

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Selülaz Enziminin Polivinil Alkol Jel İçerisinde
İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu**

Meryem ÖZEL

Kimya Anabilim Dalı

Mayıs, 2024

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAYI

Selülaz Enziminin Polivinil Alkol Jel İçerisinde
İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu

Meryem ÖZEL

Kimya Anabilim Dalı

Bu Yüksek Lisans Tezi 22/05/2024 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Değerlendirilmiş ve Oy Birliği/Oy Çokluğu ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ (Danışman)
: Prof. Dr. Deniz YILDIRIM
: Doç. Dr. Ersin AKGÖLLÜ

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

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

İÇİNDEKİLER

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VI
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler ve Enzimlerin Sınıflandırılması.....	1
1.2. Selüloz Enzimi	2
1.3. Enzim İmmobilizasyonu	6
1.4. Enzim İmmobilizasyonun Avantaj ve Dezavantajları.....	7
1.5. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	7
1.5.1. Kimyasal İmmobilizasyon Yöntemleri	8
1.5.1.a Kovalent Bağlama Yöntemi	8
1.5.1.b. İyonik Bağlama Yöntemi	8
1.5.1.c. Çapraz Bağlama Yöntemi.....	9
1.5.2. Fiziksel İmmobilizasyon Yöntemleri.....	9
1.5.2.a. Adsorpsiyon Yöntemi.....	9
1.5.2.b. Tutuklama Yöntemi (Hapsetme)	9
1.6. Çalışmanın Amacı ve Önemi	13
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	15
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	19
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	19
3.2. Metot	19
3.2.1. Selüloz Enziminin İmmobilizasyonunda Kullanılacak Destek Materyalin Hazırlanması.....	19
3.2.1.a. Polivinil Alkol Çözeltisinin (Jel) Hazırlanması.....	19
3.2.2. Selüloz Enziminin Polivinil Alkol Jelde Tutuklama Yöntemiyle İmmobilizasyonu	20
3.2.3. Protein Tayini.....	20
3.2.4. Serbest ve İmmobilize Selüloz Enziminin Aktivite Tayini	22
3.2.4.a. Serbest Selüloz Enziminin Aktivite Tayini.....	23
3.2.4.b. İmmobilize Selüloz Enziminin Aktivite Tayini.....	24
3.2.5. Serbest ve İmmobilize Selülozın Karakterizasyonu	25

3.2.5.a. Serbest ve İmmobilize Selülozın Optimum pH 'sının Belirlenmesi	25
3.2.5.b. Serbest ve İmmobilize Selülozın Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi	25
3.2.5.c. Serbest ve İmmobilize Selülozın Km ve Vmax Değerlerinin Belirlenmesi.....	25
3.2.5.d. Serbest ve İmmobilize Selülozın Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi	25
3.2.5.e. Serbest ve İmmobilize Selülozların Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi.....	26
3.2.5.f. İmmobilize Selülozın Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi.....	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	29
4.1. Bulgular.....	29
4.1.1. Selüloz Enzim Çözeltilisinde Protein Tayini.....	29
4.1.2. Serbest ve İmmobilize Selüloz Enziminin Karakterizasyonu	30
4.1.2.a. Serbest ve İmmobilize Selülozın Optimum pH Değeri	30
4.1.2.b. Serbest ve İmmobilize Selülozın Optimum Sıcaklık Değeri	33
4.1.2.c. Serbest ve İmmobilize Selüloza Ait Kinetik Parametreler	36
4.1.2.d. Serbest ve İmmobilize Selülozın Termal Kararlılığı	37
4.1.2.e. Serbest ve İmmobilize Selülozın Depolama Kararlılığı	39
4.1.2.f. İmmobilize Selülozın Tekrar Kullanım Kararlılığı	40
4.2. Tartışma	41
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	47
5.1. Sonuçlar	47
5.2. Öneriler	48
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	57

Selülag Enziminin Polivinil Alkol Jel İçerisinde İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu

Meryem ÖZEL

Danışman: Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ

Kimya Anabilim Dalı

ÖZ

Bu yüksek lisans tez çalışmasında *Aspergillus sp.* kaynaklı selülag enziminin jel immobilizasyon yöntemiyle polivinil alkol içerisinde immobilizasyonu araştırılmıştır. Serbest ve immobilize selülagın optimum pH ve sıcaklıkları, kinetik parametreleri, termal ve depolama kararlılıkları ile immobilize selülagın tekrar kullanım kararlılığı belirlenmiştir. Serbest ve immobilize selülag için optimum pH sırasıyla 5,5 ve 5,0 iken optimum sıcaklık ise her ikisi için de 45 °C olarak belirlenmiştir. Optimum koşullar altında serbest selülag için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 168,08 mg/mL ve 22,62 U/mg protein iken immobilize selülag için 39,07 mg/mL ve 5,04 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. Serbest ve immobilize selülagın farklı sıcaklıklarda belirlenen termal kararlılıkları karşılaştırılmış ve serbest selülagın 45 °C'de 24 saat sonunda aktivitesinin %4'ünü, 55 °C'de ise %61'ini, immobilize selülagın ise 45 °C'de aktivitesinin %15'ini, 55 °C'de ise %12'sini kaybettiği tespit edilmiştir. Serbest ve immobilize selülagın depolama kararlılıkları 30 gün boyunca belirli zaman aralıklarında araştırılmıştır. Serbest selülag, 5 °C'de 30 gün sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık %45'ini korurken 25 °C'de yaklaşık %20'sini korumuştur. Immobilize selülagın 5 °C'de 30 gün sonra başlangıçtaki aktivitesinin yaklaşık %48'ini, 25 °C'de ise yaklaşık %30'unu koruduğu tespit edilmiştir. Immobilize selülagın yeniden kullanılabilirliği araştırılmış ve 4. tekrardan sonra bağıl aktivitesinin %50'nin altına düştüğü gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Selülag, İmmobilizasyon, PVA Jel.

**Immobilization and Characterization of Cellulase
Enzyme in Polyvinyl Alcohol Gel**

Meryem ÖZEL

Advisor: Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ

Department Of Chemistry

ABSTRACT

In this thesis study, the immobilization of cellulase enzyme from *Aspergillus sp.* in polyvinyl alcohol by gel immobilization method was investigated. Optimum pH and temperatures, kinetic parameters, thermal and storage stability of free and immobilized cellulase and reuse stability of immobilized cellulase were determined. The optimum pH for free and immobilized cellulase was 5.5 and 5.0, respectively, while the optimum temperature was determined as 45 °C for the both preparations. Under optimum conditions, K_m and V_{max} values for free cellulase were 168.08 mg/mL and 22.62 U/mg protein, respectively, while for immobilized cellulase they were calculated as 39.07 mg/mL and 5.04 U/mg protein. Thermal stabilities of free and immobilized cellulase determined at different temperatures were compared and it was seen that free cellulase retained 4% of its initial activity at 45 °C and 61% of its initial activity at 55 °C after 24 hours. The immobilized cellulase retained 15% of its initial activity at 45 °C and 55% of its initial activity at 55 °C. It has been determined that it loses 12% of its initial activity at 55 °C. Storage stabilities of free and immobilized cellulase were investigated at specific time intervals for 30 days. Free cellulase retained approximately 45% of its initial activity after 30 days at 5 °C, while it retained approximately 20% of its initial activity at 25 °C. The immobilized cellulase retained approximately 48% of its initial activity after 30 days at 5 °C and approximately 30% of its initial activity at 25 °C. The reusability of immobilized cellulase was investigated and initial activity of immobilized cellulase decreased below 50% after four reuses.

Keywords: Cellulase, Immobilization, PVA Gel.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım süresince yanımda olup bilgisi ve tecrübesiyle beni yalnız bırakmayan, sorularım ve sorunlarım karşısında bana rehberlik edip tercihlerimi zenginleştiren, çalışmalarım esnasında karşılaştığım zorluk ve olumsuzluklar karşısında umudumu diri tutmamı sağlayan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tezimin hız kazanmasında, ana hatlarıyla şekil almasında ve çalışmalarımın tıkandığı noktalarda fikir, bilgi ve deneyimleri ile bana çeşitli yollar gösterip en doğru yolu tercih etmem konusunda yolumu aydınlatan hocam Prof. Dr. Deniz YILDIRIM'a sonsuz teşekkür ederim.

Zorlandığım birçok noktada bilgi ve deneyimleriyle seçeneklerimi artırıp zenginleştiren, destekleriyle yanımda olan Prof. Dr. Dilek ALAGÖZ ve Öğr. Gör. Ali TOPRAK hocalarıma sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezimin her adımında, gecesinde veya gündüzünde ister uzaktan isterse yüz yüze olsun ihtiyacım olduğu her an fikir, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, yanımda olup yardım ve önerileri ile beni yalnız bırakmayan, adeta bir ilaç gibi bana iyi gelen, üzerimde büyük bir emeği olan sevgili hocam Arş. Gör. Nazlı Ece VARAN FAKI' ya sonsuz teşekkür ederim.

Hayatımı varlıklarıyla zenginleştiren annem Esma ÖZER ve babam Muzaffer ÖZER'e, hayatımı zorlaştırmayıp her zaman kolaylaştıran, anlamlandıran eşim Erkan ÖZEL'e ve çalışmalarım esnasında beni anlayışla karşılayıp çalışmam için bana fırsat tanıyan sekiz yaşındaki oğlum Yusuf Emir ÖZEL'e sonsuz teşekkür ederim.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Enzimlerin sınıflandırılması: Hidrolazlar (Gözükara, 2001)	2
Çizelge 3.1 Serbest selüloz enziminin aktivite tayininde izlenecek deney adımları	24
Çizelge 3.2 İmmobilize selüloz enziminin aktivite tayininde izlenecek deney adımları	24
Çizelge 4.1 Serbest selülozın pH 'ya bağlı aktivite değişim çizelgesi	30
Çizelge 4.2 İmmobilize selülozın pH 'ya bağlı aktivite değişim çizelgesi	31
Çizelge 4.3 Serbest ve immobilize selülozların bağıl aktivitelerinin pH 'ya bağlı değişiminin birlikte gösterimi	32
Çizelge 4.4 Serbest selülozın sıcaklığa bağlı aktivite değişim çizelgesi	34
Çizelge 4.5 İmmobilize selülozın sıcaklığa bağlı aktivite değişim çizelgesi	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Selüloz (β -D glikoz polimeri) ($C_6H_{10}O_5$) _n	3
Şekil 1.2 Karboksimetil selülozun elde edilme yöntemi.....	4
Şekil 1.3 Selülozun selülaz enzimleri ile hidrolizi.....	4
Şekil 1.4 <i>Aspergillus sp.</i> nin mikroskoptaki görüntüsü (Anonymous1)	5
Şekil 1.5 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	8
Şekil 1.6 Polivinil alkolün (PVA) kimyasal yapısı.....	10
Şekil 1.7 Vinil alkol (enol)-Asetaldehit (keto) tautomerisi.....	11
Şekil 1.8 Poli (vinilasetat)ın hidrolizi sonucu poli (vinilalkol) eldesi.....	11
Şekil 1.9 Bir hidrojelde fiziksel dolanmalar (Peppas ve Hoffman, 2020).	12
Şekil 3.1 Selülazın PVA jelde immobilizasyonu sonucu oluşturulan jel damlacıkları	20
Şekil 3.2 DNSA yönteminin etki mekanizması (Anonymous2)	23
Şekil 4.1 Bovine Serum Albumin (BSA) standart protein grafiği	29
Şekil 4.2 Serbest selülazın optimum pH grafiği.....	31
Şekil 4.3 İmmobilize selülazın optimum pH grafiği.....	32
Şekil 4.4 Serbest ve immobilize selülazların optimum pH 'larının birlikte gösterim grafiği	33
Şekil 4.5 Serbest selülaz enzimi optimum sıcaklık grafiği	34
Şekil 4.6 PVA ile immobilize edilmiş selülaz enzimler için optimum sıcaklık grafiği	35
Şekil 4.7 Serbest ve immobilize selülazların optimum sıcaklıklarının birlikte gösterimi.....	35
Şekil 4.8 Serbest selülaz için Lineweaver-Burk grafiği.....	36
Şekil 4.9 PVA ile immobilize edilmiş selülaz için Lineweaver-Burk grafiği.....	37
Şekil 4.10 Serbest selülaz aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimi.....	38
Şekil 4.11 İmmobilize selülaz aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimi	38
Şekil 4.12 Serbest ve immobilize selülaz aktivitesinin 55 °C' de inkübasyon süresine bağlı değişimi	39
Şekil 4.13 Serbest selülazın 5 ve 25 °C'deki depolama kararlılığı.....	39
Şekil 4.14 İmmobilize selülazın tekrar kullanım kararlılığı.....	40

SİMGELER VE KISALTMALAR

$^{\circ}\text{C}$	:Santigrat Derece
%	:Yüzde
BSA	:Bovin Serum Albumin (Sığır Serum Albumin)
CMC	:Karboksimetil selüloz
dk.	:Dakika
DNSA	:Dinitrosalisilik asit
G	:Gram
kcat	:Turnover katsayısı (dk^{-1})
kDa	:Kilodalton (atomik kütle birimi)
Km	:Michealis Menten Hız Sabiti (mg/mL)
kcat/Km	:Katalitik etkinlik ($\text{dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}.\text{mL}$)
μmol	:Mikromol
M	:Molar
μM	:Mikromolar
μL	:Mikrolitre
mg	:Miligram
mL	:Mililitre
L	:Litre
pH	: H^{+} iyonu konsantrasyonu
PVA	:Polivinil alkol
[S]	:Substrat Konsantrasyonu
U	:Enzim Ünitesi ($\mu\text{mol}.\text{dk}^{-1}$)
UV-Vis	:Ultraviyole spektrofotometre
%w/v	:Ağırlıkça yüzde
Vmax	:Enzimin Ulaşabileceği Maksimum Hız ($\mu\text{mol}.\text{dk}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$)

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler ve Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Hücre içinde ve hücre dışında sentezlenen enzimler aktivasyon enerjisini düşürerek hücre içerisindeki reaksiyonların hızlanmasını sağlamaktadırlar (Zoppas ve ark., 2013). Enzimler olmaksızın çoğu reaksiyon biyolojik sistemlerde var olandan daha yüksek sıcaklık ve enerji düzeylerine ihtiyaç duyarlar (Lerner ve Lerner, 2003).

Enzimler aktif bölge olarak adlandırılan yapılarındaki bölgelerde özel katlanmalarla substratlara bağlanırlar. Bir enzimin aktif bölgesi iki anahtar bölge içerir. Birincisi reaksiyon boyunca substrat ile etkileşim içinde olan bölge, diğeri ise enzimin kimyasal gruplarının substratla etkileşmesini sağlayan bağlanma bölgesidir (Lerner ve Lerner, 2003). Substratlar, enzime özgü olup enzim ile bir araya geldiğinde ürün oluşturabilen ve enzimle olan büyük uyumu sayesinde enzime bağlanıp enzimin katalitik etkinliğini yerine getirmesini sağlayan maddelerdir. Günlük hayatımızda birçok alanda kullanıma sahip olan enzimleri tanıyabilmek ve sahip oldukları özellikleri daha rahat ortaya koyabilmek amacıyla enzimler üzerinde çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır.

Uluslararası Biyokimya Birliği (International Union of Biochemistry) tarafından yeni keşfedilen ve sayıları günden güne artan enzimler için yeni bir adlandırma ve sınıflandırılma oluşturulmuştur. Sınıflandırma yapılırken bazı prensip ve kurallara sadık kalınmıştır. Bu prensipler aşağıda sıralanmıştır. Sistematik isim mümkün olduğu kadar kurallara uyularak ve enzimin gerçek katalitik faaliyetlerini yansıtacak şekilde verilmelidir. Sınıflandırmada enzimlere 4 numara verilmektedir. 1-İlk numara enzimin altı sınıftan hangisine ait olduğunu belirlemektedir. 2-İkinci numara etki ettiği kimyasal yapıyı ve fonksiyonel grubu belirlemektedir. 3-Üçüncü numara akseptörü belirlemektedir. 4-Dördüncü numara belli bir sınıfta enzimin aldığı sıra numarasıdır (Gözükara, 2001). Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından oluşturulan enzim komisyonu, belirtilen bu kurallara uygun olacak şekilde enzimlerin etki ettikleri reaksiyon mekanizmalarını da dikkate alarak her enzim için dört rakamlı "E.C" kodları tanımlamıştır.

Enzimlerin sınıflandırılması kimyasal tepkime doğasına göre altı ana kategoriye ayrılmıştır (Carr ve Bowers, 1980):

1. Oksidoredüktazlar, substrat oksidasyonunu veya indirgenmesini katalize ederler.
2. Transferazlar, katalizör grubu transferini sağlarlar.
3. Hidrolazlar, su ilavesi ile bağ kırılmasını katalize ederler.
4. Liyazlar, aktif grupların substratlarından ayrılmasını sağlarlar.
5. İzomerazlar, intramoleküler (molekül içi) yeniden düzenlemeleri katalize ederler.
6. Ligazlar, kimyasal bağ yaparak, iki molekülün birleşmesini sağlarlar.

E.C kodlarına göre; E.C.1 kodu oksidoredüktazları, E.C.2 kodu transferazları, E.C.3 kodu hidrolazları, E.C.4 kodu liyazları, E.C.5 kodu izomerazları ve E.C.6 kodu ise ligazların tanımlanmasında kullanılmaktadır.

1.2. Selüloz Enzimi

Selülozlar, selülozu parçalayan enzimlerdir. Biraz daha özelleştirilirse selüloz, selülozun yapısındaki β -1,4 glikozidik bağlarına etki edip C-O bağlarını parçalayan ve bu parçalama işlemi su kullanarak gerçekleştirebilen bir sindirim enzimidir. Selüloz enzimi, bağ kırılmasını su kullanarak katalizlemesi nedeniyle hidrolazlar sınıfı içinde incelenmektedir. Günümüzde kullanılan adlandırma sistemine göre selülozlar, hidrolazlar sınıfı içerisinde yer aldığı için EC.3 ve glikozid bağlarını hidrolizlediği için ise EC.3.2 olacak şekilde glikozid bağlarını hidrolizleyenler (glikozid hidrolazlar) olarak tanımlanır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1 Enzimlerin sınıflandırılması: Hidrolazlar (Gözükara, 2001)

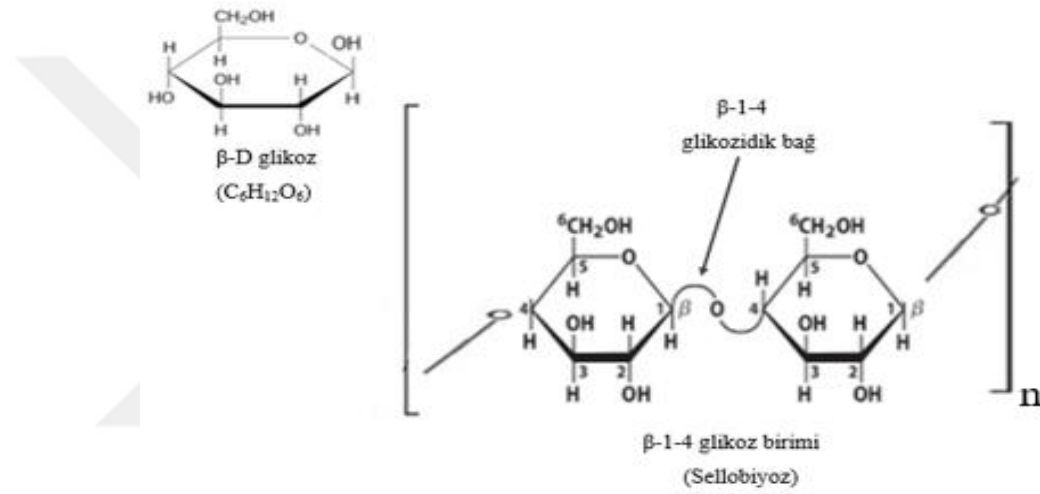
3.Hidrolazlar	Hidroliz reaksiyonlarını katalizler
EC.3.1	Esterleri hidrolizleyenler
EC.3.2	Glikozid bağlarını hidrolizleyenler
EC.3.3	Ester bağını hidrolizleyenler
EC.3.4	Peptid bağını hidrolizleyenler
EC.3.5	Diğer C-N bağlarını hidrolizleyen
EC.3.6	Asit anhidritlerini hidrolizleyenler
EC.3.7	Karbon – Karbon bağına etkilidirler
EC.3.8	Klor ile meydana gelmiş tuzlardaki bağa etkilidirler
EC.3.9	Fosfor-Kükürt bağına etkilidirler
EC.3.10	Kükürt-Azot bağına etkilidirler
EC.3.11	Karbon-Fosfor bağına etkilidirler

Glikozid hidrolazlar enzim grubunda yer alanlardan O- ve S-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler de EC.3.2.1. alt sınıfında bulunmaktadır (Henrissat, 1991; Henrissat ve Davies, 2000).

Enzimatik hidroliz, enerjinin idareli kullanılması ve toksik maddelerin veya aşındırıcı asitlerin kullanılmasına ihtiyaç bırakmamasından dolayı oldukça avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle selülozun, selüloz enzimi ile hidrolizi yaygın şekilde araştırılan bir konu haline gelmiştir. Selüloz enziminin, selülozun yüzeyine yapıştığı ve substrat boyunca hareket ederek bir takım katalitik reaksiyonları gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Enzimin, substrattan ayrılarak ve substratın başka bir bölgesine yapıştığı ve bu şekilde katalitik aktivitesini gösterdiği bilinmektedir (Haliskaranfil, 2012).

Selüloz, suda çözünmeyen selülozu katalitik bir etkinlik sonucu parçalayarak suda çözünür daha küçük parçalara dönüştürebilen bir enzimdir. Selülazın, selüloz üzerindeki katalitik etkinliği polisakkarit yapıları bir karbonhidrat türü olan selülozun yapısı incelendiğinde daha net anlaşılmaktadır.

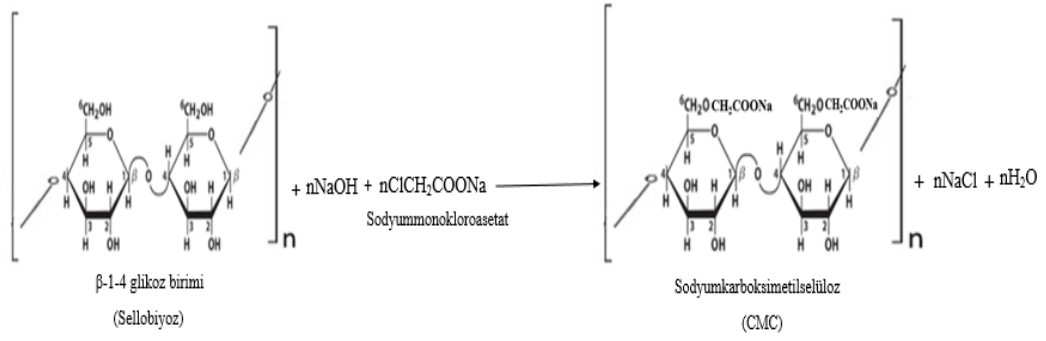
Selüloz, β -1-4 glikozidik bağlarla bağlanmış β -1-4 glikoz birimlerinden oluşan dalsız bir glikoz polimeridir (Hendriks ve Zeeman, 2009). Selüloz yapısını oluşturan ve sellobiyoz olarak da bilinen β -1-4 glikoz birimleri ise iki adet anhidroglikoz biriminden oluşmaktadır. Anhidroglikoz birimleri ($C_6H_{10}O_5$), glikoz yapısından ($C_6H_{12}O_6$) bir molekül suyun uzaklaşması ile meydana gelmiştir. Selülozun kimyasal aktifliği büyük ölçüde anhidroglikoz birimleri üzerinde bulunan hidroksil fonksiyonel grupları ile ilişkilidir. Şekil 1.1’de selüloz yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.1 Selüloz (β -D glikoz polimeri) ($C_6H_{10}O_5$)_n

Selüloz öncelikle orman kaynaklarından, odunsu olmayan lignoselülozlar (kenevir, keten, jüt, rami, kenaf ve pamuk) ile tarımsal atık ve/veya yan ürünlerden (mısır koçanı, pirinç kabuğu ve şeker kamışı küspesi) elde edilir (Ng ve ark., 2015). Selüloz, bitkisel kaynakların yanı sıra tek hücreli planktonlar, yosunlar, mantarlar, bakteriler gibi çok çeşitli kaynaklardan da elde edilebilir.

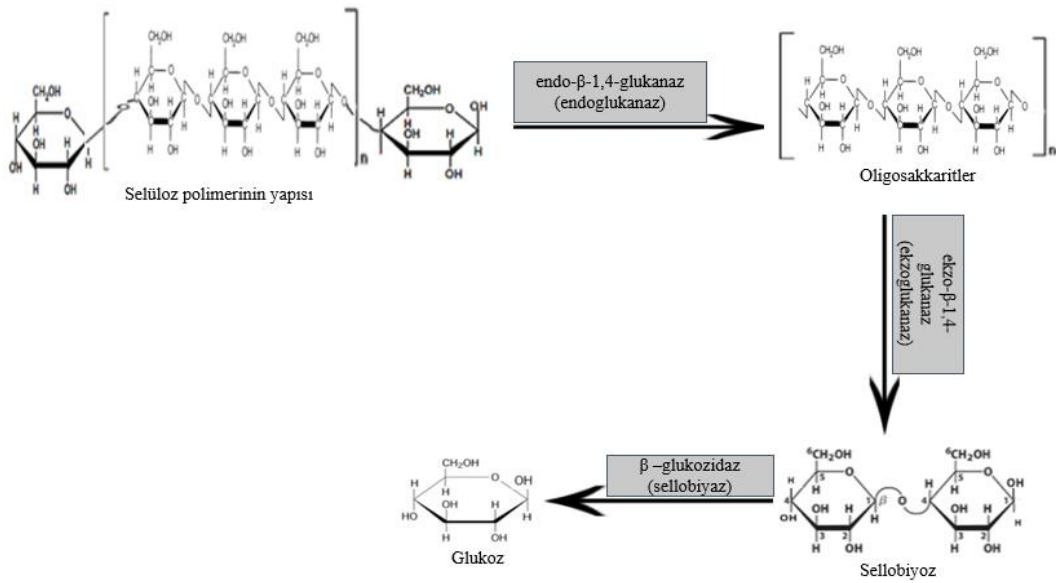
Selülozun suya karşı yüksek çekiciliği olmasına rağmen, suda hiç çözünmez (Niehaus ve ark., 1999). Çalışmada substrat olarak kullandığımız CMC (Karboksimetil selüloz) ise bir selüloz türevi olmasına rağmen sıcak ya da soğuk suda çözünür özellik gösterebilen bir polimerdir. CMC'nin suda çözünür özellik kazanması selülozdan elde edilmesi sırasında eterleştirilmesi ile ilişkilidir. Eterleştirme tepkimeleri sonucunda suda çözünebilen karboksil grubu içeren bir selüloz eteri elde edilmiştir. CMC, selüloz kullanılarak farklı tekniklerle hazırlansa da CMC eldesinde en yaygın kullanılan tekniklerden biri selülozun sodyum hidroksit çözeltisi içerisinde sodyummonokloroasetat ile reaksiyonu sonucu (Şekil 1.2) hazırlanmasıdır. CMC, aslında sodyum karboksimetil selülozdur ve sodyum tuzu olarak tanımlanır.



Şekil 1.2 Karboksimetil selülozun elde edilme yöntemi

Selülaazlar, selülozu oligasakkaritler veya sellobiyoz veya beta glikoz (basit şeker) şeklinde hidroliz sonucu parçalayabilmektedir. Bu sebeple selüloz substratı üzerinde katalitik etkinliği olan selülaazı tek bir enzim gibi düşünmek yerine substratın farklı bölgelerinde etkinlik gösteren ve farklı yapıları sahip bir enzim ailesi ya da enzim grubu gibi düşünmek daha doğru olabilir. Gösterdikleri katalitik etkinliklerine göre bu enzim ailesine ait üç farklı selülaaz türü olan endo- β -1,4-glukanaz (endoglukanaz veya endoselülaaz veya karboksimetil selülaaz), ekzo- β -1,4-glukanaz (sellobiyohidrolaz veya ekzoselülaaz) ve β -glukozidaza (β -1,4-glukozidaz veya sellobiyaz) ait katalitik etkinlikler şu şekilde incelenebilir:

Selülozun yıkımından sorumlu enzimler; selüloz zincirindeki iç bağları rastgele kıran endo- β -1,4-glukanaz (E.C. 3.2.1.4), selüloz polimerinin ucundaki indirgen ya da indirgen olmayan kısımlara saldıran ekzo- β -1,4-glukanaz (E.C. 3.2.1.91), endo ve ekzo-glukanaz karışımının ana ürünü olan sellobiyozu glikoza dönüştüren β -glukosidaz (E.C. 3.2.1.21) olmak üzere üç sınıfta toplanmaktadır (Horn ve ark., 2012).

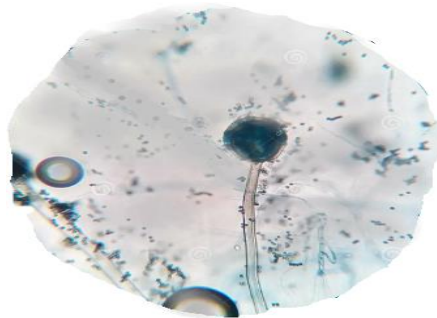


Şekil 1.3 Selülozun selülaaz enzimleri ile hidrolizi

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman, 1985). Selülozın yüksek spesifikliği, toksisitesinin olmaması, biyobozunur olması ve optimum pH, sıcaklık, basınç gibi özelliklerinin ılımlı aralıklarda olması selülozın inorganik katalizörlere göre daha avantajlı olmasını sağlamaktadır (Hegedüs ve ark., 2012). Selülozlar sahip oldukları bu avantajlardan dolayı gıda, yem, tekstil, kâğıt, deterjan, biyoyakıt, bira ve şarap endüstrisi gibi birçok alanda en çok tercih edilenler arasındadır.

Son zamanlarda selüloolitik enzimler, meyve sularının berraklaştırılması işlemlerinde, kumaşlarda parlaklığın sağlanması ve yumuşaklığın elde edilmesi için deterjanlarda, kotların biyo taşlanmasında, endüstriyel atıkların ön işleminde ve yemlerin kalitelerinin artırılması gibi çok çeşitli uygulamalarda kullanılma konusunda büyük bir yer bulmuştur (Haki ve Rashit, 2003). Endüstriyel alanda çok talep gören ve önemli bir yere sahip olan selülozın elde edilişi ise çeşitli yollarla sağlanabilmektedir.

Selüloz üretiminde kullanılan mikroorganizmalar; bazı anaerobik bakteriler (örn; *Clostridium thermocellum*), aerobik bakteriler ve mantarlar (*Trichoderma reesei*, *Aspergillum niger*)’dır (Zhang ve Lynd, 2004; Yavaş, 2010). Mantarlardan üretilen selülozın, mantarların gelişim hızlarının yavaş olması nedeniyle maliyeti yüksektir. Bunun yanı sıra mantarlar kolay saflaştırma ve ayırım için yetiştirme ortamına salınacak bol miktarda selüloz ve hemiselüloz üretme kapasitesine sahiptirler. Mantarların uzamış lifleri selüloz yapısı üzerine mekanik baskı oluşturarak selülozın bol miktarlarda üretilmesine yardımcı olmaktadır (Pandit ve Maheshwari, 2012). Kullanım alanlarının geniş bir alana yayılması sebebiyle endüstri alanında çok büyük bir öneme sahip olan selüloz enziminin elde edilişi, sağladığı avantajlardan dolayı genellikle “*Aspergillus* ve *Trichoderma*” mantar türlerinden sağlanmaktadır. Selüloz kaynağı olarak çalışmamızda “*Aspergillus sp.*” den elde edilen selüloz kullanılmıştır. Birçok türü bulunan aspergillus, saprofit özellikte bir küf mantarı türüdür. Aspergillus türleri: *Aspergillus candidus*, *aspergillus flavus*, *aspergillus niger*, *aspergillus terreus*, *aspergillus fumigatus*, *aspergillus penicilloides*, *aspergillus nidulans*, *aspergillus sp. vb.*



Şekil 1.4 *Aspergillus sp.* nin mikroskoptaki görüntüsü (Anonymous1)

Aspergillus, dünyanın her yerine yayılmış ortalama 200 küf mantarı türünden oluşmuş bir cinstir. Yuvarlak hücrelerden oluşmuş mayalardan değişik olarak, aspergillus türleri hif olarak isimlendirilen hücre zincirlerinden oluşan ipliksi mantar türleridir. Doğada saman ve çürüyen bitki artıklarında yaşarlar. Aspergillus türleri aerobiktirler ve bol oksijenli hemen her ortamda rastlanırlar. Mantarlar genel anlamda bol karbonlu yüzeylerde, glukoz gibi monosakkaritler ile büyümelerine rağmen aspergillus amilaz enzimleri salgılamış olduğu için nişasta gibi polisakkaritleri de kullanabilir. Bu yüzden Aspergillus türleri ekmek ve patates gibi nişastalı yiyeceklerin bozulmalarında sık sık görülür, ek olarak çoğu bitki ve ağaç üstünde de büyürler. Glukoz, früktoz, maltoz ve nişasta gibi karbon kaynakları ile büyüebilmelerinin yanında çoğu aspergillus türü gıda maddelerinin çok düşük konsantrasyonda olduğu veya diğer organizmaların kullanmamış olduğu besin kaynaklarının olduğu ortamlarda da gelişme yeteneğine sahiptir (Hu ve ark., 2014).

1.3. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimlerin doğal ortamlarında kullanımlarına kıyasla endüstriyel alanlardaki kullanımlarında birçok zorluk ortaya çıkmaktadır. Endüstriyel alandaki kullanımı sırasında serbest halde bulunan bir enzimin çevre koşullarının değişimine karşı kararlı yapısının sürdürülebilirliği ve aktivitesinin korunması, uzun süreli çalışmalarda birkaç kez kullanımı, istenildiği zaman ortamdan uzaklaştırılabilmesi, istenilmeyen yan ürünlerin oluşumunun engellenmesi gibi durumların sağlanabilmesi oldukça zordur.

Yüksek sıcaklıklarda çalışabilmek özellikle sanayi alanında büyük bir öneme sahiptir. “Örneğin, tekstil endüstrisinde pamukların biyo parlatılması işlemlerinde 100 °C’ye yakın sıcaklıkta stabil selülozlara gereksinim duyulmaktadır (Haki ve Rakshit, 2003).” Sıcaklık artışı reaksiyon hızının artmasını ve ortamdaki bileşiklerin çözünürlüğünü artırıp viskozitelerinin düşmesini sağlamaktadır. Reaksiyon ortamında sıcaklık artışıyla birlikte ortama enzim eklenmesi aktivasyon enerjisinin enzim tarafından düşürülmesini sağladığı için reaksiyon hızının artmasına çok önemli bir fayda sağlamaktadır. Enzimin bulunduğu böyle bir ortamda optimum düzeyde bir sıcaklık artışı sağlanmak zorundadır çünkü her enzim yüksek sıcaklıklara dayanıklı değildir. Enzimler ile katalizlenen reaksiyonlarda optimum düzeyde bir sıcaklık artışı reaksiyon hızında olduğu gibi enzim üzerinde de olumlu bir etki gösterirken belli bir sıcaklık düzeyinden sonra enzim bozulmaya başlar. Enzimin bozulmasıyla da reaksiyon hızında önemli bir düşüş gözlenir. Eğer sıcaklık daha da artırılacak olursa enzim tamamen bozulabilir. Bu sebeple enzimlerin bulunduğu ortamlarda uygun sıcaklık artışı sağlanması gerekmektedir ya da bu şartlara enzim dayanıklılığının artırılması gerekmektedir. Özellikle endüstri gibi alanlarda bu şarttır.

Endüstriyel uygulamalarda kullanılan enzimlerin aktivitesini kaybetmesi sonucu maddi kayıplar meydana gelmektedir. Maliyeti en aza indirmek için enzimlerin kararlılıklarının

sürdürülebilirliği, tekrar kullanılabilirliği ve depolama kararlılığı (raf ömrü) gibi parametrelerin iyileştirilmesi önemlidir (Ahmad ve Sardar, 2015).

Katalitik tepkimelerde enzimler için şartlar uygun olsa bile yüksek sıcaklık, yüksek veya düşük pH ve organik/inorganik çözücülerin varlığında enzimler aktifliklerini kolaylıkla kaybedebilirler. İmmobilizasyon işlemi ile birlikte, enzimlerin ekonomik açıdan kullanılabilirliğini sağlamak mümkündür (Yetim ve ark., 2019). İmmobilizasyon işlemleri ile enzimlerin yüksek sıcaklık, yüksek veya düşük pH gibi şartlara dayanıklılığı, tekrar kullanılabilirliği artırılmak istenmiş ve bu amaçla enzimler bir destek maddesine tutturulmaya çalışılmıştır. Enzim, destek materyaline tutturularak immobilize edilebilmiştir.

İmmobilize enzim “enzimin kinetik aktivitesini kaybetmeden belli bir bölgeye fiziksel olarak yerleştirilmesi veya hapsedilmesi (Saieb ve ark., 2015)” ile elde edilir. Bu şekilde elde edilen enzime immobilize enzim denir. İmmobilizasyon ise şu şekilde tanımlanabilir: “İmmobilizasyon kelime anlamı olarak, tutuklanmış, hareketi sınırlandırılmış, çözünmez hale getirilmiş demektir. Enzim immobilizasyonu, katalitik proseslerde enzim moleküllerinin katalitik aktifliğini koruyarak tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla bir destek maddesine fiziksel veya kimyasal tutturulması olarak ifade edilebilir (Köse, 2010).”

1.4. Enzim İmmobilizasyonun Avantaj ve Dezavantajları

İmmobilize enzimlerin immobilizasyon esnasında enzim aktivitesinin azalması ve enzim destek materyallerinin maliyetinin yüksek olması ve difüzyon sınırlamaları gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır (Durante ve ark, 2004). Ayrıca serbest enzime göre daha düşük aktivite de sergileyebilmektedirler. İmmobilize enzimlerin bu tür dezavantajları olmasına rağmen serbest enzim karşısında zamanla daha çok tercih edilmesini sağlayan üstünlükleri de bulunmaktadır.

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre üstünlükleri ise şu şekilde sıralanabilir: Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme vb.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz. Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vs.) karşı daha dayanıklıdır. Sürekli işlemlere uygulanabilirler. Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir. Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur. Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir. Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır. Karıştırma, çalkalama gibi çalışmalar (mekanistik) için uygundur (Coşkun, 2007). İmmobilizasyon işlemi sırasında kullanılan destek materyallerin genellikle maliyetleri yüksektir fakat immobilizasyon ile enzimin birçok kez üst üste kullanımı gerçekleştirilebildiği takdirde maliyetin düşmesinde de fayda sağlanabilir.

1.5. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Serbest hareket eden enzimlerin çözücü içinde sabit hale getirilmesi kavramı 1916 yılında ortaya çıkmıştır. Invertaz, 1916 yılının sonlarında kömür ve alüminyum hidroksit gibi matrikslere

immobilize edilen ilk enzimdir. İmmobilize invertaz, serbest hali ile benzer bir aktivite göstermiş ve bu bulgu mevcut enzim immobilizasyon tekniklerinin temelini oluşturmuştur (Fersht, 1999). Enzimlerin katalitik potansiyellerinden maksimum bir şekilde yararlanabilmek için, en uygun immobilizasyon yönteminin belirlenerek şartların optimize edilmesi gerekmektedir. Her enzim için ideal taşıyıcı ve immobilizasyon yöntemi seçiminde bilimsel standartların oluştuğunu söylemek mümkün değildir. Taşıyıcı ve immobilizasyon yöntemi seçilirken hem immobilize enzimin karakteristikleri ve kullanılacağı alan hem de seçilen yöntem ile taşıyıcı kombinasyonunun sınırlamalarının ve özelliklerinin uyumuna dikkat edilmelidir (Önal, 2000). Enzim immobilizasyon yöntemleri şu şekilde belli başlıklar altında toplanabilir:



Şekil 1.5 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

1.5.1. Kimyasal İmmobilizasyon Yöntemleri

1.5.1.a Kovalent Bağlama Yöntemi

Kovalent bağlanma yöntemi, yüzeydeki fonksiyonel gruplar ile enzimlere ait olan aminoasitlerin fonksiyonel grupları arasında kovalent bağ oluşumuna dayanır. Lizin amino grupları (NH_2), aspartik asidin veya glutamik asidin karboksil grubu (COOH), serin veya treoninin hidroksil grubu (OH) ve sisteinin sülfidril grubu (SH), kovalent bağ oluşumunda rol oynamaktadır ve genellikle reaksiyon, amino ve karboksil grupları arasında gerçekleşmektedir. Kovalent bağlanma koşulları, enzimlerin kararlılığıyla uyumlu olarak belirlenmelidir (Bickerstaff, 1997; Çınar, 2009).

1.5.1.b. İyonik Bağlama Yöntemi

İyonik bağlanma yöntemi, enzim proteinlerinin suda çözünmeyen taşıyıcılara iyonik bağlanmasına dayanır. Polisakkaritler ve iyon değişim merkezlerine sahip sentetik polimerler genellikle destek materyali olarak kullanılırlar. Bir enzimin iyonik bağlanma yöntemiyle destek materyaline bağlanması kovalent bağlanma yöntemine göre daha ılımlı koşullar altında gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle, iyonik bağlanma yöntemi enzimin konformasyonunda ve enzimin aktif bölgesinde daha az değişikliklere neden olmaktadır. Böylelikle bu yöntemde, immobilize enzimler daha yüksek aktivite gösterirler. İyonik bağlanmada yüksek iyonik şiddete

sahip substrat solüsyonlarında veya pH değişimine bağlı olarak taşıyıcıdan enzim sızıntısı ortaya çıkabilir. Bunun nedeni, enzim proteinleri ve taşıyıcılar arasındaki bağın kovalent bağlamaya göre daha zayıf olmasıdır (Çetin, 2007).

1.5.1.c. Çapraz Bağlama Yöntemi

Çapraz bağlama yönteminde immobilizasyon, proteinlerin çözünmeyen destek matrisindeki proteinlere veya fonksiyonel gruplara moleküller arası çapraz bağlanmasıyla sağlanır. İki ve daha çok fonksiyona sahip bileşikler, enzimlerin molekülleri arasına çapraz bağlanmayı sağlayan maddeler olarak kullanılır (Özçömlekçi, 2006). Çapraz bağlama derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif derişimine, pH'a ve immobilize edilecek enzime oldukça bağımlıdır. Çapraz bağlama yönteminin dezavantajları; çapraz bağlama reaksiyonun kontrolünün zor olması, enzimin aktivite kaybına uğramasının kolay olması ve fazla miktarda enzime ihtiyaç duyulmasıdır (Sürmelioglu, 2014).

1.5.2. Fiziksel İmmobilizasyon Yöntemleri

1.5.2.a. Adsorpsiyon Yöntemi

Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Taşıyıcı ile enzim arasında tersinir yüzey etkileşimleri ile oluşur. Moleküller arasında van der Waals, iyonik ve hidrojen bağı gibi güçler etkindir (Aybastier, 2010). Yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın (aktif karbon, gözenekli cam, kül, silikajel, CaCO₃, nişasta, gluten gibi) enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkanarak ortamdaki uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır (Klibanov, 2001). Yöntemin, basit, hızlı ve ucuz olması, taşıyıcının tekrar tekrar kullanılabilmesi gibi avantajları vardır. Optimum koşulların belirlenmesindeki zorluk, enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma olmaması durumunda enzimin serbest hale geçerek reaksiyon ortamında ürünleri kirlenmesi gibi dezavantajları vardır (Öztürk ve ark, 2007).

1.5.2.b. Tutuklama Yöntemi (Hapsetme)

Tutuklama işlemleri sırasında enzim moleküllerinin polimer matris içindeki kafeslerde veya yarı geçirgen membranlar içinde veya mikrokapsülleme ve misellerde tutulması sağlanır. Bu metotta enzim molekülleri çözeltide serbest olup jelin kafes yapısı tarafından sadece hareketi kısıtlanmıştır. Jel kafesin geçirgenliği enzim veya hücrelerin kaçışını önleyecek, ancak aynı zamanda substrat ve ürünün serbest hareketine izin verecek kadar sıkı bir yapı oluşturularak kontrol edilir (Uluğ, 2011). Bu yöntemin çapraz bağlanma ve kovalent bağlanmadan en önemli farkı enzimin çözeltide serbest olması, ama jel matris ya da membran içerisinde tutularak hareketinin kısıtlanmasıdır (Bickerstaff, 1997).

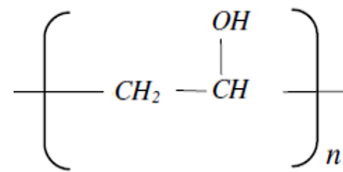
Tutuklama metodu değerlendirildiğinde en büyük avantajının sadece tek bir enzimin değil çoklu enzimlerin, hücreler ve organellerin ve sağlam ya da işlem görmüş hücrelerinde immobilize

edilebilmesine olanak tanınması olduğu söylenebilir. Bunun aksine sahip olduğu dezavantajları arasında ise yüksek molekül kütlesine sahip substratların tutuklanan biyokatalizöre ulaşmasının zorluğu ve taşıyıcının yenilenmesinin zorluğu yer almaktadır. Tüm tutuklama metodları arasında en çok tercih edilen ve kullanılan method kafes tipidir (Lee ve ark, 2009). Kafes tipi tutuklama, suda çözünmeyen çapraz bağlı polimerin boşluklarında enzimin tutuklanmasıdır. Poliakrilamid, polivinilalkol vb. bazı sentetik polimerler ve nişasta gibi doğal polimerler, bu teknikle immobilize enzim hazırlanmasında kullanılmaktadırlar (Polat, 2007).

Mikrokapsül şeklinde immobilizasyon, biyokatalizörün bir yarı geçirgen sentetik polimerin mikrokapsülleri içinde tutuklanmasını esas alır. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1 ile 100 µ arasında değişkenlik göstermektedir. İmmobilizasyonda kullanılacak olan yarı geçirgen membranın, gözenek çapları, substrat moleküllerinin kapsül içerisine girmesine ve ürünlerin dışarı çıkmasına müsaade edecek bir büyüklükte olması gerekir. Bu yöntem kullanılarak gerçekleştirilen İmmobilizasyonun verimliliği substrat moleküllerinin küçük olması ile doğru orantılı şekilde artar. Biyokatalizör immobilizasyonu bu yöntem kullanılarak iki şekilde gerçekleştirilebilir. Bunlar; sürekli ve süreksiz yarı geçirgen membran mikrokapsüllerde tutuklama şeklindedir. Sürekli mikrokapsüllerde membran katı, süreksiz mikrokapsüllerde çerçeve membranı sıvı tabakadan meydana gelir. Süreksiz mikrokapsüllerde lipidlerden oluşmuş amfipatik sıvı-yüzey aktif madde membranı içine tutuklama gerçekleştirilir. Membran tipi içerisinde biyokatalizör, yüzey aktif madde ile bir organik çözünenin karışımı ile oluşturulan ters miseller içinde hapsolmaktadır (Christina ve Bernd, 2014; Kathri ve Dirk, 2018).

- Polivinil alkol Jel İmmobilizasyonu

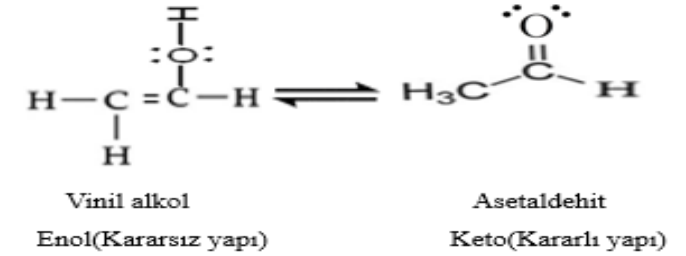
Enzimlerin polivinil alkol hidrojelinde hapsedilmesi; jelin hazırlamasında kolaylık ve basitlik, daha ucuz matris maliyeti, düşük difüzyon limitler, mekanik etkilere karşı direnç ve reaksiyon karışımından ayırma kolaylığı gibi bazı avantajlar sağlar (Rebros ve ark., 2013; Toprak ve ark., 2021). Polivinilalkol jel immobilizasyonu, polivinilalkol jel (destek materyal) içerisinde enzimin tutuklanması esasına dayanmaktadır.



Şekil 1.6 Polivinil alkolün (PVA) kimyasal yapısı

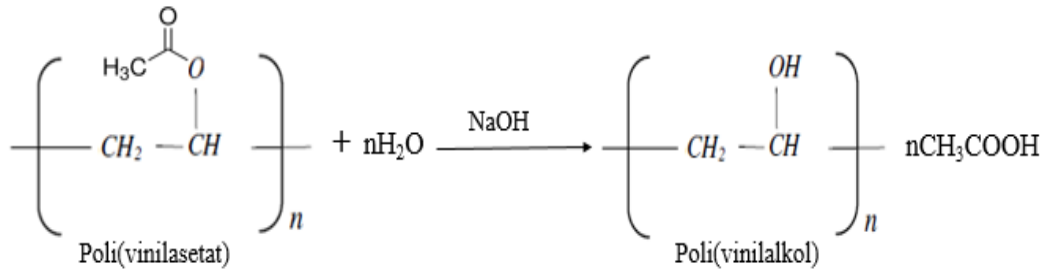
PVA renksiz, kokusuz, toksik etkisi olmayan, suda iyi çözünüp genellikle organik çözücülerde iyi çözünemeyen, hidrofilik ve hidrofobik grupları bir arada bulunduran, polimerizasyon derecesi (birbirini takip ve tekrar eden monomer sayısı) arttıkça viskozitesi artan, doğada bulunmayıp sentetik üretimi sağlanan bir polihidroksi polimerdir. Polimerizasyon işlemleri

esnasında polimerin monomeri kullanılabilmesine rağmen polivinil alkol üretiminde monomer olarak vinil alkolün (CH_2CHOH) kullanılması çok zordur. Çünkü vinil alkol oldukça kararsız bir moleküldür. Vinil alkol, keto-enol tautomerisine (Şekil 1.7.) göre daha kararlı bir yapı olan asetaldehit molekülü halinde bulunur.



Şekil 1.7 Vinil alkol (enol)-Asetaldehit (keto) tautomerisi

Vinil alkolün kararsız bir molekül olmasından dolayı polivinil alkol üretimi sırasında vinil asetat ($\text{CH}_2=\text{CHOO}-\text{CH}_3$) monomerleri kullanılmaktadır. Vinil asetatın (Etilen ve asetik asidin paladyum katalizörlüğünde oksijen ile tepkimesi sonucu elde edilir.) polimerizasyonu sonucu oluşan polivinil asetat polimeri hidroliz edilerek polivinil alkol üretimi sağlanmaktadır (Şekil 1.8.).



Şekil 1.8 Poli (vinilasetat)ın hidrolizi sonucu poli (vinilalkol) eldesi

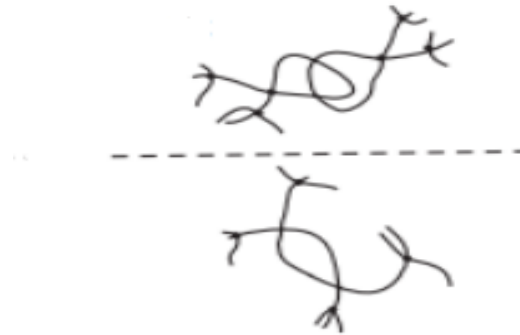
Poli (vinil alkol) zincir yapısında bulunan O-H bağları polimere kompleks ağ yapıları oluşturma imkanı sağlamaktadır (Aziz ve ark., 2015). Polimer üzerindeki kompleks ağ yapıları, çapraz bağlar olarak adlandırılır. Bu çapraz bağlar sayesinde polivinil alkol çözücüsüyle etkileşime geçerek çözünmeden suyu içine çekip şişer polimere emicilik özelliği kazandırır ve bu şekilde jel oluşumu gerçekleşir. PVA'nın çapraz bağları sayesinde su ile oluşturduğu bu jeli de "PVA Hidrojeli" olarak tanımlamak mümkündür. Fakat polimerin çözücüsü su değil de örneğin alkol ise hidrojel olarak değil alkol jel olacak şekilde çözücüye bağlı bir adlandırma yapılabilir.

PVA sadece su, dimetilsülfoksit, asetamit, glikoller ve dimetilformamit gibi yüksek polar çözücüler içinde çözünür. Sudaki çözünürlüğü polimerizasyon derecesinin ve hidroliz derecesinin fonksiyonudur. Tamamen hidroliz edilmiş PVA sadece kaynamaya yakın sıcaklıktaki suda çözünür. Kısmi hidroliz edilmiş PVA ise oda sıcaklığında çözünür. % 70-80 hidroliz edilmiş PVA sadece 10-40 °C sıcaklığındaki suda çözünme özelliğine sahiptir. PVA içindeki hidroksil grupları

moleküller arasında ve molekül içerisinde güçlü hidrojen bağı sağlar ve bu da PVA'nın sudaki çözünürlüğünü azaltır. Kısmi hidroliz edilmiş PVA'da bulunan asetat gruplarının kalıntıları bu hidrojen bağlarını zayıflatır ve düşük sıcaklıklarda çözünürlüğe yol açar. Asetat gruplarının hidrofobik doğası asetat gruplarının sayısı arttıkça artan negatif çözünme ısısına neden olur. Artan asetat grubu oranı kritik sıcaklığın düşmesine neden olur. Yani düşük hidroliz dereceli (% 70-80) PVA üzerine uygulanan sıcaklık arttıkça çözünürlük azalır (Marten, 2002). Normalde PVA'nın sudaki çözünürlüğü iyi olmasına rağmen çapraz bağlanmaların PVA'ya kazandırdığı dayanıklılık ve kararlılık ile PVA su içinde çözünmeden suyu emer ve şişer.

Su emme yetenekleri, hidrojel formülasyonunu oluşturan polimer yapısında bulunan $-CONH$, $-OH$, $-CONH_2$ ve $-SO_3H$ gibi hidrofilik fonksiyonel grupların varlığından kaynaklanmaktadır. Hidrojel tarafından su absorpsiyonu; fonksiyonel gruba, suyun durumuna ve hidrojeldeki çapraz bağlama ağının yoğunluğuna bağlıdır (Zainal ve ark., 2021). Polimerinin bulunduğu ortama su eklendiğinde polimer – su etkileşimi ve hidrojen bağlarının oluşumu meydana gelir. Polivinil alkol yapısında yer alan hidroksil ($-OH$) grubu PVA'nın suyla hidrojen bağları kurmasını ve hidrofilik (suyu seven) bir özellik göstermesine etki etmektedir. PVA'nın yapısında $-OH$ grupların yer alması ve fiziksel ya da kimyasal yöntemlerle çapraz bağlarının oluşumu polimere emicilik özelliği kazandırır.

Genel olarak hidrojellerin çapraz bağ yapısının oluşumu şu şekilde açıklanabilir: “Hidrojellerin çapraz bağlı yapısı, güçlü kimyasal bağlardan (kovalent ve iyonik bağlar gibi), kalıcı veya geçici fiziksel dolanmalardan, mikrokristalit oluşumundan ve zayıf etkileşimlerden (hidrojen bağları gibi) oluşturulabilen bağlantı noktaları ile karakterize edilir (Slaughter ve ark., 2009).”



Şekil 1.9 Bir hidrojelde fiziksel dolanmalar (Peppas ve Hoffman, 2020).

Üç tip çapraz bağlama yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler kimyasal, fiziksel ve biyolojik çapraz bağlama yöntemleridir (Mane ve ark., 2015). Hidrojel formülasyonlarında genellikle kimyasal ve fiziksel yöntemler kullanılmıştır. Kimyasal olarak çapraz bağlı jeller, radikal polimerizasyon, kondenzasyon polimerizasyonu, yüksek enerjili ışınlama ve enzimler kullanılarak üretilir (Khan ve Ranjha, 2014). Kimyasal çapraz bağlama, mükemmel bir mekanik mukavemete sahip hidrojellerin oluşumu için oldukça iyi bir yöntem

olmasına rağmen hidrojel hazırlamada kullanılan çapraz bağlayıcılar, rapor edilen toksisitelerinden dolayı fiziksel olarak çapraz bağlı yöntemler çapraz bağlayıcı toksisitesinin alternatif çözümüdür (Akhtar ve ark., 2016). Potansiyel olarak toksik ajanların salınmasına yol açan çapraz bağlanma süreçlerinden kaçınmak için bazı polimerlerin özellikle PVA'nın fiziksel bir jelleşme ve katılaştırma yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde PVA örnekleri soğukta bekletilerek jelleşmesi sağlanmaktadır (Hassan ve Peppas, 2000).

Polimer zincirlerinin fiziksel çapraz bağlanması çeşitli pH, sıcaklık, iyonik kuvvet gibi çevresel tetikleyiciler ve hidrofobik etkileşimler, yük yoğunlaşması, hidrojen bağları gibi çeşitli fizikokimyasal etkileşimler kullanılarak gerçekleşmektedir. Fiziksel hidrojellerdeki ağ yapılar tersinirdir ve hem aynı zincir üzerindeki molekül içi bağlarla hem de farklı zincirler arasındaki moleküller arası bağların varlığıyla oluşmaktadır. Bu yöntem ile hazırlanan jeller biyouyumluluk ve toksisite açısından büyük bir avantaj sağlamaktadır. Diğer yandan mekanik dayanımları zayıftır (Hoare ve Kohane, 2007). Hidrojeller yüksek su tutma kapasitesi ve toksik olmayan yapıları nedeniyle doku mühendisliğinde ve bölgesel ilaç hedeflendirmede yaygın olarak kullanılmaktadır (Arısoy ve Dortunç, 2020). Selüloz enziminin polivinil alkol kullanılarak immobilize edilmesinde fiziksel jelleşme yönteminden faydalanılmış herhangi bir kimyasal etki ile kimyasal jelleşme yöntemine başvurulmamıştır.

Jelleşme esnasında ortamda bulunan enzimler bu jellerin içerisinde hapsedilerek immobilize edilmektedir. PVA toksik olmadığından ve endüstriyel ölçekli uygulamalar için ekonomik olduğundan dolayı enzim immobilizasyonda kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra yüksek enzim yüklemesi, enzim yapısının dış ara yüzlerden korunması, alt ünitelerinin ayrılmasının engellenmesi, basit jel hazırlanması, düşük difüzyon limitleri, düşük matriks maliyeti, reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılabilmesi, ucuz ve mükemmel mekanik kararlılığına sahip olması nedeni ile enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Rebros ve ark., 2007).

PVA; ilaç sektöründe (viskozite arttırıcı ajan olması gibi), tekstil sektöründe (ipliklerin direncini arttırmak için dokuma öncesi hazırlık işlemi gibi), gıda sektöründe (bağlayıcı ve kaplama ajanı olarak kullanılması gibi) , çocuk ve hasta bezleri gibi malzeme üretiminde, tarım, boya, kâğıt, tutkal, yapıştırıcı ve daha birçok sektörde geniş bir kullanım alanına sahiptir.

1.6. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Doğal ortamı dışında bir reaksiyonu katalizlemesi amacıyla katalizör olarak kullanılan enzimin reaksiyon sonucu aktivitesi düşer ve tekrar kullanımı (geri kazanımı) mümkün olmaz. Bu sebeple enzimin tekrar kullanımını sağlamak ve bu sırada aktivitesindeki azalmayı da minimuma indirebilmek endüstri ve biyoteknoloji alanında büyük bir ihtiyaçtır. Endüstriyel alanda geniş bir kullanım yelpazesine sahip olan selüloz enziminin bu alandaki önemini de göz önünde bulundurarak yaptığımız çalışma ve araştırma da bu ihtiyaca cevap verme amacını gütmektedir. Immobilizasyon çalışmamız ile amaçladıklarımızı şu şekilde sıralayabiliriz:

-“*Aspergillus sp.*“ sıvı selüloz enziminin destek materyali olarak kullanılan “Polivinil Alkol Jel” içerisinde tutuklama yöntemi ile immobilizasyonunun araştırılması,

-Serbest ve immobilize sıvı selüloz enziminin en yüksek aktiviteyi gösterdiği optimum pH ile sıcaklıkları, sahip oldukları kinetik parametreleri, termal kararlılıkları, depolama kararlılıklarının ve immobilize selülazın tekrar kullanım kararlılığının belirlenerek serbest ve immobilize selüloz örnekleri üzerinde karakterizasyon çalışmalarının yapılması,

-Karakterizasyon çalışmaları sonucunda immobilize selülazın serbest selülaza göre endüstriyel alanda kullanılabilirliği kıyaslanarak sağlayabileceği avantajların araştırılması. Sonuç olarak yapılan bu immobilizasyon çalışması ile selüloz immobilizasyonuna farklı bir alternatif sunularak selülazın endüstriyel alandaki performansının artırılması amaçlanmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Selülazın çeşitli destek materyalleri ile immobilizasyonu konusunda yapılmış bazı önemli çalışmalara aşağıda yer verilmiştir:

Figueira ve ark (2011) yaptıkları çalışmada “*Aspergillus sp.*”den kısmen saflaştırılmış bir β -glukozidaz özütünün immobilizasyonu için bir dizi destek araştırmışlardır. Eupergit, Amberlite, aljinat, jelatin, polivinil alkol (PVA) bazlı matrisler (Lentikats) ve sol-jel gibi desteklerin diğer bazı enzim bazlı süreçlerin uygulanması için etkili olduğunu saptamışlardır. Gelecek vadeden destek materyallerin seçimi için ilk kriterin “İmmobilizasyonun hemen ardından katalitik aktivitenin korunup korunmadığının araştırılması” olduğunu bildirmişlerdir. Lentikats ve sol-jelin immobilizasyonu esnasında katalitik aktivitelerinin diğer denenen destek materyallere göre daha yüksek olması nedeniyle bu iki destek materyaline ait immobilizasyonunun karakterizasyonu araştırılmıştır. İmmobilizasyon, pH/aktivite profilini değiştirmezken sıcaklık/aktivite profilini iyileştirmiştir (Sol jel ve Lentikats’ta pH optimumu 4,5 iken sıcaklık optimumu 55-60 °C aralığında gözlenmiştir.). İmmobilizasyonun bir sonucu olarak hem termal hem de pH kararlılığı artmıştır. 70 °C’de inkübasyon altında serbest enzim hızla denatüre olurken, sol-jel ile immobilize edilmiş selülazın 2 saat sonra başlangıç aktivitesinin %20’sini hala koruduğu bildirilmiştir. İmmobilizasyonun ardından K_m ’de bir artış gözlenmiş ve bunun difüzyon sınırlamalarına işaret ettiği bildirilmiştir.

Bilgin ve ark (2015) tarafından *Trichoderma reesei* kaynaklı selülazın, Sepabeads EC-EP ve modifiye edilmiş ReliZyme HA403 destekleri üzerine kovalent immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Selülaz immobilizasyonu öncesinde ReliZyme HA403 desteği glutaraldehide ile aktive edilirken Sepabeads EC-EP desteği herhangi bir modifikasyon yapılmadan kullanılmıştır. Optimum immobilizasyon koşulları yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak belirlenmiştir. Optimum pH/sıcaklık değerleri serbest selülaz, Sepabeads EC-EP desteği üzerine immobilize edilmiş selülaz ve modifiye ReliZyme HA403 desteği üzerine immobilize edilmiş selülaz için sırasıyla 4.0/45 °C, 4.0/50 °C ve 3.5/60 °C olarak belirlenmiştir. Serbest ve immobilize selülaz preparatları kullanılarak selülozun iyonik sıvılar (IL) içinde yardımcı çözücüler kullanılarak hidrolizi araştırılmıştır. Tekrar kullanım kararlılığı ölçülen sepabeads EC-EP desteği ve modifiye ReliZyme HA403 desteği üzerine immobilize edilen selülaz preparatları için 5 tekrar kullanımdan sonra korunan başlangıç aktiviteleri sırasıyla %32 ve %57 olduğu bildirilmiştir. Serbest selülaz, 50 °C’de 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda başlangıçtaki aktivitesinin yaklaşık %14’ünü korurken Sepabeads EC-EP ve modifiye ReliZyme HA403 destekleri üzerine immobilize edilmiş selülazların ise aynı sıcaklık ve inkübasyon süresince başlangıçtaki aktivitelerinin sırasıyla %35 ve %65’ini korudukları bildirilmiştir. Modifiye edilmiş ReliZyme HA403 desteği üzerine immobilize edilen selülazın, Sepabeads EC-EP desteği üzerine immobilize edilen selülazdan daha iyi termal performans ve yeniden kullanılabilirlik gösterdiği rapor edilmiştir.

Peng ve ark (2016) yaptıkları çalışmada selüloz enziminin nanojeller içinde tutuklama yöntemiyle mikrokapsül şeklinde immobilizasyonu sağlanmış ve nanojel ağının kimyasal yapısının enzimin biyokatalitik aktivitesini nasıl etkilediğine dair cevaplar araştırılmıştır. Geliştirdikleri yöntem ile zorlu depolama koşulları, kaotropik maddeler ve organik çözücülere karşı enzim direncinin geliştirilmesi ve enzim aktivitesinin hassas bir şekilde kontrol edilmesi sağlanmıştır. Nanojeller, selüloz proteinlerinin yanında suda çözünür reaktif kopolimerler poli (N-vinilpirolidon-ko-N-metakriloksisüksinimit) ile yağ içinde su emülsiyonunda geliştirilmiş yeşil flüoresan proteini (EGFP) gibi proteinlerin doğrudan kimyasal çapraz bağlanmasıyla oluşturulmuştur. Bu çalışma ile selüloz konjuge nanojellerin (CNG) biyokatalitik aktivitesinin çapraz bağlanma derecelerinin kontrolüyle ayarlanabileceği gösterilmiştir. Daha düşük çapraz bağlanma derecesine sahip nanojellerin, enzimin aktif bölgesine daha kolay erişim sağlayarak daha yüksek substrat taşıma hızı sağladığı ortaya çıkarılmıştır. Biyohibrit nanojellerin serbest selüloz ile kıyaslandığında enzimatik aktiviteyi korumada önemli ölçüde gelişmiş stabilite gösterdiği çıkarımında bulunulmuştur. İmmobilize ve serbest selülozların spesifik aktiviteleri her 7 günde bir analiz edilmiş ve serbest selülozun %40'tan fazla spesifik aktiviteyi kaybettiği fakat tüm nanojellerin 3 hafta sonra bile %77'den fazla kalan aktiviteyi koruduğu gözlenmiştir. Ayarlanabilir enzimatik aktiviteye ve geliştirilmiş stabiliteye sahip fonksiyonel biyohibrit nanojellerin biyokataliz, biyokütle dönüşümü veya enerji kullanım alanlarındaki uygulamalar için umut verici adaylar olabileceği çalışmada ifade edilmiştir. Selüloz ve polimerik nanojeller arasındaki kovalent konjugasyonların hidrolitik aktiviteyi azaltırken katalitik stabiliteyi koruduğu bunun da selülozu kararlı bir şekilde immobilize etmek için avantajlı bir strateji sağladığı bildirilmiştir.

Wang ve ark (2018) çalışmasında selülozu immobilize etmek için çapraz bağlı stiren ve maleikanhidrit kopolimer nanopartiküllerini (SMN), çökeltme yoluyla taşıyıcı olarak uygun bir şekilde sentezlemişlerdir. Bu sentezin hemen sonrasında ise selülozun ılımlı koşullarda, SMN'ye kovalent olarak bağlanması sağlanmıştır. SMN üzerine optimum selüloz yükleme miktarının 167 mg/g olduğu belirlenmiştir. İmmobilize selüloz neredeyse hiç aktivite değişikliği göstermemiş olsa da serbest selüloz ile kıyaslandığında 30 °C'den 80 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda pH stabilitesi önemli ölçüde artmış olduğu belirtilmiştir. Ayrıca immobilizasyon ile optimum pH, 5,0'a kaymış ve immobilize selüloz pH 8,0'da %80 aktiviteyi koruyabilmiştir. İmmobilize enzimin tekrar kullanım kararlılığında 6 döngüden sonra %100 aktivitesini koruduğu ve 10 döngüden sonra sadece %20 aktivite kaybı olduğu rapor edilmiştir.

Qi ve ark (2018) yaptıkları çalışmada selülozu, manyetik çekirdek (kabuk metal) organik çerçeve üzerine immobilize etmişlerdir. Hazırlanan immobilize selülozun, yüksek protein yükleme verimliliğine (126,2 g/g destek) sahip olduğu ve manyetik destek (UIO-66-NH₂) üzerine immobilize edilen selülozun serbest selüloza kıyasla pH kararlılığı, termal kararlılık ve katalitik verimlilik açısından üstün bir performans sergilemiş olduğu gösterilmiştir. İmmobilize selülozun formik asit ve vanilin varlığında serbest selüloza göre sırasıyla %16,8 ve %21,5 daha yüksek

aktivite göstermiş olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak; immobilizasyonun bazı ön işlem inhibitörlerinin selüloz üzerindeki engelleyici etkilerini hafifletebileceği çıkarımında bulunulmuştur.

Sui ve ark (2019) yaptıkları çalışmada, düzgün ve tek dağılımlı PU (poliüre) mikrokürelerini selülazın kovalent immobilizasyonu için kullanmışlardır. Immobilizasyon için destek malzemesi hazırlanırken öncelikle PU mikroküreleri ılımlı reaksiyon koşulları altında polimerizasyon çökeltmesi ile hazırlanmış ve PU yüzeyinde aldehit fonksiyonel gruplarını bağlamak için glutaraldehit tarafından aktive edilmiştir. Selülazın amin grupları ile destek materyaldeki (PU-Glu) aldehit grupları schiff bazı reaksiyonu ile bağlanmış ve selülaz, PU destek materyali üzerine immobilize edilmiştir. Destek ve immobilize selülaz SEM, TEM, AFM, FT-IR, TGA ile karakterize edilmiş ve selülazın destekler üzerinde başarılı bir şekilde immobilize edildiği doğrulanmıştır. Serbest ve immobilize selülazın her ikisinde de optimum pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla pH 5 ve 50 °C olduğu tespit edilmiştir. 50 °C üzerindeki sıcaklıklarda serbest selülazın immobilize selülaza göre aktivitesinde daha büyük düşüşler yaşandığı ve immobilize selülaza göre yüksek sıcaklıklara dayanıklılığının daha az olduğu test edilmiştir. Km ve Vmax parametrelerinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmada ise immobilize selülazın serbest selülaza göre çok daha düşük Km ve Vmax değerlerine sahip olduğu gösterilmiştir. Immobilize selülazın serbeste göre daha hidrofilik olduğu temas açısı testi (contact angle test) yapılarak kanıtlanmış ve bu test immobilize selülazın neden daha düşük Km ve Vmax değerlerine sahip olduğunu göstermiştir. Immobilizasyon işlemi sonucu substrat olarak kullanılan CMC ile immobilize selülaz arasında daha yüksek bir affinite olduğu görülmüştür. Serbest ve immobilize selülazın termal kararlılığı ise, 50 °C’de 180 dakika inkübe edilerek test edilmiştir. 90 dakikada serbest selülazın başlangıç aktivitesi düşerken immobilize selülaz 180 dakika boyunca yüksek enzim aktivitesini korumuştur. Immobilize selülazın 3,5 katlık daha fazla rezidüel aktivite sergilediği bildirilmiştir. Immobilize selülaz için tekrar kullanım kararlılığı 8 defaya kadar test edilmiş ve immobilize selülazın başlangıç aktivitesinin %75’ini koruduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar selülazın literatürdeki başka desteklerle immobilize edildikten sonraki tekrar kullanım kararlılıklarıyla kıyaslanmış ve çalışmada kullanılan desteğin önceki birçok desteğe göre üstün yeniden kullanılabilirlik performansı gösterdiği kanıtlanmıştır.

Mo ve ark (2020) yaptıkları çalışmada selülaz enziminin adsorpsiyon yoluyla immobilizasyonunu; gözenekli lignoselülozik biyokütleden elde edilen yüksek spesifik yüzey alanı, poligözenekli yapısı ve hazırlanma kolaylığı gibi özellikleri sebebiyle destek maddeleri içinde popüler bir yere sahip olan biyokömür (biochar) destek materyalini kullanarak sağlamışlardır. Bu çalışmada poligözenekli biyokömür, manyetik-Fe₂O₃ partikülü ile birleştirilerek kalsinasyon yoluyla hazırlanmıştır. Kalsinasyon sıcaklığı ve süresinin manyetik poligözenekli biyokömürün özellikleri üzerindeki etkisi araştırılmış ve optimum hazırlık koşulları belirlenmiştir. Selülaz adsorpsiyonu için, manyetik desteğin immobilizasyon kapasitesi, serbest selülazinkine kıyasla

%73,6'lık bir nispi aktivite ile 266 mg/g kadar ulaşmıştır. Selülaaz adsorpsiyonunun davranışı, endotermik bir işlemin yüksek sıcaklıklarda daha kolay gerçekleştiğini ve bunun da yüksek bir adsorpsiyon miktarıyla sonuçlandığı bildirilmiştir.

Wang ve ark (2021) yaptıkları çalışmada, sodyum aljinat (SA)-polietilen glikol (PEG)-Kitosan (CS) destek üçlüsünün selülaaz ile immobilize edilmesini sağlamışlardır. Bu sayede selülaazın tekrar tekrar kullanımını sağlayabilecek bir ürün ortaya konulmuştur. Immobilize selülaazın matrisi Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskobu kullanılarak test ve karakterize edilmiştir. Substrat olarak mikrokristalin selüloz kullanılmıştır. Serbest ve immobilize selülaazın optimum pH'sı sırasıyla 4 ve 5 olarak tespit edilmiştir. Immobilizasyonda kullanılan SA-PEG-CS destek materyalinin SA miktarı artırıldıkça immobilize selülaazın optimum pH'sının yükseldiği tespit edilmiştir. SA-PEG-CS immobilize selülaaz ile SA immobilize selülaazın optimal sıcaklığının ise serbest selülaaza göre 20 °C daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada immobilize selülaazın termal kararlılığını artırabilmek amacıyla SA-PEG-CS ile sabitleştirilmiş selülaaz yüzeyine polielektrolit zar yapıştırılmıştır. Bu sayede taşıyıcı çözünmesi ve selülaazın yüksek sıcaklıktan dolayı parçalanması azaltılmıştır. Serbest selülaazın, SA-immobilize selülaazın ve SA-PEG-CS-immobilize selülaazın Km değerleri sırasıyla 0,809, 2,964, 1,760 olarak tespit edilmiştir. SA-PEG-CS immobilize selülaazın Km değerinin SA-immobilize selülaazından %41 daha düşük olduğu ve bunun affinite artışına işaret ettiği yorumu yapılmıştır. Destek materyalin yapısını oluşturan maddelerden biri olan PEG' in gözenekli bir yapıya sahip olması, destek materyalin gözenekli olma özelliğini artırmış ve bu sayede selülaaz ile substrat arasındaki kütle transfer direncinin azalmasını sağladığı bildirilmiştir. CS'nin ise enzim ile substrat arasındaki affiniteyi olumsuz etkilemiş olduğu deneyler sonucunda rapor edilmiştir.

Kalita and Sit (2023) 'in yaptıkları çalışmada *Aspergillus sp.* kaynaklı selülaaz, kapsüllenmiş kalsiyum aljinat boncuklar ve agarda aljinat olmak üzere iki farklı tutuklama yöntemi ile immobilize edilmiştir. Serbest selülaaz, 50 °C ve pH 4'te optimum aktivite göstermiştir. Serbest selülaazın 39.29 mg/ml'lik bir Km, 0.50 µmol/dak'lık bir Vmax'a sahip olduğu belirlenmiştir. Kapsüllenmiş kalsiyum aljinat boncukların optimum koşullarda, 50°C ve pH 8'de, sahip oldukları Km ve Vmax değerleri sırasıyla 72.28 mg/mL ve 1.32 µmol /dak olarak tespit edilirken agar aljinatların optimum koşullarda, 60 °C ve pH 4'te, sahip olduğu Km ve Vmax değerleri ise sırasıyla 13,08 ve 0,38 µmol/dak olarak tespit edilmiştir. Ayrıca immobilize edilmiş selülaazların 5 döngü boyunca kullanılabilecekleri fakat 5 döngü sonrası aktivitelerinin bozulmaya başladığı bildirilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda serbest ve immobilize selülaazın havuç suyu verimini artırmada etkili olduğu bildirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Sıvı selüloz enzimi (*Aspergillus sp.*), CMC (Karboksi Metil Selüloz), asetik Asit, sitrik asit, fosforik asit, hidroklorik asit, sodyum hidroksit, DNSA (Dinitro Salisilik Asit), bakır (II) sülfat penta hidrat, folin ciocalteu çözeltisi (Folin-C), BSA (Sığır Serum Albümin)

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Analitik terazi (KERN), pH metre (HANNA), Su banyosu (NÜVE), soğutmalı inkübatör (BINDER), UV-Vıs spektrofotometre (Thermo Scientific- Genesys 10S UV-Vıs), Isıtmalı manyetik karıştırıcı (ISOLAB), otomatik pipet (Eppendorf)

3.2. Metot

3.2.1. Selüloz Enziminin İmmobilizasyonunda Kullanılacak Destek Materyalin Hazırlanması

3.2.1.a. Polivinil Alkol Çözeltisinin (Jel) Hazırlanması

Çalışmamızda polivinil alkolün %10'luk çözeltisi (PVA'nın en ideal viskozitedeki çözeltisi) hazırlanarak kullanılmıştır. Polivinil alkol çözeltisi, 250 mL saf su içinde 25 gram polivinil alkolün uygun şartlar altında çözündürülmesi ile hazırlanmıştır.

Bir cam behere alınan 200 mL saf su, içine manyetik balık atılarak ısıtmalı manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. Isıtma yapılmadan saf su içine azar azar 25 gramlık PVA katısı eklenerek karıştırmaya başlanmıştır. Buradaki amacımız; polivinil alkol katısı ve sudan oluşan karışımın ısıtılmaya başlanmadan önce oda sıcaklığında çözünmesini sağlamaktır. PVA katısının yavaş yavaş eklenmesi sırasında topaklanmanın önlenmesi için karıştırma işleminin durdurulmaması önemlidir. PVA'nın saf su içerisindeki dağılma işlemi tamamlandıktan sonra ısıtıcının ısıtma modu da aktifleştirilmiş ve karışım içerisine bir termometre daldırılmıştır. PVA karışımının tamamen çözünür hale getirmek için sıcaklık 80 °C'ye ayarlanmıştır. PVA katısının çözücüsü olan su içinde homojen bir şekilde çözülmesi ve jel oluşumuna yardımcı olması için karışım yaklaşık 70-90 °C sıcaklık aralığında 1-2 saat boyunca durdurulmaksızın karıştırma işlemine devam edilmiştir. Uzun bir süre kaynatma işlemi yapılacağı için beherin ağzı saat camı ile kapatılmıştır. Homojen bir karışım elde edildikten sonra karışım ısıtmalı manyetik karıştırıcı üzerinden alınarak soğutulmuş ve 250 mL'lik balon jöjeye alınmıştır. Karışımın son hacmi saf su kullanılarak oda sıcaklığında 250 mL'ye tamamlanmıştır. Bu işlemler sonucunda yaklaşık %10'luk bir polivinil alkol çözeltisi elde edilmiştir. Elde edilen PVA sulu çözeltisinin akmaya karşı dirençli ve şeffaf bir özellikte olduğu gözlenmiştir. Akışkanlığı az ve şeffaf özellikteki bu çözelti, kapaklı bir cam kap içine alınarak jel damlacıkları oluşturulmadan önce 24 saatlik bir dinlendirmeye alınmış ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Selülaz Enziminin Polivinil Alkol Jelde Tutuklama Yöntemiyle İmmobilizasyonu

Selülaz enziminin polivinil alkol içerisinde immobilize edilmesinde Rebro ve ark., (2007)'nın önerdiği yöntem kullanılmıştır. Ağzı geniş cam tüp içerisine 100 µL sıvı selülaz (14 mg protein/mL) konulmuştur. Üzerine immobilizasyon için 900 µL pH 5,5 asetat tamponu (100mM) eklenmiş ve selülaz enzimi ile karıştırılmıştır. Destek materyal olarak hazırladığımız polivinil alkol jel içerisinden mikropipet yardımı ile 2 mL jel çekilmiş ve enzim ile tamponun eklendiği cam tüp içerisine aktarılmıştır. Bu sırada jelin yoğun kıvamının çekme işlemine engel oluşturmaması için mikropipet ucu makasla biraz kesilmiş ve tek seferde 2 mL jel çekmek yerine birer mililitre olacak şekilde çekilmiş ve enzim-tampon karışımı içine eklenmiştir. Bu aşamada karışımın bileşenlerinin birbiriyle iyice karışması oldukça önemlidir.

Elde edilen karışım, ucu kesilmiş mikropipet ile yüzer mikrolitrelik olacak şekilde damla damla eşit aralıklarla plastik bir petri kabı içerisine damlatılmıştır. Bu şekilde benzer kütlelerde (~8-9 mg) jel damlaları elde edilmeye çalışılmıştır. Plastik kap içerisine yapılan damlatma işlemi bitince damlaların dağılmaması için kap yerinden 10 dakika boyunca hiç hareket ettirilmemiştir. 10 dakikanın sonunda plastik kap içindeki jel damlacıkları 24 saat boyunca bekletilip kurutulmak üzere inkübatöre (5 °C'de) yerleştirilmiştir. Selülaz enziminin ” Polivinil Alkol Jelde Tutuklama Yöntemi” ile immobilizasyonu sağlanmıştır.



Şekil 3.1 Selülazın PVA jelde immobilizasyonu sonucu oluşturulan jel damlacıkları

3.2.3. Protein Tayini

Çalışmamızda sıvı selülazın protein derişimi, Lowry ve ark (1951) tarafından önerilen yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Miktarı bilinen standart protein olarak “Bovine Serum Albumin (BSA)” kullanılmış ve Lowry yöntemine göre bu standardın farklı derişimlere sahip çözeltileri saf su ile hazırlanmıştır. Lowry protein tayin yöntemine göre BSA'nın çeşitli konsantrasyonlardaki absorbans değerleri 750 nm dalga boyunda ölçülmüş ve BSA'nın farklı derişimlerdeki absorbans değerlerinin derişime karşı değişimi grafiğe geçirilerek “Standart Protein Grafiği” çizilmiştir. Daha sonra protein miktar tayini yapılacak olan sıvı selülaz enzimi için de Lowry protein tayin basamakları sırasıyla uygulanmış ve yine 750 nm'de spektrofotometre ile absorbans ölçümü

yapılmıştır. Bu ölçümden elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınarak çizilen standart protein grafiğine ait denkleme göre bir karşılaştırma yapılmış ve miktarı bilinmeyen sıvı selüloz enzimi için protein miktarı hesaplanmıştır. Kısaca; çizilen standart protein grafiği kullanılarak miktarı bilinmeyen protein örneğinin (sıvı selüloz) absorbansı, miktarı bilinen standardın (BSA) absorbansı ile karşılaştırılmış ve bu absorbans değerine karşılık gelen protein derişimi bulunmuştur. Sıvı selüloz enzim içeriğindeki protein miktarının BSA'nın içeriğindeki protein miktarına bağlı bir değeri elde edilmiştir.

Protein tayini için A ve B çözeltileri hazırlanmış ve hemen sonrasında ise A ve B çözeltilerinden belirli miktarlarda alınarak C çözeltisi hazırlanmıştır. C çözeltisinin etkinliğini kaybetmemesi için deneye başlama esnasında hazırlanması uygun görülmüştür.

-Protein Tayininde Hazırlanacak Çözeltiler:

A Çözeltisinin Hazırlanması:

Saf suda 20 g Na_2CO_3 ile 4 g NaOH birlikte çözülerek son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

B Çözeltisinin Hazırlanması:

0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, %1'lik sodyum sitrat çözeltisinin bir miktarı içinde çözülüp son hacim yine %1'lik sodyum sitrat çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

C Çözeltisinin Hazırlanması:

50 mL A çözeltisi içine 1 mL B çözeltisi eklenerek hazırlanmıştır.

Folin Ciocalteu (Folin-C) Çözeltisinin Hazırlanması:

Folin-Ciocalteu saf su ile 1/1 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.

Standart Protein Çözeltisinin Hazırlanması:

1 mL saf suda 1 mg "Bovine Serum Albumin" çözdürülerek hazırlanmıştır.

-Protein Tayininde İzlenecek Deney Adımları:

1. Her tüpe (Kör tüp hariç) sırasıyla belirli miktarlarda standart madde (BSA) eklenmiş ve ardından her tüpün son hacmi saf su ile 1 mL'ye tamamlanmıştır.
2. Her tüpe "5 mL C çözeltisi" eklenerek tüpler çalkalanmıştır.
3. "C çözeltisi" eklendikten sonra 10 dakika oda sıcaklığında beklenilmiştir.
4. Her tüpe "0,5 mL Folin-C çözeltisi" eklenip tüpler yine çalkalanmıştır.
5. Folin-C çözeltisi eklendikten sonra 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

6. 30 dakikanın sonunda 750 nm dalga boyunda UV-VIS cihazı ile absorbans ölçümü yapılmıştır.

7.

-Bovine Serum Albumine ait Standart Grafiğin Çizimi:

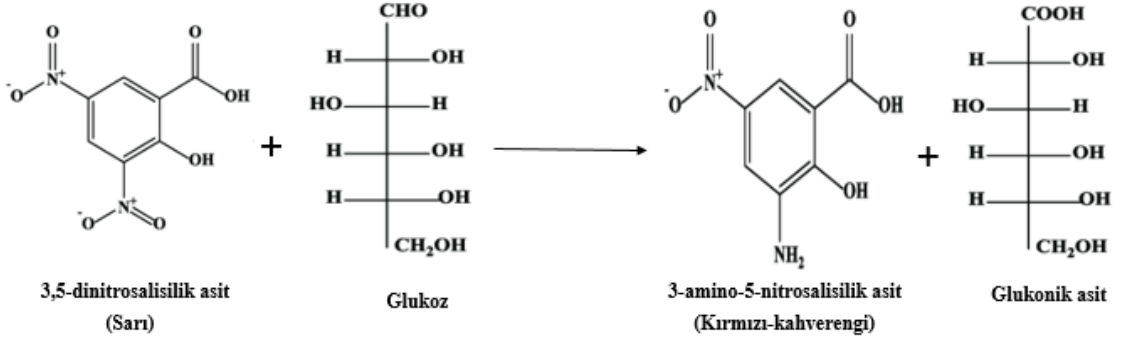
Lowry yöntemine göre, protein miktarı bilinmeyen örneğin (sıvı selüloz enzimi) miktarının tespiti için öncelikle standart maddede protein tayini yapılmıştır. Standart madde olarak “Bovine Serum Albumin (BSA)” ile çalışılmış ve 1 mg/mL derişimindeki çözeltisi saf su kullanılarak hazırlanmıştır.

10 adet deney tüpü ve her örnek tüpe ait üçer paraleli olacak şekilde tüp hazırlığı yapılmıştır. Örnek tüplerin her birinin içine sırasıyla 0 (kör tüp)- 25 - 50 - 100 - 150 - 250 - 350 - 500 - 750 - 1000 µL olacak şekilde 1 mg/mL derişiminde albümin standart protein çözeltisi eklenmiş ve bu tüplerin son hacmi saf su ile 1 mL’ye tamamlanmıştır. Tüplerin albümin (standart) protein derişimleri sırasıyla 0 - 0,025 - 0,050 - 0,100 - 0,150 - 0,250 - 0,350 - 0,500 - 0,750 - 1,000 mg/mL’dir. Lowry protein yöntemine göre tüplere sırası ile 5 mL C çözeltisi eklenip çalkalanmış ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 10 dakika sonra tüplere sırası ile 0,5 mL Folin-C çözeltisi eklenip çalkalanmış ve bu karışım ise 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 30 dakika bekledikten sonra tüplerdeki örneklerin köre karşı absorbans değerleri 750 nm’de UV-VIS spektrometre cihazında okutulmuş ve elde edilen absorbans değerleri, derişime karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil.4.1). Elde edilen standart protein grafiği yardımıyla selüloz enziminin protein derişimi hesaplanmıştır.

3.2.4. Serbest ve İmmobilize Selüloz Enziminin Aktivite Tayini

Çalışmamızda serbest ve immobilize selüloz enziminin aktivite tayininde Sumner ve ark (1921) tarafından geliştirilen “İndirgen Şeker Metodu” olarak adlandırılan “DNSA veya DNS Yöntemi” uygulanmıştır.

DNS yöntemi, 3,5-dinitrosalisiklik asit ile örnekte bulunan indirgeyici şekerler arasındaki redoks reaksiyonundan oluşan bir kolorimetrik tekniktir. Şekerlerin indirgeme gücü, oksitleyici ajanlar tarafından karboksil grubuna oksitlenen karbonil gruplarından gelir. Sarı olan DNS, kırmızımsı kahverengi bir 3-amino-5-nitrosalisiklik aside indirgenir; bu da maksimum absorbansın 540 nm dalga boyunda spektrofotometri ile ölçülebilmektedir (Miller 1959). Çalışmamızda DNSA yöntemi uygulanarak 530 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler alınmıştır.



Şekil 3.2 DNSA yönteminin etki mekanizması (Anonymous2)

3.2.4.a. Serbest Selülag Enziminin Aktivite Tayini

1mg/mL protein derişiminde selülag çözeltilisinin hazırlanması:

Standart protein grafiğı kullanılarak sıvı selülagın protein tayini sonucu bulunan ortalama absorbans değeri BSA'nın absorbansı ile karşılaştırılmış ve bu absorbans değerine karşılık gelen protein derişimi bulunmuştur. Bu sayede sıvı selülag şişesi içerisindeki protein derişimi tespit edilmiş ve 1mg/mL derişiminde enzim çözeltilisi hazırlayabilmek için sıvı selülag şişesinden ne kadar örnek alınabileceğı hesaplanmıştır. 100 mM pH 6,0 fosfat tamponu içinde 1 mg/mL protein derişiminde serbest selülag çözeltilisi hazırlanmıştır.

%1(w/v)'lik CMC çözeltilisinin hazırlanması:

Kör ve her bir örnek tüp için 250 µL CMC çözeltilisine ihtiyaç olduğu göz önünde bulundurularak ihtiyaç olan CMC çözeltilisine ait hesaplama yapılmış ve buna uygun %1 (w/v)'lik CMC çözeltilisi pH 6,0 fosfat tamponu ile hazırlanmıştır.

-DNSA metoduna göre serbest selülag enziminin aktivite tayininde uygulanan deney adımları:

1 adet kör, 3 adet örnek tüp ve 3 adet de enzim körü örnek tüpü hazırlanmıştır. Kör tüpe 50 µL pH 6 fosfat tamponu (100 mM) eklenirken örnek ve enzim körü örnek tüplerinin hepsine tampon yerine 50 µL selülag çözeltilisinden eklenmiştir. Tüpler daha önceden 55°C sıcaklığa ayarlanmış sıcak su ısıtıcısına alınmıştır. Sıcak su ısıtıcısına alınan tüplerden kör ve örnek tüp üzerine 250 µL %1 (w/v)'lik CMC çözeltilisi eklenirken enzim körü örnek tüpü üzerine CMC çözeltilisi yerine 250 µL pH 6,0 fosfat tamponu (100 mM) eklenmiştir. Tüpler 30 dakika boyunca, 55 °C sıcaklıkta sıcak su ısıtıcısında bekletilmiştir. 30 dakikalık inkübasyon sonunda her tüpün içine renk indikatörü olan 300 µL'lik DNSA eklenmiştir. Tüpler kaynar su banyosuna alınarak yaklaşık 20 dakika (renk değışimi gözlenene kadar) kaynatılmıştır. Kaynar su banyosundan çıkarılan tüpler soğutulmuş ve üzerine 3400 µL saf su eklenmiştir. Böylece tüplerin toplam hacmi 4000 µL'ye tamamlanmıştır. Son olarak UV-VIS spektrometre cihazı yardımıyla enzim – substrat reaksiyonu sonucu açığa çıkan glukoz miktarı 530 nm'de köre karşı örnek tüplerin absorbans değerleri okutularak ölçülmüştür (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1 Serbest selülaaz enziminin aktivite tayininde izlenecek deney adımları

Kör Tüp (1 adet)	Örnek Tüp (3 adet)	Enzim Körü Örnek Tüp (3 adet)
50 µL pH 6 fosfat tamponu	50 µL selülaaz çözeltisi	50 µL selülaaz çözeltisi
Tüpler daha önceden 55 °C sıcaklığa ayarlanmış sıcak su ısıtıcısına alınmıştır.		
250 µL CMC çözeltisi	250 µL CMC çözeltisi	250 µL pH 6 fosfat tamponu
Tüpler 55 °C sıcaklığa ayarlanmış sıcak su ısıtıcısında 30 dakika boyunca bekletilmiştir.		
300 µL DNSA	300 µL DNSA	300 µL DNSA
Tüpler kaynar su banyosuna alınarak renk dönüşümü gözlenene kadar kaynatılmıştır. Kaynatma işlemi tamamlandıktan sonra tüpler soğuk musluk suyu altında soğutulmuştur.		
3400 µL saf su	3400 µL saf su	3400 µL saf su
530 nm’de köre karşı örnek tüp ve enzim körü örnek tüpünün absorbans değerleri okutulmuştur.		

3.2.4.b. İmmobilize Selülaaz Enziminin Aktivite Tayini

%1 (w/v)’lik CMC çözeltisinin hazırlanması:

Her tüp (1 adet kör ve 3 adet örnek cam tüp) için 300 µL CMC çözeltisine ihtiyaç olduğu göz önünde bulundurularak ihtiyaç olan CMC çözeltisine ait hesaplama yapılmış ve buna uygun %1 (w/v)’lik CMC çözeltisi hazırlanmıştır.

-DNSA metoduna göre immobilize selülaaz enziminin hidrolitik aktivite tayininde uygulanan deney adımları:

Her örnek tüpe immobilize jelden 1 adet eklenmiş ve tüpler daha önceden 55 °C sıcaklığa ayarlanmış sıcak su ısıtıcısına alınmıştır. Kör tüp de dâhil her tüpün üzerine 300 µL %1 (w/v)’lik CMC çözeltisi eklenmiştir. Böylece örnek tüplerin içerisindeki immobilize enzim-substrat reaksiyonu başlatılmış ve tüpler 30 dakika boyunca sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra serbest selülaazın aktivite tayini esnasında uygulanan deney adımlarının aynısı uygulanmıştır (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2 İmmobilize selülaaz enziminin aktivite tayininde izlenecek deney adımları

Kör Tüp (1 adet)	Örnek Tüpler (3 adet)
Bu aşamada kör tüpe bir şey eklenmemiş boş bırakılmıştır.	İnkübatörde kurutulmuş olan immobilize jel damlasından 1 adet eklenmiştir.
Tüpler daha önceden 55 °C sıcaklığa ayarlanmış sıcak su ısıtıcısına alınmıştır.	
300 µL CMC çözeltisi	300 µL CMC çözeltisi
Tüpler 55 °C sıcaklığa ayarlanmış sıcak su ısıtıcısında 30 dakika boyunca bekletilmiştir.	
300 µL DNSA	300 µL DNSA
Tüpler kaynar su banyosuna alınarak renk dönüşümü gözlenene kadar kaynatılmıştır. Kaynatma işlemi tamamlandıktan sonra tüpler soğuk musluk suyu altında soğutulmuştur.	
3400 µL saf su	3400 µL saf su
530 nm’de köre karşı örnek tüp ve enzim körü örnek tüpünün absorbans değerleri okutulmuştur.	

3.2.5. Serbest ve İmmobilize Selülaazın Karakterizasyonu

3.2.5.a. Serbest ve İmmobilize Selülaazın Optimum pH 'sının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize selülaaz enzimlerinin en yüksek aktivite gösterdiği pH'larının belirlenmesinde sırasıyla 0,1 M'lık pH 3,0 - 4,0 - 4,5 - 5,0 - 5,5 - 6,0 - 6,5 - 7,0 - 8,0 - 9,0 ve 10,0 tamponları ile CMC çözeltileri (substrat çözeltisi) hazırlanmıştır. Serbest ve immobilize selülaaz için çizilen aktivite-pH grafiklerinde en yüksek aktivitedeki pH, optimum pH olarak belirlenmiştir.

3.2.5.b. Serbest ve İmmobilize Selülaazın Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi

Optimum pH belirlendikten sonra serbest ve immobilize selülaazın optimum sıcaklığının belirlenmesinde kullanılacak %1 (w/v)'lık CMC çözeltileri ile serbest selülaazın optimum sıcaklığının belirlenmesinde kullanılacak 1 mg/mL protein derişimindeki selülaaz çözeltisi belirlenen optimum pH tamponları ile hazırlanmıştır. Serbest ve immobilize selülaaz enzimlerinin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklıkların belirlenmesi için 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 °C sıcaklıklarında DNSA metodu uygulanarak çalışılmış ve sıcaklığın aktivite üzerindeki etkisi incelenmiştir. Serbest ve immobilize selülaazlar için çizilen aktivite-sıcaklık grafiklerinde en yüksek aktivitedeki sıcaklık, optimum sıcaklık olarak belirlenmiştir.

3.2.5.c. Serbest ve İmmobilize Selülaazın Km ve Vmax Değerlerinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize selülaazların Km ve Vmax değerlerinin (kinetik parametreler) belirlenebilmesi için serbest ve immobilize selülaaza ait optimum pH tamponları kullanılarak %0,00625 , %0,125 , %0,25 , %0,40 , %0,50 , %0,75 , %1 , %1,5 , %1,75 , %2 , %3'lük CMC (substrat) çözeltileri hazırlanmıştır. Farklı yüzdeliklerdeki bu CMC çözeltilerini hazırlayabilmek için en yüksek derişimdeki (çalışmamızda %3) CMC çözeltisi serbest ve immobilize selülaaza ait optimum pH tamponu ile hazırlanmış ve diğer yüzdelikteki derişimler de bu CMC çözeltisinin optimum pH tamponu ile seyreltilmesi sonucu elde edilmiştir. Enzim ve substrat reaksiyonu ise serbest ve immobilize selülaaza ait optimum sıcaklıkta başlatılmış ve DNSA metodu uygulanarak aktivite ölçümü yapılmıştır. Optimum pH tamponları kullanılarak farklı derişimlerde hazırlanan CMC çözeltilerinin reaksiyon hızı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu etki araştırılırken Michaelis-Menten eşitliği ve Lineweaver-Burk grafiğinden faydalanılarak Km ve Vmax değerleri belirlenmiştir.

3.2.5.d. Serbest ve İmmobilize Selülaazın Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize selülaazların termal kararlılığı belirlemek amacıyla 45 ve 55 °C olmak üzere iki farklı sıcaklık değeri kullanılmıştır. Başlangıçtaki aktiviteyi bilmek belirlenen zaman aralıklarındaki aktivite değişimlerini kıyaslayabilmek adına önemli olduğu için 45 ve 55 °C sıcaklıkların ikisinde de ayrı ayrı takip edilecek zaman aralıkları başlangıçla birlikte 1, 2, 4, 8, 16

ve 24.saat dilimleri olarak belirlenmiştir. Belirlenen sıcaklık ve zaman aralıklarında serbest ve immobilize selülozların kalan aktiviteleri tayin edilmiş ve termal kararlılıkları test edilmiştir.

3.2.5.e. Serbest ve İmmobilize Selülozların Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi

İhtiyaca göre serbest selüloz örneği 1 mg/mL derişiminde hazırlanırken immobilize selüloz örnekleri de selülozun immobilize edilmesi esnasında uygulanan adımlar doğrultusunda hazırlanmıştır. Serbest ve immobilize selülozun depolama kararlılığını belirleyebilmek amacıyla her ikisi için de hazırlanan örnek miktarları yarıya bölünerek örnekler, dolap içinde 5 °C ve oda sıcaklığında 25 °C’de saklanmak üzere gruplara ayrılmıştır. Hem serbest hem de immobilize selüloz örneklerine ait başlangıç aktiviteleri ölçüldükten sonra “1, 3, 5, 10, 15, 20 ve 30.gün “ olmak üzere yedi farklı zaman diliminde kalan aktivite ölçümlerinin yapılması planlanmıştır. Örneklere ait kalan aktiviteler 30 gün boyunca planlanan gün aralıklarına göre ölçülmüş ve depolama kararlılıkları belirlenmiştir.

3.2.5.f. İmmobilize Selülozun Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi

İmmobilize selülozun tekrar kullanım kararlılığı, immobilize selüloza ait optimum pH ve sıcaklıkta test edilmiştir. İhtiyaç duyulan %1’lik CMC çözeltisi ise immobilize selüloza ait optimum pH tamponu ile hazırlanmıştır. İmmobilize enzimin tekrar kullanımını test etmek için başlangıç aktivitesi ölçüldükten sonra 5 ayrı tekrar yapılmıştır. Tekrar tekrar enzimi kullanıp DNSA metodu ile immobilize enzim üzerinde aktivite tayini yapabilmek için bir enjektör içine cam pamuk yerleştirilmiştir. Enjektör içerisine yerleştirilen cam pamuk, immobilize enzim üzerine uygulanan işlemler sonucunda elde edilen karışımın süzdürülmesini ve geride kalan immobilize enzimin tekrar aynı basamaklar uygulanarak kullanımını sağlamıştır. İçerisine cam pamuk yerleştirilmiş enjektörün boşaltma ucu enjektör uç kapağı ile kapatılmış ve cam pamuk üzerine bir adet jel damlası atılarak enjektör, önceden immobilize enzim optimum sıcaklığına kadar ısıtılmış su dolu ısıtıcı içerisine yerleştirilmiş ve yanına bir adet de kör tüp olarak kullanılmak üzere ağzı kapaklı bir cam tüp konulmuştur. Yapılan her tekrarda ısıtıcı içerisindeki enjektör, örnek tüp olarak kullanılmıştır. Kör tüpe ve enjektör içindeki jelin üzerine 300 µL CMC eklemesi yapılmış ve bu sayede enjektör içindeki cam pamuk üzerine yerleştirilmiş immobilize enzim ile CMC arasında 45 °C sıcaklıkta immobilize enzim-substrat tepkimesi başlatılmıştır. 30 dakika beklenmiş ve bu aşamanın hemen arkasından süzme işlemine geçilmiştir. Enjektör içerisindeki örnek, enjektör uç kapağı açılarak enjektör piston gövdesi itilip önceden ayarlamış olduğumuz ağzı kapaklı örnek cam tüplerden birisi içine aktarımı sağlanmıştır. Örnek ve kör tüpün her ikisi içine 300 µL DNSA eklenerek örnek tüpteki immobilize enzim-substrat tepkimesi sonlandırılmıştır. DNSA ekleme basamağından hemen sonra aktivite tayini esnasında izlediğimiz diğer adımlar da aynen uygulanmış ve 530 nm’de köre karşı örnek tüpün absorpsiyon değeri ölçülmüştür. 1.kullanım sonucu alınan bu ilk ölçüm, immobilize enzimin “Başlangıç” aktivite değeridir. Enjektör içindeki

immobilize enzim tekrar kullanılmak üzere yeniden ısıtıcıya yerleştirilmiş ve aynı adımlar tekrar uygulanmıştır. İmmobilize enzim, tekrar kullanılarak deney adımları 5 kez tekrarlanmış ve her seferinde 530 nm’de absorbans ölçümü alınmıştır.



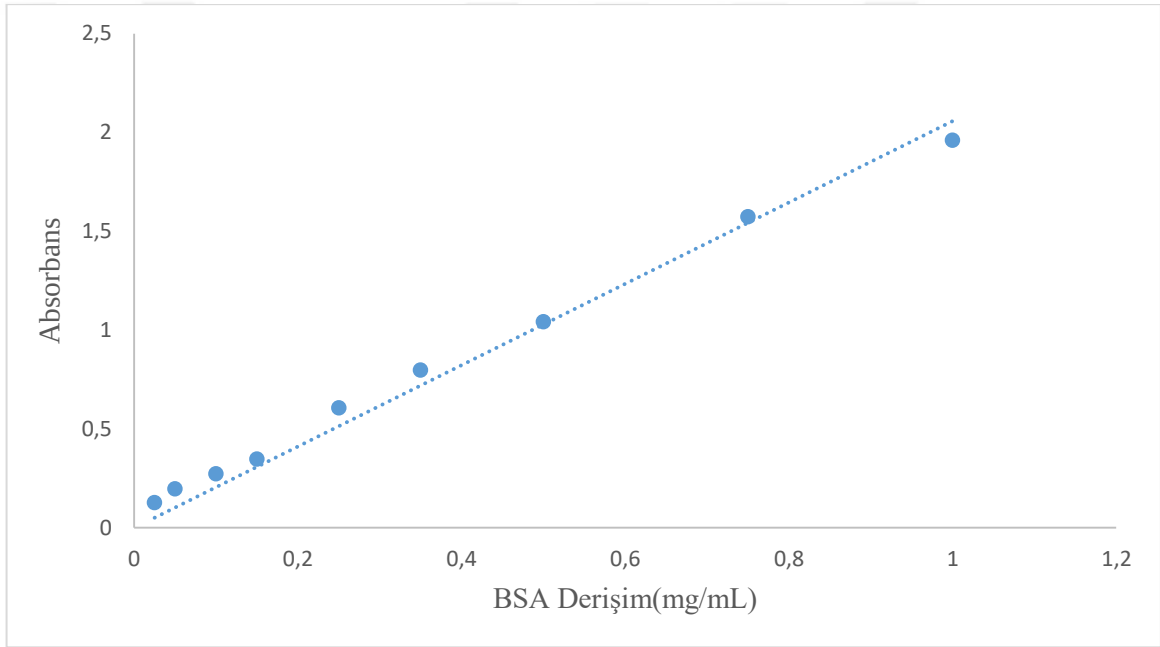


4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Bu tez çalışmasında selüloz enziminin polivinil alkol jel içerisinde tutuklanması yöntemiyle yapılan immobilizasyon incelenmiştir. Serbest ve immobilize selüloz örneklerinin karakterizasyonunun (optimum pH, optimum sıcaklık, kinetik parametreler, termal kararlılık, depolama kararlılığı ve tekrar kullanım kararlılığı) yapılabilmesi için aktiviteleri ölçülmüştür. Bu sayede serbest selüloz yerine immobilize selülozun kullanılabilirliği test edilmiş ve araştırılmıştır. Araştırma verileri ise grafik ve çizelgelerle detaylandırılmıştır.

4.1.1. Selüloz Enzim Çözeltilisinde Protein Tayini



Şekil 4.1Bovine Serum Albumin (BSA) standart protein grafiği

Lowry protein tayinine göre “Bovine Serum Albumin (BSA)” standart maddesi kullanılarak derişime göre absorbans değişimini veren standart grafik oluşturulmuştur. Protein tayini yapılmak istenen *Aspergillus sp.* kaynaklı sıvı selüloz enzim örneği üzerinde de Lowry protein tayin yöntemleri uygulanmış ve bunun sonucunda elde edilen absorbans değerleri standart eğri (şekil 4.1.) üzerinde değerlendirilmiştir. Selüloz enzim örneğindeki protein miktarlarını belirlemek için standart eğriden elde edilen denklem “ $y = 2,0569x$ ” kullanılmıştır. Bu sayede sıvı selüloz enzim örneğindeki protein miktarı bağıl (BSA’nın protein miktarına bağılı) olarak tespit edilmiştir. Protein derişimi bilinen BSA standart maddesi kullanılarak bu standart maddenin protein derişimine bağılı olarak selüloz çözeltisinin protein derişimi 14 mg/mL olarak bulunmuştur.

4.1.2. Serbest ve İmmobilize Selüloz Enziminin Karakterizasyonu

Serbest ve immobilize selüloz enzimi için yapılan karakterizasyon çalışmalarında aktivite ölçümleri yapılmıştır. Aktivite ölçümleri için DNSA metodu uygulanmıştır.

4.1.2.a. Serbest ve İmmobilize Selüloz Optimum pH Değeri

Serbest ve immobilize selüloz örneklerinin aktiviteleri üzerinde pH 'nın etkisi araştırılmıştır. Bu etkiyi incelemek üzere 100 mM derişiminde, farklı pH'larda sitrat (3,0-4,0-4,5), asetat (5,0-5,5), fosfat (6,0 - 6,5 - 7,0 - 8,0) ve karbonat (9,0 - 10,0) tamponları hazırlanarak 55 °C'de aktiviteleri ölçülmüştür. Bağlı aktivitenin pH 'ya bağlı değişimi grafik ve çizelgeler üzerinde gösterilerek pH değişimlerinin aktivite üzerindeki etkisi incelenmiştir. En yüksek aktiviteye sahip optimum pH değeri belirlenmiştir.

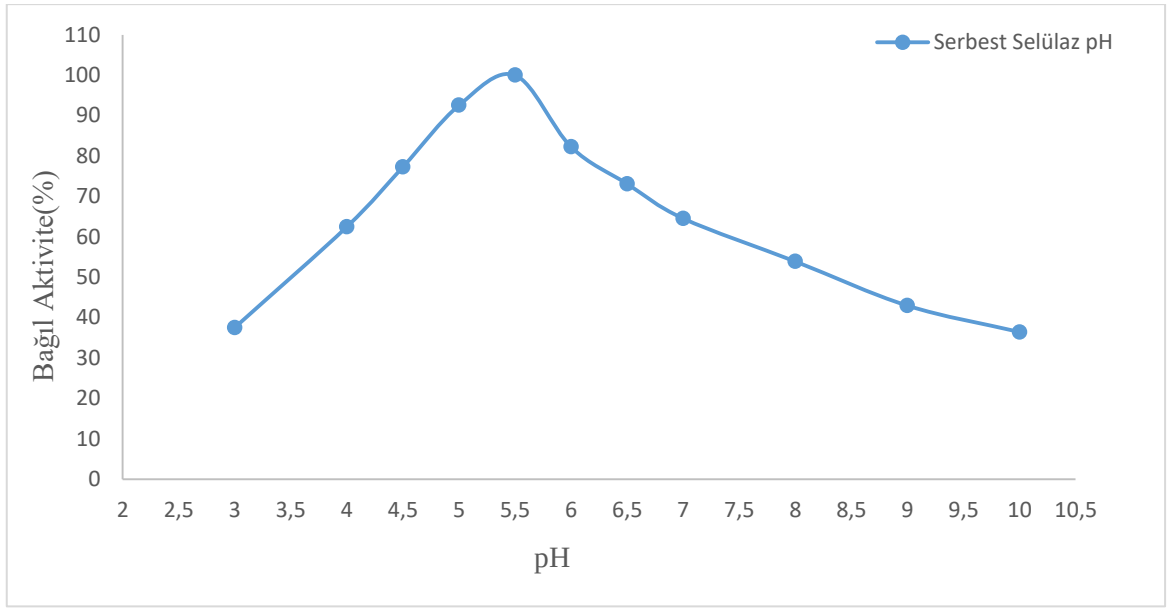
Serbest Selüloz Optimum pH Değeri

Serbest selülozın uç pH'larda aktivitelerinin düşük bir değere sahip olduğu görülmüştür (pH 3 - % 38; pH 10 - % 36). Aktivitenin pH 3.0-5.5 aralığında sürekli artıp pH 5,0'da aktivitesinin %92'sini gösterdiği ve pH 5,5 'a ulaştığında ise maksimum aktivitesinin %100 olduğu optimum pH değeri belirlenmiştir. Aktivitenin pH 5,5'ten sonra sürekli bir düşüşe geçtiği, pH 6,0 'da aktivitesinin %82'sini koruduğu fakat pH 5,5'ten sonra pH artıkça bağlı aktivitenin sürekli düştüğü ve pH 10'da ise yeniden minimum bir değere ulaştığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.1 ve şekil 4.2' deki grafik üzerindeki veriler incelendiğinde serbest enzimin pH 5,0-6,0 aralığında aktivitesi %92 ile 82 aralığında değiştiği ve en yüksek aktivitelere bu aralıkta sahip olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre serbest enzimin en uygun kullanım aralığının pH 4,5 ile 6,5 aralığında olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.1 Serbest selülozın pH 'ya bağlı aktivite değişim çizelgesi

Serbest Selüloz	pH										
	3	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	8,0	9,0	10,0
Bağlı Aktivite(%)	38	62	77	92	100	82	73	64	54	42	36



Şekil 4.2 Serbest selülazın optimum pH grafiği

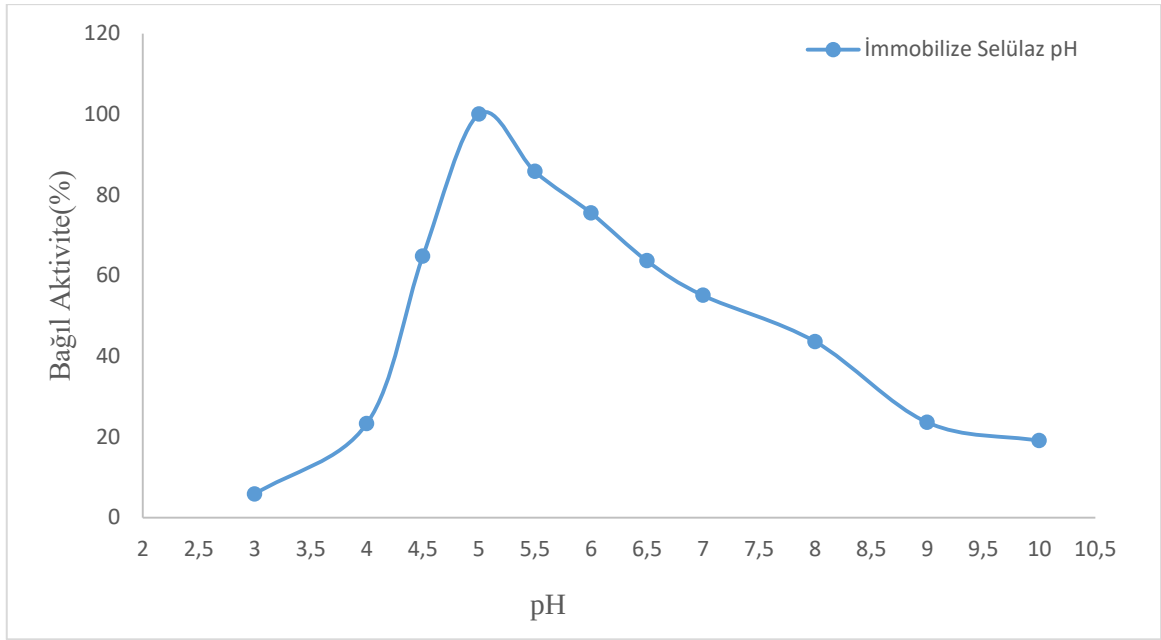
İmmobilize Selülazın Optimum pH Değeri

Bağlı aktivite incelendiğinde, serbest selülazın optimum pH değeri 5.5 iken immobilize selülazın optimum pH değeri, 0,5 birim asidik yöne kaymış ve optimum pH 5,0 olarak belirlenmiştir. İmmobilize selülazda aktivitenin pH; 3.0-5.0 aralığında sürekli artıp pH 5,0'da maksimum aktivitesinin %100 olduğu gözlenmiştir. Serbest selülazın optimum pH'sının immobilizasyon işleminden sonra asidik ortama kayması PVA' nın sahip olduğu H^+ iyonlarının etkisiyle olduğu düşünülmüştür. Aktivitenin pH 5,0'dan sonra ise bir düşüşe geçtiği, pH 5,5 'te aktivitenin %85 olduğu ve pH 10'da ise yeniden minimum bir değere ulaştığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.2 ve şekil 4.3' deki grafik üzerindeki veriler incelendiğinde immobilize enzimin en yüksek aktiviteye sahip olduğu pH aralığı 5,0-5,5 olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre immobilize enzimin en uygun kullanım aralığının pH 5,0 ile 6,0 aralığında olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.2 İmmobilize selülazın pH 'ya bağlı aktivite değişim çizelgesi

İmmobilize Selülaz	pH										
	3	4,0	4,	5,0	5,	6,	6,5	7,	8,0	9,0	10,
Bağlı Aktivite(%)	5	23	65	10	85	75	63	55	43	23	19

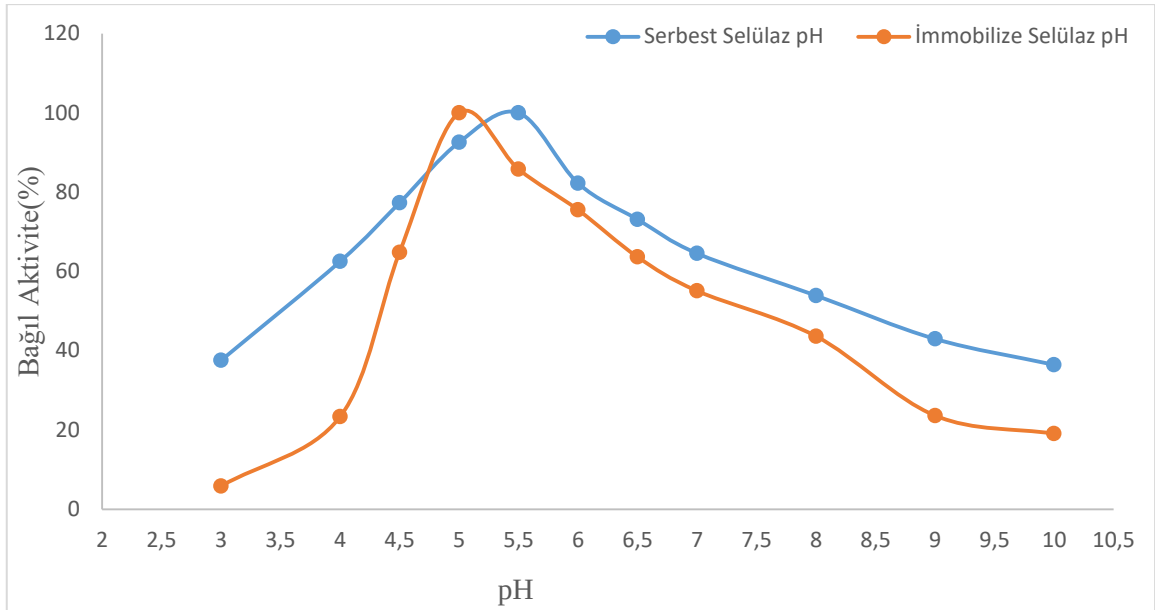


Şekil 4.3 İmmobilize selülaazın optimum pH grafiği

Serbest ve immobilize selülaazların aktiviteleri incelendiğinde, 3,0-10,0 pH aralığında karşılaştırma yapılmıştır. pH 5,0'a kadar immobilize enzim, serbest enzime göre daha düşük bir aktiviteye sahipken pH 5,0'da, %100 aktivite gösterdiği görülmüştür. Serbest selülaazın yüksek aktivite gösterdiği pH aralığı immobilize selülaaza göre biraz daha geniştir. pH 3,0- 4,0- 9,0 ve 10,0'da immobilize selülaazın çok düşük bir aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Serbest selülaazın ise pH 3,0 ve 10,0 olan uç pH'larda çok düşük aktivite gösterdiği gözlenmiştir.

Çizelge 4.3 Serbest ve immobilize selülaazların bağıl aktivitelerinin pH 'ya bağlı değişiminin birlikte gösterimi

	pH										
	3,0	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	8,0	9,0	10,0
Bağıl Aktivite(%) (Serbest)	38	62	77	92	100	82	73	64	54	42	36
Bağıl Aktivite(%) (İmmobilize)	5	23	76	100	85	75	63	55	43	23	19



Şekil 4.4 Serbest ve immobilize selülazların optimum pH 'larının birlikte gösterim grafiği

Serbest selülazda olduğu gibi immobilize selülazda da daha asidik ya da bazik ortama doğru kayıldığında aktivitede düşüş yaşandığı gözlenmiştir. Serbest selülazın daha az aktivite gösterdiği 4,5-5,0 pH aralığında immobilize selülazın daha yüksek bir aktiviteye sahip olması bu aralıkta pH değişikliğine karşı immobilize selülazın daha etkili olduğunu göstermektedir.

4.1.2.b. Serbest ve İmmobilize Selülazın Optimum Sıcaklık Değeri

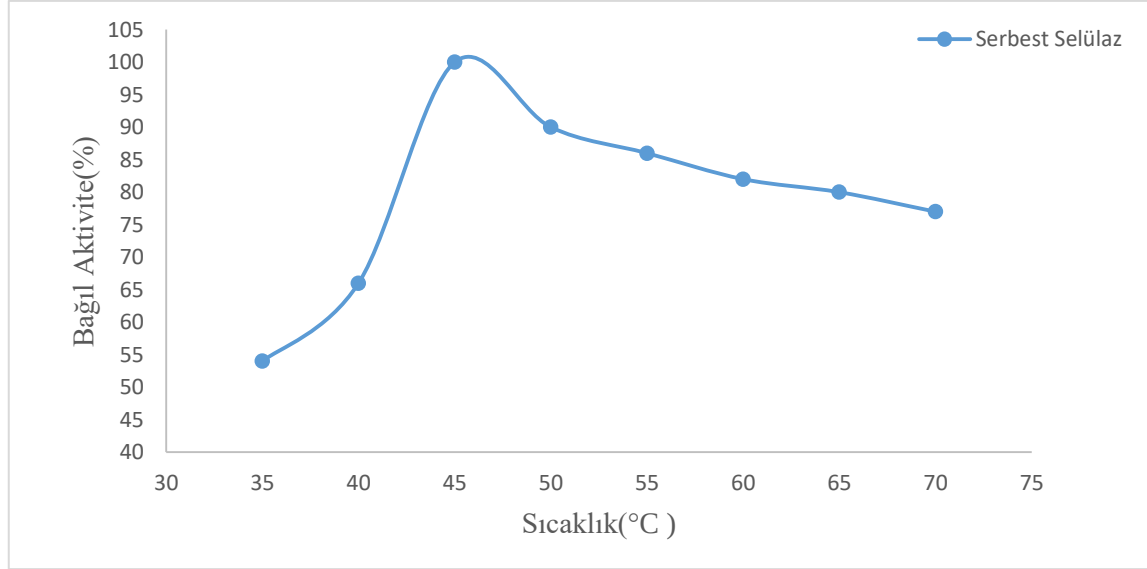
Serbest ve immobilize selülaz örneklerinin aktiviteleri üzerinde sıcaklığın da etkisi bulunmaktadır. Bu etkiyi incelemek üzere serbest selülaz enziminin 100 mM pH 5,5 (optimum pH) asetat tamponu ve immobilize enzim için ise 100 mM pH 5,0 (optimum pH) asetat tamponu hazırlanarak farklı sıcaklıklarda (35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 °C) aktiviteleri ölçülmüştür. Aktivitenin sıcaklığa bağlı değişimi grafik ve çizelgeler üzerinde gösterilerek sıcaklık değişiminin aktivite üzerindeki etkisi incelenmiştir. En yüksek aktiviteye sahip optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir.

Serbest Selülazın Optimum Sıcaklık Değeri

Serbest enzim aktivitesinin 35 ile 45 °C sıcaklık aralığında sürekli arttığı görülmüş ve aktivitenin en yüksek (%100) olduğu 45 °C, optimum sıcaklık değeri olarak belirlenmiştir. Optimum sıcaklık değeri olarak belirlenen 45 °C'den sonra aktivitede tekrar bir düşüş yaşanmaya başlansa da 45-70 °C sıcaklık aralığındaki yüksek aktivite değerleri 45 °C sıcaklık öncesine göre daha yüksektir. Optimum üstü sıcaklık değerlerinde, optimum altı sıcaklık değerlerine göre aktivitenin yüksek olması serbest enzim için daha kullanışlı bir alan sunmuştur.

Çizelge 4.4 Serbest selülaazın sıcaklığa bağlı aktivite değişim çizelgesi

Serbest Selülaaz	Sıcaklık (°C)							
	35	40	45	50	55	60	65	70
Bağlı Aktivite (%)	54	66	100	90	86	82	80	77



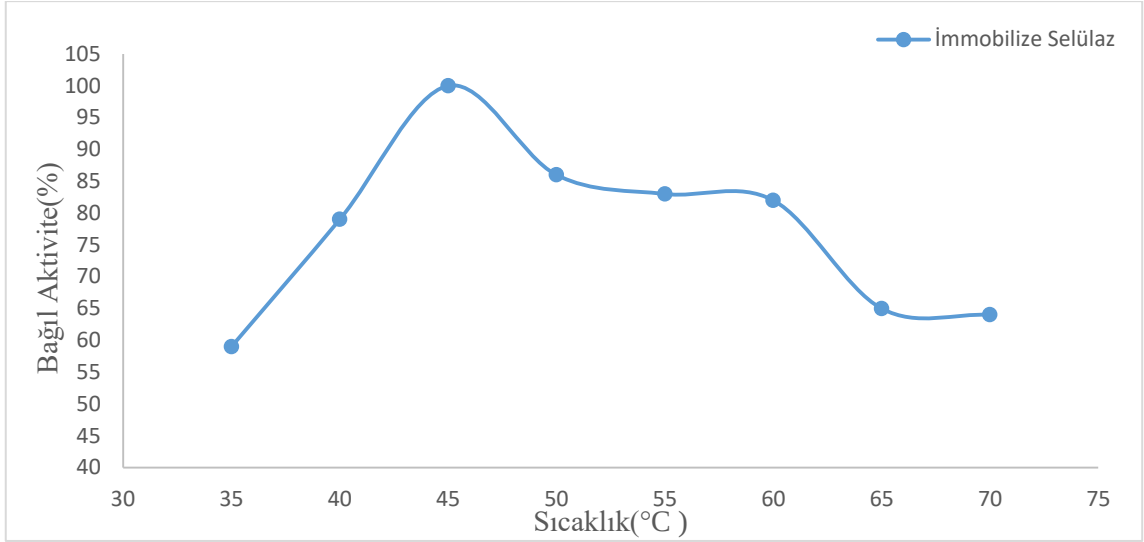
Şekil 4.5 Serbest selülaaz enzimi optimum sıcaklık grafiği

İmmobilize Selülaazın Optimum Sıcaklık Değeri:

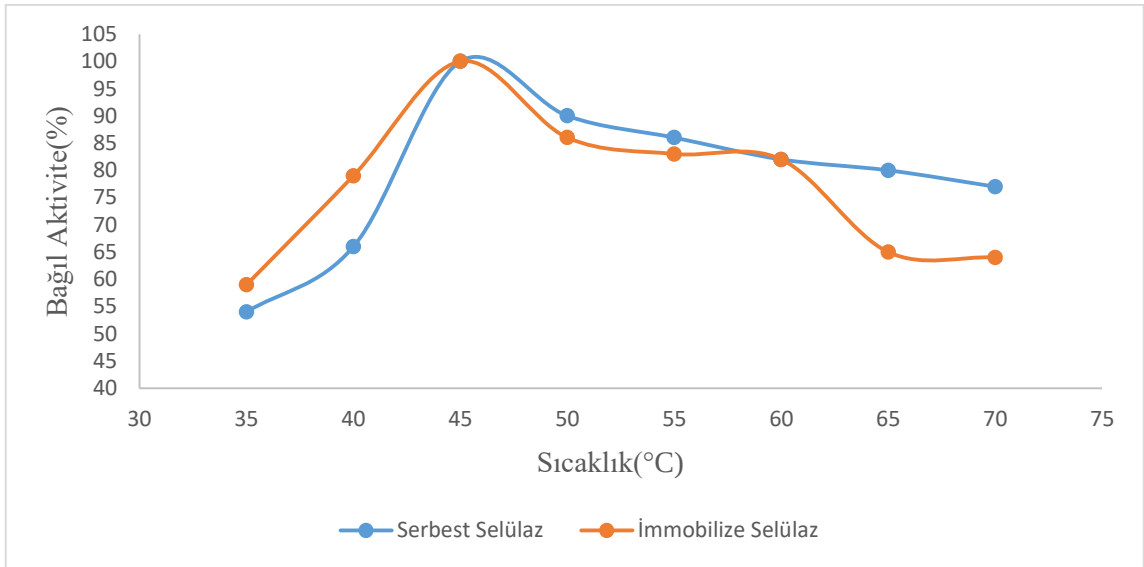
İmmobilize enzim aktivitesinin de serbest enzimde olduğu gibi 35 ile 45 °C sıcaklık aralığında sürekli arttığı görülmüş ve aktivitenin en yüksek (%100) olduğu 45 °C, optimum sıcaklık değeri olarak belirlenmiştir. İmmobilize selülaazın 40 ve 60 °C aralığında yüksek bir aktivite aralığına sahip olduğu görülmüştür. İmmobilizasyon işlemi, enzimin optimum sıcaklığında bir değişikliğe sebep olmamış fakat optimum altı sıcaklıklarda az da olsa daha yüksek bir aktivite göstermesini sağlamıştır. 65 ve 70 °C sıcaklık aralığında ise tam tersi bir etki ile aktivitede serbest enzime göre bir düşüş gözlenmiştir.

Çizelge 4.5 İmmobilize selülaazın sıcaklığa bağlı aktivite değişim çizelgesi

İmmobilize Selülaaz	Sıcaklık (°C)							
	35	40	45	50	55	60	65	70
Bağlı Aktivite (%)	59	79	100	86	83	82	65	64



Şekil 4.6 PVA ile immobilize edilmiş selüloz enzimler için optimum sıcaklık grafiği



Şekil 4.7 Serbest ve immobilize selülozların optimum sıcaklıklarının birlikte gösterimi

Serbest ve immobilize selülozların aktivitesi, 35-70 °C sıcaklık aralığında karşılaştırılmıştır. Hem serbest hem de immobilize selülozun ikisinde de optimum sıcaklık 45 °C olarak tespit edilmiştir. 35 ile 45 °C arasında immobilize selülozun serbest selüloza göre çok daha iyi bir stabilite sergilediği görülmüştür. Bu aralıkta sıcaklık yükseldikçe immobilize selülozun esnekliği artmış ve bu sayede substratın enzim katalitik merkezine daha verimli bir şekilde bağlandığı düşünülmüştür. İmmobilize enzim 40 °C' de yaklaşık %75'lik bir aktiviteye sahip iken serbest enzim aynı sıcaklıkta yaklaşık %60 'lık bir aktiviteye sahiptir. Bu sonuç, selülozun belirli bir sıcaklık aralığında immobilizasyonun sıcaklık direnci üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu göstermiştir. 45 ve 70 °C sıcaklık aralığında enzim stabilitesi incelendiğinde ise bu sefer de serbest enzimin stabilitesinin immobilize enzime göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. 45 ve 60 °C sıcaklık aralığında sıcaklık artıkça serbest ve immobilize selülozun her ikisinin aktivitesinde de paralel bir düşüş yaşandığı gözlenmiştir. Fakat immobilize selülozun 45 °C üzerindeki sıcaklık

artışlarında aktivitesinin serbest enzime göre daha fazla etkilendiği görülmüş ve özellikle 60 °C'den sonra immobilize selülaaz aktivitesinde bir düşüş yaşanmıştır.

Çizelge 4.6. Serbest ve immobilize selülaazların bağıl aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişiminin birlikte gösterimi

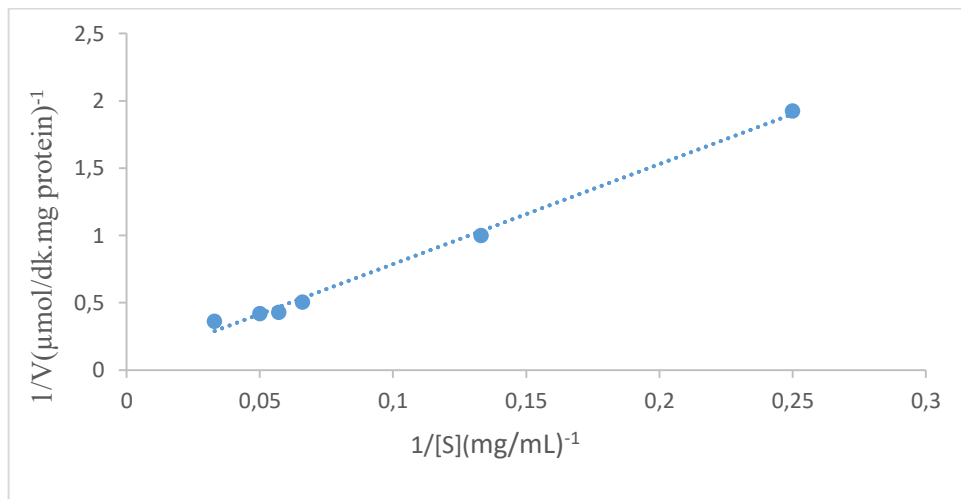
	Sıcaklık (°C)							
	5	0	5	0	5	0	5	0
Bağıl Aktivite(%) (Serbest)	4	6	00	0	6	2	0	7
Bağıl Aktivite(%) (İmmobilize)	59	79	100	86	83	82	65	64

4.1.2.c. Serbest ve İmmobilize Selülaza Ait Kinetik Parametreler

Serbest ve immobilize selülaaz için belirlenen optimum koşullarda (serbest için pH:5,5- sıcaklık 45 °C ve immobilize için pH:5,0- sıcaklık: 45 °C) % 0,00625 , %0,125 , %0,25 , %0,40 , %0,50 , %0,75 , %1 , %1,5 , %1,75 , %2 ve %3 derişimine sahip CMC çözeltileri kullanılarak serbest ve immobilize selülaazların absorbans değerleri ölçülmüş ve spesifik aktiviteleri hesaplanmıştır. Serbest ve immobilize selülaaz için ayrı ayrı “Lineweaver-Burk Grafiği” 1/S’ye karşı 1/V değerleri hesaplanarak çizilmiştir. Enzimatik reaksiyona ait Km, Vmax, kcat ve kcat/Km gibi kinetik parametreler, Lineweaver ve Burk(1934) metoduna göre çizilen doğrusal grafik kullanılarak aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır:

$$V = \frac{(Km)}{(Vmax)} \times \left(\frac{1}{[S]} \right) + \left(\frac{1}{Vmax} \right) \quad (4.1)$$

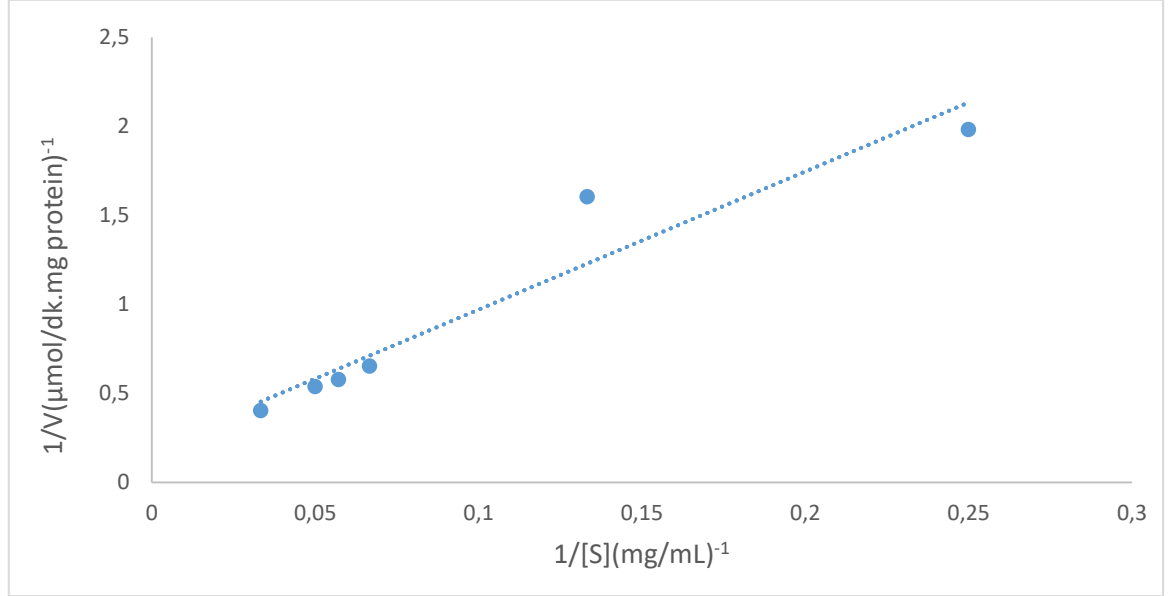
Serbest Selülaza Ait Kinetik Parametreler



Şekil 4.8 Serbest selülaaz için Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 4.8'deki grafikten elde edilen $y = 7,4293x + 0,0442$ denklemine göre serbest selüloz için Michaelis-Menten katsayısı (K_m) 168,08 mg/mL; maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) 22,62 U/mg protein; turnover sayısı (k_{cat}) 705,86 dk⁻¹; katalitik etkinlik (k_{cat}/K_m) 4,20 dk⁻¹(mg/mL)⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

İmmobilize Selüloza Ait Kinetik Parametreler



Şekil 4.9 PVA ile immobilize edilmiş selüloz için Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 4,9'daki grafikten elde edilen $y = 7,7543x + 0,1954$ denklemine göre immobilize selüloz için Michaelis-Menten katsayısı (K_m) 39,68 mg/mL; maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) 5,12 U/mg protein; turnover sayısı (k_{cat}) 159,68 dk⁻¹; katalitik etkinlik (k_{cat}/K_m) 4,02 dk⁻¹ (mg/mL)⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.7. Optimum koşullarda serbest ve immobilize selüloza ait kinetik parametreler

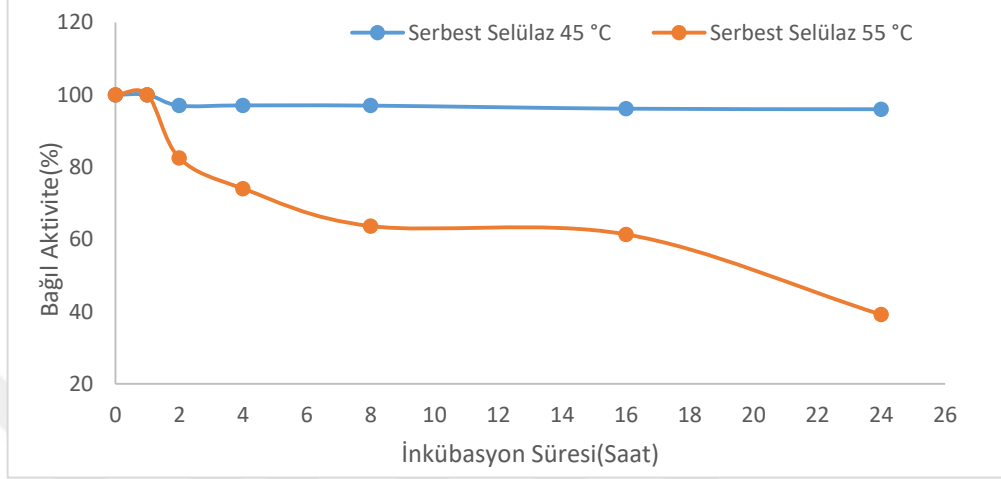
	pH / Sıcaklık (°C) (Optimum koşullar)	K_m (mg/mL)	V_{max} (U/mg protein)	k_{cat} (dk ⁻¹)	k_{cat}/K_m dk ⁻¹ (mg/mL) ⁻¹
Serbest Selüloz	5,5 / 45	168,08	22,62	705,86	4,20
İmmobilize Selüloz	5,0 / 45	39,68	5,12	159,68	4,02

4.1.2.d. Serbest ve İmmobilize Selülazın Termal Kararlılığı

Serbest ve immobilize selüloza ait optimum pH ve sıcaklık değerleri (Serbest enzim için optimum pH 5,5-optimum sıcaklık 45 °C ve immobilize selüloz için optimum pH 5,0-optimum sıcaklık 45 °C) tespit edilmiştir. Serbest ve immobilize selülazların termal kararlılıkları araştırılırken tespiti yapılmış optimum koşullarda inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Serbest

selüla 100 mM pH 5,5 asetat tamponunda ve immobilize selüla ise 100 mM pH 5,0 asetat tamponunda 45 ve 55 °C’de 1, 2 4, 8, 16, 24 saat aralıklarında inkübe edilerek kalan aktiviteleri ölçölmüştür.

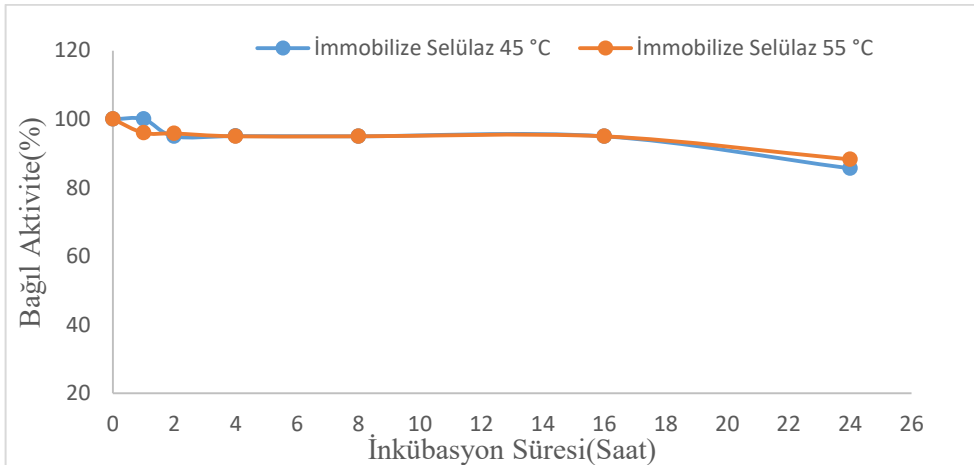
Serbest Selüla ın Termal Kararlılığı



Şekil 4.10 Serbest selüla aktivitesinin inkübasyon süresine bağı değışimi

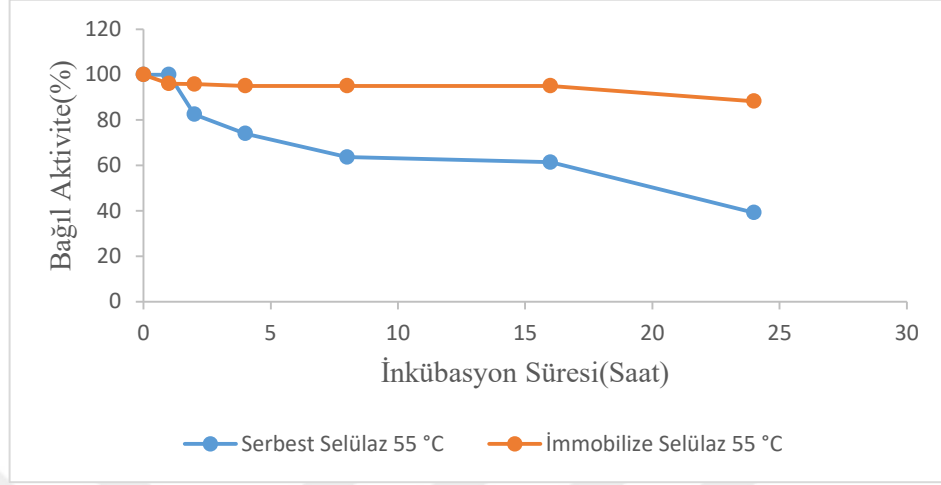
Serbest selüla , 45 °C’de ilk 8 saat aktivitesinin %97’sini korurken, 24 saat sonunda bağı l aktivitesi %96’ya düşmüş ve aktivitesinde büyük bir kayıp yaşanmamıştır. Serbest selüla 55 °C’de ise ilk 8 saat aktivitesinin % 63’ünü korurken, 24 saat sonunda bağı l aktivitesi %39 olarak ölçölmüştür. 55 °C’de ölçölen aktivite kaybının 45 °C’deki kayba göre çok daha büyük bir kayıp olduğu görölmüştür. Belirlenen bütün zaman aralıklarında aynı durumun yaşandığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.10.).

İmmobilize Selüla ın Termal Kararlılığı



Şekil 4.11 İmmobilize selüla aktivitesinin inkübasyon süresine bağı l değışimi

İmmobilize selüloz, 45 °C’de ilk 8 saat aktivitesinin %95’ini korurken 24 saat sonunda bağıl aktivitesi %85’e düşmüştür (Şekil 4.11). 55 °C’de ise ilk 8 saat aktivitesinin yine %95’ini korurken 24 saat sonunda bağıl aktivitesi %88 olarak ölçülmüştür.



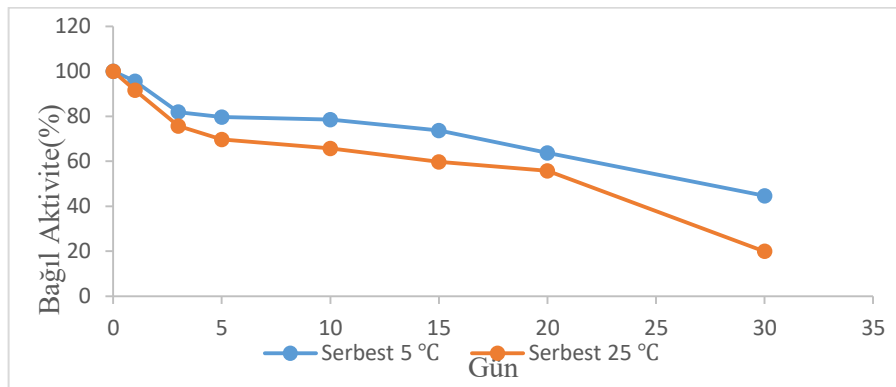
Şekil 4.12 Serbest ve immobilize selüloz aktivitesinin 55 °C’de inkübasyon süresine bağlı değişimi

55 °C’de 24 saat boyunca yapılan inkübasyon sonunda serbest selüloz denatüre olarak aktivitesinin yaklaşık %61’ini kaybederken immobilize selüloz ise aktivitesinin yaklaşık %12’sini kaybetmiştir. İmmobilize enzimin serbest enzime göre yüksek sıcaklığa olan dayanıklılığının daha fazla olduğu görülmüştür.

4.1.2.e. Serbest ve İmmobilize Selülozun Depolama Kararlılığı

Saklama koşulları değiştirilerek serbest ve immobilize selüloza ait depolama kararlılığı incelenmiştir. Serbest selüloz ve PVA ile immobilize edilmiş selülozun depolama kararlılığının tespiti için 5 ve 25 °C sıcaklıklarda 30 gün boyunca belirli aralıklarla enzimlere ait aktiviteler ölçülmüştür.

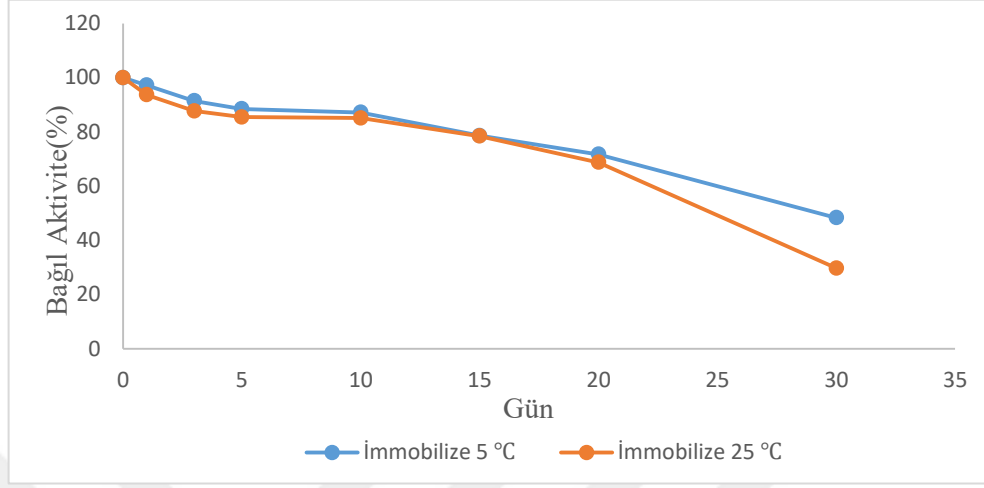
Serbest Selülozun Depolama Kararlılığı:



Şekil 4.13 Serbest selülozun 5 ve 25 °C’deki depolama kararlılığı

Serbest selüloz, 5 °C’de 30 gün sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık %45’ini korurken, 25 °C’de yaklaşık %20’sini korumuştur.

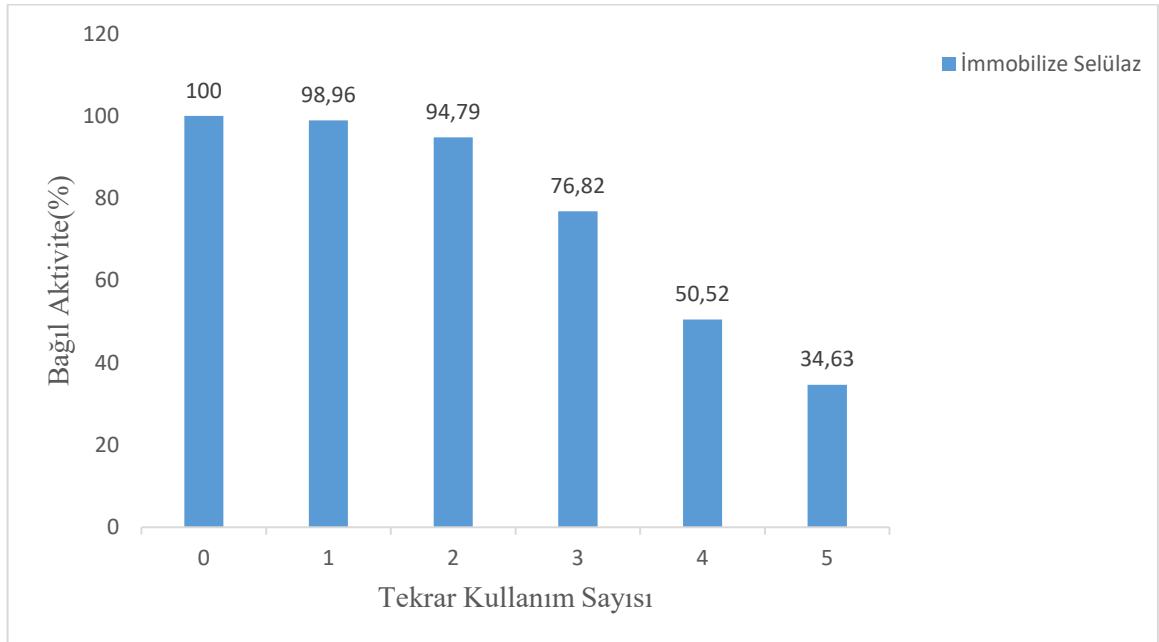
İmmobilize Selülozın Depolama Kararlılığı



İmmobilize selülozın 5 ve 25 °C’deki depolama kararlılığı

İmmobilize selüloz, 5 °C’de 30 gün sonunda başlangıç aktivitesinin %48’ini korurken, 25 °C’de yaklaşık %30’unu korumuştur.

4.1.2.f. İmmobilize Selülozın Tekrar Kullanım Kararlılığı



Şekil 4.14 İmmobilize selülozın tekrar kullanım kararlılığı

Yaptığımız çalışma sonucunda PVA ile immobilize edilmiş selüloz enziminin 4. kullanımından sonra bağlı aktivitesini %50 oranında koruduğu görülmüştür. Kullanım sayısı

artıkça immobilize enzimin aktivitesi azalırken 5. kullanımdan sonra ilk kullanıma göre aktivitesinin yaklaşık %35'ini koruyabilmiştir.

4.2. Tartışma

Bu çalışmada polivinil alkol hidrojelinde, selüloz enziminin tutuklama yöntemi ile immobilizasyonu yapılmış ve karakterizasyonu incelenmiştir. Enzimlerin polivinil alkol hidrojelinde hapsedilmesi; jelin hazırlamasında kolaylık ve basitlik, daha ucuz matris maliyeti, düşük difüzyon limitler, mekanik etkilere karşı direnç ve reaksiyon karışımından ayırma kolaylığı gibi bazı avantajlar sağlar (Rebros ve ark., 2013; Toprak ve ark., 2021). Bu avantajların yanı sıra PVA, bir hidroksi polimer olması sebebiyle yapısında çok sayıda -OH grubu taşır ve bu özellik PVA'ya hidrofilik bir karakter kazandırır. Bu hidrofilik karakter, immobilizasyon ile selüloz-substrat arasındaki etkileşimi artırabilir. Çalışmamızda PVA, su kullanılarak hidrojel haline getirilmiş ve destek materyal gözenekli bir yapıya kavuşmuştur. Bu sayede immobilizasyonda difüzyon sınırlamalarının da azaltıldığı düşünülmüştür. PVA'nın sağladığı tüm bu avantajların yanında immobilize enzimin katalitik veriminin serbest enzimin katalitik verimine çok yakın bir değerde elde edilmesi, polivinil alkol jel immobilizasyonunun çalışmamızda tercih edilmesini sağlamıştır.

Her enzim için aktivitelerinin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer. Bununla beraber bütün enzimlerin pH-aktivite eğrileri aynı şekilde değildir (Bhat, 2000). İmmobilizasyon, pH optimumunda bir kaymaya ve çevredeki pH'ya karşı yüksek toleransa neden olabilir (Klein ve diğerleri, 2013, Oliveira ve diğerleri, 2020; Xu ve diğerleri, 2015). Jiang ve ark (2017) göre; genel olarak selüloz, 5,0-6,0 pH seviyesinde nispeten yüksek aktiviteler göstermektedir. Çalışmamızda PVA'nın *Aspergillus sp.* kaynaklı selülozın immobilizasyonunda kullanılması sonucu optimum pH'da değişiklik gözlenmiştir. Serbest selülozın optimum pH değeri 5.5 iken immobilize selülozın optimum pH değeri 5,0 olarak belirlenmiştir. İmmobilizasyon sonucu enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri, 0,5 birim asidik yönde kayma göstermiştir. Enzim ve destek arasındaki etkileşimin bir sonucu olarak enzim çevresindeki grupların değişmesi bu kaymaya sebep olmuş olabilir. Serbest selülozın %92 aktivite gösterdiği pH 5,0'da immobilize enzimin %100 aktivite göstermesinin selüloz ile PVA arasındaki etkileşimin bir sonucu olduğu düşünülmüştür. Zaten asidik olan selülozın PVA ile immobilizasyonu sonucu asidik ortama olan direncinin arttığı sonucuna ulaşılmıştır. pH'daki azalmanın etkisiyle enzim yapısında bazı konformasyonel değişikliklerin de meydana gelebileceği düşünülmüştür. Zarta ve ark (2017), *Aspergillus niger* kaynaklı selülozı sentezlenen bir TiO₂-lignin hibrit desteği üzerine immobilize etmişlerdir. Maksimum bağıl aktivite, serbest selüloz için pH 5,5'te ve immobilize enzim için pH 6,0'da kaydedilmiştir. Yapılan çalışmada bağıl aktivite-pH grafiği incelendiğinde serbest ve immobilize selülozların benzer eğilimler göstermesine rağmen, immobilize selülozın aynı pH koşullarında serbest olanlardan daha yüksek bağıl aktiviteye sahip

olduğu bildirilmiştir. Nayeri ve ark (2023), selülag enzimini Fe_3O_4 ve $NiFe_2O_4$ manyetik parçacıkları üzerine immobilize etmişlerdir. İmmobilize selülagın bağıl aktivitesi üzerinde pH'nın etkisini gözlemlemek için pH 4-8 aralığında inceleme yapmışlardır. Hem serbest selülag hem de immobilize selülaglar için optimum pH değeri 5 olarak tespit edilmiş ve immobilizasyon ile pH'da bir değişimin gözlenmediği bildirilmiştir. Fakat serbest selülagın sahip olduğu pH değerlerinde, immobilize selülagın sahip olduğu aktivite değerlerinin serbest selülagdan çok daha fazla olduğu belirtilmiştir. Papadopoulou ve ark (2019), *Trichoderma reesei* kaynaklı selülag enzimini MHPC nanomalzemeleri üzerine kovalent veya kovalent olmayan bağlanma yöntemiyle immobilize etmişlerdir. Optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla pH 3-8 aralığında inceleme yapılmış ve hem serbest hem de kovalent olarak immobilize edilmiş selülagın pH 5,5'te en yüksek katalitik aktiviteyi sergilediği bildirilmiştir.

İmmobilize enzimin optimum reaksiyon sıcaklığı serbest olana göre artabilir, azalabilir veya değişmeyebilir muadilleri ve her türden birkaç örnek daha önce rapor edilmiştir (Akkaya ve ark., 2009). Çalışmamızda sıcaklığın serbest ve immobilize selülag örneklerinin aktiviteleri üzerindeki etkisini görmek için elde edilen sonuçlar incelenmiş ve her ikisi için de maksimum aktivitenin 45 °C sıcaklıkta gözlemlendiği belirlenmiştir. İmmobilizasyon işlemiyle optimum sıcaklıkta değişiklik olmamıştır. Serbest ve immobilize enzimin optimum sıcaklık değeri olan 45 °C 'den sonra her ikisi için de artan sıcaklıkla birlikte aktivitelerinde sürekli bir düşüş yaşanmıştır. Bu durum, yüksek sıcaklıkla enzim yapısında meydana gelebilecek denatürasyonu düşündürmüştür. Zhou (2010), çalışmasında selülag enzimini N-süksinil-kitosan (NSC) üzerine immobilize etmiş ve sıcaklığın selülag aktivitesi üzerindeki etkisini gözlemlemek amacıyla 35-65 °C sıcaklık aralığında inceleme yapmıştır. Hem serbest hem de immobilize enzimin optimum sıcaklığının 45 °C olduğunu tespit etmiştir. Duman ve ark (2020) vermikülit üzerine selülagı adsorpsiyon yoluyla immobilize etmişler ve sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Buna göre hem serbest selülag hem de vermikülit üzerine immobilizasyonu sağlanan selülagın 45 °C sıcaklıkta en yüksek aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Huang ve ark (2020) ise selülag enzimini manyetik $Fe_2O_3/Fe_3O_4/SiO_2/CHO$ nanokompozit destek materyali üzerine immobilize etmişlerdir. Serbest selülag 45 °C sıcaklığında en yüksek bağıl aktiviteye sahip iken immobilize selülagın 60 °C de en yüksek bağıl aktiviteye sahip olmasının immobilize selülagın yüksek sıcaklığa daha dayanıklı olduğunu ve immobilizasyonun serbest enzimin ısı direnci üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Dinçer ve ark (2007) *Aspergillus niger* kaynaklı selülag enzimini modifiye edilmiş PVA kaplı kitosan boncuklar üzerine immobilize etmişler ve sıcaklığın aktivite üzerindeki etkisini incelemek amacıyla 4-65 °C sıcaklık aralığında çalışmışlardır. Hem serbest hem de immobilize enzimin optimum sıcaklığının 40 °C olduğunu bulmuşlardır.

Çalışmamızda farklı derişimlerde CMC çözeltileri hazırlanarak kinetik parametreler olan "Km, Vmax, kcat ve kcat/Km" değerleri Lineweaver-Burk grafiğı kullanılarak hesaplandığında serbest ve immobilize selülag a ait bu değerlerin birbirinden farklı olduğu görülmüştür. Km değeri,

serbest ve immobilize selülag için sırasıyla 168,08 mg/mL ve 39,68 mg/mL olarak hesaplanmıştır. İmmobilizasyon sonucu K_m değeriinde bir azalma yaşanmıştır. K_m 'deki azalma enzimin substrata olan ilgisindeki artışın bir göstergesidir. PVA'nın sahip olduğu hidrofilik yapının immobilize enzim-substrat özgülüğüne katkı sağlayarak selülagın CMC'ye olan ilgisinde artışa sebep olabileceğı düşünölmüştür. Bu sayede CMC'nin immobilize selülagın aktif bölgesine daha güçlü bir şekilde bağlanabileceğı tahmin edilmiştir. V_{max} değeri, serbest ve immobilize selülag için sırasıyla 22,62 U/mg protein ve 5,12 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. V_{max} değeriinde bir azalma olduğu görölmüştür. PVA'nın hidrofilik yapısı etkisiyle immobilize enzim-substrat arasında oluşın güçlü bağlanma ve immobilizasyon ile enzimin hidrojel içinde hareket alanının kısıtlanması gibi nedenler V_{max} 'ta azalmaya neden olmuş olabilir. Ayrıca immobilizasyon işlemiyle PVA'nın selülag yapısındaki proteinlerle kurabileceğı olası zayıf etkileşimler de selülagın kompleks yapısının bozulmasına ve buna bağlı olarak immobilize selülagın aktif bölgelerinin bir kısmının engellenmesine ya da değişimine sebebiyet vermiş olabilir. k_{cat} ve k_{cat}/K_m değeriiler ise serbest selülag için sırasıyla $705,86 \text{ dk}^{-1}$ ve $4,20 \text{ dk}^{-1} \cdot (\text{mg/mL})^{-1}$ olarak hesaplanırken immobilizasyon işlemi sonucunda ise $159,68 \text{ dk}^{-1}$ ve $4,02 \text{ dk}^{-1} \cdot (\text{mg/mL})^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. İmmobilizasyonla k_{cat} (turnover sayısı) değeri düşerken k_{cat}/K_m (katalitik verimlilik) değeriinde birbirine oldukça yakın değeriiler elde edilmiştir. Asli ve ark (2016) *Aspergillus niger* kaynaklı selülagı PEG (polietilen glikol) yüzeyine immobilize ederek serbest ve immobilize selülagı aıt kinetik parametreleri hesaplamışlardır. Belirledikleri optimum koşullarda serbest selülagın K_m değeriinin 171,8 mg/mL olduğunu, immobilizasyon ile birlikte K_m değeriinin arttığını ve 179,2 mg/mL olarak hesaplandığını bildirmişlerdir. Dal (2018) yaptığı çalışmasında destek materyali olarak birlikte çöktürme yöntemiyle sentezlenen manyetit (Fe_3O_4) kullanmış ve selülag enziminin kovalent olarak immobilizasyonunu gerçekleştirmiştir. Farklı substrat derişimlerinde ölçölen aktiviteler sonucu serbest ve immobilize selülag enzimi için K_m değeriiler sırasıyla 155,25 ve 23,64 mg/ml iken V_{max} değeriiler ise sırasıyla 2500 ve 108,69 $\mu\text{mol/ml.dk}$ olarak bildirilmiştir. Huang ve ark (2022)'nın yaptığı çalışmada da selülag enziminin immobilizasyonu sonucunda K_m ve V_{max} değeriilerinde düşüş yaşandığı bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada serbest selülag ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\&\text{SiO}_2$ 'nin üzerine immobilize edilmiş selülagın K_m 'sinin sırasıyla, 0,0125 ve 0,015 mg/mL olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, substrat olarak kullanılan CMC ile selülag enzimi arasındaki afinitenin immobilizasyondan sonra azalmasının göstergesi olarak ifade edilmiştir. Serbest ve immobilize selülagın V_{max} 'ı ise sırasıyla 5,0 ve 0,833 mmol/dak olarak tespit edilmiştir. Bu durumun ise katalitik verimliliğinin immobilizasyondan sonra azalmasının bir göstergesi olarak göröldüğü ifade edilmiştir. Gadaka ve ark (2021)'nın yaptığı çalışmada ise termitlerden (*Macrotermes bellicosus*) kısmen saflaştırılmış selülag, kalsiyum aljinat boncuklar üzerine hapsedilerek immobilize edilmiştir. Yaptıkları kinetik çalışmalar sonucunda hem serbest hem de immobilize selülagın her ikisinin de K_m ve V_{max} değeriilerinin azaldığı bildirilmiştir. Serbest ve immobilize selülag için sırasıyla K_m değeriiler 7,953 mg/ml ve 3,455 mg/ml iken V_{max} değeriiler ise 1,593 ünite/mL ve

1,154 ünite/mL olarak hesaplanmıştır. İmmobilize selülozün V_{max} değeriindeki düşüşün substratın immobilize selülozün aktif bölgesine daha düşük erişilebilirliğinden kaynaklı olabileceği rapor edilmiştir.

Endüstriyel alanda çoğu zaman yüksek sıcaklıklarda çalışma ihtiyacı doğar. Fakat yüksek sıcaklıklarda enzimlerle çalışıldığında birçok enzimin yapısında denatürasyon meydana gelir. Yüksek sıcaklıklarda inkübe edilen serbest enzimin aktivitesinde meydana gelebilecek düşüş, enzime yapılan immobilizasyon işlemi ile en aza indirilmeye çalışılır. Serbest ve immobilize enzimin termal kararlılıklarının kıyaslanması immobilizasyon işleminin önemini anlamak adına faydalı bir kriter olacağı için çalışmamızda serbest ve immobilize selüloza ait 45 ve 55 °C sıcaklıklarda 24 saatlik inkübasyon süresince elde edilen bağıl aktivite değerleri kullanılarak kıyaslamalar yapılmıştır. 45 °C sıcaklıkta 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda serbest ve immobilize selüloz sırasıyla bağıl aktivitesinin yaklaşık %96 ve %86'sını korurken 55 °C sıcaklıkta ise %39 ve %88'ini koruyabilmiştir. Serbest ve immobilize selüloz 45 °C'de benzer davranışlar sergilerken 55 °C sıcaklıkta immobilize selüloz, serbest selüloza göre daha yüksek bir termal kararlılık sergilemiştir. İnkübe edilen serbest enzimin sıcaklık artışı ile yapısında meydana gelebilecek denatürasyon aktivitesindeki düşüşe neden olmuş olabilir. 55 °C sıcaklığa karşı immobilize selülozün serbest selüloza göre daha dayanıklı olduğu görülmüştür. Selülozün PVA ile immobilizasyonu sonucu sıcaklığın enzim üzerindeki olumsuz etkisinin minimize edilebileceği gösterilmiştir. Özyılmaz ve ark (2021)'nin yaptığı çalışmada selüloz immobilizasyonu için yenilenebilir manyetik nanopartiküller hazırlanmıştır. Yenilenebilir manyetik nanopartiküller elde etmek için, başlangıç malzemesi olarak trietoksi (3-izosiyanatopropil) silan ve iminodiasetik asit (IZ) kullanılmış ve Fe_3O_4 nanopartikülleri üzerinde immobilize edilmiştir. Fe-IZ nanopartiküllerine bakır iyonları (Cu^{2+} iyonları) yüklenmiş ve selüloz immobilizasyonu için kullanılmıştır. Serbest ve Fe-IZ-Cu ile immobilize edilmiş selülozün 60 °C'de 3 saat süreyle inkübe edildiği ve inkübasyona başladıktan 2 saat sonra serbest selülozün aktivitesinin %50'si korunurken immobilize selülozün aktivitesinin ise yaklaşık %77'sinin korunduğu bildirilmiştir.

Serbest enzimler, kendi ortamlarında olmayıp örneğin bir çözelti ortamında olduğunda kısa bir süre içinde çoğunlukla stabilitelerinde düşüşler ve yapısal anlamda bozulmalar yaşayabilir. Bu sebeple enzimlerin kendi ortamları dışında depolanması ve saklanması gibi özellikler endüstriyel alanda önemli bir faktördür. Çalışmamızda serbest ve immobilize selülozün depolama süresinin enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. 5 °C'de 30 gün sonunda, serbest selüloz başlangıç aktivitesinin yaklaşık %45'ini korurken immobilize selüloz %48 'ini korumuştur. 25 °C'de 30 gün sonunda serbest enzim aktivitesinin yaklaşık %20'sini korurken immobilize selüloz başlangıç aktivitesinin %30'unu korumuştur. Verilere göre serbest ve immobilize selülozün depolama kararlılıklarında paralel değerlere sahip olduğu fakat immobilize enzimin aktivite değerlerinde daha yüksek verim elde edildiği görülmüştür. Sui ve ark (2019)' nın yaptığı çalışmada selüloz, schiff bazı kullanılarak PU (poliüre) desteklerine immobilize edilmiştir. Bu çalışmada serbest ve

immobilize selülaazın depolama stabilitesini değerlendirmek amacıyla uzun bir süre her ikisi de 4 °C'de bekletilmiştir. 60 gün sonunda immobilize selülaaz başlangıç aktivitesinin yarısını korurken serbest selülaaz başlangıç aktivitesinin sadece %14 'ünü koruyabilmiştir. Böylece immobilize selülaazın depolama için daha uygun olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Bir enzimin tekrar kullanılabilme özelliğine sahip olması endüstriyel alanda büyük bir öneme sahiptir. Fakat serbest enzimin bu şekilde tekrar bir kullanımı pek mümkün olmazken immobilizasyon işlemi ile birlikte enzimin verimli bir şekilde tekrar kullanımı sağlanabilmektedir. Çalışmamızda PVA ile immobilize edilmiş selülaazın her kullanımdan sonra aktivitesi ölçülerek enzimin tekrar kullanılabilme kararlılığı (geri dönüşüm yeteneği) araştırılmıştır. İmmobilize selülaazın ilk üç, dört ve beş kullanımı başlangıç değeriyle kıyaslandığında bağıl aktivitesinin giderek azaldığı ve tekrar kullanımının 5.döngüsünde başlangıç aktivitesinin yaklaşık %35'ini koruduğu görülmüştür. Bu verilere göre ilk dört kullanıma kadar aktivitesinin yaklaşık yarısının korunması başarılmıştır. Denenen her tekrar sonucu PVA'nın sahip olduğu hidrojel yapı çözelti ortamında daha da şişerek gözenekli yapısının daha çok açılmasına neden olmuş olabilir. Gözeneklerin büyümesi enzim kaçınıtlarına sebebiyet vermiş ve bu da sonraki tekrarlara fırsat tanınmasına engel olmuş olabilir. Wu ve ark (2005) selülaazı, PVA ile elektrospinning yoluyla nanofibröz PVA/selülaaz membranlarına dönüştürmüşler ve ardından da elde ettikleri bu PVA/selülaaz membranlarının immobilizasyonunu çapraz bağlanma yoluyla glutaraldehit buharı kullanarak gerçekleştirmişlerdir. İmmobilize selülaazın başlangıç değerine kıyasla yüzde olarak bağıl aktivitesi yeniden kullanım süreleriyle birlikte azalmış ve immobilize enzimin beş yeniden kullanım döngüsünden sonra başlangıç aktivitesinin yaklaşık %40'ını koruduğu rapor edilmiştir. Katalitik aktivite kaybı da iki sebebe bağlanmıştır: Birincisi; PVA liflerine kimyasal olarak bağlanmamış sadece fiziksel olarak gömülmüş bazı selülaaz molekülleri ölçüm işlemi esnasında kaybolmuş olabilir, ikincisi; PVA'nın hidrofilik özelliği sebebiyle birkaç kullanımdan sonra PVA liflerinin çapı büyümüş ve yüzey alanı küçülmüştür. Huang ve ark (2020)'nın yaptığı çalışmada selülaaz enzimi manyetik Fe₂O₃/Fe₃O₄&SiO₂/CHO nanokompozit destek materyali üzerine immobilize edilmiştir. Her tekrar için ilk aktiviteye göre kalan aktivite hesaplanmıştır. Manyetik Fe₂O₃/Fe₃O₄&SiO₂/CHO selülaaz nanokompozitlerinin tekrar tekrar kullanılması nedeniyle meydana gelen immobilize selülaazın aktivitesinde kademeli olarak azalma yaşandığı bildirilmiştir. Beş döngüden sonra başlangıçtaki aktivitenin %71 'inden fazlasını, sekiz döngüden sonra ise hala aktivitesinin yarısından fazlasının (yaklaşık %52) korunmuş olduğunun gözlemlendiği ve değerlendirmeler sonucunda immobilizasyon selülaazının verimli bir şekilde kullanılabileceği bildirilmiştir. Gadaka ve ark (2021)'nın yaptığı çalışmada kalsiyum aljinat boncuklar üzerine hapsedilerek immobilizasyonu sağlanan selülaazın 5 döngüden sonra enzimatik aktivitesinin %50' sinden fazlasını koruduğu için yüksek bir geri dönüşüm verimliliğine sahip olduğu bildirilmiştir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. Serbest selüloz için optimum pH 5,5 iken immobilizasyonun etkisi ile immobilize selüloz için optimum pH 5,0 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre immobilizasyon işlemi ile selülazın pH 5,0 -5,5 aralığında asidik ortama olan uyumluluğu ve dayanıklılığı artırılmıştır.
2. Serbest ve immobilize selülazın her ikisi için de en yüksek aktivite gösterdikleri sıcaklık değeri (optimum sıcaklık) 45 °C olarak tespit edilmiştir. Selülazın PVA jel içerisindeki immobilizasyonunun optimum sıcaklık üzerinde bir etkisi olmamasına rağmen immobilizasyonun % aktivite-sıcaklık değişimine olan etkisi incelendiğinde özellikle 35-45 °C sıcaklık aralığında aktivitenin serbest selülaza göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. 35-45 °C sıcaklık aralığındaki sıcaklık artışına karşı immobilize selülazın dayanıklılığının serbest selülaza göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu sıcaklık aralığında PVA'nın, selülaz üzerinde olumlu bir etki oluşturduğu sonucuna ulaşılmıştır.
3. Serbest ve immobilize selülaz için belirlenen optimum koşullarda (serbest için pH:5,5- sıcaklık 45 °C ve immobilize selülaz için pH:5,0-sıcaklık: 45 °C) kinetik parametreleri belirlenmiştir. Serbest enzim için Km değeri 168,08 mg/mL ve Vmax değeri 22,62 U/ mg protein olarak belirlenmiştir. İmmobilize enzim için ise Km değeri 39,68 mg/mL ve Vmax değeri 5,12 U/ mg protein olarak belirlenmiştir. PVA ile immobilize edilmiş selülazın Km değerinin serbest enzime kıyasla daha küçük olduğu görülmüş bu sebeple de immobilize selülazın konformasyon kararlılığının serbest selülaza göre daha iyi olduğu sonucuna ulaşılmıştır.
4. 45 °C de 24 saat boyunca yapılan inkübasyon sonunda serbest selülaz enziminin denatüre olarak aktivitesini %4, immobilize enzimlerin ise yaklaşık %15 oranında kaybettiği gözlemlenmiştir. 55 °C de ise 24 saat boyunca yapılan inkübasyon sonunda serbest selülaz enziminin denatüre olarak aktivitesini %61, immobilize enzimlerin ise aktivitesini yaklaşık %12 oranında kaybettiği gözlemlenmiştir. İmmobilize enzimin serbest enzime göre yüksek sıcaklığa olan dayanıklılığının daha yüksek olduğu görülmüştür. İmmobilize selülaz, özellikle 55 °C 'lik daha yüksek bir sıcaklıkta, serbest selülaz ile karşılaştırıldığında termal kararlılığa sahip olduğu belirlenmiştir.
5. Serbest selülaz, 5 °C'de 30 gün sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık %45'ini korurken, 25 °C'de yaklaşık %20'sini korumuştur. İmmobilize selülaz ise, 5 °C'de 30 gün sonunda başlangıç aktivitesinin %48'ini korurken, 25 °C'de yaklaşık %30'unu korumuştur.
6. İmmobilize edilmiş selülazın ilk 4 kullanım sonrasında başlangıç aktivitesinin yaklaşık yarısını koruduğu gözlenmiştir.
7. Serbest ve immobilize edilmiş selülaz üzerinde yapılan karakterizasyon çalışmaları

gösteriyor ki selülaazın PVA jel içerisinde tutuklama yöntemi ile immobilizasyonu başarılı olmuş ve bu immobilizasyonun endüstri alanına farklı bir alternatif sunabileceği gösterilmiştir.

5.2. Öneriler

1. Immobilizasyon sonrası, immobilize selülaazın katalitik etkinliğinin serbest selülaaz ile benzer bir değere sahip olması selülaaz enziminin PVA ile immobilizasyonu uygun bir yöntem olarak önerilebilir. Selülaazın PVA ile immobilizasyonu endüstriye ekonomik bir katkı sunabilir.
2. Farklı substratlar ile farklı pH ve derişimlerde tampon çözeltileri kullanılarak serbest ve PVA ile immobilize edilen selülaazın katalitik etkinlikleri karşılaştırılabilir.
3. Selülaazın PVA ile olan immobilizasyonunda farklı bağlanma yöntemleri araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Ahmad, R., and Sardar, M., 2015. Enzyme immobilization: An overview on nanoparticles as immobilization matrix. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 4(2): 1-8, Doi:10.4172/2161-1009,1000178.
- Akhtar, M. F., Hanif, M., and Ranjha, N. M., 2016. Methods of synthesis of hydrogels... A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(5): 554-559.
- Akkaya, B., Şahin, F., Demirel, G., and Tümtürk, H., 2009. Functional polymeric supports for immobilization of cholesterol oxidase. *Biochemical Engineering Journal*, 43(3): 333-337.
- Anonymous1:<https://www.dreamstime.com/aspergillus-sp-microscope-image219960738/investigations/data> [Son erişim tarihi: 30.01.2024].
- Anonymous2: <https://cynthialearnsthings.wordpress.com/2016/07/13/dns-assay/> [Son erişim tarihi: 10.02.2024].
- Arısoy, S., ve Dortunç, B., 2020. Sıcaklık duyarlı hidrojellerin kontrollü ilaç salımında kullanımı. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*, 9(1): 90-100.
- Asli, U.A., Nwaha, I., Hamid, H., Zakaria, Z. A., Sadikin, A.N., Kamaruddin, M.J., 2016. A kinetic study of enzymatic hydrolysis of oil palm biomass for fermentable sugar using polyethylene glycol(PEG) immobilized cellulase. *Jurnal Teknologi*, 78(8-3), 51-7.
- Aybastier, Ö., 2010. Bitkisel atık yağların karakterizasyonu ve biyodizel üretiminde değerlendirilmesi. Yüksek lisans tezi, Uludağ Üniversitesi, Bursa, 105s.
- Aziz, M. F., Buraidah, M. H., Careem, M. A., and Arof, A. K., 2015. PVA based gel polymer electrolytes with mixed iodide salts (K^+I^- And $Bu_4n^+I^-$) for dye-sensitized solar cell application. *Electrochimica Acta*, 182, 217-223.
- Bhat, M. K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18, 355- 383.
- Bickerstaff, G. F., 1997. Immobilization of enzymes and cells. Humana Press, New Jersey,367p.
- Bilgin, R., Yalçın, M.S.,Yıldırım, D., 2015. Optimization of covalent immobilization of *Trichoderma reesei* cellulase onto modified ReliZyme HA403 and Sepabeads EC-EP supports for cellulose hydrolysis in buffer and ionic liquids/buffer media. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 44(5): 1276-1284. DOI:10.3109/21691401.2015.1024842
- Biotransformation, 39(3): 221–231. Doi: 10.1080/10242422.2020.1869217
- Carr, P. W. and Bowers, L. D., 1980. Immobilized enzymes in analytical and clinical chemistry: Chemical analysis, Wiley-Interscience, New York, 460p.
- Christina, R., Bernd, N., 2014.Enzyme immobilization by microencapsulation: methods, materials, and technological applications.

- Coşkun, G., 2007. Glutatiyon-S-Transferaz enziminin farklı taşıyıcılarda immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Doktora tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 118s.
- Çetin, F. B. E., 2007. Preparation and characterization of magnetic polymeric carriers for enzyme immobilization. Master's thesis, Hacettepe University, Ankara, 57p.
- Çınar, M., 2009. Enzyme immobilization on titania-silica-gold thin films for biosensor applications and photocatalytic enzyme removal for surface patterning. Master's thesis, Middle East Technical University, Ankara, 75p.
- Dal, H., 2018. Selüloz Enzim Kompleksinin Manyetik Partiküllere İmmobilizasyonu. Yüksek lisans tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ, 67s.
- Dinçer, A., and Telefoncu, A., 2007. Improving the stability of cellulase by immobilization on modifiedpolyvinyl alcohol coated chitosan beads. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45(1-2): 10-14.
- Duman, Y.A., Tufan, G., and Kaya, A. U., 2020. Immobilisation of cellulase on vermiculite and the effects on enzymatic kinetics and thermodynamics. *Applied Clay Science*, 197, 105792.
- Durante, D., Casadio, R., Martelli, L., Tasco, G., Portaccio, M., Luca, P. D., Bencivenga, U., Rossi, S., Martino, S. D., Grano, V., Diano, N., and Mita, D. G., 2004. Isothermal and non-isothermal bioreactors in the detoxification of waste waters polluted by aromatic compounds by means of immobilised laccase from *Rhus vernicifera*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 27(4-6): 191–206.
- Fersht, A., 1999. Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding. W. H. Freeman, New York, 631p.
- Figueira, J. D. A., Dias, F. F. G., Sato, H. H., and Fernandes, P., 2011. Screening of supports for the immobilization of β -glucosidase. *Enzyme Research*, Doi:10.4061/2011/642460
- Gadaka, M.A., Alhassan, A.J., Zainab, G.A, Muhammad, Y.Y., Muhammad, I.U., Muazu, A.B., Murtala, M., 2021. Effects of Immobilization on the Kinetic Parameters of Partially Purified Cellulase from Termites (*Macrotermesbellicosus*). *Acta Scientific Pharmacology*. 2(6): 1–9
- Gözükara, E. M., 2001. *Biyokimya cilt 2*, Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, 673s.
- Haki ,G. D., and Rakshit, S. K., 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresource Technology*, 89(1): 17-34.
- Haliskaranfil, S., 2012. Termoalkalifik amilaz ve selüloz enzim (multienzim) üreticisi *bacillus sp.* izolasyonu, enzimlerin karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulanabilirliği. Yüksek lisans tez, Çukurova Üniversitesi, Adana, 163s.
- Hassan, C. M., and Peppas, N. A., 2000. Biopolymers PVA hydrogels, anionic polymerisation nanocomposites, Springer, Berlin (Heidelberg), 221p.
- Hegedüs, I., Hancsok, J., and Nagy; E., 2012. Stabilization of the cellulase enzyme complex as enzyme nanoparticle. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 168: 1372–1383.

- Hendriks, A. T. W. M., and Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology*, 100(1): 10-18.
- Henrissat, B. and Davies, G. J., 2000. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. *Plant Physiol*, 124(4): 1515- 1519.
- Henrissat, B., 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*. 280(2): 309-316.
- Hoare, T. R., and Kohane, D. S., 2008. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 49(8): 1993-2007.
- Horn, S.J., Kolstad-Vaaje, G., Westereng, B. and Eijsink, V., 2012. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1): 1-13.
- Hu, W., Liu, J., Chen, J.H., Wang, S. Y., Lu, D., Wu, Q. H., and Li, W. J., 2014, A mutation of *Aspergillus niger* for hyper-production of citric acid from corn meal hydrolysate in a bioreactor. *Journal of Zhejiang University. SCIENCE. B (Biomedicine & Biotechnology)*, 15(11): 1006-1010.
- Huang, W., Pan, S., Li, Y., Yu, L., and Liu, R., 2020. Immobilization and characterization of cellulase on hydroxy and aldehyde functionalized magnetic Fe₂O₃/Fe₃O₄ nanocomposites prepared via a novel rapid combustion process. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 845-852.
- Huang, Y. Y., Zhan, P., Wang, F., Shaol, L. S., Zhang, L., Qing, Y., and Chen, J. N., 2022. Cellulase immobilized onto amino-functionalized magnetic Fe₃O₄&SiO₂ nanoparticle for poplar deconstruction. *Chemical Papers*, 76(9): 5807-5817.
- Jiang, J., Zhao, J., He, C., Cui, B., Xiong, J., Jiang, H., Ao, J., Xiang, G., 2017. Recyclable magnetic carboxymethyl chitosan/calcium alginate–cellulase bioconjugates for corn stalk hydrolysis. *Carbohydrate polymers*, 166, 358-364.
- Kalita, B. J., and Sit, N., 2023. Characterization of cellulase immobilized by different methods of entrapment and its application for carrot juice extraction. *Food Science and Biotechnology*, 1-13.
- Kathri, C. and Dirk, W.B., 2018. Enzymatische prozesse bioprozesstechnik, 403-447.
- Khan, S., and Ranjha, N. M., 2014. Effect of degree of cross-linking on swelling and on drug release of low viscous chitosan/poly (vinyl alcohol) hydrogels. *Polymer Bulletin*, 71, 2133-2158
- Klein, M. P., Fallavena, L. P., Schöffner, J. D. N., Ayub, M. A., Rodrigues, R. C., Ninow, J. L., and Hertz, P. F., 2013. High stability of immobilized β-D-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *Carbohydrate Polymers*, 95(1): 465-470.
- Klibanov, A. M., 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409(6817): 241–246.

- Köse, H. 2010. Polifenol oksidaz enziminin farklı maddelerle immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Sakarya Üniversitesi, Sakarya, 54s.
- Lee, C. H., Lin, T.S., and Mou, C. Y., 2009. Mesoporous materials for encapsulating enzymes. *Nanotoday*, 4(2): 165-179.
- Lerner, K. L., and Lerner, B. W., 2003. *World of microbiology and immunology*. Gale Group, USA, 751p.
- Lineweaver, H., Burk D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc* 56: 658–666. doi:10.1021/ja01318a036
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, 193(1): 265-275.
- Mane, S., Ponrathnam, S., and Chavan, N., 2015. Effect of chemical cross-linking on properties of polymer microbeads: A Review. *Canadian Chemical Transactions*, 3(4): 473-485.
- Marten, F.L., 2002. Vinyl Alcohol Polymers. *Encyclopedia Of Polymer Science and Technology*. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426-428.
- Mo, H., and Qiu, J., 2020. Preparation of chitosan/magnetic porous biochar as support for cellulase immobilization by using glutaraldehyde. *Polymers*, 12(11): 2672.
- Nayeri, M. D., Nikkhah, H., Zilouei, H., and Bazarganipour, M. 2023. Immobilization of cellulase on graphene oxide coated with NiFe₂O₄ and Fe₃O₄ for hydrolysis of rice straw. *Springer Nature*, 30(9): 5549-5571.
- Ng, H. M., Sin, L. T., Tee, T. T., Bee, S. T., Hui, D., Low, C. Y., and Rahmat, A. R., 2015. Extraction of cellulose nanocrystals from plant sources for application as reinforcing agent in polymers. *Composites Part B: Engineering*, 75, 176-200.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., and Antranikian, G., 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol*. 51, 711-729.
- Oliveira, B. H., Coradi, G. V., de Oliva-Neto, P., and do Nascimento, V. M. G., 2020. Biocatalytic benefits of immobilized *Fusarium* sp.(GFC) lipase from solid state fermentation on free lipase from submerged fermentation. *Industrial Crops and Products*, 147, 112235.
- Önal, S. T., 2000. Karpuz (*Citrullus vulgaris*) α -galaktozidazının doğal ve sentetik polimerlerde Immobilizasyonu. Doktora tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 190s.
- Özçömlekçi, E., 2006. Proteaz enziminin glutaraldehit tutuklanarak kovalent bağlama ile immobilizasyonunda optimum şartların belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 74s.
- Öztürk, N., Akgöl, S., Arısoy, M., and Denizli, A., 2007. Reversible adsorption of lipase on novel hydrophobic nanospheres. *Separation and Purification Technology*, 58(1): 83–90.

Özyılmaz, E., Alhiali, A., Çağlar, Ö., Yılmaz, M., 2021. Preparation of regenerable magnetic nanoparticles for cellulase immobilization: Improvement of enzymatic activity and stability. *Biotechnology Progress*, 37(4): 3145.

Pandit, N. P., and Maheshwari, S. K., 2012. Optimization of cellulase enzyme production from sugarcane pressmud using oyster mushroom –*Pleurotus sajor- caju* by solid state fermentation. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 3(3).

Papadopoulou, A., Zarafeta, D., Galanopoulou, A. P., Stamatis, H., 2019. Enhanced catalytic performance of *Trichoderma reesei* cellulase immobilized on magnetic hierarchical porous carbon nanoparticles. *The Protein Journal*, 38, 640-648.

Peng, H., Rübsam, K., Jakob, F., Schwaneberg, U., and Pich, A. 2016. Tunable enzymatic activity and enhanced stability of cellulase immobilized in biohybrid nanogels. *Biomacromolecules*, 17(11): 3619-3631.

Peppas, N. A., and Hoffman, A. S., 2020. 1.3.2E-Hydrogels. *Biomaterials Science*, Academic Press, Cambridge.

Polat, G., 2007. Aşı polimerlerinde üreaz-alanin dehidrogenaz enzim çiftinin immobilizasyonu ve sistemin üreyi alanine dönüştürme yeteneğinin araştırılması. Doktora tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 145s.

Qi, B., Luo, J., Wan, Y., 2018. Immobilization of cellulase on a core-shell structured metal-organic framework composites: Better inhibitors tolerance and easier recycling. *Bioresource Technology*, 268, 577-582.

Rebros M., Pilnikova A., Šimcikova D., Weignerova L., Stloukal R., Kren V., and Rosenberg M., 2013. Recombinant α -L-rhamnosidase of *Aspergillus terreus* immobilization in polyvinylalcohol hydrogel and its application in rutin derhamnosylation. *Biocatalysis and Biotransformation*, 31(6): 329-334. Doi:10.3109/10242422.2013.858711

Rebros, M., Rosenberg, M., Mlichova, Z., and Kristofikova, L., 2007. Hydrolysis of sucrose by invertase entrapped in polyvinyl alcohol hydrogel capsules. *Food Chemistry*, 102(3): 784-787.

Saieb, F. M., Boaker, S. A. , El-Komy, H. M., and Issa, A., 2015. Production and estimation of keratinase by immobilized and free *Bacillus licheniformis* (St. 24). *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 3(5): 119-122.

Slaughter, B. V., Khurshid, S. S., Fisher, O. Z., Khademhosseini, A., and Peppas, N. A., 2009. Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced materials*, 21(32-33): 3307-3329.

Sui, Y., Cui, Y., Xia, G., Peng, X., Yuan, G., and Sun, G., 2019. A facile route to preparation of immobilized cellulase on polyurea microspheres for improving catalytic activity and stability. *Process Biochemistry*, 87, 73-82

Sumner, J.B. 1921. Dinitrosalicylic acid: A reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *Journal of Biological Chemistry*, 47: 5.

Sürmelioglu, İ., 2014. Lipaz enziminin doğal destek maddelerine immobilizasyonu ve biyodizel üretiminde kullanımının kemometrik metodlarla araştırılması. Yüksek lisans tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Hatay, 67s.

Toprak, A., Tükel, S. S., and Yıldırım, D., 2021. Stabilization of multimeric nitrilase via different immobilization techniques for hydrolysis of acrylonitrile to acrylic acid. *Biocatalysis and*

Uluğ, N., 2011. Alginat+jelatin jel karışımlarında lipaz immobilizasyonu ve immobilize enzimin bazı biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Trakya Üniversitesi, Edirne, 63s.

Wang, Y., Feng, C., Guo, R., Ma, Y., Yuan, Y., Liu, Y., 2021. Cellulase immobilized by sodium alginate-polyethylene glycol-chitosan for hydrolysis enhancement of microcrystalline cellulose. *Process Biochemistry*, 107, 38-47

Wang, Y., Chen, D., Wang, G., Zhao, C., Ma, Y., Yang, W., 2018. Immobilization of cellulase on styrene/maleic anhydride copolymer nanoparticles with improved stability against pH changes. *Chemical Engineering Journal*, 336, 152-159

Wiseman, A., 1985. *Handbook of Enzymes Biotechnology*. Halsted Press; 2nd edition, UK, 457p.

Wu, L., Yuan, X., and Sheng, J., 2005. Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning. *Journal of Membrane Science*, 250(1-2): 167-173.

Xu, J., Liu, X., He, J., Hu, L., Dai, B., and Wu, B., 2015. Enzymatic in situ saccharification of rice straw in aqueous-ionic liquid media using encapsulated *Trichoderma aureoviride* cellulase. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(1): 57-63.

Yavaş, S., 2010. Conversion of lignocellulosic biomass into nanofiber by microfluidization and its effect on the enzymatic hydrolysis. Master's thesis, Middle East Technical University, Ankara, 136p.

Yetim, N. K., Özkan, E. H., ve Sarı, N., 2019. Polimerik nanoküreler üzerine enzim immobilizasyonu ve optimizasyonu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 14(1): 97-104.

Zainal, S. H., Mohd, N.H., Suhaili, N., Anuar, F. H., Lazim, A. M., and Othaman, R., 2021. Preparation of cellulose-based hydrogel: A review. *Journal of Materials Research and Technology* 10, 935-952.

Zdarta, J., Jędrzak, A., Klapiszewski, Ł., & Jesionowski, T., 2017. Immobilization of cellulase on a functional inorganic-organic hybrid support: Stability and kinetic study. *Catalysts*, 7(12): 374.

Zhang, Y. H. P., and Lynd, L. R., 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(7): 797-824.

Zhou, J., 2010. Immobilization of cellulase on a reversibly soluble-insoluble support: Properties and application. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(11): 6741-6746.

Zoppas, F. M., Meneguzzi, A., and Tramontina, F., 2013. Alternatives for cellulase production in submerged fermentation with agroindustrial wastes. *International Journal of Modern Engineering Research (IJMER)*, 3(4): 2374-2381.





ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı :ÖZEL, Meryem

Eğitim

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne	
Lisans	Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	2013
Ortaöğretim	Bursa Turhan Tayan Anadolu Lisesi	2007

Çalışma Tecrübesi

Yıl	İşyeri	Unvan
2019-Halen	Enerjisa Tufanbeyli Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi	Kimya/Kimya Teknolojisi Öğretmeni