

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA BİLİM DALI**

**FARKLI TAŞIYICILAR ÜZERİNE SERİN PROTEAZ
SUBTİLİSİN CARLSBERG İMMOBİLİZASYONU,
KARAKTERİZASYONU, HİDROLİZ VE
TRANSESTERİFİKASYON REAKSİYONLARINDAKİ KİNETİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Ahmet ESER

**Danışman
Prof. Dr. Tülin AYDEMİR**



MANİSA-2023

AHMET ESER

FARKLI TAŞIYICILAR ÜZERİNE SERİN PROTEAZ SUBTİLİSİN CARLSBERG
İMMOBİLİZASYONU, KARAKTERİZASYONU, HİDROLİZ VE TRANSESTERİFİKASYON
REAKSİYONLARINDAKİ KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

2023

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Ahmet ESER



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TAAHHÜTNAME.....	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
TABLO DİZİNİ	VII
TEŞEKKÜR.....	VIII
ÖZET.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Enzimler	3
2.2. Proteazlar.....	6
2.3. Alkalen Proteaz Enzimi	15
2.3.1. Alkalen Proteazların Kullanım Alanı	15
2.4. Enzim İmmobilizasyonu.....	25
2.4.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	27
2.4.1.2. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri	27
2.4.1.3. Kovalent Bağlama Metodu	27
2.4.1.4. İyonik Bağlama Metodu	29
2.4.1.5. Fiziksel Adsorpsiyon Metodu.....	29
2.4.1.6. Çapraz Bağlama.....	30
2.4.1.7. Tutuklama Metodu.....	30
2.5. Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Taşıyıcılar ve Taşıyıcı Seçimi .	31
2.5.1. Kitosan.....	32
2.5.2. Manyetik Partiküller	33
2.5.3. Perlit.....	34
2.5.4. Siklodekstrinler.....	34
2.6. Çapraz Bağlama ve Çapraz Bağlayıcı Sistemi	35
2.6.1. Genipin (GE)	35
2.6.2. Glutaraldehit (GA).....	36
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER	37
3.1. Materyal.....	37
3.1.1. Kimyasallar.....	37
3.2. Yöntemler.....	38
3.2.1. Manyetit (Fe ₃ O ₄) Hazırlama	38
3.2.2. Kitosan Boncuk Hazırlanması	38
3.2.3. Manyetik Kitosan Kompozit Boncukların Hazırlanması	39
3.2.4. Perlit Aktivasyonu	41
3.2.5. β-siklodekstrin ile Perlit Modifikasyonu	41
3.2.6. MK ve Perlit-CD in Glutaraldehit (GA) ile Aktivasyonu	42

3.2.7. MK ve Perlit-CD in Genipin (GE) ile Aktivasyonu	42
3.2.8. Aktivite edilmiş MK ve Perlit-CD Üzerine Subtilisin Carlsberg İmmobilizasyonu	43
3.2.9. MK ve Perlit-CD in Karakterizasyonu	43
3.2.10. Taşıyıcı Üzerine Bağlanan Protein Miktarının Belirlenmesi	45
3.2.11. Tirozin Standart Grafiğinin Oluşturulması	45
3.2.12. Serbest ve İmmobilize Enzim Karakterizasyonu	45
3.2.12.1. Optimum pH	48
3.2.12.2. Optimum Sıcaklık ve Sıcaklık Stabilite	48
3.2.12.3. Subtilisin Carlsberg ile Deri Yüzeyinden kıl Giderimi	49
3.2.13. Enzim Kinetiği Subtilisin	49
3.2.14. Serbest ve İmmobilize Subtilisin Carlsberg ile Deri Yüzeyinden Kıl Giderimi	49
3.2.14.1. Derilerin Yıkanması ve Kıl Giderimi	50
3.2.14.2. Enzimatik Kıl Giderimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi	50
3.2.14.3. Kimyasal ve Enzimatik Kıl Giderimi Yapılmış Derilerin Fabrika Ölçeğinde İşlenmesi	50
3.2.15. Subtilisin Carlsberg Enziminin Transesterifikasyon Aktivitesinin Belirlenmesi	51
3.2.15.1. Serbest ve İmmobilize SC'nin Organik Çözücü Ortamındaki Transesterifikasyon Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi	50
3.2.15.2. Serbest ve İmmobilize Subtilisin Carlsberg'in Organik Çözücü Ortamındaki Transesterifikasyon Aktivitesi Üzerine Tuz Etkisi	50
4. BULGULAR	53
4.1. MK ve Perlit-CD in Karakterizasyonu	53
4.2. İmmobilizasyon Verimi	62
4.3. Serbest ve İmmobilize Subtilisin Carlsberg in Karakterizasyonu	63
4.3.1. pH ve Sıcaklığın Etkisinin belirlenmesi	63
4.3.2. Sıcaklık Stabilite	67
4.3.3. Enzim Kinetiği	70
4.4. Serbest ve İmmobilize Subtilisin Carlsberg ile Deri yüzeyinden Kıl Giderimi (Dehairing)	70
4.4.4.1. İnkübasyon Süresinin Enzimatik Kıl Giderimi üzerine Etkisi	74
4.4.4.2. Serbest Enzim, İmmobilize Enzim ve Kimyasal Yöntem ile Kıl Giderimi	74
4.4.4.2. Deri Yüzey Morfolojisinin Karakterizasyonu	75
4.5. Propanol Standart Eğrisinin Oluşturulması ve Subtilisin Carlsberg in Transesterifikasyon Aktivitesini Hesaplanması	79
4.5.1. Transesterifikasyon Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi	84
4.5.2. Transesterifikasyon Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	84
4.5.3. Liyofilizasyon Ortamına Metal İyonu İlavesinin Transesterifikasyon Aktivitesi Üzerine Etkisi	86
4.5.4. Liyofilizasyon Ortamına Tuz İlavesinin Transesterifikasyon Aktivitesi Üzerine Etkisi	86

5. TARTIşMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....	88
KAYNAKLAR	95



SİMGELER VE KISALTMALAR

SC	Subtilisin Carlsberg
GA	Glutaraldehit
GE	Genipin
MK	Manyetik kitosan
Perlit-CD	Perlit-Siklodekstrin
Fe₃O₄	Manyetit
GC	Gaz Kromatografisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopi
TGA	Termogravimetrik Analiz
EDX	Enerji Yayılımlı X-Işını Analizi
3-APTS	3-amino etil trietoksi silan
TPP	Tri polifosfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. Omega-peptidazlar.....	8
Şekil 2. Özgüllüğe göre sınıflandırma.	9
Şekil 3. Subtilisin Carlsberg (A) ve Tripsin (B) enzimlerinin aktif bölgesi	12
Şekil 4. Deri imalatı işyeri büyüklükleri	19
Şekil 5. Deri imalatı sürecinde depolama	21
Şekil 6. Deri işlemede kireçleme	22
Şekil 7. Tabaklama işlemi sonrası derinin wet-blue hali	23
Şekil 8. Deri imalatı sürecinde renk verme işlemi	24
Şekil 9. Enzimin taşıyıcı üzerine bağlanmasında kullanılan yöntemler	27
Şekil 10 Kitin, kitosan, selüloz yapıları	33
Şekil 11. Genipinin kimyasal yapısı.....	36
Şekil 12. Glutaraldehitin kimyasal yapısı	53
Şekil 13. Manyetik (Fe_3O_4) partiküllerinin hazırlanması	54
Şekil 14. Manyetik kitosan kompozit boncuk hazırlama	56
Şekil 15. Perlitin 3-APTS ile silanlanması ve çapraz bağlayıcı ajan ile aktifleştirilmesi.....	57
Şekil 16. Perlitin β -siklodekstrin ile modifikasyonu.....	58
Şekil 17. GA ve GE ile aktifleştirilmiş taşıyıcılara Subtilisin Carlsberg immobilizasyonu	61
Şekil 18. Protein standart eğrisi	61
Şekil 19. Subtilisin Carlsberg ile kazein hidroliz reaksiyonu	61
Şekil 20. Tirozin standart eğrisi	63
Şekil 21. İmmobilize enzim ile transesterifikasyon reaksiyonu.....	64
Şekil 22. MK yüzey yapısı.....	66
Şekil 23. Enzim immobilizasyonu için kullanılan taşıyıcıların SEM görüntüleri	70
Şekil 24. Enzim immobilizasyonu için kullanılan taşıyıcıların SEM görüntüleri	70
Şekil 25. Enzim immobilizasyonu için kullanılan taşıyıcıların EDX grafikleri .	73
Şekil 26. Enzim immobilizasyonu için kullanılan taşıyıcıların EDX grafikleri .	75
Şekil 27. Enzim immobilizasyonu için kullanılan taşıyıcıların TGA eğrileri:....	76
Şekil 28. Enzim immobilizasyonu için kullanılan taşıyıcıların TGA eğrileri:....	77
Şekil 29. Farklı taşıyıcılar üzerine GA ve GE ile immobilize edilmiş Subtilisin Carlsberg enziminin İmmobilizasyon Verimi.....	78
Şekil 30. Farklı taşıyıcılar üzerine GA ve GE ile immobilize edilmiş ve Serbest Subtilisin Carlsberg in aktivitesi üzerine pH etkisi.....	80
Şekil 31. Farklı taşıyıcılar üzerine GA ve GE ile immobilize edilmiş ve Serbest Subtilisin Carlsberg in aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi	80
Şekil 32. Serbest SC (a), MK-GA-SC(b) ve MK-GA-SC (c) in Response Surface and Contour Grafikleri.....	80
Şekil 33. Serbest SC (a), Perlit-CD-GA-SC (b) ve Perlit-CD-GE-SC (c) in Response Surface and Contour Grafikleri.....	80
Şekil 34. GA ve GE ile farklı taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiş ve Serbest Subtilisin Carlsberg in termal stabilitesi	80
Şekil 35. Serbest Subtilisin Carlsberg enziminin kazein substratı ile elde edilen Lineweaver- Burk grafiği.....	80
Şekil 36. Farklı taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiş Subtilisin Carlsberg in Lineweaver- Burk grafiği.....	80
Şekil 37. Enzimatik kıl giderimine inkübasyon süresinin etkisi	80

Şekil 38. Serbest Subtilisin Carlsberg (A), immobilize Subtilisin Carlsberg (B) ve geleneksel (kimyasal) yöntem (C) ile kıl giderim akış şeması	80
Şekil 39. Serbest Subtilisin Carlsberg (A), immobilize Subtilisin Carlsberg (B) ve geleneksel (kimyasal) yöntem (C) ile kıl giderimi sonrası diğer deri işleme süreçlerinden geçirilen deri yüzeyleri	80
Şekil 40. Kimyasal işlemle kıl giderimi ile elde edilen deri yüzeyine ait SEM görüntüleri	80
Şekil 41. Transesterifikasyon reaksiyon ortamında bulunan THF (çözgen), 1-propanol (substrat) ve dodekana (iç standart) ait Gaz Kromatografisi Kromatogramları	80
Şekil 42. Propanol standart çözeltilerine (0,1-0,2-0,4-0,6-0,8 M) ait Gaz Kromatografisi Kromatogramları.....	80
Şekil 43. 1-Propanol standart grafiği	80
Şekil 44. Sıcaklığın Subtilisin Carlsberg in transesterifikasyon yüzdesi üzerine etkisi	80
Şekil 45. Serbest Subtilisin Carlsberg in transesterifikasyon aktivitesine ilişkin Lineweaver- Burk grafiği.....	80
Şekil 46. İmmobilize Subtilisin Carlsberg'in transesterifikasyon aktivitesine ilişkin Lineweaver- Burk grafiği.....	80
Şekil 47. Organik çözücü ortamına metal iyonu ilavesinin Subtilisin Carlsberg in transesterifikasyon yüzdesi üzerine etkisi	80
Şekil 48. Organik çözücü ortamına tuz ilavesinin Subtilisin Carlsberg aktivitesi ve transesterifikasyon yüzdesi üzerine etkisi	80

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1. Tirozin Standart Eğrisi için DeneySEL İşlemler.....	24
Tablo 2. SC Aktivite Ölçüm İşlemleri	60
Tablo 3. Farklı taşıyıcılara immobilize edilen Subtilisin Carlsberg'in protein miktarı ve yükleme etkinliği.....	60
Tablo 4. Serbest ve farklı taşıyıcılar üzerine immobilize edilen Subtilisin Carlsberg in termal inaktivasyon parametreleri.....	70
Tablo 5. Subtilisin Carlsberg in doğal ve sentetik substratları üzerine hidrolitik aktivitesi için K_M değerleri.....	71
Tablo 6. Serbest ve İmoobilize Subtilisin Carlsberg in Hidroliz Aktivitesine ilişkin K_M ve V_{max} Değerleri	75



TEŞEKKÜR

Bu tez kapsamında konu seçiminden projelendirmeye, çalışmaların yürütülmesinden tez yazımına kadar tüm süreçlerde engin bilgi ve tecrübeleriyle her daim yanımda olan ve koşulsuz destek veren kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Tülin AYDEMİR' e sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca Tez İzleme Komitesi toplantılarında süreçlerin doğru yönetilmesi ve karşılaştığım problemlerle başa çıkma konusunda kıymetli bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Prof. Dr. Leman TARHAN ve Prof. Dr. Ayşe DİNÇER'e teşekkürlerimi sunarım.

Her koşulda yanımda olan ve motivasyonumu yukarıda tutan başta eşim olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2016/156 proje numarası ile desteklenmiştir. Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi'ne desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Ahmet ESER
Manisa, 2023

ÖZET

Doktora Tezi

Farklı Taşıyıcılar Üzerine Serin Proteaz Subtilisin Carlsberg İmmobilizasyonu, Karakterizasyonu, Hidroliz ve Transesterifikasyon Reaksiyonlarındaki Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi

Ahmet ESER

Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tülin AYDEMİR

Subtilisin Carlsberg (SC) *Bacillus licheniformis* 'ten fermentasyonla elde edilen alkali serin endoproteaz ailesine ait bir enzim olup alkali koşullar altında doğal veya denatüre proteinleri hidroliz etmektedir. Subtilisin Carlsberg disülfid bağı içermeyen tek bir polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Ayrıca izoelektrik noktası 9,4 olup bazı organik çözücülerde aktivitesini sürdürebilmektedir. Proteolitik aktivitesinin yanında esteraz aktivitesine de sahiptir. Bu çalışmada Subtilisin Carlsberg iki farklı çapraz bağlayıcı: glutaraldehit ve genipin kullanılarak manyetik kitosan (MK), perlit ve β -siklodekstrin ile modifiye edilmiş perlit (Perlit-CD) üzerine immobilize edildi. Immobilize Subtilisin Carlsberg in hidroliz aktivitesi ve kinetik özellikleri çalışıldı. Hazırlanan taşıyıcıların yapısı ve yüzey morfolojisi SEM, TGA ve EDX ile karakterize edildi. Serbest Subtilisin Carlsberg aktivitesinin optimum sıcaklık ve pH değeri sırasıyla 50°C ve pH 8,0 olarak belirlendi. Genipin ve glutaraldehit ile aktive edilmiş taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiş Subtilisin Carlsberg in aktivitesi için optimum pH ve sıcaklıkta serbest enzime benzerlik gösterdi. Subtilisin Carlsberg in hidroliz aktivitesinin bir uygulaması olarak yapılan enzimatik kıl giderimi çalışmalarında enzimatik ve kimyasal yöntemle gerçekleştirilen kıl giderimi çalışmaları karşılaştırıldı. Enzimatik kıl giderimi ile daha yumuşak ve pürüzsüz bir deri yüzeyi elde edildi. Subtilisin Carlsberg in organik çözücü ortamındaki transesterifikasyon aktivitesi ve kinetik özellikleri araştırıldı Ayrıca liyofilizasyon ortamına metal iyonu ve tuz ilavesinin transesterifikasyon aktivitesi üzerine etkisi incelendi.

Anahtar Kelimeler: Subtilisin Carlsberg, İmmobilizasyon, Transesterifikasyon, Peptit Hidrolizi

2023, 131 Sayfa

ABSTRACT

PhD Thesis

Immobilization of Serine Protease Subtilisin Carlsberg on Different Carriers, Characterization and Kinetic Properties in Hydrolysis and Transesterification Reactions of Serine Protease Subtilisin Carlsberg

Ahmet ESER

**Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Chemistry**

Supervisor: Prof. Dr. Tülin AYDEMİR

Subtilisin Carlsberg (SC) is an enzyme belonging to the alkali serine endoprotease family obtained by fermentation from *Bacillus licheniformis* and hydrolyzes natural or denatured proteins under alkaline conditions. Subtilisin Carlsberg consists of a single polypeptide chain that does not contain disulfide bonds. In addition, the isoelectric point is 9.4 and it can show its activity in some organic solvents. Besides its proteolytic activity, it also has esterase activity. In this study, Subtilisin Carlsberg was immobilized on magnetic chitosan (MK), perlite and β -cyclodextrin modified perlite (Perlit-CD) using two different crosslinkers: glutaraldehyde and genipin. The hydrolysis and transesterification activity of immobilized Subtilisin Carlsberg has been extensively investigated. The structure and surface morphology of prepared carriers were characterized by SEM, TGA and EDX. The optimum temperature and pH value of free and immobilized Subtilisin Carlsberg activity were found to be 50°C and pH 8.0, respectively. It was similar to the free enzyme at optimum pH and temperature for the activity of Subtilisin Carlsberg immobilized on genipin and glutaraldehyde activated carriers. With enzymatic hair removal as an application of the hydrolysis activity of Subtilisin Carlsberg, a softer and smoother skin surface was obtained compared to the chemical method. In studies on the transesterification activity of Subtilisin Carlsberg, the optimum temperature was determined as 50 °C. In addition, the effect of metal ion and salt addition on the transesterification activity was investigated.

Key Words: Subtilisin Carlsberg, Immobilization, Transesterification, Peptide Hydrolysis

2023, 131 Pages

1. GİRİŞ

Enzimler, organik katalizörlerdir ve canlı hücreler tarafından hücre içinde genetik kontrol altında sentez edilirler. Enzimler, biyolojik olaylarda katalizör olma özelliğinde olan maddelere verilen isimdir. Enzimler, kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve kolaylaştıran maddelerdir ve belirli maddeler arasındaki belirli reaksiyonları katalize ederler. Enzimler, çeşitli biyolojik işlevleri olan proteinlerdir. Enzimler, çalışmaları sırasında bir kofaktör gibi yardımcı maddelere ihtiyaç duyabilir ve bunlar reaksiyonları hızlandırmak için kullanılır. Enzimler, genellikle çok yüksek bir seçiciliğe sahiptirler ve sadece belirli reaksiyonları katalize ederler. Enzimler, genellikle bir enzim-substrat ilişkisi göstererek çalışır ve substrat yapısı reaksiyonun hızını etkiler. Enzimler, genellikle pH, sıcaklık ve diğer çevre koşullarına hassastır ve bu koşullar reaksiyonun hızını etkileyebilir. Enzimler, genellikle çok yüksek bir verimliliğe sahiptirler [1]. Bütün proteinler gibi enzimlerin de monomeri, amino asitlerdir. Canlı organizmaların hayatsal faaliyetlerini gerçekleştirmeleri için gerekli pek çok biyokimyasal reaksiyonlardan sorumludurlar [2]. Öne çıkan avantajları yüksek katalitik etkinlikleri ve sahip oldukları özgüllükleridir. Enzimler sadece reaksiyonlara karşı değil substratlarına karşı da yüksek özgüllük sergilediklerinden istenilen tek bir son ürünün oluşumunu sağlamakta ve gereksiz yan ürünlerin oluşmasını engellemektedirler. Bunlara ek olarak enzimler, katalizlenmemiş reaksiyonlara kıyasla reaksiyon hızını 10^7 - 10^{16} kez artırırlar. Katalizledikleri reaksiyonlar arasında, mevcut organik kimya metotlarla ulaşılamayan, kompleks kimyasal transformasyon reaksiyonları da vardır. Bu durum enzimleri biyoteknolojik kullanımlar için son derece önemli kılmıştır [3]. Tüm bu özelliklerinden dolayı 1960'lardan bu yana enzimlerin endüstriyel katalizör olarak kullanımları artan bir ivmeyle yaygınlaşmakta olup endüstriyel alanla birlikte tıpta teşhis, tedavi ve ilaç tasarımı amaçlı kullanımları da geniş uygulama alanı bulmaktadırlar [1-5].

Dünyadaki enzim talebi, bir ülkenin veya bölgenin gıda, tarım, tekstil, deterjan, yapı malzemesi gibi sektörlerdeki işletmelerin enzimleri satın alma ihtiyacını gösterir. Enzimlerin endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılması, dünyadaki enzim talebini doğrudan etkiler ve bu nedenle dünyadaki enzim talebi de sürekli olarak artmaktadır [6-7].

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Enzimler, canlı sistemlerde kimyasal türlerin dönüşümünü destekleyen biyolojik katalizörlerdir. Kesin düzenlemelerde binlerce atomdan oluşan bu moleküller, biyolojik hücrelerde meydana gelen çok sayıda farklı kimyasal reaksiyonu katalize edebilir. Biyolojik süreçlerdeki, sağlık ve hastalıktaki rolleri kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Ayrıca, doğaları veya işlevleri bilinmeden çok önce, birçok eski insan faaliyetinde, özellikle gıda işlemede önemli bir bileşen olmuşlardır [1,2,8-10]. Enzimler, çok yüksek derecede substrat spesifikliğı ile çok ılımlı koşullar altında reaksiyonları katalize etme yeteneğine sahiptir. Böylece yan ürünlerin oluşumunu azaltır. Katalize edilen reaksiyonlar arasında, sıradan organik kimya yöntemleriyle erişilemeyen biyolojik makromoleküller ile bir dizi karmaşık kimyasal dönüşüm reaksiyonları vardır. Bu onları biyoteknolojik kullanım için çok ilginç kılıyor. Yirminci yüzyılın başlarında enzimlerin fermantasyon süreçlerinden sorumlu olduğu gösterilmiş ve yapıları ve kimyasal bileşimleri incelenmeye başlanmıştır [12]. Elde edilen bilgi, tekstil, ilaç ve kimya endüstrileri gibi çeşitli diğer alanlarda biyolojik katalizörlerin yaygın teknolojik kullanımına yol açmıştır [13].

Enzim terminolojisi ve sınıflandırılmasına göre enzimler, katalizörlük yapılan tepkimenin tipine göre 6 ana sınıfa ayrılmıştır. Bu sınıflar, Oksidoredüktaz, Transferazlar, Hidrolazlar, Liyazlar, izomerazlar ve ligazlardır. Bununla birlikte, bu sınıflardan hiçbirinin, iyonları veya molekülleri zarlar boyunca hareket ettiren veya zarlar içinde ayrılmasını sağlayan önemli bir enzim grubunu açık bir şekilde tanımlamamaktadır. Günümüzde, bu enzimler yeni bir translokaz sınıfı (EC 7) altında sınıflandırılmıştır.

Oksidoredüktazlar: Bu sınıf, oksidoreduksiyon reaksiyonlarını katalize eden tüm enzimleri içerir. Okside edilen substrat, hidrojen donörü olarak kabul edilir. Sistematik ad, donör:akseptör oksidoredüktaz üzerine kurulmuştur. Genel ad, mümkünse dehidrojenaz olmalıdır; alternatif olarak, redüktaz kullanılabilir. Oksidaz, sadece O₂'nin akseptör olduğu durumlarda kullanılır [14].

Transferazlar: Transferazlar, bir bileşikten (genellikle donör olarak kabul edilen) bir grubu (örneğin, metil grubu veya glikozil grubu) diğer bir bileşiğe (genellikle akseptör

olarak kabul edilen) transfer eden enzimlerdir. Sistemik adlar, donör:akseptör grup transferaz şemasına göre oluşturulur. Genel adlar, genellikle akseptör grup transferaz veya donör grup transferaz şeklinde oluşturulur. Çok sayıda durumda, donör bir ko-faktördür (ko-enzim) ve transfer edilecek grubu taşır [14-15].

Hidrolazlar: Bu enzimler, C-O, C-N, C-C ve bazı diğer bağların, fosforik anhidrit bağları dahil, hidrolitik parçalama reaksiyonlarını katalize eder. Sistemik ad, her zaman hidrolaz içersede, genel ad, çoğu durumda, substratın adının sonuna -az eki getirilerek oluşturulur. Substratın bu ek ile birlikte adının, bir hidrolitik enzim olduğu anlaşılmaktadır. Ester, glikozil, peptit, amid veya diğer bağlar üzerinde etkin hidrolazların birçoğu, sadece substratlarından belirli bir grubun hidrolitik çıkartılmasını değil, aynı zamanda bu grubun uygun akseptör moleküllerine transfer edilmesini de katalize ettiği bilinmektedir. Kural olarak, tüm hidrolitik enzimler transferaz olarak sınıflandırılabilir. Çünkü hidroliz kendisi de belirli bir grubun suya akseptör olarak transfer edilmesi olarak görülebilir. Ancak, çoğu durumda, suyun akseptör olarak kullanıldığı reaksiyon daha önce keşfedilmiş ve enzimin ana fizyolojik fonksiyonu olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle, bu tür enzimler transferazlar değil hidrolazlar olarak sınıflandırılır [15].

Liyazlar: hidroliz ve yükseltgenme (oksidasyon) harici yollarla C-C, C-O, C-N gibi çeşitli kimyasal bağları kırabilen, çoğu zaman bunu yeni bir çift bağ veya halka yapısı oluşturarak gerçekleştiren bir enzimdir. Sistemik ad, substrate group-lyase şablonuna göre oluşturulur. Tire, adın önemli bir parçasıdır ve karışıklığı önlemek için çıkarılmamalıdır. Genel adlarda, dekarboksilaz, aldolaz, dehidrataz gibi ifadeler kullanılır. Tersine reaksiyonun çok daha önemli olduğu veya sadece bir tanesinin gösterildiği durumlarda, sentaz adı kullanılabilir [15].

İzomerazlar: İzomerazlar, rasemizasyon ve epimerizasyon gibi izomerizasyon reaksiyonlarını katalize eder. Pek çok endüstriyel uygulamada kullanılmamıştır. Bununla birlikte, en başarılı enzim bazlı biyokatalitik işlemlerden biri bir izomeraz içerir: yüksek fruktozlu mısır şurubu (HFC'ler) üretimi için glikoz izomeraz kullanımı. HFCS, yiyecek ve içecek endüstrisinde sakaroza alternatif bir tatlandırıcı olarak kullanılır. Glikozun endüstriyel ölçekte hfc'lere izomerizasyonu, hareketsiz glikoz izomerazları kullanılarak sürekli sabit yataklı reaktörlerde gerçekleştirilir. Glikoz

izomeras tarafından üretilen toplam HFC miktarı yılda bir milyon tonu aşmaktadır. [14-15].

Ligazlar: Ligazlar, iki molekülün birbirlerine bağlanmasını ATP veya benzeri bir trifosfat içinde bir difosfat bağının hidroliziyle birlikte katalize eden enzimlerdir. Bağlar oluşturmak için ATP kullanan bir enzim olan ligaz, rekombinant DNA klonlamasında kullanılır. Yaygın olarak kullanılan ligaz, ilk olarak bakteriyofaj T4 ile enfekte olan *E. coli*'den izole edilen T4 DNA ligazıdır. Gen, T4 genomu tarafından kodlanır ve fajın enfeksiyon döngüsünde rol oynar. T4 DNA ligazı, çift sarmallı DNA'da bitişik 3'-hidroksil ve 5'-fosfataz ucu arasında fosfodiester bağlarının oluşumunu katalize eder. Ticari olarak temin edilebilen ligaz artık rekombinant DNA araçları ile üretilmektedir. Enzim, tek sarmallı nükleik asitler üzerinde etkili değildir. T4 DNA ligazı çift sarmallı DNA'daki çentikleri onarabilir. T4 DNA ligazı bir 5'fosfat gerektirdiğinden, bakteriyel alkalın fosfataz veya bağırırsak alkalın fosfataz kullanılarak fosfat grubunu vektörden çıkararak bir vektör DNA'sının yeniden birleşmesini önlemek mümkündür. [14-16].

Translokazlar: Translokaz, genellikle bir hücre zarı boyunca başka bir molekülün hareket etmesine yardımcı olan bir protein için genel bir terimdir. Bu enzimler, iyonların veya moleküllerin zarlar boyunca hareketini veya bunların zarlar içinde ayrılmasını katalize eder. Reaksiyon, "1. Taraf"tan "2. Taraf"a transfer olarak tanımlanır, çünkü daha önce kullanılmış olan "içeri" ve "dışarı" tanımlamaları belirsiz olabilir. Translokazlar, gram pozitif bakterilerde en yaygın salgı sistemidir. Translokazlar, kritik işlevleri nedeniyle biyolojik aktivitelerde önemli bir rol oynar. Örneğin, mitokondriyal fonksiyon için gerekli proteinlerin çoğu, hücrenin çekirdeği tarafından kodlanır. Dış zarın translokazı (TOM), proteinleri mitokondriye taşımak için iç zarın translokazı (TIM) ile birlikte çalışabilir. Preproteinler söz konusu olduğunda, mitokondriyal matrise taşınması, iç zarın (TIM23 kompleksi) ve translokazla ilişkili motorun (PAM) ön sıra translokazını gerektirir. Karnitin-açilkarnitin translokazı, hem karnitin-yağ asidi komplekslerinin hem de karnitinin iç mitokondriyal zar boyunca taşınmasından sorumludur, bu, yağ asitleri yardım almadan mitokondriyal zarları geçemediğinden gereklidir. ADP / ATP translokazları, iç mitokondriyal zar boyunca sitozolik adenzin difosfat (ADP) ve mitokondriyal adenzin trifosfat (ATP) değişimini sağlayan taşıyıcı proteinlerdir. Serbest ADP

sitoplazmadan mitokondriyal matrise taşınırken, oksidatif fosforilasyondan üretilen ATP mitokondriyal matristen sitoplazmaya taşınır ve böylece hücrelere ana enerji para birimini sağlar. DNA translokazları, ATP hidrolizinin kimyasal enerjisini DNA boyunca yönlü harekete dönüştürebilen motor proteinlerdir. Farklı taşıma enzimleri organizmalarda farklı işlevler oynar ve yaşam aktiviteleri için büyük önem taşıyan iç ortamın stabilitesini korur.

2.2. Proteazlar

Proteazlar, peptid bağlarını hidrolize eden enzimlerdir. Bu enzimler, proteinleri hücreler tarafından absorblanabilir daha küçük moleküllere parçalar. Proteazlar, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği tarafından geliştirilen EC numaraları sistemine göre hidrolazlar (Sınıf 3) ve peptidazlar (alt sınıf 3.4) olarak sınıflandırılır ve EC 3.4. başlığı altında toplanır. [15].

Bir proteolitik enzim, bir proteinden veya daha büyük bir peptitten bir amino asit veya bir peptit açığa çıkarır. Proteoliz, birçok protein için translasyon sonrası işlemin son aşamalarından biridir ve tek yönlüdür. Biyosentezden hemen sonra veya proteinin çalışması gereken yere yönlendirildiği bir süre sonra ortaya çıkabilir [16]. Çok az protein proteolize dirençlidir. Başlatıcı metiyonini yeni sentezlenen sitoplazmik proteinlerden uzaklaştırmak, sinyal peptidlerini hücrenin salgı yolunu hedef alan proteinlerden uzaklaştırmak, mitokondriyon veya kloroplast gibi spesifik organelleri hedef alan proteinlerden hedefleme sinyallerini uzaklaştırmak, öncüler olarak sentezlenen enzimlerden, hormonlardan ve reseptörlerden propeptitleri uzaklaştırmak için proteoliz gereklidir. Patojenler ve parazitler ayrıca konakçıları istila etmek ve onlara zarar verebilecek veya üremelerine müdahale edebilecek herhangi bir konakçı proteini etkisiz hale getirmek için proteolitik enzimler kullanırlar. Bir protein metabolizması bozulmasının tümör istilası, romatoid artrit veya Alzheimer hastalığı gibi hastalıklara yol açtığı birçok patolojik durum vardır [17].

Hemen hemen tüm organizmaların çalışması için proteolitik enzimlere ihtiyacı vardır. Genomlarında proteolitik enzimleri kodlamayan bazı virüsler vardır. Ancak bunlar bile onlar için işlemi yapmak için konakçı enzimleri kaçırmaz. Bir bakterideki proteolitik enzimlerin sayısı, bakteriyofajlardan ve plazmidlerden türetilen dizilere bağlıdır. Bakteriyofajlar ve plazmitler kendi benzersiz proteolitik enzimlerini kodladıklarından, bir bakterinin ne kadar çok suşu dizilirse, toplam proteolitik enzim

sayısı o kadar fazla olacaktır. [18]. Proteazlar, birçok farklı endüstriyel uygulamada kullanıldıklarından dolayı enzim ticaretinde önemli bir yere sahip olup, et ve süt ürünlerinin işlenmesinde, çamaşır deterjanlarında, deri işlemede, ilaç üretiminde, organik sentezlerde ve atık arıtımında kullanılırlar. Proteazlar endüstriyel enzim ticaretinde kullanılan enzimlerin %59'unu oluşturdıklarından diğer enzimlerden daha yaygın olarak kullanılırlar ve çevre dostu bir seçenek olarak da değerlendirilebilirler [8-10].

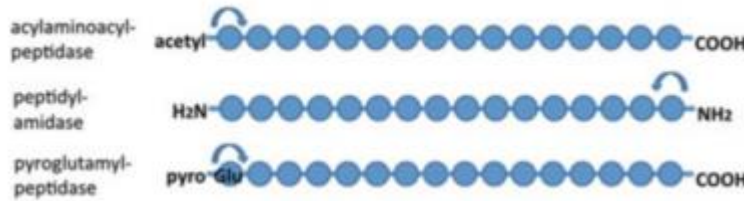
2.2.1. Proteazların Sınıflandırılması

The International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) tarafından kullanılan genel enzim adlandırma sistemi (EC sistemi) proteazları hidrolazlar olarak adlandırılan 3. grubun 4. alt grubunda sınıflandırmaktadır. EC sistemi, enzimleri kimyasal etki mekanizmalarına göre sınıflandıran bir sistemdir. Bu sistemde, hidrolazlar katalizördür ve hidrolik olarak su molekülleri kullanarak bir molekülü diğerine parçalar. Proteazlar ise amino asitlerin peptidler ve proteinlerin peptid bağlarını hidrolik olarak parçalayan enzimlerdir, bu nedenle EC 3.4 altında sınıflandırılırlar. Ancak proteazların etki mekanizmaları ve yapısal çeşitlilikleri nedeniyle, EC sisteminde diğer enzim sınıfları gibi tam olarak sınıflandırılmazlar. Örneğin, proteazların bir kısmı proteinleri hidrolitik olarak parçalamak için peptid bağlarını keserken, diğerleri ise amino asitleri hidrolik olarak parçalamak için proteinlerin içindeki peptid bağlarını koparır. Bu nedenle, proteazların çeşitli alt grupları vardır, bunların arasında peptidazlar, proteazlar ve proteinazlar yer alır [18].

Peptidazlar, “ekzopeptidazlar” olarak bilinen serbest bir N- veya C-terminaline bağlı olan ve bunlara etki eden ve bir veya her iki ucunun bloke edilip edilmediğine bakılmaksızın iç peptid bağlarına etki eden endopeptidazlar” olarak iki geniş gruba ayrılmıştır. Proteazlar genellikle aktif bölgelerindeki fonksiyonel amino asit köklerine göre sınıflandırılırlar. Dört ana grup vardır: serin proteazlar (EC 3.4.21), aspartik proteazlar (EC 3.4.23), metalloproteazlar (EC 3.4.24) ve Sistein/tiol proteazlar (EC 3.4.22) [17-18].

Endopeptidazlar

Endopeptidazlar, ekzopeptidazlarla aynı şekilde kolayca gruplandırılmaz. Tek büyük ayırım, herhangi bir boyuttaki peptitler ve proteinler üzerinde etkili olanlar ile kısa peptitler üzerinde etkili olanlar arasındadır. "Omega-peptidazlar" olarak bilinen başka bir peptidaz grubu daha vardır. Bunlar standart peptit bağları üzerinde değil, amino asitlerden birinin modifiye edildiği peptit bağları veya alfa karbon tarafından yapılmayan peptit bağları üzerinde etki eder. Şekil 1, bu tür omega-peptidazların çeşitliliğini göstermektedir. İzopeptit bağları, bir proteinin bir karboksi ucu ile başka bir protein üzerindeki bir amino asidin (genellikle lizin) yan zincirindeki amino grubu arasında oluşur. Ubikuitin ve sumo gibi küçük proteinlerin eklenmesiyle bozunma veya translokasyon için birkaç protein hedeflenir. Bu hedefleme proteinlerini yeniden kullanılabilmesi için uzaklaştıran peptidazlar vardır ve bu peptidazlar izopeptit bağlarını parçalamaktadır [19]. Genellikle bu peptidazlar, normal bir peptit bağı olan N-terminal amino grubuna bağlı hedef proteinleri de çıkarabilir. Bu nedenle, özellikle izopeptidazlar için EC kategorisi yoktur.

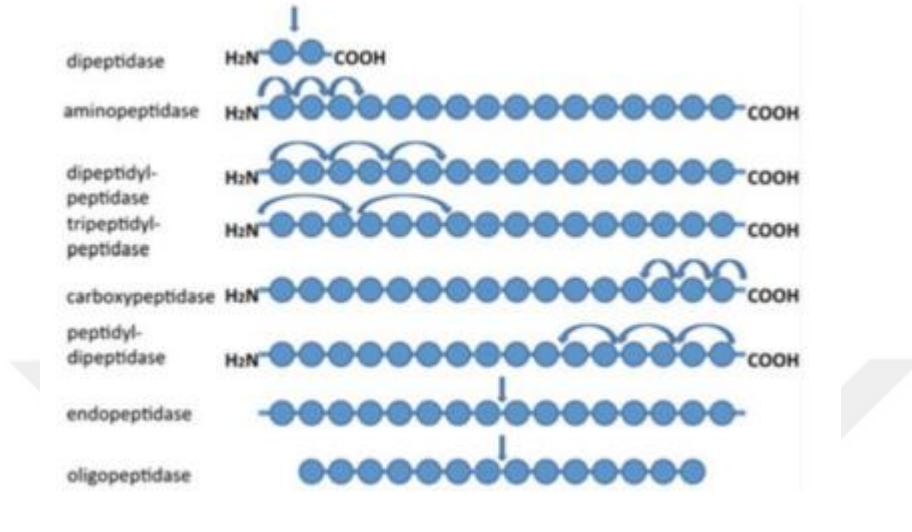


Şekil 1. Omega-peptidazlar. Şekil, omega peptidazların katalitik aktivitesinin bazı örneklerini göstermektedir. Her bir polipeptid zinciri substratı, her bir boncuk ise bir amino asidi temsil etmektedir. Oklar bölünme pozisyonlarını gösterir.

Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar, N- veya C-terminalinde hareket edip etmediklerine ve bir bölünme sırasında salınan amino asit sayısına göre daha da bölünebilir. Bir N-terminal amino asidi serbest bırakan bir ekzopeptidaz, bir aminopeptidazdır (EC alt sınıfı 3.4.11). N terminalinden bir dipeptid salıyorsa, bir dipeptidil peptidazdır (EC alt alt sınıfı 3.4.14) ve bir tripeptid salınırsa bir tripeptidilpeptidazdır (EC alt alt sınıfı 3.4.14'e de dahildir). C terminalinden tek bir amino asit salan bir ekzopeptidaz, bir karboksipeptidazdır (EC alt sınıfları 3.4.16, 3.4.17 ve 3.4.18); ve eğer bir dipeptit

salınırsa, bir peptidil dipeptidazdır (EC alt sınıfı 3.4.15). Sadece bir dipeptidi parçalayan bir ekzopeptidaz, dipeptidaz olarak bilinir (EC alt alt sınıfı 3.4.13). Bu faaliyetler Şekil 2 de gösterilmiştir [20].



Şekil 2. Özgülüğe göre sınıflandırma. Enzim İsimlendirme alt alt sınıflarına göre farklı peptidazların katalitik aktivitesini göstermektedir. Her bir polipeptid zinciri substratı, her bir boncuk ise bir amino asidi temsil etmektedir. Oklar bölünme pozisyonlarını gösterir.

Ekzopeptidazlar, proteinlerin peptid bağlarını keserek parçalayan enzimlerdir ve sadece proteinlerin sonunda bulunan peptid zincirlerine etki etmektedir. Ekzopeptidazlar, peptidlerin N ucuna (aminopeptidaz) veya C ucuna (karboksipeptidaz) etki ederek, proteinleri parçalar ve böylece proteinlerin yıkımını sağlar [20-21].

Aminopeptidazlar

Aminopeptidazlar, proteinlerin ve polipeptidlerin N uçlarındaki peptid bağlarını hidroliz ederken, karboksipeptidazlar ise proteinlerin ve polipeptidlerin C uçlarındaki peptid bağlarını hidroliz ederler. Omega peptidaz, aminopeptidazların ve karboksipeptidazların özel türlerini ifade eden bir ek terimdir ve bu enzimler, serbest -amin veya -karboksil grubu olmayan terminal kalıntıları veya -peptid tipi dışındaki bağlara etki ederler. Aminopeptidazlar, üç gruba ayrılır: polipeptit zincirinde bir amino asit kalıntısının salınımı ile ilk peptid bağını hidroliz eden (aminoaçıl- ve iminoaçıl

peptidazlar [EC 3.4.11]) aminopeptidazlar; polipeptit zincirlerinden dipeptit veya tripeptitleri uzaklaştıran (dipeptidil- ve tripeptidil peptidazlar [EC 3.4.14]) aminopeptidazlar ve yalnızca dipeptit veya tripeptitleri hidroliz eden (dipeptidazlar [EC 3.4.15] ve tripeptidazlar [EC 3.4.14.4]) aminopeptidazlar [22]. Aminopeptidazlar, bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve memelilerde yaygındır. Bu enzimler, sitoplazmada, lizozomlarda ve zarflarda bulunan farklı alt hücre boşluklarında yer alır ve aynı zamanda ekstrasellüler ortama da salgılanabilir. Katalitik mekanizma açısından, aminopeptidazların çoğu metallo-enzimdir ancak sistin ve sistein peptidazlar da bu gruba dahil edilir. Bazı aminopeptidazlar monomerik olmasına rağmen, özellikle ökaryotik organizmalardan gelenler çoğunlukla polimerik yapılara sahiptir [21-22].

Karboksipeptidazlar

Karboksipeptidazlar, yiyeceklerin sindiriminden başlayarak hücreler arası iletişimde görev alan peptitlerin biyosentezine kadar geniş bir fizyolojik süreç yelpazesinde yer alır. Karboksipeptidazların iki ana grubu vardır; bir tanesi aktif bölge kalıntısı olarak serin kullanır ve diğeri ise aktif bölgede çinko kullanır [23]. Serin ve metalkarboksipeptidazlar, hiçbir amino asit dizilimi benzerliği paylaşmaz. Metalokarboksipeptidaz ailesi, amino asit dizilimi benzerliklerine göre iki alt gruba ayrılabilir. Her grubun kendi grubunun diğer üyeleriyle yaklaşık %40-60 amino asit dizilimi benzerliği vardır, ancak diğer grubun üyeleriyle sadece %15-25 amino asit dizilimi benzerliği vardır. Metalkarboksipeptidaz ailesinin her üyesi ayrıca, substrat özelliklerine göre C-terminal aromatik veya alifatik kalıntı seçici enzimler, C-terminal temel kalıntı seçici enzimler olarak sınıflandırılabilir [24].

Serin Proteazlar (EC 3.4.21)

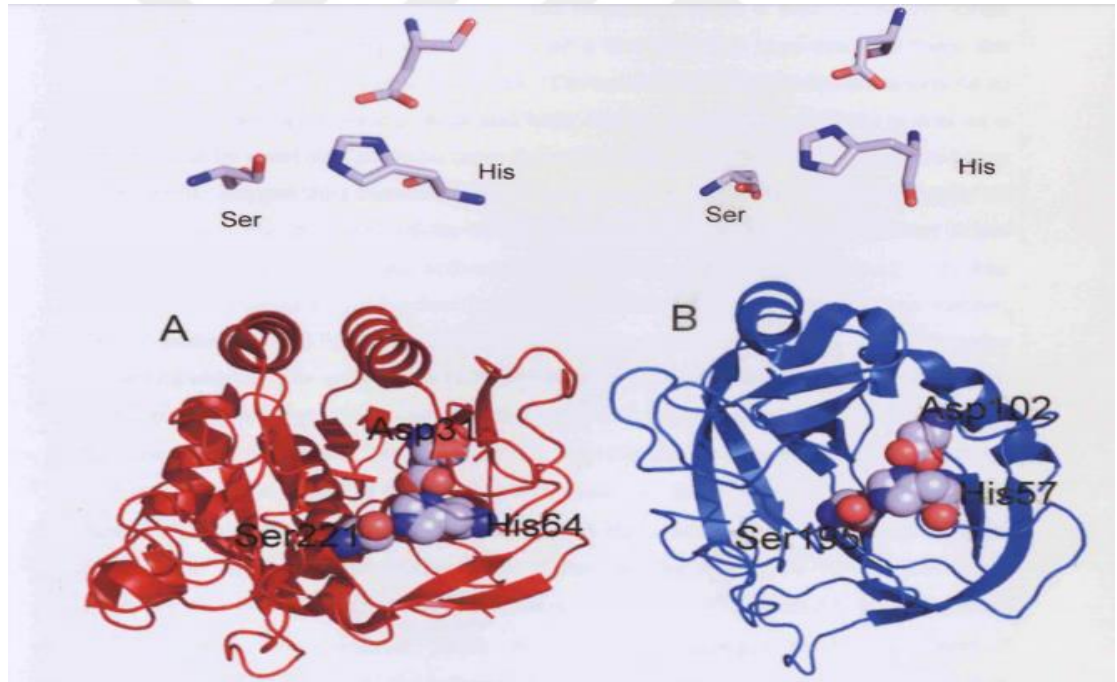
Sınıflandırma sistemi, proteazları katalitik mekanizmaya dayalı olarak klanlara ve ortak soy temelinde ailelere ayırır. Bilinen tüm proteolitik enzimlerin üçte birinden fazlası, 13 klan ve 40 familya halinde gruplandırılmış serin proteazlardır. Aile adı, bir açıl enzim ara maddesi oluşturmak üzere substrat peptid bağının karbonil kısmına saldıran enzim aktif bölgesindeki nükleofilik Serin amino asidinden (Ser) kaynaklanmaktadır [25].

Katalitik Ser'in nükleofilikliği tipik olarak, Asp, His ve Ser kalıntılarının oluşturduğu katalitik üçlüye bağlıdır. Tripsin, subtilisin, prolil oligopeptidaz ve ClpP peptidaz tarafından gösterildiği gibi en az dört farklı protein kıvrımı, peptit bağlarının hidrolizini katalize etmek için Asp-His-Ser katalitik üçlüsünü aynı konfigürasyonda kullanır [25]. Bu, üçlünün dört farklı evrimsel yolda katalitik bir makine olarak başarısının kanıtıdır. Birçok serin proteaz, Lys veya His'in katalitik Ser ile eşleştirildiği daha basit bir ikili mekanizma kullanır. Diğer serin proteazlar, nükleofilik Ser ile birleştirilmiş bir çift kalıntısı gibi yeni kalıntı üçlüleri aracılığıyla katalize aracılık eder. Serin proteazlar doğada yaygın olarak dağılır ve birçok viral genomun yanı sıra hücresel yaşamın tüm evrelerinde bulunur. Bununla birlikte, her klanın türler arasındaki dağılımında önemli farklılıklar vardır. Örneğin, klan PA proteazları ökaryotlarda yüksek oranda temsil edilir, ancak prokaryotik ve bitki genomlarının nadir bileşenleridir. Omurgalılar, çeşitli hücre dışı süreçlerden sorumlu bir dizi klan PA proteazına sahiptir. SB ve SC klanları en çok diğer organizmalarda temsil edilir. Serin proteazlar genellikle endoproteazlardır ve bir polipeptit zincirinin ortasında bağ hidrolizini katalize eder [26]. Bununla birlikte, hedef polipeptit zincirlerinin ucundan bir veya daha fazla amino asidi uzaklaştıran birkaç ekzoproteaz ailesi tanımlanmıştır. Aslında dört proteaz ailesi kendi başlarına insanlardaki tüm proteolitik enzimlerin %40 dan fazlasını oluşturur. Bunlar, düzenlenmiş hücre içi protein döngüsünden sorumlu ubiquitine özgü proteazlar [27], büyüme faktörlerini ve integrin fonksiyonunu kontrol eden oligopeptidazlar ve aynı zamanda en büyük homolog protein grubu olan tripsin benzeri serin proteazlardır [28]. İnsandaki 699 proteazdan 178'i serin proteazdır ve 138'i S1 proteaz ailesine aittir. S1 proteazlarının bolluğu, protein katının diğer proteazlara göre seçici bir avantaj sağladığını gösterir. S1 proteaz ailesinin tripsin kıvrımı, katalitik verimliliği, substrat seçiciliğini ve diğer yardımcı protein modülleriyle kolayca ilişkilendirilen çoklu düzenleme seviyelerini barındırır [28-30]. Hemen hemen tüm klan PA proteazları katalitik üçlüyü kullanır ve peptit bağını iki dört yüzlü ara madde yoluyla hidrolize eder. Başlangıçta, katalitik S195'in hidroksil O atomu, genel bir baz olarak H57 kullanılarak substrat peptid bağının karboniline saldırır. Oksianyon tetrahedral ara maddesi, omurga tarafından stabilize edilir. G193 ve S195 birlikte oksianyon deliği olarak bilinen aktif bölge içinde pozitif yüklü bir cep oluşturur. Oksianyon deliğindeki H bağlanma etkileşimleri, zemin ve geçiş durumu stabilizasyonuna 1.5–3.0 kcal / mol lük katkıda bulunur. Tetrahedral ara maddenin çökmesi açıl enzim ara maddesini oluşturur ve yeni oluşturulan N terminalinin

stabilizasyonuna H57 aracılık eder. Bir su molekülü, serbest polipeptit parçasının yerini alır ve açıl-enzim ara maddesine saldırır. Oksianyon deliği, yolun ikinci dört yüzölü ara maddesini stabilize eder ve bu ara maddenin çökmesi, substratta yeni bir C-terminali oluşturur [31].

Subtilisinler

Bacillus orijinli subtilisinler serin proteazların ikinci büyük ailesine dahildirler. Subtilisinlerin tüm alt aileleri biyoteknoloji için umut vaat etmektedir. Yaygın kullanım ilk alkali serin proteaz, *Bacillus subtilis*'ten bir alkali serin proteaz olan subtilisin A (EC 3.4.21.62) dır. Subtilisinlerin keşfi ve incelenmesi tarihi, Carlsberg adlı bir bira bira şirketinin araştırma merkezinde başladı ve tarif edilecek ilk enzime “Subtilisin Carlsberg” adı verildi [32].



Şekil 3. Subtilisin Carlsberg (A) ve Tripsin (B) enzimlerinin aktif bölgesi [32].

Serin proteazların katalitik merkezi Asp-32, His-64 ve Ser-221 olmak üzere üç amino asit kalıntısından oluşur. Nükleofilik saldırıyı gerçekleştiren amino asit kalıntısı Ser-221 olduğu için subtilisinler ve ilgili proteolitik enzimlere serin proteinazlar denir [31]. Yüksek alkali proteazlar arasında, *Bacillus* sp suşundan izole edilen bir enzim vardır. Optimum aktivitesi 55 ° C ve pH 12.3'tür. Bu enzim, ilgili yüksek alkali

proteazlar endüstride bir deterjanla kompleks halinde kullanılır. Ara subtilisinler, gerçek subtilizinler ile yüksek alkali proteazlar arasında bir yeredir ve bazı umut verici enzimler içerir. Örneğin, *Alkaliphilus transvaalensis*'ten izole edilen ALTP enzimi [32] çok yüksek sıcaklıklarda ve pH'ta, yani 70 ° C'de ve pH> 12.6'da maksimum aktivite gösterir. Bununla birlikte, ALTP daha düşük sıcaklıklarda ve pH'da katalitik bir işlev de gerçekleştirebilir.

Aspartik proteazlar

Aspartik proteazların tümü endoproteazlardır. Su, bilinen ailelerin çoğu üyesinde iki aspartatla bağlanır, ancak bazı ailelerde aktif proteaz, her monomerin aspartatlardan birini sağladığı bir homodimerdir. Klan AA, pepsin (A1) ve HIV-1 retropepsin (A2) ailelerini içerir. Pepsinin yapısı, eski bir gen çoğaltma / füzyon olayını açıkça göstermektedir [32]. Kimopapain ve metionil aminoproteazda gözlemlendiği gibi, her bir alt alan aktif bölge aspartatlarından birini taşır. Bununla birlikte, retropepsinin yapısı tek bir pepsin alt alanını temsil eder ve bu nedenle proteaz yalnızca bir homodimer olarak aktiftir [33]. Retropepsin benzeri tek alan veya pepsin benzeri iki alandan hangisini mimarinin ataların durumunu temsil ettiği konusunda önemli tartışmalar olmuştur. Yakın zamana kadar A1 ailesindeki bakteri homologları bilinmiyordu, ancak artık durum böyle değil; ayrıca, ökaryotlardan ve bakterilerden retropepsin tek alanlı mimarisine benzer birkaç proteaz ailesi, özellikle A28 aileleri (DNA hasarına neden olabilir protein DDI) keşfedilmiştir [34]. Retropepsin benzeri proteazlar, yalnızca dimer olarak aktif olan tek aspartik proteazlar değildir. *Plasmodium falciparum*'dan gelen histoaspartik proteaz, aspartik çiftlerinden birinin korunmaması ve yerine bir histidin konması bakımından istisnai bir durumdur. Alışılmadık bir şekilde, bu histidin katalitik aktivite için gerekli değildir [35]. Apoenzimde bir çinko iyonunu bağlar ve aktif olması için proteazın dimerleşmesi gerekir. Aspartik proteazlar ağırlıklı olarak asidik bir pH optimumuna sahiptir, ancak A1 ailesindeki renin ve A2 ailesindeki retropepsinler ve presenilinler (A22 ailesi A alt ailesi), sinyal peptidi proteazları (A22 ailesi B alt ailesi) ve omptin (A26 ailesi) gibi zara bağlı proteazlar gibi istisnalar vardır [36].

Sistein/Tiol Proteazlar

Sistein peptidaz familyası, sisteinin nükleofilik tiyolü taşıdığı ve histidinin genel bir baz görevi gördüğü temel bir Cys / His ikilisine sahiptir. CD klanındaki

peptidazlar sadece katalitik ikiliye sahiptir. Histidin halkasının konumlandırılması için yine önemli olduğu düşünölen üçüncü bir kalıntı söz konusu olabilir. Bu üçüncü kalıntı asparajin (papain ve kalpainde olduğu gibi), aspartat (adenain ve bazı ubikuitinleştirici enzimlerde olduğu gibi) veya glutamat (piroglutamil-peptidaz I'de olduğu gibi) olabilir. Oksianyon deliğinin oluşmasına yardımcı olarak açıl ara maddesini stabilize etmek için dördüncü bir kalıntı da önemli olabilir. Bu dördüncü kalıntı, bir glutamin (papain ve kalpainde olduğu gibi), bir asparajin (bazı deubikuitinleştirici enzimlerde ve ayak ve ağız hastalığı virüsünden L-peptidazda olduğu gibi) veya bir tirozin (otofajinler ve UfSP1 peptidaz) olabilir. CA, CF, CN ve CO klanlarının üyelerinde katalitik diad sırası Cys, His, CD, CE, CL ve CM klanlarında ise His, Cys dir [34-35].

Metalloproteazlar

Bir metallopeptidazdaki metal iyonu genellikle çinkodur, ancak metiyonil aminopeptidaz 1 (M24 ailesi) kobaltı bağlar, aminopeptidaz P (M24 ailesi) manganezi bağlar ve VMP3 peptidazı bakırı bağlar. Bazı metallopeptidazlar, her ikisi de kataliz için önemli olan iki metal iyonunu bağlar ("ko-katalitik"). İki metal iyonuna sahip peptidazlar MF, MG, MH, MN ve MQ klanlarıyla sınırlıdır [34-35]. Her metal iyonu, üç amino asit yan zincir ligandı ve bir su molekülü tarafından tetrahedral olarak koordine edilir. Ko-katalitik metal iyonlarına sahip peptidazlarda, bir amino asit her iki metali de bağlar, bu nedenle beş amino asit ligandı vardır. Ligandlar genellikle histidinler, glutamatlar veya aspartatlardır, ancak bir lizin, lös aminopeptidazdaki bir metal ligandır. Daha önce sadece yapısal metal iyonları için bir ligand olarak bilinen ve *Staphylococcus aureus*'tan (M20 ailesi) elde edilen HmrA peptidazın çinko ligand olarak sistein kullandığı gösterilmiştir [37].

2.3. Alkalen Proteazlar

Alkali proteazlar (EC.3.4.21-24, 99), 9 ila 11 arasında optimum pH değerine sahip alkali pH'da aktif olan enzimlerdir [39]. "Bacillus" cinsi, endüstriyel alkali proteazların önemli bir kaynağıdır ve muhtemelen alkali proteaz üretimi için ticarileştirilen tek cinslerdir [40-41]. Toprakta ve suda yaygın olarak dağılırlar ve bazı suşlar, yüksek alkali koşullar dahil olmak üzere aşırı çevresel koşulları tolere eder. Alkali proteaz üreten *Bacillus* spp izolasyonu, yüksek pH ve/veya deterjan kontaminasyonunun varlığı ile karakterize edilen topraklar dahil olmak üzere

kurutulmuş balık [42], kum toprağı, süt işleme tesisi, mezbahalar [43] gibi çeşitli kaynaklardan bildirilmiştir [42-45]. Enzim pazarının en büyük payını, çoğunlukla alkali serin proteaz olan ve nötr ila alkali pH aralığında aktif olan deterjan proteazları oluşturur. Alkali serin proteazlar, aktif bölgelerinde katalitik bir üçlü oluşturan Serin (Ser) ile birlikte Aspartat (Asp) ve Histidin (His) kalıntılarına sahiptir [46]. Serin proteazlar, enzim pazarındaki payın üçte birine katkıda bulunur ve Fenil Metan Sülfonil Florür (PMSF) ile kolayca inaktive edilir [47].

Farklı asidik, nötr ve alkali proteaz türleri arasında alkali proteaz, alkali pH'daki aktiviteleri ve stabiliteleri açısından en yaygın kullanılan endüstriyel enzim olarak çok önemli bir rol oynar.

2.3.1. Alkalen Proteazların Kullanım Alanları

Mikrobiyal proteazlar en önemli hidrolitik enzimler arasındadır ve enzimolojinin ortaya çıkışından bu yana kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Alkali proteazların uygulamaları enzim pazarları arasında en ön sırayı almaktadır [50]. Sadece önemli miktarda hücre dışı enzim üreten mikroplar endüstriyel öneme sahiptir. Bakteriyel alkali proteazlara dayalı çeşitli ürünler son birkaç yılda piyasada başarıyla piyasaya sürülmüştür [51-52]. Mikrobiyal proteazlar genel olarak çeşitli endüstrilerde çok çeşitli uygulamalara sahiptir [23, 25-26].

Proteazlar, birçok farklı endüstriyel uygulamada kullanıldıklarından dolayı enzim ticaretinde önemli bir yere sahip olup, et ve süt ürünlerinin işlenmesinde, çamaşır deterjanlarında, deri işlemede, ilaç üretiminde, organik sentezlerde ve atık arıtımında kullanılırlar. Proteazlar endüstriyel enzim ticaretinde kullanılan enzimlerin %59'unu oluşturdıklarından diğer enzimlerden daha yaygın olarak kullanılırlar ve çevre dostu bir seçenek olarak da değerlendirilebilirler [8-10].

Deterjan Endüstrisinde Proteaz Kullanımı

Proteazlar, deterjan endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Proteazlar her türlü deterjanın standart maddelerinden biri olup, aynı zamanda gözlük ve diş protezlerinin temizlenmesi için kullanılan reaktiflerde de bulunur. Özellikle çamaşır deterjanlarında proteazların kullanımı, enzimlerin toplam dünya satışlarının yaklaşık yüzde 25'ini oluşturur. İlk enzimatik deterjan olan "Burnus"un hazırlanışı 1913'e

dayanmaktadır ve sodyum karbonat ve kaba pankreas ekstrelerinden oluşur. 1956'da ilk bakteriyel enzim içeren deterjan piyasaya sürülmüştür ve 1960'ta Novo Industry A/S, *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen alkalaz'ı piyasaya sürdü. Bunu, Gist-Brocades tarafından üretilen Maxatase adlı bir deterjanı takip etmiştir. Daha yeni olarak, *Bacillus cereus* BM1 proteazının deterjanlarla uyumlu olduğu rapor edilmiştir. Bu enzim, Fabs Perfect adlı bir deterjanın %10'a kadar w/v çözeltisinde aktivitesini koruyabilmiştir [53]. Bu durum enzimin ticari endüstride uygulanabileceği anlamına gelebilir. Deterjan proteazlarının seçimi için önemli parametrelerden biri pI değeridir. Deterjan çözeltisinde çalışan proteazların pH değerinin enzimlerin pI değeriyle aynı olması durumunda en iyi şekilde çalıştığı bilinmektedir. Ancak, iyi bir deterjan proteazı seçiminde birçok parametre daha vardır, örneğin deterjan bileşenleriyle uyumluluk, yüzey ağartıcılar, parfümler ve açıcılar gibi, uygun çamaşır pH ve sıcaklıklarında iyi aktivite, deterjan çözeltisinin iyonik kuvvetiyle uyumluluk, leke parçalama ve kaldırma potansiyeli, kararlılık ve raf ömrü gibi. Geleneksel olarak, deterjanlar yüksek çamaşır sıcaklıklarında kullanılmıştır, ancak şu anda geniş bir sıcaklık aralığında etkili alkalın proteazların tanımlanması konusunda büyük ilgi vardır. Genel olarak, piyasada bulunan çoğu enzim, açıcı/oksitleyici ajanların varlığında stabil değildir. Bu nedenle, enzim bazlı deterjanlardaki son trend, daha iyi stabiliteye sahip biyo-mühendislik enzimleri üretmek için rekombinant DNA teknolojisinin kullanımıdır. [54-55].

Gıda Endüstrisinde Kullanımı

Süt endüstrisinde mikrobiyal proteazlar peynir oluşum sürecinde faydalı olmuştur. Peynir üretiminde süte proteaz enzimleri eklenir, böylece kaseinleri (özellikle kappa kasein) hidrolize eder, bu da micellerin oluşumunu stabil hale getirir ve koagülasyonu önler [56]. Proteazlar ayrıca un endüstrisinde de kullanılır. Eğer gluteninin kısmen hidrolize edilmişse, hamur daha hızlı hazırlanabilir [57]. Daha sonraki pişirmede erken inaktive olacak şekilde ısı duyarlı bir fungal proteaz kullanılır. Mikrobiyal alkalın proteazlar, yüksek besin değeri olan protein hidrolizatlarının hazırlanmasında kullanılmıştır [29]. Protein hidrolizatları, kan basıncı düzenlemesinde önemli bir rol oynar ve bebek mamalarının formülasyonunda, özel terapötik diyet ürünlerinde ve meyve sularının ve hafif içeceklerin besin öğelerinin artırılmasında kullanılır [30-32].

Atık Arıtımı ve Dönüşümünde Proteazlar

Çevreyi ve çevresini çok tehlikeli hale getirebilecek atıkların kimyasal işlemine, atık yönetiminin ekolojik bir yolla işlenmesi için alternatif bir yol bulmaya yönelik çalışmalar yapılmıştır. Atık tüyler, deri ağırlığının yaklaşık %5'ini oluşturur ve sağlam keratin yapıları tamamen yok edildiğinde yüksek protein kaynağı olarak görülürler. Gıda ve yem endüstrisi atıkları için keratinolitik proteazların, deri atıklarından gelen atık keratin materyallerinin parçalanmasında [56] ve boruları tıkanan saç deposu içeren atıkları temizlemeye yardımcı olan tüy çıkarmada [57] kullanımı rapor edilmiştir. Piyasada şu anda mevcut olan bir formülasyon, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* ve *Streptomyces* sp. tarafından üretilen proteolitik enzimler ve saçın parçalanmasını artıran bir disülfid azaltıcı ajan (tiyoglikolat) içerir. Bu formülasyon, Genex tarafından hazırlanmış ve patentlenmiştir [58].

Fotğrafçılıkta Proteaz Kullanımı

Fotografik endüstride, kimyasal yöntemler yerine enzimatik işlemlerin kullanımı, çevre dostu olması açısından avantajlıdır. *Bacillus subtilis*, *Conidiobolus coronatus* ve *Streptomyces avermectinus* gibi alkalın proteazların X ışınlı filmlerden gümüşün başarılı bir şekilde geri kazanımı rapor edilmiştir [58-59]. Ayrıca, baskı için kullanılmış şerit filmlerden polietilen teraftalat ve gümüşün geri kazanımının da alkalofilik *Bacillus* sp. B21-2'den alkalın proteazın termo stabil mutant enziminin kullanımıyla gerçekleştirildiği rapor edilmiştir [59].

Tekstil Sanayiinde Proteaz Kullanımı

Ham ipeklerin liflerini kaplayan serisin, proteinlerden oluşan bir madde olduğu için, lifleri açık hale getirilmelidir. Geleneksel olarak, bu işlem sıklıkla sabun içeren bir alkali çözeltide yapılır. Bu yöntem, lifleri de etkileyerek sert bir işlemdir. Ancak, seçili alkalın proteolitik enzimlerin kullanımı, lifleri etkilemeden serisini çıkararak daha iyi bir yöntemdir. Yüksek enzim konsantrasyonlarıyla yapılan deneyler, liflerin zarar görmediğini ve geleneksel işleme göre daha güçlü ipek ipliklerinin elde edildiğini göstermiştir [60].

Medikal Kullanımı

Proteazlar tıp alanında, yumuşak jel tabanlı ilaç formüllerinde, merhem kompozisyonlarında ve yeni bandaj malzemeleri geliştirilmesinde kullanılmıştır [60]. *Aspergillus oryzae*'den elde edilen proteazların ağız yoluyla verilmesi, enzim eksiklik sendromlarını düzeltmek için tanısız yardım olarak kullanılmıştır. Alkalın fibrinolitik proteazın, fibrini öncelikli olarak parçaladığı rapor edilmiş, bu da trombolik terapi ve antikanser ilaçlarında gelecekteki uygulamalarını öngörmektedir. Alkalın proteaz aktivitesine sahip kollagenazlar, yavaş salım doz formlarının hazırlanmasında terapötik uygulamalar için giderek daha sık kullanılmaktadır. *Aspergillus niger* LCF9 tarafından üretilen yeni yarı alkalın proteaz, yüksek kollagenolitik aktiviteye sahiptir. Enzimin, amino asit salımı olmaksızın çeşitli kollagen türlerini hidrolize ederek potansiyel terapötik kullanım için düşük molekül ağırlıklı peptitler üretmek için kullanıldığı rapor edilmiştir. Benzer şekilde, *Bacillus subtilis* 316M'den elde edilen elastoraz ın, yanık ve yaraların tedavisinde terapötik uygulamalar için bandaj üzerine immobilize edilerek kullanıldığı belirtilmiştir [61].

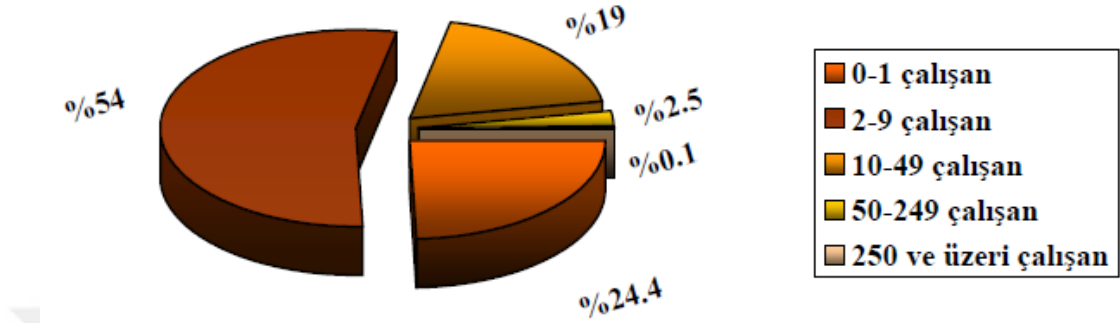
Diğer Kullanım Alanları

Endüstriyel ve medikal uygulamalarının yanı sıra, proteazlar temel araştırmada da önemli bir rol oynar. Seçici peptit bağı koparıcı etkileri, proteinlerin yapı-fonksiyon ilişkisinin belirlenmesinde, peptitlerin sentezinde ve proteinlerin diziliminde kullanılır. Özet olarak, proteazların hidrolitik etkisinin geniş özelleştiriciliği, gıda, deterjan, deri ve ilaç endüstrisinde yaygın bir uygulama bulurken, sentetik kapasiteleri ise proteinlerin sentezinde kullanılır [63-64].

Deri Endüstrisinde Proteaz Kullanımı

Canlı hayvanın dış etkenlerden korunmasını sağlayan deri, onun dış dünya ile iletişim kurmasına yardımcı olan ve hayvanın bir takım fizyolojik fonksiyonlarını yerine getiren karmaşık yapılu organik bir madde olup aynı zamanda çok büyük bir ekonomik değere sahiptir. Böyle büyük bir ekonomik öneme sahip olan ham derinin mamul hale getirilmesinde çok çeşitli yöntemler kullanılmaktadır [61]. Deri imalatı sektörü dünya çapındaki üretimin %2,87 lik, ülkemizin toplam imalat sanayii üretimi içinde %1 lik, imalat sanayii istihdamı içinde ise %1,5'ik oranla önemli bir sanayi koludur. Sektöre yönelik büyük işletmelerin Tuzla (İstanbul), Çorlu (Tekirdağ), Menemen (İzmir), Uşak, Bursa, Manisa ve Gönen (Balıkesir) yerleşkelerinde

bulunmakta olup bunun yanı sıra, Çanakkale, Isparta, Denizli, Niğde ve Bolu’da da küçük ölçekli işletmeler bulunmaktadır. Sosyal Güvenlik Kurumu 2012 istatistiklerine göre ülkemizde bulunan 6425 deri imalatı yapan işyerinin %99,9 u küçük orta büyük işletme statüsündedir [61]. İlgili dağılım Şekil 4’te belirtilmiştir



Şekil 4. Deri İmalatı İşyeri Büyüklükleri

Deri imalatı işlemleri dört ana grupta toplanabilir;

- Post ve Deri Depolama
- Kireçleme ve Kaveleta
- Kireç Giderme ve Sepileme
- İkinci Sepileme ve Son İşlemler

Post ve Deri Depolama

Post ve deriler, kesimhanelerde hayvanın gövdesinden elde edildikten sonra doğrudan tabakhanelere getirilirler. Önce büyüklüklerine göre sınıflandırılıp traş edilirler. Gerekli görülen durumlarda kokuşmayı önlemek için deri sertleştirilmektedir. Hazırlama aşamasına kadar post ve deriler boyutlarına göre sıralanıp, sertleştirilip Şekil 5’teki gibi depolanmaktadır. Böylece derinin tabaklama işlemine alınana kadar bozulmadan depolanmasını sağlamaktadır. Bu işlem tuzlama, tuzlu suya yatırma, kurutma ve tuzlu kurutma aşamalarını içermektedir. Bu sayede ham deri depolarda 6 aya kadar saklanabilmektedir [65].



Şekil 5. Deri İmalatı Sürecinde Depolama

Kireçleme ve Kaveleta

Post ve deri depolama işleminin ardından deriler tüylerinden arındırılma, içeriğindeki sudan arındırılma ve temizlenme amacıyla kireçleme odalarına alınırlar. Burada depolama kısmında, tuzlanan derinin tuzdan arındırılma işlemi gerçekleştirilir. Bir sonraki temizlik aşaması ise Kaveleta denilen sistemdir. Burada kireçlenmiş olan derinin yağ benzeri atıklardan detaylı bir şekilde arındırılması amaçlanmaktadır. Özellikle derisi yünle kaplı koyun, keçi oğlak derisi gibi hammaddelere, yün yapının deriye hasar vermeden uzaklaştırılması için kireç ve genel olarak sodyum sülfat içerikli boyalar uygulanmaktadır [65].



Şekil 6. Deri İşlemede Kireçleme

Kireç Giderme ve Sepileme (Tabaklama)

Artıklarından tamamen temizlenen deri, işleme alınmadan önce temizlik sırasında uygulanan kireçten arındırılır. Ardından derinin yapısına göre hazırlama sürecinde yapıldığı gibi deri eser miktarda kalan yağdan arındırılır. Derinin boyayı tutması amacıyla pH değeri düşürülür. Kireçten ve yağdan arındırılan, pH'ı düşürülen deri, krom tuzu, mineral ya da bitkisel özütlerle sepiyerek ara ürün olan ‘wet blue’ adını alır [65-66].



Şekil 7. Tabaklama işlemi sonrası derinin Wet-Blue hali

Deriye kazandırdığı mukavemetin bitkisel tanenlere göre daha yüksek olması müşteri taleplerinin daha kısa zamanda ve ihtiyaçlar doğrultusunda en iyi şekilde karşılanabilmesi, mamul derinin daha iyi fiziksel özellikler kazanması ve ekonomik yönden daha verimli olması gibi nedenlerden dolayı olumsuz çevresel etkilerine rağmen sepileme işlemlerinde %90 oranında krom tuzu kullanılmaktadır [64-65].

Küçükbaş hayvanların deri yüzeyinde, yünlerin bulunması nedeniyle küçükbaş derilerinin işlendiği işyerlerinde sepileme öncesi apreleme işlemlerinden zımparalama ve traşlama yapılmaktadır. Büyükbaş derilerinin işlenmesi sırasında ise tüm apreleme işlemleri sepileme işlemlerinin ardından yapılmaktadır [66].

İkinci Sepileme ve Son İşlemler

Sepileme sonrası işlemler temel olarak nötralizasyon, ikinci sepileme ve yıkama işlemlerinden oluşmaktadır. Nötrleme işlemi tekrar tabaklama işlemine zemin hazırlamak için pH değerinin ayarlanması işlemlerini kapsamaktadır [67].

İşlenecek derinin kalitesinin yükseltilmesi amacıyla derinin alkalitesinin artırılması, ilk sepileme sırasında işleme alınamayan kısımların onarılması amacıyla ikinci sepileme son işlemlerin ikincisidir. Burada sepileme sürecinde kullanılan kimyasallar kullanılmaktadır [66].

Derinin son ürün özelliğine göre boyanması bu kategoriye giren diğer bir süreçtir. Burada genel olarak su bazlı asidik boyalar kullanılmaktadır. Boyamanın ardından kurutma işlemi ile son ürüne dönüşecek deri ara mamulü elde edilir. Burada vakumlu kurutma, asarak kurutma, santrifüjlü kurutma yöntemleri ile kurutulan özellikle büyükbaş derileri deri apreleme işleminden geçer [67-68].



Şekil 8. Deri imalatı sürecinde renk verme işlemi

Apreleme son ürünün renk, parlaklık, kavrama, esneklik, kırılabilirlik, su buharı geçirgenliği ve su geçirgenliğine göre mekanik apreleme ve yüzey kaplaması olmak üzere iki şekilde uygulanır. Mekanik apreleme işlemi sayesinde deriye istenen nem, yumuşaklık, pürüzsüzlük koşulları sağlanırken yüzey kaplama işlemi ile deri dış etkenlerden etkilenmeyecek şekilde yapılandırılarak müşterinin istediği forma getirilir [68].

Kireçleme ve kaveleta, kireç giderme, birinci ve ikinci sepileme işlemlerinin tümü tabakhane işlemleri olarak adlandırılır ve bu aşama deri teknolojisinde en önemli aşamalardan biridir. Tabakhane işlemleri diğer bir deyişle ham derilerin teknik süreçlerde mamul deriye dönüştürülmesidir. Genel anlamda ham derinin bozulmaz hale getirilmesi olan sepileme işleminde kullanılan kimyasallar; mineral, sentetik, bitkisel, aldehit ve yağlar olarak çeşitlendirilmektedir. Bitkisel kimyasallar bugün

kösele, ayakkabı yüzlük, astarlık, saraciyelik gibi sıkı ve biçimini kolay kaybetmeyen derilerin üretiminde kullanılırken, krom özlü kimyasallar başta giysilik deri üretimi olmak üzere hemen her tip mamul derinin üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [68-69].

Deri işleme esnasında açığa çıkan atığın miktarı ve türü çeşitli faktörlere ve kullanılan teknolojiye bağlıdır. Sufitler mevcut diğer teknolojilerden daha etkili ve ucuz oldukları için kıl gideriminde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Son yıllarda gerçek giderim prosesleri üzerine yapılan çalışmalar artan çevresel farkındalıklardan dolayı dikkat çekmektedir. Enzimatik kıl giderim teknolojileri organik atık salınımını azaltmaları sebebiyle ilgi çekmektedir. Enzimatik prosesler sufiler ve aminler gibi zararlı kimyasalların kullanımını azaltmaktadır [70].

2.4. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, mükemmel fonksiyonel özellikleri (aktivite, seçicilik, özgüllük) nedeniyle, en iyi deneysel ve çevresel koşullar altında en karmaşık kimyasal süreçleri katalize edebilirler [71]. Enzimler, çok hafif koşullar altında, diğer çok benzer moleküllerin varlığında yalnızca bir substratta bulunan benzersiz bir fonksiyonel grubun (birkaç benzer grup arasında) çok hızlı modifiye katyonlarını katalize edebilirler. Bu nedenle enzimler, kimya endüstrisinin çeşitli alanlarında mükemmel endüstriyel katalizörler olabilir. Bununla birlikte enzimler endüstriyel reaktörlerin içinde çalışmak için optimize edilmemiştir. Bu şekilde enzimler, mükemmel katalitik özelliklerine ek olarak, çözünür katalizör olmaları, genellikle çok kararsız olmaları, substratlar ve ürünler tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilebilmeleri, sadece doğal substratlarda ve fizyolojik koşullar altında iyi çalışmalarını gibi endüstriyel uygulamalar için pek uygun olmayan bazı özelliklere de sahiptir [72-73]. Bu nedenle enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler [73-75].

İmmobilize enzimlerin özellikleri, taşıyıcı malzemenin özelliklerinin yanı sıra enzim ile destek arasındaki etkileşimlerin doğası ve sayısı ile belirlenir. Enzim

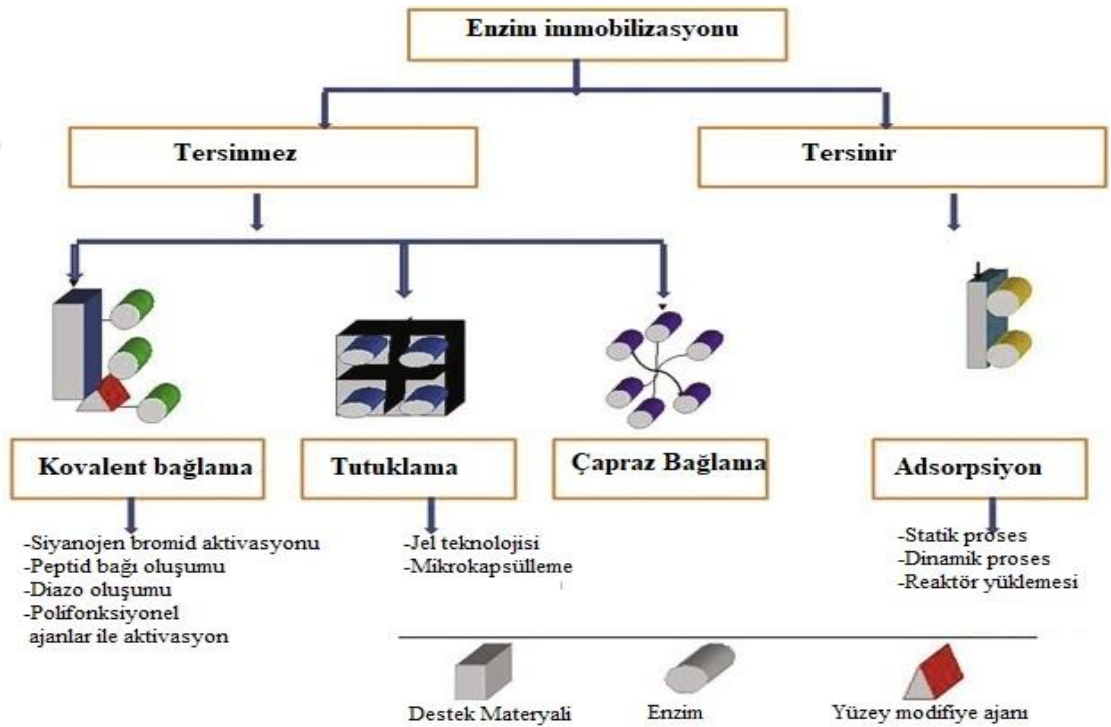
immobilizasyonunun bir sonucu olarak, enzimlerin stabilitesi ve kinetik özellikleri, çoğunlukla destekleyici matris tarafından uygulanan mikro çevre ve modifikasyonlar nedeniyle genellikle değiştirilir [76]. Özelliklerdeki bu modifikasyona ya immobilize enzimin içsel aktivitesindeki değişiklikler ya da immobilize enzim ile substrat arasındaki etkileşimin, dökme çözeltiden farklı bir mikro ortamda gerçekleşmesi neden olabilir. Bu nedenle, immobilize enzimlerin kullanımıyla ilgili temel sorunlardan biri, özellikle enzimler makromoleküler substratlar üzerinde etkili olduğunda katalitik aktivite kaybıdır. Substratın enzimin aktif bölgesine sınırlı erişimi nedeniyle, aktivite yalnızca substratın erişilebilir yüzey gruplarına indirgenebilir. Bu sterik kısıtlama, makromoleküler substrattan türetilen ürünlerin karakteristik modelini değiştirebilir [77]. Bu sterik problemlerden kaçınmak için izole makromoleküler zincir ağlarından oluşan desteklerin seçimi, immobilizasyonda yer alan enzim kalıntılarının dikkatli seçimi ve hidrofilik ve inert ara kolların kullanımı gibi birkaç strateji vardır [78].

İmmobilizasyon üzerine katalitik özelliklerde gözlenen değişiklikler, enzimin matrise bağlanmasıyla tetiklenen proteinin üç boyutlu konformasyonundaki değişikliklerden de kaynaklanabilir. Bu etkiler gösterilmiştir ve sınırlı sayıda enzim sistemi için daha az ölçüde kullanılmıştır. Çoğu zaman, bir enzim hareketsiz hale getirildiğinde, daha yüksek sıcaklıkta ve organik çözücülerin varlığında operasyonel stabilitesi oldukça iyileştirilir [79]. Bu nedenle stabilizasyon kavramı, enzimleri hareketsiz hale getirmek için önemli bir itici güç olmuştur. Çok noktalı kovalent bağlanma yoluyla hareketsiz hale getirilen proteinler gibi moleküler düzeyde gerçek stabilizasyon gösterilmiştir [80]. Birkaç yazar tarafından farklı yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalar, stabilizasyon ile matrise kovalent bağ sayısı arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir [81-83].

2.4.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

2.4.1.2. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri

Son yıllarda literatürde immobilizasyon için binlerce protokol rapor edilmiş ve çeşitli immobilizasyon stratejileri öngörülmüştür [26-30]. Enzimler, geri dönüşümlü fiziksel adsorpsiyon ve iyonik bağlantılardan kararlı kovalent bağlara kadar değişen etkileşimlerle desteğe bağlanabilir. Enzimleri hareketsiz hale getirmeye yönelik çeşitli yaklaşımları geri döndürülemez ve geri döndürülebilir olarak iki geniş kategoridedir.



Şekil 9. Enzimin Taşıyıcı Üzerine bağlanmasında Kullanılan Yöntemler [50].

2.4.1.3. Kovalent Bağlama Metodu

Enzimlerin kovalent bağ oluşumuna dayalı yöntemlerle immobilizasyonu en yaygın kullanılanlar arasındadır. Bu yöntemlerin bir avantajı, enzim ve matris arasında oluşan bağların kararlı yapısı nedeniyle, enzimin kullanım üzerine çözeltiye salınmamasıdır. Bununla birlikte, yüksek düzeyde bağlı aktivite elde etmek için, katalitik aktivite için gerekli olan amino asit kalıntıları, desteğe kovalent bağlantıya

dahil edilmemelidir ve bu, bazı durumlarda yerine getirilmesi zor bir gereklilik olabilir. Bazen aktivite verimini artırmak için bağlama reaksiyonunu substrat analoglarının varlığında gerçekleştirmek basit bir prosedürdür [84]. İmmobilizasyon için kovalent yöntemler, üründe enzimin bulunmaması için kesin bir gereklilik olduğunda kullanılır.

Matriste bulunan fonksiyonel gruplara bağlı olarak çok çeşitli reaksiyonlar geliştirilmiştir [84]. Genel olarak bağlama yöntemleri iki ana sınıfa ayrılabilir: (1) bir polimere reaktif bir fonksiyon eklenerek matrisin aktivasyonu; (2) aktive edilmiş bir grup üretmek için polimer omurgasının modifikasyonu. Aktivasyon süreçleri genellikle, destek üzerinde, birleştirme aşamasında proteinler üzerindeki güçlü nükleofillerle reaksiyona giren elektrofilik gruplar oluşturmak üzere tasarlanmıştır. Matrislere kovalent bağlanmanın seyirini kontrol eden temel ilkeler, proteinlerin kimyasal modifikasyonu için kullanılanlara benzer. En sık kullanılan reaksiyonlar, amino asitlerin aşağıdaki yan zincirlerini içerir: lizin (ϵ -amino grubu), sistein (tiyol grubu), aspartik ve glutamik asitler (karboksilik grup) [85].

İmmobilizasyon için piyasada satılan birçok destek materyali vardır. Her durumda en iyi seçim, katalizörün bazı ilgili özelliklerinin ve kullanım amacının dikkate alınmasını gerektirir. Bununla birlikte, genellikle birden fazla yaklaşımı denemek ve ardından bir yöntemi belirli koşullara uyarlamak gerekir [84]. Yaygın olarak kullanılan kovalent reaksiyonlar ile, örneğin amid, eter, tiyoeter veya karbamat bağları yoluyla desteğe kovalent bağlı enzimler elde edilir. Bu nedenle, enzim matrisine güçlü bir şekilde bağlanır ve çoğu durumda da stabilize edilir. Bununla birlikte, bağın kovalent doğası nedeniyle, enzimatik aktivite bozulduğunda matrisin enzimle birlikte atılması gerekir. Bu reaksiyonlardan kaynaklanan enzim ve matris arasında sızdırmaz bir bağlanma elde etmenin yararı, genellikle düşük hareketsiz aktivite verimi ve bu bağlanmanın geri dönüşü olmayan karakteri açısından maliyet ile kısmen dengelenebilir. Katı desteklere disulfid bağları ile kovalent olarak bağlanan enzimler, bu sorunu önlemenin bir yolunu temsil eder [84]

2.4.1.4. İyonik Bağlama Metodu

Enzimlerin geri dönüşümlü immobilizasyonu yaklaşımı, protein-ligand etkileşimlerini kromatografide kullanılan prensiplere dayandırmaktır. Örneğin, enzimlerin tersinir immobilizasyonunda kromatografik prensiplerin ilk uygulamalarından biri iyon değiştiricilerin kullanılmasıydı [83-85]. Yöntem basit ve geri dönüşümlüdür, ancak genel olarak enzimin hem güçlü bir şekilde bağlı hem de tamamen aktif kaldığı koşullardan farklıdır. Daha yakın zamanlarda, hareketsiz polimerik iyonik ligandların kullanımı, protein ve matris arasındaki etkileşimleri modüle etmeye ve böylece türevin özelliklerini optimize etmeye izin vermiştir. Zengin çeşitlilikteki enzimleri ve tüm hücreleri bağlamak için polietileneimin kullanımına ilişkin bir dizi patent alınmıştır [86]. Bununla birlikte, substratlar veya ürünler kendileri yüklendiğinde yüksek yüklü bir desteğin kullanılmasından kinetik, bölme veya difüzyon olayları nedeniyle bozulmalar gibi sorunlar ortaya çıkabilir. Bu nedenle, optimum pH'ı veya pH stabilite aralığı gibi enzim özellikleri değişebilir [87]. Bu bir sorun olsada, uygulamaya bağlı olarak belirli bir enzimin optimal koşullarının daha alkali veya asidik koşullara kaydırılması da faydalı olabilir [88].

2.4.1.5. Fiziksel Adsorpsiyon Metodu

En basit immobilizasyon yöntemi, esas olarak fiziksel adsorpsiyona veya iyonik bağlanmaya dayanan spesifik olmayan adsorpsiyondur [85-86]. Fiziksel adsorpsiyonda enzimler matrise hidrojen bağı, Van Der Waals kuvvetleri veya hidrofobik etkileşimler yoluyla bağlanırken, iyonik bağda enzimler tuz bağlantıları yoluyla bağlanır. Kovalent olmayan immobilizasyonda yer alan kuvvetlerin doğası, etkileşimin gücünü (çözücünün pH'ı, iyonik kuvveti, sıcaklığı veya polaritesi) etkileyen koşullar değiştirilerek tersine çevrilebilen bir işlemle sonuçlanır. Adsorpsiyon ile immobilizasyon hafif, gerçekleştirilmesi kolay bir işlemdir ve genellikle enzimin katalitik aktivitesini korur. Bu nedenle bu tür yöntemler ekonomik olarak caziptir, ancak etkileşimler nispeten zayıf olduğunda matristen enzim sızıntısı gibi sorunlar oluşabilir.

2.4.1.6. Çapraz Bağlama Metodu

Çapraz bağlama, enzimlerin birbirlerine ko-valent bağlar aracılığıyla çapraz bağlama yoluyla bağlanmalarını sağlayan kimyasal immobilizasyon yöntemlerinden biridir. Glutaraldehit gibi bir bağlayıcı reaktif olarak kullanılan ortak çözücülerdir. Bu enzimleri suda çözünmez hale getirirler ve üç boyutlu çapraz bağlı agregatlar oluştururlar [87]. Immobilize edilmiş enzimler genelde 1-100  m arasında boyutludur ve yüksek verimlilik, işletme kararlılığı ve katalizörün kolay geri dönüşümüne sahiptir. Tuzların, su ile çözünebilir organik çözücülerin veya noniyonik polimerlerin eklenmesi de sulu reaksiyon karışımındaki enzimlerin çökmesine neden olmuştur [88]. Kovalent olmayan bağlama yoluyla çapraz bağlı bu fiziksel agregatlar kalıcı şekilde suda çözünmez ve yapı ve katalitik aktivite korunmuş şekilde bulunur. Bu tür immobilize edilmiş enzimler üretim maliyeti, katalitik aktivite ve tekrar kullanılabilirlik açısından oldukça etkilidir [89]. Bu immobilizasyon tekniği, kofaktör bağımlı oksidoreduktazların [90] ve penisilin asilazın bağlanmasına uygulanmış ve aktivitelerindenmli bir iyileşme gözlenmiştir [91].

2.4.1.7. Tutuklama Metodu

Tutuklama, hücre veya enzimlerin immobilizasyonu için en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Bu yöntem, hücreleri veya enzimleri yüksek moleküler bileşiklerin 3-D matrisine immobilize eder. Entrapment'ın üç türü vardır: jel entrapment (kapsülleme), mikrokapsül entrapment (mikrokapsülleme) ve fiber entrapment (fiber kapsülleme) [87-88].

Jel tutuklama, hücrelerin veya enzimlerin, aljinat veya poliakrilamid gibi bir hidrojelin 3 boyutlu bir ağı içinde hareketsiz hale getirildiği en yaygın tuzak türüdür. Hücreler veya enzimler hidrojelncleri ile karıştırılır ve daha sonra hidrojel matrisini oluşturmak için çapraz bağlanır. Bu yöntem basit ve kullanımı kolaydır, ancak substratların ve ürünlerin hidrojel matrisi boyunca kt­le transferi sınırlandırılabilir, bu da hareketsiz hücrelerin veya enzimlerin performansını etkileyebilir [87-88]

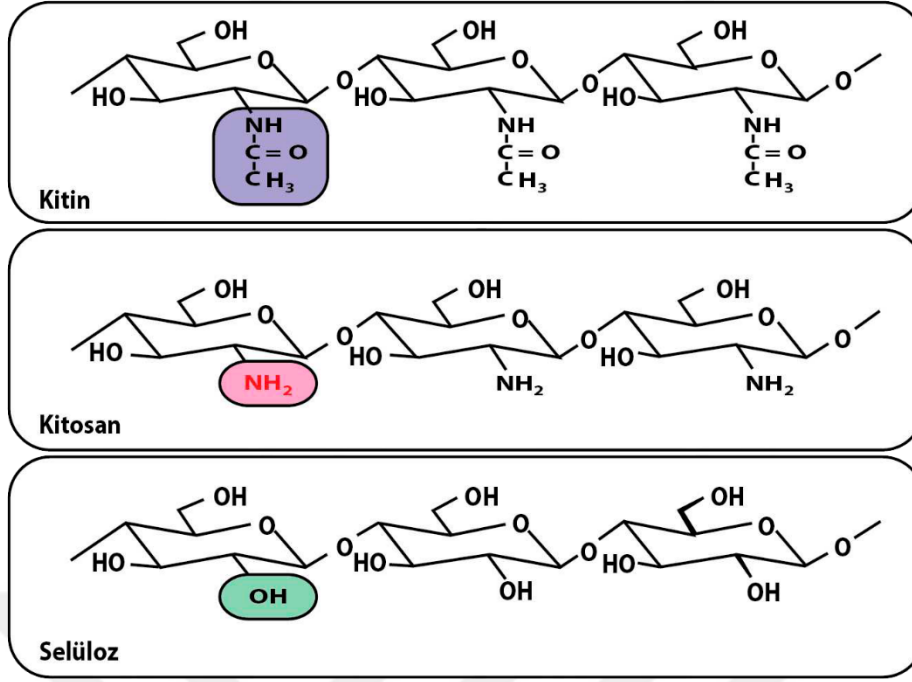
Mikrokapsül tutuklama, poliüretan veya polisakkarit membran gibi ince bir zar içindeki hücrelerin veya enzimlerin kaplanmasını içerir. Hücreler veya enzimler bir

2.5.1. Kitosan

Doğada mevcut ikinci en önemli biyopolimer olarak kitin gösterilebilir. Kitin pazarı hızla genişlemektedir ve 2027 yılına kadar 2,9 milyar dolara ulaşması beklenmektedir (Future Market Insights 2017). Kitin, teknik olarak karides ve yengeçler gibi kabuklu deniz hayvanlarının dış eskeletlerinden elde edilir. Kitin'in en önemli türevlerinden biri de deasetilasyon süreciyle elde edilen kitosandır. Kitosan, rasgele dağılmış deasetile birimlerden (β -(1-4) bağlantılı d-glukozamin) ve asetile birimlerden (N-asetil-d-glukozamin) oluşur. D-glukozamin birimlerinde bulunan amino grupları nedeniyle asidik bir ortamda çözünürlüğe sahiptir [51-52].

Kitosan özel fizikokimyasal özelliklere sahiptir. Geniş çaplı kullanımı, biyolojik çözünürlüğü, toksisitesi olmaması ve biyo-yapışkan özellikleri nedeniyle kitosan, kimyasal çapraz bağlanma, iyonik çapraz bağlanma ve iyonik kompleksleşme mekanizmaları ile tutuklanabilir. Kitosanın özel uygulamaları, ilaç teslimatı, doku mühendisliği, fonksiyonel gıdalar, gıda koruyucuları, biyokatalizör immobilizasyonu, atık su arıtma, moleküler kaplama ve metal azaltımı içerir. Bu nedenle, kitosan, çok yönlü ve ucuz bir biyomateryaldir [91-95]

Çok yönlü immobilizasyon biyomateryalleri olarak, kitosan çeşitli fonksiyonel grupları, örneğin poliamin, amino ve hidroksil içerir. Bu kimyasal gruplar, taşıyıcı desteklerin stabilize edilmesine yardımcı olur. Çoklu fonksiyonel gruplar, kitosan ve enzim arasında etkin biyokatalizör bağlanmasını sağlar. Örneğin, kitosanın amino grupları, protein ile kovalent bağlar oluşturmak için glutation aldehit çapraz bağlayıcısı ile bağlanmaya yardımcı olabilir. Kitin, çok sayıda enzimin immobilizasyonunda kullanılmıştır, örneğin asit fosfataz, kimotripsin, glukoz isomeraz, galaktozidaz, glukoz oksidaz ve laktaz [90-93]. Böylece, biyokatalizörlerin immobilizasyonu, kitin/kitosan destekleri kullanılarak gerçekleştirilir ve bu, biyoteknolojik uygulamaların çalışma alanını genişletir.



Şekil 10. Kitin, Kitosan, Selüloz Yapıları

2.5.2. Manyetik Partiküller

Son yıllarda manyetit kimyasal inertlik, biyouyumluluk, toksik olmama, iyi termal stabilite ve yüksek yüzey alanı dahil olmak üzere çeşitli değerli özellikleriyle ve bir karışımdan harici bir manyetik alanın uygulanması ile basit bir şekilde ayrılmasını kolaylaştıran ferromanyetik özellikleriyle ilgili birçok çalışma bildirilmiştir. [96-98]. Ek olarak, manyetik melezler oluşturmak için manyetit yüzeyine birçok farklı malzeme eklenebilir. İnorganik ve organik bileşiklerin kombinasyonu ile oluşan melezler, homojenlik, termal direnç ve mekanik, kimyasal ve elektrokinetik stabilite ile karakterize edilir. Özellikle, Fe_3O_4 'ün manyetik nanoparçacıkları, kitosan ve selüloz gibi biyopolimerlerle ve karbon nanoyapıları (grafen, çok ve tek duvarlı karbon nanotüpler) ve biyomoleküller gibi diğer bileşenlerle araştırılmıştır. Manyetik nanopartiküllerin hibritlere dahil edilmesi, bu malzemelere, örneğin boyaların, pigmentlerin veya zararlı iyonların adsorbanları gibi birçok endüstri ve bilim alanındaki pratik uygulamalarını büyük ölçüde geliştiren benzersiz özellikler verir. Bununla birlikte, son yıllarda, hibrit malzemeler için bir baz olarak kullanılan manyetit, esas olarak manyetik nanopartiküllerin, hareketsiz

biyomoleküllerin harici bir manyetik alan kullanılarak hızlı ve basit bir şekilde izole edilmesini kolaylaştırması nedeniyle, bir enzim taşıyıcısı olarak da yoğun bir şekilde incelenmiştir. Sonuç olarak, biyokatalitik sistemin yeniden kullanılabilirliği büyük ölçüde iyileştirilir ve daha yüksek saflıkta ürünler elde edilebilir [96-99].

2.5.3. Perlit

Perlit, silika içeriği %70'in üzerinde olan amorf alüminyum silikatıdır. Organiklerle karşılaştırıldığında, mekanik stabilitenin ve mikrobiyal saldırıya ve organik çözücülere karşı direncin daha yüksek olduğu gibi, perlit, silika jelleri, alumina ve zeolitler gibi diğer rapor edilen inorganik desteklerle karşılaştırıldığında daha ucuz bir alternatif olmaktadır [91]. Bu türden inert bir destek seçimi, protein bağlama için fonksiyonel gruplar sunan bir yüzeye sahip olması gerektiği anlamına gelir [92].

Perlite, doğal olarak meydana gelen volkanik camdır ve enzim immobilizasyonu için destek malzemesi olarak kullanılmıştır. Ağırlığı hafif ve yüzeyi pürüzlü olan bu malzeme yüksek yüzey alanına sahiptir ve bu özelliği enzim immobilizasyonu için uygun bir seçim yapılmasını sağlar. Bir çalışmada perlite, biyoteknoloji uygulamalarında kullanım potansiyeli olan lakkaz enzimini perlite parçacıklarının yüzeyine fiziksel adsorpsiyon yoluyla immobilize edilmiştir. Bu şekilde immobilize edilen lakkaz enziminin aktivitesi ve stabilitesi çoklu kullanım döngülerinde iyi seviyede korunmuştur. Diğer bir çalışmada ise perlite, gıda ve ilaç endüstrisinde potansiyel uygulamaları olan lipaz enzimini perlit parçacıklarının pürüzleri içinde hapsetme yoluyla immobilize edilmiştir. Bu şekilde immobilize edilen enzim iyi bir stabilite ve yeniden kullanılabilirlik göstermiştir ve perlit enzim immobilizasyonu için umut verici bir destek malzemesi olmuştur. [97].

2.5.4. Siklodekstrinler

Siklodekstrinler, α -1,4-glikozidik bağlarla birleştirilen glikoz birimlerinin siklik oligomerleridir. En yaygın siklodekstrinler, sırasıyla 6, 7 ve 8 tekrar eden birime sahip α , β ve γ siklodekstrinlerdir. Boşluklarının hidrofobikliği nedeniyle suda hidrofobik konuk molekülleri ile inklüzyon kompleksleri yapabilirler. Makrosiklik yapıya sahip siklodekstrinler, enzim aktivitesini iyileştirmek ve organik çözücülerdeki enzim katalizli reaksiyonlarda reaksiyon hızını arttırmak için başarıyla kullanılmıştır [23,24]. Kimyasal olarak modifiye edilmiş siklodekstrinlerin iç hidrofobik boşluğu ve dış hidrofilik kenarı, onları enzim substrat bağlanmasını modellemek için ideal kılar [25]. Torik boşluğun her iki tarafındaki hidroksil gruplarının yukarıdaki yönelimi nedeniyle, Siklodekstrin çevresi hidrofiliktir, bu da sulu çözeltilerde hidrasyonu ve çözünürlüğü destekler. Öte yandan, Siklodekstrin boşluğunun içi daha hidrofobik olabilir çünkü glikozidik oksijenin bağlanmayan elektron çiftleri, yüksek elektron yoğunluğu ve Lewis-baz özellikleriyle birlikte bulunur. Siklodekstrinlerin fizikokimyasal özellikleri ve dahil etme kapasitesi doğrudan OH gruplarının bu özel topolojisinden kaynaklanmaktadır.

2.6. Çapraz Bağlama ve Çapraz Bağlayıcı Seçimi

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcının fiziksel ve kimyasal özellikleri immobilize enzimin performansını (örneğin aktivitesini, seçiciliğini, kararlılığını) doğrudan etkilemektedir. Seçilen taşıyıcılar reaktif değilse yardımcı bir reaktif ile aktifleştirilmesi gerekir. Aktifleştirilmiş desteklere enzimlerin immobilizasyonunda düşük immobilizasyon etkinliği ve enzim kararlılığında artış veya azalış meydana gelebilmektedir [48].

Bağlanmada yer alabilecek fonksiyonel gruplar aşağıda listelenmiştir [99]:

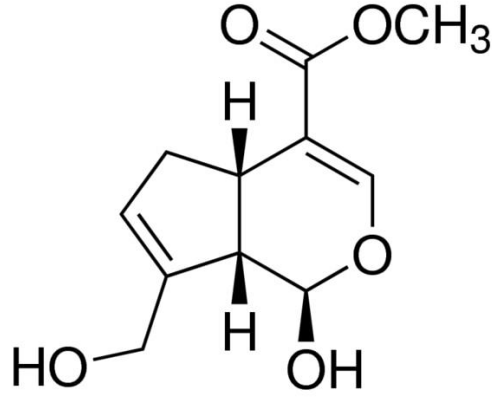
- Amino grubu
- Karboksil grubu
- Sülfidril grubu
- Hidroksil grubu
- İmidazol grubu

- Fenolik grup
- Tiyol grubu
- Treonin grubu
- İndol grubu

Ardından çapraz bağlayıcı bir ajan, enzimin fonksiyonel bir grubuyla aktivite edilmiş taşıyıcıyı bağlamak için kullanılır. Taşıyıcı üzerindeki fonksiyonel grubun tanıtılması gerekmektedir. Bunun için fonksiyonel monomerlerle kopolimerizasyon ya da polimer tipi reaksiyon kullanılır.

2.6.1. Genipin

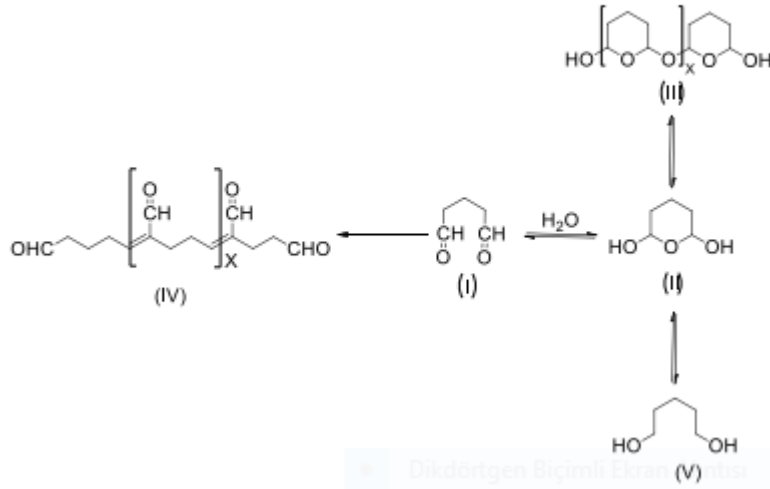
Genipin, geniposidin hidrolitik bir ürünü olan ve geleneksel olarak alışılmış Çin tıbbında tip 2 diyabet semptomlarını hafifletmek için kullanılan Gardenia jasminoides Ellis bitkisinin meyvelerinden ekstrakte edilen bir aglikon türevidir. Doğu Asya gıda endüstrilerinde renklendirici (mavi renk) olarak kullanılır [100-101]. Anti-inflamatuar ve anti-anjiyogenez özelliklerinin yanı sıra lipid peroksidasyonunu ve nitrik oksit üretimini engeller. Buna ek olarak hipokampal nöronları Alzheimer amiloid beta proteininin toksisitesinden korur. Genipin, kollajen, jelatin, proteinler ve kitosan çapraz bağlanması için kullanılan doğal olarak elde edilen harika bir çapraz bağlayıcıdır. Son zamanlarda, genipin (Şekil 11) biyoyumluluğu ve kararlı ve biyoyumlu çapraz bağlı ürünleri gerçekleştirme kabiliyeti nedeniyle, enzim immobilizasyonu için bir çapraz bağlama maddesi olarak kabul edilmiştir [102]. Genipin, lizin, hidroksilizin ve arginin ile birlikte serbest amino gruplarının çapraz bağlanmasını tetikler, ayrıca kolajen ile moleküler çapraz bağlar oluşturur. Genipin ile çapraz bağlanan biyomoleküllerin, glutaraldehit veya diğer epoksi bileşikleriyle çapraz bağlanan moleküllere göre gelişmiş biyoyumluluk sağladığı bildirilmiştir [103].



Şekil 11. Genipinin Kimyasal Yapısı

2.6.2. Glutaraldehit

Glutaraldehit, polimerleşme yeteneğine sahip iki-fonksiyonel bir reaktandır. Glutaraldehit, özellikle proteinlerin birincil amino gruplarıyla reaksiyona girer, ancak diğer gruplarla da (tiyoller, fenoller ve imidazoller) reaksiyona girebilir. Bununla birlikte, proteinlerin kesisi veya enzimlerin immobilizasyonu ile ilgili ana yapıların tam olarak açıklanmış olmadığı da bir gerçektir. Şekil 12, bu önerilen yapıların bazılarını göstermektedir. Glutaraldehitin, enzimleri ve destekleri değiştirmeyi amaçlayan yapısının doğrudan bir lineer yapı olmadığı, ancak bir tür dengeli döngüler şeklinde olduğu açıktır. Glutaraldehit ilk olarak bazı durumlarda formaldehit ile birlikte doku koruma amacıyla kullanılmıştır. Bu, moleküller arası çapraz bağlama oluşturularak gerçekleştirilir. Günümüzde, glutaraldehit hala en güçlü çapraz bağlama reaktantlarından biridir ve klinik uygulamalarda da kullanılır. Bu reaktifin çok iyi çapraz bağlama özelliklerinin bir nedeni, glutaraldehitin kendisiyle veya zaten bir glutaraldehit molekülü ile modifiye edilmiş protein gruplarıyla reaksiyona girmesiyle ilgilidir. Proteinlerin çapraz bağlanmaları, farklı protein moleküllerinde bulunan gruplar arasında moleküller arası) ya da aynı molekülde bulunan gruplar arasında (molekül içi) olabilir [105-106].



Şekil 12. Glutaraldehitin rezonans yapısı

2.7. Literatür Özeti

Demirci ve arkadaşları (2021) bildirilen bir çalışmada halotolerant alkalifilik bakteri olan *Bacillus agaradhaerens* suşu AKR'den serin alkali proteaz saflaştırılmıştır ve çift mezopor çekirdek kabuklu silika (DMCSS) nano kürelerine immobilize edilmiştir. AKR proteazının aktive edilmiş DMCSS-NH₂ nano kürelerine kovalent immobilizasyonu, fiziksel adsorpsiyondan daha etkili olmuştur ve ileri çalışmalarda uygulanmıştır. Serbest AKR proteazına göre, immobilize enzim optimum sıcaklık ve pH'ta sırasıyla 60 ila 65 ° C ve pH 10,0 ila 10,5 arasında kaymalar sergiledi. Çözünür enzim, 50 ve 60 ° C'de 1 saat işleminden sonra aktivitesinin % 47,2'sini ve % 9,1'ini korurken, immobilize proteaz sırasıyla % 87.7 ve % 48.3'ünü korumuştur.

Kumar ve arkadaşları (2018) tarafından rapor edilen bir çalışmada Tunus patateslerinden izole edilen ve güçlü bir proteaz aktivitesi (protect 2) sergileyen proteaz üreten bir suş CT2, 16S ribozomal DNA sekans analizine göre *Bacillus* halotolerans olarak tanımlanmıştır. Fasulye tohumu proteinleri ile desteklenmiş ortamda maksimum prot CT2 üretimi elde edilmiştir. Proteolitik aktivite, amonyum sülfat çökeltmesi, Sefakril S200 jel filtrasyonu ve SP-sefaroze katyon değişim

kromatografisi ile saflaştırıldı. Optimal enzim aktivitesine pH 9 ve 50 ° C sıcaklıkta ulaşılmıştır. Proteolitik aktivite, Ca^{2+} ve Mn^{2+} iyonları ile artırılmış ve PMSF tarafından tamamen inhibe edilmiştir. Ayrıca ticari deterjanların varlığında yüksek stabilite sergilemiştir.

Lakshmi ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan bir çalışmada Karnataka'daki Murudeshwar'ın deniz suyu örneklerinden izole edilen bakteriler, yağsız süt agar ortamına kültürlenerek alkali proteaz üretimi açısından taranmıştır. İzole edilen bakterilerden *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Alcaligenes faecalis* enzim üretimi nedeniyle farklı hidroliz bölgeleri göstermiştir. Alkali proteazın kısmi saflaştırılması izoelektrik çöktürme ile gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesi değişen pH koşulları, inkübasyon sıcaklığı, farklı substratlar, karbon ve azot kaynakları ve tuz konsantrasyonları koşullar altında sigma'nın evrensel proteaz aktivite ölçümü kullanılarak belirlenmiştir. Enzim immobilizasyonu %2 Sodyum aljinat ve 0.1 M soğuk CaCl_2 kullanılarak gerçekleştirilmiş ve değişen pH, sıcaklık koşulları ve deterjan uyumluluğu altındaki aktivitesi analiz edilmiştir. Enzimin leke çıkarmadaki etkinliği test edilmiştir.

Bashir ve arkadaşları (2020) tarafından bildirilen bir çalışmada *Streptomyces sp* suşu üreten alkali bir proteaz. GS-1, Munanbam ve Valapad, Kerala, Hindistan'ın durgun sularından izole edilmiştir. Büyüme özellikleri ve proteaz üretimi, dört farklı substratla desteklenmiş 10 farklı bazal ortamda (BM) araştırılmıştır. Ekstrakte edilen proteazın aktivitesi 341 U / ml olarak bulunmuştur. Serbest enzim, 45 ° C'de ve pH 8.5'te maksimum aktivite sergilemiştir. Enzimin K_m ve V_{max} değerleri substrat olarak %1 kazein kullanılarak sırasıyla %5.29 ve 32.25 $\mu\text{mol l}^{-1} \text{dk}^{-1} \text{mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Enzim, aktivitesini yüksek sıcaklıkta (8 saat boyunca 50 ° C), alkali pH'ta (8-10) ve metal iyonları ve organik çözücülerin varlığında sürdürmüştür. Enzim kıl giderme özelliği gösterdi ve keçi postunda test edildiği gibi kıl köklerini başarıyla çıkarmıştır.

Sánchez-Ramírez ve arkadaşları (2016) nın bildirdiğine göre Tunus'taki Chott Eldjerid Hipersalin Gölü'nden izole edilen orta derecede halofilik bir suş (CJ4), agar plakasında en yüksek aktiviteyi göstermiştir. İzolatın biyokimyasal ve fizyolojik karakterizasyonu, 16S rRNA dizi analizi ile birlikte onu *Halobacillus* cinsine

yerleştirmiştir. Proteaz üretimi 120 g / L NaCl'de (2 M) en yüksek bulunmuştur ve üstel fazdan başlayarak bakteri üremesinin erken gerileme fazında maksimum seviyeye ulaşmıştır. Proteaz aktivitesi 0.4 M NaCl, pH 9 ve 45 ° C'de optimum olarak belirlenmiştir. Geniş sıcaklık aralıklarında (30-60 ° C), NaCl konsantrasyonlarında (0-5 M) ve pH değerlerinde (5-10) mükemmel bir stabilite göstermiştir. Proteaz aktivitesi, çeşitli organik çözücüler ve deterjan katkı maddelerinin varlığında yüksek stabilite sergilemiştir.

Kumar ve arkadaşları (1999) tarafından yapılan çalışmada liyofilize edilmiş Subtilisin Carlsberg'in aktivite ve enantiyo seçiciliği üzerine metil-β-siklodekstrin ilavesini etkisi incelenmiştir. Bu amaçla model bir transesterifikasyon reaksiyonu seçilmiştir. Sonuç olarak liyofilizasyon esnasında ilave edilen metil-β-siklodekstrin Subtilisin Carlsberg'in THF ortamındaki bu transesterifikasyon reaksiyonun üzerine aktivitesi 4 kat artırdığı belirlenmiştir.

Patel ve arkadaşları (2005) tarafından gerçekteştiren bir çalışmada liyofilize edilmiş Subtilisin Carlsberg ile hekzan ortamında gerçekteştirilen N-asetil-fenilalanin etil ester ve propanol arasındaki transesterifikasyon reaksiyonunda liyofilizasyon esnasında ilave edilen silikanın enzimin aktivitesini 130 kat artırdığı bildirilmiştir.

Tasso ve arkadaşları (2009) maleik anhidrit kopolimeri üzerine Subtilisin A'nın kovalent olarak immobilize edildiğini bildirmişlerdir. İmmobilize enzimin sulu ortamdaki aktivitesini sentetik peptid hidrolizi ile belirlemişlerdir.

Zhang ve arkadaşları (2015) tarafından bildirilen bir çalışmada lipaz ve proteaz ile oluşturulan multi-çapraz bağlı enzim agregatı elde edilmiş ve birbirinden bağımsız reaksiyonların tek bir uygulamada beraber gerçekteştirildiği gösterilmiştir. Bu multi-enzim agregatı %43 proteaz ve %89 lipaz aktivitesi göstermiştir. Multi enzim agregatı oluşturulmasında glutaraldehit, amonyum sülfat ve bovine serum albümin kullanılmıştır.

Özbek ve arkadaşları (2001) organik çözücü ortamındaki Subtilisin Carlsberg aktivitesi üzerine su varlığının etkisini gösteren bir çalışma rapor etmişlerdir. Buna göre su aktivitesinin enzimin toluen ortamındaki transesterifikasyon aktivitesi üzerine anlamlı bir etkisi olmadığını bildirilmiştir.

Mukherjee ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan bir çalışmada Subtilisin Carlsberg'in sulu tampon ortamında substrat analogu ile çözüldüğü ve substrat alkolü

ile çöktürüldüğü ve böylece damgalı enzim elde edildiği bildirilmiştir. Ayrıca çöktürerek damgalamanın dondurarak kurutmaya göre daha iyi bir teknik olduğu belirtilmiştir. Damgalı enzimin damgalı olmayan enzime göre aktivitesinin 60 kat arttığı belirlenmiştir.

Yust ve arkadaşları (2010) Subtilisin Carlsberg ile gerçekleştirilen bir transesterifikasyon reaksiyonunda enzimin enantiyo seçiciliği üzerine bir çalışma yapmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre daha kısa zincirli alkoller ile daha düşük enantiyo seçicilik görülürken daha geniş ve kalabalık alkoller ile daha yüksek bir enantiyo seçicilik olduğu ortaya konmuştur.

Martinez ve arkadaşları (2013) tarafından rapor edilen bir çalışmada Serine proteaz subtilisinin deterjan ve EDTA varlığındaki aktivitesi araştırılmıştır. Sonuçlar subtilisinin non iyonik sürfaktan ve EDTA varlığında proteolitik aktivitesini %80 oranında koruduğunu göstermiştir.

Briki ve arkadaşlarının (2016)'nın yaptığı bir çalışmada *Bacillus* türünden elde edilen bir serine proteaz kimyasal işlemlerle yapılan deri tabaklamasında kullanılmıştır. Serine proteaz kullanımının deri yüzeyinin fizikokimyasal özelliklerini iyileştirdiği ortaya konulurken daha az kimyasal atık ve kirlilik oluşturduğu bildirilmiştir.

Ferreira ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan bir çalışma Subtilisin Carlsberg'in farklı por büyüklüğüne sahip silika üzerine kovalen immobilizasyonunda daha büyük por çapına sahip silika üzerine immobilize edilen enzimin kazein üzerine proteolitik aktivitesinin daha fazla olduğunu göstermiştir.

Roy ve arkadaşları (2004) tarafından bildirilen çalışmaya göre Subtilisin Carlsberg'in liyofilizasyonu esnasında kullanılan farklı aktivasyon ajanlarının enzimin aktivitesini anlamlı düzeyde değiştiği belirlenmiştir. Aktivatör olarak kullanılan trehaloz ile birlikte PEG kullanımı aktivite artışını daha da ileri düzeye taşıdığı belirtilmiştir.

Jiangling ve arkadaşları (2001) tarafından yapılan bir çalışmada subtilisin PVA-kriyojel boncukları üzerine immobilize edilerek organik çözücü ortamında peptit sentezi gerçekleştirilmiştir.

Shah ve arkadaşları (2008) tarafından rapor edilen bir çalışmada Subtilisin amonyum sülfat ve PEG kullanılarak çöktürülerek triton X-100 ve tween-20 ile agregatlaştırılmıştır. Enzim agregatı glutaraldehit kullanılarak çapraz bağlama ile suda çözünmez forma getirilmiştir. Elde edilen çözünmez formdaki enzim agregatı organik çözücü ortamında çeşitli hidroliz reaksiyonlarında kullanılmıştır

Thakrar ve arkadaşları (2019) tarafından bildirilen bir raporda bir haloalkalifilik aktinobakteriden yüksek derecede termostabil bir proteaz, 24 taşıyıcı üzerinde 5 farklı yaklaşım kullanılarak immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon ile aktivasyon enerjisi ve deaktivasyon hızı sabitinin azaldığı, bu da immobilize proteazı uygulamalar için uygun hale getirdiği bildirilmiştir. Benzer şekilde, pH ve sıcaklık stabilitesi artarken, V_{max} ve K_m değiştiği bulunmuştur. İmmobilize enzimin, çeşitli metal iyonlarında ve deterjanlarda daha fazla stabiliteye sahip olduğu da bildirilmiştir.

Zhou ve arkadaşları (2021) tarafından polivinil alkol / sodyum aljinat @ Fe_3O_4 (PVA/SA@ Fe_3O_4) manyetik immobilize enzim hidrojel boncukları hazırlandığı rapor edilmiştir. Yapıları ve morfolojileri taramalı elektron mikroskobu, yüzey alanı ve gözeneklilik analizleri, Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi, X-ışını fotoelektron spektroskopisi ve titreşimli numune manyetometresi ile karakterize edilmiştir. PVA/SA@ Fe_3O_4 ün nötr proteazı adsorbe etme kabiliyeti, bileşim, sıcaklık, pH, karıştırma hızı, enzim konsantrasyonu ve çapraz bağlama konsantrasyonundaki değişikliklerle araştırılmıştır. İmmobilize enzimin termal stabilitesi, asit-baz stabilitesi ve yeniden kullanılabilirliği önemli ölçüde iyileştirildiği bildirilmiştir. 7 döngüden sonra, immobilize enzim aktivitesi, başlangıç enzim aktivitesinin %30,8'inde kalmıştır.

3. MATERİYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar

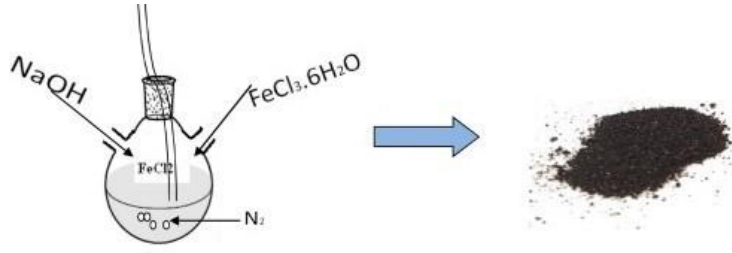
Kitosan (Orta Molekül Ağırlıklı) Sigma-Aldrich'ten satın alındı. *Bacillus licheniformis*'ten (7-15 U/mg katı) üretilen Subtilisin Carlsberg enzimi ve teknik dereceli kazein Sigma-Aldrich'ten temin edildi. Çözücüler ticari olarak mevcut en yüksek saflıkta kullanıldı. Kıl giderimi çalışmalarında kullanılan deriler Manisa Dericiler Sanayiinde faaliyet gösteren Ardako Deri'den temin edildi. Genipin %98 saflıkta Auova'dan alınmıştır. Kimyasal kıl gideriminde kullanılan CaO Acros'tan, Na₂S ise VWR Chemicals'tan alındı. Folin Ciocalteu reaktifi Merck'ten ve β-siklodekstrin ise TCI' den satın alınmıştır. Demir (II) klorür ve demir (III) klorür Carlo Erba dan temin edildi. Diğer tüm kimyasallar kullanım amaçlarına uygun analitik saflıkta temin edilmiştir. Tüm sulu çözeltiler, Milipore Milli-Q Plus su arıtma cihazıyla saflaştırılan saf su ile hazırlandı.

Elde edilen verilerin işlenmesi ve ilgili grafiklerin oluşturulmasında Origin Pro 22 ve Sigma Plot 12 programları kullanılmıştır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Manyetit (Fe₃O₄) Hazırlanması

Manyetit sentezi için, 1,7 gr FeCl₃.6H₂O, 0,63 gr FeCl₂.4H₂O 250 mL 1,5 M amonyak (NH₃) çözeltisine eklendi. Karışım, bir su banyosu içinde 95 °C'de 2 saat karıştırıldı. Karışım filtre kağıdından süzüldükten sonra etanol ve saf su ile pH nötral oluncaya kadar birkaç kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra sonra, numune 70° C'de 15 saat boyunca kurutuldu. Kurutulmuş koyu kahverengi manyetit partikülleri havanda ince bir toz haline getirildi ve endorff içinde muhafaza edildi.



Şekil 13. Manyetit (Fe_3O_4) partiküllerin hazırlanması

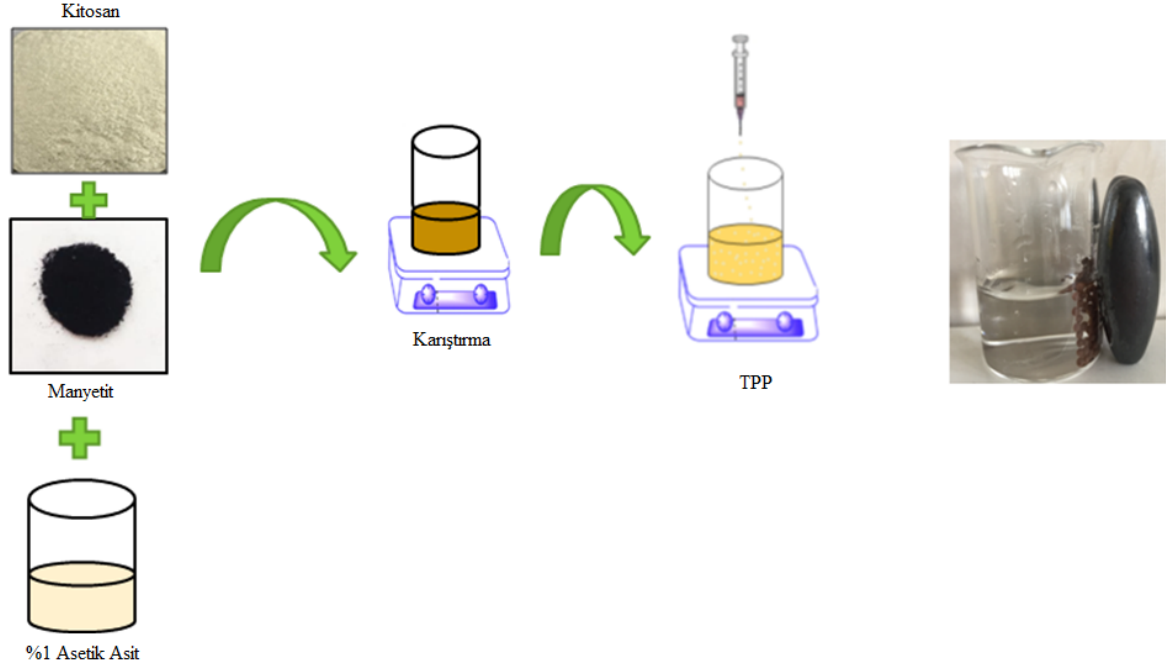
3.2.2. Kitosan Boncuk Hazırlanması

%2 (w/v)'lik kitosan çözeltisi hazırlamak için 2 mL asetik asit deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı 2 gr kitosan tartılarak hazırlanan %2 (v/v)'lik asetik asit çözeltisine eklenmiş ve iyice çözünene kadar karıştırıldı. Yoğun bir jel kıvamı alan kitosan çözeltisinin bir kısmı enjektör yardımıyla hazırlanan soğuk tripolifosfat (TPP) çözeltisi (pH 8,2) içerisine damlatılarak boncuklar oluşturuldu. Boncuklar 4 saat boyunca karıştıktan sonra TPP'den ayrılarak saf su ile yıkandı. Üzerinde bir miktar saf su konularak daha sonra kullanılmak üzere buzdolabında 4°C'de muhafaza edildi. Kalan kitosan çözeltisi daha sonra manyetik kitosan boncukları oluşturmak için kullanılmak üzere buzdolabında 4°C'de muhafaza edildi.

3.2.3. Manyetik Kitosan (MK) Kompozit Boncukların Hazırlanması

MK boncuklarının oluşturulması için %2 (w/v)'lik kitosan çözeltisi ve sentezlenen manyetit belirli ölçüde karıştırıldı. Manyetik kitosan boncukların sentezi için hazırlanan 100 mL %2 (w/v)'lik kitosan çözeltisi içerisine kurutulmuş olan manyetitten 0,5 gr eklendi. Karışım ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca karışmaya bırakıldı. Manyetit kitosan içerisinde homojen bir dağılım gösterdikten sonra manyetik karıştırıcı üzerindeki hazırlanmış TPP çözeltisi (pH 8,2) içerisine şırınga yardımıyla damlatılarak manyetik kitosan boncukları oluşturuldu. Boncuklar TPP çözeltisi içerisinde 4 saat boyunca karıştıktan sonra TPP'den ayrılarak saf su ile yıkandı.

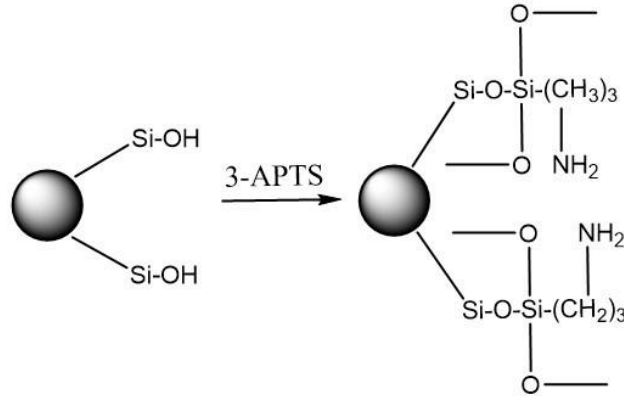
Üzerinde bir miktar saf su konularak daha sonra kullanılmak üzere buzdolabında 4°C’de saklandı (Şekil 14).



Şekil 14. MK kompozit boncuk hazırlanması

3.2.4. Perlit Aktivasyonu

Elenmiş ve kuru perlit bir gece metanol de bekletilerek organik kirleticiler uzaklaştırıldı. Ardından 5 N NaOH eklenerek su banyosunda bekletilerek organik olmayan kirleticiler uzaklaştırıldı. Sonrasında süzme ve yıkama yapıldı. Perlit partikülleri pH 4,0 50 mM asetat tamponunda hazırlanmış %10 (w/v) luk 3-amino propil trietoksi silan (3-APTS) ile 4 saat inkübe edildi. Sonrasında süzme ve yıkama yapıldı (Şekil 15).

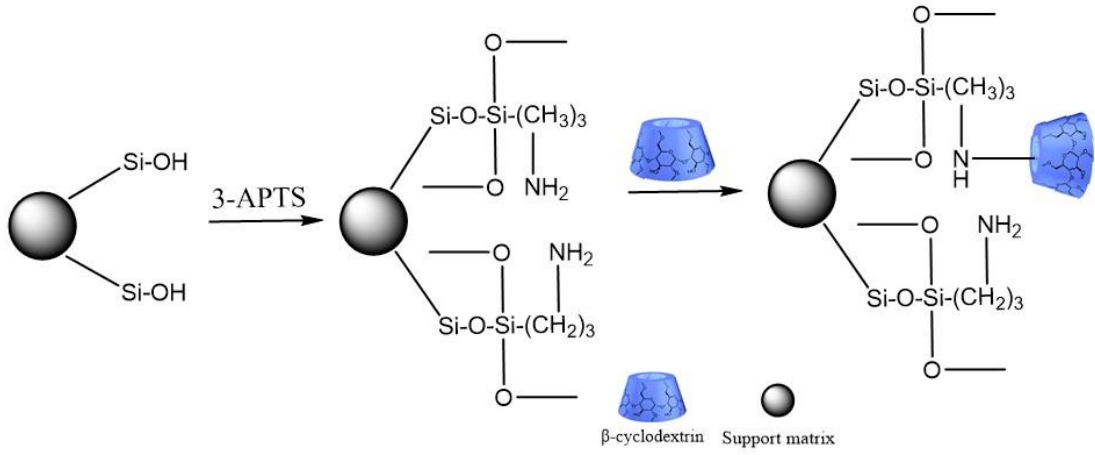


Şekil 15. Perlitin 3-APTS ile silanlanması

3.2.5. β -siklodekstrin ile Perlit Modifikasyonu (Perlit-CD)

β -siklodekstrin (β -CD) etüvde 6 saat kurutuldu. 4g β -CD üzerine 25 mL 0,4 M NaOH çözeltisi eklendi. 4 mL asetonitrilde çözünmüş 1 g p-toluen sülfonil klorit eklendi. 0 °C de 5 saat karıştırıldı, süzüldü ve HCl ile pH 2,0 ye getirildi. 12 saat +4°C de bekletildi ve oluşan çökelek süzülerek kurutuldu.

2 g aktif perlit asetonitril ile süspanse edildi. Ardından üzerine 0,2 g 6-o-tolüen sülfonil klorit- β -CD ilave edilerek 60 °C de 1 gün bekletildi. Sonrasında katı faz süzülerek asetonitril ile yıkandı ve kurutuldu.



Şekil 16. Perlitin β-siklodekstrin ile modifikasyonu

3.2.6. MK ve Perlit-CD in Glutaraldehit (GA) ile Aktivasyonu

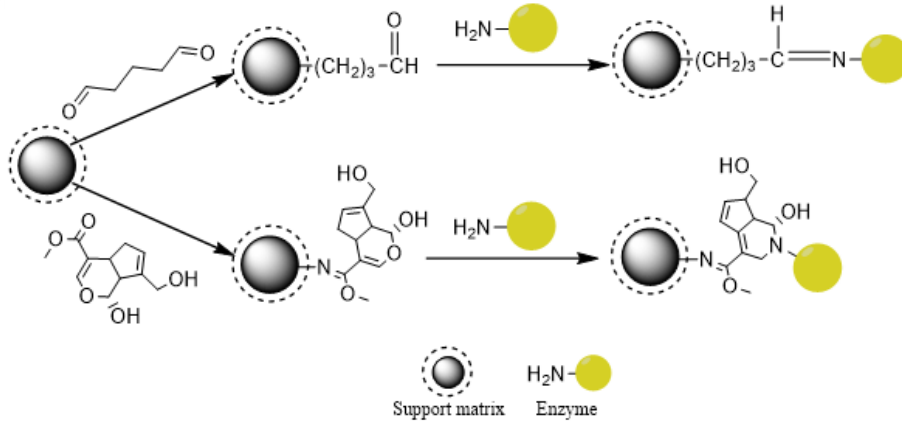
Hazırlanmış olan taşıyıcılardan 1 g alınarak %4 (v/v)'lük 50 mL glutaraldehit ile 4 saat boyunca 40°C 'de muamele edilerek çapraz bağlama gerçekleştirildi. Çapraz bağlama sonrası taşıyıcı materyaller distile su ile defalarca yıkanarak glutaraldehitten iyice arındırıldı. GA ile aktifleştirilmiş taşıyıcıların bir kısmı immobilizasyon işlemi için kullanılmak üzere ayrılırken kalan kısım bir miktar distile su ilave edilerek daha sonra kullanılmak üzere buzdolabında (4°C) muhafaza edildi.

3.2.7. MK ve Perlit-CD in Genipin (GE) ile Aktivasyonu

Bir g taşıyıcı, % 0,6 lık genipin ile 15 saat boyunca 150 rpm'de inkübe edildi. Sonrasında genipinin fazlalığını gidermek için 0,05 M asetat tamponu (pH 5,0), 1 M NaCl ve saf su ile yıkandı ve deiyonize su içinde 4 °C' de depolandı.

3.2.8. Aktive Edilmiş MK ve Perlit-CD Üzerine Subtilisin Carlsberg İmmobilizasyonu

1 mg/mL Subtilisin Carlsberg çözeltisi 0,05 M pH 8,0 Tris-HCl tamponu kullanılarak hazırlandı. Aktive edilmiş taşıyıcılardan 0,5 g tartılarak üzerine 2 mL enzim çözeltisi konuldu. 4 saat boyunca oda sıcaklığında ortamda inkübasyona bırakıldı. İmmobilizasyon işlemi sonrası çözelti ve immobilize enzim birbirinden ayrıldı ve 0,05 M pH 8,0 Tris-HCl tamponu ile yıkanarak serbest enzim çözeltisinden arındırıldı. Kalan filtratın ve immobilize enzimin aktivite ölçümleri yapıldı (Şekil 18).



Şekil 17. Taşıyıcıların GA ve GE ile aktifleştirilmesi ve Subtilisin Carlsberg immobilizasyonu

3.2.9. MK ve Perlit-CD in Karakterizasyonu

Termogravimetrik analiz yöntemiyle, kontrol edilen bir atmosferde, sıcaklığın programlı olarak artırılması ya da azaltılmasıyla maddenin kütlesinde meydana gelen değişiklik sıcaklığın ya da zamanın fonksiyonu olarak incelenmektedir. Örneğin, sıcaklığa karşı maddenin kütlesinde meydana gelen azalmayı gösteren termogramlardan, maddenin yapısal özellikleri ve içerdiği su miktarı konusunda bilgi edinilebilmektedir. Kompozit boncukların termal analizleri, N_2 atmosferinde, 10°C

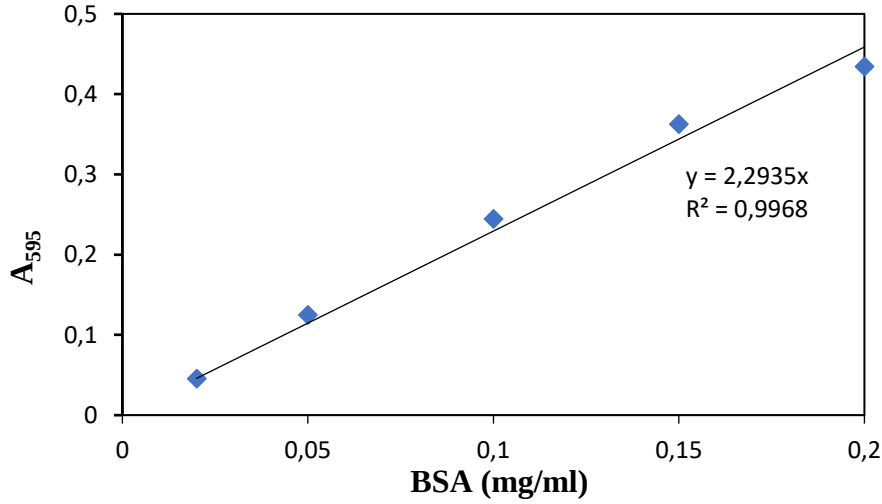
dk⁻¹ ısıtma hızında, oda sıcaklığından 800 °C sıcaklığa kadar Perkin Elmer SII 7300 termogravimetrik analizör ile gerçekleştirildi.

Taramalı elektron mikroskopta, katı numune yüzeyi yüksek enerjili bir elektron demetiyle taranır. Bu teknikte yüzeyden çeşitli tür sinyaller oluşturulur. Bunlar geri saçılmış elektronlar, ikincil elektronlar, Auger elektronları, X-ışını flüoresans fotonları ve değişik enerjili diğer fotonlardır. Bütün bu sinyaller yüzey çalışmalarında kullanılmış olmakla beraber, bunların içinde en yaygın olan iki tanesi taramalı elektron mikroskopunun temelini oluşturan geri saçılmış ve ikincil elektronlar ve elektron mikroprob analizde kullanılan X-ışını emisyonudur. Bir veya daha çok sayıda mercekten oluşan kondensör mercekle sistemi, elektron demetinin objektif merceklerle ulaştırılmak üzere yönlendirilmesini sağlar, objektif mercekler ise numune yüzeyine çarpan elektron demetinin boyutlarından sorumludur. Ayrıca, elektrikçe iyi iletken numuneler genellikle ısıyı iyi ilettilerinden ısısal bozunma olasılığı da en azdır. Ancak, ne yazık ki çoğu biyolojik ve mineralojik numuneler iletken değildir. İletken olmayan numunelerin SEM görüntülerini elde etmek için çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Fakat en çok uygulanan tekniklerde numune yüzeyine tozlaşma veya vakum da buharlaştırma uygulanarak ince bir metalik film tabakasıyla kaplanır. Kaplama işlemlerinde dikkat edilecek nokta, aşırı kalın kaplamanın yüzey ayrıntılarını örtmesidir. Bu nedenle optimum bir kalınlığın seçilmesi gerekir. Taramalı elektron mikroskoplarda elektron için en yaygın transduser tipi X ışınları sintilasyon transduserlerine (dönüştürücülerinde) benzer fonksiyona sahip simülasyon düzenekleridir. Bunlarda katkılanmış bir cam veya plastik hedef üzerine bir elektron çarptığında görünür bölgede aşırı miktarda foton yayınlanır. Fotonlar, cihazın yüksek vakum bölgesi dışında yer alan bir foto çoğaltıcı tüpe bir ışık borusu vasıtasıyla iletilir. Sintilasyon dönüştürücülerinde ortalama 10⁵ ile 10⁶ katlık bir çoğaltma sağlanır.

Taşıyıcıların SEM görüntülerinin alınabilmesi için içerisinde su kalmayacak şekilde iyice kurutuldu. Taşıyıcı yüzey morfolojisi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) (XL30-SFEG, FEI / Philips) kullanılarak incelendi.

3.2.10. Taşıyıcı Üzerine Bağlanan Protein Miktarının Belirlenmesi

Serbest enzim, filtrat ve yıkama sularındaki protein miktarı, Bradford (1976) tarafından geliştirilen yöntemle göre, sığır serum albumin (BSA) kullanılarak 595 nm’de spektrofotometrik olarak tayin edildi. Deney tüplerine sırasıyla 0,02-0,05-0,1-0,125-0,15-0,2 mg mL⁻¹ olan BSA standart çözeltilerinden 0,1 mL eklendi ve her birinin üzerine 2 mL Bradford reaktifi eklenerek 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında 595 nm’deki absorbansları ölçülerek elde edilen değerler ile BSA derişimine karşı oluşturulan standart protein eğrisi protein tayininde kullanıldı (Şekil 18).

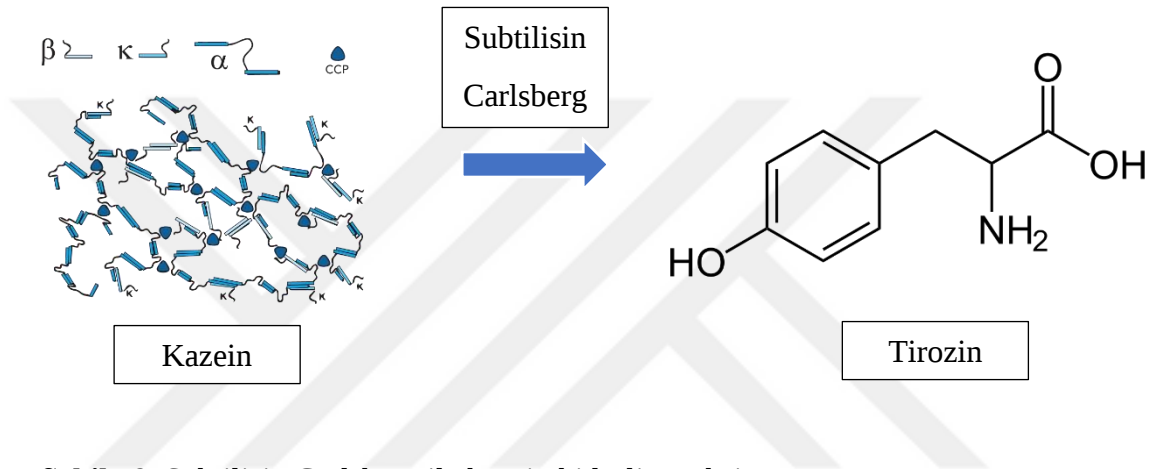


Şekil 18. Protein standart eğrisi

Subtilisin Carlsberg enziminin yükleme etkinliğini hesaplamak için başlangıçtaki enzim çözeltisi, immobilizasyon sonrası kalan süpernatant ve immobilizasyonda kullanılan taşıyıcıların yıkama sıvılarında Bradford yöntemiyle protein tayini yapıldı.

3.2.11. Tirozin Standart Eğrisinin Oluşturulması, Serbest ve İmmobilize Subtilisin Carlsberg in Hidroliz Aktivitesinin Hesaplanması

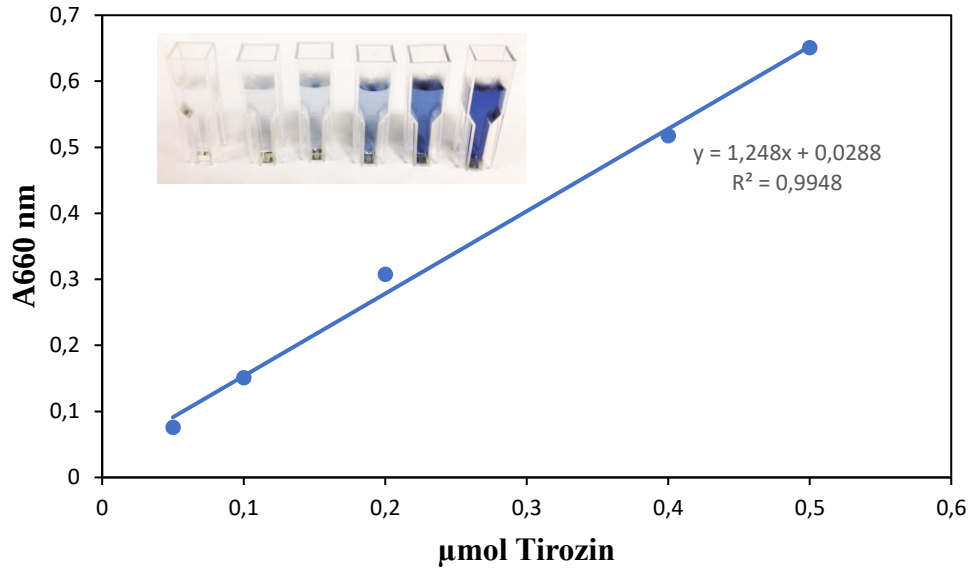
Subtilisin Carlsberg aktivitesi kazeinin enzimatik hidrolizi sonucunda açığa çıkan tirozin miktarının spektrofotometrik olarak belirlenmesi ile hesaplandı. Bu amaçla 660 nm de alınan absorbans değerleri ile tirozin konsantrasyonları (0,05-01-0,2-0,4-0,5 μ mol) arasında standart grafiği çizildi (Şekil 19-20, Tablo 1).



Şekil 19. Subtilisin Carlsberg ile kazein hidroliz reaksiyonu

Tablo 1. Tirozin standart eğrisi için deneysel işlemler

	Standart 1	Standart 2	Standart 3	Standart 4	Standart 5
Standart Çözelti	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
Na ₂ CO ₃ (500 mM)	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
Folin Reaktifi (%25)	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
10 dk inkübasyon (37 °C) ve 660 nm de absorbans ölçümü					



Şekil 20. Tirozin standart eğrisi

Aktivite ölçümü için cam tüp içerisindeki reaksiyon ortamına 1 mL Subtilisin Carlsberg enzimi (0,5 mg/mL) ve 5 mL kazein substrat çözeltisi (%0,65'lik) eklenerek 37 °C de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüplerin içerisine 5 mL trikloro asetik asit (TCA) çözeltisi eklendi reaksiyon durduruldu. Daha sonra 37 °C de 30 dk inkübe edildikten sonra 5000 rpm de santrifüjlenerek filtrattan 2 mL alındı ve üzerine 5 mL Na₂CO₃ ve 1 mL Folin Ciocalteu reaktifi eklenerek 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 660 nm de absorbans okundu.

Folin Ciocalteu reaktifi, fenolik ve polifenolik bileşiklerin kolorimetrik tayininde kullanılan fosfomolibdat ve fosfotungstat içeren reaktiftir.

Tablo 2. Subtilisin Carlsberg aktivite ölçüm işlemleri

	ÖRNEK	KÖR
Kazein (% 0,65)	5 mL	-
Enzim	1 mL (50 mg)	-
10 dk inkübasyon		
TCA (110 mM)	5 mL	5 mL
Enzim	-	1 mL
30 dk inkübasyon (37 °C) ve Filtrasyon		
Renklendirme		
Örnek Filtrat	2 mL	-
Test Filtrat	-	2 mL
Na₂CO₃ (500 mM)	5 mL	5 mL
Folin Reaktifi (%25)	1 mL	1 mL
10 dk inkübasyon (37 °C) ve 660 nm de absorbans ölçümü		

İmmobilize Subtilisin Carlsberg enziminin aktivitesi, mg taşıyıcı başına düşen aktivite olarak hesaplandı.

Hacimsel Aktivite:

$$U/mL = \frac{\mu mol \text{ tirozin reaksiyon hacmi}(ml)}{enzim \text{ hacmi}(ml) \times süre(dk) \times küvet \text{ hacmi}(ml)}$$

İmmobilize Enzim Aktivitesi:

$$U/mg \text{ taşıyıcı} = \frac{\mu mol \text{ tirozin reaksiyon hacmi}(ml)}{immobilize \text{ enzim}(mg) \times süre(dk) \times küvet \text{ hacmi}(ml)}$$

Spesifik Aktivite:

$$U/mg \text{ protein} = \frac{(U/ml)}{mg \text{ protein}}$$

3.2.12. Serbest ve İmmobilize Enzim Karakterizasyonu

3.2.12.1. Optimum pH

pH ın bir fonksiyonu olarak serbest ve immobilize Subtilisin Carlsberg enziminin aktivitesi pH 7,0-10,0 (7,0-7,5-8,0-8,5-9,0-9,5-10,0) aralığında substrat olarak kazein kullanılarak tayin edildi. Deneyler sırasında kullanılan belirli pH aralığındaki tüm tamponlar 50 mM Tris-HCl ile hazırlandı. Subtilisin Carlsberg enziminin aktivitesi standart analiz koşullarında ölçüldü ve en yüksek aktivite değerinin elde edildiği pH değeri baz alınarak % bağıl aktivite hesaplandı. Ölçümler en az üç kez tekrarlandı.

3.2.12.2. Optimum Sıcaklık ve Sıcaklık Stabilitesi

Optimum sıcaklığı belirlemek üzere, serbest enzim ve immobilize enzim aktivitesi 25 ile 70 °C arasında değişen sıcaklıklardaki inkübasyon sıcaklıklarında ölçüldü. Sıcaklık stabilitesini belirlemek için ise serbest ve taşıyıcılar üzerine immobilize enzim 70 °C de dört saat bekletildi ve 30 dakika aralıklarla aktiviteleri ölçüldü.

Serbest ve immobilize Subtilisin Carlsberg için aktivasyon enerjisi (E_a), Arrhenius denklemi kullanılarak log v (yüzde aktivitenin logaritması) ve T⁻¹ (K) (Kelvin cinsinden sıcaklığın tersi) arasındaki eğiminden ortaya çıkan eşitlik kullanılarak belirlendi:

$$\text{Eğim} = \frac{-E_a}{R}$$

Subtilisin Carlsberg aktivitesi ile ilgili termodinamik parametreler, termal stabilite profilinden elde edilen verilerden belirlendi. Subtilisin Carlsberg aktivitesinin termal inaktivasyon sabiti(k_d) ve yarı ömürleri (t_{1/2}) 40-70 °C de aralığındaki sıcaklıklarda araştırıldı. Geri kazanılan aktivite 0. Dakikadaki aktivitenin %100 kabul edilmesiyle belirlendi. Elde edilen sonuçlar birinci dereceden termal deaktivasyon sabiti(k_d) ve yarı ömür süreleri (t_{1/2}) aynı zamanda da D değerleri (sabit bir sıcaklıktaki Subtilisin Carlsberg aktivitesinin %90'ını inaktive etmek için gereken süre) araştırılan

her bir sıcaklık için hesaplandı. Bu deneysel noktalar aşağıdaki denklemlere göre hesaplandı:

$$\ln \frac{A}{A_0} = k_d \times t$$

A ısıtıl işlem sonrası t (dk) süre sonundaki kalan aktivite, A₀ ise başlangıç aktivitesi ve k_d termal inaktivasyon hızı sabiti (dk⁻¹)'dir.

Subtilisin Carlsberg nin yarı ömrü aşağıdaki eşitlikten hesaplandı:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d}$$

D değeri aşağıdaki eşitlikten hesaplandı:

$$D = \frac{\ln 10}{k_d}$$

3.2.13. Enzim Kinetiği

Serbest ve immobilize Subtilisin Carlsberg için Michealis-Menten (K_M) sabiti ve maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) optimum şartlar altında farklı substrat derişimleri kullanılarak (0,1-5,0 mM) elde edilen Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla belirlendi.

3.2.14. Serbest ve İmmobilize Subtilisin Carlsberg ile Deri Yüzeyinden Kıl Giderimi (Dehairing)

Serbest ve immobilize Subtilisin Carlsberg enzimi ile deri yüzeyinden kıl giderimi için 60 g ham keçi derisi kullanıldı. Deri tuzun uzaklaştırılması için 4 saat suda bekletildi ve üç eşit parçaya kesildi. Deriler ayrı ayrı %30 su ile birlikte 2,5 mg serbest Subtilisin Carlsberg ve serbest Subtilisin Carlsberg aktivitesine eşdeğer miktarda immobilize Subtilisin Carlsberg ile 24 saat muamele edildi. Ayrıca kontrol deneyi olarak, derinin 3. kısmı, geleneksel kıl gideriminde kullanılan %3,5 Na₂S ve %6 CaO ile muamele edildi. Sonrasında kılların deriden uzaklaştırılması kuvvet

uygulamadan el ile yapıldı ve deriler iyice yıkandı. Elde edilen deri yüzeyleri morfolojik olarak incelenerek sonuçlar karşılaştırıldı.

3.2.14.2. Enzimatik Kıl Giderimi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Enzimatik kıl giderimi üzerine inkübasyon süresinin etkisini belirlemek için 8 ila 24 (8-16-24 saat) saat arasında değişen inkübasyon süreleri incelendi (reaksiyon koşulları: pH 8,0; 30 °C, reaksiyon ortamı: %30 su ve 2,5 mg serbest SC).

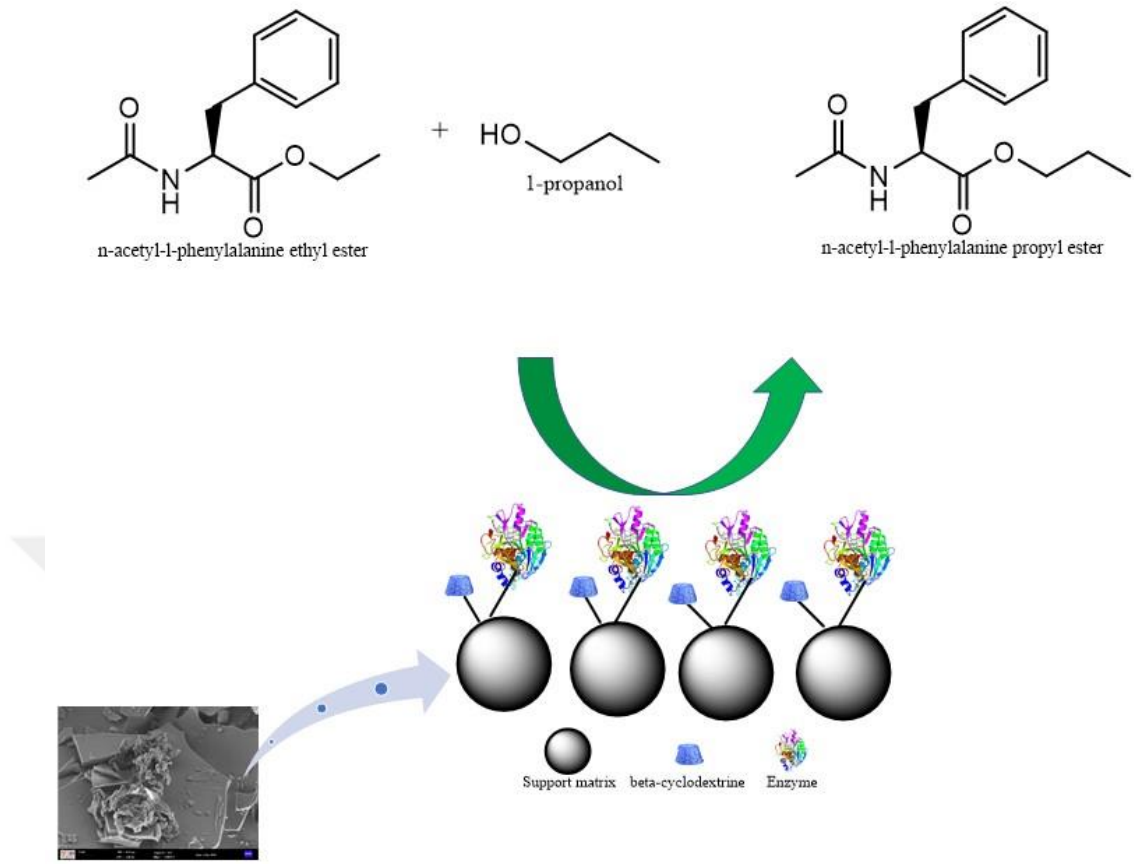
3.2.14.3. Kimyasal ve Enzimatik Kıl Giderimi Yapılmış Derilerin Fabrika Ölçeğinde İşlenmesi

Kimyasal ve enzimatik olarak kıl giderimi yapılan derilere, kırıhane tabaklama prosesi, tabaklama sonrası proses ve bitirme aşamaları bir deri fabrikasında (Ardako Deri, Manisa, Türkiye) uygulandı.

3.2.15. Subtilisin Carlsberg Enziminin Transesterifikasyon Aktivitesinin Belirlenmesi

SC enziminin organik ortamda transesterifikasyon aktivitesi için N-asetil-L-fenil alanin etil ester (APEE) ve 1-propanol arasındaki transesterifikasyon reaksiyonu kullanıldı. 10 mL THF içerisinde 1 mmol APEE ve 10 mmol alkol olacak şekilde hazırlanan reaksiyon ortamına 50 mg immobilize SC eklendi ve optimum sıcaklıkta 24 saat sürekli karıştırıldı. İşlemler aynı koşullarda 2,5 mg liyofilize serbest Subtilisin Carlsberg ile tekrarlandı. Gaz kromatografisi (30 m x 250 µm x 25 µm ile DB5 kolonu, FID dedektörü, He taşıyıcı gazı) ile belirli zaman aralıklarında reaksiyon ortamından alınan numune analiz edilerek reaksiyon ilerlemesi izlendi.

Transesterifikasyon reaksiyonunun verimi, 1-propanol için GC kromatogramından hesaplandı. Kantitatif analiz için, farklı 1-propanol konsantrasyonları (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 M) kullanılarak konsantrasyon ve pik alanı ile standart eğri çizildi.



Şekil 21. İmmobilize enzim ile transesterifikasyon reaksiyonu

3.2.15.1. Serbest ve İmmobilize Subtilisin Carlsberg'in Organik Çözücü Ortamındaki Transesterifikasyon Aktivitesi Üzerindeki Sıcaklığın Etkisi

N-asetil-L-fenil alanin etil ester (APEE) ve 1-propanol arasındaki enzimatik transesterifikasyon reaksiyonu için optimum sıcaklığı belirlemek üzere, serbest enzim ve immobilize enzim aktivitesi 20 ile 60 °C (20-40-50-60 °C) arasında değişen sıcaklıklardaki inkübasyon sıcaklıklarında ölçüldü.

3.2.15.2. Serbest ve İmmobilize Subtilisin Carlsberg'nin Organik Çözücü Ortamındaki Transesterifikasyon Aktivitesi Üzerindeki Metal İyonlarının Etkisi

Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} and Fe^{2+} iyonlarının serbest ve immobilize Subtilisin Carlsberg aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek için liyofilizasyon ortamına 5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ilave edildi. Transesterifikasyon yüzdesi belirlendi.

3.2.15.3. Serbest ve İmmobilize Subtilisin Carlsberg'in Organik Çözücü Ortamındaki Transesterifikasyon Aktivitesi Üzerindeki Tuz Etkisi

Cl^- , Br^- , SO_4^{2-} ve NO_3^- iyonlarının serbest ve immobilize Subtilisin Carlsberg aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek için liyofilizasyon ortamına 5 mM NaCl, KBr, Na_2SO_4 ve KNO_3 ilave edildi. Transesterifikasyon yüzdesi belirlendi.

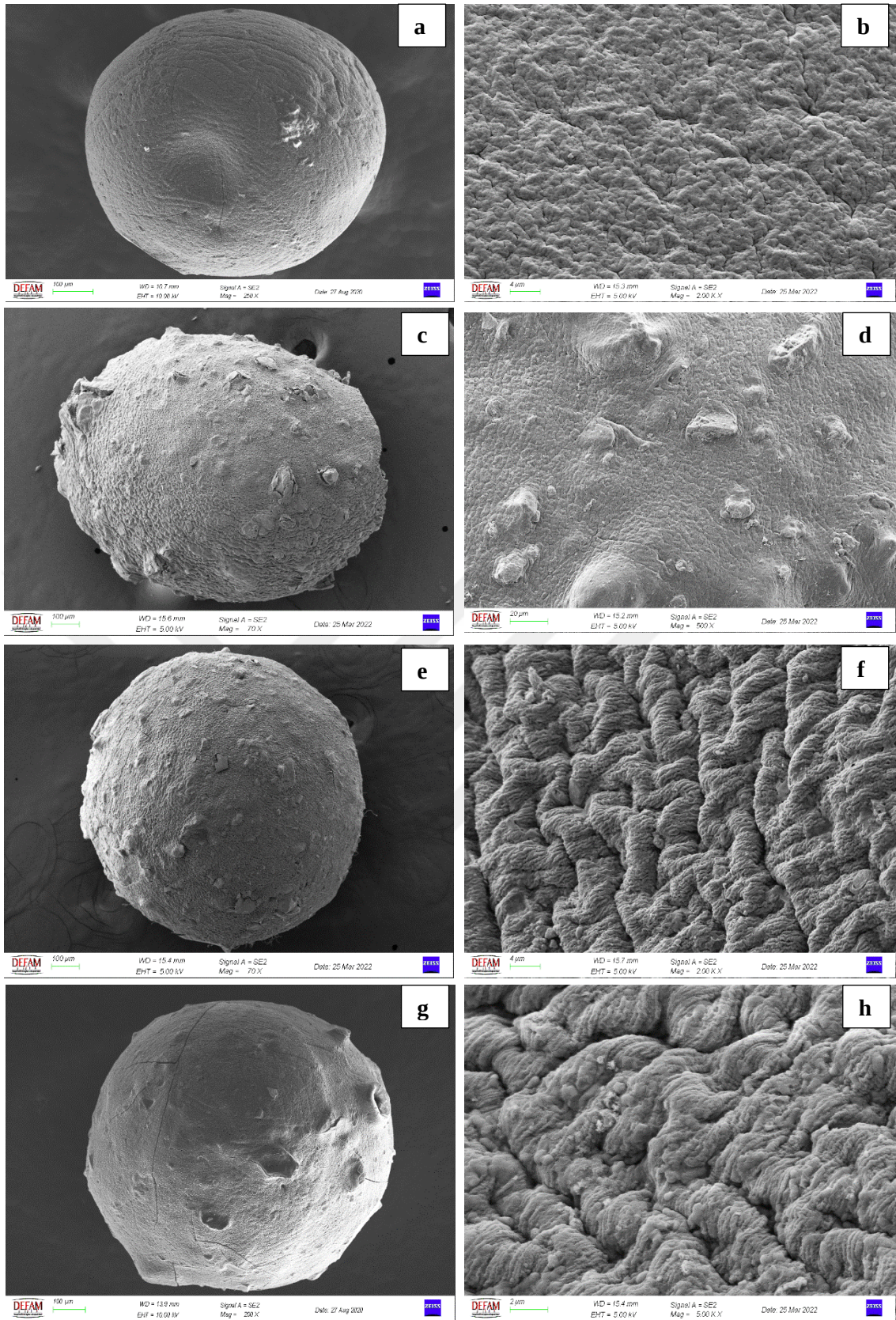
4. BULGULAR

4.1. MK ve Perlit-CD in Karakterizasyonu

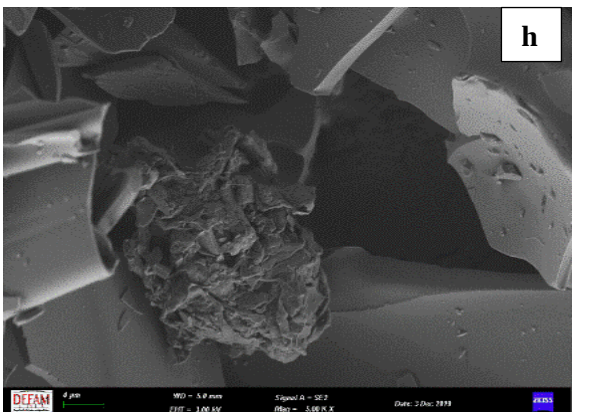
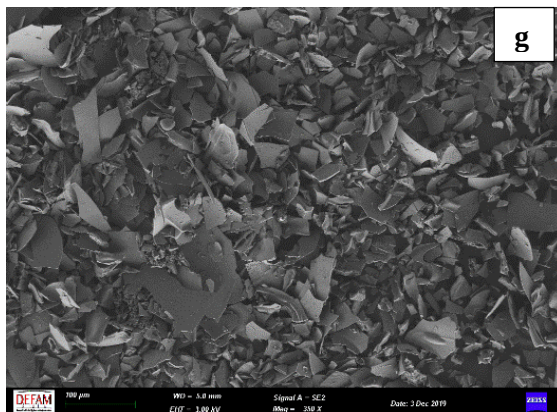
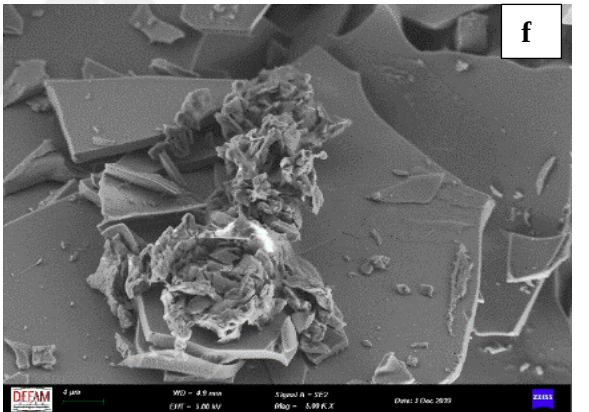
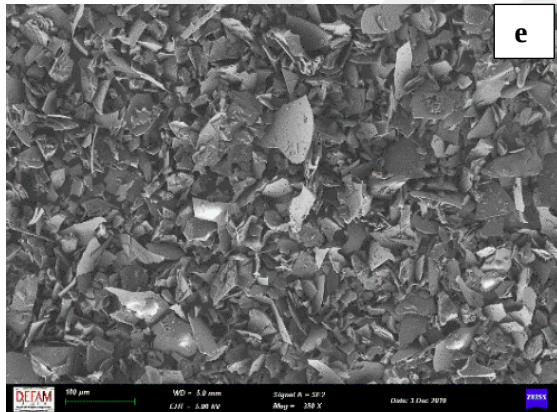
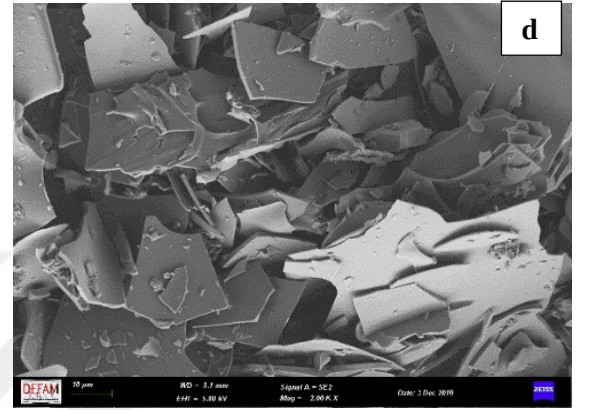
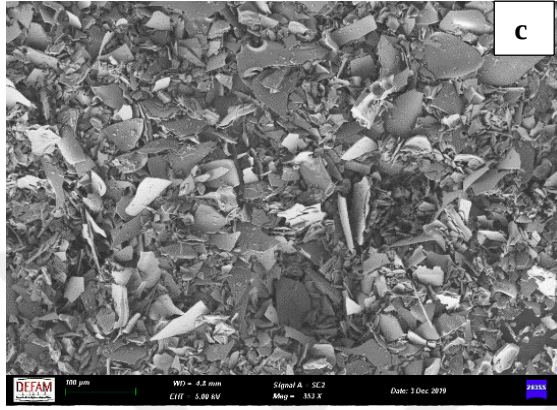
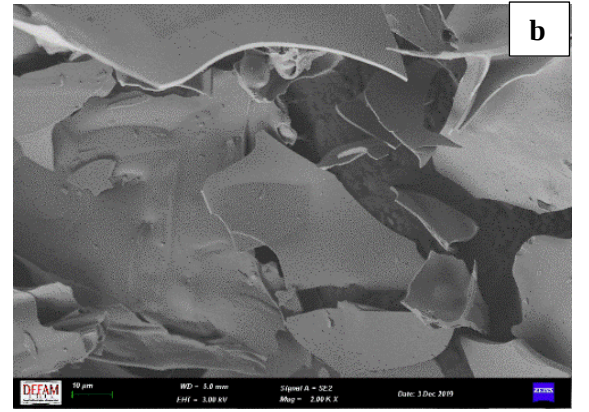
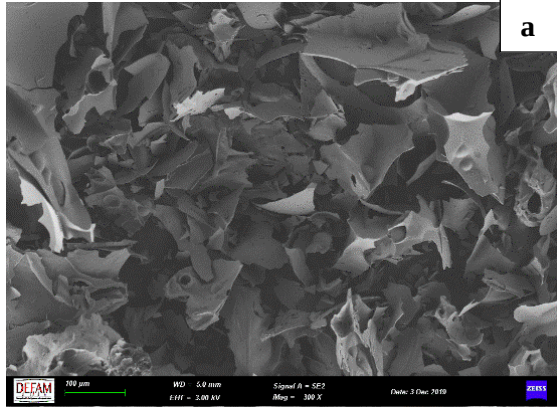
Enzim immobilizasyonu için seçilen organik yapıdaki kitosan (CS) ile inorganik yapıdaki perlit (PE) in çeşitli modifikasyonları sonucu elde edilen magnetit kitosan (MK) ve perlit- β -siklodekstrin (Perlit-CD) ile onların glutaraldehit (GA) ve genipin (GE) ile çapraz bağlanması sonucu elde edilen MK-GA, MK-GE, Perlit-CD-GA, Perlit-CD-GE nin yüzey morfolojileri SEM analizi ile irdelendi (Şekil 22-23-24).



Şekil 22. MK yüzey yapısı



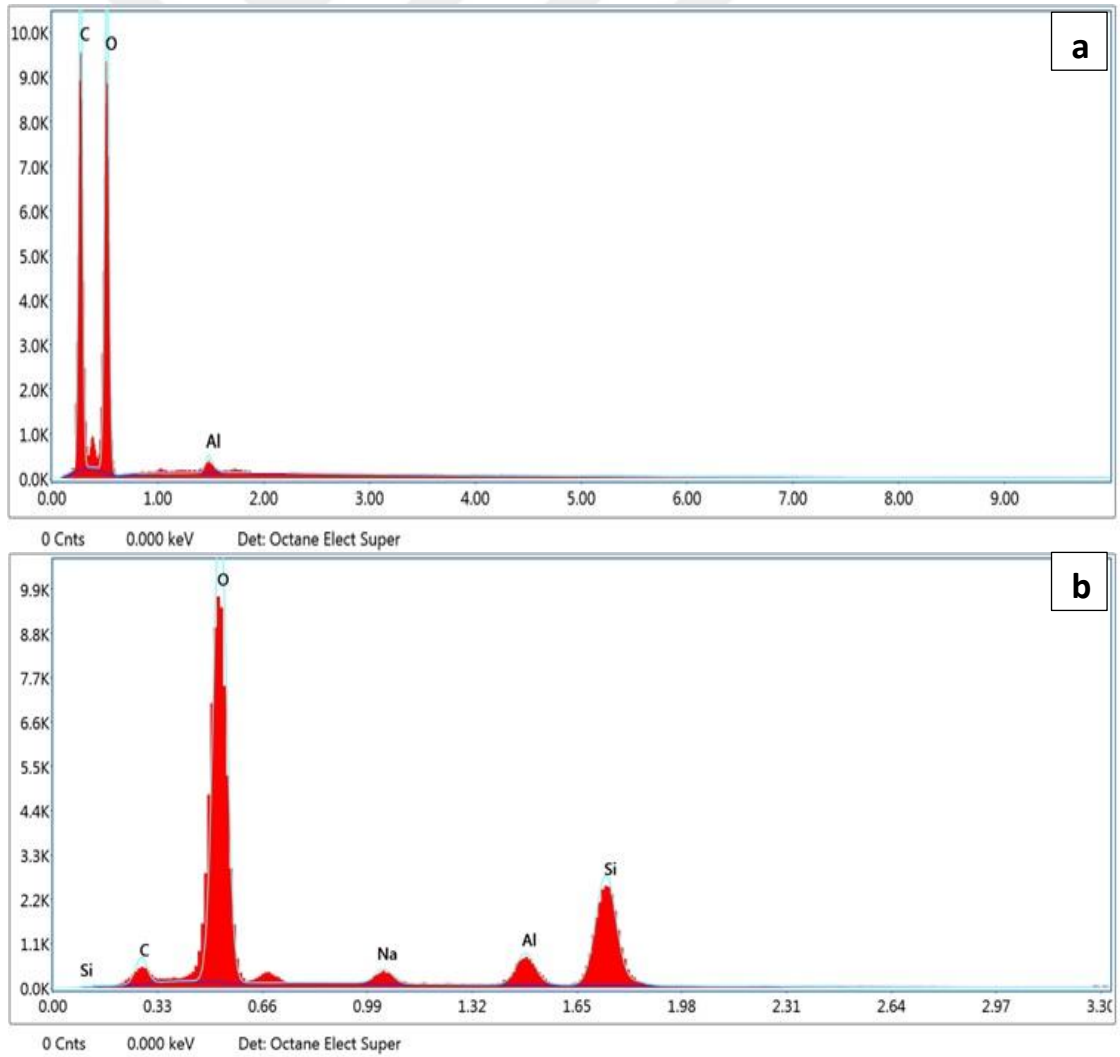
Şekil 23. Kitosan temelli taşıyıcıların SEM görüntüleri: CS (a:250x, b: 5000x), MK (c:250x, d: 5000x), MK-GA (e:250x, f: 5000x), MK-GE (g:250x, h: 5000x).

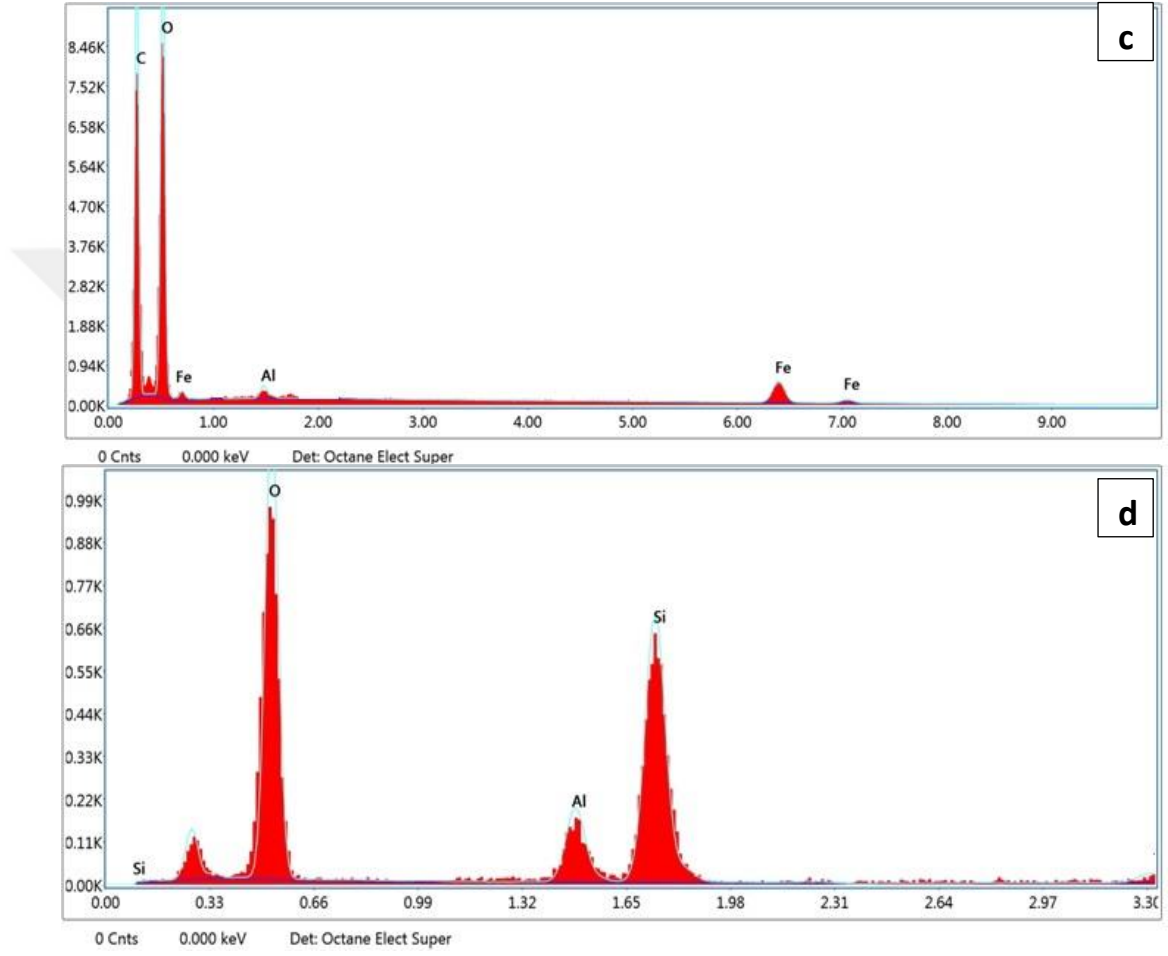


Şekil 24. Perlit temelli taşıyıcıların SEM görüntüleri: Perlit (a:300x, b:2000x), Perlit-CD (c:300x, d:2000x), PE-CD-GA (e:300x, f:2000x), Perlit-CD-GE (g:300x, h:2000x)

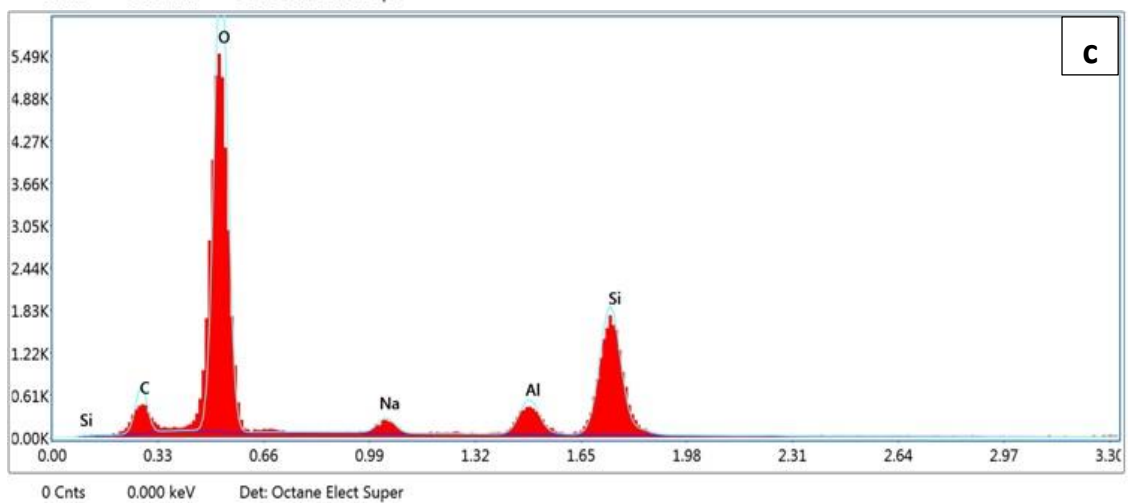
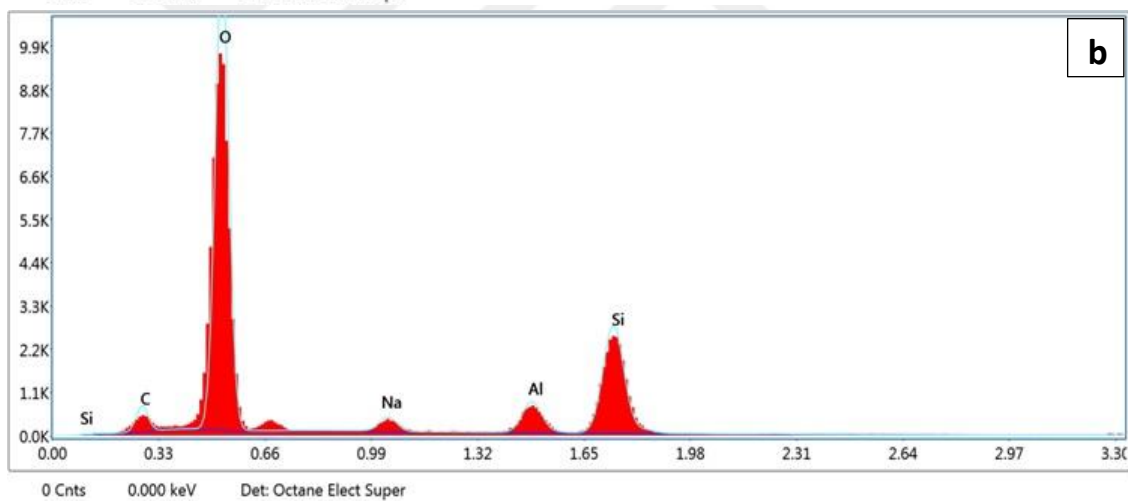
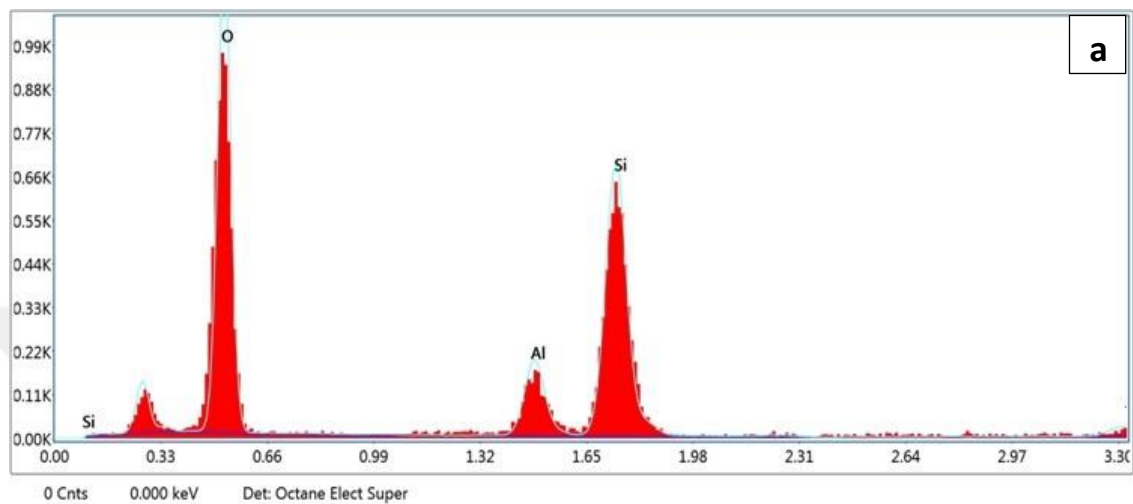
Ekde edilen görüntüler incelendiğinde CS yüzeyinin ağısı polimerik bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. MK yüzeyinde ise magnetit partiküllerinin dağılımı görülmektedir. İnorganik temelli taşıyıcı görüntülerine bakıldığında ise perlit yapısının kırık tabakalı heterojen bir yapı görülmektedir. Modifikasyon ve çaptaz bağlama sonrasında ise kırık tabakalar üzerinde polimerik yapılar görülmektedir.

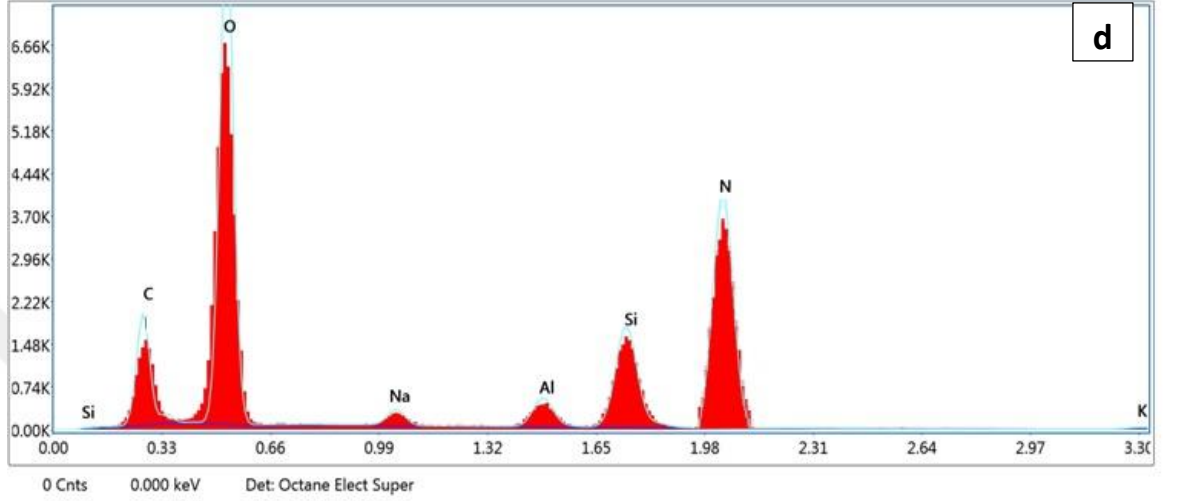
EDX tekniği ile analiz edilen malzemenin elementel bileşimini karakterize etmek için, elektron demeti tarafından bombardıman edilen numuneden yayılan X-ışınları kullanılarak yaklaşık 1µm kadar küçük yüzeyler ya da fazlar yarı-kantitatif olarak analiz edilebilir. EDS ile nokta, çizgi analizleri yanı sıra elementel haritalama mümkündür. Bu amaçla immobilizasyonda kullanılan taşıyıcıların elementel bileşimi hakkında bilgi edinmek için EDX analiz haritaları şekil 25 ve şekil 26 da verilmiştir.





Şekil 25. Kitosan temelli taşıyıcıların EDX grafikleri: CS (a), MK (b), MK-GA (c), MK-GE (d)

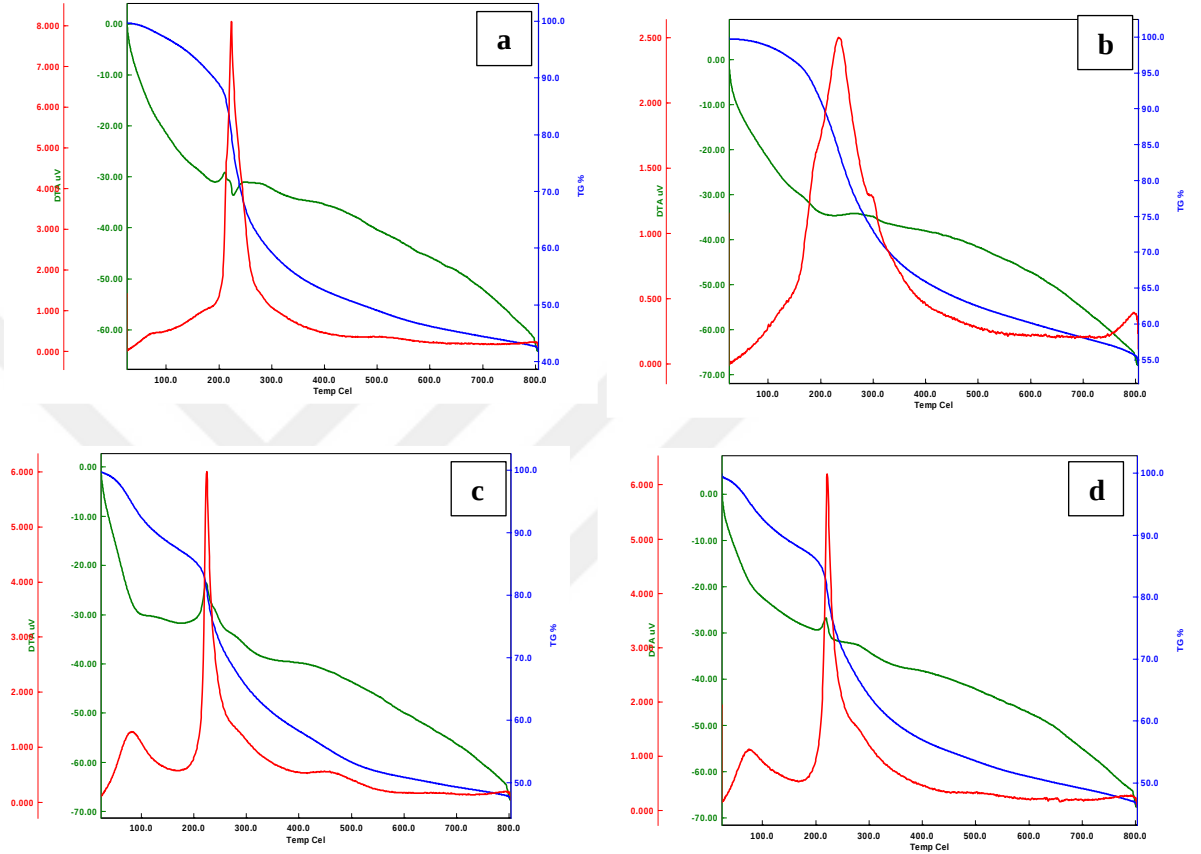




Şekil 26. Perlit temelli taşıyıcıların EDX grafikleri: Perlit (a), Perlit-CD (b), Perlit-CD-GA (c), Perlit-CD-GE (d)

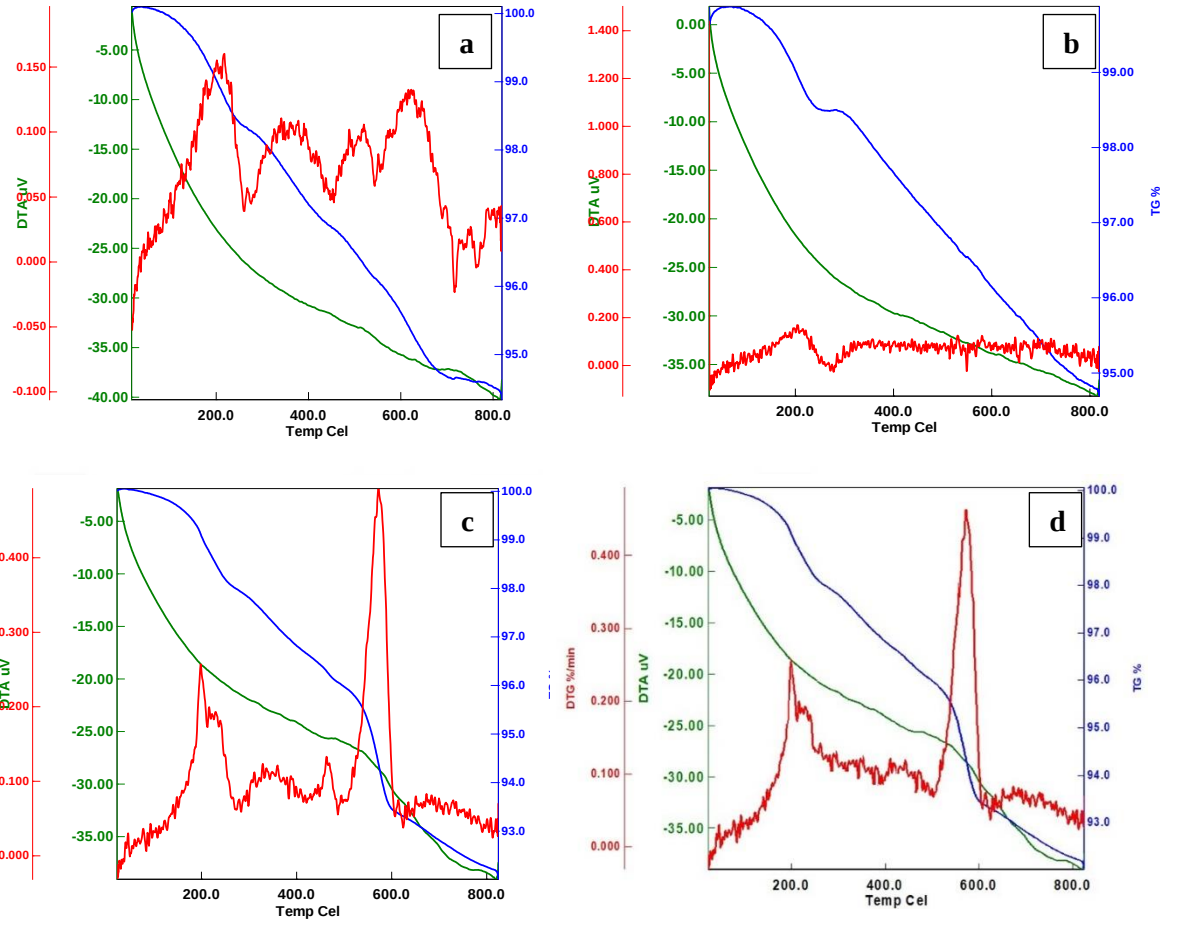
EDX sonuçları magnetit kullanılarak elde edilen MK yapısında azot atomlarının varlığını göstermektedir. Ayrıca perlit yapısında bulunan silisyum atomları da görülmektedir.

Kitosan ve perlit esaslı taşıyıcıların termal ayrışması termogravimetrik analiz kullanılarak incelendi ve sonuçlar Şekil 27-28'de gösterildi.



Şekil 27. Kitosan temelli taşıyıcıların TGA eğrileri: CS (a), MK (b), MK-GA (c), MK-GE (d)

Kitosan temelli taşıyıcının termal ayrışma profili incelendiğinde 800 °C de kütle kaybının %57 civarında olduğu görülmektedir. MK da ise kütle kaybı %45 olarak bulundu. Ayrıca 100 ve 230 °C de iki temel ayrışma profili vardır.

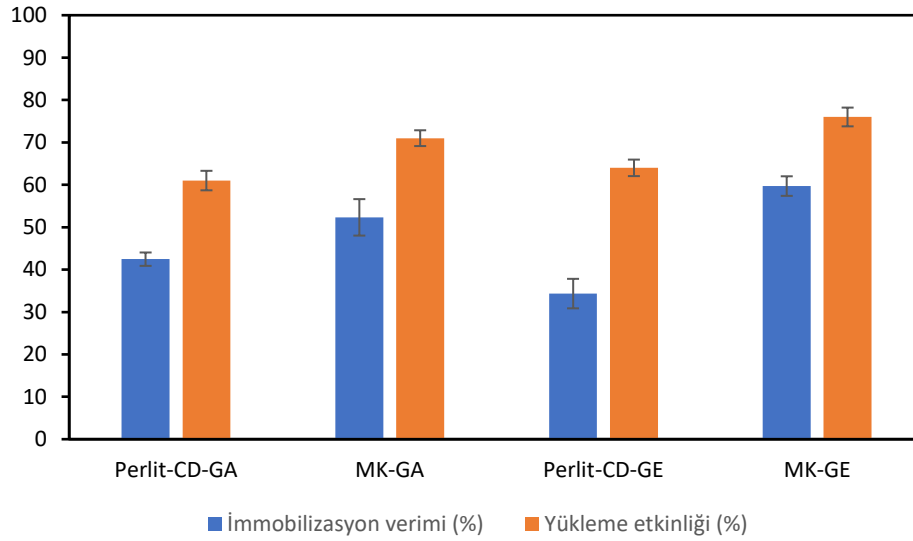


Şekil 28. Perlit temelli taşıyıcıların TGA eğrileri: Perlit (a), Perlit-CD (b), Perlit-CD-GA (c), Perlit-CD-GE (d)

Perlit esaslı taşıyıcıların 800 °C deki kütle kayıpları yaklaşık %6 olarak bulundu. Ham perlitte 230 °C de bir ayrışma profili görülürken modifiye perlitlerde 230 ve 600 °C civarında iki ayrışma profili görülmektedir.

4.2. Taşıyıcıya Bağlanan Protein Miktarı ve İmmobilizasyon Verimi

Subtilisin Carlsberg enziminin kitosan ve perlit esaslı taşıyıcılar üzerine kovalent bağlanma yöntemiyle immobilizasyonunda, iki farklı çapraz bağlama ajanı kullanıldı ve immobilizasyon verimleri karşılaştırıldı. İmmobilizasyon verimlerinin ve yükleme etkinliğinin belirlenmesi için serbest enzim, immobilizasyon işlemi sonrası kalan filtrat ve immobilize enzimin aktivite ve protein tayinleri ilgili prosedürlere göre yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 29 ve Tablo 3'te gösterildi.



Şekil 29. Farklı taşıyıcılar üzerine GA ve GE ile immobilize edilmiş Subtilisin Carlsberg enziminin immobilizasyon verimi (Reaksiyon ortamı: 250 mg taşıyıcı, 2 mL Subtilisin Carlsberg (0,5 mg/mL); reaksiyon koşulları: pH 8,0; 25 °C; reaksiyon süresi: 2 saat)

Tablo 3. Farklı taşıyıcılara immobilize edilen Subtilisin Carlsberg'in protein miktarı ve yükleme etkinliği

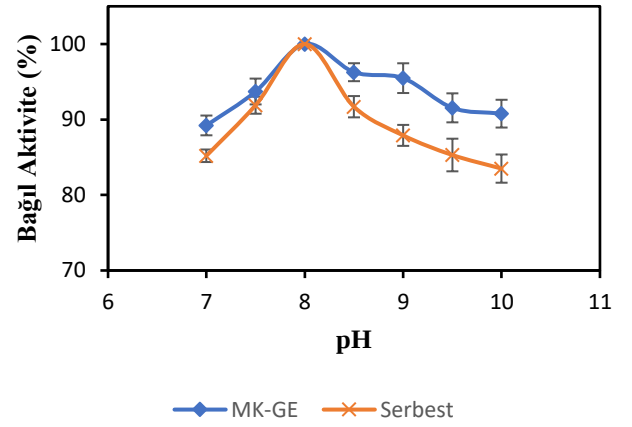
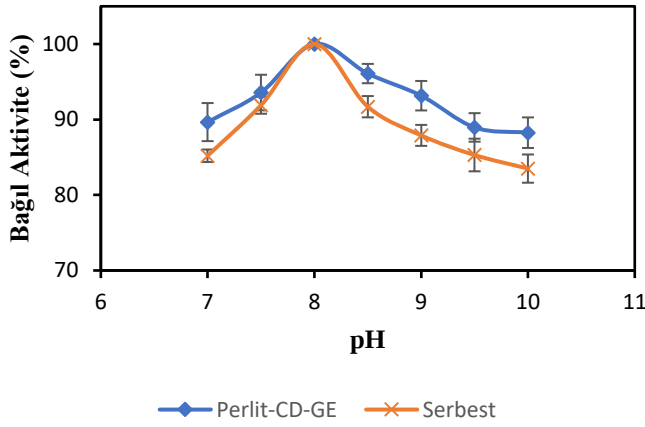
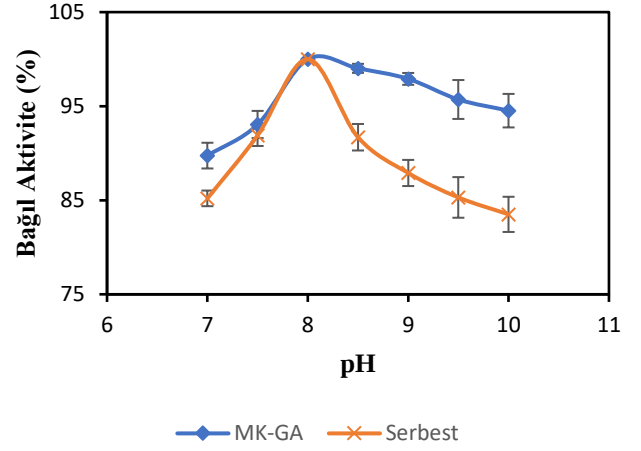
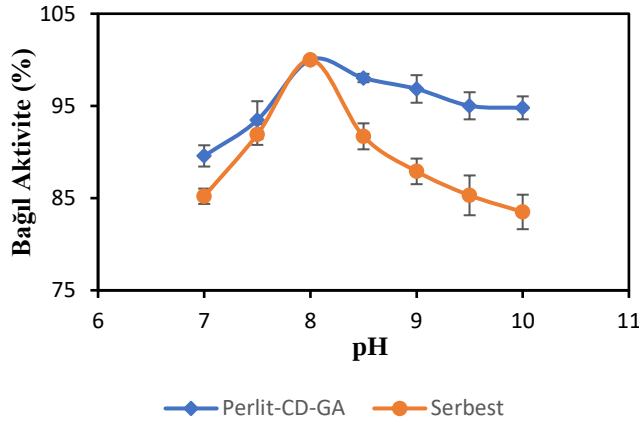
	Protein miktarı (mg)	Aktivite (U/mL-U/mg)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Yükleme Etkinliği (%)
Serbest SC	0,83±0,038	6,4±0,41	7,71	-
Perlit-CD-GA-SC	0,62±0,022	0,032±0,0012	0,051	62±2,3
MK-GA-SC	0,70±0,018	0,038±0,0014	0,054	71±1,86
Perlit-CD-GE-SC	0,63±0,019	0,033±0,0015	0,052	64±1,95
MK-GE-SC	0,75±0,022	0,04±0,0017	0,053	76±2,21

4.3. Serbest ve İmmobilize Subtilisin Carlsberg in Karakterizasyonu

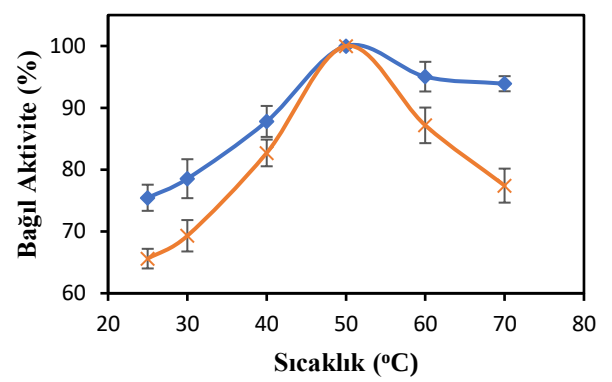
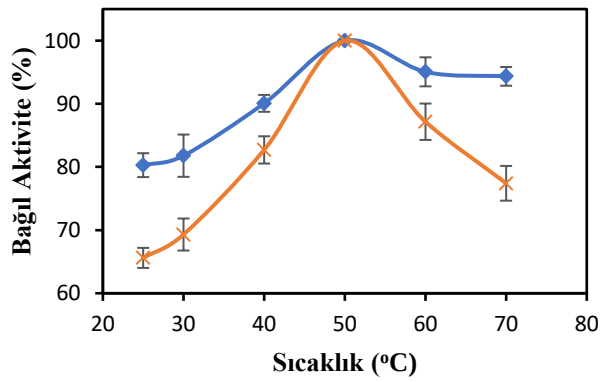
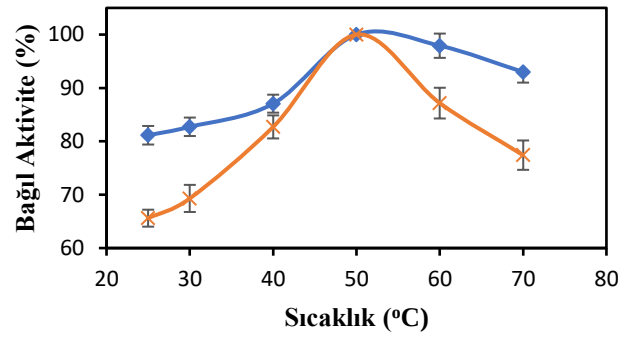
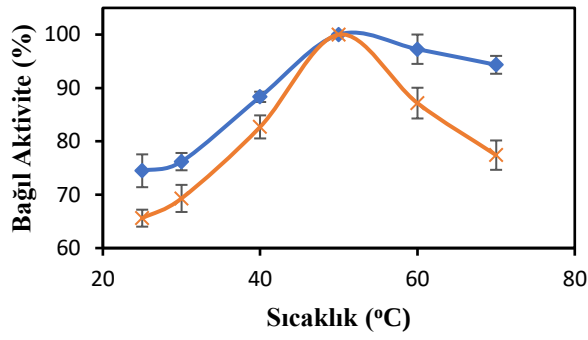
4.3.1. pH ve Sıcaklığın Etkisinin Belirlenmesi

Enzim özellikleri immobilizasyon sonrası değişebileceği için enzimin katalitik aktivitesini etkileyebilecek parametrelerin incelenmesi büyük önem arz eder. Çapraz bağlayıcı olarak genipin ve glutaraldehit kullanılarak farklı taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiş Subtilisin Carlsberg in aktivitesi değişen pH ve sıcaklık koşulları altında substrat olarak kazein kullanılarak ölçüldü ve yüzde bağıl aktivite değerleri hesaplandı. Şekil 30'da gösterildiği gibi, serbest ve farklı taşıyıcılarda immobilize edilmiş Subtilisin Carlsberg nin optimum pH'ı benzer bulundu.

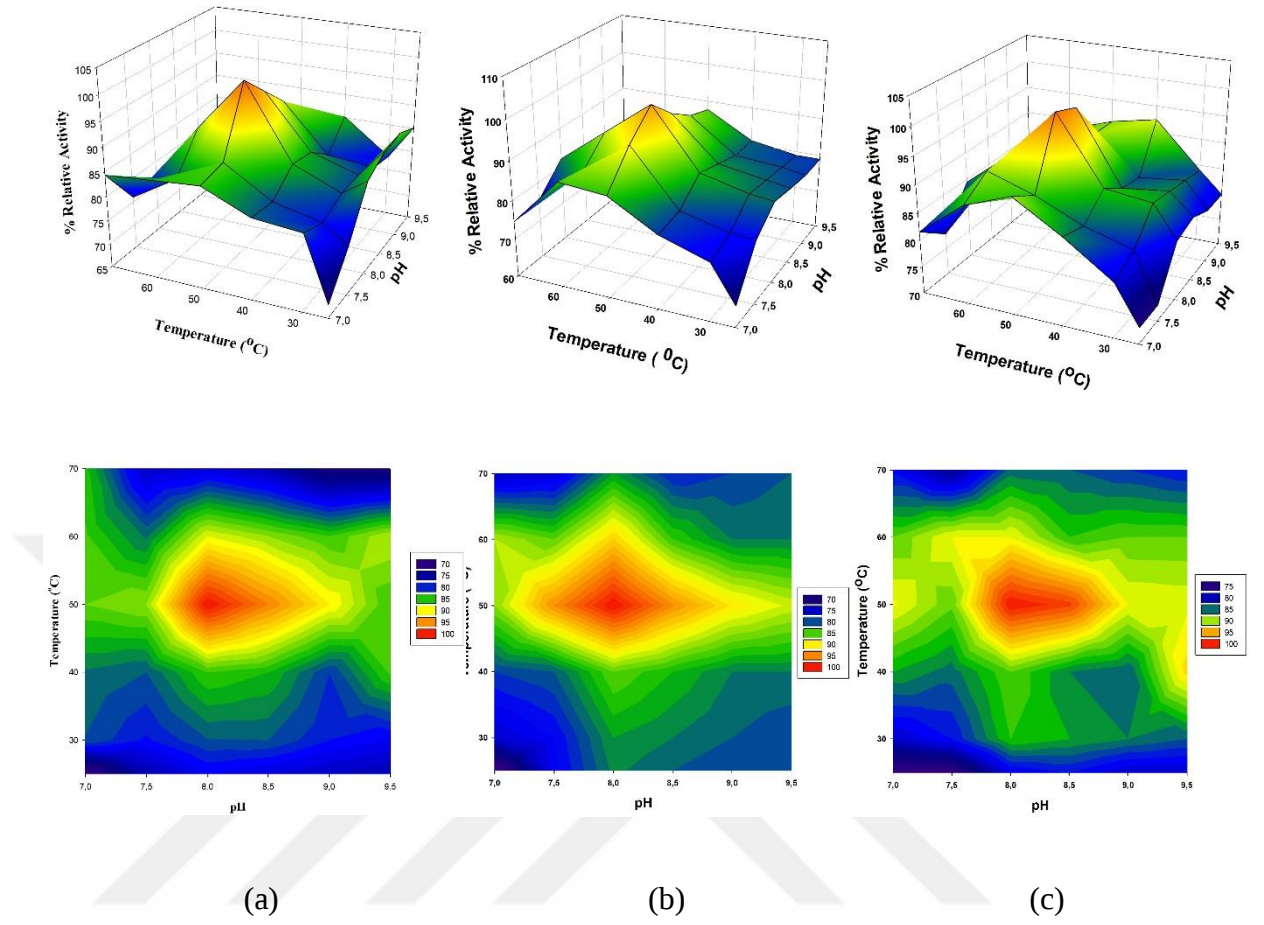
Enzimatik reaksiyonların hızları sıcaklıkla artmakla birlikte, yüksek sıcaklıklarda enzimlerin protein yapılarındaki bozulmalardan dolayı aktiviteleri azalmaktadır. Reaksiyon hızının maksimuma eriştiği noktadaki sıcaklık derecesi optimum sıcaklık olarak ifade edilir. Enzimlerin optimum çalışma sıcaklığının üzerinde denatürasyon başlar. Çalışmada serbest ve immobilize Subtilisin Carlsberg için optimum sıcaklık değeri 50 °C olarak belirlendi (Şekil 31-33).



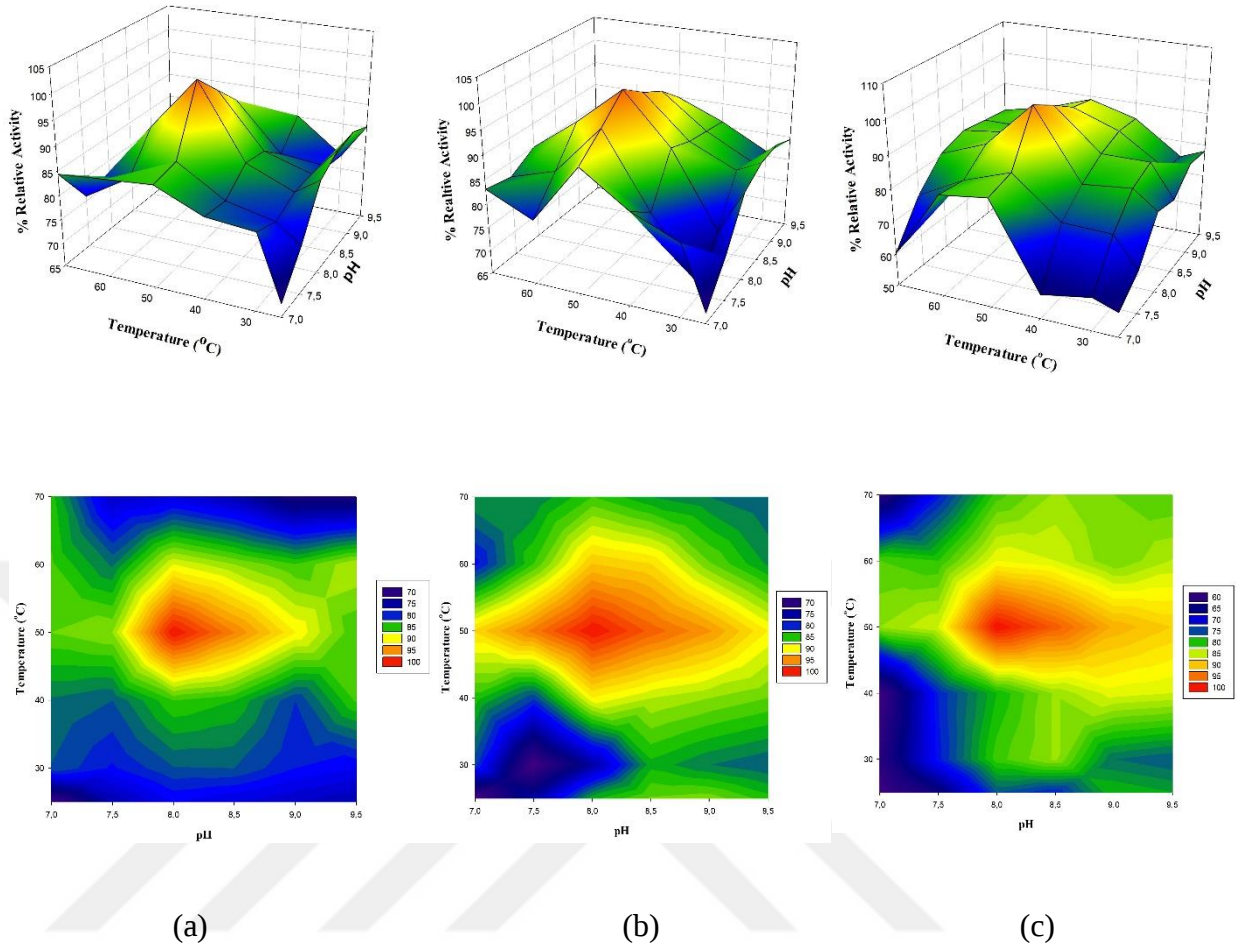
Şekil 30. Farklı taşıyıcılar üzerine GA ve GE ile immobilize edilmiş ve Serbest Subtilisin Carlsberg in aktivitesi üzerine pH etkisi (Serbest enzim için reaksiyon ortamı: 5 mL kazein (%0,65), 1 mL Subtilisin Carlsberg (1 mg/mL); immobilize enzim için reaksiyon ortamı: 50 mg İmmobilize Subtilisin Carlsberg, 5 mL kazein (%0,65); serbest ve immobilize enzim için reaksiyon koşulları: 37 °C, inkübasyon süresi: 10 dk)



Şekil 31. Farklı taşıyıcılar üzerine GA ve GE ile immobilize edilmiş ve Serbest Subtilisin Carlsberg nin aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi (Serbest enzim için reaksiyon ortamı: 5 mL kazein (%0,65), 1 mL Subtilisin Carlsberg (0,5 mg/mL); immobilize enzim için reaksiyon ortamı: 50 mg İmmobilize Subtilisin Carlsberg, 5 mL kazein (%0,65); serbest ve immobilize enzim aktivitesi için ölçüm koşulları: pH 8,0; inkübasyon süresi: 10 dk)



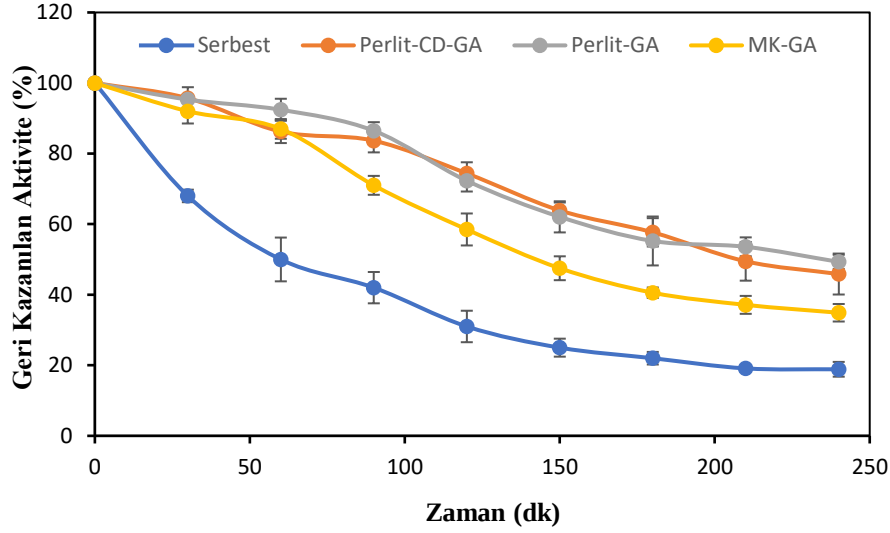
Şekil 32. Serbest SC (a), MK-GA-SC(b) ve MK-GE-SC (c)'nin Response Surface ve Contour grafikleri



Şekil 33. Serbest SC (a), Perlit-CD-GA-SC (b) ve Perlit-CD-GE-SC (c) nin Response Surface and Contour grafikleri

4.3.2. Sıcaklık Stabilitesi

Sıcaklık kararlılığı immobilize enzimlerin uygulamalarında önemli bir kriter olduğundan bu konu üzerinde çalışmalar artmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda serbest enzimler deaktif olurken, immobilize enzimlerde taşıyıcı genellikle enzim için termal bir kalkan oluşturmaktadır. Serbest ve immobilize Subtilisin Carlsberg nin sıcaklık stabilitesinin incelenmesi amacıyla 70 °C de 4 saat bekletilen serbest ve immobilize Subtilisin Carlsberg aktivitesi 30 dakika aralıklarla ölçülerek bağlı aktivite olarak hesaplandı (Şekil 34).



Şekil 34. GA ve GE ile farklı taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiş ve serbest Subtilisin Carlsberg in 70 °C deki sıcaklık stabilitesi (inkübasyon süresi :240 dk)

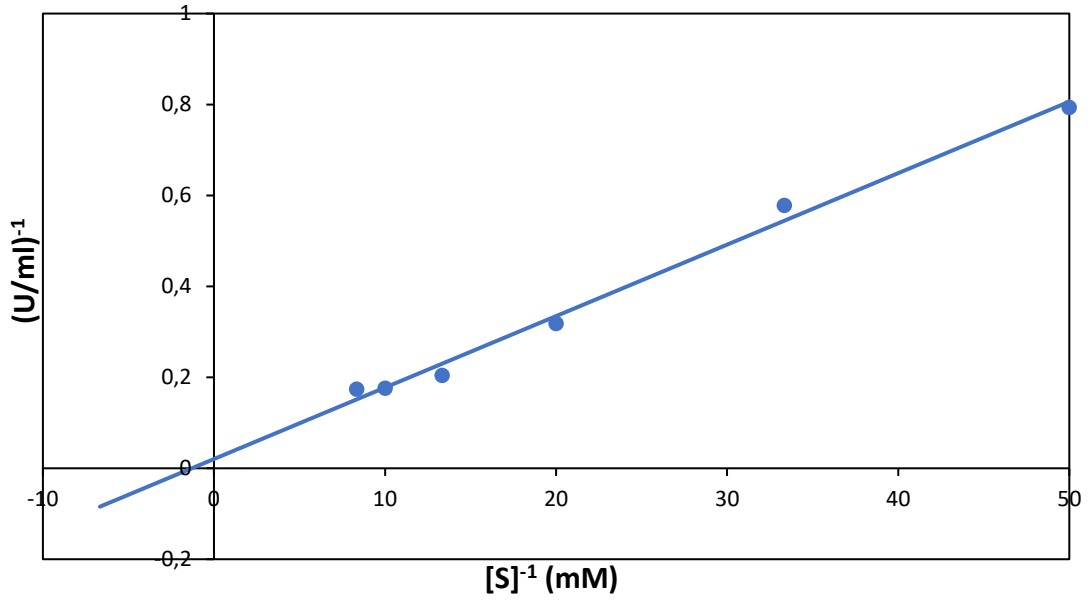
Tablo 4 de verilen bu sonuçlar değerlendirildiğinde Subtilisin Carlsberg enziminin yarı ömür sürelerinde ve D değerlerinin kovalent immobilizasyon sonrasında tüm sıcaklıklarda arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar, farklı taşıyıcılar üzerine immobilize edilen Subtilisin Carlsberg in termal stabilitesinin serbest Subtilisin Carlsberg den daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Tablo 4. Serbest ve farklı taşıyıcılar üzerine immobilize edilen Subtilisin Carlsberg in termal inaktivasyon parametreleri (Stabilite koşulları: 70 °C; 240 dk)

	k_D (dk ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dk)	D (dk)
Serbest SC	0,0072	95,8	319
Perlit-CD-GA-SC	0,0030	231	767
MK-GA-SC	0,0042	165	548
Perlit-CD-GE-SC	0,0033	210	697
MK-GE-SC	0,0044	165	523

4.3.3. Enzim Kinetiği

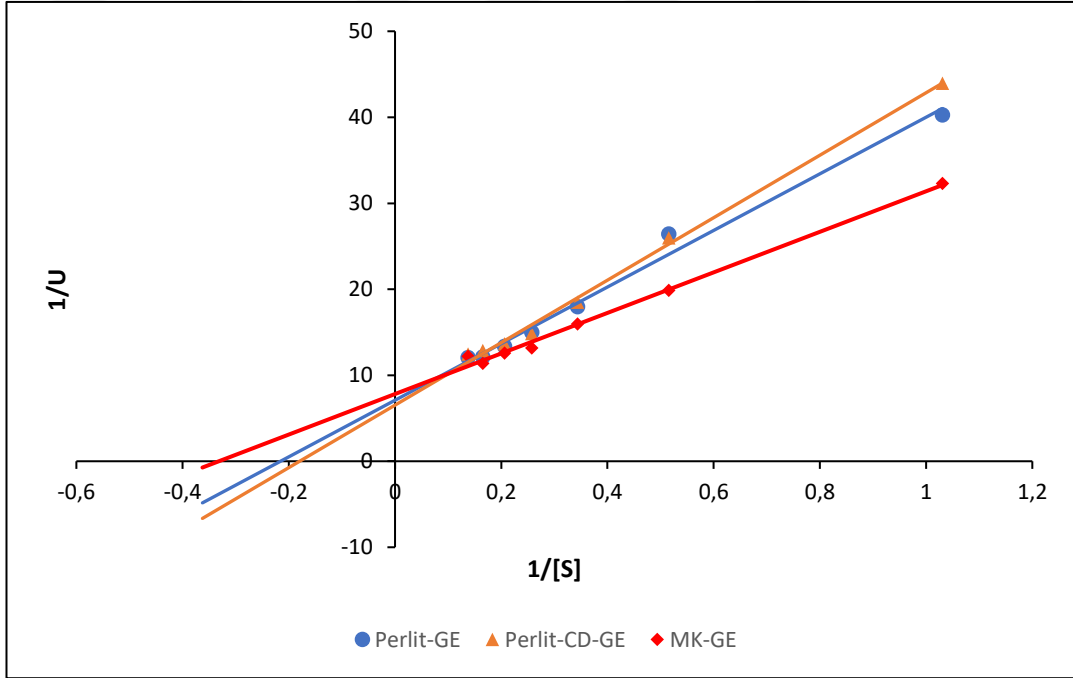
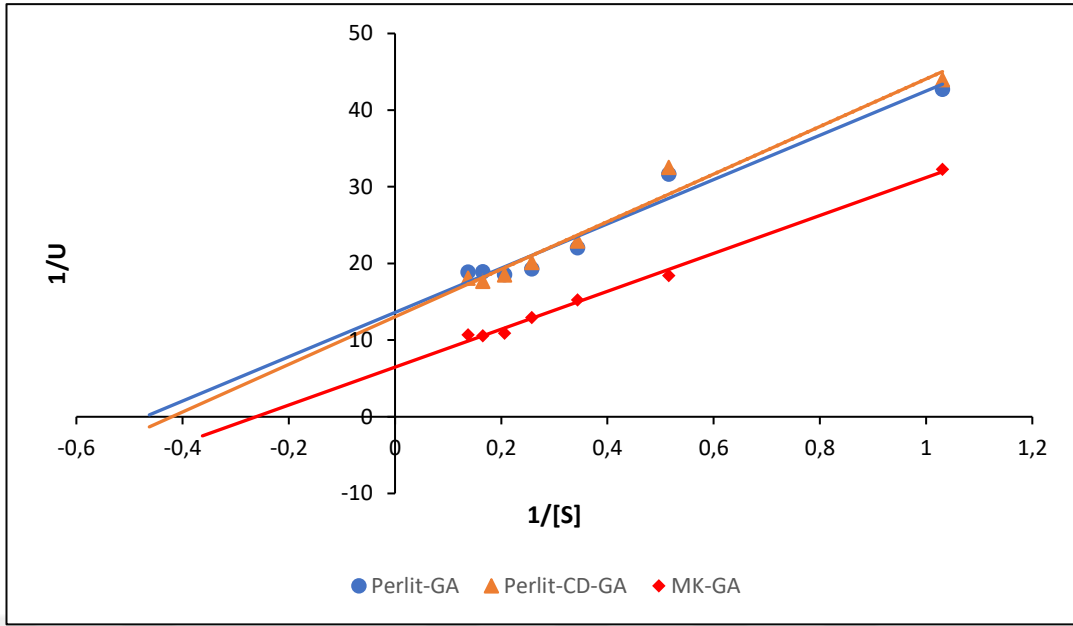
Serbest Subtilisin Carlsberg enziminin K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için kazein substratın farklı derişimleri kullanılarak elde edilen Lineweaver- Burk grafiği Şekil 35 de gösterilmiştir.



Şekil 35. Serbest Subtilisin Carlsberg enziminin kazein substratı ile elde edilen Lineweaver- Burk grafiği

(Reaksiyon ortamı: 0,5 mg/mL Subtilisin Carlsberg, kazein; reaksiyon koşulları: pH:8,0, 50 °C)

İmmobilize Subtilisin Carlsberg enzimi için 0,05 M, pH 8,0 Tris-HCl tamponu içerisinde hazırlanan kazein substratın belirli derişimleri (0,97-1,94-2,91-3,88-4,85-6,06-7,28 mM) kullanılarak ölçülen aktivite değerleri ile oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği Şekil 36’te gösterilmiştir.



Şekil 36. Farklı taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiş Subtilisin Carlsberg enziminin Lineweaver- Burk grafiği (Reaksiyon ortamı: 50 mg immobilize Subtilisin Carlsberg; 5 mL Kazein. Reaksiyon koşulları: pH:8,0 ;50 °C; reaksiyon süresi:10 dk)

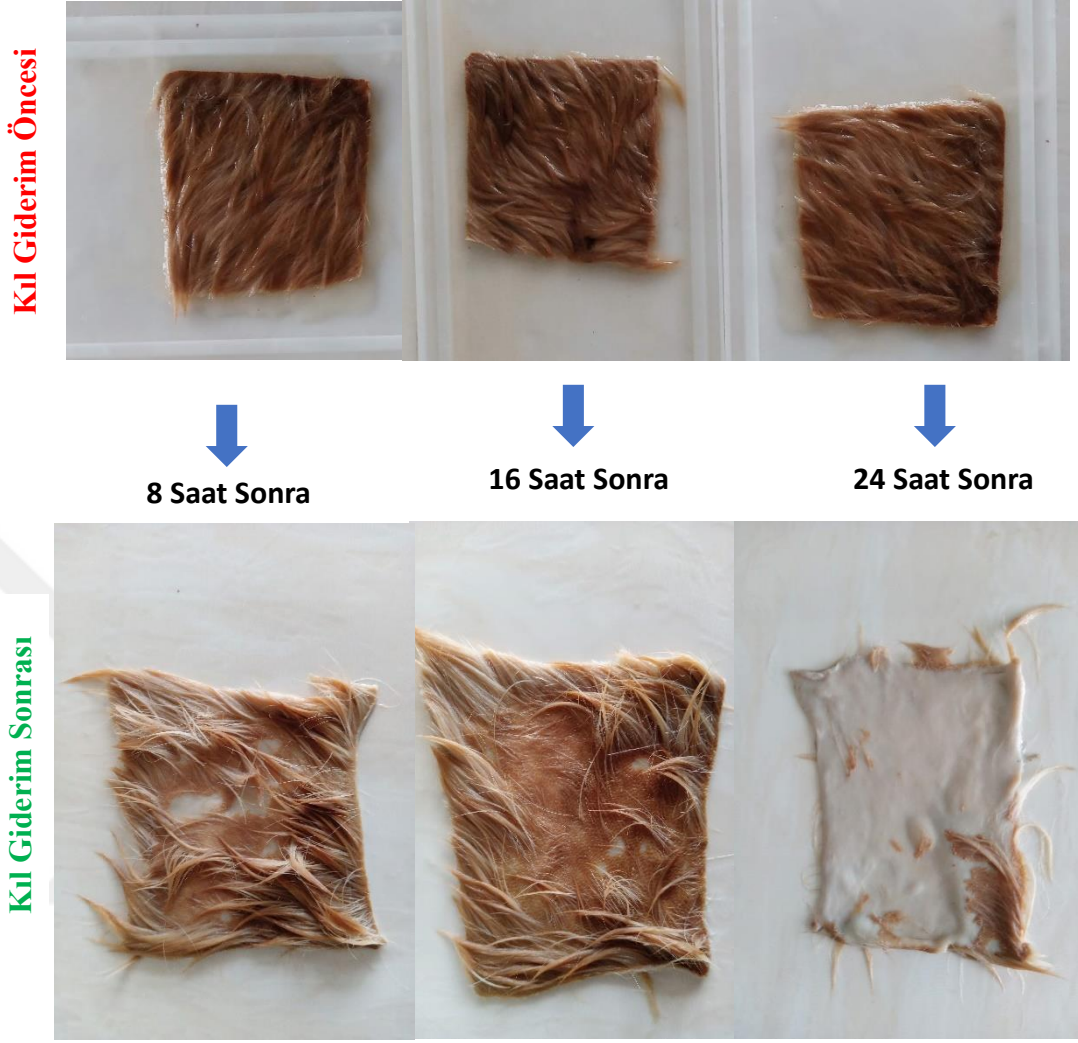
Tablo 5. Serbest ve İmmobilize SC nin hidroliz aktivitesine ilişkin K_M ve V_{max} değerleri

	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/mL}$)
Serbest SC	1,69	5,29
	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/g taşıyıcı}$)
Perlit-GA-SC	2,17	7,34
Perlit-CD-GA-SC	2,38	7,60
MK-GA-SC	3,03	15,4
Perlit-GE-SC	2,76	12,7
Perlit-CD-GE-SC	2,88	14,1
MK-GE-SC	3,84	15,3

4.4. Serbest ve İmmobilize Subtilisin Carlsberg ile Deri yüzeyinden Kıl Giderimi (Dehairing)

4.4.1. İnkübasyon Süresinin Enzimatik Kıl Giderimi Üzerine Etkisi

Enzimatik kıl giderimi prosesinde enzimin deri yüzeyindeki fibril paketleriyle ve kıl kökü etrafındaki yapısal olmayan proteinlerle etkileşimi kıl gideriminin temel prensibidir. Bu nedenle bu etkileşimin süresi kıl gideriminin etkinliğini etkilemektedir. Deri parçası 3 eşit parçaya bölünerek aynı reaksiyon şartlarında fakat farklı inkübasyon süreleri (8,16,24 saat) ile enzimatik kıl giderimine tabi tutuldu (Şekil 37).



Şekil 37. Enzimatik kıl giderimine inkübasyon süresinin etkisi (enzimatik işlem ortamı: %30 su, 2,5 mg Subtilisin Carlsberg; enzimatik işlem koşulları: pH 8,0; 30 °C)

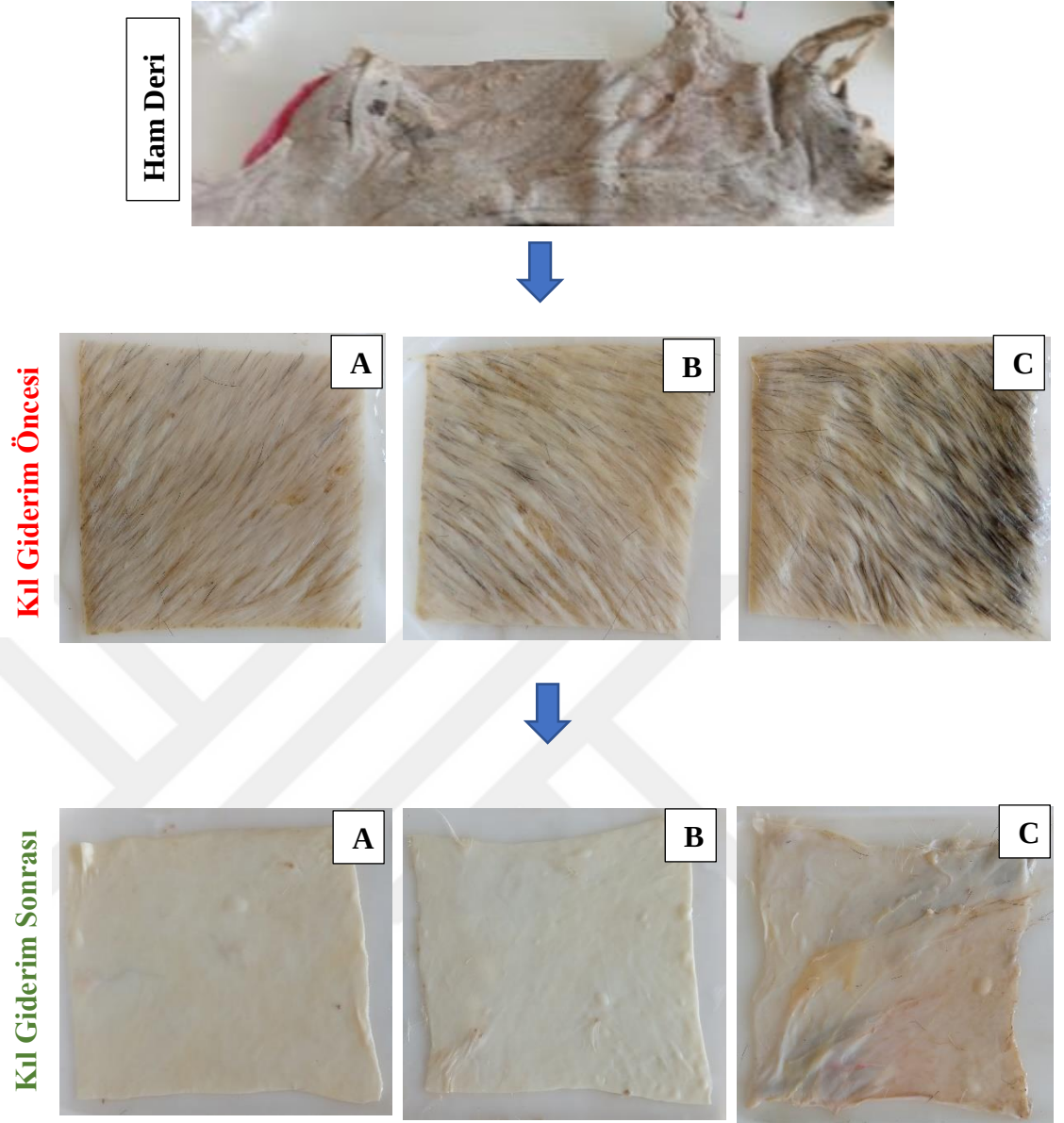
Elde edilen sonuçlar 8 ve 16 saatlik inkübasyon sürelerinin enzimin yüzeydeki fibril paketlerini açarak kıl folikülleri etrafındaki yapısal olmayan proteinleri hidroliz etmek için yeterli olmadığını göstermektedir. Deri yüzeyinin tamamen kıllardan arındırılması için en az 24 saat inkübasyon gerekli olduğu görüldü.

4.4.2. Serbest Enzim, İmmobilize Enzim ve Kimyasal Yöntem ile Kıl Giderimi

Deri işlemede kirletici oluşturan temel süreç deri yüzeyinden fibriler proteinlerin uzaklaştırılmasıdır. Bu süreçte kullanılan kimyasal yöntemler esnasında kullanılan

sülfidler bu kirleticilerin başında gelmektedir. Kimyasal yöntemlere alternatif olarak enzimlerin kullanılmasıyla bu fibriler proteinlerin uzaklaştırılması kimyasal kirletici oluşturmeyen çevre dostu bir yöntem olarak önem kazanmaktadır. Bu amaçla ham keçi derisinden kesilen iki özdeş parçadan birisi kimyasal kıl giderimine diğeri ise enzimatik kıl giderimine tabi tutulmuştur (Şekil 38).

Parçalar öncelikle ağırlıklarının %300 ü kadar suda bekletilerek yüzeylerindeki tuz ve kirliliklerin temizlenmesi sağlandı. Kimyasal işlem ortamı deri ağırlığının %30 u kadar su, %3,5 i kadar sodyum sülfid ve %6 s i kadar kalsiyum oksitten oluşurken enzimatik işlem ortamı deri ağırlığının %30 ukadar su ve 2,5 mg enzim katısından oluşmaktadır. Kimyasal işlem ortam koşulları pH 12,57; 30 °C ve 24 saat inkübasyon iken enzimatik işlem ortam koşulları pH 8,0 ;30 °C ve 24 saat inkübasyon olarak gerçekleşti.



Şekil 38. Serbest Subtilisin Carlsberg (A), immobilize Subtilisin Carlsberg (B) ve geleneksel (kimyasal) yöntem (C) ile kıl giderim akış şeması (kimyasal giderim ortamı: %30 (w/v) su, %3,5 Na₂S, %6 CaO; kimyasal giderim koşulları: pH 12,57, 30 °C, 24 saat; serbest enzim ile giderim ortamı: %30 su, 2,5 mg Subtilisin Carlsberg katısı; immobilize enzim ile giderim ortamı: %30 (w/v) su, 2,5 mg Subtilisin Carlsberg aktivitesine eşdeğer miktarda immobilize enzim, enzimatik giderim koşulları: pH 8,0;30 °C; inkübasyon süresi: 24 saat)

Elde edilen sonuçlar enzimatik kıl gideriminde deride daha pürüzsüz ve yumuşak bir yüzey oluştuğunu göstermektedir. Kimyasal kıl gideriminde ise daha sert ve fibriler bir yüzey olduğu görülmektedir.

Ayrıca hem enzimatik hemde kimyasal işlem ile kıl giderimi sonrası derilerin nihai kullanıma gelene kadar yapılan tüm işlemler deri fabrikasında gerçekleştirilmiş olup elde edilen yüzeyler aşağıdaki gibidir (Şekil 39).

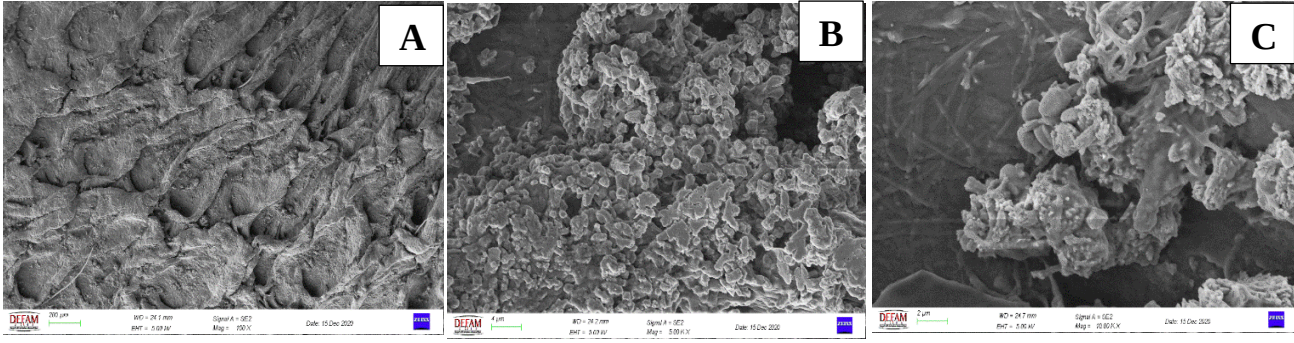


Şekil 39. Serbest Subtilisin Carlsberg (A), immobilize Subtilisin Carlsberg (B) ve geleneksel (kimyasal) yöntem (C) ile kıl giderimi sonrası diğer deri işleme süreçlerinden geçirilen deri yüzeyleri

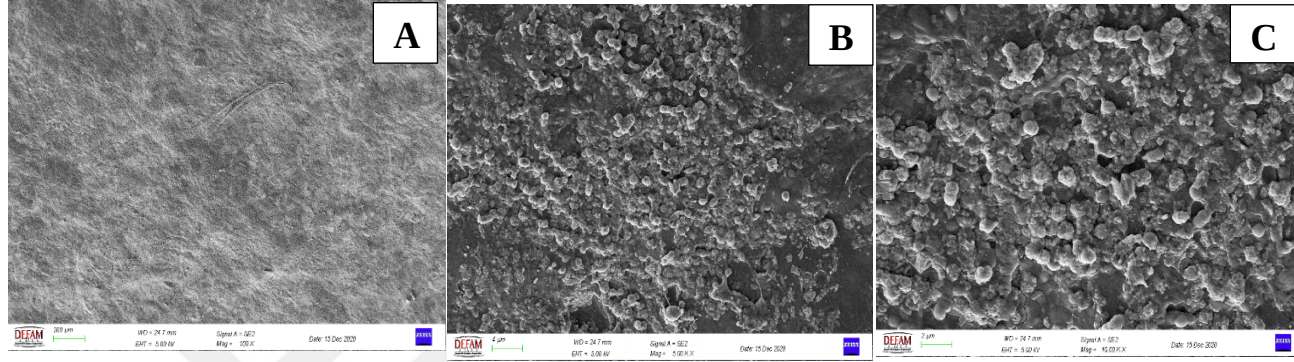
4.4.3. Deri Yüzey Morfolojisinin Karakterizasyonu

Kimyasal ve enzimatik kıl gideriminin moleküler mekanizması birbirinden farklı olduğundan yüzey morfolojisindeki değişimlerde farklı olmaktadır. Bu nedenle her iki yöntemle gerçekleştirilen kıl gideriminin deri yüzeyinde oluşturduğu morfolojik etki, derinin işlenmesinde sonraki aşamaları etkilemekle birlikte endüstriyel kullanıma hazır hale gelecek olan nihai formunu da farklı olarak etkileyecektir. Şekil 40 da kimyasal ve enzimatik kıl giderimi sonrasında deri yüzeylerinin SEM ile çekilmiş görüntüleri görülmektedir.

Kimyasal kıl giderimi



Enzimatik kıl giderimi

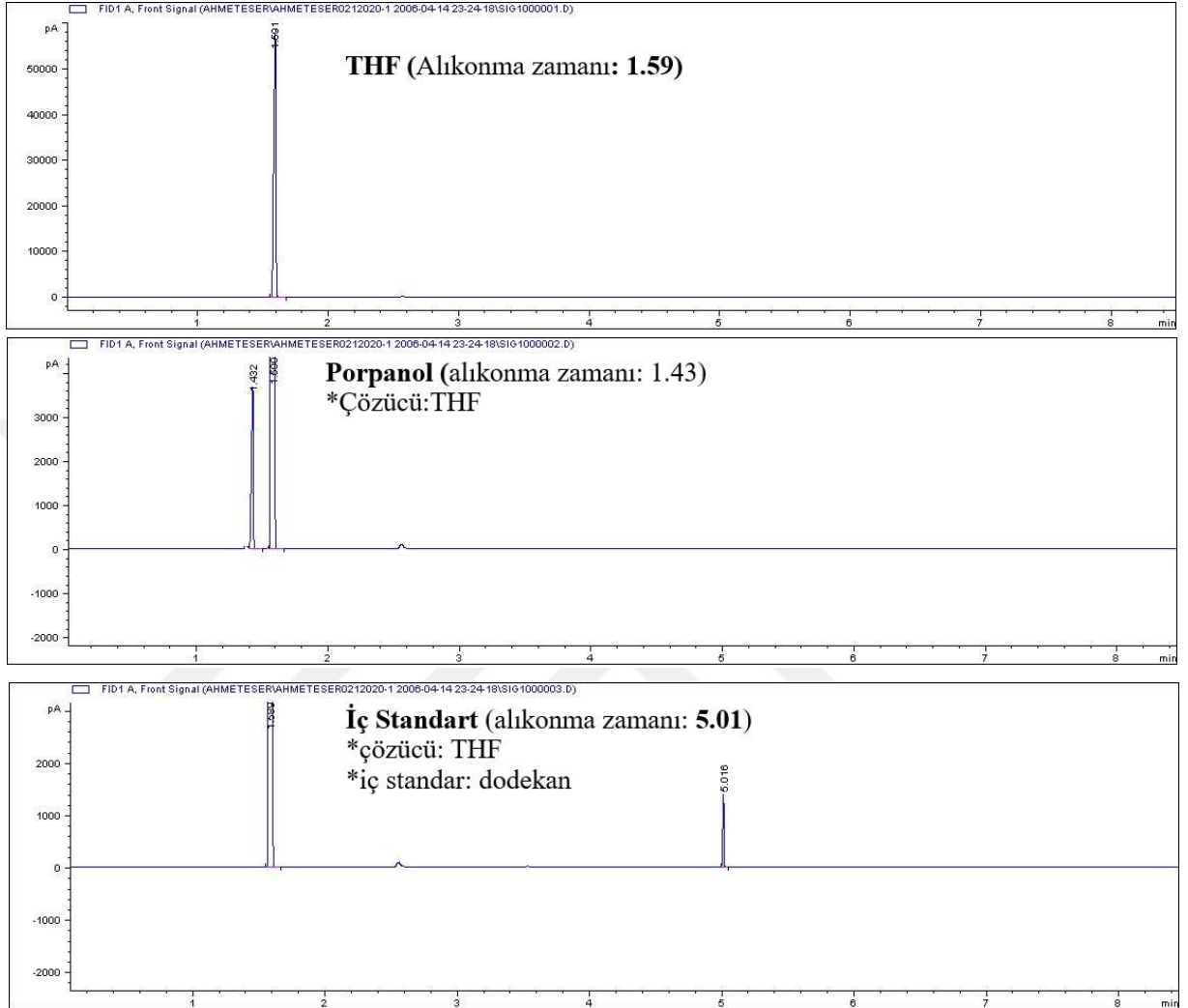


Şekil 40. Kimyasal ve enzimatik kıl giderimi sonrası elde edilen deri yüzeyine ait SEM görüntüleri (A: 250X, B:1000X, C:2000X)

4.5. Propanol Standart Eğrisinin Oluşturulması ve Subtilisin Carlsberg in Transesterifikasyon Aktivitesinin Hesaplanması

Subtilisin Carlsberg in transesterifikasyon aktivitesi THF ortamında N-asetil-L-fenil alanin etil ester (AFEE) ve 1-propanol arasında gerçekleşen enzimatik transesterifikasyon reaksiyonu ile kromatografik olarak belirlendi. Reaksiyon ortamından 24 saat sonra örnek alındı ve içerisine iç standart (dodekan) eklenerek GC ne verildi. Enzimatik transesterifikasyon aktivitesi 1 dakikada harcanan μmol alkol (1-propanol) miktarı olarak belirlendi.

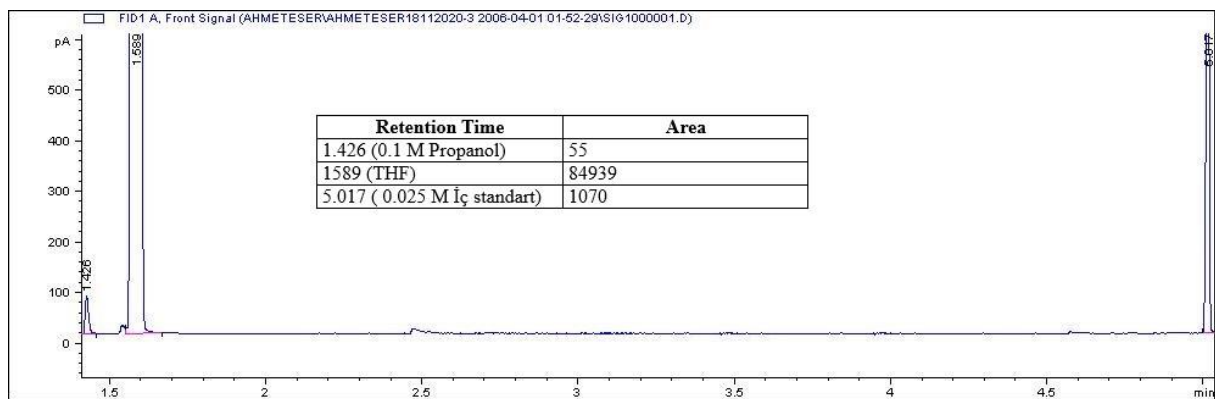
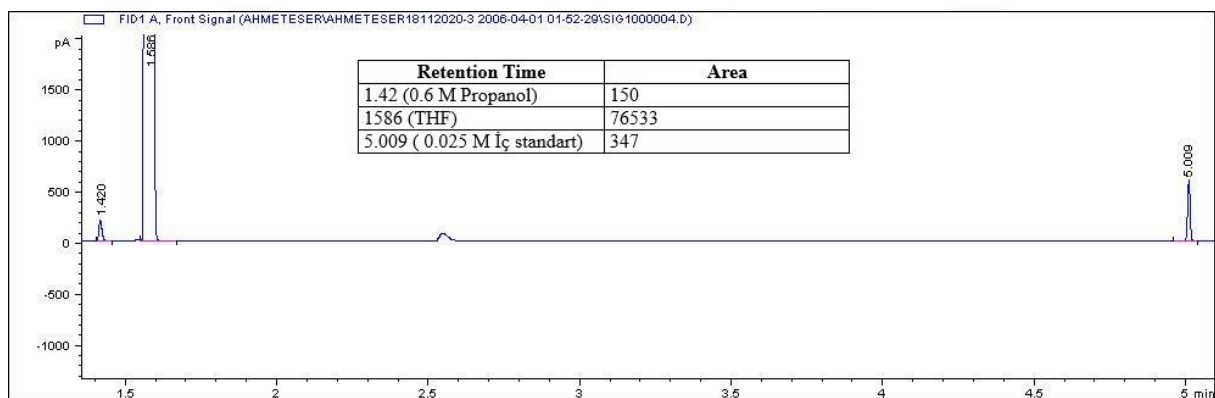
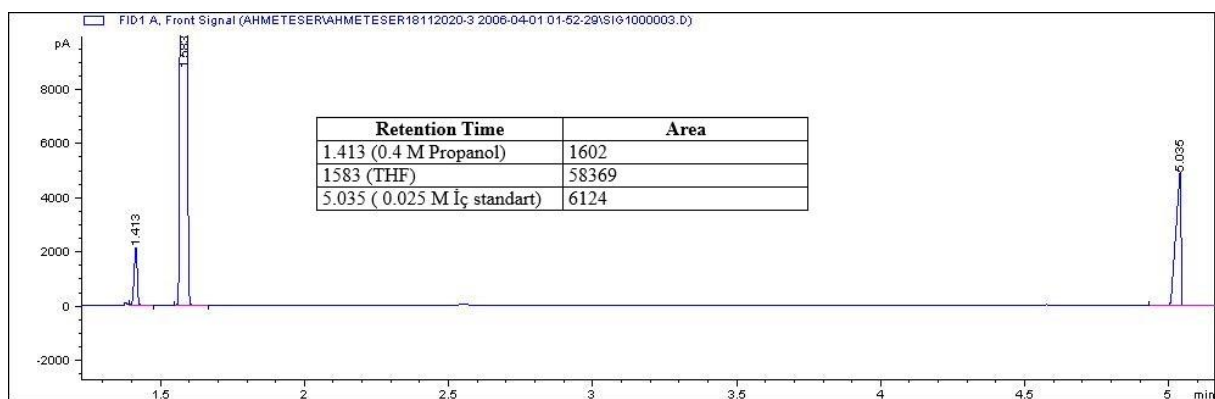
Öncelikle 1-propanol, THF ve dodekan ayrı ayrı GC ye verilerek her birinin kromatogramdaki pik yerleri (alınım zamanı) belirlendi.

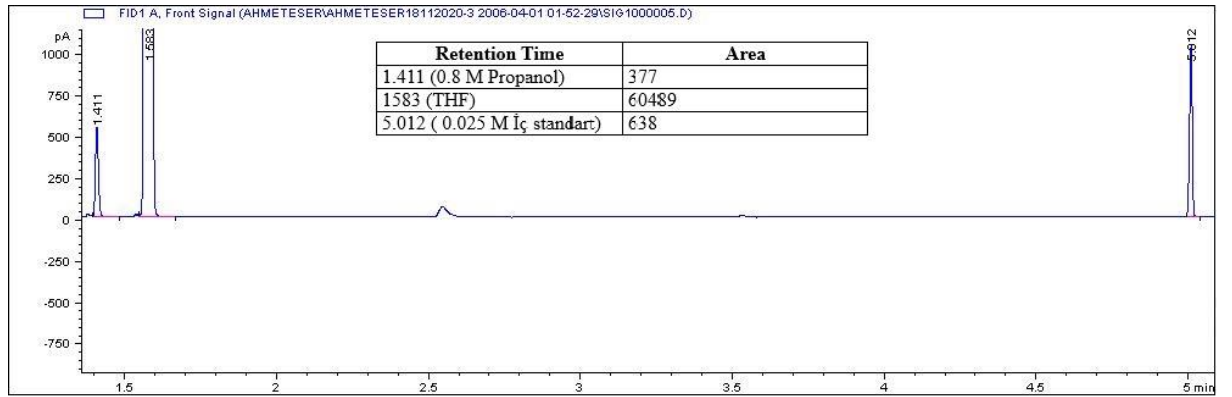
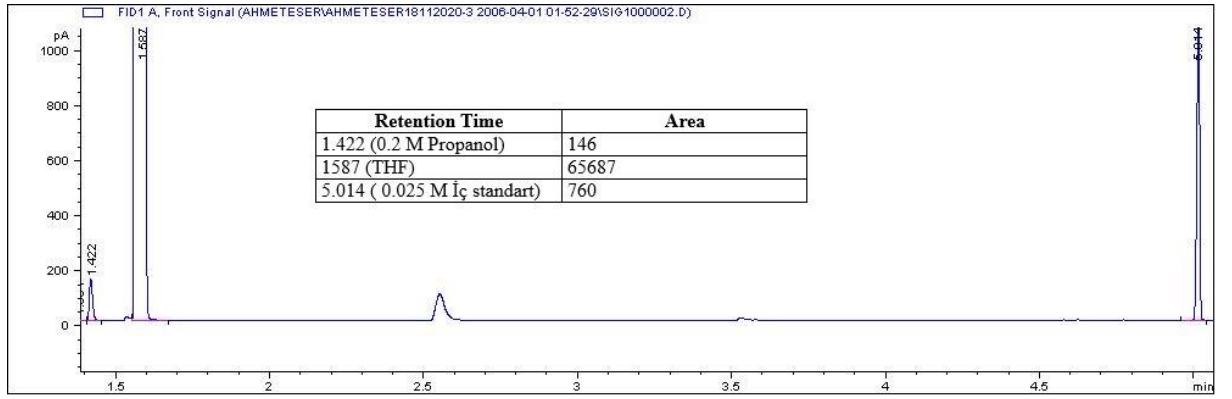


Şekil 41. Transesterifikasyon reaksiyon ortamında bulunan THF (çözgen), 1-propanol (substrat) ve dodekana (iç standart) ait GC Kromatogramları.

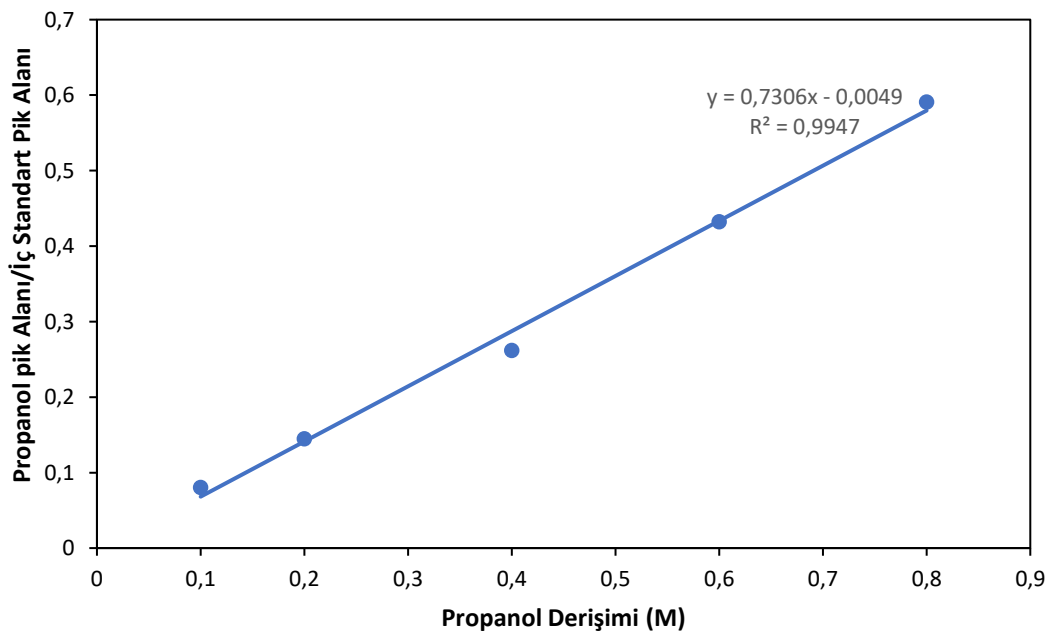
Kromatogramlar incelendiğinde THF e ait pik in 1,59 dk da, propanol e ait pikin 1,43 dk dave dodekan (iç standart) a ait pikin 5.01 dk civarında olduğu görülmektedir.

Standart grafiği oluşturmak için 0,1-0,2-0,4-0,6-0,8 M propanol çözeltileri hazırlanarak içerisinde iç standart (0,025 M) eklenerek GC ye verildi. Propanol ün her bir konsantrasyonu için kromatogramlardan elde edilen propanol ve iç standart alanları belirlendi. Propanol konsantrasyonuna karşılık propanol pik alanı/iç standart pik alanı grafiği çizildi (Şekil 42-43).





Şekil 42. Farklı konsantrasyonlardaki 1-propanol standart çözeltilerine (0,1-0,2-0,4-0,6-0,8 M) ait GC Kromatogramları.



Şekil 43. 1-Propanol standart grafiği.

Subtilisin Carlsberg enziminin aktivitesi kromatografik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için cam tüp içerisinde 5 mL THF ortamı içerisinde 2,5 mg liyofilize Subtilisin Carlsberg enzimi, 20 mM AFEE ve 0,8 M 1-propanol olacak şekilde reaksiyon ortamı oluşturuldu. 90 dakika sonunda reaksiyon ortamında numune alınarak transesterifikasyon aktivitesinin belirlenmesi için GC de analiz edildi. 24 saat sonra alınan numune ise transesterifikasyon yüzdesinin belirlenmesi için GC de analiz edildi.

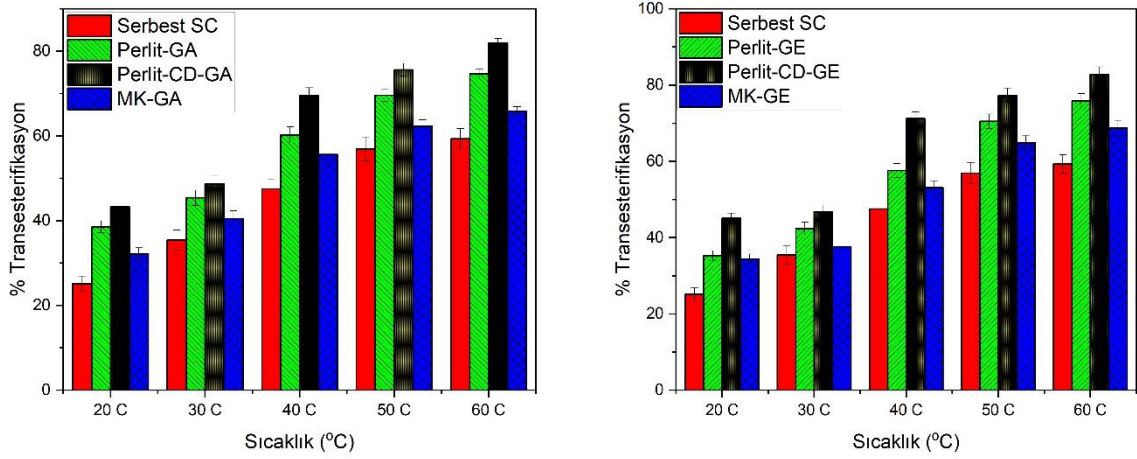
$$\text{Serbest Enzim Aktivitesi (U/mg)} = \frac{\text{harcanan } \mu\text{mol propanol/dk}}{\text{liyofilize enzim miktarı(mg)}}$$

$$\text{İmmobilize Enzim Aktivitesi (U/g taşıyıcı)} = \frac{\text{harcanan } \mu\text{mol propanol/dk}}{\text{immobilize enzim miktarı(g)}}$$

$$\text{Transesterifikasyon Yüzdesi} = \frac{\text{Harcanan 1-propanol (mol)}}{\text{Başlangıç 1-propanol (mol)}} \times 100$$

4.5.1. Transesterifikasyon Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi

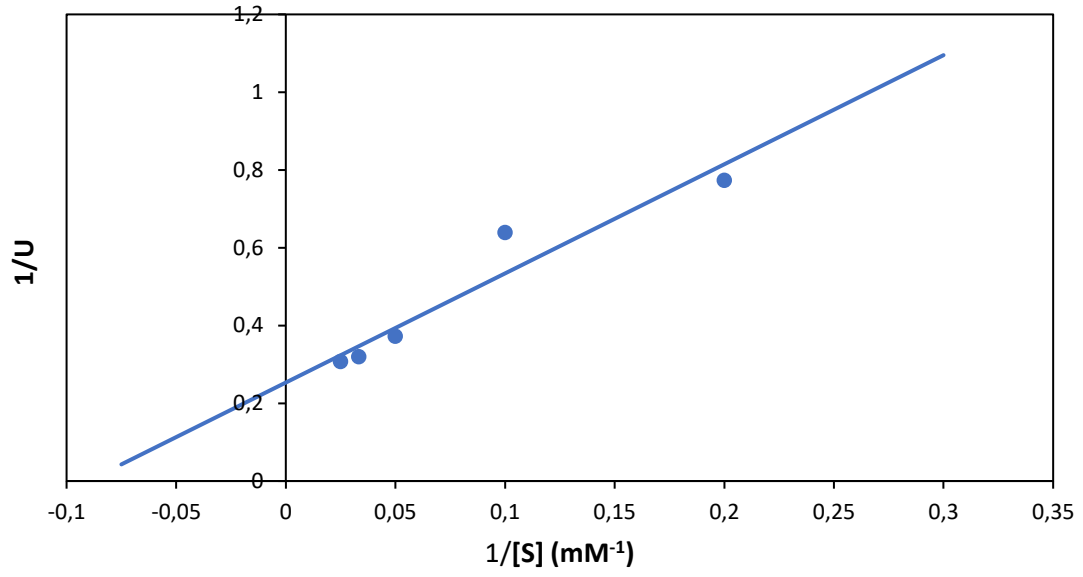
Enzimlerle katalizlenen reaksiyonların hızları sıcaklıkla artmakla birlikte, yüksek sıcaklıklarda enzimlerin protein yapılarından dolayı aktiviteleri azaldıkça bu reaksiyonların hızları azalmaktadır. Reaksiyon hızının maksimuma eriştiği noktadaki sıcaklık derecesine optimum sıcaklık denir. Enzimlerin optimum çalışma sıcaklığının üzerinde denatürasyon başlar. Çalışmada serbest ve immobilize Subtilisin Carlsberg in transesterifikasyon yüzdesi için optimum sıcaklık değeri 50 °C olarak belirlendi (Şekil 44).



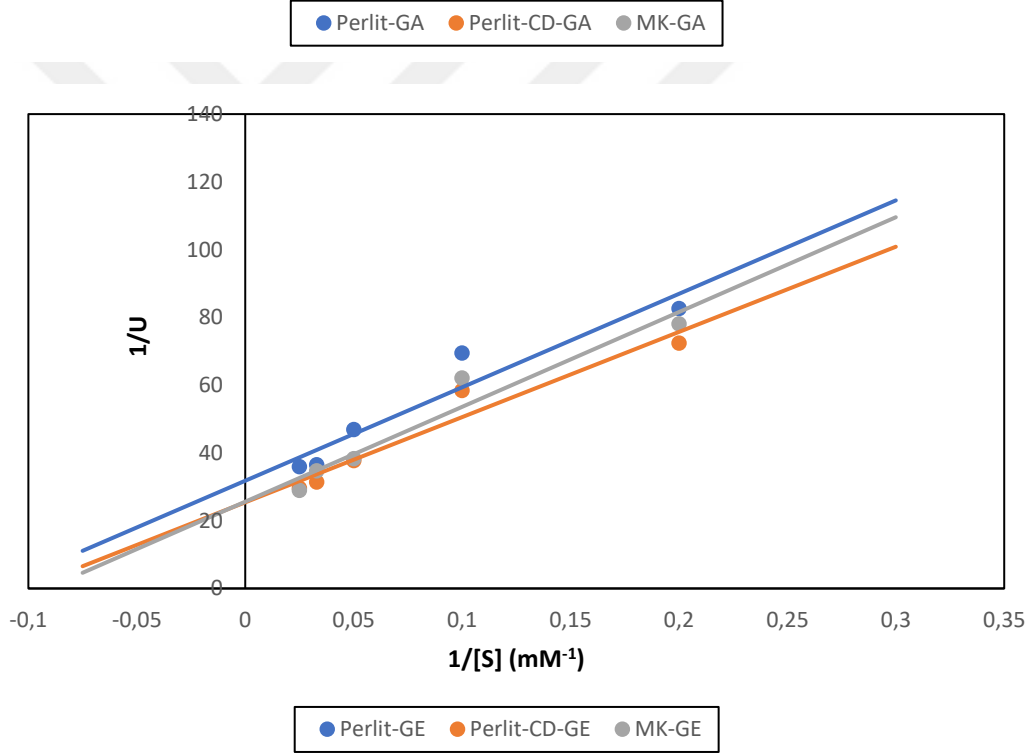
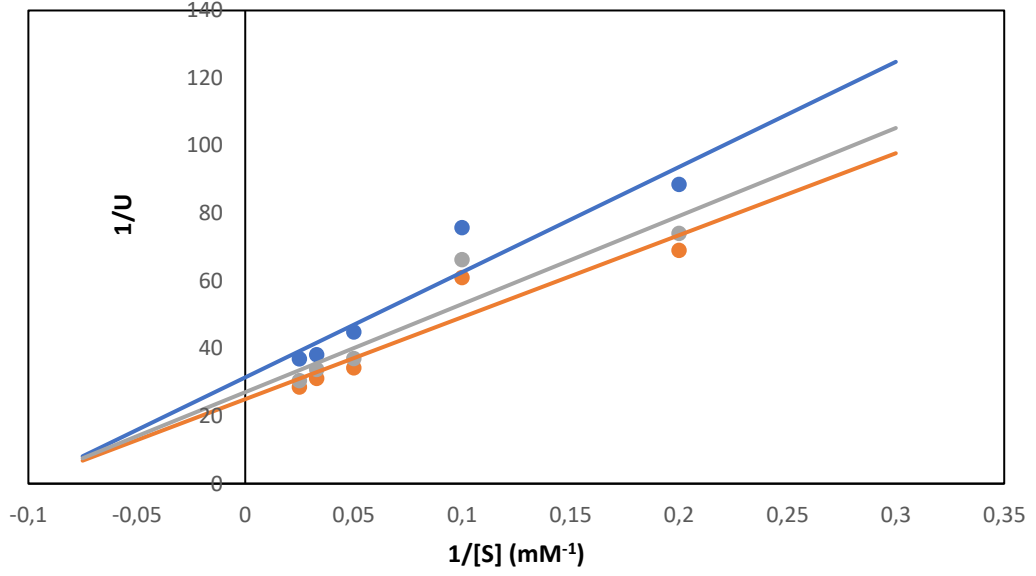
Şekil 44. Sıcaklığın Subtilisin Carlsberg nin transesterifikasyon yüzdesi üzerine etkisi (reaksiyon ortamı: 2,5 mg liyofilize Subtilisin Carlsberg veya 50 mg immobilize enzim; 20 mM AFEE; 0,8 M propanol. Reaksiyon süresi: 24 saat

4.5.2. Transesterifikasyon Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Serbest ve immobilize Subtilisin Carlsberg enzimi ile farklı substrat derişimleri (5-10-20-30-40 mM AFEE) kullanılarak ölçülen aktivite değerleri ile oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği Şekil 45 ve 46 da gösterilmiştir.



Şekil 45. Serbest Subtilisin Carlsberg'in transesterifikasyon aktivitesine ilişkin Lineweaver- Burk grafiği (Reaksiyon ortamı: 5mL THF içerisinde 2,5 mg liyofilize Subtilisin Carlsberg, 5-40 mM AFEE ve 0,8 M 1-propanol; reaksiyon koşulları: pH:8,0;50 °C; inkübasyon süresi: 90 dk)



Şekil 46. İmmobilize Subtilisin Carlsberg'in transesterifikasyon aktivitesine ilişkin Lineweaver- Burk grafiği (Reaksiyon ortamı: 5mL THF içerisinde 50 mg immobilize Subtilisin Carlsberg, 5-40 mM AFEE ve 0,8 M 1-propanol; reaksiyon koşulları: pH:8,0;50 °C; inkübasyon süresi: 90 dk)

Bir enzim için K_M değeri, maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonunu ifade eder. Bunun yanı sıra K_M değeri ne kadar küçükse enzimin substrata ilgisi o kadar yüksek olmaktadır. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde

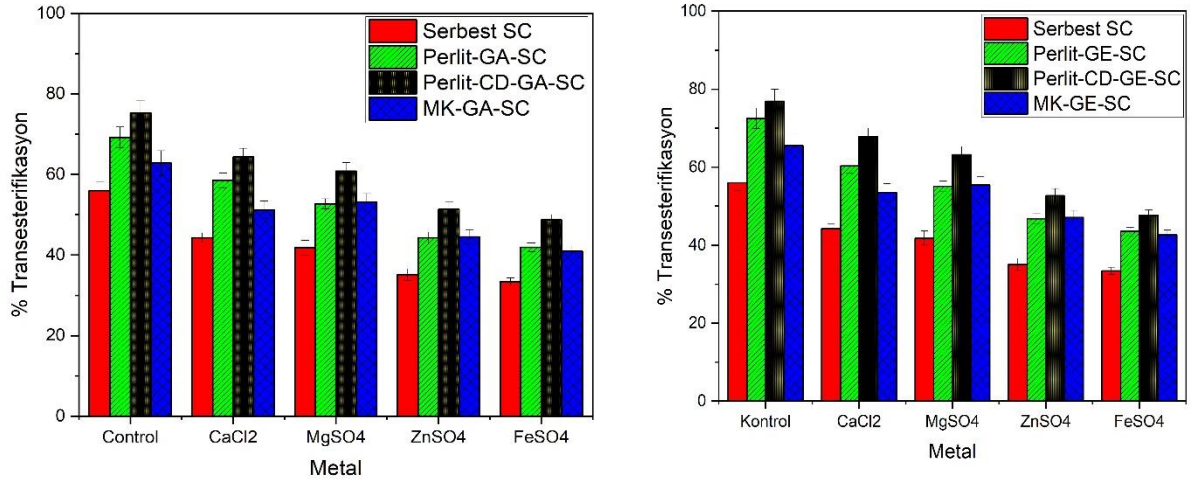
Subtilisin Carlsberg enziminin AFEE ve 1-propanol arasındaki transesterifikasyon reaksiyonu katalizlediği reaksiyona ilişkin serbest ve immobilize enzimin K_M ve V_{max} değerleri Tablo 6 da gösterilmiştir.

Tablo 6. Serbest ve İmmobilize Subtilisin Carlsberg nin transesterifikasyon aktivitesine ilişkin K_M ve V_{max} değerleri

	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/mL}$)
Serbest SC	11,2	3,95
	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/g taşıyıcı}$)
Perlit-GA-SC	20,3	32,2
Perlit-CD-GA-SC	19,7	40,1
MK-GA-SC	19,63	36,9
Perlit-GE-SC	18,68	31,4
Perlit-CD-GE-SC	20,9	39
MK-GE-SC	19,89	39,2

4.5.3. Liyofilizasyon Ortamına Metal İyonu İlavesinin Transesterifikasyon Aktivitesi Üzerine Etkisi

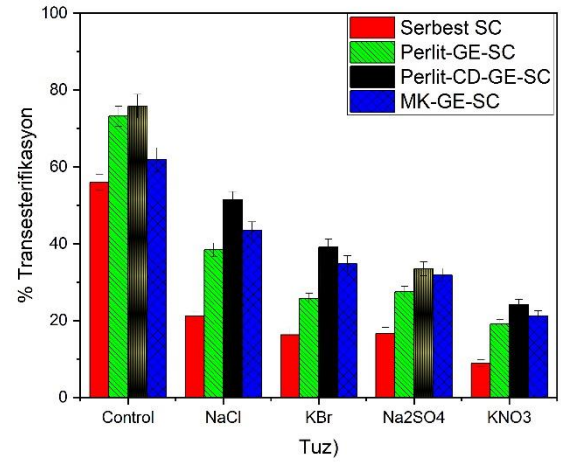
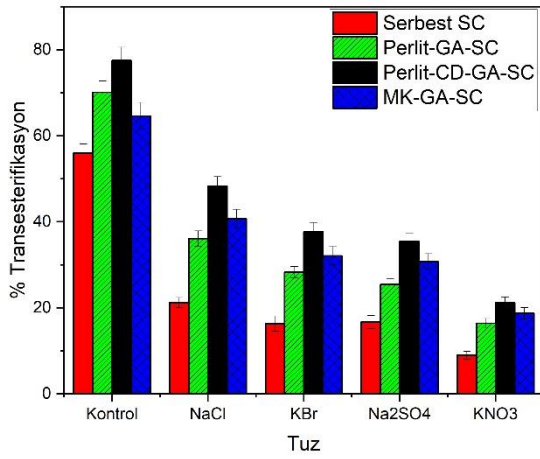
Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ve Fe^{2+} iyonların Subtilisin Carlsberg aktivitesi üzerine etkisini incelenmek amacıyla liyofilizasyon ortamına 5 mM olacak şekilde $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ katısı ilave edilerek metal iyonu ilavesinin transesterifikasyon yüzdesine etkisi de belirlendi (Şekil 47).



Şekil 47. Liyofilizasyon ortamına metal iyonu ilavesinin Subtilisin Carlsberg nin transesterifikasyon yüzdesi üzerine etkisi (reaksiyon ortamı: 2,5 mg Subtilisin Carlsberg veya 50 mg immobilize enzim, 20 mM AFEE, 0,8 M propanol; reaksiyon koşulları: 50 C, reaksiyon süresi: 24 saat)

4.5.4. Liyofilizasyon Ortamına Tuz İlavesinin Transesterifikasyon Aktivitesi Üzerine Etkisi

Cl^- , Br^- , SO_4^{2-} ve NO_3^- iyonların Subtilisin Carlsberg aktivitesi üzerine etkisini incelenmek amacıyla liyofilizasyon ortamına 5 mM olacak şekilde NaCl, KBr, Na_2SO_4 ve KNO_3 katısı ilave edilerek tuz iyonu ilavesinin transesterifikasyon yüzdesine etkisi de belirlendi (Şekil 48).



Şekil 48. Liyofilizasyon ortamına tuz ilavesinin Subtilisin Carlsberg aktivitesi ve transesterifikasyon yüzdesi üzerine etkisi (Reaksiyon ortamı: 2,5 mg liyofilize Subtilisin Carlsberg veya 50 mg immobilize enzim, 20 mM AFEE, 0,8 M propanol; reaksiyon koşulları: 50 °C, reaksiyon süresi: 24 saat)

5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Subtilisin Carlsberg immobilizasyonu için hazırlanan taşıyıcıların SEM görüntüleri incelendiğinde, CS yüzeyinde ağısı bir yüzey görülürken MK yüzeyinde ise ağısı yapı üzerinde kompozit oluşturan magnetit partikülleri görülmektedir. MK-GA ve MK-GE yüzeyleri incelendiğinde ise çapraz bağlayıcıların yüzeyde daha sıkı bir ağ örgüsü oluşturduğu görülmektedir. Yagar ve Balkan [106], Zhang ve arkadaşları [107] ve Wang ve arkadaşları [108] tarafından yapılan çalışmalarda da kitosan yüzeyindeki ağısı polimerik yapılar olduğu ve manyetit partiküllerinin yüzey üzerindeki varlığı SEM ile gösterilmiştir. PE yüzeyi incelendiğinde kırık tabakalı heterojen bir yapı görülmektedir. Perlit-CD-GA ve Perlit-CD-GE yüzeyleri incelendiğinde ise çapraz bağlayıcıların tabaka yüzeylerinde polimerik bir yapı oluşturduğu görülmektedir. Tashnizi ve arkadaşları [109] yaptıkları çalışmada SEM analizi ile asetilkolin estera immobilizasyonu için kullanılan perlitin yüzeyinin kırık tabakalı yapıya sahip olduğunu bildirmişlerdir. Torabi ve arkadaşları [110] da kolesterol oksidaz immobilizasyonu için kullanılan perlit yüzeyinin heterojen dağılmış tabakalardan oluştuğunu yaptıkları SEM analizi ile rapor etmişlerdir. Özmen ve arkadaşları [111] bildirilen bir diğer çalışmada glutaraldehit ile lipaz immobilizasyonu için kullanılan perlit yüzeyindeki polimerik yapılar SEM ile gösterilmiştir. Belyakova ve arkadaşları [112] adsorban olarak kullanmak üzere hazırladıkları β -siklodekstrin modifiyeli perlitin yüzey morfolojisini SEM ile karakterize ederek perlit yüzeyinde β -siklodekstrine ait polimerik yapıların varlığından bahsetmişlerdir.

İmmobilizasyon için hazırlanan taşıyıcıların termal ayrışma profilleri incelendi. CS temelli taşıyıcılar için tüm termal ayrışma profilleri, biri 100°C'den başlayıp diğeri 230°C'de olmak üzere iki ana aşama göstermektedir. 100°C'deki kütle kaybının nedeni fiziksel bağlı suyun olduğu söylenebilir. 230°C'deki kütle kaybı ise hidroksil gruplarının kopmasından kaynaklanabilir. 800°C'deki toplam kütle kayıpları incelendiğinde CS da %57'lik kütle kaybı gözlenirken MK-GA ve MK-GE için kütle kaybının ise %45 civarında olduğu görüldü. PE temelli taşıyıcıların termal ayrışma profilleri incelendiğinde 800 °C deki kütle kayıpları %6 civarında olduğu görülmektedir. Perlit-CD için 250 °C civarında bir ayrışma olduğu görülürken Perlit-CD-GA ve Perlit-CD-GE için ise 250 °C ile birlikte 600 °C civarında da bir ayrışma

profili görülmektedir. 250 °C civarındaki kütle kaybı hidroksil gruplarının kopmasından kaynaklanabilir. 600 °C deki kütle kaybına ise çapraz bağlamadan ve siklodekstrin modifikasyonundan kaynaklanan polimerik yapıların bozunması neden olabilir. Acharyulu ve arkadaşları [113] kitosanın TGA spektrumunun %65'nin 840°C civarında bozunduğunu ve çalışma sonucunda kalan kitosanın %35,07'sinin tortu benzeri formda geri kaldığını rapor etmişlerdir. Shouman ve arkadaşları [114] yaptıkları çalışmada kitosanın 100°C'ye kadar olan sıcaklık aralığında kütle kaybının %5,26 gibi düşük oranda olmasını nemin uzaklaştırılması nedeniyle olduğunu, 216-316 °C civarındaki ikinci aşamada %24,5'luk kütle kaybının depolimerizasyon reaksiyonlarından kaynaklandığını bildirmişlerdir. Ayrıca 316-600°C arasındaki sıcaklıkta ise %10,08'lik bir kütle kaybı olduğunu tespit etmişlerdir. El-Hefian ve arkadaşları [115] yaptıkları çalışmada TGA eğrisinde kitosanın 2 basamakta kütle kaybı gösterdiğini, birinci basamakta 30 ile 145°C arasında nemin buharlaşması nedeniyle %5'lik kütle kaybının olduğunu, ikinci basamağın ise yaklaşık 150°C civarında başladığına ve %47 kütle kaybının olduğunu belirtmişlerdir ve bu kaybın kitosanın dekompozisyonundan kaynaklandığını rapor etmişlerdir. Mohammadi ve arkadaşları [116] tarafından Fe_3O_4 'ün TGA eğrisinde görülen ilk kütle kaybının, 250 °C'den az bir sıcaklıkta fiziksel olarak absorbe edilen suyun uzaklaşması nedeniyle, ikinci kütle kaybının ise sentezi sırasında Fe_3O_4 nanopatikülünün yüzeyine absorbe olan hidroksil gruplarından kaynaklandığı rapor edilmiştir.

GA ve GE ile kitosan ve perlit esaslı taşıyıcılar üzerine Subtilisin Carlsberg immobilizasyonu incelendiğinde kitosan esaslı taşıyıcılara immobilizasyon verimi yaklaşık %60 iken perlit esaslı taşıyıcıların immobilizasyon verimi ise yaklaşık %40 tır. Thakrar ve arkadaşları [117] tarafından yapılan çalışmada proteaz enzimi organik yapılı kitosan ve inorganik yapılı silika üzerine immobilize edilmiş ve immobilizasyon verimi kitosan için %81 ve silika için %37 olarak bulunmuştur. Bu durum organik bir yapıya sahip kitosanın doğal yapısında serbest amino grupları bulunurken inorganik bir yapıya sahip perlit yapısında amino grubu bulunmayıp silanlama ile amino grupları oluşturulmaktadır. Bu nedenle enzimin bağlanmasında rol oynayacak amino grubu yüzdesi kitosanda daha fazla olduğundan immobilizasyon veriminin de daha yüksek olması beklenen bir durumdur.

Serbest ve immobilize Subtilisin Carlsberg in aktivitesi üzerine pH ve sıcaklığın etkisi sonuçları incelendiğinde termofilik ve alkalifik bir bakteriden izole edilen bu enzim aktivitesinin optimum pH ve sıcaklığının sırasıyla 8,0 ve 50 °C olduğu görülmektedir. Farklı taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiş Subtilisin Carlsberg aktivitesinin de optimum pH ve sıcaklığı benzer olarak bulundu. Liu ve arkadaşları [118] tarafından yapılan bir çalışmada selüloz bazlı fonksiyonelleştirilmiş bir taşıyıcıya immobilize edilen subtilisin aktivitesinin optimum pH ve sıcaklığının sırasıyla 8,0 ve 50 °C olduğu belirtilmiştir. Ayrıca Ferreira ve arkadaşları [119] tarafından yapılan çalışmada serbest ve silika türevleri üzerine immobilize edilen Subtilisin Carlsberg aktivitesinin optimum pH ve sıcaklığının sırasıyla 8,0 ve 60 °C olduğu bildirilmiştir. Bir diğer çalışmada Yang ve arkadaşları [120] Subtilisin Carlsberg in maksimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklığı sırasıyla 8,0 ve 60 °C olarak bildirmişlerdir. Yust ve arkadaşları [121] ile birlikte Mahmod ve arkadaşlarında [122] yaptığı çalışmalarda serbest ve bazı taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiş Subtilisinlerin optimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık yine sırasıyla 8,0 ve 50 °C olarak belirtilmiştir. Çalışmamızda gerçekleştirilen optimizasyon çalışması sonucu elde edilen pH ve sıcaklık grafiği incelendiğinde optimum pH ve sıcaklığın altında serbest enzimin immobilize enzime göre aktivitesi daha yüksektir. Bu duruma immobilizasyon esnasında enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanması ile meydana gelen aktivite kaybı neden olabilmektedir. Fakat optimum pH ve sıcaklığın üzerinde ise immobilize enzimin aktivitesini daha etkin ve geniş bir aralıkta sürdürdüğünü söyleyebiliriz. Çünkü enzimin bir taşıyıcı üzerinde bulunması onu sert çevresel koşullara karşı daha dayanıklı hale getirmektedir. Yang ve arkadaşları [123] tarafından yapılan bir çalışmada karboksil fonksiyonlu manyetik boncuklar üzerine immobilize edilen Alkalaz enzimi aktivitesinin optimizasyonu çalışmasında da optimum pH ve sıcaklığın alt bölgelerinde serbest enzim (%60-70) immobilize enzimden (%50-60) daha iyi bir aktive göstermiştir. Bir diğer serbest ve immobilize Subtilisin Carlsberg aktivitesinin optimizasyonu çalışmasında Özbek ve Ünal [124] da optimum pH ve sıcaklıktan düşük pH ve sıcaklıkta serbest enzim (%65) immobilize enzimden (%40) daha iyi aktivite göstermiştir. Immobilizasyon işlemi Subtilisin Carlsberg in endüstriyel uygulamalarda kullanımını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca birçok endüstriyel uygulamadaki alkalen pH ve yüksek sıcaklık gerektiren proseslerde yüksek endüstriyel potansiyelini daha da artırmaktadır.

Her ne kadar enzimin taşıyıcıya kovalent olarak immobilizasyonu enzim aktivitesinde kayıplara sebep olsada enzimin termal kararlılığını, çözelti ortamında serbest olarak bulunan enzime göre ciddi oranda artırmaktadır. Serbest ve immobilize Subtilisin Carlsberg in termal stabilite grafikleri incelendiğinde her ne kadar termal dayanımı yüksek bir enzim olsa da 4 saatin sonunda enzimin aktivitesini %20 civarında sürdürebildiği görülmektedir. Enzim immobilizasyonu ise aktivitenin %60 a kadar korunmasını sağlamaktadır. Ayrıca inorganik yapısı sebebiyle perlit esaslı taşıyıcının aktivitenin korunmasında daha etkili olduğu söylenebilir. Yang ve arkadaşları [123] tarafından çalışmamıza benzer şartlarda serbest ve immobilize Alkalaz (Subtilisin Carlsberg) ile gerçekleştirilen termal stabilite çalışmasında 240 dk sonunda serbest enzimi aktivitesinin %20 sini sürdürürken immobilize enzim ise %40 ını sürdürdüğünü rapor etmiştir. Ayrıca Mahmod ve arkadaşları [122] tarafından yapılan serbest ve immobilize proteaz enzimine ilişkin termal stabilite çalışmasında da serbest enzimin aktivitesi %35 e düşerken immobilize enzimin aktivitesi %50 düştüğü bildirilmiştir.

Sıcaklık kararlılığı immobilize enzimlerin uygulamalarında önemli bir kriter olduğundan bu konu üzerinde fazla sayıda çalışmalar bulunmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda serbest enzimler deaktif olurken, immobilize enzimlerde taşıyıcı genellikle enzim açısından yüksek sıcaklığa karşı koruyucu bir durum sergilemektedir. Immobilizasyon işlemi ile enzimlerin biçimsel esnekliği değişime uğramaktadır. Bu sonuçlar, taşıyıcılar üzerine immobilize edilen Subtilisin Carlsberg in termal stabilitesinin serbest olandan daha yüksek olduğunu göstermektedir. Enzimin taşıyıcıya immobilizasyonu enzimin dayanıklılığını artırır ve bu durum genellikle enzimin artan sıcaklığa karşı kararlılığının artmasını sağlamaktadır. Termal inaktivasyon parametreleri incelendiğinde perlit esaslı taşıyıcı üzerine immobilize edilen Subtilisin Carlsberg in yarı ömrü, serbest Subtilisin Carlsberg ile karşılaştırıldığında yaklaşık 2,5 kat artken kitosan esaslı taşıyıcı üzerine immobilize edilen Subtilisin Carlsberg in yarı ömrü serbest Subtilisin Carlsberg e göre yaklaşık 1,5 kat artmıştır. Bu yarı ömrünün artması, yapının denatürasyona karşı dayanıklılığını desteklemiş olabilecek organik ve inorganik taşıyıcıya kovalent enzim bağlanmasına bağlı olabilir [112-113]. Ayrıca TG eğrilerinde de gösterilmiş olan perlit in kitosan göre daha yüksek termal dayanıma sahip olması taşıyıcı üzerindeki enzimin yarı ömrüne de yansımış olduğu görülmektedir.

Enzim kinetiği çalışmaları farklı substrat konsantrasyonları kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafikleri incelendiğinde Subtilisin Carlsberg in maksimum aktivitesinin yarısına ulaşması için gereken substrat konsantrasyonunun immobilizasyon sonrası arttığı görülmektedir. Bu durumun sebebi enzimin peptit bağlarına ulaşarak hidroliz etme süreci immobilizasyondan sonra değişkenlik göstermesi olarak söylenebilir. Riggers ve arkadaşları [125] tarafından yapılan, *Bacillus lentus* tan izole edilmiş bir proteazın sentetik substrat hidroliz etmesine ilişkin kinetik çalışmada K_M değerinin immobilizasyon sonrası arttığı bildirilmiştir. Ayrıca Ferreira ve arkadaşları [66] tarafından yapılan doğal substrat kazein in serbest Subtilisin Carlsberg ile hidrolizine ilişkin kinetik çalışmada K_M değeri 2,5 mM olarak bulunurken immobilize Subtilisin Carlsberg için 4,3 mM olarak bulunmuştur.

Subtilisin Carslberg in hidroliz aktivitesinin endüstriyel bir uygulaması olarak ham deri yüzeyinden kıl giderimi çalışması yapıldı. Bu çalışmalar serbest enzim, immobilize enzim ve geleneksel kimyasallar kullanılarak 3 grupta gerçekleştirildi. Enzimatik ve kimyasal yöntem ile gerçekleştirilen kıl giderimi sonrası elde edilen deri yüzeylerinin morfolojisi SEM ile incelendiğinde enzimatik yöntemle kıl giderimi yapılmış deri yüzeyinde ayrılmış ve yönlenmiş fibril paketler görülürken kimyasal yöntem ile kıl giderimi yapılmış deri yüzeyinde ise sıkı fibril paketlerin varlığı görülmektedir. Sonuç olarak enzimatik kıl giderimi ile elde edilen yüzeyin daha pürüzsüz ve yumuşak olduğu deri yüzeyi görsellerinde de görülmektedir. Souza ve Gutierrez [126], Paul ve arkadaşları [127], Christopher ve arkadaşları [128] tarafından yapılan enzimatik ve kimyasal kıl giderimi çalışmaları sonucunda da benzer deri morfolojileri görülmektedir. Bu durum enzimin yüzeydeki fibril paketlerinin açılmasında daha başarılı olmasıyla açıklanabilir. Çünkü enzim ile kıl gideriminde enzim kıl folikülleri etrsfindaki yapısal olmayan proteinleri hidroliz ederek kılın serbest kalmasını sağlarken kimyasal kullanılan yöntemde doğrudan kılın sert kimyasallarla deformasyonu sağlanır [128].

İşlemeye uygun bir deri yüzeyi elde etmede kimyasal yöntemle göre daha başarılı bir sonuç veren enzimatik yöntemin ayrıca işleme sürecinde sert kimyasallar kullanılmadığı için pH düşürme gereksinimine ihtiyaç duymaması maliyet düşürme

açısından da onu daha avantajlı hale getirmektedir. Ayrıca kimyasal yöntemde kullanılan CaO ve Na₂S gibi sert kimyasal kullanımı söz konusu olmadığından daha çevreci bir yöntem olabileceği de söylenebilir.

Subtilisin Carlsberg in hidroliz aktivitesi yanı sıra transesterifikasyon aktivitesinin de olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda THF ortamında N-asetil-L-fenil alanin etil ester (AFEE) ve 1-propanol arasında gerçekleşen transesterifikasyon reaksiyonu model alınarak Subtilisin Carlsberg in transesterifikasyon aktivitesi çalışmaları gerçekleştirildi. Aktivite tayini GC ile kromatografik olarak gerçekleştirildi. Enzimin transesterifikasyon aktivitesinin optimum sıcaklığı hidroliz aktivitesinde olduğu gibi 50 °C olarak belirlendi. Shah ve arkadaşları [129] ve Prasad ve Roy [130] tarafından yapılan çalışmalarda Subtilisin Carlsberg ile transesterifikasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiş olup optimum sıcaklık 60 °C olarak bildirilmiştir.

Subtilisin Carlsberg diğer proteazlardan farklı olarak organik çözücü ortamında da aktivitesini sürdürebilmektedir. Bu sebeple organik ortamda gerçekleşen transesterifikasyon aktivitesinin karakterizasyonu için organik çözücü ortamına metal iyonu ve tuz ilavesinin enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Elde edilen sonuçlar metal iyonu ilavesinin transesterifikasyon yüzdesini kontrol grubuna göre %10 civarında azalttığı görülürken tuz ilavesi ile transesterifikasyon yüzdesinde kontrol grubuna göre % 60-80 arasında belirgin bir azalma olduğu görülmektedir. Benzer sonuçlar Tekin [131] tarafından yapılan çalışmada da bildirilmiş olup tuz ilavesi ile aktivite değerlerinin % 70 civarında azaldığı belirtilmiştir. Proteazların stabilitesini koruduğu bilinen, enzimin aktif bölgesinin konformasyonunun yüksek sıcaklıklarda korunmasında önemli işlevi olan ve termal denatürasyona karşı enzimi koruyan metal iyonlarının çözücü ortamında bulunması aktiviteye negatif etkisi olmamaktadır. Tuz ilavesinin ise enzimin ve substratın iyonizasyon durumunda değişikliğe neden olması sonucunda aktivitenin azalması açıklanabilir [132].

Sonuç olarak Subtilisin Carlsberg in alkali ve yüksek sıcaklıkta gösterdiği yüksek aktivitesinin potansiyelini endüstriyel uygulamalara aktarabilmek için Subtilisin Carlsberg immobilizasyonu büyük önem arz etmektedir. Literatürde bu

enzimin immobilizasyonu ile yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Bu çalışmada Subtilisin Carlsberg in farklı taşıyıcılar üzerine immobilizasyonu, immobilize enzimin karakterizasyonu, hidroliz ve transesterfikasyon aktiviteleri detaylı bir şekilde çalışıldı. Serbest ve immobilize enzimin deri endüstrisindeki uygulaması bizzat deri fabrikasında kimyasal yöntemlerle elde edilen derilerle kıyaslanarak işleme tabi tutuldu. Sonuçlar gösterdi ki Subtilisin Carlsberg enzimi deri işlemede hem daha uygun bir yüzey elde edilmesi ile hemde daha çevreci bir yöntem potansiyeli ile etkin bir alternatif olarak ön plana çıkabilir.



KAYNAKLAR

- [1]. Alagöz, D., (2007). β -galaktozidaz ve Glukoz İzomeraz'ın Eupergit Desteğe Kovalent İmmobilizasyonu ve İmmobilize Enzimlerin Laktoz Hidrolizi ve Glukoz İzomerizasyonunda Kullanılması, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [2]. Sümengen, M., (2011). Laktik Asit Bakterilerinden Fitaz Üretimi Ve Endüstriyel Kullanım Olanakları, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [3]. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., (2002). Biochemistry (5Th ed). New York: W.H. Freeman and Co. LOC: Sci and Tech.
- [4]. Özçömlekçi, E., (2006). Proteaz Enziminin Glutaraldehit Kullanarak Kovalent Bağlanma İle İmmobilizasyonunda Optimum Şartların Belirlenmesi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [5]. Alptekin, Ö., (2009). Katalazın Eupergit, Florisil Ve Cam Desteklere Kovalent Olarak İmmobilizasyonu Ve Karakterizasyonu, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [6]. Alpan, L.G., (2008). Bazı ekstrem termofil anaerobik bakterilerin alkali proteazlarının özelliklerinin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [7]. Ahmetoglu, N., Bekler, F.M., Acer, O., Guven, R.G., Guven, K., (2015). Production, purification and characterisation of thermostable metallo-protease from newly isolated *Bacillus* sp. KG., *EurAsian Journal of BioSciences*, 9, 1-11.
- [8]. Venugopal, M., Saramma, A.V., (2006). Characterization of Alkaline Protease from *Vibrio fluvialis* Strain VM10 Isolated from a Mangrove Sediment Sample and its Application as a Laundry Detergent Additive. *Process Biochemistry*, 41, 1239-1245.
- [9]. Michael, G., (2010). Structure, Function and Folding of a Novel Subtilisin Serine Protease. Cardiff University, England.

- [10]. Nilegaonkar, S.S., Zambare, V.P., Kanekar, P.P., Dhakephalkar, P.K., Sarnaik, S.S., (2007). Production and Partial Characterization of Dehairing Protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresource Technology*, 98, 1238-1245.
- [11]. Özbek, B., and Ünal, Ş., (2017). Preparation and characterization of polymer-coated mesoporous silica nanoparticles and their application in Subtilisin immobilization. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 34, 1992-2001.
- [12]. Milena, G., Zuza1, N., Milasinovic, Z., Marko, M., Jonovic Jelena R., Jovanovic, L., (2017) Design and characterization of alcalase–chitosan conjugates as potential biocatalysts. *Bioprocess Biosystem Engineering*. 40, 1713–1723.
- [13]. Kazan, M., (2008). Zorunlu Alkalifilik *Bacillus marmariensis* GMBE 72 Soyundan İzole Edilen Alkalen Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.
- [14]. Özçömlekçi, E., (2006) Proteaz Enziminin Glutaraldehit Kullanarak Kovalent Bağlanması ile İmmobilizasyonunda Optimum şartların Belirlenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [15]. Gençkal, H., (2004). Studies On Alkaline Protease Production from *Bacillus* sp. İzmir Teknoloji Enstitüsü, Biyomühendislik ve Biyoteknoloji Bölümü, İzmir.
- [16]. Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P., (2002). Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, 59, 15–32.
- [17]. Anshu, Y., Caiyun, L., Jiaheng, X., Ping, T., Youfei, C., Yan, W. and Hongbing, C., (2017). Enzymatic characterisation of the immobilised Alcalase to hydrolyse egg white protein for potential allergenicity reduction. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 97, 199–206.

- [18]. Corici, N., August, E., Frissen, D., Carmen, G. B., (2011). Sol–gel immobilization of Alcalase from *Bacillus licheniformis* for application in the synthesis of C-terminal peptide amides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 73, 90–97.
- [19]. Yust, M., Justo, P., María del Carmen, M., Juan María, H., Francisco, M., (2010). Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. *Food Chemistry*, 122, 1212–1217.
- [20]. Ariel, W.J., Chana Isabelle, M., Todd, B., Ronald, J. N., (2006). Granulation of subtilisin by internal gelation of alginate microspheres for application in detergent formulation. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 265–272.
- [21]. Gupta, R., Beg, Q.K., Khan, S., Chauhan, B., (2002b). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology Biotechnology*, 60, 381-395.
- [22]. Hirata, A., Yuki, H., Yuichi, K., Jun, O., Akikazu, S., Kazuyoshi, I., Shigenori, K. and Kazufumi, T., (2013). Enzymatic activity of a subtilisin homolog, Tk-SP, from *Thermococcus kodakarensis* in detergents and its ability to degrade the abnormal prion protein. *BMC Biotechnology*, 7, 13-19.
- [23]. Kumar, C.G., Takagi, H., (1999). Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17, 61-594.
- [24]. Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P., (2002a). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology Biotechnology* 59, 15-32.
- [25]. Fogarty, W.M., Kelly, C.T., (1990). Studies on the thermostability of the α -amylase of *Bacillus caldovelox*. *Microbial en. and biotec.* , 9, 71–132.

- [26]. Ezio, F., Betzaida, C., Angelica, S., Elsa, S., Amaris, F., Eduardo, R., Kai, G., Francesco, S., Gabriel, L.B., (2006). Activation of subtilisin Carlsberg in organic solvents by methyl cyclodextrin: Lyoprotection versus substrate and product-complex effect. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 42, 20–26.
- [27]. Dağışan, L., (1997). Enzimlerin Gıda ve Hayvan Yemi Üretimindeki Uygulamaları-Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar, Marmara Araştırma Merkezi, 14-15.
- [28]. Maurer, K.H., (2004). Detergent proteases. *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 1-5.
- [29]. Linko, Y., Javanainen, P., Linko, S., (1999). Engineering baker's yeast: room for improvement. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 339.
- [30]. Puri. S., Beg. Q.K., Gupta. R., (2002). Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by Response Surface Methodology. *Current Microbiology*, 44 ,286–290.
- [31]. Ghorbel, B., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M., (2003). Stability Studies of Protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*, 3,2 513-518.
- [32]. Anwar, A., Saleemuddin, M., (1998). Alkaline Proteases: A review. *Bioresource Technology*, 64, 175–183.
- [33]. Claus, D., Berkeley, P.H.A., (1986). Genus *Bacillus*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1105–1141.
- [34]. Patel, R., Dodia, M., Singh, S.P., (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkalophilic *Bacillus* sp. Production and optimization. *Process Biochemistry*, 40, 3569-3575.

- [35]. Jelinek, B., Antal, J., Venekei, I., and Graf, L. (2004). Ala226 to Gly and Ser189 to Asp mutations convert rat chymotrypsin B to a trypsinlike protease. *Protein Eng. Des. Sel.* 17, 127–131.
- [36]. Alptekin Ö., (2009). Katalazın Eupergit, Florisil ve Cam Desteklere Kovalent Olarak İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [37]. Çoşkun, G., (2007). Glutatiyon S Transferaz Enziminin Farklı Taşıyıcılarda İmmobilizasyonu ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [38]. Klivanov, A.M., (1983). Immobilized Enzymes and Cells as Practical Catalysts. *Science*, 219, 722-727.
- [39]. Sheldon, R.A., (2012). Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design. *Chemical Social Review*, 41(4), 1437-51.
- [40]. Volesky, B., and Holan, Z.R., (1995). Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress*, 11, 235-250.
- [41]. Inoue, K., Yshizuka, K. and Ohta, K., (1999). Adsorptive separation of some metal ions by complexing agent types of chemically modified chitosan. *Analytica Chimica Acta* ,338, 209-218.
- [42]. Coma, V., Sebiti, I., Pardon, P., Pichavant, F. H. and Deschamps A., (2003). Film properties from crosslinking of cellulosic derivatives with a polyfunctional carboxylic acid. *Carbohydrate Polymers*, 51, 265-271.
- [43]. Shahidi, F., Arachchi Jeon, J.K.V., (1999). Food Applications of chitin and chitosans, *Trends in Food Science &Technology*, 10, 37-51.
- [44]. Kirk, R.E. and Othmer, D.F., (1972). Encyclopedia of Chemical Technology. *Wiley-Interscience Publishers*, 6, 1- 24.

- [45]. Denizci, A.A., Kazan, D., Abeln, E.C.A., Erarslan, A., (2004). Newly Isolated *Bacillus clausii* GMBAE 42: an Alkaline Protease Producer Capable to Grow Under Highly Alkaline Conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 320- 327.
- [46]. Bhaskar, N., Sudeepa, E.S., Rashmi, H.N., Selvi, A.T., (2006). Partial Purification and Characterization of Protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 Isolated from Fish Processing Waste and Its Antibacterial Activities. *Bioresource Technology*, 98, 2758-2764.
- [47]. Salleh, A.B., (2006). Protease:Introduction. Editörler: Salleh, A.B., Rahman, R.N.Z.R.A., Basri, M., New Lipases and Proteases. Nova Bimedical, 23-39, New York.
- [48]. Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(3), 597-635.
- [49]. Gupta, R., Ajay, S., (2011). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications *Enzyme Research*, 2011, 280-696.
- [50]. Kim, S.J., Kim, J.K., Lee, D.U., Kwak, J.H. and Lee, S.M., (2010). *European Journal of Pharmacology*, 635, 188–193.
- [51]. Hayat, M.A., (2000). Principles and techniques of electron microscopy: biological applications, Ed. By M. A. Hayat: 4th edition, 28-42p.
- [52]. Mohammad, B., Shahin, A., Kaveh, N., Seyed-Fakhreddin, T. and Seyed-Omid, R., (2009). Covalent immobilization of *Drosophila* acetylcholinesterase for biosensor applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 52, 257–264.
- [53]. Hulya, Y., and Ugur, B., (2016). Entrapment Of Laurel Lipase in Chitosan Hydrogel Beads. *Artificial Cells, Nanomedicine And Biotechnology*, 45, 864-870

- [54]. Wei-Wei, Z., Xian-Ling, Y., Jun-Qi, J., Na, W., Cheng-Li, H., Xiao-Qi, Yu., (2015). Surfactant-activated magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of *Thermomyces lanuginosus* lipase for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 115, 83–89.
- [55]. Rehman, R., Ahmed, M., Siddique, A., Hasan, F., Hameed, A., Jamal, A., (2017). Catalytic role of thermostable metalloproteases from *Bacillus subtilis* KT004404 as dehairing and destaining agent. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181(1), 434–450.
- [56]. Mohammad, B., Shahin, A., Kaveh, N., Seyed-Fakhreddin, T. and Seyed-Omid, R., (2009). Covalent immobilization of *Drosophila* acetylcholinesterase for biosensor applications. *Biotechnology Applied Biochemistry*, 52, 257–264.
- [57]. Seyed-Fakhreddin, T., Khosro, K., Salehe, G., Nasser, G., Seyed-Omid Ranaei, S., (2007). Covalent attachment of cholesterol oxidase and horseradish peroxidase on perlite through silanization: Activity, stability and co immobilization. *Journal of Biotechnology*, 131, 111–120.
- [58]. Elif Yilmaz, O., Mehmet, S., Mustafa, Y., (2015). Synthesis, characterization and sorption properties of silica modified with some derivatives of cyclodextrin. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 643–656.
- [59]. Oleksandra, S. and Lyudmila, B., (2015). Synthesis, characterization and sorption properties of silica modified with some derivatives of cyclodextrin. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 643–656.

- [60]. Flores-Hernández, CG., Colín-Cruz, A., Velasco Santos, C., Castaño, V.M., Rivera Armenta, J.L., Almendarez-Camarillo, A., (2014). All green composites from fully renewable biopolymers: chitosan-starch reinforced with keratin from feathers. *Polymers*, 6, 686–705.
- [61]. Huang, J., Zhao, R. Wang, H. Zhao, W., Ding, L., (2010). Immobilization of glucose oxidase on Fe₃O₄/SiO₂ magnetic nanoparticles. *Biotechnology Letters*, 32, 817–821.
- [62]. Esam A., Elham S., Elgannoudi Azizah M., Abdul Haamid Y., (2010). Characterization of Chitosan in Acetic Acid: Rheological And Thermal Studies. *Turkish Journal of Chemistry*, 34, 47-56.
- [63]. Mohammad Ali, G., Mina, A., Javad, S., Foram, J., (2016). Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles: An efficient, green and magnetically reusable catalyst for the one-pot synthesis of 14-aryl-14H-dibenzo[a,i]xanthene-8,13-dione derivatives. *Iranian Journal of Catalysis*, 6(2), 758-767.
- [64]. Thakrar, S., Singh, P., (2019). Highly thermostable alkaline protease from a haloalkaliphilic actinobacteria, *Nocardiopsis alba* TATA-5. *Bioresource Technology*, 278, 150–158.
- [65] Jiangling, L., Jianquan, W., Leonidas, G.B. and Dibakar, B., (2001). Activity Studies of Immobilized Subtilisin on Functionalized Pure Cellulose-Based Membranes. *Biotechnology Progress*, 17, 866-871.
- [66]. Ferreira, L., Ramos, M.A, Dordick, J.S., Gil, M.H., (2003). Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21,189-199.
- [67]. Zhen, Y., Michael, D., Robert, A., Fang Xiao, Y. And Alan, J. R., (1996). Polyethylene glycol-induced stabilization of subtilisin. *Enzyme and Microbial Technology*, 1, 82-89.

- [68]. María del, M., Justo, P., María del Carmen, M., Juan María, A., Francisco, M., (2010). Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. *Food Chemistry*, 122, 1212–1217.
- [69]. Mahmood, S., Faridah, Y., Mohammed, S., Soofia, K., (2015). Development of an immobilized biocatalyst with lipase and protease activities as a multipurpose cross-linked enzyme aggregate (multi-CLEA). *Process Biochemistry*, 50, 2144–2157.
- [70]. Yang, A., Caiyun, L., Jiaheng, X., Ping, T., Youfei, C., Yan W., and Hongbing, C., (2017). Enzymatic characterisation of the immobilised Alcalase to hydrolyse egg white protein for potential allergenicity reduction. *Journal Science Food Agriculture*, 97, 199–206.
- [71]. Lin, Y., Liu, X., Xing, Z., Geng, Y., Wilson, J., Wu, D. and Kong, H., (2017). Preparation and characterization of magnetic Fe₃O₄–chitosan nanoparticles for cellulase immobilization. *Cellulose*, 24(12), 5541–5550.
- [72]. Sánchez-Ramírez, J., Martínez-Hernández, J. L., Segura-Ceniceros, P., López, G., Saade, H., Medina-Morales, M. A., Ilyina, A., (2016). Cellulases immobilization on chitosan-coated magnetic nanoparticles: application for Agave Atrovirens lignocellulosic biomass hydrolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(1), 9–22.
- [73]. De Souza, F.R., And Gutterres., M., (2012). Application Of Enzymes In Leather Processing: A Comparison Between Chemical And Coenzymatic Processes. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 29, 473– 481.
- [74]. Tanmay, P., Arijit, J., Amit, K.M., Arpita, M., Pradeep, K., Das, M., Keshab, C.M., (2016). Bacterial keratinolytic protease, imminent starter for NextGen leather and detergent industries. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 3, 8–22.

- [75]. Jayakumar, G., Sivaraman, G., Saravanan, P., Mohan, R., Raghava Rao, J., (2014). Cohesive system for enzymatic unhairing and fibre opening: an architecture towards eco-benign pretanning operation. *Journal of Cleaner Production*, 83, 428-436.
- [76]. Nadiya, K., Punitha, V., Amsamani, S., Rao Jonnalagadda, R., Chandrasekaran B., Thanikaivelan P., (2012). Eco-benign enzymatic dehairing of goatskins utilizing a protease from a *Pseudomonas fluorescens* species isolated from fish visceral waste. *Journal of Cleaner Production*, 25, 27-33.
- [77]. Shah, S., Sharma, A. and Gupta, M.N., (2008). Cross-linked protein-coated microcrystals as biocatalysts in non-aqueous solvents. *Biocatalysis and Biotransformation*, 26, 266-271.
- [78]. Prasad, S., Ipsita, R., (2017). Obtaining a high activity subtilisin preparation by controlled thermal stress in n-octane. *Analytical Biochemistry*, 534, 86-90.
- [79]. Nilgün T., (2008). Türkiye Kaynaklı *Bacillus* Spp.'lerin Alkalen Proteaz Üretim Kapasiteleri ve Enzimlerin Kısmen Karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [80]. Ashraf, N.M., Krishnagopal, A., Hussain, A., Kastner, D., Sayed, A.M.M., Mok, Y.K., Swaminathan, K., Zeeshan, N., (2019). Engineering of serine protease for improved thermostability and catalytic activity using rational design. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 229-237.
- [81]. Hadjidj, R., Badis, A., Mechri, S., Eddouaouda, K., Khelouia, L., Annane, R., Hattab, M.E., Jaouadi, B., (2018). Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A. *International Journal of Biological macromolecules*, 114, 1033-1048.

- [82]. Jeong, Y.J., Baek, S.C., Kim, H., (2018). Cloning and characterization of a novel intracellular serine protease (IspK) from *Bacillus megaterium* with a potential additive for detergents. *International Journal of Biological macromolecules*, 108, 808-816.
- [83]. Gulmez, C., Atakisi, O., Dalginli, K.Y., Atakisi E., (2019). A novel detergent additive: Organic solvent- and thermo-alkaline-stable recombinant subtilisin. *International Journal of Biological macromolecules*, 108, 436-443.
- [84]. Bacha, A.B., Al-Assaf, A., Moubayed, N.M.S. and Abid, I., (2018). Evaluation of a novel thermo-alkaline *Staphylococcus aureus* lipase for application in detergent formulations, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(3), 409-417.
- [85]. Kumar, L., Jain, S.K. and Yadav, L., (2018). Proteases: a beneficial degradative enzyme in therapeutic applications. *International Journal of Scientific Research in Biological Sciences*, 5(4), 114-118.
- [86]. Lakshmi, B.K.M., Muni Kumar, D. and Hemalatha, K.P.J., (2018). Purification and characterization of alkaline protease with novel properties from *Bacillus cereus* strain S8. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 295-304.
- [87]. Lai, J.Y., (2012). Biocompatibility of genipin and glutaraldehyde cross- Linked chitosan materials in the anterior chamber of the Eye. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 10970-10985.
- [88]. Hakala, R., (2013). Crosslinked poly (ester anhydrides) for controlled drug delivery. Aalto University publication series, Finland,
- [89]. Zhang, Y., Ge, J., Liu, Z., (2015). Enhanced activity of immobilized or chemically modified enzymes. *ACS Catalysis*, 5, 4503-4513.
- [90]. Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., Wojcieszynska, D., (2014). Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-Application to oxidoreductases. *Molecules* 19, 8995–9018.

- [91]. Sheldon, R.A., van Pelt S., (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how? *Chemical Society Review*, 42,6223–6235.
- [92]. Kołodziejczak-Radzimska, A., Zdarta, J., Jesionowski, T., (2018). Physicochemical and catalytic properties of acylase I from *Aspergillus melleus* immobilized on amino- and carbonyl-grafted Stöber silica. *Biotechnology Progress* 34, 767-777.
- [93]. Maksim, P., Tarnacka, M., Dzienia, A., Matuszek, K., Chrobok, A., Kaminski, K., Paluch, M., (2017). Enhanced polymerization rate and conductivity of ionic liquid-based epoxy resin. *Macromolecules*, 50, 3262–3272.
- [94]. Wang, W., Zhou, W., Li J., Hao, D., Su, Z., Ma, G., (2015). Comparison of covalent and physical immobilization of lipase in gigaporous polymeric microspheres. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 38, 2107-2115.
- [95]. Kim, H.J., Park, S., Kim, S. H., Kim, J. H., Hoot Kim, H.J., Yang, Y. H., Kan, E., Kim, Y.H., Lee, S.H., (2015). Biocompatible cellulose nanocrystals as supports to immobilize. *Food and Agricultural Organization*, 12, 170–178.
- [96]. Abdeen, Z.I., El Farargy, A.F., Negm, N.A., (2018). Nano composite framework of chitosan/ polyvinyl alcohol/ZnO: preparation, characterization, swelling and antimicrobial evaluation. *Journal of Molecular Liquids*, 250, 335–343.
- [97]. Barbosa, A.I., Castanheira, A.P., Reis, N.M., (2018). Sensitive optical detection of clinically relevant biomarkers in affordable microfluidic devices: Overcoming substrate diffusion limitations. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 258, 313–320.
- [98]. Cooney, M.J., (2017). Kinetic measurements for enzyme immobilization. In: *Enzyme Stabilization and Immobilization*. Humana Press, New York, NY, pp. 215-232.

- [99]. Elwakeel, K.Z., Al-Bogami, A.S., (2018). Influence of Mo (VI) immobilization and temperature on As (V) sorption onto magnetic separable poly p-phenylenediaminethiourea-formaldehyde polymer. *Journal of Hazardous materials*, 342, 335–346.
- [100]. Asmat, S., Anwer, A.H, Husain, Q., (2019). Immobilization of lipase onto novel constructed polydopamine grafted multiwalled carbon nanotube impregnated with magnetic cobalt and its application in synthesis of fruit flavours, *International Journal of Biological macromolecules*, 140, 484–495.
- [101]. Atiroglu, V., (2020). Lipase immobilization on synthesized hyaluronic acid coated magnetic nanoparticle-functionalized graphene oxide composites as new biocatalysts: improved reusability, stability, and activity. *International Journal of Biological macromolecules*, 145, 456–465.
- [102]. Zhou, K., Wu, B., Chai, X., Dai, X., (2021). Co-immobilization of clinoptilolite and nanostructured hydrated ferric-zirconium binary oxide via polyvinyl alcoholalginate covalent cross-linking for simultaneous deep removal of aqueous low-level nitrogen and phosphorus. *Arabian Journal of Chemistry*, 14 (10), 103354.
- [103]. Barzkar, N., (2020). Marine microbial alkaline protease: recent developments in biofilm ideal choice for industrial application. *International Journal of Biological macromolecules*, 161, 1216–1229.
- [104]. Sharma, M., (2019). A review on microbial alkaline protease: an essential tool for various industrial approaches. *Industrial Biotechnology*, 1 (15), 69–78.
- [105]. Sittipol, D., Saelao, P., Lohnoo, T., Lerksuthirat, T., Kumsang, Y., Yingyong, W., Khunrae, P., Rattanarojpong, T., Jongruja, N., (2019). Cloning, expression, purification and characterization of a thermo- and surfactant- stable protease from *Thermomonospora curvata*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19, 101111.

- [106]. Ayalew, S., Murdock, B.K., Snider, T.A., Confer, A.W., (2019). Mannheimia haemolytica Iga-specific proteases. *Veterinary Microbiology*, 239, 108487.
- [107]. Beheshtirouy, S., Mirzaei, F., Eyvazi, S., Tarhriz, V., (2021). Recent advances in therapeutic peptides for breast cancer treatment. *Current Protein and Peptide Science*, 22, 74–88.
- [108]. Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., Kumar, V., (2020). A review on bioactive peptides: physiological functions, bioavailability and safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26, 139-150.
- [109]. Bruno, S., Coppola, D., Di Prisco, G., Giordano, D., Verde, C., (2019). Enzymes from marine polar regions and their biotechnological applications. *Marine Drugs* 17, 544.
- [110]. Martinez, R., Jakob, F., Tu, R., Siegert, P., Maurer, K.H, Schwaneberg, U., (2013). Increasing activity and thermal resistance of *Bacillus gibsonii* alkaline protease (BgAP) directed by evolution. *Biotechnology and Bioengineering*, 110, 711-20.
- [111]. Zucca, P., Sanjust, E., (2014). Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms. *Molecules*, 19, 14139-14194.
- [112]. Gustafsson, H., (2012). Enzyme Immobilization in Mesoporous Silica, Chalmers University of Technology Department of Chemical and Biological Engineering. Master of science in Chemistry, pp.10-12, Gothenburg.
- [113]. Nigam, S., Mehrotra, S., Vani, B., Mehrotra, R., (2014). Lipase immobilization techniques for biodiesel production: An overview, *International Journal of Renewable Energy&Biofuels*, 16.
- [114]. Cardiel, J.J., Zhao, Y., Tonggu, L., Wang, L., Chung, J-H., Shen, A.Q., (2014). Flowinduced immobilization of glucose oxidase in nonionic micellar nanogels for glucose sensing. *Royal Society of Chemistry*, 14, 3912-3916.

- [115]. Welch, M.E., Doublet, T., Bernard, C., Malliaras, G.G., Ober, C.K., (2015). A glucose sensor via stable immobilization of the GOx enzyme on an organic transistor using a polymer brush. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 53,372-377.
- [116]. Barbosa, O., Torres, R., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R., (2013). Heterofunctional supports in enzyme immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. *Biomacromolecules*, 14, 2433-2462.
- [117]. Carlsson, N., Gustafsson, H., Thörn, C., Olsson, L., Holmberg, K., Akerman, B., (2013). Enzymes immobilized in mesoporous silica: a physical–chemical perspective, *Advanced Colloid Interface Science*, 205, 339.
- [118]. Pathak, S., Jain, K., Kumar, P., Wang, X., and Pant, R., (2019). Improved thermal Performance of Annular Fin-Shell Tube Storage System Using Magnetic Fluid. *Appl. Energ.* 239,1524-1535.
- [119]. Ansari S., Ruffinatti E.F., Stura I., Argenziano M. and Abollino O., (2019) Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Functionalization for Biomedical Applications in the central Nervous System. *Materials*, 12, 465.
- [120]. Mohamed, A. E.-M., & Mohamed, M. (2019). Nanoparticles: Magnetism and Applications. *Magnetic Nanostructures*, 1–12.
- [121]. Ari B., Yetiskin B., Okay O., and Sahiner, N., (2020). Preparation of dextran cryogels for separation processes of binary dye and pesticide mixtures from aqueous solutions. *Polymer Engineering & Science*, 60(8), 1890–1901.
- [122]. Askaripour H., Vossoughi M., Khajeh K., and Alemzadeh I., (2020). Examination of chondroitinase ABC I immobilization onto dextran-coated Fe₃O₄ nanoparticles and its invitro release. *Journal of Biotechnology*, 309, 131–141.

- [123]. Bashir, N., Sood, M., & Bandral, J.D., (2020). Enzyme immobilization and its applications in food processing: A review. *International Journal of Chemical Studies*, 8(2), 254–261.
- [124]. Boudrant, J., Woodley, J. M., and Fernandez-Lafuente, R., (2020). Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. *Process Biochemistry*, 90, 66–80.
- [125]. Demirci S., and Sahiner N., (2021). Superporous neutral, anionic, and cationic cryogel reactors to improved enzymatic activity and stability of α -Glucosidase enzyme via entrapment method. *Chemical Engineering Journal*, 409, 128233.
- [126]. Dmitry B., (2020). Gold nanoparticles incorporated into cryogel walls for efficient nitrophenol conversion. *Journal of Cleaner Production*, 247, 119089.
- [127]. Girelli, A.M., Quattrocchi, L. and Scuto, F.R., (2020). Silica-chitosan hybrid support for laccase immobilization. *Journal of Biotechnology*, 318, 45–50.
- [128]. Qiu, B., Shi, Y., Yan, L., Wu, X., Zhu, J., Zhao, D., Khan, M.Z.H. and Liu, X., (2020). Development of an on-line immobilized α -glucosidase microreactor coupled to liquid chromatography for screening of α -glucosidase inhibitors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 180, 113047.
- [129]. Saniner, N., Suner, S.S. and Tosunoglu, M., (2020). Preparation of Macroporous Carboxymethyl Cellulose Cryogels and Its Blood Compatibility. *MRS Advances*, 5(16), 825–833.
- [130]. Falahati, M., (2020). Enzyme immobilization onto the nanomaterials: Application in enzyme stability and prodrug-activated cancer therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143, 665–676.
- [131]. Cho, S.J., (2019). Primary structure and characterization of a protease from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from meju, a traditional Korean soybean fermentation starter. *Process Biochemistry*, 80, 52–57.

[132]. Ashraf, N.M., Krishnagopal, A., Hussain, A., Kastner, D., Sayed, A.M.M., Mok, Y.K., Swaminathan, K., Zeeshan, N., (2019). Engineering of serine protease for improved thermostability and catalytic activity using rational design. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 229-237.

