakikalık gazsızlaştırma işlemi ardından çözelti 4 ve 5 sırasıyla eklenerek yavaşça karıştırılır.
- Yürütücü jel dökülür, gece boyunca ya da 3 saat bekletilir. Ardından düzenleyici jel dökülerek 1–1,5 saat bekletilir.

3.2.5.2. Örneklerin hazırlanıp ve elektroforeze uygulanması

Örnek tamponunun (3,55 mL distile su, 1,25 mL UT, 2,5 mL gliserol, 2 mL % 10 SDS, 0,2 mL % 0,5, w/v, bromfenol mavisini) 950 µL' sine 50 µL β-merkaptotenol eklenmiştir. Örnekler 95°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra jel kuyucuklarına 20 µL'si uygulanmıştır.

Anot ve katot rezervuarlarındaki Tris/glisin/SDS tamponu ile elektroforez yürütülmüştür. Proteinlerin elektroforezinde düzenleyici jelde 80 volt ve yürütücü jelde 100 volt güç uygulanmıştır. Bromfenol mavisinin oluşturduğu bant jelle ulaşmadan 0,5 cm önce elektroforez işlemine son verilmiştir.

3.2.5.3. Protein bantlarının boyanması

Jellerin boyanmasında Coomassie-Brillant Blue G-250 boyası kullanılmıştır. Bu boyama metodunun esası boyanın asidik pH'da proteinlere bağlanmasıdır. Jeller, Coomassie Blue çözeltisi (% 50 metanol (v/v); % 10 asetik asit (v/v) ve % 0,05 Coomassie Brilliant Blue G-250(w/v)) ile 1 saat boyunca yavaşça çalkalanmıştır. Jelde oluşan mavi renk % 40 metanol (v/v) ve % 10 asetik asitten (v/v) oluşan çözelti ile gece boyu yıkanmıştır.

3.2.6. Selüla z ın Tutuklama Metodu ile İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon prosedüründe, %80 (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi yapılan selüla z enzimi kullanılırken TPP ile deriştirilen orta fazdan elde edilen selüla z optimizasyonlar tamamlanınca TPP ile deriştirilmeyen selüla z la kıyas için kullanılmıştır. Öncelikle 0,5 mg protein içeren, toplam hacmi 1 mL olan selüla z preparatı, 50 mM pH 4,5 Na-Asetat tamponunda hazırlanmıştır. Üzerine 1 mL %2 (w/v) aljinat çözeltisi eklenmiştir. Karışım iyice vortekslenmiştir. Ardından bir şırıngaya doldurulan enzim-aljinat karışımı, düz uçlu iğne vasıtasıyla, %1 (w/v) asetik asit içerisinde hazırlanıp süzgeç kağıdından süzülerek %0,5 (w/v) kitosan içeren, 50 mL 0,15 M CaCl_2 çözeltisine yavaş yavaş damlatılmıştır. İşlem bir buz banyosu içerisinde gerçekleştirilip, damlatma bitince beherin ağzı hemen parafin yardımıyla kapatılmıştır. 3 saat buzda immobilizasyon işlemi daimi karıştırma eşliğinde gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon süresi sona erince, bir Nuçe erleni ve bir filtreli Nuçe hunisi yardımı ile su trompu sistemi kullanılarak Ca-aljinat mikroküreler, 100 mL 50 mM, pH 4,5 Na-Asetat tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra mikroküreler 15 mL %0,5 (v/v) glutaraldehit (GA) ile 2 saat boyunca, oda sıcaklığında sürekli karıştırılarak muamele edilmiştir. Süre sonunda yine aynı süzme-yıkama düzeneği kullanılarak 100 mL 50 mM, Na-Asetat tamponu ile mikroküreler yıkanmıştır. GA ile muamale işlemi tamamlanınca mikroküreler sayılmış, adedi kaydedilmiş ve aktivitesi tayin edilmiştir.

3.2.6.1. Aljinat konsantrasyonu optimizasyonu

Aljinat konsantrasyonu optimizasyonunda, genel prosedür uygulanmış olup sadece sistemde kullanılan aljinat konsantrasyonu değiştirilmiştir. Sistemde enzim; 0,5 mg başlangıç proteini ile, %0,5 (w/v) kitosan içeren 0,15 M CaCl_2 çözeltisi içerisinde damlatılarak, 3 saat immobilize edilip, %0,5 (v/v) GA ile 2 saat çapraz bağlanmıştır. Sisteme eklenen enzim-aljinat karışımı oluşturulurken, %1, %2, %3 ve %4 (w/v) aljinat çözeltileri kullanılarak immobilizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon sonrasında, hazırlanan mikrokürelerin sayısı belirlenmiş ve aktivitesi tayin edilmiştir.

3.2.6.2. Kalsiyum klorür (CaCl₂) konsantrasyonu optimizasyonu

CaCl₂ konsantrasyonu optimizasyonunda, yine genel prosedür uygulanmış olup sadece sistemde kullanılan CaCl₂ konsantrasyonu değiştirilmiştir. Sistemde enzim; 0,5 mg başlangıç proteini ile %2 (w/v) aljinat çözeltisi karıştırılarak, %0,5 (w/v) kitosan varlığındaki farklı konsantrasyonlardaki CaCl₂ çözeltilerine damlatılıp, 3 saat immobilize edilip, %0,5 (v/v) GA ile 2 saat çapraz bağlanmıştır. Bu denemede 0,10 M; 0,15 M ve 0,20 M CaCl₂ çözeltileri kullanılarak immobilizasyonlar gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon sonrasında, hazırlanan mikrokürelerin sayısı belirlenmiş ve aktivitesi tayin edilmiştir.

3.2.6.3. Kitosan konsantrasyonu optimizasyonu

Kitosan konsantrasyonu optimizasyonunda, yine genel prosedür uygulanmış olup sadece sistemde kullanılan kitosan konsantrasyonu değiştirilmiştir. Sistemde enzim; 0,5 mg başlangıç proteini ile %2 (w/v) aljinat çözeltisi karıştırılarak, farklı konsantrasyonlarda kitosan içeren 0,15 M CaCl₂ çözeltilerine damlatılıp, 3 saat immobilize edilip, %0,5 (v/v) GA ile 2 saat çapraz bağlanmıştır. Bu denemede %0,25, %0,50 ve %0,75 (w/v) kitosan içeren CaCl₂ çözeltileri kullanılarak immobilizasyonlar gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon sonrasında, hazırlanan mikrokürelerin sayısı belirlenmiş ve aktivitesi tayin edilmiştir.

3.2.6.4. İmmobilizasyon süresi optimizasyonu

İmmobilizasyon süresi optimizasyonunda, yine genel prosedür uygulanmış olup sadece enzimin immobilizasyon süresi değiştirilmiştir. Sistemde enzim; 0,5 mg başlangıç proteini ile %2 (w/v) aljinat çözeltisi karıştırılarak, %0,5 (w/v) kitosan içeren 0,15 M CaCl₂ çözeltisine damlatılıp, farklı sürelerde immobilize edilip, %0,5 (v/v) GA ile 2 saat çapraz bağlanmıştır. Bu denemede 3, 6 ve 15 saatte immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon sonrasında, hazırlanan mikrokürelerin sayısı belirlenmiş ve aktivitesi tayin edilmiştir.

3.2.6.5. Çapraz bağlayıcı (Glutaraldehit, GA) konsantrasyonu optimizasyonu

Glutaraldehit (GA) konsantrasyonu optimizasyonunda, yine genel prosedür uygulanmış olup sadece sistemde kullanılan GA konsantrasyonu değiştirilmiştir. Sistemde enzim; 0,5 mg başlangıç proteini ile %2 (w/v) aljinat çözeltisi karıştırılarak, %0,5 (w/v) kitosan içeren 0,15 M CaCl₂ çözeltisine damlatılıp, 3 saat immobilize edilip, farklı konsantrasyonlardaki GA ile 2 saat çapraz bağlanmıştır. Bu denemede %0,5; %1,0; %2,0; %3,0; %4,0 ve %5,0 (v/v) GA çözeltileri ile çapraz bağlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon sonrasında, hazırlanan mikrokürelerin sayısı belirlenmiş ve aktivitesi tayin edilmiştir.

3.2.6.6. Çapraz bağlanma süresinin optimizasyonu

Çapraz bağlanma süresinin optimizasyonunda, yine genel prosedür uygulanmış olup sadece immobilizasyon sisteminde Ca-Aljinat mikrokürelerin çapraz bağlanma süresi değiştirilmiştir. Sistemde enzim; 0,5 mg başlangıç proteini ile %2 (w/v) aljinat çözeltisi karıştırılarak, %0,5 (w/v) kitosan içeren 0,15 M CaCl₂ çözeltisine damlatılıp, 3 saat immobilize edilip, %2,0 (v/v) GA ile farklı sürelerde çapraz bağlanarak immobilize edilmiştir. Bu denemede 15, 30, 60, 120 ve 180 dk'lık çapraz bağlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon sonrasında, hazırlanan mikrokürelerin sayısı belirlenmiş ve aktivitesi tayin edilmiştir.

3.2.6.7. Protein miktarı optimizasyonu

Protein miktarı optimizasyonunda, yine genel prosedür uygulanmış olup sadece sisteme başlangıçta eklenen protein miktarı değiştirilmiştir. Sistemde enzim; farklı miktarlarda başlangıç proteinleri ile %2 (w/v) aljinat çözeltisi karıştırılarak, %0,5 (w/v) kitosan içeren 0,15 M CaCl₂ çözeltisine damlatılıp, 3 saat immobilize edilip, %2,0 (v/v) GA ile 2 saat çapraz bağlanmıştır. Bu deneme, 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 ve 1,50 mg başlangıç enzimi kullanılarak kurulan farklı

sistemler ile gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon sonrasında, hazırlanan mikrokürelerin sayısı belirlenmiş ve aktivitesi tayin edilmiştir.

3.2.6.8. Tekrarlanabilirlik denemesi

Tekrarlanabilirlik denemesinde, optimum koşulları belirlenmiş olan enzim immobilizasyonu prosedürü, 4 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Sistemde enzim; 0,5 mg başlangıç proteini ile %2 (w/v) aljinat çözeltisi karıştırılarak, %0,5 (w/v) kitosan içeren 0,15 M CaCl_2 çözeltisine damlatılıp, 3 saat immobilize edilip, %2,0 (v/v) GA ile 2 saat çapraz bağlanarak immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon sonrasında, hazırlanan mikrokürelerin sayısı belirlenmiş ve aktivitesi tayin edilmiştir.

Tüm optimizasyonlarda, aktivite ve protein tayinleri üçlü setler kurularak gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. İmmobilize ve Serbest Selülozların Karakterizasyonu

3.2.7.1. Optimum sıcaklık

İmmobilize ve serbest formdaki selülozlar için optimum çalışma sıcaklığı belirlenmesi denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu karakterizasyon çalışmasında yine DNS ile aktivite tayini yapılmıştır. Denemede hem serbest hem de immobilize enzimler, substratları ortama ilave edildikten sonra farklı sıcaklıklardaki su banyolarında 5 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra DNS eklenerek 10 dk kaynar su banyosunda bekletilip, normal prosedüre göre aktiviteleri okunmuştur. Optimum sıcaklık denemesinde enzimler; 40, 50, 60, 65, 70, 80 ve 90 °C'lik su banyolarında inkübe edilmiştir.

3.2.7.2. Optimum pH

İmmobilize ve serbest formdaki selülozlar için optimum çalışma pH'ı belirlenmesi denemeleri gerçekleştirilmiştir. Denemede serbest enzimler, ilgili pH'daki tamponda seyreltilip kullanılırken, immobilize enzimlere ilgili pH'daki

tamponlardan 0,25 mL eklenerek reaksiyon düzeneği kurulmuştur. Enzimler substrat ortama ilave edildikten sonra 50 °C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra DNS eklenerek 10 dk kaynar su banyosunda bekletilip, normal prosedüre göre aktiviteleri okunmuştur. Optimum pH denemesinde, pH'ı 2,5; 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 ve 6,5 olan tamponlar kullanılmıştır. pH 2,5 ve pH 3,0 için glisin-HCl tamponu, pH 4,0 ile pH 5,5 arasındaki denemelerde Na-Asetat tamponu ve pH 6,0 ile pH 6,5'da gerçekleştirilen denemelerde ise Na-Fosfat tamponu kullanılmıştır.

3.2.7.3. pH kararlılığı

İmmobilize ve serbest formdaki selülozlar için pH kararlılığı denemeleri gerçekleştirilmiştir. Denemede serbest enzimler, ilgili pH'daki tamponda seyreltilip kullanılırken (0,25 mL), immobilize enzimlere ilgili pH'daki tamponlardan 0,25 mL eklenmiştir. Ardından, serbest ve immobilize enzimlere ait bu deney düzenekleri 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ön inkübasyon süresi tamamlanınca enzimlere substrat ilave edildikten sonra 50 °C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Sonra da DNS eklenerek 10 dk kaynar su banyosunda bekletilip, normal prosedüre göre aktiviteleri okunmuştur. pH kararlılığı denemesinde; pH'ı 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 olan 50 mM Na-Asetat tamponu kullanılmıştır.

3.2.7.4. Termal kararlılık

İmmobilize ve serbest formdaki selülozlar için termal kararlılık denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu denemede serbest ve immobilize enzimler, farklı sıcaklıklardaki su banyolarında 30 dk ön inkübe edilmiştir. Ardından enzimlere substrat ilave edildikten sonra 50 °C'de 5 dk inkübe edilmişlerdir. Sonra da DNS eklenerek 10 dk kaynar su banyosunda bekletilip, normal prosedüre göre aktiviteleri okunmuştur. Termal kararlılık denemesinde enzimler; 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C'de ön inkübasyona uğratılmıştır.

3.2.7.5. Zamana bağlı termal kararlılık

İmmobilize ve serbest formdaki selülozlar için zamana bağlı termal kararlılık denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu denemede serbest ve immobilize

enzimler, 37 °C'deki su banyosunda farklı sürelerde inkübe edilmiştir. Ardından enzimlere substratları ilave edildikten sonra 50 °C'de 5 dk inkübe edilmişlerdir. Sonra da DNS eklenerek 10 dk kaynar su banyosunda bekletilip, normal prosedüre göre aktiviteleri okunmuştur. Zamana bağlı termal kararlılık denemesinde enzimler; 20, 30, 60, 120 ve 180 dk süreler ile 37 °C'de ön inkübasyona uğratılmıştır.

3.2.8. Tuz Çöktürmesi ile Deriştirilmiş ve TPP ile Kısmi Saflaştırılmış Selülaazlarla Hazırlanan İmmobilize Enzimlerin Salınım Özellikleri

%80 (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi yapılan selülaazın optimum immobilizasyon koşulları yukarıda açıklanan yöntemlerle belirlenmiştir. TPP'nin immobilizasyon verimine etkisinin anlaşılması adına, TPP sistemi ile saflaştırılan selülaaz (orta faz) enzimi de bu optimum koşullar altında immobilize edilmiştir. Sistemde enzim; 0,5 mg başlangıç proteini ile %2 (w/v) aljinat çözeltisi karıştırılarak, %0,5 (w/v) kitosan içeren 0,15 M CaCl₂ çözeltisine damlatılıp, 3 saat immobilize edilip, %2,0 (v/v) GA ile 2 saat çapraz bağlanarak immobilize edilmiştir. İleriki denemelerde her iki immobilize enzim de kullanılacağından ötürü, yeni hazırlanan bu immobilize enzime TPP-immobilize selülaaz, optimizasyonlarda kullanılan ve %80 amonyum sülfat çöktürmesi yapılan selülaaza ise AS-immobilize selülaaz denilmiştir.

3.2.8.1. AS-İmmobilize selülaaz ile TPP-İmmobilize selülaazın pH'ya bağlı salınım özellikleri

AS-immobilize enzim ve TPP-immobilize enzim mikrokürelerin pH'ya bağlı salınım ve çalışma potansiyelleri belirlenmiştir. Denemede iki enzim grubunun da 37 °C'de 30 dk farklı tamponlarda ön inkübe edildiği koşulda; ortama saldıgı ve o pH ortamından dışarı alındığında ne kadar aktivite gösterdiğine dair sonuçlar belirlenmiştir. Çalışmada pH; 1,0; 1,2; 1,5; 2,0; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 ve 6,0'daki tamponlar ile denemeler gerçekleştirilmiş olup; pH 1,0 ve pH 2,0 arasındaki denemelerde HCl-NaOH tamponu, pH 3,0 ve pH 3,5'daki denemelerde glisin-HCl tamponu, pH 4,0 ile pH 5,5 arasındaki

denemelerde Na-Asetat tamponu ve son olarak pH 6,0'daki denemede ise Na-Fosfat tamponu kullanılmıştır.

3.2.8.2. Tekrar kullanılabilirlik

AS-immobilize ve TPP-immobilize mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliklerinin belirlendiği bu çalışmada, her iki immobilize enzim grubunun normal koşullar altında aktiviteleri okunmuştur. Daha sonra reaksiyon ortamından geri alınan enzimler 50 mM, pH 4,5 Na-Asetat tamponu ile yıkanmıştır. Ardından yıkanmış ve bir kez aktiviteleri ölçülmüş enzimlere yeniden taze substrat eklenerek aktiviteleri normal prosedüre göre okunmuştur. Bu işlem bir kez daha aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. Her iki immobilize enzim ard arda 3'er kez başarı ile kullanılabilmiş ve aktivitelerini yüksek oranda koruyarak çalışmışlardır. Ancak üçüncü denemenin ardından tüm boncukların fiziksel stabilitesi kaybolup, erimeye başlamaları sebebiyle dördüncü kez kullanım söz konusu olamamıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Selülazın Tuz (AS) Çöktürmesi Metoduyla Kısmi Deriştirilmesi

Trichoderma reesei kaynaklı selülazın, deriştirilmesi ve saflığının artırılması amacı ile gerçekleştirilen %80 (w/v) amonyum sülfat çöktürmesine ait sonuçlar Çizelge 4.1’de, tuz çöktürmesi sonrası gerçekleştirilen diyaliz işleminin fotoğrafı ise Şekil 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 %80 (w/v) Amonyum sülfat çöktürmesinin ham ekstrakta etkisi.

	Total Aktivite (U)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Aktivite Verimi (%)	Protein Verimi (%)	Saflaştırma Katı (fold)
BAŞLANGIÇ* SELÜLAZ	3380	73	46	100	100	1
%80 (w/v) AS ÇÖKTÜRMESİ	1492	63	24	44	86	0,5

*Selülaz: 500 mg / 25 mL



Şekil 4.1 Amonyum sülfat (AS) çöktürmesi sonrası pelletin diyalizi.

İlk olarak *Trichoderma reesei* kaynaklı ticari selülaz enzimi %80 (w/v) oranında amonyum sülfat kullanılarak deriştirilmiştir. Bu işlem ve devamında gerçekleştirilen diyaliz prosedürü ile hem ticari enzimin içerisinde bulunması olası

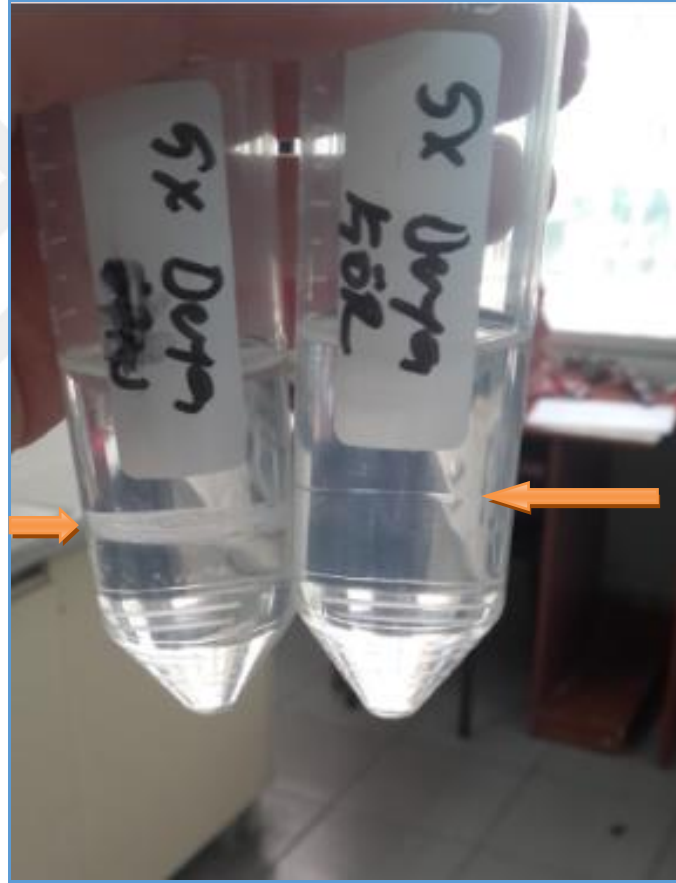
koruyucuları uzaklaştırmak hem de TPP ve immobilizasyon işlemlerinde kullanmak üzere daha derişik bir protein çözeltisi elde etmek hedeflenmiştir. 20 mg/mL başlangıç konsantrasyonu ile hazırlanan selülaaz preparatı, başlangıçta toplamda 3380 U aktiviteye sahip ve 73 mg protein içermektedir. %80 (w/v) AS çöktürmesi sonrası toplamda 1492 U aktivite ve 63 mg protein miktarı ile 24 (U/mg) spesifik aktivite ile selülaaz enzimi deriştirilebilmiştir. %44 verimle aktivite korunmuş ve %86 verimle de protein çöktürmesi gerçekleştirilmiştir. Burada gözlenen ciddi orandaki aktivite düşüşü, enzim koruyucularının ve ortamda bulunması olası ekstraselüler renk bileşenlerinin (ki toz formdaki enzim kısmi sarı idi) DNS metoduna girişim yapmış olabilmesi ihtimaline dayandırılarak açıklanabilmektedir.

Literatür incelendiğinde, selülaaz enziminin farklı çalışma grupları tarafından da amonyum sülfat çöktürmesi metoduyla saflaştırıldığı çalışmalara ulaşılabilir. Megha ve arkadaşları (2015), kendi hazırladıkları besiyerinde ürettikleri *Aspergillus terreus*'dan izole ettikleri intraselüler selülaaz enzimini, amonyum sülfat kullanarak saflaştırmışlardır. Ham selülaaz preparatına, %0-100 arası oranlarda tuz çöktürmesi uygulamışlar ve selülaaz enzimini 12,69 (U/μg) spesifik aktivite, 76,9 (μg/ml) protein miktarı ve 976,4 (ml indirgen şeker/1saat) aktivite ile %60-80 (w/v) amonyum sülfat doygunluğunda maksimum oranda çöktürebilmişlerdir. Milala ve arkadaşları (2014), darı sapının kullanıldığı besiyerinde ürettikleri *Rhizopus stolonifer* türünden ekstraselüler selülaaz izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, etkin saflaştırma için kaba ekstrakta %20-90 (w/v) oranında amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirmişlerdir. Denemenin neticesinde selülaaz enzimini, %74,2 aktivite verimi ve 1,46 saflaştırma katı ile %80 (w/v) amonyum sülfat doygunluğunda başarı ile deriştirmişlerdir. Bakare ve arkadaşları (2005), %0,2'lik (w/v) CMC ortamında büyüttükleri *Pseudomonas fluorescens*'e ait ekstraselüler selülaaz enzimini, amonyum sülfat çöktürmesi metoduyla saflaştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada %90 (w/v) doygunlukta amonyum sülfat kullanmışlardır. Çalışma sonucunda, *P. fluorescens* selülaazı %64 aktivite verimi ve 5.69 saflaştırma katı ile başarı ile saflaştırılmıştır. Yapılan bu çalışmalar ile bize ait bu tez kapsamında gerçekleştirilen amonyum sülfat çöktürmesi adımı karşılaştırıldığında, hem ekstraselüler hem de intraselüler selülaazlar için %80-90 (w/v) amonyum sülfat

doymunluklarının ideal aralıklar olduğu gör÷lmektedir. Buradan yola çıkarak, bu tez çalışmasında, sel÷laz için tuz çöktürmesi adımın ideal aralıkta gerçekleştirilmiş olduğu söylenebilmektedir.

4.2. Sel÷lazaın TPP Metodu ile Kısmi Saflaştırılması

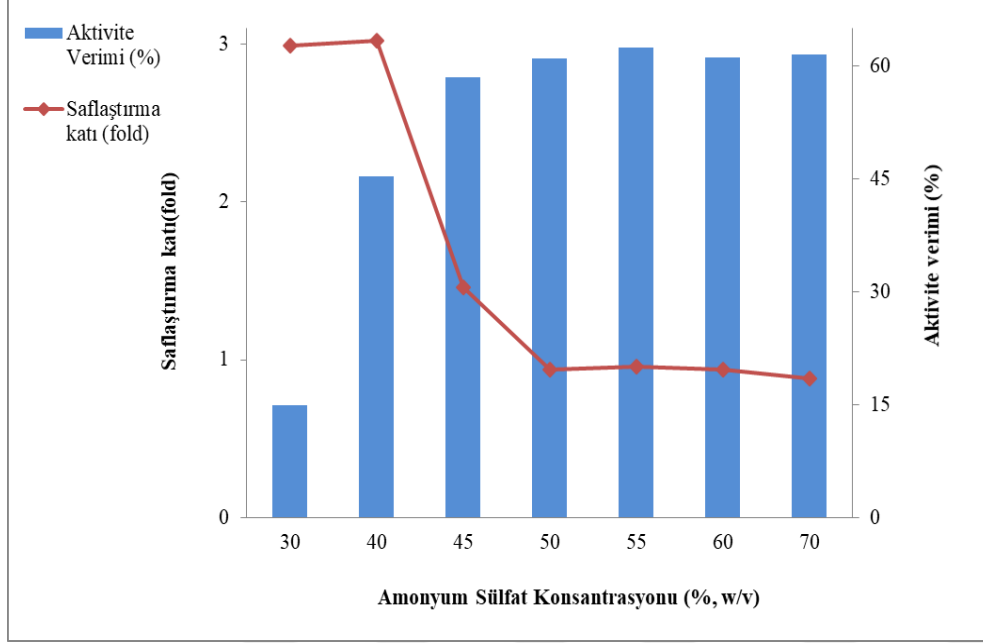
Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası elde edilen sel÷laz enzimi, TPP metodu ile deriştirilmiştir. TPP sistemlerinde temelde oluşan üç faz Şekil 4.2’de verilmiştir. Şekilde sol tüp örneğe ait ve sel÷lazı içeren orta faza sahipken, sağ tüp köre aittir.



Şekil 4.2 Üçlü-faz ayırma (TPP) sistemi (sol: sel÷laz TPP orta fazı, sağ: kör).

4.2.1. Amonyum Sülfat (AS) Konsantrasyonu Optimizasyonu

Farklı konsantrasyonlardaki amonyum sülfat ile kurulan TPP sistemlerinin orta fazlarına ait sonuçlar Şekil 4.3'te verilmiştir.

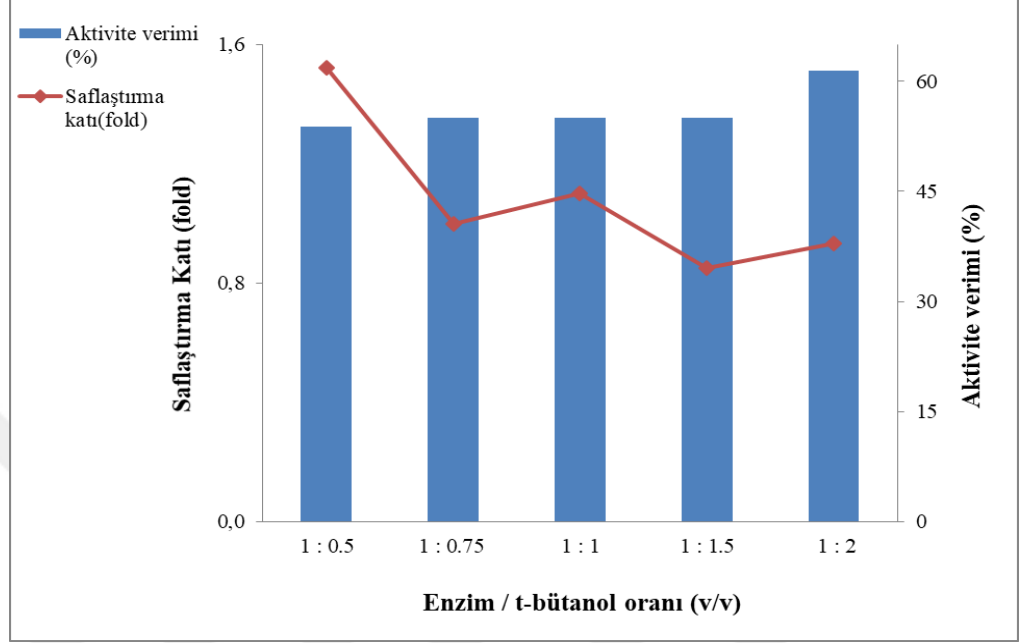


Şekil 4.3 Amonyum sülfat (AS) konsantrasyonunun selülaz enziminin saflaştırılmasına etkisi.

Gerçekleştirilen deneme neticesinde, selülaz enzimi %61 aktivite verimi ve 0,94 saflaştırma katı ile %50 (w/v) amonyum sülfatla hazırlanan sistemde başarı ile saflaştırılmıştır. Sonraki tüm denemelerde %50 (w/v) amonyum sülfat ile çalışılmıştır.

4.2.2. Enzim: T-Bütanol (v/v) Oranı Optimizasyonu

Farklı enzim: *tert*-bütanol oranları ile kurulan TPP sistemlerinin orta fazlarına ait sonuçlar Şekil 4.4'te verilmiştir.

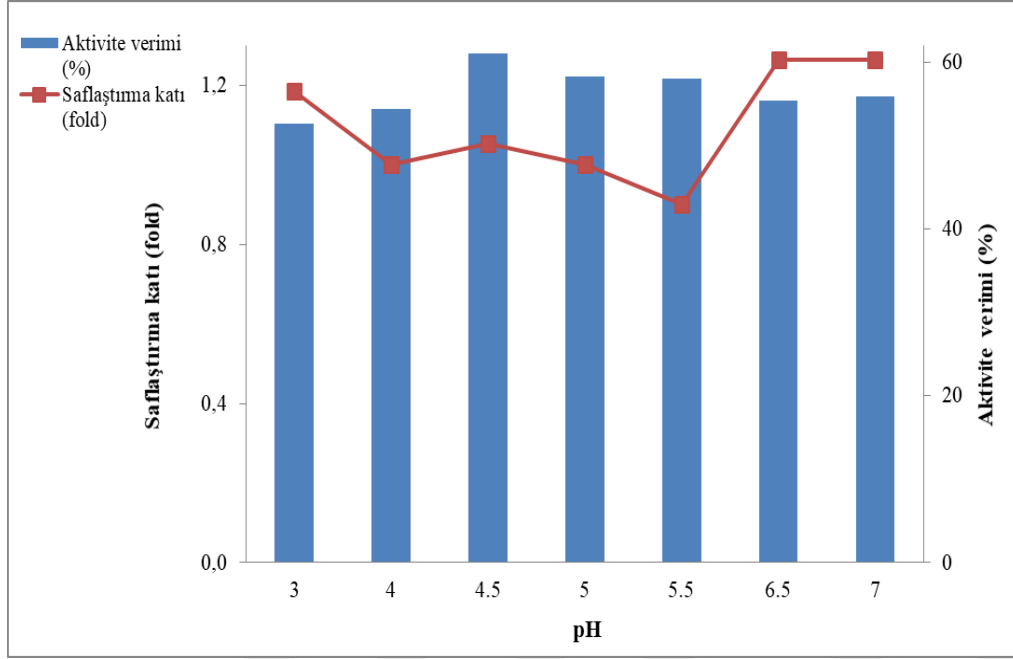


Şekil 4.4 Enzim: t-bütanol oranının selüloz enziminin saflaştırılmasına etkisi.

Gerçekleştirilen deneme neticesinde, selüloz enzimi %55 aktivite verimi ve 1,10 saflaştırma katı ile 1:1 enzim: *tert*-bütanol (v/v) oranı ile hazırlanan sistemde başarı ile saflaştırılmıştır. Sonraki tüm denemelerde 1:1 enzim: *tert*-bütanol (v/v) oranı ile çalışılmıştır.

4.2.3. Sistem pH'ı Optimizasyonu

Farklı pH'larda kurulan TPP sistemlerinin orta fazlarına ait sonuçlar Şekil 4.5'te verilmiştir.

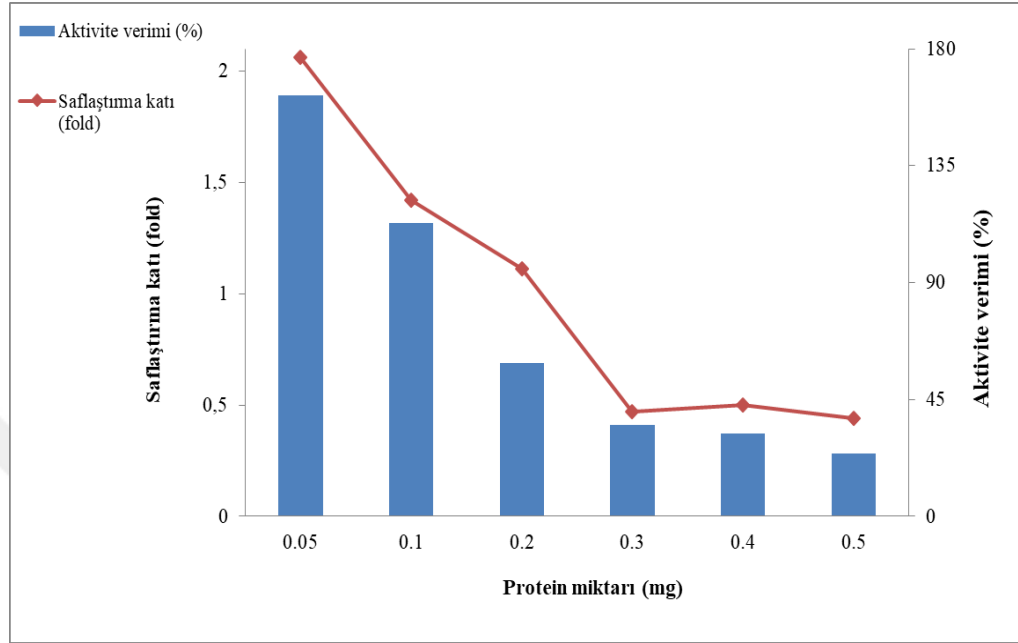


Şekil 4.5 TPP ortam pH'ının selüloz enziminin saflaştırılmasına etkisi.

Gerçekleştirilen deneme neticesinde, selüloz enzimi %61 aktivite verimi ve 1,05 saflaştırma katı ile (kendi pH'ı olan) pH 4,5'da hazırlanan sistemde başarı ile saflaştırılmıştır. Sonraki tüm denemeler pH 4,5'da gerçekleştirilmiştir.

4.2.4. Protein Miktarı Optimizasyonu

Farklı protein konsantrasyonları ile gerçekleştirilen TPP sistemlerinin orta fazlarına ait sonuç Şekil 4.6’da verilmiştir.

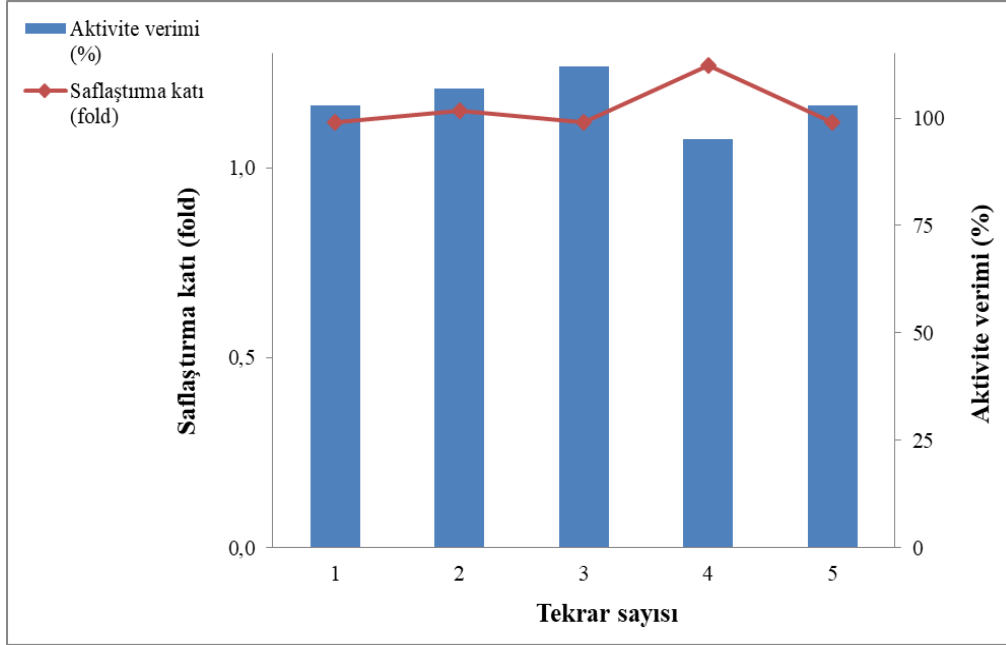


Şekil 4.6 TPP başlangıç protein miktarının, selüloz enziminin saflaştırılmasına etkisi.

Gerçekleştirilen deneme neticesinde, selüloz enzimi %113 aktivite verimi ve 1,42 saflaştırma katı ile 0,1 mg enzim (protein miktarı) ile hazırlanan sistemde başarı ile saflaştırılmıştır.

4.2.5. Tekrarlanabilirlik Denemesi

Elde edilen optimum koşullarda ve 5'li tekrar şeklinde kurulan TPP sistemlerinin orta fazlarına ait sonuçlar Şekil 4.7'de verilmiştir.

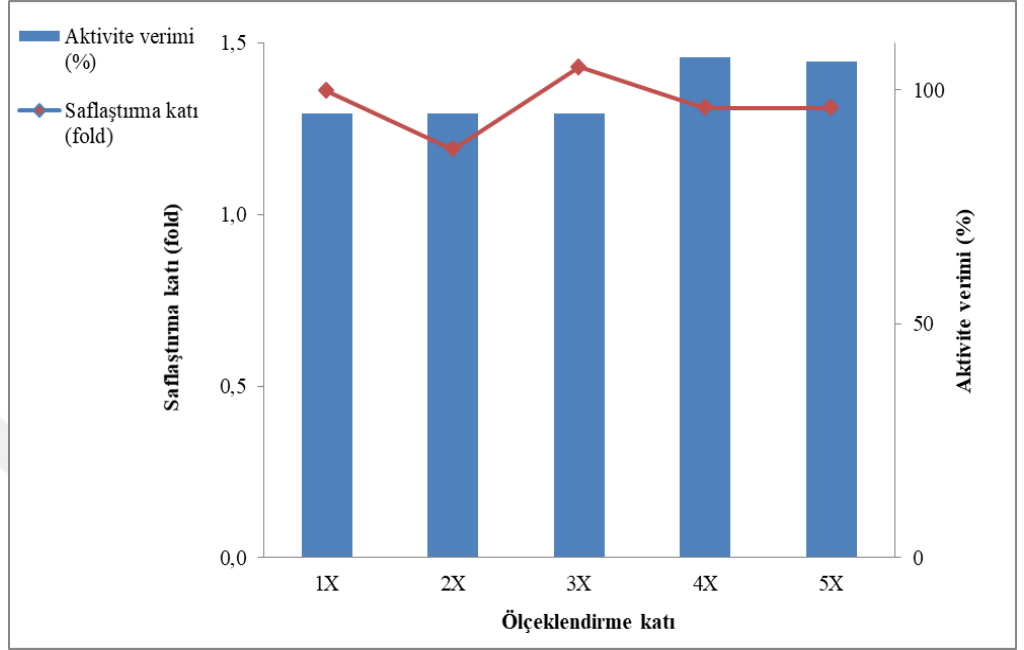


Şekil 4.7 TPP sisteminin tekrarlanabilirliği.

Gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik denemesinde sonuçlar birbirine paralel çıkmış olup, selüloz enzimi maksimum %112 aktivite verimi ile saflaştırılmıştır.

4.2.6. Ölçek Büyütme Denemesi

Belirlenen optimum koşulların kullanıldığı ölçek büyütme denemesine ilişkin sonuçlar Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.8 TPP’de ölçek büyütme.

Gerçekleştirilen ölçek büyütme denemesinde sonuçlar birbirine paralel çıkmış olup selülaz enziminin saflaştırılmasında, belirlenen optimum TPP koşullarının ölçek büyütmeye uygun olduğu belirlenmiştir.

4.2.7. TPP Optimum Sonuçları

Selülaaz enziminin saflaştırılmasına ait optimum koşullarda gerçekleştirilen TPP sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Selülaaz enziminin TPP ile saflaştırılmasına ait sonuçlar.

Adım	Toplam aktivite (U)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (U/mg)	Saflaştırma katı (fold)	Aktivite verimi (%)
Ham selülaaz (%80 w/v AS)	3,33	0,10	33	1	100
TPP orta faz	3,76	0,08	47	1,42	113
TPP alt faz	0,00	0,03	0	0	0

Bu tez çalışması kapsamında ikinci adım olarak, %80 (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirilmiş ve Na-Asetat tamponuna karşı diyalizlenmiş selülaaz enziminin, TPP metodu ile deriştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Amonyum sülfat tuzu, *tert*-bütanol ve enzimden oluşan sistemin; amonyum sülfat doygunluğu, enzim: t-bütanol oranı, sistem pH’ı ve sisteme yüklenen başlangıç protein miktarı parametreleri geniş aralıklarda çalışılarak, TPP sistemi optimize edilmiştir. Kurulan tüm sistemlerde *Trichoderma reesei* selülaazı orta fazda belirgin bir verim farkı ile saflaştırılmış ve deriştirilmiştir.

Yapılan TPP optimizasyonları sonucunda; selülaaz enzimi, %50 (w/v) amonyum sülfat doygunluğunda, 1:1 (v/v) enzim: t-bütanol oranı ile kendi pH’sında (pH 4,5) ve 0,1 mg başlangıç proteini ile kurulan sistemle saflaştırıldığında %113 aktivite verimi ve 1,42 saflaştırma katı ile maksimum

koşullarda başarı ile değiştirilmiştir. Bu saptanan optimum koşulların tekrarlanabilirliği, 5'li set halinde kurulan TPP düzenekleri ile ispat edilmiştir. Yapılan tekrar denemesinde eş koşullarda gerçekleştirilen TPP sistemlerinde sırası ile %103, %107, %112, %95 ve %103 aktivite verimleri elde edilmiş ve yine bu sistemlerde selülaz enzimi sırası ile 1,12; 1,15; 1,12; 1,27 ve 1,12 kat saflaştırılabilmektedir. Sistemin tekrarlanabilirliği ispatlandıktan sonra ölçek büyütme denemesi gerçekleştirilmiştir. Bu denemede ise optimize ettiğimiz TPP sisteminin, endüstriyel alanda kullanılabilirliğinin ölçülmesi hedeflenmiştir. Yapılan tüm optimizasyon denemelerinde standart olarak 2 mL enzim ile başlatılan düzenekler kurulmuştur. Ölçek büyütmede ise 1, 2, 3, 4 ve 5 kat büyütme çalışıldığından 2, 4, 6, 8 ve 10 mL'lik düzenekler kurulmuş ve sırası ile %95, %95, %95, %107 ve %106 aktivite verimi elde edilmiş ve selülaz enzimi yine sırası ile 1,36; 1,19; 1,43; 1,31 ve 1,31 kat saflaştırılmıştır.

Literatür incelendiğinde, TPP ile saflaştırılan pek çok enzim ve enzim grubunun olduğunu görebilmekteyiz. Bu kapsamda yapılan çalışmalara biraz değineceğiz. Duman ve Kaya (2013), kuru nohuttan izole ettikleri β -galaktozidaz enzimini, TPP sistemini kullanarak başarılı bir şekilde saflaştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada tuz olarak amonyum sülfat, alkol olarak ise *tert*-bütanol kullanmışlar ve sistemin değişken parametrelerini optimize etmişlerdir. Nohut β -galaktozidazı için tespit ettikleri optimum TPP koşulları; %60 (w/v) amonyum sülfat doygunluğu, 1:0,5 (v/v) enzim: t- bütanol oranı ve pH 6,8 olmuştur. Bu optimum koşullar altında, nohuttan β -galaktozidaz enzimini %133 aktivite verimi ve 10,1 saflaştırma katı ile başarılı bir şekilde saflaştırmışlardır. Yine Duman ve Kaya (2014), patates yumrularından invertaz saflaştırmak amacıyla bir TPP düzeneği oluşturmuşlardır. Buldukları optimum koşullar olan %25 (w/v) amonyum sülfat doygunluğunda ve 1:1 (v/v) enzim: t-bütanol oranı ile kurdukları sistemde invertaz enzimini, %156 aktivite verimi ve 12,8 saflaştırma katı ile başarıyla saflaştırmışlardır. Roy ve arkadaşları (2005), ticari Pectinex ultra SP-L enzimini kullanarak TPP metodu ile enzim saflaştırması denemesi gerçekleştirmişlerdir. İlk olarak üre ile denatüre ettikleri, pektinolitik enzimler ile hemiselülazlar ve selülazlardan oluşan karışıma ait enzimleri değiştirmişlerdir. Kurdukları TPP düzeneği ile hepsi *Aspergillus aculeatus* kaynaklı enzimlerden; selülaz enzimini %94 aktivite verimi ve 73 kat saflaştırma katı ile, sellobiaz

enzimini %98 aktivite verimi ve 65 kat saflaştırma katı ile, son olarak da β -galaktozidaz enzimini %90 aktivite verimi ve 101 kat saflaştırma katı ile başarılı bir şekilde saflaştırmışlardır. Özer ve arkadaşları (2010), taze domatesten invertaz enzimini izole etmek için TPP metodunu kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmada değişken parametreleri optimize ederek, domates invertazı için maksimum verimle saflaştırma koşullarını saptamışlardır. İvertaz enzimi, %50 (w/v) amonyum sülfat doygunluğunda, 1:1 (v/v) enzim: *tert*-bütanol oranı ile ve pH 4,5’da kurulan TPP sisteminde, %190 aktivite verimi ve 8,6 saflaştırma katı ile başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır.

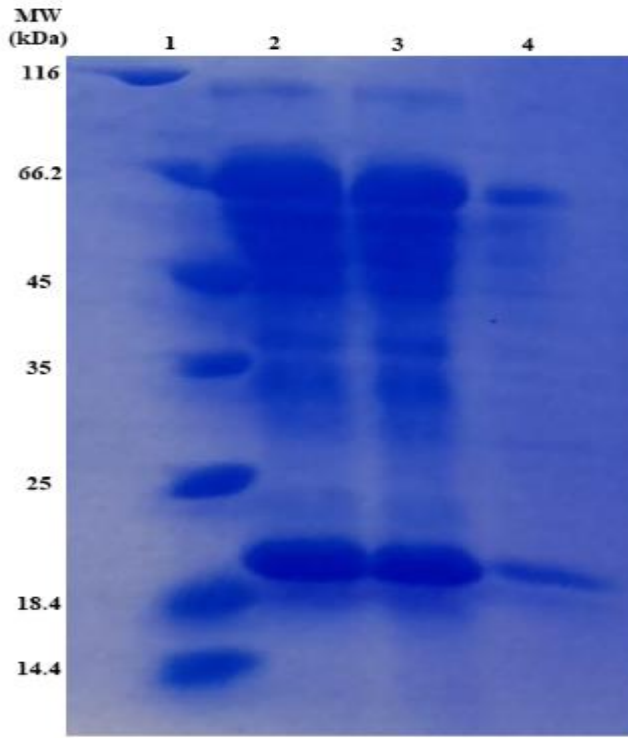
Shankar ve arkadaşları (2014), *Trichoderma sp.* kaynaklı selülaz enzimini TPP metodunu kullanarak ve sisteme ekstra olarak kitosan molekülü ekleyerek saflaştırmışlardır. Kurdukları TPP sisteminde selülaz enzimini, orta fazda ve kitosana bağlı vaziyette saflaştırmışlardır. Çalışma neticesinde *Trichoderma sp.* selülazı 1,369 saflaştırma katı ile başarı ile saflaştırılabilmektedir. Dobrev ve arkadaşları (2019), *Rhizopus arrhizus*’tan lipaz enzimini, amonyum sülfat ve *tert*-bütanol kullanarak kurdukları TPP sistemi ile başarılı bir şekilde saflaştırılabilmektedir. Yaptıkları çalışmada *R. arrhizus* lipazını, %30 (w/v) amonyum sülfat doygunluğunda, 1:0,5 (v/v) enzim: t-bütanol oranı ile pH 7,0’de kurulan sistemle (optimum koşullar) %71 aktivite verimi ve 19,1 saflaştırma katı ile orta fazda başarı ile saflaştırılabilmektedir. Ketnawa ve arkadaşları (2017) yaptıkları literatür taramasında TPP metodu ile deriştirilen bazı enzimler ve deriştirilme verimlerine ait veriler elde etmişlerdir. Bu çalışmalardan ilki portakal kabuğundan peroksidaz enziminin izolasyonudur. %50 (w/v) amonyum sülfat doygunluğunda, 1:1,5 (v/v) enzim: t-bütanol oranı ile pH 6,0’da gerçekleştirilen TPP denemesinde, peroksidaz enzimi %93,96 aktivite verimi ve 18,29 saflaştırma katı ile başarı ile saflaştırılmıştır. Yapılan başka bir çalışmada, %40 (w/v) amonyum sülfat doygunluğunda, 1:0,75 (v/v) enzim: t-bütanol oranı ile pH 7,0’de kurulan TPP sistemi ile incir ağacından fisin (proteaz sınıfı enzim) enzimi %167 aktivite verimi ve 6,04 saflaştırma katı ile başarıyla saflaştırılmıştır. Bu kapsamda yapılan bir başka çalışmada, dev yayın balığının iç organlarından alkalın proteazların izolasyonunda ve saflaştırılmasında TPP metodu kullanılmıştır. Alkalın proteazlar, %50 (w/v) sodyum sitrat doygunluğunda, 1:0,5 (v/v) enzim: t-bütanol oranı ile pH 8,0’de kurulan sistem ile %220 aktivite verimi ve 5,04 saflaştırma

katı ile başarıyla saflaştırılmıştır. İlgili literatürde belirtilen bir başka çalışmada ise pasifik beyaz karidesinin hepatopankreasından (bir sindirim bezi) proteaz saflaştırılmasında TPP metodu kullanılmıştır. %30 (w/v) amonyum sülfat doygunluğunda, 1:1 (v/v) enzim: t-bütanol oranı ile kurulan sistemde proteaz enzimi, %76 aktivite verimi ve 2,6 saflaştırma katı ile başarıyla saflaştırılabilmektedir.

Balakrishnan ve arkadaşları (2013), ksilanaz enzimini *Trichoderma sp.*'den TPP metodu ile saflaştırmışlardır. %50 (w/v) amonyum sülfat doygunluğu ve 0,5:1,0 (v/v) enzim: t-bütanol oranı ile kurdukları sistem ile ksilanaz enzimini %56,58 aktivite verimi ve 7,13 saflaştırma katı ile tek adımda başarı ile saflaştırmışlardır. Chew ve arkadaşları (2018), yaptıkları literatür araştırmasında, TPP sistemlerinin kullanıldığı pek çok enzim saflaştırma çalışmasının sonuçlarından bahsetmiştir. Burada ise bu çalışmalardan, en yüksek verimle saflaştırılan birkaç örnekten bahsedilecektir. İlk örnek olarak TPP metodu ile pepino meyvesinden (*Solanum muricatum*) %50 (w/v) amonyum sülfat doygunluğunda, 1:1,5 (v/v) enzim: t-bütanol oranı ile ve pH 5,25'de kurulan sistemle %127 aktivite verimi ile alfa-galaktozidazın saflaştırılmasından bahsedebiliriz. Farklı bir çalışmada, çekirdekli fasulye diye adlandırılan *Abrus precatorius* meyvesinden, %49,5 (w/v) amonyum sülfat doygunluğunda, 1:1,15 (v/v) enzim: t-bütanol oranı ile ve pH 5,2'de kurulan TPP sistemi ile amilaz enzimi %156,2 aktivite verimi ile başarı ile saflaştırılabilmektedir. Bir başka çalışmada ise asparaginaz enzimi, *Capsicum annuum L.* (bir çeşit biber)'den %50 (w/v) amonyum sülfat doygunluğunda, 1:0,75 (v/v) enzim: t-bütanol oranı ile ve pH 8,5'da kurulan TPP sisteminde %567,4 aktivite verimi ile oldukça başarılı bir sonuçla saflaştırılabilmektedir.

4.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ve Moleküler Kütle Tayini

SDS-PAGE metodu ile gerçekleştirilen mini jel-elektroforez sistemine ilişkin jel görüntüsü ve kullanılan marker'a ait veriler Şekil 4.9'da verilmiştir.

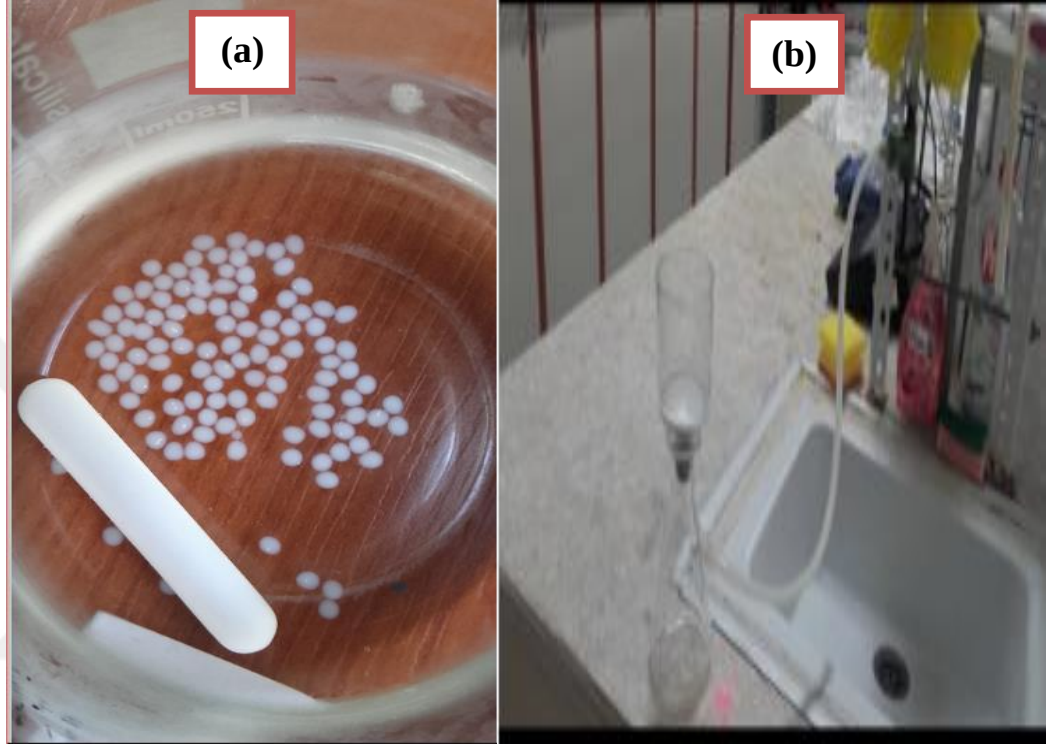


Şekil 4.9 *Trichoderma reesei* selülasına ilişkin SDS-PAGE jel görüntüsü [1: Moleküler kütle standartları; 2 ve 3: Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası örnek (6 mg/mL protein); 4: Üçlü-faz ayırma (TPP) sonrası örnek (orta faz) (0,16 mg/mL protein)].

Gerçekleştirilen SDS-PAGE’de %80 (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi yapılan preparatın pek çok bant içermesi sebebiyle kısmi saflıkta olduğu görülmüştür. Üçlü-faz ayırma (TPP) metoduyla kısmi deriştirilen selülazın ise yaklaşık 69 kDa ve 19 kDa boyutlarında iki farklı bant içerdiği gözlenmiştir. 69 kDa boyutundaki ilk bantın selülaz enzimi olduğu düşünülmektedir. 19 kDa boyutundaki ikinci bantın ise farklı bir enzim olabileceği ya da küçük molekül kütleli bir endoglukonaz olabileceği düşünülmektedir. Miettinen-Oinonen (2004), *Trichoderma reesei* suşuna ait temel selülaz componentlerini ve moleküler ağırlıklarını listelemiştir. *Trichoderma reesei*’nin en çok CBH I (CEL7A) (Sellobiyohidrolaz I) enzimini ürettiğini ve bu enzimin total üretilen proteinin yaklaşık yarısı miktarına denk geldiğini belirtmiştir. Miettinen-Oinonen’e göre; CBH I ortalama 59-68 kDa, CBH II (CEL6A) ortalama 50-58 kDa, EG I (CEL7B) ortalama 50-55 kDa, EG II (CEL5A) 48 kDa, EG III (CEL12A) 25 kDa, EG IV (CEL61A) 34 kDa, EG V(CEL45A) 23 kDa, EG (Cel61B) 27 kDa ve EG (Cel74A) ise 87 kDa moleküler boyutta ifade edilmiştir.

4.4. Selüla ζ nın Tutuklama Metodu ile İmmobilizasyonu

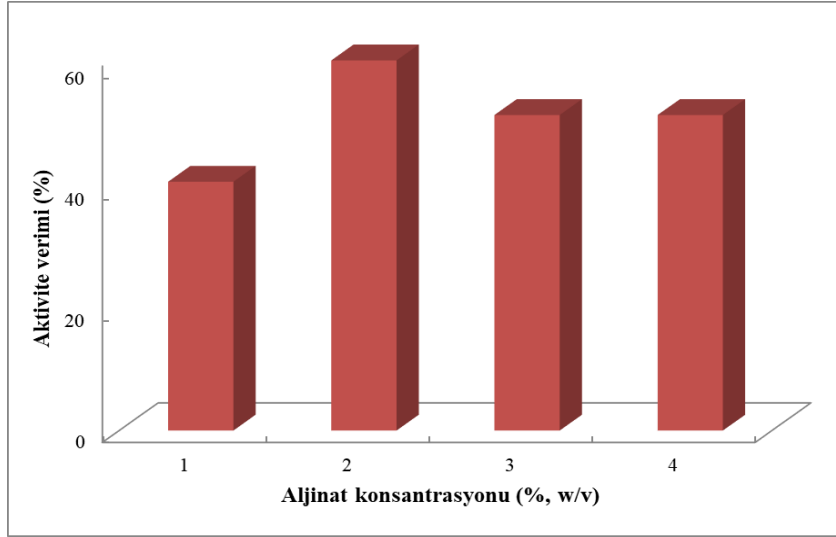
İmmobilizasyon işlemleri esnasında, yıkama prosedüründe kullanılan sistem ve Ca-Aljinat selüla ζ mikrokürelerin (çapraz bağlanmamış) fotoğrafı Şekil 4.10'da verilmiştir.



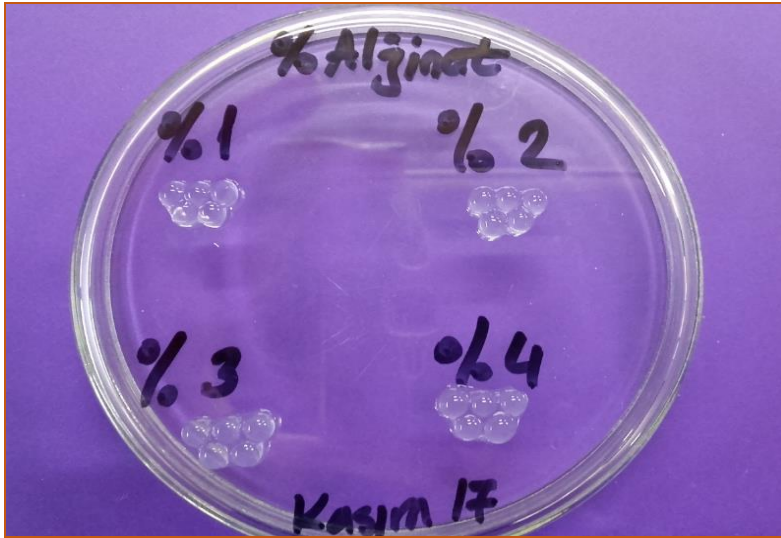
Şekil 4.10 Ca-Aljinat mikroküreler (a) ve immobilizasyonda kullanılan Nuçe erleni ve beherinden oluşan yıkama sistemi (b).

4.4.1. Aljinat Konsantrasyonu Optimizasyonu

Sadece aljinat konsantrasyonu değiştirilerek kurulan immobilizasyon sistemlerine ilişkin sonuçlar Şekil 4.11’de verilmiştir. Elde edilen mikroküreler ise Şekil 4.12’de gösterilmiştir.



Şekil 4.11 Aljinat konsantrasyonunun immobilizasyon verimine etkisi (0,5 mg protein, %0,5 (w/v) kitosan içeren 0,15 M CaCl₂, 3 saat immobilizasyon, %0,5 (v/v) GA, 2 saat çapraz bağlama).

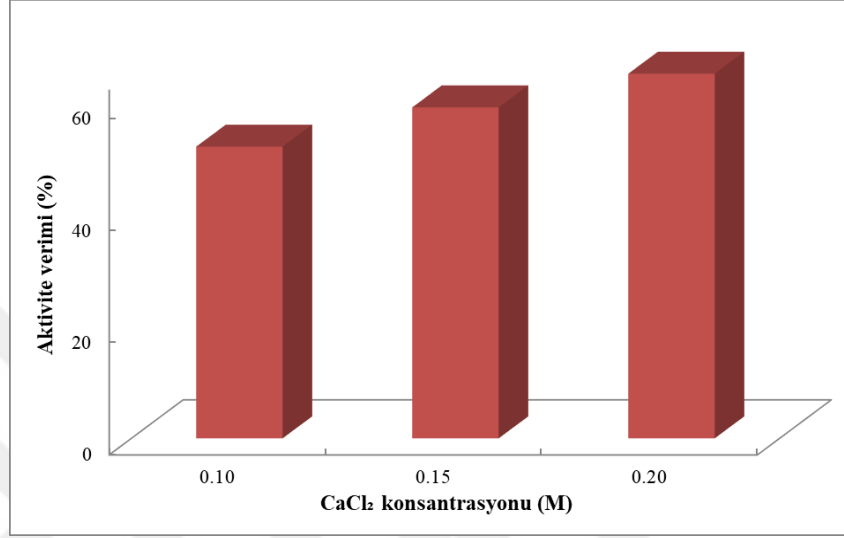


Şekil 4.12 Farklı konsantrasyondaki aljinatlar kullanılarak elde edilen selüloz mikroküreler.

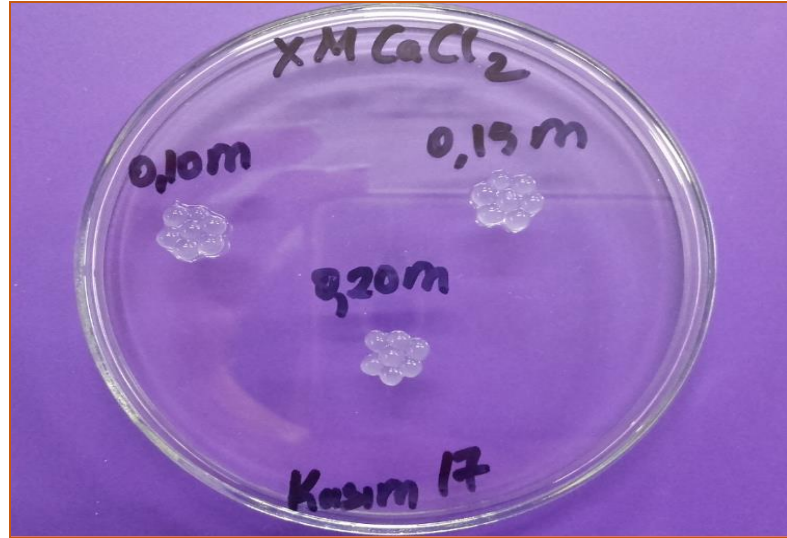
Gerçekleştirilen deneme neticesinde, selüloz enzimi %2 (w/v) aljinatın kullanıldığı sistemde %61 aktivite verimi ile başarı ile immobilize edilmiştir.

4.4.2. Kalsiyum Klorür (CaCl_2) Konsantrasyonu Optimizasyonu

Sadece kalsiyum klorür konsantrasyonu değiştirilerek kurulan immobilizasyon sistemlerine ilişkin sonuçlar Şekil 4.13’de verilmiştir. Elde edilen mikroküreler ise Şekil 4.14’de gösterilmiştir.



Şekil 4.13 CaCl_2 konsantrasyonunun immobilizasyon verimine etkisi (0,5 mg protein, %2 (w/v) aljinat, %0,5 (w/v) kitosan, 3 saat immobilizasyon, %0,5 (v/v) GA, 2 saat çapraz bağlama).

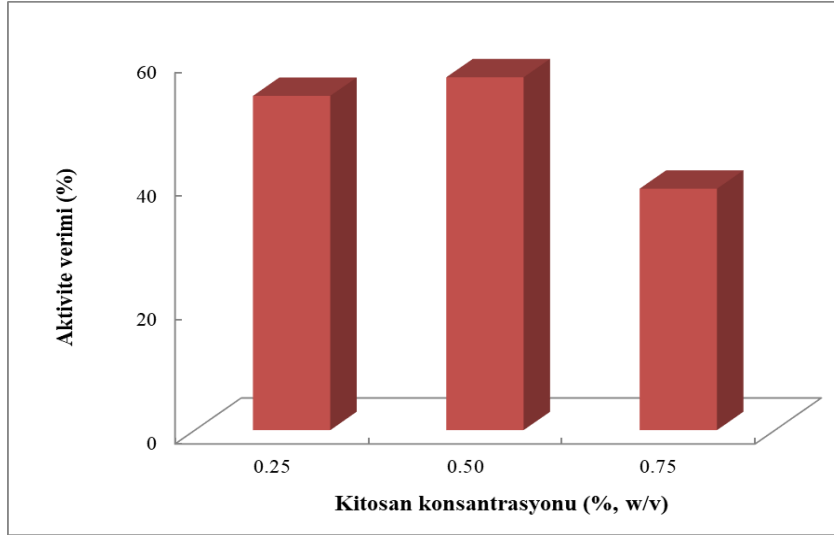


Şekil 4.14 Farklı konsantrasyonda CaCl_2 çözeltileri kullanılarak elde edilen selüloz mikroküreler.

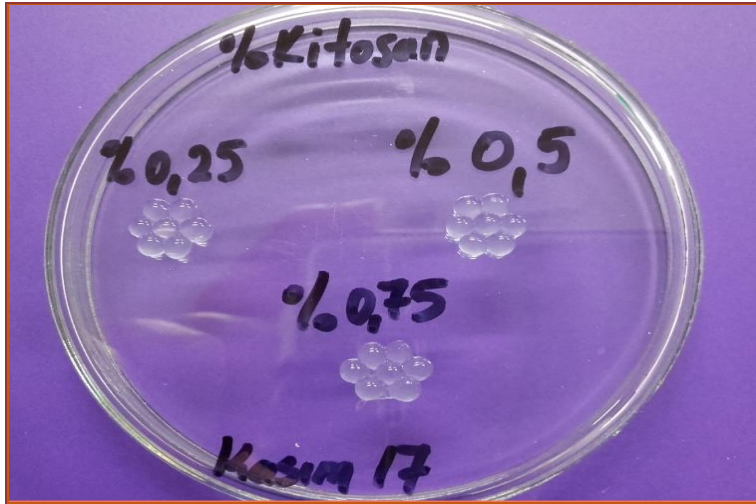
Gerçekleştirilen deneme neticesinde, selüloz enzimi 0,15 M CaCl_2 ’ün kullanıldığı sistemde %59 aktivite verimi ile başarı ile immobilize edilmiştir.

4.4.3. Kitosan Konsantrasyonu Optimizasyonu

Sadece kitosan konsantrasyonu değiştirilerek kurulan immobilizasyon sistemlerine ilişkin sonuçlar Şekil 4.15'te verilmiştir. Elde edilen mikroküreler ise Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.15 Kitosan konsantrasyonunun immobilizasyon verimine etkisi (0,5 mg protein, %2 (w/v) aljinat, 0,15 M CaCl₂, 3 saat immobilizasyon, %0,5 (v/v) GA, 2 saat çapraz bağlama).

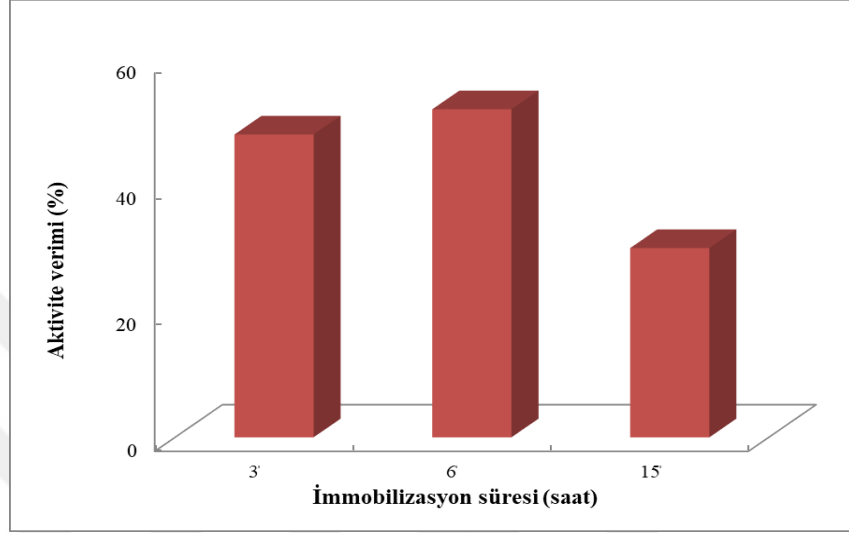


Şekil 4.16 Farklı konsantrasyondaki kitosan çözeltileri kullanılarak elde edilen selüloz mikroküreler.

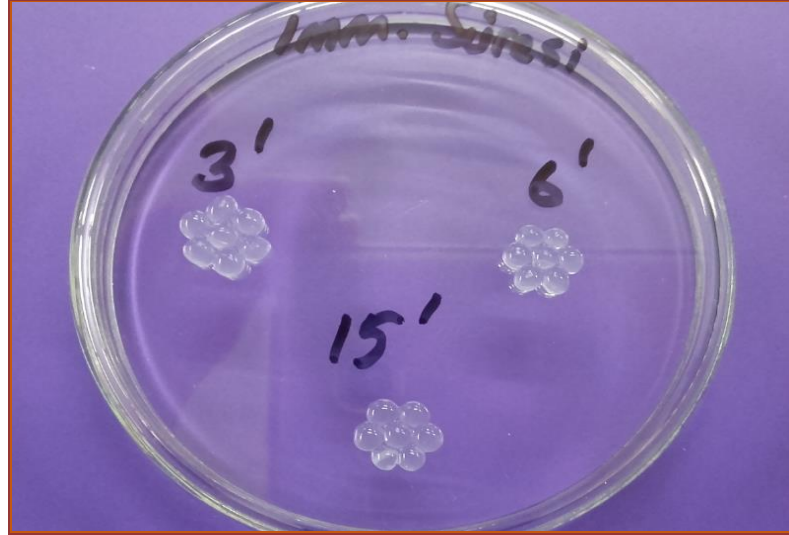
Gerçekleştirilen deneme neticesinde, selüloz enzimi %0,5 (w/v) kitosanın kullanıldığı sistemde %57 aktivite verimi ile başarı ile immobilize edilmiştir.

4.4.4. İmmobilizasyon Süresi Optimizasyonu

Sadece immobilizasyon süreleri değiştirilerek kurulan sistemlere ilişkin sonuçlar Şekil 4.17’de verilmiştir. Elde edilen mikroküreler ise Şekil 4.18’de gösterilmiştir.



Şekil 4. 17 İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon verimine etkisi (0,5 mg protein, %2 (w/v) aljinat, %0,5 (w/v) kitosan içeren 0,15 M CaCl₂, %0,5 (v/v) GA, 2 saat çapraz bağlama).

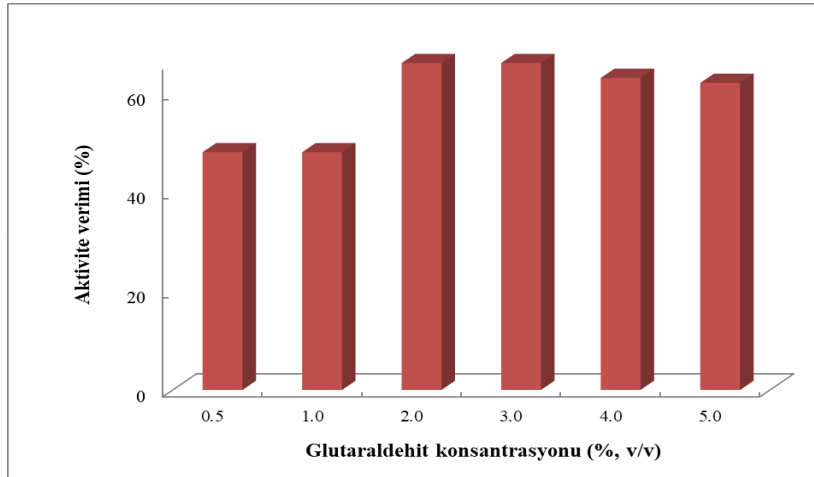


Şekil 4.18 Farklı sürelerde immobilize edilen selülag mikroküreler.

Gerçekleştirilen deneme neticesinde, selülag enzimi %48 aktivite verimi ile 3 saatte başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir.

4.4.5. Çapraz Bağlayıcı Olarak Glutaraldehit (GA) Konsantrasyonu Optimizasyonu

Farklı konsantrasyondaki glutaraldehit çözeltileri kullanılarak kurulan sistemlere ilişkin sonuçlar Şekil 4.19'da verilmiştir. Elde edilen mikroküreler ise Şekil 4.20'de gösterilmiştir.



Şekil 4.19 Glutaraldehit konsantrasyonunun immobilizasyon verimine etkisi (0,5 mg protein, %2 (w/v) aljinat, %0,5 (w/v) kitosan içeren 0,15 M CaCl₂, 3 saat immobilizasyon, 2 saat çapraz bağlama).

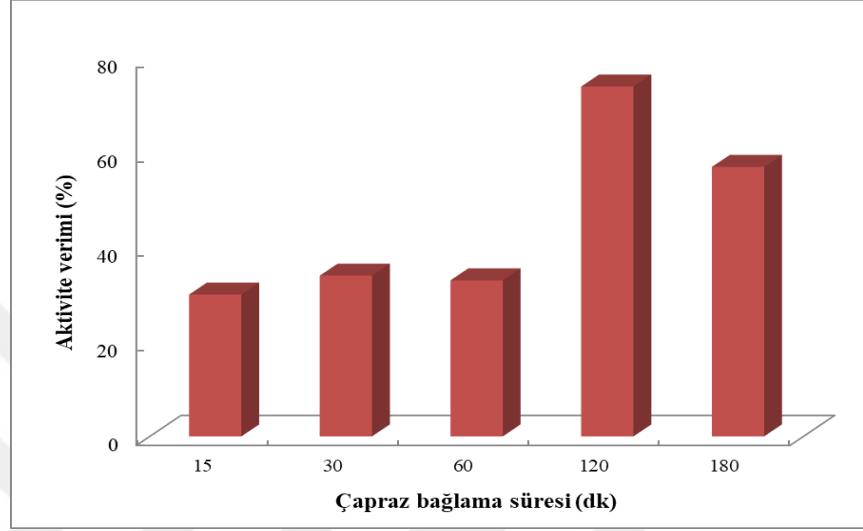


Şekil 4. 20 Farklı konsantrasyonda glutaraldehit kullanılarak elde edilen selüloz mikroküreler.

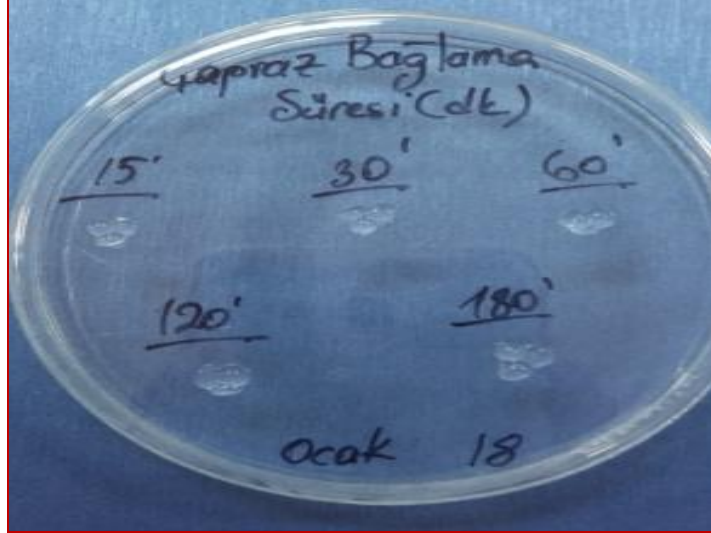
Gerçekleştirilen denemede, selüloz enzimi %2 (v/v) glutaraldehitin kullanıldığı sistemde %66 aktivite verimi ile başarı ile immobilize edilmiştir.

4.4.6. Çapraz Bağlanma Süresi Optimizasyonu

Çapraz bağlanma süreleri değiştirilerek kurulan sistemlere ilişkin sonuçlar Şekil 4.21’de verilmiştir. Elde edilen mikroküreler ise Şekil 4.22’de gösterilmektedir.



Şekil 4.21 Çapraz bağlanma süresinin immobilizasyon verimine etkisi (0,5 mg protein, %2 (w/v) aljinat, %0,5 (w/v) kitosan içeren 0,15 M CaCl₂, 3 saat immobilizasyon, %2 (v/v) GA).

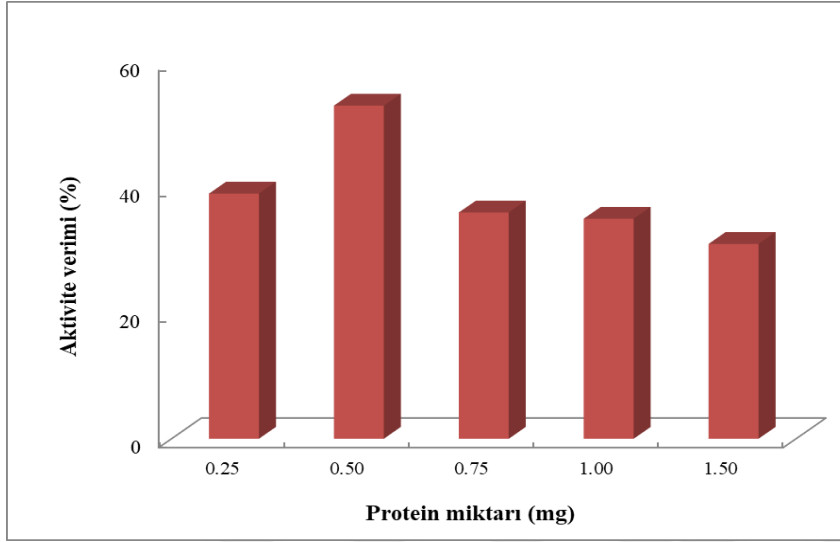


Şekil 4.22 Farklı sürelerde çapraz bağlanarak elde edilen selüloz mikroküreler.

Gerçekleştirilen deneme neticesinde, selüloz enzimi %74 aktivite verimi ile 2 saat çapraz bağlanarak başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir.

4.4.7. Protein Miktarı Optimizasyonu

Başlangıç protein miktarlarını değiştirerek kurulan sistemlere ilişkin sonuçlar Şekil 4.23'te verilmiştir. Elde edilen mikroküreler ise Şekil 4.24'te gösterilmiştir.



Şekil 4.23 Protein miktarının immobilizasyon verimine etkisi (%2 (w/v) aljinat, %0,5 (w/v) kitosan içeren 0,15 M CaCl₂, 3 saat immobilizasyon, %2 (v/v) GA, 2 saat çapraz bağlama).

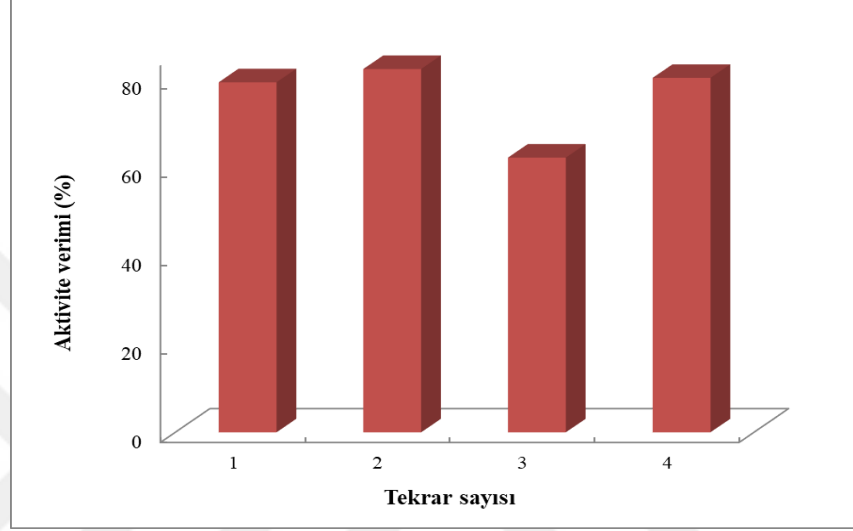


Şekil 4.24 Farklı protein miktarlarıyla kurulan sistemlerden elde edilen selüloz mikroküreler.

Gerçekleştirilen denemede, selüloz enzimi 0,5 mg protein ile kurulan sistemde %53 aktivite verimi ile başarı ile immobilize edilmiştir.

4.4.8. Tekrarlanabilirlik Denemesi

Yapılan optimizasyon çalışmaları ile elde edilen optimum koşulların tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla optimum koşullarda 4 farklı immobilizasyon sistemi kurulmuştur. Kurulan sistemlere ilişkin sonuçlar Şekil 4.25’de verilmiştir.



Şekil 4.25 Optimum koşullarda immobilizasyonun tekrarlanabilirliği (0,5 mg protein, %2 (w/v) aljinat, %0,5 (w/v) kitosan içeren 0,15 M CaCl₂, 3 saat immobilizasyon, %2 (v/v) GA, 2 saat çapraz bağlama).

Gerçekleştirilen optimum koşulların tekrarlanabilirliği denemesinde, tüm sonuçlar birbirine yakın bulunmuştur. Aynı şartlarda kurulan sistemlerde selüloz enzimi, maksimum %82 aktivite verimi ile başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir.

4.4.9. Selülaz Enziminin İmmobilizasyon Sonuçları

Trichoderma reesei selülazının optimum verimle immobilizasyonuna ait sonuçlar Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Selülaz enziminin immobilizasyon sonuçları.

Adım	Toplam aktivite (U)	Aktivite verimi (%)
Ham selülaz (%80 w/v AS)	13,91	100
AS - Selülaz (İmmobilize)	11,43	82

İmmobilizasyon çalışmaları kapsamında, %80 (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi yaptığımız *Trichoderma reesei* selülazını, taşıyıcı materyal olarak aljinat seçtiğimiz, kitosan ile uygun sıklıkta paketlediğimiz ve ilaveten glutaraldehit ile çapraz bağladığımız (tutuklama metodu ile) çalışmalar gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyonda gerçekleştirilen adımlara ait tüm değişken parametreler geniş aralıklarla çalışılıp, selülaz immobilizasyonu için optimum koşullar belirlenmiştir. Yaptığımız optimizasyon denemeleri neticesinde, ticari selülaz enziminin; 0,5 mg enzim (protein miktarı) ve %2 (w/v) aljinat ile başlatılan, %0,5 (w/v) kitosan içeren 0,15 M CaCl₂ içerisine damlatılan, 3 saatte immobilizasyonun gerçekleştiği, %2,0 (v/v) glutaraldehit ile 2 saatte çapraz bağlanan sistem ile en ideal sonuçlarla immobilize edildiği belirlenmiştir. Bu optimum koşullarda gerçekleştirilen immobilizasyon neticesinde selülaz enzimi maksimum %82 aktivite verimi ile başarı ile immobilize edilmiştir. Daha sonra optimum koşulların tekrarlanabilirliği denenmiştir ve bu amaçla optimum koşullarda 4 seri immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Eş koşullarda gerçekleştirilen immobilizasyonlar neticesinde selülaz enzimi sırası ile %79, %82,

%62 ve %80 aktivite verimleri ile tekrarlanabilir bir başarı oranı ile immobilize edilmiştir. Genel olarak immobilizasyon çalışmalarımız değerlendirildiğinde; sahip olduğumuz laboratuvar koşulları ve kullandığımız kimyasallar varlığında, aynı koşullarda gerçekleştirilen immobilizasyonlarda %20'ye varan oranlarda aktivite kazanımı/kaybı saptanmıştır. Bununla birlikte elde ettiğimiz immobilize enzim, yapısal açıdan stabil ve istenen sferik yapıya sahiptir.

Bu kısımda literatürdeki immobilizasyon çalışmalarından bazı örnekler vererek yöntemin etkinliğinden bahsedilecektir. Önal ve Zihnioğlu (2002), yaptıkları enkapsulasyonla insülin immobilizasyonu çalışmasında oldukça başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. İlk olarak %2 (w/v) aljinat ile %2 (w/v) insülinden oluşan çözeltiyi, %0,5 (w/v) kitosan içeren 0,1 M CaCl_2 çözeltisine damlatmışlar ve gece boyu bekletmişlerdir. Immobilizasyon süresinin ardından yıkanan mikrokürelerin bir kısmı %0,25 (v/v) glutaraldehit ile çapraz bağlanmıştır. Her iki immobilize form incelendiğinde, kitosan kaplı aljinat mikroküreler %97 verimle insülin bağlama kapasitesi göstermiş, glutaraldehit ile çapraz bağlanan kitosan-aljinat mikroküreler ise %95 immobilizasyon verimi ile başarılı bir şekilde enkapsule edilmiştir. Andriani ve arkadaşları (2012), *Bacillus subtilis* TD6 selülazını, %80 (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi metodu ile kısmi saflaştırmışlar ve ardından kalsiyum aljinat ile enkapsule etmişlerdir. Gerçekleştirdikleri optimizasyon çalışmalarının neticesinde, %2 (w/v) aljinat ile selülaz enzimini 1:1 (v/v) oranında birleştirmişler ve 0,15 M CaCl_2 üzerine damlatarak immobilize etmişlerdir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen immobilizasyonda, selülaz enzimini %60 aktivite verimi ile başarılı bir şekilde enkapsule etmişlerdir. Üstelik immobilize selülazı, 3 kez kaydadeğer düzeyde bir aktivite ile kullanılabilmişlerdir. Romo-Sánchez ve arkadaşları (2014), ticari Celluclast BG enzimini kitin-kitosandan oluşturdukları polimerik taşıyıcıda hem adsorpsiyon hem de glutaraldehit ile çapraz bağlama metodunun eklendiği retikülasyon metodları ile immobilize etmişlerdir. Immobilizasyon için ideal ortam pH'ını 4,5 ve immobilizasyon süresini de 2,5 saat olarak tespit etmişlerdir. Retikülasyon işlemi için ise adsorpsiyonla elde ettikleri immobilize selülazı, %0,125 (v/v) glutaraldehit ile ideal koşullarda çapraz bağlamışlardır. Yaptıkları çalışma neticesinde, adsorpsiyon metoduyla immobilize edilen selülaz 19 kez başarılı bir şekilde kullanılabilmiş ve 19. kullanımda halen %32 aktivitesini koruyabilmiştir.

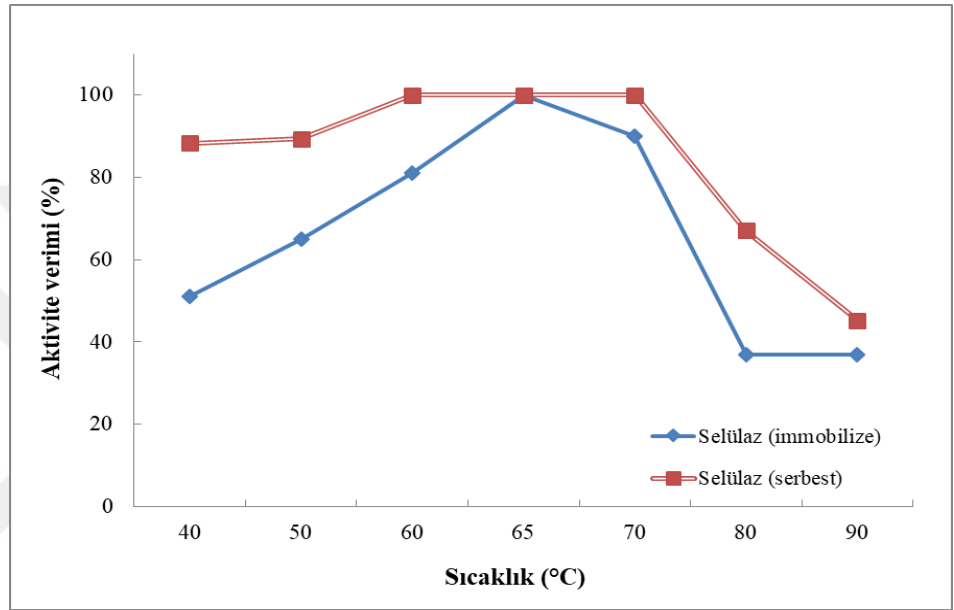
Bunun yanı sıra glutaraldehit ile çapraz bağlayarak oluşturdıkları (retikülasyonla immobilizasyonda elde edilen) selülaaz ise 19. kez kullanımında halen %64 oranında gösterdiği aktivite ile başarılı bir tekrarlı kullanım niteliği göstermiştir.

Yener 2007 yılında yaptığı tez çalışmasında, ticari pektinaz (Novozyme) enzimini aljinat jelde tutuklama metodu ile immobilize etmiştir. Immobilizasyon için pektinaz enzimini %2'lik (w/v) aljinat çözeltisi ile muamele etmiş, daha sonra 2 M CaCl_2 üzerine transfer etmiştir. Pektinaz enzimi aljinat jelde %83 protein bağlanma verimi ile immobilize edilmiştir. Tekrarlı kullanım testi gerçekleştirilen immobilize pektinaz, 20 kez kullanımın ardından aktivitesinin halen %94'ünü koruyarak oldukça başarılı bir immobilizasyon ürünü olmuştur. Viet ve arkadaşları (2013), *Trichoderma reesei* kaynaklı ticari Celluclast enzimini kalsiyum aljinat jelde tutuklama metodu ile immobilize etmişlerdir. Yaptıkları optimizasyon çalışmaları neticesinde, selülaaz enzimini %2 (w/v) aljinat varlığında ve 0,15 M CaCl_2 üzerine damlatarak gerçekleştirdikleri ve 30 dk'da gerçekleştirilen immobilizasyonla oldukça başarılı bir sonuçla %83 bağlanma verimi ile immobilize etmişlerdir. Elde ettikleri immobilize selülaaz mikroküreler, 5. kullanımda hala %69,2 aktivite gösterirken 8. kullanımda %20,3 aktivite göstermiştir. Xu ve arkadaşları (2014), *Trichoderma aureoviride* selülaazını kalsiyum aljinat jelde tutuklama metodu ile immobilize etmişlerdir. Saptanan optimum immobilizasyon koşulları; %3 (w/v) sodyum-aljinat ile selülaaz karışımının, 0,3 M CaCl_2 üzerine damlatılarak 120 dakikada immobilize edildiği sistem olmuştur. Optimum koşullarda *T. aureoviride* selülaazı %63 immobilizasyon verimi ile başarı ile immobilize edilmiştir.

4.5. İmmobilize ve Serbest Selülaazların Karakterizasyonu

4.5.1. Optimum Sıcaklık

İmmobilize ve serbest formdaki selülaazların maksimum verim ile çalıştıkları sıcaklığın belirlendiği optimum sıcaklık denemesine ilişkin sonuçlar Şekil 4.26’da verilmiştir.

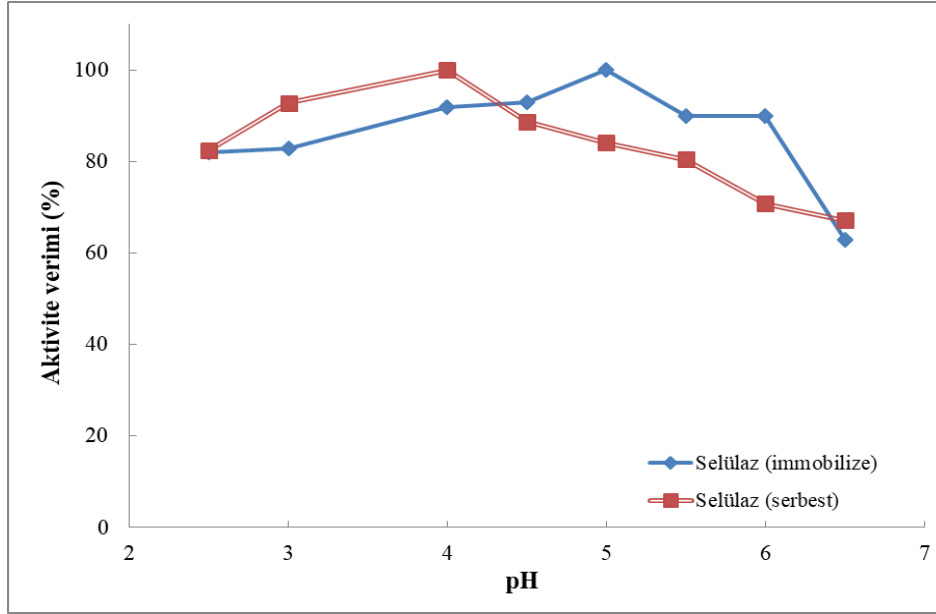


Şekil 4.26 Optimum sıcaklık.

Gerçekleştirilen optimum sıcaklık denemesinde her iki selülaaz benzer bir eğri göstermiş olup, serbest selülaazın maksimum çalışma sıcaklığı 60-65-70 °C iken immobilize selülaazın optimum çalışma sıcaklığı 65 °C olarak belirlenmiştir.

4.5.2. Optimum pH

İmmobilize ve serbest formdaki selülozların maksimum verim ile çalıştıkları pH'ın belirlendiği optimum pH denemesine ilişkin sonuçlar Şekil 4.27'de verilmiştir.

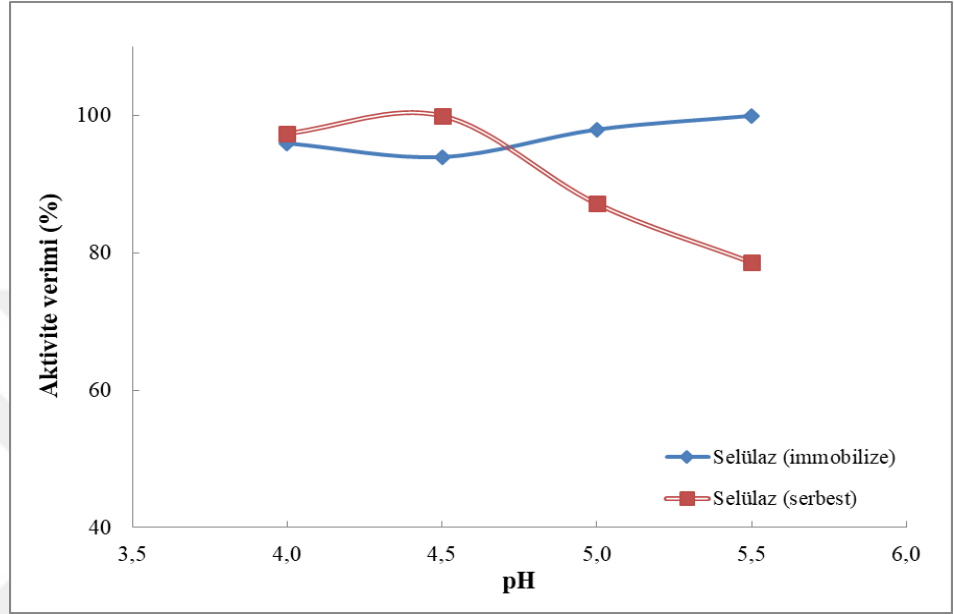


Şekil 4.27 Optimum pH.

Gerçekleştirilen optimum pH denemesinde her iki selülaz benzer stabilite göstermiş olup, serbest selülazın optimum çalışma pH'ı 4,0 iken immobilize selülazın optimum çalışma pH'ı 5,0 olarak belirlenmiştir.

4.5.3. pH Kararlılığı

İmmobilize ve serbest formdaki selülozların farklı pH'lara karşı stabilitelerinin incelendiği pH kararlılığı denemesinin sonuçları Şekil 4.28'de verilmiştir.

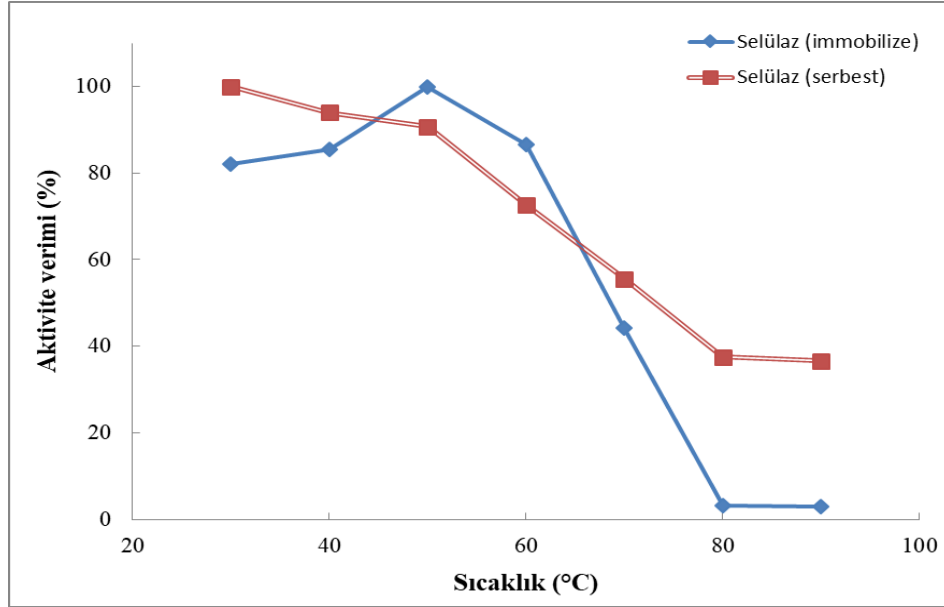


Şekil 4.28 pH kararlılığı.

Gerçekleştirilen pH kararlılığı denemesinde her iki selüloz benzer stabilite göstermiş olup, pH 4,0-5,5 arası etkin çalışma performansı göstermiştir.

4.5.4. Termal Kararlılık

İmmobilize ve serbest formdaki selülozların sıcaklığa karşı dayanıklılıklarının incelendiği termal kararlılık denemesinin sonuçları Şekil 4.29’da verilmiştir.

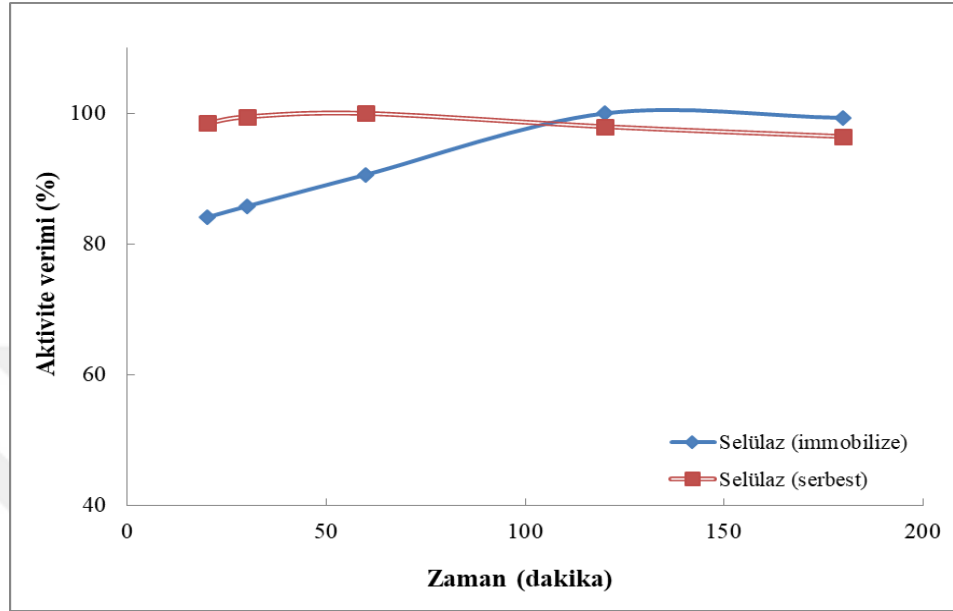


Şekil 4.29 Termal kararlılık.

Gerçekleştirilen termal kararlılık denemesinde her iki selülaz benzer karakter göstermiş olup, 30-70 °C arasında etkin çalışma performansı göstermiştir.

4.5.5. Zamana Bağlı Termal Kararlılık

İmmobilize ve serbest formdaki selülozların 37 °C'deki zamana bağlı termal kararlılıkları Şekil 4.30'da verilmiştir.



Şekil 4.30 Zamana bağlı termal kararlılık.

Gerçekleştirilen zamana bağlı termal kararlılık denemesinde, her iki selülaz da 37 °C'de 180 dakika ön inkübe edilmesine rağmen tüm aktivitesini korumaya devam etmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında serbest ve immobilize selülozların karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlk deneme olarak serbest selülaz ve %80 (w/v) amonyum sülfat sonrası immobilize edilen selülaz enzimlerinin optimum çalışma sıcaklıkları belirlenmiştir. Yapılan bir seri sıcaklık denemesi neticesinde, serbest selülazın optimum çalışma sıcaklığı 60-65-70 °C, immobilize selülazın ise 65 °C olarak saptanmıştır. Her iki form da benzer bir eğri ile sıcaklıktan etkilenirken, 80 °C hem serbest hem de immobilize selülaz için aktivitenin azalmaya başladığı sıcaklık olarak tespit edilmiştir. 90 °C'de her iki formun da halen aktivitesinin minimum %37'sini koruyabildiği belirlenmiştir. Bir sonraki karakterizasyon basamağı olarak serbest ve immobilize selülazın optimum çalışma pH'ı belirlenmiştir. pH 2,5-6,5 arasında yapılan çalışmada, serbest

selüla ζ ın optimum pH 'ı 4,0 immobilize selüla ζ ın optimum pH 'ı ise 5,0 olarak belirlenmiştir. Her iki selüla ζ da genel itibarı ile pH 'dan çok fazla etkilenmemiş olup pH 6,5'da halen aktivitelerinin minimum %63'ünü koruyabildikleri saptanmıştır. Daha üst pH 'larda gerçekleştirilen çalışmalarda ise immobilize selüla ζ stabilitesini ve akabinde aktivitesini kaybetmiştir. Karakterizasyon çalışmalarının üçüncü basamağı olarak pH kararlılığı denemesi gerçekleştirilmiştir. Serbest ve immobilize selüla ζ lar oda sıcaklığında 30'ar dk pH 4,0-5,5 arasındaki tamponlarda inkübe edilmiştir. Her iki form da tüm pH 'larda aktivitelerinin minimum %79'unu korurken, serbest selüla ζ pH 4,5'da, immobilize selüla ζ ise pH 5,5'da maksimum düzeyde aktivitesini korumuştur.

Bir sonraki karakterizasyon denemesinde, her iki selüla ζ enzimi, farklı sıcaklıklarda 30 dk ön inkübe edilerek termal kararlılıkları incelenmiştir. Yapılan çalışma neticesinde hem serbest hem de immobilize selüla ζ lar, benzer bir termal eğri göstermişlerdir. 70 °C her iki form için de belirgin etkilenme sıcaklığı olarak tespit edilmiş olup, bu sıcaklıkta serbest selüla ζ halen aktivitesinin %56'sını korurken immobilize form aktivitesinin %44'ünü koruyabilmiştir. 80 °C immobilize selüla ζ için çalışmasını durdurucu etki yaparken, serbest selüla ζ 90 °C'de halen aktivite göstermeye devam etmiştir. Karakterizasyon çalışmalarının son adımı olarak da zamana bağlı termal kararlılık denemesi gerçekleştirilmiştir. Bu denemede her iki enzim de 37 °C'de farklı sürelerde ön inkübe edilerek zamana bağlı profilleri çıkarılmıştır. 20-180 dk aralığının çalışıldığı denemede, hem immobilize hem de serbest selüla ζ lar aktivite kaybı göstermemiş olup, 120 dk'dan sonra aktivitelerinde sabitlenme durumu gözlenmiştir.

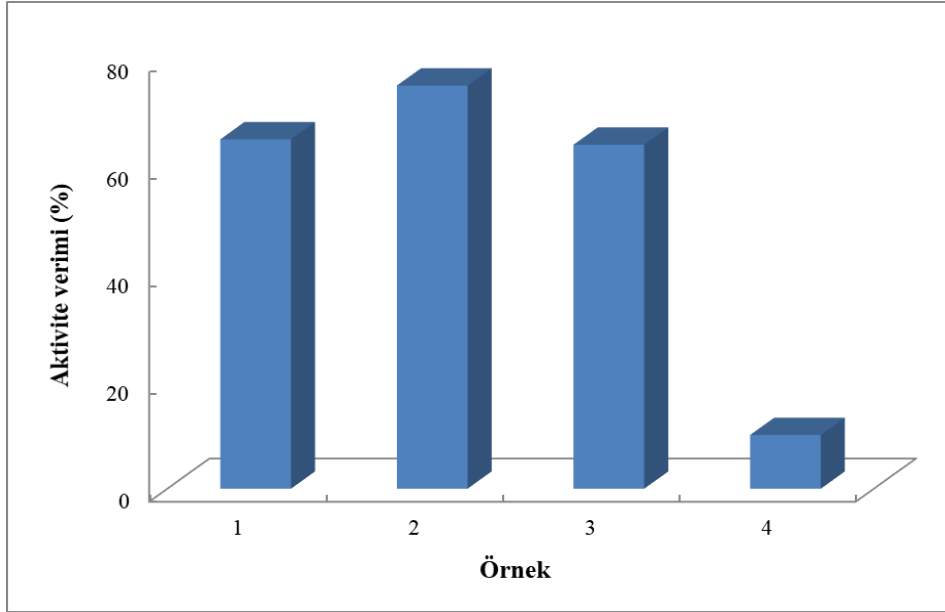
Literatürdeki selüla ζ çalışmalarına bakıldığında farklı kaynaklardan izole edilen selüla ζ ların benzer optimum çalışma karakterine sahip olduğu ve immobilize edildiklerinde serbest formlarına benzer nitelikte ve fiziksel şartlara daha dayanıklı bir profil çizdikleri görülmektedir. Bu kapsamda yapılmış bazı çalışmalardan bahsedeceğiz. Andriani ve arkadaşları (2012), *Bacillus subtilis* TD6 suşundan izole ettikleri selüla ζ enzimini %2 (w/v) aljinat ve 0,15 M CaCl_2 kullanarak immobilize etmişlerdir. Daha sonra her iki formu da karakterize etmişlerdir. Yaptıkları çalışma neticesinde, hem immobilize hem de serbest

selülaaz için optimum çalışma pH'ını 6,0 bulmuşlardır. Optimum çalışma sıcaklıkları ise serbest selülaaz için 50 °C bulunurken immobilize selülaaz için 60 °C olarak saptanmıştır. Ardından termal ve pH kararlılıkları saptanan immobilize selülaaz için; en kararlı depolanabildiği koşullar pH 6,0 ve 50 °C olmuştur. Viet ve arkadaşları (2013), *Trichoderma reesei* kaynaklı ticari selülaaz (Celluclast) enzimini %2 (w/v) aljinat ve 0,15 M CaCl₂ kullanarak immobilize etmişlerdir. Ardından immobilize ve serbest formdaki selülaazları karakterize etmişlerdir. Hem optimum çalışma koşullarını hem de kararlılıklarını aynı çalışma kapsamında incelemişlerdir. Farklı pH'larda, 55 °C'de 30 dakika ön inkübe ederek gerçekleştirdikleri çalışmada; hem immobilize hem de serbest selülaaz için optimum çalışma pH'ı 4,5 olarak saptanmıştır. Her iki form da asitlik düzeyinden benzer bir eğri ile etkilenmiş olup pH 7,0 olduğunda serbest selülaaz %15,06 aktiviteye sahipken immobilize selülaaz halen %70,38'lik aktivitesi ile nötral pH'larda da başarı ile etkinlik göstermiştir. Bir sonraki denemede ise pH 4,5'da ve farklı sıcaklıklarda 30 dakika ön inkübe edilerek yapılan çalışmada; serbest selülaaz için optimum çalışma sıcaklığı 55 °C, immobilize selülaaz için 60 °C olarak belirlenmiştir. Termal kararlılık açısından irdelendiğinde, 90 °C'de serbest selülaaz %16,42 aktivitesini koruyabilmişken immobilize selülaaz halen %50,51 aktivitesini korumuştur. Bu veriler kapsamında, immobilize form serbest selülaaza kıyasla pH ve sıcaklık değişimlerinden minimum oranda etkilenmiştir.

Xu ve arkadaşları (2014), *Trichoderma aureoviride* selülaazını %3 (w/v) sodyum-aljinat ve 0,3 M CaCl₂ kullanarak enkapsüle etmişlerdir. Daha sonra hem serbest hem de immobilize formu karakterize etmişler ve hem pH hem de termal değişikliklerden farklı yüzdelerde ancak aynı eğri ile etkilendiklerini saptamışlardır. Hem immobilize hem de serbest selülaaz için optimum çalışma pH'ı 4,5 olarak belirlenmiştir. Serbest selülaazın optimum çalışma sıcaklığı 50 °C immobilize selülaazın ise 60 °C olarak saptanmıştır. 1 saat 25 °C'de ve farklı pH'larda gerçekleştirilen ön inkübasyonun ardından; pH 8,0'de serbest form %50 civarında bir aktivite gösterirken immobilize selülaaz halen %80 den fazla aktivite göstermektedir. Yine 1 saat ve farklı sıcaklıklarda ön inkübasyonun akabinde gerçekleştirilen termal kararlılık denemesinde ise 80 °C'de immobilize selülaaz halen %20'den fazla aktivitesini korurken serbest selülaaz tüm aktivitesini kaybetmiştir.

4.6. Tuz Çöktürmesi ile Deriştirilmiş ve TPP ile Kısmi Saflaştırılmış Selüla larla Hazırlanan İmmobilize Enzimlerin Salınım Özellikleri

Bu tez çalışmasında immobilizasyon koşullarının optimizasyonları, %80 (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi yapılan ve TPP ile deriştirilmemiş selüla lar ile gerçekleştirilmiştir. Tuz çöktürmesinin ardından TPP ile deriştirilen orta fazdan toplanan selüla lar kullanılarak sözkonusu bu optimum koşullarda immobilize edilmiştir. Bu çalışma aynı zamanda optimum koşulların da bir tekrarı niteliğinde olup sonuçlar Şekil 4.31’de verilmiştir.

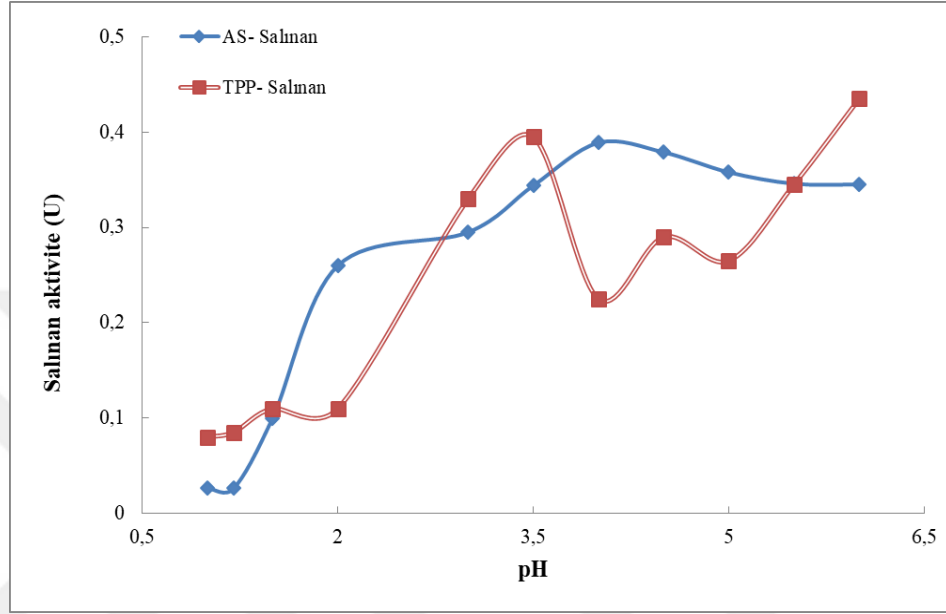


Şekil 4. 31 Selüla ların TPP ile deriştirilmemiş ve deriştirilmiş formlarının optimum koşullardaki immobilizasyon verimi (1,2,3: Tuz çöktürmesinden elde edilen selüla lar enzimi, 4: TPP ile ayrılan orta fazdaki selüla lar enzimi).

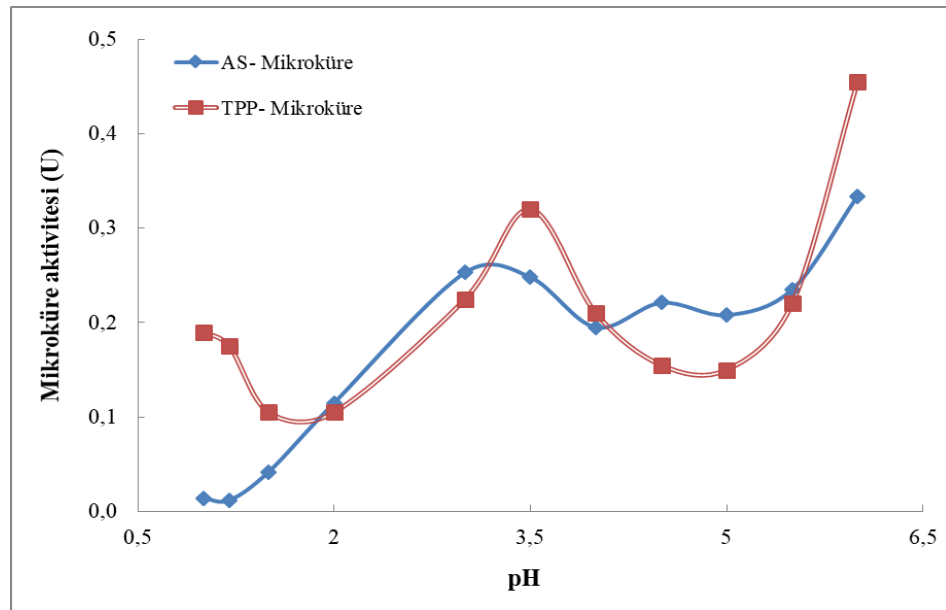
Belirlenen optimum immobilizasyon koşullarında çalışılan bu denemede, tuz çöktürmesi yapılan selüla lar enzimi sırası ile %65, %75 ve %64 aktivite verimi ile immobilize edilmiştir. Aynı optimum koşullarda TPP orta fazından elde edilen selüla lar enzimi ise %10 aktivite verimi ile immobilize edilmiştir.

4.6.1. pH'ya Bağlı Salınım Özellikleri

Hem AS- hem de TPP-immobilize selüloz mikrokürelerin pH'ya bağlı salınım sonuçları Şekil 4.32'de geri kalan aktivite değerleri ise Şekil 4.33'de verilmiştir.



Şekil 4.32 Mikrokürelerin pH'ya bağlı salınım potansiyelleri.



Şekil 4.33 pH'ya bağlı salınım sonrası mikrokürelerde mevcut aktivite değerleri.

AS- Mikrokürelerin pH'ya bağlı salınım verileri Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4 AS- mikrokürelerin pH'ya bağlı salınım ve salınım sonrası kalan aktivite değerleri.

pH	Salınan aktivite (U)	Salınım oranı (%)	Geri kalan aktivite (U)	Geri kalan aktivite oranı (%)
1.0	0,026	6	0,014	3
1.2	0,026	6	0,012	3
1.5	0,100	23	0,042	10
2.0	0,260	61	0,115	27
3.0	0,295	85	0,253	73
3.5	0,344	99	0,248	72
4.0	0,389	112	0,195	56
4.5	0,379	110	0,221	64
5.0	0,358	104	0,208	60
5.5	0,346	100	0,235	68
6.0	0,345	100	0,334	97

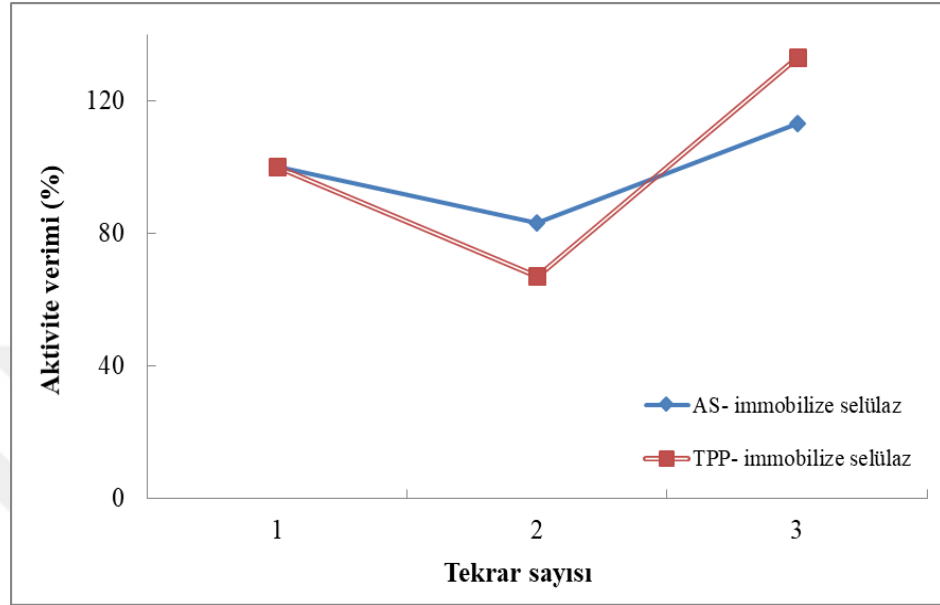
TPP- Mikrokürelerin pH'ya bağlı salınım verileri Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5 TPP- mikrokürelerin pH'ya bağlı salınım ve salınım sonrası kalan aktivite değerleri.

pH	Salınan aktivite (U)	Salınım oranı (%)	Geri kalan aktivite (U)	Geri kalan aktivite oranı (%)
1.0	0,016	33	0,038	79
1.2	0,017	35	0,035	73
1.5	0,022	46	0,021	44
2.0	0,022	46	0,021	44
3.0	0,066	138	0,045	94
3.5	0,079	165	0,064	133
4.0	0,045	94	0,042	88
4.5	0,058	121	0,031	65
5.0	0,053	110	0,030	63
5.5	0,069	144	0,044	92
6.0	0,087	181	0,091	190

4.6.2. Tekrar Kullanılabilirlik

AS-immobilize ve TPP-immobilize selüloz mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliğine ilişkin sonuçlar Şekil 4.34'te verilmiştir.



Şekil 4.34 Tekrar kullanılabilirlik.

İmmobilizasyonla ilgili bu kısımdaki sonuçlardan bahsedilecektir. İmmobilizasyon çalışmasının devamı niteliğinde, bir seri immobilizasyon denemesi daha gerçekleştirilmiştir. Bu denemede, belirlenen optimum koşullar 3'lü tekrar şeklinde yeniden çalışılmış ve ilave olarak bir önceki çalışmada TPP metodu kullanılarak orta fazda deriştirilen selüloz enzimi aynı optimum koşullar altında immobilize edilmiştir. Tekrarlanabilirliğin bir kez daha çalışıldığı bu denemede, optimum koşullarda %80 (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi yapılan selüloz enzimi sırası ile %65, %75 ve %64 aktivite verimi ile immobilize edilirken TPP ile orta fazda deriştirilen selüloz enzimi %10 aktivite verimi ile immobilize edilmiştir. TPP ile deriştirilen selülozın immobilizasyon veriminin bu denli düşük olmasını, immobilizasyon sisteminin TPP'li selülaza göre yeniden optimize edilmesi gerektiği fikri ile açıklayabilmekteyiz. Bilindiği üzere tüm immobilizasyon sistemleri kendi enzimine göre optimize edilmesi gerektiğinden, TPP ile deriştirildikten sonra aktif bölge statığı ve belki de konformasyonu değişen selüloz için de immobilizasyon sisteminin optimize edilmesi neticesinde

başarı oranının artabileceği öngörülmektedir. İlave çalışma olarak, elde edilen bu iki immobilize selülazın tekrar kullanılabilirliği test edilmiştir. İşlem, normal koşullarda, DNS metodu ile aktivite ölçülerek ve her işlem sonrası mikroküreleri 50 mM, pH 4,5 Na-Asetat tamponu ile yıkayarak gerçekleştirilmiştir. Totalde her iki immobilize selülaz da 3 kez oldukça etkin olarak kullanılabilmiştir. Ancak, Ca-Aljinat mikrokürelerin stabiliteleri bozulduğu için 4. kez çalışma denemeleri gerçekleştirilememiştir. Bu duruma aktivite reaksiyon ortamının 50 °C olmasından ötürü termal bozulmanın sebep olabileceği düşünülmektedir. Bunu aşmak için başka aktivite tayin metodlarının kullanılabilirliği öngörülmektedir. Ayrıca enzimin salınım süresinin de optimize edilerek, tekrar kullanılabilirliğinin artırılabilceği düşünülmektedir.

İmmobilizasyon çalışmaları kapsamında yapılan bir diğer çalışmamız ise her iki immobilize selülaz enziminin ortam pH'ına bağlı salınım karakterinin belirlenmesidir. Hem AS diye ifade ettiğimiz ve %80 (w/v) amonyum sülfat çöktürmesinin ardından elde edilen, hem de TPP ile deriştirdiğimiz selülaza ait immobilize enzimler 37 °C'de 30 dk salınıma bırakılarak, çalışma kapasiteleri ve korunan aktiviteleri ölçülmüştür. AS-selülaz mikroküreler pH 4,0'de, TPP-selülaz mikroküreler ise pH 3,5'da maksimum salınımlarını gerçekleştirmişlerdir. Her iki immobilize form da pH'lardan benzer karakter ile etkilenmiş olup pH 3,0-6,0 arasında etkin salınım ve aktivite korunum özellikleri göstermişlerdir. Bu tez kapsamında, proje başlangıcında sentetik mide sıvısında immobilize formların salınımının incelenmesi hedeflenmişti. Ancak yapılan bu pH'ya bağlı salınım denemesi, sentetik mide sıvısında kullanılan pH 1,2'nin her iki immobilize form için uygun bir çalışma asitliği olmadığını göstermektedir. Aynı zamanda pH 1,2 immobilize formdaki selülazların yapısal stabilitesini de olumsuz etkilemiş olup, yapılarının bozulmasına sebep olmuştur. Midede kullanım için henüz çok uygun olmadığı belirlenen bu formların; çapraz bağlayıcı, taşıyıcı vb. temel bileşenlerinin farkedirilerek gerçekleştirildiği immobilizasyonlar tasarlanarak, midede kullanımı için uygun formlarının oluşturulabilmesi olası fikirler arasındadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında *Trichoderma reesei* kaynaklı ticari selüloz enziminin kalsiyum aljinat jelde tutuklanması ve inovatif bir enzim mikroküre sentezi hedeflenmiştir. Elde edilen immobilize enzimin yem sanayisi ve sağlık sektörü için yararlı bir preparat olması amaçlanmıştır. Bu kapsamda ticari selüloz enzimi ilk olarak %80 (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi deriştirilmiş ve ardından üçlü-faz ayırma (TPP) metodu ile kısmi saflaştırılmıştır. Bir sonraki adım olarak %80 (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi yapılan selüloz enziminin kalsiyum aljinat jelde immobilizasyonu için optimum koşullar belirlenmiş olup, aynı koşullarda immobilize edilen TPP ile saflaştırılan selüloz enzimi ile kıyası yapılmıştır.

TPP adımımda, %80 (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi yapılan selüloz enzimi amonyum sülfat ve *tert*-bütanol varlığında ve bir saat gibi kısa bir sürede tek adımda kısmi saflaştırılmıştır. Selüloz enzimi, TPP metoduyla optimum koşullarda (%50 amonyum sülfat, 1:1 enzim: t-bütanol (v/v) oranı, pH 4.5) %113 aktivite verimi ve 1,42 saflaştırma katı ile başarılı bir şekilde saflaştırılmıştır.

İmmobilizasyon adımımda 0,5 mg %80 (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi yapılan selüloz enzimi %2 (w/v) aljinat çözeltisi ile birlikte, %0,5 (w/v) kitosan içeren 0,15 M CaCl₂ çözeltisine damlatılmıştır. 3 saat immobilizasyonun ardından, oluşan mikroküreler %2 (v/v) glutaraldehit ile 2 saat çapraz bağlanmıştır. Belirlenen bu optimum koşullar altında %80 (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi yapılan selüloz enzimi maksimum %82 aktivite verimi ile immobilize edilirken, TPP ile saflaştırılan selüloz enzimi ise %10 aktivite verimi ile immobilize edilmiştir.

%80 (w/v) amonyum sülfat çöktürmesi yapılan selüloz ile oluşturulan mikrokürelerin optimum çalışma sıcaklığı 65 °C, optimum çalışma pH' ise 5,0 olarak belirlenmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen mikroküreler 3 kez ard arda başarılı bir aktivite verimi ile kullanılabilmiştir. Mikrokürelerin daha çok tekrarlı kullanılabilmesi için matriks ya da çapraz bağlayıcı değiştirilerek gerçekleştirilen enkapsülasyon çalışmaları ile niteliklerinin geliştirilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Andriani, D., Sunwoo, C., Ryu, H-W., Prasetya, B., Park, D-H.,** 2012, Immobilization of cellulase from newly isolated strain *Bacillus subtilis* TD6 using calcium alginate as a support material, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35, 29-33 pp.
- Bakare, M.K., Adewale, I.O., Ajayi, A., Shonukan, O.O.,** 2005, Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*, *African Journal of Biotechnology*, 4 (9), 898-904 pp.
- Balakrishnan, K., Kumar, R., Devi, R.A., Jayasri, S., Nishabalu, B.,** 2013, Utilization of fortified rice husk for the fermentative production of xylanase by *Trichoderma sp.*, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2 (9), 174-187 pp.
- Bhat, M.K.,** 2000, Cellulases and related enzymes in biotechnology, *Biotechnology Advances*, 18, 355-383 pp.
- Bıçak Çelem, E.,** 2013, α -galaktozidaz enziminin immobilizasyonu, karakterizasyonu ve endüstriyel proseslerde kullanım potansiyelinin araştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, 1-182 s.
- Bradford, M.M.,** 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254 pp.
- Brena, B.M., Batista-Viera, F.,** 2006, Immobilization of Enzymes, *Immobilization of Enzymes and Cells*, Guisán, J.M. (Ed.), Humana Press, XIV- 450p.-217 illus, 15-30 pp.
- Chew, K.W., Ling, T.C., Show, P.L.,** 2018, Recent developments and applications of three-phase partitioning for the recovery of proteins, *Separation and Purification Reviews*, 1-13 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Costa, S.A., Azevedo, H.S., Reis, R.L.,** 2004, Enzyme immobilization in biodegradable polymers for biomedical applications, *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine- CRC Press LLC*, 301-324 pp.
- Çamurlu, D., Çavuş, S.,** 2015, Termotolerant funguslardan alfa-galaktozidaz izolasyonu, üçlü-faz ayırma tekniği ile saflaştırılması, Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi, 1-51 s.
- Delgado, M.C., Rodríguez, E.F., Vázquez-Garza, J.M.N., Llorens, C.G., López, C.V.,** 2014, Intestinal obstruction caused by recurrent phytobezoar: Resolved with non-surgical treatment with cellulase, *Cirugía Española*, 92 (6), 434-435 pp.
- Dobreva, V., Zhekova, B., Dobrev, G.,** 2019, Use of aqueous two-phase and three-phase partitioning systems for purification of lipase obtained in solid-state fermentation by *Rhizopus arrhizus*, *The Open Biotechnology Journal*, Volume 13, 27-36 pp.
- Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P.,** 2017, Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production, *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1485-1499 pp.
- Duman, (Avcı), Y., Kaya, E.,** 2013, Purification, recovery, and characterization of chick pea (*Cicer arietinum*) β -galactosidase in single step by three phase partitioning as a rapid and easy technique, *Protein Expression and Purification*, 91, 155-160 pp.
- Duman, Y., Kaya, E.,** 2014, Purification and recovery of invertase from potato tubers (*Solanum tuberosum*) by three phase partitioning and determination of kinetic properties of purified enzyme, *Turkish Journal of Biochemistry*, 39 (4), 443-448 pp.
- El-Naggar, N.E.A., Abdelwahed, N.A.M.,** 2012, Optimization of process parameters for the production of alkali-tolerant carboxymethyl cellulase by newly isolated *Streptomyces* sp. strain NEAE-D, *African Journal of Biotechnology*, 11(5), 1185-1196 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gaur, R., Tiwari, S.,** 2015, Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07, *BMC Biotechnology*, 15:19, 1-12 pp.
- Gayá, J., Barranco, L., Llompart, A., Reyes, J., Obrador, A.,** 2002, Persimmon bezoars: a successful combined therapy, *Gastrointestinal Endoscopy*, 55(4), 581-583 pp.
- Hermanson, G.T.,** 1996, Enzyme modification and conjugation, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, Third edition, Chapter 22, 951-957 pp.
- Ketnawa, S., Rungraeng, N., Rawdkuen, S.,** 2017, Phase partitioning for enzyme separation: An overview and recent applications, *International Food Research Journal*, 24(1), 1-24 pp.
- Kramer, S.J., Pochapin, M.B.,** 2012, Gastric phytobezoar dissolution with ingestion of diet coke and cellulase, *Gastroenterology and Hepatology*, 8(11), 770-772 pp.
- Kuhad, R.C., Gupta, R., Singh, A.,** 2011, Microbial cellulases and their industrial applications, *Enzyme Research*, 1-10 pp.
- Laemmli, U.K.,** 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685 pp.
- Lakhundi, S., Siddiqui, R., Khan, N.A.,** 2015, Cellulose degradation: a therapeutic strategy in the improved treatment of *Acanthamoeba* infections, *Parasites and Vectors*, 8:23, 1-16 p.
- Liao, H., Zhang, X-Z., Rollin, J.A., Zhang, Y-H.P.,** 2011, A minimal set of bacterial cellulases for consolidated bioprocessing of lignocellulose, *Biotechnology Journal*, 6, 1-10 pp.
- Liu, Y., Sun, Y., Li, Y., Xu, S., Tang, J., Ding, J., Xu, Y.,** 2011, Preparation and characterization of α -galactosidase-loaded chitosan nanoparticles for use in foods, *Carbohydrate Polymers*, 83, 1162-1168 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, Z., Yu, D., Li, L., Liu, X., Zhang, H., Sun, W., Lin, C.C., Chen, J., Chen, Z., Wang, W., Jia, W.,** 2019, Three-phase partitioning for the extraction and purification of polysaccharides from the immunomodulatory medicinal mushroom *Inonotus obliquus*, *MDPI Molecules*, 24:403, 1-14 pp.
- Megha, S.V., Maragathavalli, S., Brindha, S., Karthikeyan, V., Annadurai, B., Gangwar, S.K.,** 2015, Isolation and purification of cellulase, *International Journal of Science and Nature*, 6 (3), 474-479 pp.
- Menendez, E., Garcia-Fraile, P., Rivas, R.,** 2015, Biotechnological applications of bacterial cellulases, *AIMS Bioengineering*, 2(3), 163-182 pp.
- Miettinen-Oinonen, A.,** 2004, *Trichoderma reesei* strains for production of cellulases for the textile industry, *VTT Publications 550*, Espoo 2004, 1-96 pp.
- Milala, M.A., Shugaba, A., Zanna, H., Appollos, B.,** 2014, Isolation and partial purification of cellulase from *Rhizopus stolonifer*, *ARPN Journal of Science and Technology*, 4(8), 433-438 pp.
- Önal, S., Zihnioğlu, F.,** 2002, Encapsulation of insulin in chitosan-coated alginate beads: Oral therapeutic peptide delivery, *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, 30(3), 229-237 pp.
- Özer, B., Akardere, E., Bıçak Çelem, E., Önal, S.,** 2010, Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato, *Biochemical Engineering Journal*, 50, 110-115 pp.
- Pinos, N., Moreno-Merino, S., Congregado, M.,** 2015, Phytobezoar by aloe vera as long term complication after oesophagectomy resolved using cellulase, *International Journal of Surgery Case Reports*, 2210-2612, 1-3 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Romo-Sánchez, S., Camacho, C., Ramirez, H.L., Arévalo-Villena, M.,** 2014, Immobilization of commercial cellulase and xylanase by different methods using two polymeric supports, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5, 517-526 pp.
- Roy, I., Sharma, A., Gupta, M.N.,** 2005, Recovery of biological activity in reversibly inactivated proteins by three phase partitioning, *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 113-120 pp.
- Sanders, M.K.,** 2004, Bezoars: From mystical charms to medical and nutritional management, *Practical Gastroenterology*, 37-38; 37-50 pp.
- Sethi, S., Datta, A., Gupta, B.L., Gupta, S.,** 2013, Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil, *ISRN Biotechnology*, Article ID: 985685: 1-7 pp.
- Shankar, O., Shrivastava, M.K., Batra, A., Tripathi, V., Gupta, V., Kumar, K.,** 2014, Production, purification, characterization and application of cellulase from *Trichoderma* species, *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 2 (4), 222-239 pp.
- Sukumaran, R.K., Singhanian, R.R., Pandey, A.,** 2005, Microbial cellulases – Production, applications and challenges, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64, 832-844 pp.
- Viet, T.Q., Minh, N.P., Dao, D.T.A.,** 2013, Immobilization of cellulase enzyme in calcium alginate gel and its immobilized stability, *American Journal of Research Communication*, 1(12), 254-267 pp.
- Wang, Y.Y., Ma, H., Yan, J.K., Wang, K.D., Yang, Y., Wang, W.H., Zhang, H.N.,** 2019, Three-phase partitioning system with dimethyl carbonate as organic phase for partitioning of exopolysaccharides from *Phellinus baumii*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 0141-8130, 941-948 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Xu, J., Liu, X., He, J., Hu, L., Dai, B., Wu, B.,** 2014, Enzymatic *in situ* saccharification of rice straw in aqueous-ionic liquid media using encapsulated *Trichoderma aureoviride* cellulase, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90, 57-63 pp.
- Yener, F.,** 2007, Pektinaz enziminin farklı iki destek üzerine immobilizasyonu ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, 1-46 s.
- Zhang, X.Z., Zhang, Y.H.P.,** 2013, Cellulases: Characteristics, sources, production and applications, *John Wiley and Sons, Inc.* Published 2013, 131-146 pp.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca her an görüş ve deneyimlerinden yararlandığım başta danışman hocam Sayın Prof. Dr. Seçil ÖNAL'a, öğretim görevlisi Sn. Dr. Hasan BAYRAKTAR'a, çalışma arkadaşlarım Sn. Burcu HOCA ve Sn. Fatih KIRLANGIÇ'a, laboratuvarını bana açan hocam Sn. Doç. Dr. Serap EVRAN'a, öğretim görevlisi Sn. Burhan BORA'ya ve tüm Biyokimya Bölümü öğretim elemanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin her aşamasında bana destek olan, sabır ve fedakârlık gösteren sevgili aile fertlerim; annem Sevim PINAR ÇAMURLU, babam Mehmet ÇAMURLU ve kardeşim Başak ÇAMURLU'ya ve yanımda olan dostlarıma sonsuz teşekkürler.

DERYA ÇAMURLU

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

- * **İsim:** Derya ÇAMURLU
- * **Doğum tarihi:** 01.01.1992
- * **Tel:** 0544 7375732
- * **E-mail:** camurluderya@gmail.com
- * **Adres:** Rafetpaşa Mahallesi, Bornova-İZMİR.



Eğitim Bilgileri

- * **Lisans:** Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü (2010-2015)
- * **Yüksek lisans:** Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı (2015-2019)

Akademik Kariyer

- * **Lisans bitirme tezi:** Termotolerant Funguslardan Alfa-Galaktozidaz İzolasyonu, Üçlü-Faz Ayırma Tekniği ile Saflaştırılması (2015)
- * **Tübitak 2209/A Projesi:** Termotolerant Funguslardan Alfa-Galaktozidaz Enziminin İzolasyonu, Üçlü-Faz Ayırma Tekniği ile Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (2015)
- * **Sözlü bildiri:** *Aspergillus sp.*'den α -Galaktozidaz Enziminin Üçlü-Faz Ayırma Tekniği ile Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (2015)