



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**SELÜLAZ ENZİMİNİN SULU İKİLİ-FAZ
EKSTRAKSİYON SİSTEMLERİ İLE
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

Yeliz TÜRKEL

Biyokimya Anabilim Dalı

İzmir
2021

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

**SELÜLAZ ENZİMİNİN SULU İKİLİ-FAZ
EKSTRAKSİYON SİSTEMLERİ İLE
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Yeliz TÜRKEK

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Seçil ÖNAL

Biyokimya Anabilim Dalı

Biyokimya Yüksek Lisans Programı

İzmir

2021

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

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

02/08/2021

Yeliz TÜRKEL



ÖZET**SELÜLAZ ENZİMİNİN SULU İKİLİ-FAZ EKSTRAKSİYON
SİSTEMLERİ İLE SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

TÜRKEL, Yeliz

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Seçil ÖNAL

Ağustos 2021, 175 sayfa

Selülaazlar (endoglukanaz, ekzoglukanaz ve β -glukozidaz, EC 3.2.1.4) endüstriyel alanda özellikle tekstil, kâğıt, deterjan ve gıda endüstrisinde kullanılan hidrolitik enzimlerdir. Protein ve enzim saflaştırılması işlemlerinde kullanılan pek çok biyokimyasal izolasyon ve saflaştırma metodu mevcut olmasına rağmen afiniteye dayalı yeni bir teknik olan sulu ikili-faz sistemleri (Aqueous two-phase systems, ATPS) son yıllarda enzim saflaştırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, selülaaz enzimi bezelyeden (*Pisum sativum*) ekstrakte edilerek PEG/Tuz sulu ikili faz sistemi ile saflaştırıldı ve karakterize edildi. Sulu ikili-faz sisteminin optimizasyonu gerçekleştirilmiş, enzim aktivitesine etki eden bazı parametrelerin etkisi incelenerek kararlılık testleri (termal, pH, depo) yapılmıştır. Enzim aktivitesi dinitrosalisilik asit (DNS) metodu ile, protein tayini ise Bradford metodu ile gerçekleştirilmiştir.

%15 (w/w) PEG-6000, %10 (w/w) Na₂SO₄ (pH 6,0, 25 ° C) kullanılarak hazırlanan sulu ikili-faz sisteminde selülaaz enzimi tuzca zengin alt fazda toplandı ve 2 kat saflaştırıldı. Enzimin optimum pH ve sıcaklığı ise sırasıyla pH 4.5 ve 55° C olarak belirlendi. Enzimin K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 1,7 g/mL ve 37,2 U olarak belirlendi. Polimer-tuz tabanlı ATPS ile saflaştırılan bezelye selülaazı geniş bir pH ve sıcaklık aralığında oldukça kararlı bir enzimdir. Geleneksel metodlara kıyasla, selülaazın saflaştırılmasında kullanılan bu tek adımlı ekstraksiyon metodu basit, ekonomik ve etkili bir metod olup hazırlanan enzim preparatı ise sahip olduğu katalitik özellikleri bakımından gıda ve yem sanayindeki uygulamalarında kullanılabilecek uygun bir preparattır.

Anahtar kelimeler: Selülaaz, *Pisum sativum*, Sulu İkili-Faz Sistemleri (ATPS), Enzim Saflaştırma, Enzim Karakterizasyonu.



ABSTRACT**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CELLULASE
ENZYME BY AQUEOUS TWO-PHASE EXTRACTION SYSTEMS**

TURKEL, Yeliz

Master of Science Thesis, Biochemistry Department

Supervisor: Prof. Dr. Seçil ÖNAL

August 2021, 175 pages

Cellulases (endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidase, EC 3.2.1.4) are hydrolytic enzymes that used in the industrial area, especially in the textile, paper, detergent and food industry. Although there are many biochemical isolation and purification methods used in protein and enzyme purification processes, Aqueous two-phase systems (ATPS), a new technique based on affinity, has been frequently used in enzyme purification in recent years.

In this study, cellulase was extracted from pea (*Pisum sativum*) and purified by using a PEG/Salt aqueous two-phase system and characterized. Optimization of the aqueous two-phase system was carried out and stability tests (thermal, pH and storage) were performed by examining the effect of some parameters affecting enzyme activity. The enzyme activity and protein amount were determined by the dinitrosalicilic acid and Bradford methods, respectively.

The cellulase enzyme was partitioned in the salt-rich bottom phase of % 15 (w/w) PEG-6000, % 10 (w/w) Na₂SO₄ (pH 6.0, 25⁰ C) aqueous two-phase system and purified with 2 fold. The optimum pH and temperature were determined as to be pH 4.5 and 55⁰ C, respectively. The K_M ve V_{max} values were found as 1,7 g/mL and 37,2 U, respectively. The pea cellulase purified with a polymer-salt based ATPS is a very stable enzyme over a wide range of pH and temperature. Compared to the traditional methods this single-step extraction method used in purification of cellulase is a simple, economical and effective method. The enzyme is a suitable preparation that can be used in food and feed applications due to its catalytic properties.

Keywords: Cellulase, *Pisum sativum*, Aqueous Two-Phase Systems (ATPS), Enzyme Purification, Enzyme Characterization

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, selüloz enzimi bezelyeden (*Pisum sativum*) ekstrakte edilerek PEG/Tuz sulu ikili-faz sistemi ile saflaştırıldı ve karakterize edildi. Sulu ikili-faz sisteminin optimizasyonu gerçekleştirilmiş, enzim aktivitesine etki eden bazı parametrelerin etkisi incelenerek kararlılık testleri (termal, pH, depo) yapılmıştır. Enzim aktivitesi dinitrosalisilik asit (DNS) metodu ile protein tayini ise Bradford metodu ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan PEG/Tuz sulu ikili faz sistemleri tek adımda saflaştırma uygulamaları için uygun bir yöntemdir. Hazırlanan selüloz preparatının ise pek çok endüstriyel alanda kullanıma uygun olması amaçlanmıştır.

Bu çalışmamın gerçekleştirilmesindeki desteklerinden dolayı danışmanım Prof. Dr. Seçil ÖNAL'a, bu süreçte yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen değerli aileme ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

İZMİR

02/ 08/ 2021

Yeliz TÜRKEL



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇ KAPAK.....	ii
KABUL ONAY SAYFASI.....	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Glikozidazlar.....	2
1.1.1 Selülazlar ve selülazların biyokimyası	5
1.1.2 Selülaz sistemi enzimleri	13
1.1.3 Selülazların katalitik mekanizması	16
1.1.4 Sinerjizm.....	21

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.1.5 Selülozların izolasyonu ve saflaştırılması	24
1.1.6 Selülozların fiziksel özellikleri.....	26
1.1.7 Selülozların kinetik özellikleri	28
1.1.8 Selülozların uygulama alanları.....	41
2. SULU İKİLİ-FAZ SİSTEMİ (ATPS).....	47
2.1 Faz Diyagramları.....	49
2.1.1 Binodiyal eğri.....	50
2.1.2 Tie –line hatları	51
2.2 Dağılım Katsayısı (K)	53
2.3 Dağılım Mekanizması	54
2.4 Protein Dağılımını Etkileyen Parametreler	55
2.4.1 Polimer konsantrasyonu ve molekül kütlesinin etkisi.....	57
2.4.2 Tuz türü ve konsantrasyonunun etkisi	58
2.4.3 pH etkisi	60
2.4.4 Sıcaklığın etkisi.....	60

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4.5 Hidrofobik etkileşimler.....	60
2.4.6 Protein konsantrasyonunun etkisi	61
2.4.7 Zamanın etkisi	61
2.4.8 Düşük molekül kütleli maddelerin etkisi.....	61
2.5 Sulu İkili-Faz Sisteminin Uygulama Alanları	62
3. MATERYAL VE METOD	69
3.1 Materyal.....	69
3.2 Selülaz Aktivitesi Tayini	69
3.3 Protein Tayini	71
3.4 Sulu İkili-Faz Sistemi (ATPS) ile Selülazın Bezelyeden (<i>Pisum Sativum</i>) İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	72
3.4.1 Sulu ikili-faz sisteminin hazırlanması	73
3.4.2 Dağılma parametrelerinin belirlenmesi	74
3.5 Bezelye (<i>Pisum Sativum</i>) Selülazının Karakterizasyonu.....	76
3.5.1 pH etkisi.....	76
3.5.2 Sıcaklık etkisi.....	76

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.5.3 Substrat konsantrasyonu etkisi.....	76
3.5.4 Efektör türü ve konsantrasyonunun etkisi.....	77
3.6 Kararlılık Testleri.....	77
3.6.1 Termal kararlılık	77
3.6.2 pH kararlılığı	79
3.6.3 Depo kararlılığı	80
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	82
4.1 Selülazın Bezelyeden (<i>Pisum sativum</i>) İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması..	82
4.2 Sulu İkili-Faz Sistemi (ATPS) ile Bezelye (<i>Pisum sativum</i>) Selülazının Saflaştırılması.....	83
4.2.1 Tuz türünün belirlenmesi	84
4.2.2 PEG molekül kütlelerinin belirlenmesi	87
4.2.3 PEG (6000) konsantrasyonunun belirlenmesi.....	91
4.2.4 Na ₂ SO ₄ konsantrasyonunun belirlenmesi	93
4.2.5 pH etkisinin belirlenmesi	95
4.2.6 Selülaz konsantrasyonunun dağılıma etkisi	98

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.2.7 Optimize edilmiş sistemin tekrarlanabilirliği	101
4.2.8 Büyük ölçekli sulu ikili-faz sistemi	102
4.3 Bezelye (<i>Pisum sativum</i>) Selülazının Karakterizasyonu	105
4.3.1 Selülaz aktivitesine pH etkisi.....	105
4.3.2 Selülaz aktivitesine sıcaklığın etkisi	106
4.3.3 Selülaz aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisi.....	108
4.3.4 Efektör türü ve konsantrasyonunun etkisi	110
4.4 Kararlılık Testleri.....	112
4.4.1 Selülazın termal kararlılığı	112
4.4.2 Selülazın pH kararlılığı.....	115
4.4.3 Selülazın depo kararlılığı.....	117
4.5 Genel Değerlendirme.....	118
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	122
TEŞEKKÜR	174
ÖZGEÇMİŞ.....	175



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Çeşitli substratların glikozil hidrolazlar tarafından hidrolizi.....	4
Şekil 1.2 Aile 6 ve 7 glikozil hidrolazlarının katalitik alanlarının temel katlanmalarının ile β tabakaların ve heliks yapılarının (kırmızı) gösterimi	5
Şekil 1.3 Selülozun selülaz enzim sistemi ile glukozu hidrolizi.....	6
Şekil 1.4 (a) ve (b) farklı açılardan <i>H. jecorina</i> Cel12A'nın kristal yapısı	8
Şekil 1.5 Endoglukanazın (EGL 2) 3 boyutlu yapısı.....	9
Şekil 1.6 Endoglukanazın (EGL 2) aminoasit dizilimi.....	9
Şekil 1.7 Ekzoglukanaz I (CBH I)'in 3 boyutlu yapısı.....	10
Şekil 1.8 Ekzoglukanaz I (CBH I)'in aminoasit dizilimi	10
Şekil 1.9 Selülazın 3 boyutlu yapısındaki farklı alanların gösterimi.....	11
Şekil 1.10 Kompleks olmayan selülazlarla gösterilen çoklu domainlerin organizasyonu	12
Şekil 1.11 Endoglukanazın yapısı A: <i>H. insolens</i> ' den elde edilen endoglukanaz V (Cel45A)'in yapısı.	14
Şekil 1.12 Sellobiyohidrolazın yapısı.....	15
Şekil 1.13 <i>Fervidobacterium islandicum</i> β -glukozidazının 3 boyutlu yapısı.....	16
Şekil 1.14 Selülozun selülaz enzim sistemi ile hidrolizi	17

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.15 <i>Trichoderma harzianum</i> endoglukanaz 3'ün (Eg3) kristal yapısı, yapısal organizasyonu ve substrat tanıma bölgeleri	18
Şekil 1.16 (a) Retansiyon mekanizması (b) İnversiyon mekanizması	19
Şekil 1.17 <i>Clostridium thermocellum</i> sellobiyohidrolazının (CelS) inversiyon mekanizması ile selooligosakkarit hidroliz mekanizması.....	20
Şekil 1.18 Kompleks olmayan selülaz sistemi tarafından selülozun enzimatik degradesyonunun şematik gösterimi	21
Şekil 1.19 Çok işlevli bir selülazın varsayımsal etki mekanizması	23
Şekil 1.20 <i>C. thermocellum</i> 'a ait selülozomun selüloz üzerindeki etkisi	28
Şekil 1.21 Selülozun yapısal olarak tekrarlayan sellobiyoz birimleri.....	28
Şekil 2.1 Faz diyagramları	50
Şekil 2.2 Turbidometrik titrasyon ve cloud-point metodları.....	51
Şekil 2.3 Tie –line hatları.....	52
Şekil 2.4 PEG/Tuz sistemlerinde biyomoleküllerin dağılması	56
Şekil 2.5 PEG/Dekstran sistemlerinde biyomoleküllerin dağılması	57
Şekil 2.6 Sulu ikili-faz sistemi ile DNA izolasyonu	64
Şekil 2.7 Sulu ikili-faz sistemiyle membran proteinin izolasyonu	65

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.8 Sürekli karıştırılmalı kontaktör.....	67
Şekil 3.1 DNS yönteminin prensibi.....	70
Şekil 3.2 Selülozun selülaz ile hidroliz reaksiyonu.....	70
Şekil 4.1 % 15 (w/v) PEG / % 10 (w/v) Na ₂ SO ₄ sisteminde PEG molekül kütlelerinin protein dağılıma katsayısına (K _p) etkisi.....	90
Şekil 4.2 PEG-6000 konsantrasyonunun PEG/Na ₂ SO ₄ sisteminde selülaz ekstraksiyonuna ve dağılımına etkisi.....	92
Şekil 4.3 PEG-6000 konsantrasyonunun PEG-Na ₂ SO ₄ sisteminde selülaz dağılıma katsayısına (K _e) etkisi.....	92
Şekil 4.4 Na ₂ SO ₄ konsantrasyonunun PEG/Na ₂ SO ₄ sisteminde selülaz ekstraksiyonuna ve dağılımına etkisi.....	94
Şekil 4.5 % 15 (w/v) PEG-% 10 (w/v) Na ₂ SO ₄ sisteminde selülaz ekstraksiyonuna ve dağılımına pH'ın etkisi.....	97
Şekil 4.6 % 15 (w/v) PEG-% 10 (w/v) Na ₂ SO ₄ sisteminde pH'ın selülaz dağılıma katsayısına (K _e) etkisi.....	98
Şekil 4.7 % 15 (w/v) PEG-% 10 (w/v) Na ₂ SO ₄ sisteminde pH'ın protein dağılıma katsayısına (K _p) etkisi.....	98
Şekil 4.8 % 15 (w/v) PEG-6000 / % 10 (w/v) Na ₂ SO ₄ / pH 6,0 sisteminde selülazın dağılımına (K _e) ve selektivitesine (α) enzim miktarının etkisi.....	99

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**Şekil****Sayfa**

Şekil 4.9 % 15 (w/v) PEG-6000 / % 10 (w/v) Na₂SO₄ / pH 6,0 sisteminde selüloz saflaştırma katsayısı ve protein dağılıma katsayısına enzim miktarının etkisi100

Şekil 4.10 Optimize edilmiş % 15 (w/v) PEG-6000 / % 10 (w/v) Na₂SO₄ / pH 6,0 sisteminin tekrarlanabilirliği.102

Şekil 4.11 Büyük ölçekli PEG 6000- Na₂SO₄ sisteminde selüloz enziminin saflaştırma sonuçları (saflaştırma katsayısı ve protein dağılıma katsayısı).103

Şekil 4.12 Büyük ölçekli PEG 6000- Na₂SO₄ sisteminde selüloz enziminin saflaştırma sonuçları (geri kazanım ve verim).....103

Şekil 4.13 10, 20, 30, 40 ve 50 mL'lik sistemlerde saflaştırılan selüloz enziminin spesifik aktivite değerleri.104

Şekil 4.14 Selüloz aktivitesine pH'ın etkisi (*optimum pH*) (Substrat: Karboksimetil selüloz (CMC), Sıcaklık: 50 °C, Tamponlar: 50 mM pH; 3,0-3,5; Glisin, 4,0-5,5; Asetat, 6,0-8,0 Fosfat).105

Şekil 4.15 Selüloz aktivitesine sıcaklığın etkisi (*optimum sıcaklık*) (Substrat: Karboksimetil selüloz (CMC); İnkübasyon süresi: 5 dakika).....107

Şekil 4.16 Karboksimetil selüloz (CMC) konsantrasyonunun selüloz aktivitesine etkisi (Substrat [S]: Karboksimetil selüloz, Sıcaklık: 50 °C, İnkübasyon süresi: 5 dakika) (Michaelis Menten grafiği).108

Şekil 4.17 Selüloz enziminin Lineweaver-Burk diyagramı (Substrat [S]: Karboksimetil selüloz, Sıcaklık: 50 °C, İnkübasyon süresi: 5 dakika).....109

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.18 Selülazın termal kararlılığı (Substrat: CMC; Sıcaklık: 50 ⁰ C; İnkübasyon süresi: 5 dakika	113
Şekil 4.19 Selülazın inkübasyon süresine bağımlı termal kararlılığı (Substrat: CMC; Sıcaklık: 50 ⁰ C; İnkübasyon süresi: 5 dakika)	114
Şekil 4.20 Selülazın pH kararlılığı (Substrat: CMC; Sıcaklık 50 ⁰ C; Tamponlar 50 mM: pH 3,0- 3,5; Glisin, pH 4,0- 5,5; Asetat, pH 6,0-7,5 Fosfat; İnkübasyon süresi: 5 dakika.....	115
Şekil 4.21 Selülazın inkübasyon süresine bağımlı pH kararlılığı (Substrat: CMC; Sıcaklık 50 ⁰ C; Tamponlar 50 mM: pH 3,0- 3,5; Glisin, pH 4,0- 5,5; Asetat, pH 6,0-7,5 Fosfat; İnkübasyon süresi 5 dakika)	116

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 1.1 Çeşitli kaynaklardan izole edilen selülozlar için hesaplanan K_M değerleri	31
Çizelge 1.2 Selülozların termal kararlılıkları	35
Çizelge 1.3 Selülozların optimum pHdeğerleri	37
Çizelge 1.4 Çeşitli inhibitörlerin selüloz aktivitesine etkisi	40
Çizelge 4.1 Selüloz enziminin dağılımına faz bileşimi ve tuz türünün etkisi	85
Çizelge 4.2 Selüloz enziminin dağılımına PEG molekül kütesinin etkisi	89
Çizelge 4.3 %15 (w/v) PEG/ % 10 (w/v) Na_2SO_4 sisteminde PEG molekül kütesinin selüloz enziminin dağılıma katsayısına (K_p) etkisi	90
Çizelge 4.4 Diyaliz öncesi ve sonrası toplam alt faz hacimlerine ait total aktivite ve protein değerleri	104
Çizelge 4.5 Çeşitli efektörlerin selüloz aktivitesine etkisi	111

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
\AA	Ångström
mM	Milimolar
μM	Mikromolar
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
mL	Mililitre
L	Litre
μg	Mikrogram
mg	Miligram
w/w	Kütle/kütle
w/v	Kütle/hacim
v/v	Hacim/hacim
Da	Dalton (Atomik kütle birimi)
kDa	Kilodalton
MDa	Megadalton
C	Konsantrasyon
V	Hacim
[S]	Substrat konsantrasyonu
U	Unit (Uluslararası enzim aktivite birimi)

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**Kısaltmalar**

E.C	Enzim Komisyonu
ATPS	Sulu ikili-faz sistemi
PEG	Polietilen glikol
EG	Endoglukanaz
CBH	Sellobiyohidrolaz
IUB	Uluslararası Biyokimya Birliği
GH	Glikozil hidrolaz
Cel	Selülaz
CD	Katalitik alan
CBM	Karbohidrat bağlama alanı
Cys	Sistein
Gly	Glisin
Asn	Asparagin
Glu	Glutamik asit
His	Histidin
Lys	Lizin
Arg	Arginin
DNS	Dinitrosalisilik asit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

BSA	Bovin serum albumin (Sığır Serum Albumini)
MW	Moleküler ağırlık
DNA	Deoksiribo nükleik asit
pDNA	Plazmid DNA'sı
cDNA	Komplementer DNA
rDNA	Rekombinant DNA
PEI	Polietilenimin
HPLC/ESI-MS/MS	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi/elektrosprey iyonizasyon-kütle spektrometrisi/kütle spektrometrisi
sp.	Tür
CMC	Karboksimetil selüloz
PASC	Fosforik asit ile şişirilmiş selüloz
BG	Beta glukozidaz
TIM	Triozfosfat izomeraz
DP	Polimerizasyon derecesi
Ig	İmmunoglobulin
PS	Prolin/serin
SDS	Sodyum dodesil sülfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

CMCaz	Karboksimetil selüloz
FPaz	Filtre kağıdı enzim aktivitesi
K_M	Michaelis-Menten sabiti
V_{max}	Maksimum hız
pI	İzoelektrik nokta
CrI	Kristalizasyon yüzdesi
pNP-Fuc	para-nitrofenol α -L-fukopiranosid
pNP-Gal	para-nitrofenol β -D-galaktopiranosid
pNP-Glc	para-nitrofenol α -D-glukopiranosid
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
DPPE	1,2-bis(difenilfosfino) etilen
DMF	Dimetilformamid
P-A-L plus enzimleri	Proteaz-amilaz-lipaz plus enzimleri

1. GİRİŞ

Selülozlar (E.C 3.2.1.4), selülozun yapısındaki β -1,4 glikozidik bağların hidrolizinde görev alan, pek çok mikrobiyal ve bitkisel kaynaktan izole edilebilen hidrolaz sınıfı enzimlerdir. Selüloz enzimleri basit yapıda olan substratların tek tip bağlarını hidrolizlemektedir fakat selülozun kristal yapısı degradasyona karşı oldukça dayanıklıdır. Bu nedenle, selülozun verimli bir şekilde degradasyonu için çoklu enzim sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Selülozların yüksek spesifikliğı, toksik etkilerinin olmaması ve optimum pH ve sıcaklık gibi özelliklerinin ılımlı aralıklarda olması inorganik katalizörlere göre daha avantajlı olmalarını sağlamaktadır. Selülozlar endüstriyel alanda özellikle hayvan yemlerinde önemli oranda uygulama alanı bulmuştur. Bu uygulamaları gıda sanayi uygulamaları ve kağıt, deterjan, tekstil sanayileri takip etmektedir. Selüloz enziminin genel kullanım alanları arasında; meyve ve sebze sularının elde edilmesi ve berraklaştırılması, meyve nektar ve pürelerinin üretimi, zeytinyağı üretimi, fırın ürünlerinin kalitesinin artırılması, bira ve şarap endüstrisi, hayvan yemi üretimi (monogastrik ve ruminant hayvan yemlerinin üretimi), tekstil endüstrisi ve çamaşır deterjanı endüstrisi, denim kumaşların biyolojik taşlanması, biyoetanol üretiminde kullanımı yer almaktadır. Endüstriyel anlamda istenilen sonuca ulaşabilmek enzimlerin daha yeni yöntemlerle etkin bir şekilde izolasyonu ve saflaştırılmasına bağlıdır.

Proteinler ve enzimlerin saflaştırılmasında pek çok biyokimyasal izolasyon ve saflaştırma yöntemi mevcut olmasına rağmen son yıllarda afiniteye dayalı yöntemlerin (afinite çöktürmesi, afinite membranları, sulu ikili-faz ve üçlü-faz sistemleri gibi) özellikle enzimlerin saflaştırılmasında aktif bir şekilde kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışmada, bezelyeden izole edilen selüloz enzimi sulu ikili-faz sistemi (ATPS) kullanılarak saflaştırıldı. Selüloz kaynağı olarak seçilen bezelye, kolay temin edilebilmesi, ekonomik bir kaynak olması, ayrıca selüloz miktarı ve aktivitesi açısından zengin olması nedeniyle uygun bir enzim kaynağıdır. Sulu ikili-faz sistemi (ATPS) olarak polimer-tuz (PEG-Tuz) sistemi seçildi. ATPS ile selüloz enziminin saflaştırma koşulları optimize edildi ve bu amaçla uygun tuz türü, tuz konsantrasyonu, PEG molekül kütlesi, PEG konsantrasyonu ve pH gibi çeşitli

parametrelerin etkisi incelendi. Ayrıca saflaştırılan enzimin biyokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirildi. Enzim aktivitesi ve kararlılığına sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu gibi bazı parametrelerin etkisi araştırıldı.

1.1 Glikozidazlar

Selülazlar, glikozidazların bir alt sınıfı olan hidrolitik enzimlerdir. Glikozidazlar (EC 3.2.1.-) iki ya da daha sayıdaki glikozidik bağların degradasyonunda etkilidirler (Henrissat *et al.*, 1998).

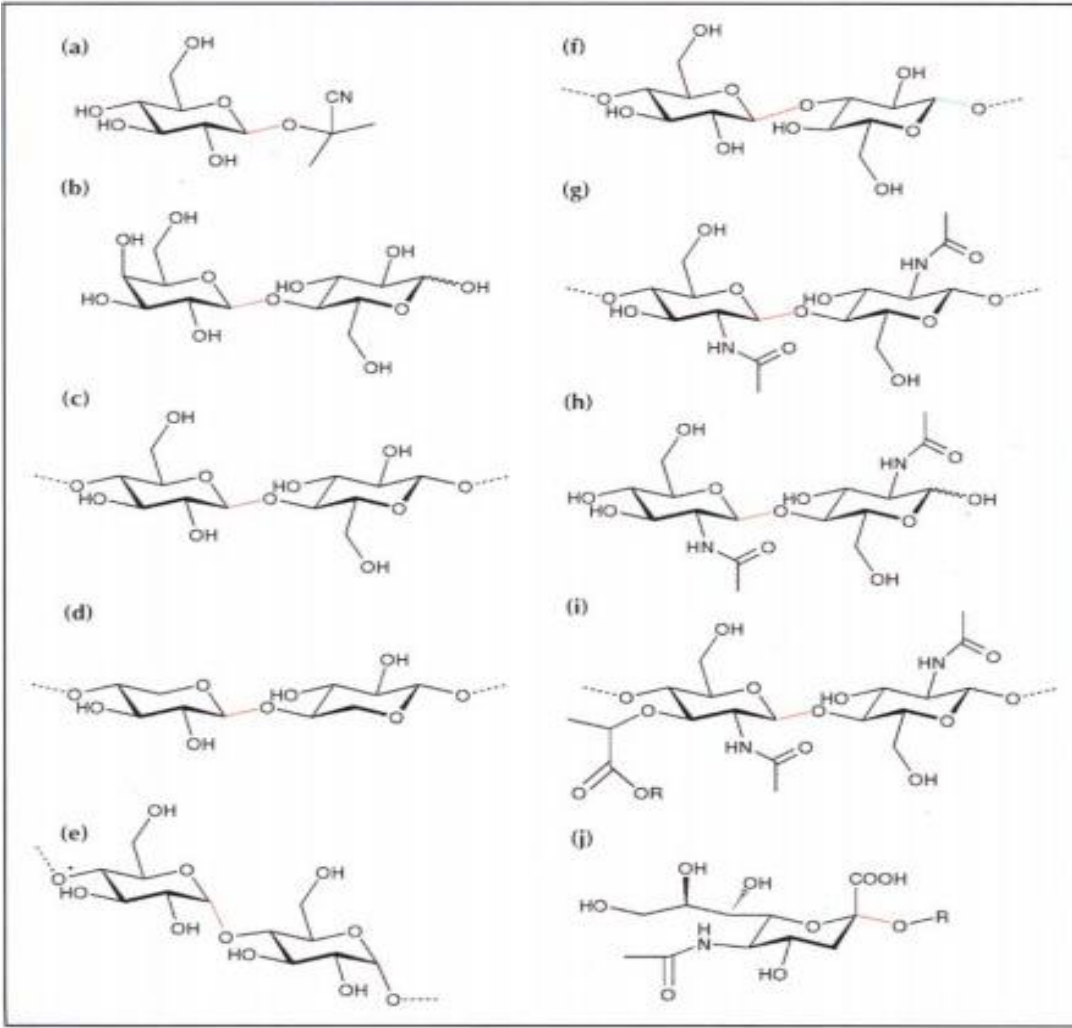
Uzun yıllardır enzimolojinin önemli araştırma konularından birisi olmalarına rağmen glikozidazların moleküler özellikleri ve etki mekanizmaları hakkında çok az bilgi edinilebilmiş ve sadece birkaç tanesi kristalize edilebilmiştir. Amilaz ve lizozim kristal formda elde edilen glikozidaz sınıfı enzimlerdendir. Karbohidratların geniş ölçüde sterokimyasal değişkenlik gösterme özelliği nedeniyle indirgen hegzasakkaritlerin 10^{12} 'nin üzerinde izomerinin olması ihtimali de oldukça yüksektir. Canlı organizmalar; depolama, yüksek spesifiklikte sinyal oluşturma ve daha pek çok biyolojik fonksiyonlarda oligosakkaritleri ve polisakkaritleri kullanarak bu çeşitlilikten yararlanmaktadır. Temel olarak yüklü grup içermeyen substratlarla ilgilidirler. Tüm belirleyici gruplar ya hidroksil grupları ya da hidrojen atomlarıdır. Bu nedenle de spesifiklikleri bir model ile belirlenmelidir.

Substrat spesifikliği ve enzimlerin yapısal benzerliğine göre yapılan sınıflandırmalar, selülazlar için en çok geçerli olan sınıflandırmalardır. Bir diğer seçenek ise reaksiyon mekanizmasına göre olandır. Substrat spesifikliğine göre selülazlar, ekzoglukanazlar diğer bir adıyla sellobiyohidrolazlar ve endoglukanazlar olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadırlar. Selülaz enzimleri sinerjistik etki ile çalışan enzimlerdir. Endoglukanaz (EG), sellobiyohidrolaz (CBH) ve β -glikozidaz sinerjistik çalışmaları için “gerçek selülazlar” olarak adlandırılmamaktadır. Bu enzimler, sellodekstrin ve sellobiyazlar üzerinde etkili iken selüloz üzerinde tek başına katalitik aktivite gösterememektedir. Substrat spesifikliğine bağlı sınıflandırma sahip olduğu zorluklar nedeniyle yeni bir sınıflandırma çeşidine ihtiyaç olduğunu göstermiştir (Andersen, 2007).

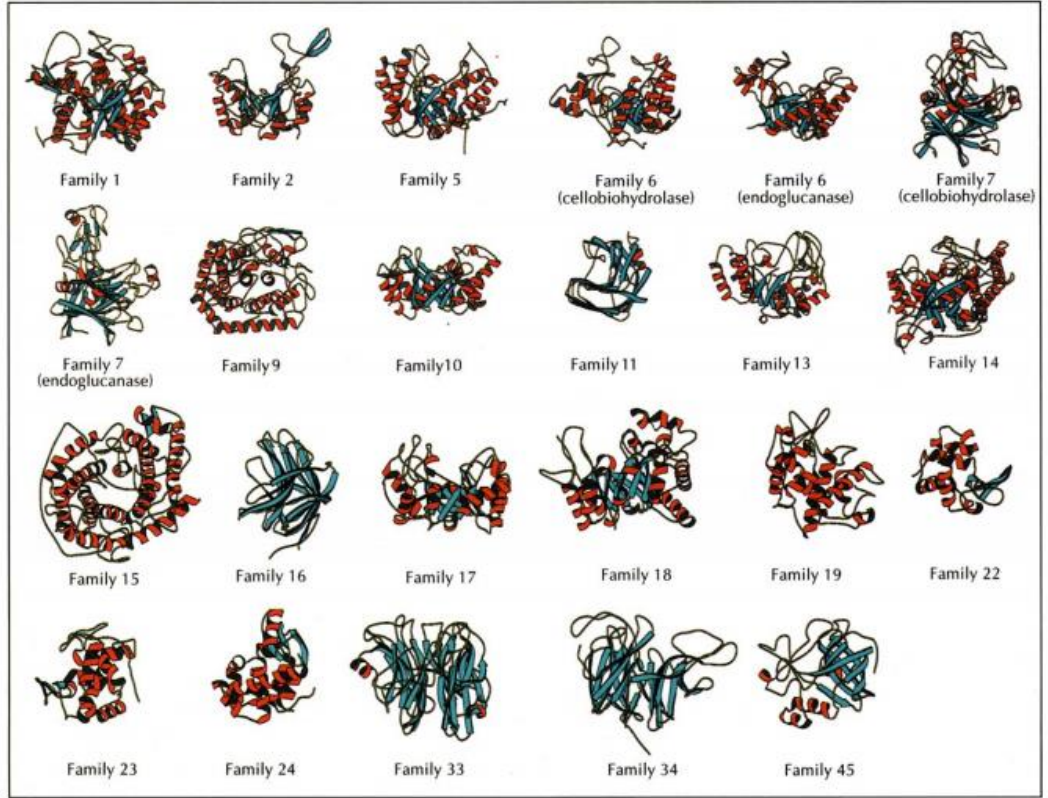
Glikozidazlar, genel olarak endo- ve ekzo- glikozidazlar olarak iki gruba ayrılırlar. Glikoproteinler üzerinde etkili olan endoglikozidazlar; endo- β -galaktozidaz (EC 3.2.1.103), endoglikozidaz D (EC 3.2.1.96), endoglikozidaz F (EC 3.2.1.96), endoglikozidaz H (EC 3.2.1.96) ve glikopeptidaz F (EC 3.2.1.18) dir. Polisakkaritler üzerinde etkili olan endoglikozidazlar; α -amilaz (EC 3.2.1.1), selülaz (EC 3.2.1.4), hyaluronidaz (EC 3.2.1.45), lizozim (EC 3.2.1.17) ve pullulanaz (EC 3.2.1.41) dir. Ekzoglikozidazlar ise sadece terminal artıklar üzerinde etkilidirler. Bunlar; β -N-asetil-D-glukozaminidaz (EC 3.2.1.30), β -amilaz (EC 3.2.1.2), amiloglukozidaz (EC 3.2.1.3), β -fruktofuranozidaz (EC 3.2.1.26), α -L-fukozidaz (EC 3.2.1.51), α -galaktozidaz (EC 3.2.1.22), β -galaktozidaz (EC 3.2.1.23), α -glukozidaz (EC 3.2.1.20), β -glukozidaz (EC 3.2.1.21), β -glukuronidaz (EC 3.2.1.31) ve nörominidaz (EC 3.2.1.18) dir (Önal Tatar, 1994; Agrawell and Bahl, 1968).

Glikozil hidrolazlar için aminoasit sekanslarındaki benzerlik esas alınarak sınıflandırma yapılmıştır. Bu sınıflandırma ile 45'ten daha fazla aile oluşturulmuş ve bu enzimlerin yapı ve fonksiyonları adına bilgi edinilmesinin kolay hale gelmesi amaçlanmıştır. Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafınca yapılan substrat spesifikliğine dayalı adlandırma, sekans ve yapısal olarak yapılarına göre oldukça farklılık göstermektedir. Glikozidik bağları bozan, değiştiren veya oluşturan enzimlerin yapısal olarak ilişkili katalitik ve karbohidrat bağlayıcı modüllerinin aileleri hakkında sürekli güncellenen bilgiler "Carbohydrate Active Enzyme Database" sunucusunda (<http://ww.cazy.org/>) mevcuttur.

Bazı glikozil hidrolaz enzimlerinin substratları ve glikozidik bağları üzerine etkisi Şekil 1.1'de gösterilmiştir. Şekil 1.2'de ise, Aile 6 ve 7 'de bulunan glikozil hidrolazların katalitik alanlarının temel katlanmaları ile β -tabakaların ve heliks yapıları gösterilmiştir (Davies and Henrissat, 1995).



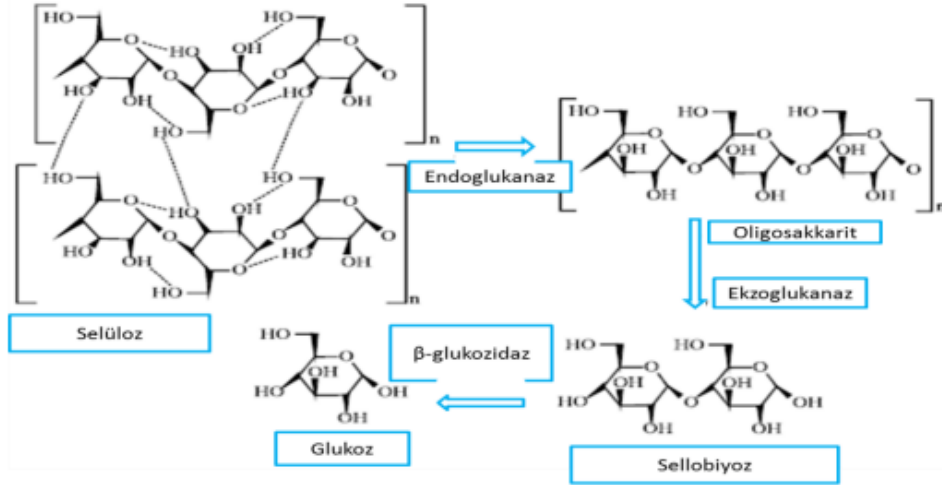
Şekil 1.1 Çeşitli substratların glikozil hidrolazlar tarafından hidrolizi. a. Laminarin b. Laktoz c. Selüloz d. Ksilan e. Amiloz f. β -1,3-1,4 glukan için; kırmızı ile işaretli yerler β -1,3-glukanazlar tarafından ve mavi renkle işaretlenen yerlerde ise β -1,3-1,4 glukanazlar tarafından kesilen bağlar gösterilmiştir. g. Kitin h. Kitobiyoz i. N-asetil muramik asit ve N-asetilglukozamin içeren bakteri hücre duvarı j. Glukokonjugat bağlı sialik (Davies ve Henrissat, 1995).



Şekil 1.2 Aile 6 ve 7 glikozil hidrolazlarının katalitik alanlarının temel katlanmaları ile β -tabakaların ve heliks yapılarının (kırmızı) gösterimi (Davies ve Henrissat, 1995).

1.1.1 Selülazlar ve selülazların biyokimyası

Selülaz enzim sistemi içerisinde üç ana enzim bulunmaktadır. Bunlar; 1) *ekzoglukanazlar* (1,4- β -D-glucan sellobiyohidrolaz, EC 3.2.1.91), 2) *endo- β -1,4-glukanaz* (EG ya da endo-1,4- β -D-glukan 4-glukanhidrolaz, EC 3.2.14) ve 3) *β -glukozidaz* (BG, EC 3.2.1.21) (Sukumaran *et al.*, 2005). Endoglukanazlar selülozları rastgele parçalayarak oligosakkaritleri, sellobiyozları ve glukozları oluştururken, ekzoglukanazlar (sellobiyohidrolazlar) selülozdaki β -1,4-D-glukozidik bağları hidrolizleyerek indirgenmemiş uçlardan sellobiyozların serbest kalmasını sağlamaktadır. β -glukozidazlar ise sellobiyozları glukozla hidrolize etmektedir (Haki and Rakshit, 2003).



Şekil 1.3 Selülozun selülaz enzim sistemi ile glukoz hidrolizi.

Selülazlar çeşitli mikrobiyal kaynaklardan; (Rajoka and Malik, 1997; Christakopoulos *et al.*, 1999; Nikolov *et al.*, 2000; Huang and Monk, 2004; Singh *et al.*, 2004; Topuz *et al.*, 2007; Jo *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Rastogi *et al.*, 2010; Shanmughapriya *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2010; Trivedi *et al.*, 2011; Annamalai *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2011; Rodhe *et al.*, 2011; Korpole *et al.*, 2011) farklı biyokimyasal teknikler kullanılarak izole edilip saflaştırılmıştır.

Selülazlar oldukça geniş uygulama alanı olan enzimlerdir. Yemlerin besin değerlerini arttırmak amacıyla monogastrik ve ruminant yemlerinin üretimi (Bhat, 2000; Kıran *et al.*, 2006) için yem endüstrisinde, hemiselülaz ve pektinazlarla meyve suyu üretiminde (Soares *et al.*, 2001) ve fırıncılık alanında ürün kalitesinin artırılması (Bhat, 2000) gibi uygulamalar için gıda endüstrisinde, kumaşlarda (Sukumaran *et al.*, 2005) ve liflerin istenilen şekilde modifikasyonu (Pazarlıoğlu *et al.*, 2005) gibi uygulamalar için tekstil endüstrisinde, alkalın selülazların keşfi ile (Horikoshi, 1999) deterjan endüstrisinde, kağıtlardaki mürekkebin enzimatik yollarla uzaklaştırılması (Schafer *et al.*, 2007) gibi uygulamalar için kağıt endüstrisinde ve selülozik materyallerin glukoz ve diğer fermente edilebilir şekerlere çevrimi ile etanol gibi çeşitli fermantasyon ürünlerinin üretimi (Sukumaran *et al.*, 2005), zirai ve endüstriyel atıkların sakkarifikasyonu (Kıran *et al.*, 2006) gibi birçok endüstriyel uygulamalarda selülazlar kullanılmaktadır. Ayrıca pigment ekstraksiyonunda enzim kombinasyonlarının kullanımı (Bunea *et al.*, 2009), biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu (Puri *et al.*, 2011), bakteriyel biyofilmin

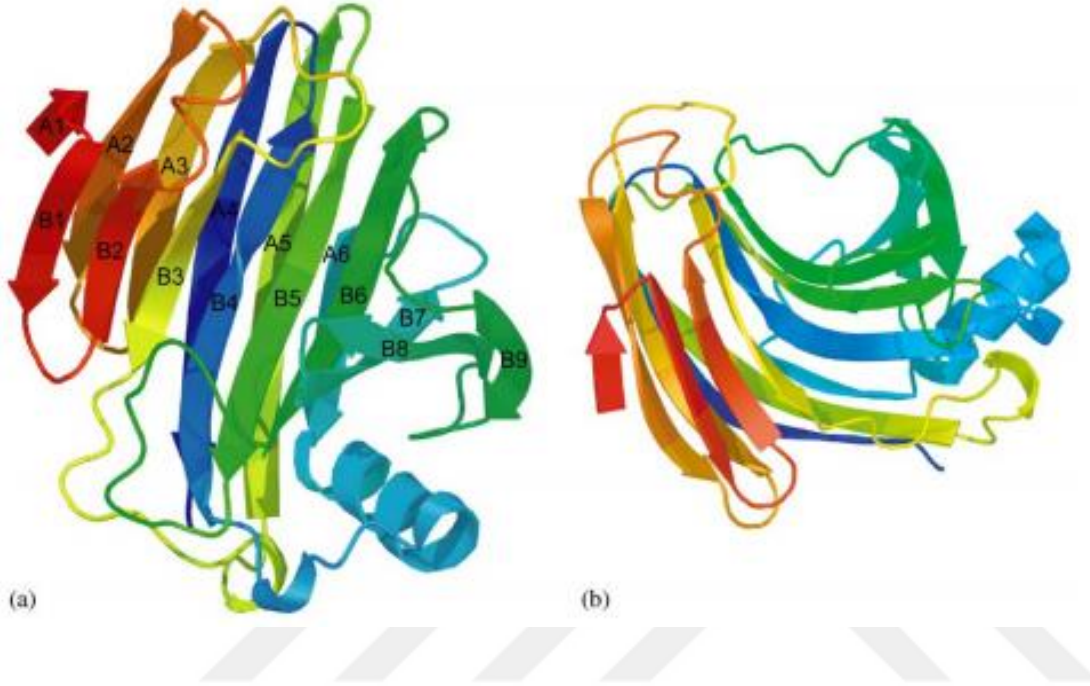
giderimi (Kumar, 2008; Barnett *et al.*, 2009), farmasötik endüstrisi (Karmakar and Ray, 2011; Chen *et al.*, 2005; Al-Ghazzewi *et al.*, 2007) ve endüstriyel biyoteknolojik çalışmalarda termostabil selüloz enzimleri için uygulamalar da bulunmaktadır (Sharma *et al.*, 2019).

Selülozlar, tamamen farklı kıvrım yapılarına sahip GH ailelerinde bulunmalarına rağmen bazı ortak özellikler göstermektedirler. Örneğin; GH-A klanında α_8/β_8 -barrel ve GH-C klanında β -sandviç görünüşü olarak bazı benzerlikler bulundurmaktadırlar. Ksilanazlar, amilazlar ve kitinazlar gibi karbohidrat polimerleri üzerinde etki gösteren diğer enzimlerle ortak olarak, proteinin bir tarafı boyunca uzanan ve birkaç ardışık şeker kalıntıları bulunmaktadır. Genellikle her iki tarafta en az iki glukoz birimini bağlayan uzun bir substrat olukları vardır. Oluk, hidrojen bağı kalıntıları ile kaplıdır ve birkaç aromatik kalıntı olan yan zincir, genellikle ayrı şeker bağlayıcı alt birimleri oluşturan hidrofobik alanlar olarak bulunmaktadır. Endoglukanazlar genellikle açık bir bağlanma yarığı bulundururken, ekzoglukanazlar selüloz zincirini çevreleyen genişletilmiş halkalar bulundurmaktadır. Böylece bir substrat bağlama tüneli oluşturmaktadır (Divne *et al.*, 1994; Rouvinen *et al.*, 1990).

Transkripsiyon analizi ve genom dizilimi çalışmaları, biyokütle degradasyonunda kullanılacak enzimleri tanımlamak için *Trichoderma reesei* olarak da bilinen ipliksi bir fungus olan *Hypocrea jecorina* ile yapılmıştır (Foreman *et al.*, 2003). Bu selülotik sistemde Cel6A ve Cel7A olmak üzere iki CBH (ekzoglukanaz, sellobiyohidrolaz) ve Cel5A, Cel5B, Cel7B, Cel12A, Cel45A, Cel61A, Cel61B ve Cel74B olmak üzere sekiz EG (endoglukanaz) olarak on selüloz enzimi bildirilmiştir. X-ışınları kristalografisi ile yapısı aydınlatılan ilk selüloz enzimi, *H. jecorina* Cel6A'nın katalitik alan yapısıdır (Rouvinen *et al.*, 1990). *H. jecorina*'nın bilinen 10 selülozundan 4'ü için X-ışınları kristalografisi ile 3 boyutlu yapılar; Cel6A (Rouvinen *et al.*, 1990), Cel7A (Divne *et al.*, 1994), Cel7B (Kleywegt *et al.*, 1997) ve Cel12A (Sandgren *et al.*, 2001) için belirlenmiştir. Üçünün kristalizasyonunun ancak selüloz bağlayıcı domainin (CBD) katalitik alandan ayrılması sonucu mümkün olduğu bildirilmektedir.

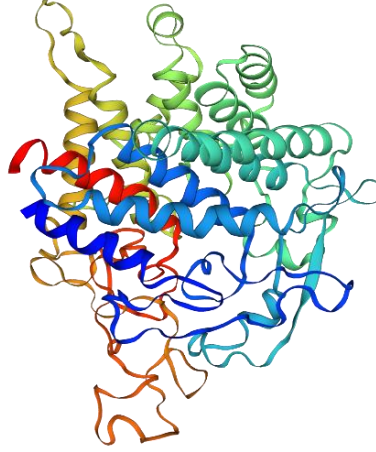
Şekil 1.4'te görüldüğü gibi, *H. jecorina* Cel12A birbiri üzerine yığılmış ve bükülmüş, büyük ölçüde paralel olmayan A ve B şeklinde katlanan 15 uzun β -şeridinden oluşmaktadır. Yapıda, β -tabakasının dış bükey yüzeyine karşı sıkışan

tek bir α -heliks bulunmaktadır. Enzim kompakttır ve boyutları yaklaşık olarak 40x40x30 Å şeklindedir. *H. jecorina* Cel12A proteininde, Cys 4 ve Cys 32 A1 ve A2'de β ipliklerini köprüleyen bir disülfid bağı oluşturmaktadır (Sandgren *et al.*, 2005).



Şekil 1.4 (a) ve (b) farklı açılardan *H. jecorina* Cel12A'nın kristal yapısı (Sandgren *et al.*, 2005).

Pisum sativum'dan izole edilen endoglukanazın (EGL 2) Şekil 1.5'de 3 boyutlu yapısı ve Şekil 1.6'da aminoasit dizilimi gösterilmiştir. 506 aminoasitten oluşan endoglukanaz glikozil hidrolaz 9 (Selülaz E) ailesine aittir.



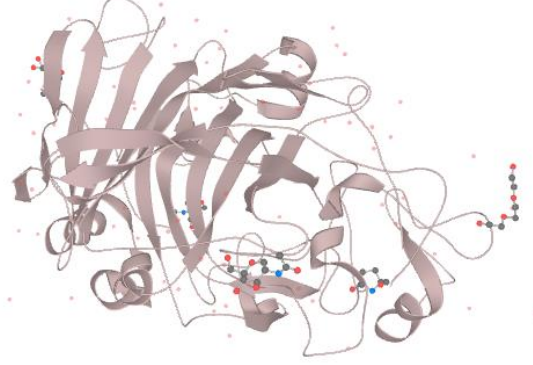
Şekil 1.5 Endoglukanazın (EGL 2) 3 boyutlu yapısı (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9SSU7>).

10	20	30	40	50
MALSLSLTTI	LLSLFSFFLL	HTHANPFRSI	HHNHHPHFAT	HNYRDALTKS
60	70	80	90	100
ILFFQQRSG	KLPSNQRI SW	RRDSGLSDGS	ALHVDLVGGY	YDAGDNVKFG
110	120	130	140	150
FPMAFTTML	SWSVIEFGGL	MKSELPNAKK	AVRWATDYLL	KATAHPNI IY
160	170	180	190	200
VQVGDAKKDH	ACWERPEDMD	TPRSVFKVDA	NAPGSEVAAE	TAAALAAASL
210	220	230	240	250
VFRKSDPTYA	KILVRRAIRV	FQFADKHRRS	YSNALKPFVC	PFYCSYSGYQ
260	270	280	290	300
DGLLWGAAWL	HKATKNPMYL	KYIQTNQIL	GAAEFDNTFG	WDNKHVGARI
310	320	330	340	350
LLSKEFLVQN	VKSLHDYKGH	SDNFVCSLIP	GAGSSSAQYT	PGLLLFKMSD
360	370	380	390	400
SNMQYVTSTT	FLLVITYAKYL	TKSHSVVNCG	GTTVTPKRLR	TLAKRQVDYL
410	420	430	440	450
LGDNPLKMSY	MVGYGPRYPQ	RIHHRGSSLP	SMAVHPGKIQ	CSAGFGVMNS
460	470	480	490	500
KSPNPNIIMG	AVVGGPDQHD	RFPDQRSDYE	QSEPATYVNA	PLVGTLAYLA
HSFGQL				

Şekil 1.6 Endoglukanazın (EGL 2) aminoasit dizilimi (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9SSU7>).

Trichoderma harzianum (*Hypocrea lixii*)’dan izole edilen ekzoglukanaz I (CBH I)’in Şekil 1.7’de 3 boyutlu yapısı ve Şekil 1.8’de aminoasit dizilimi gösterilmiştir. 505 aminoasit içeren ekzoglukanaz I (CBH I), serin, treonin ve prolin açısından zengin bir karbohidrat bağlama alanı (CBM) ve yüksek oranda glikozile

edilmiş bağlayıcı dizisi ile birleştirilen bir katalitik domain olmak üzere iki işlevsel alandan oluşur.



Şekil 1.7 Ekzoglukanaz I (CBH I)'in 3 boyutlu yapısı (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9P8P3>).

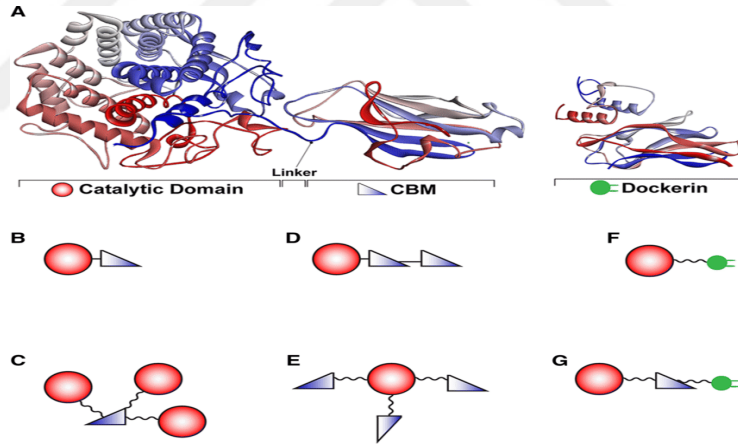
10	20	30	40	50
MYRKLAVIS A	FLAAARAQQV	CTQQAETHPP	LTWQKCTASG	CTPQQGSVVL
60	70	80	90	100
DANWRWTHDT	KSTTNCYDGN	TWSSTLCPDD	ATCAKNCCLD	GANYSGTYGV
110	120	130	140	150
TTSGDALTLQ	FVTASNVGSR	LYLMANDSTY	QEFTLSGNEF	SFDVDVSQLP
160	170	180	190	200
CGLNGALYFV	SMDADGGQSK	YPGNAAGAKY	GTGYCDSQCP	RDLKFINGQA
210	220	230	240	250
NVEGWEPSSN	NANTGVGGHG	SCCSEMDIWE	ANSISEALTP	HPCETVGQTM
260	270	280	290	300
CSGDSCGGTY	SNDRYGGTCD	PDGCDWNPYR	LGNTSFYGP	SSFALDTTKK
310	320	330	340	350
LTVVTQFATD	GSISRYVQON	GVKFQQPNAQ	VGSYSNTIN	TDYCAAEQTA
360	370	380	390	400
FGGTSFTDKG	GLAQINKAFQ	GGMVLVMSLW	DDYAVNMLWL	DSTYPTNATA
410	420	430	440	450
STPGAKRGSC	STSSGVPAQV	EAQSPNSKVI	YSNIRFGPIG	STGGNTGNSP
460	470	480	490	500
PGTSTTRAPP	SSTGSSPTAT	QTHYGQCGGT	GWTGPTRCAS	GYTCQVLNPF
YSQCL				

Şekil 1.8 Ekzoglukanaz I (CBH I)'in aminoasit dizilimi (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9P8P3>).

Yapılan başka bir çalışmada da, pirinç kabuğunu deşere eden bir mikroorganizma topraktan saflaştırılmıştır ve çalışmanın devamında *B.*

amyoliquefaciens DL-3 olarak adlandırılmıştır. *B. amyoliquefaciens* DL-3 selülağı, glikozil hidrolaz aile 5'in (GH5) katalitik domaini (Gly-31 ila Asn-332 arası) ve aile 3 selüloz bağlayıcı domain (CBM3) (Glu-350 ila His499) içeren modüler bir yapıya sahiptir. Birçok *Bacillus* endoglukanazındaki modüler organizasyon (GH5/CBM3) gibi (<http://afmb.cnrs.mrs.fr/CAZY/index.html>), *B. amyoliquefaciens* DL-3 selülağına da katalitik alanı N-terminal kısmında ve CBM ise C-terminal kısmında bulunmaktadır (Lee *et al.*, 2008).

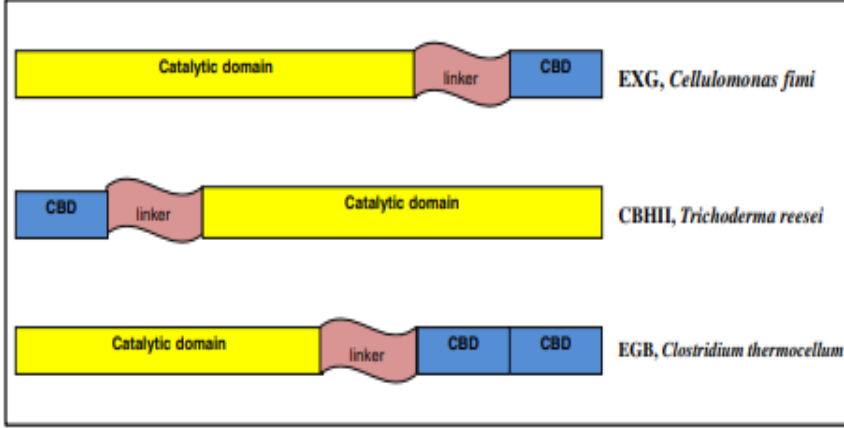
Selülağlar, bağımsız katlanmaların olduğu farklı yapı ve fonksiyona sahip alt birimlerin bir araya gelmesi ile oluşmaktadır. Bu karmaşık enzim sistemi genellikle bir katalitik birim, bir veya daha fazla substrat bağlayıcı yada kompleksi oluşturmada görevli yardımcı birimlerden oluşmaktadır. Bağlayıcı birimler genellikle glisin, prolin, serin ve treonince zengin peptidlerdir (Williamson *et al.*, 1992). Yaygın olarak selülağlar, bir katalitik domain (CD) ve bir karbohidrat bağlayıcı domain (CBM) oluşmaktadır (Şekil 1.9).



Şekil 1.9 Selülağın 3 boyutlu yapısındaki farklı alanların gösterimi (Pirich *et al.*,2020).

Katalitik alan (CD) ve buna bağlı selüloz bağlayıcı alan (CBM) aerobik mikroorganizmaların kompleks olmayan enzim sistemlerinde bulunmaktadır. Bu alanlar genellikle prolin ve hidroksi aminoasit içeren bir bağlayıcı peptid ile tutulmaktadır. Selülozun degradasyonu için katalitik alan ve selüloz bağlayıcı alan oldukça önemlidir (Ohmiya *et al.*, 1997). Şekil 1.10'da gösterildiği gibi selüloz bağlayıcı domain; tek, çift veya üçlü alan olarak mevcuttur ve proteinin C- veya N-

terminali üzerinde konumlandırılabilir. Prolin ve treonin açısından zengin bir bağlayıcı sekans yoluyla katalitik alana bağlanmaktadır (Lakhundi *et al.*, 2015).



Şekil 1.10 Kompleks olmayan selülaözlerle gösterilen çoklu domainlerin organizasyonu (Lakhundi *et al.*, 2015).

Bir selülaözün CD'si selülozun degradasyonundan sorumlu iken CBD ise, katalitik aktivite göstermez. Çözünür özellikte olmayan kristal selüloz, enzimin soğurumundan sorumludur (Henrissat ve Davies, 2000). CBD bu sayede katalitik alana substratın yaklaşmasını sağlayarak selülozun degradasyonunu kolaylaştırmaktadır (Lynd *et al.*, 2002). CBM'ler, selülaözler ve ksilanazlarda yaygın yardımcı alan olarak bulunmaktadır. Çoğu birincil yapıdaki benzerliklere göre beş ana aile olarak; I, II, III, IV ve VI şeklinde sınıflandırılabilir. Üç ilgisiz, işlevsel CBM ise V, VII ve VIII ailelerine yerleştirilmişlerdir. Bu ailelerin her birinde bulunan birkaç CBM'nin selüloza affinite gösterdiği ve diğerlerinin yalnızca sekans karşılaştırması temeline dayandığı bildirilmektedir. Aile I CBM'leri fungaldir ve ilk kez *T. reesei* selülaözünde tanımlanmıştır. 33-36 aminoasit uzunluğundadır ve yüksek oranda korunmuş olarak bulunan diziler genellikle C-terminaldir. Selüloz ile etkileşim için önemli olduğu düşünülen en az dört korunmuş aromatik kalıntı ve iki disülfür köprüsü oluşturan dört sistein içermektedir. Aile II; *C. jirni*, *P. fluorescens subsp cellulosa*, *S. lividans* ve *T. fusca* gibi türlerde bulunmaktadır ve fungal temsilcisi yoktur. Aile II CBM'leri yaklaşık 100 artık uzunluğundadır. Tam olarak korunmuş dört triptofan artığı ve bir disülfür köprüsü oluşturan yüksek düzeyde korunmuş iki sistein artığı içermektedir. Aile II CBM

'leri; selülaazlar, ksilanazlar ve iki kitinazın yanı sıra bir arabinofuranosidaz ve bir asetil esteraz da bulunmaktadır. Aile III CBM'leri *Bacillus spp.* *Clostridium spp.* ve *Caldocellum saccharolyticum* gibi türlerde bulunmaktadır. 130-170 aminoasit artığı içermektedir. Aile IV, aile II ile bağlantılı küçük bir CBM grubunu içermektedir. Aile IV ise, ağırlıklı olarak ksilanazlarda bulunan yeni bir CBM ailesi olarak bilinmektedir (Tomme *et al.*, 1995).

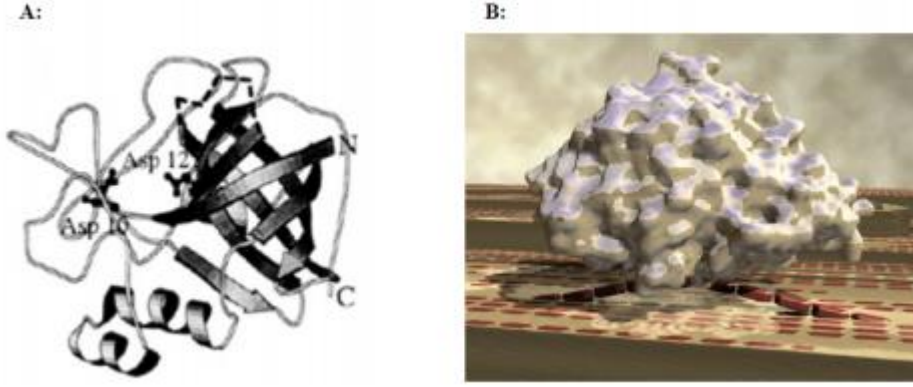
1.1.2 Selülaaz sistemi enzimleri

Selülozun verimli bir şekilde degradasyonu için çoklu enzim sistemlerine gereksinim duyulmaktadır (Bayer *et al.*, 1998). Kompleks olmayan enzim sistemi ve kompleks enzim sistemleri üç enzim grubundan (endoglukanaz, ekzoglukanaz ve β -glukozidaz) oluşmaktadır. Bu enzimler selülozun verimli bir şekilde degradasyonu için koordineli bir şekilde çalışmaktadırlar (Lynd *et al.*, 2002).

1.1.2.1 Endoglukanazlar

Endoglukanazlar, β -1,4 glikozidik bağlara rastgele etki ederek farklı uzunluktaki oligosakkaritler ile ekzoglukanazlar için yeni zincir uçları açığa çıkarırlar (Boisset *et al.*, 2000). Moleküller arası bağları ayırmada görevli oldukları gibi selülozik substratın polimerizasyon derecesini ve CMC'un spesifik vizkozitesini azaltmakta da görevlidirler (Zhang *et al.*, 2006; Andersen, 2007). Aktivite tayinleri için genellikle polimerizasyon derecesi yüksek CMC gibi selüloz türevleri kullanılmaktadır (Zhang *et al.*, 2006).

Bazı EG'nin yapısı çözümlenerek, küçük bir loopa sahip oldukları ve bundan dolayı oluk şeklinde bir yapı oluşturdukları görülmüştür. Oluk şeklindeki bu yapıya uzun zincirli selülozun hidroliz için girdiği düşünülmektedir (Davies *et al.*, 1993; Davies *et al.*, 1996; Kleywegt *et al.*, 1997; Sandgren *et al.*, 2000). X-ray analizi ile yapısı aydınlatılan *H. insolens* Cel45A Şekil 1.11'de gösterilmiştir (Andersen, 2007).



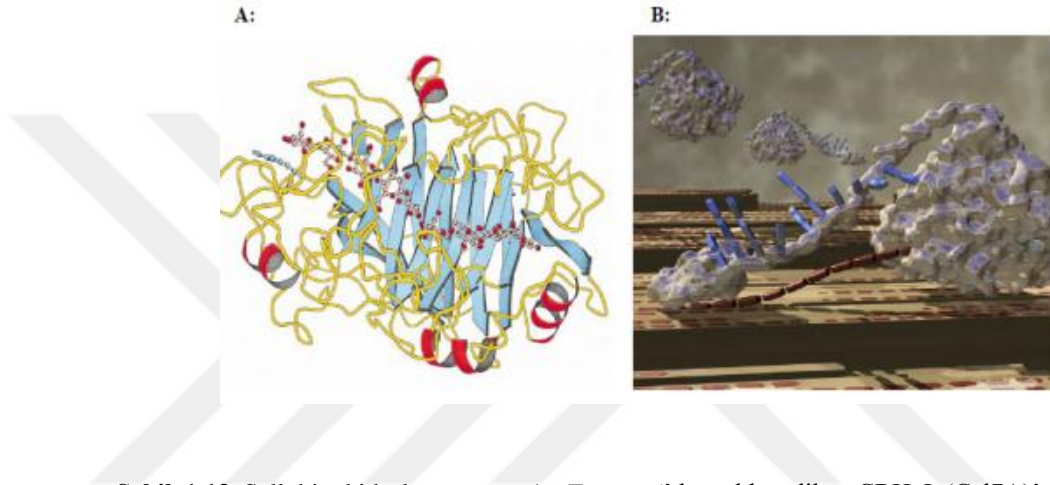
Şekil 1.11 Endoglukanazın yapısı A: *H. insolens*' den elde edilen endoglukanaz V (Cel45A)'in yapısı. B: Selüloz üzerindeki endoglukanazların animasyon gösterimi (Andersen, 2007).

Çeşitli EG'lerin hidroliz modelleri için, mikrokristalin (Avicel), amorf selüloz (Fosforik asitte şişirilmiş Selüloz - PASC) ve çözünür karbohidrat polimerleri (Karboksimetil selüloz - CMC dahil) çok çeşitli substratlar üzerinde çalışılmıştır (Karlsson *et al.*, 2002). Şekil 1.11'de görüldüğü gibi Cel7B (EG I), Cel5A (EG II), Cel12A (EG III), Cel45A (EG V) ve çekirdek Cel45A ile yapılan çalışmalar sonucunda oluşan öncelikli ürünlerin farklı olduğu görülmüştür. Cel45A enziminin diğer enzimlere göre ürün oluşum modelinde dikkate edilmesi gereken bir farklılık gözlenmiştir. *T. reesei* 'den elde edilen Cel45A enziminin selooligosakkaritler üzerinde hiçbir etkisi gözlemlenmemişken (Karlsson *et al.*, 2002), *H. insolens*' den elde edilen Cel45A enziminin daha uzun selooligosakkaritler üzerinde etkili olduğu görülmüştür (Schou *et al.*, 1993) *T. reesei* ve *H. insolens*'in Cel45A endoglukanazları, aynı glikozil hidrolaz ailesinde olmasına rağmen hidroliz modelleri açısından farklılık göstermiştir.

1.1.2.2 Ekzoglukanaz

Uzun selüloz zincirinin indirgen ve indirgen olmayan ucundan etki ederek ana ürün olarak glukoz, sellobiyoz ya da selooligosakkaritleri açığa çıkaran ve CMC'ye karşı düşük, Avicel'e karşı yüksek aktivite gösteren enzimler ekzoglukanaz olarak adlandırılırlar (Lynd *et al.*, 2002; Sukumaran *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Amorf yapıdaki selüloz ve çözünür selodekstrinler hem endoglukanazlar hem de ekzoglukanazlar için substrat olarak kullanılabilirdiği için selülaz karışımı içinde bulunan ekzoglukanazlar için spesifik bir substrat bulunmamaktadır (Zhang

et al., 2006). Tüm ekzoglukanazların, mikrokristalin selüloz üzerinde etki etmeleri önemli özelliklerindedir (Terri, 1997). Avicel, ekzoglukanaz aktivitesini ölçmede en çok kullanılan substrattır (Bhat and Bhat 1997; Zhang *et al.*, 2006). CBH'ların aktif bölgesi EG'lara kıyasla bir tünel içerisinde bulunmaktadır. *T. reesei*'den elde edilen CBH I (Cel7A) için bu tünel 50 Å uzunluğunda iken, (Divne *et al.*, 1994) CBH II (Cel6A) için ise bu tünel 20 Å şeklinde ve daha kısa olarak bulunmuştur (Rouvinen *et al.*, 1990). CBH II'ye benzeyen sellobiyohidrolazların da endoglukanaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 1.12).



Şekil 1.12 Sellobiyohidrolaz yapısı. A: *T. reesei*'den elde edilen CBH I (Cel7A)'nın katalitik bölgesinin şematik gösterimi B: Selüloz üzerindeki sellobiyohidrolazın animasyon gösterimi. (Andersen, 2007).

CBH I selüloz zinciri üzerinde enzimatik degradasyon sırasında indirgen uçtan indirgen olmayan uca doğru ilerlerken (Barr *et al.*, 1996; Boisset *et al.*, 2000), CBH II'de tersi bir durum söz konusudur ve enzimatik degradasyon boyunca indirgen olmayan uçtan indirgen uca doğru ilerlemektedir (Moiser *et al.*, 1999).

1.1.2.3. β -Glukozidazlar

β -glukozidazlar (BG) sellobiyozu ve kısa zincirli selooligosakkaritleri glukoz forma dönüştürerek selülozun degradasyonunu tamamlar. Enzimatik olarak sellobiyozun oluşumu oldukça önemli bir adımdır. Sellobiyozun, EG ve CBH aktivitesini inhibe etme gibi bir özelliğinin bulunması bu önemi arttırmaktadır. BG aktivitesi, sellobiyozun EG ve CBH üzerindeki inhibisyon etkisini azaltarak hız sınırlayıcı adımı oluşturmaktadır (Duff and Murray, 1996; Tolan and Foody, 1999). Bu nedenle ticari selülaz enzim preparatlarına BG aktivitesi eklenmektedir.

T. reesei kültür süpernatantından iki BG izole edilmiştir (Chen *et al.*, 1992) fakat yapılan çalışmalarla, bu enzimlerin büyük bir kısmının hücre duvarına bağlı olduğunu bulunmuştur (Messner *et al.*, 1990; Usami *et al.*, 1990). *T. reesei*'den elde edilen BG'lar glukoz tarafından inhibisyona uğramaktadır. Örneğin ; *T. reesei*'den elde edilen BG I için, substrat olarak p-nitrofenil-glukoz kullanıldığında elde edilen inhibisyon sabiti 182 μM iken, reaksiyon ortamında 5 mM glukoz kullanıldığında 624 μM 'a yükselmiştir (Chen *et al.*, 1992; Watanabe 1992; Gunata and Vallier, 1999; Decker *et al.*, 2000).

Şekil 1.13'de *Fervidobacterium islandicum* β -glukozidazının yapısı gösterilmiştir. FiBg11A, sekiz β ipliği ve sekiz α -sarmal sergileyen tipik bir korunmuş protein katı olan TIM-barrel kıvrımına sahiptir. Nükleofilik Glu360 ve genel asit / baz Glu187, sırasıyla β -8 ve β -4 ipliklerinde bulunur (Jabbour *et al.*, 2012).

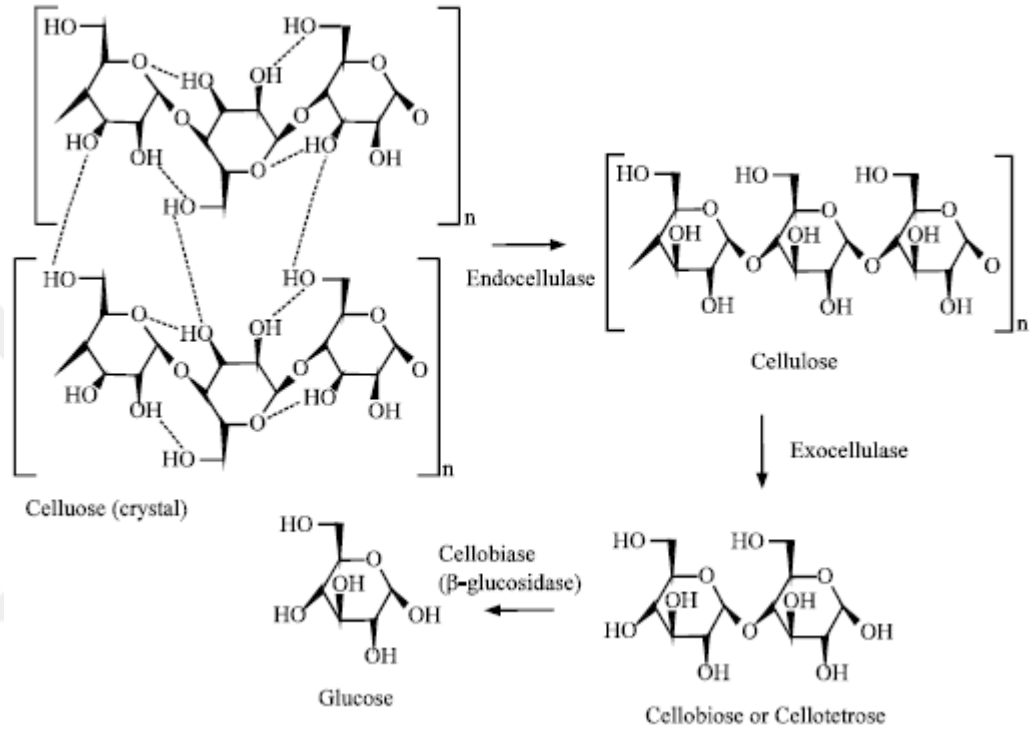


Şekil 1.13 *Fervidobacterium islandicum* β -glukozidazının 3 boyutlu yapısı (Jabbour *et al.*, 2012).

1.1.3 Selülazların Katalitik Mekanizması

Glikozidik bağların kataliz mekanizması için, bir proton donörü ve bir nükleofil/baz gerekmektedir. Bu mekanizmaların prensibinde anomerik karbonun ya alıkonması ya da ters çevrilmesi bulunmaktadır. Katalitik aktivite, iki aspartik asit veya glutamik asit ile sağlanmaktadır (Mosier *et al.*, 1999). Selülazlar etki mekanizmalarına göre; ekzoglukanazlar (sellobiyohidrolazlar), endoglukanazlar (endo- β -1,4 glukozidaz) ve β -glukozidazlar olarak incelenmektedirler. Ekzoglukanazlar, selüloz polimerini bütün olarak ya da endo- β -1,4 glukozidaz yardımıyla parçalanmış kısımların uç kısımlarından parçalama işlemini

yürütmektedir. Parçalanma sonrasında sellobiyoz ortaya çıkmaktadır. Endoglukanazlar, selüloz polimerinin genelde amorf bölgesinden parçalama yapmaktadır. Oligosakkaritler parçalama işlemi sonucunda açığa çıkan en son üründür. β -glukozidaz enzimleri ise ortaya çıkan sellobiyoz parçalarını glukoz birimlerine bölmektedir (Lynd *et al.*, 1991; Kuduğ, 2013) (Şekil 1.14).

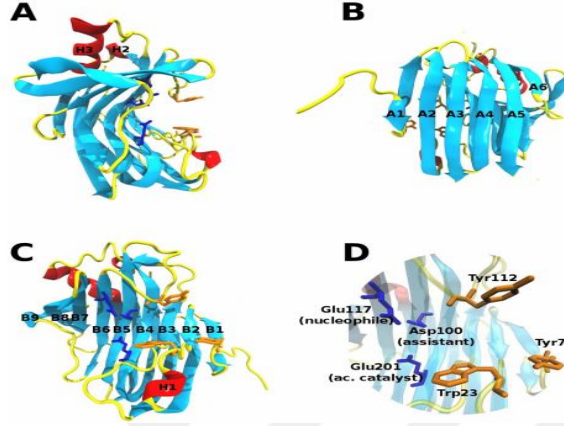


Şekil 1.14 Selülozun selülaz enzim sistemi ile hidrolizi (Karmakar and Ray, 2011).

Selüloz molekülü çok kararlı bir yapıya sahiptir. β -glukozidik bağın 25°C 'de yarılanma ömrü 5-8 milyon yıl kadardır. Fakat enzim aracılığıyla selülozun hidrolizi oldukça çabuk gerçekleşmektedir. Karbon atomunun atmosfere geri kazandırılmasında bu işlem oldukça büyük önem taşımaktadır (Kuduğ, 2013; Wolfenden and Snider, 2001). Selülazın, selülozun yüzeyine yapıştığı ve substrat boyunca hareket ederek bir takım katalitik reaksiyonları gerçekleştirdiği bulunmuştur. Enzim, substrattan ayrılarak ve substratın başka bir bölgesi ile etkileşerek katalitik aktivitesini göstermektedir (Kıran *et al.*, 2006).

Trichoderma harzianum'dan izole edilen Endoglukanaz 3 enziminin, 3 boyutlu yapısını, selüloz bağlama modülü olmayan endoglukanazlarla yapısal organizasyonunu ve substrat tanıma bölgelerini belirlemek için moleküler dinamik

simülasyonlar kullanılmıştır. TheEG3'ün üç boyutlu yapısı, X-ışını kristalografisi ile belirlenmiştir ve Şekil 1.15'de gösterilmektedir. Yapı, Şekil 1.15B ve 1.15C'de gösterildiği gibi, dışbükey ve içbükey kısımların sırasıyla altı (A1–A6) ve dokuz (B1–B9) iplikten oluşturulduğu anti-paralel β -yapraklarının iki yaprakçığından oluşmaktadır. β -şeritleri birkaç ilmek ve üç α -heliks (H1, H2 ve H3; Şekil 1A, 1C) aracılığıyla bağlanır (Prates *et al.*, 2013).



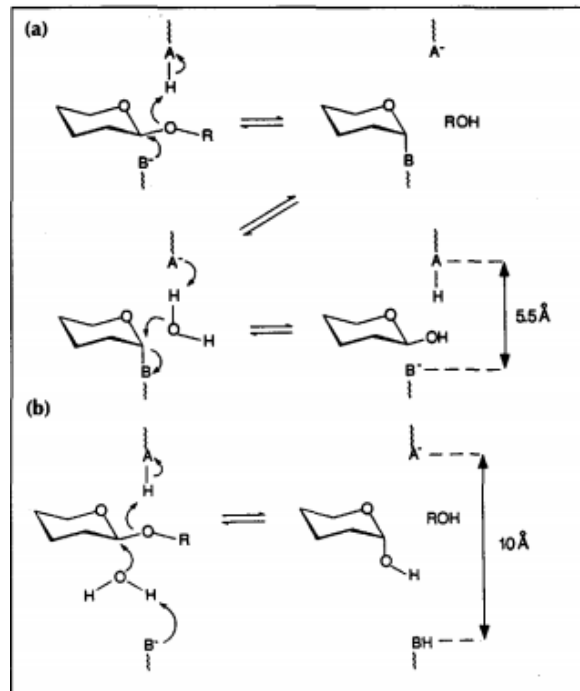
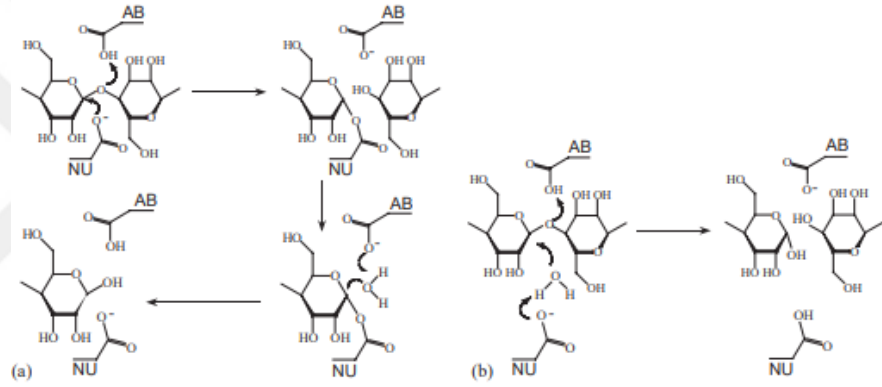
Şekil 1.15 *Trichoderma harzianum* endoglukanaz 3'ün (Eg3) kristal yapısı, yapısal organizasyonu ve substrat tanıma bölgeleri (Prates *et al.*, 2013).

Glikozidazlar, çok yaygın enzimlerden oluşan bir grup olup çeşitli protein katlanmaları ve substrat spesiflikleri göstermektedirler. Glikozidazların hepsinde olan ortak özellik; glikozidik bağın yıkımından sorumlu katalizle ilgili mekanizmayı gerçekleştiren, kritik bir yerde lokalize olmuş iki tane asidik aminoasit artığına ortak olmalarıdır. Bu değişmez aminoasitler, nükleofilik olarak davranan aspartat ve genel asit-baz gibi davranan glutamattır. Glikozidik bağın enzimatik olarak hidrolizi iki tane stereokimyasal yol (anomerik konfigürasyonun retansiyonu (tutma) yada inversiyonu (tersine çevirme) ile mümkün olmaktadır. (Alberto *et al.*, 2004).

Retansiyon mekanizmasına sahip glikozidazlar, ikili yer değiştirme mekanizmasıyla karbohidrat halkasındaki anomerik karbonun konfigürasyonunu koruyarak glikozidik bağın hidrolizini katalizlemektedir (Şekil 1.16). Bu enzimler bazen transglukozilleme yeteneği göstermektedir. Bu enzimlerin katalitik mekanizması karbohidratın bulunduğu düzlemin iki yanında lokalize olmuş iki tane karboksilik artığın birbirinden ayrı kimyasal reaksiyonu gerçekleştirmesine

dayanmaktadır. İlk adımda (glikozilleme); bir karboksilik grup genel-asit katalizi prensibine göre ayrılacak grubun koparılmasını sağlar ve hemen eş zamanlı olarak ikinci karboksilik grup tarafından nükleofilik bir atak sonucu glikozil-enzim ara ürünü oluşturulur. İkinci adımda (deglükozilleme); ilk artık, genel-baz gibi davranarak gelmekte olan nükleofili (hidroliz reaksiyonu ise su molekülü; transglükozilleme ise alkol) aktive eder ve sonunda karbohidrat hidrolizlenmiş olur. İki karboksilik artık arasındaki mesafe yaklaşık olarak 5.5 Å kadardır (Mosier *et al.*, 1999; Davies and Sinnott, 1997; McCarter and Withers, 1994).

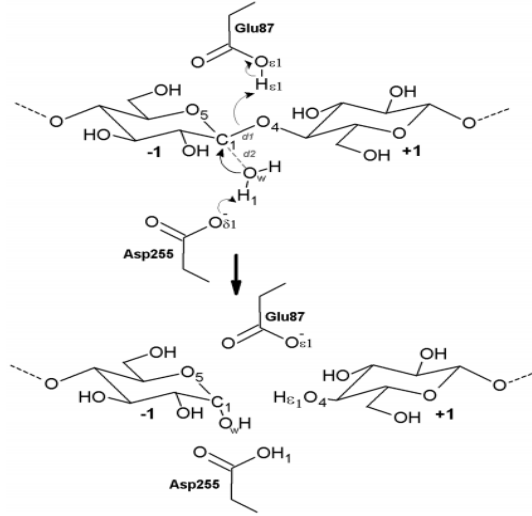
İnversiyon mekanizmasına sahip glikozidazlar, tek adımlı nükleofilik yer değiştirme adımıyla anomerik konfigürasyonun ters çevrilmesine neden olurlar. Bu nedenle β -glikozidik bağın hidroliziyle, ürünler kısmında α -glikozidik bağ meydana getirirler veya belirtilenin aksini gerçekleştirirler (Şekil 1.16).



Şekil 1.16 (a) Retansiyon mekanizması (b) İnversiyon mekanizması (Sandgren et al., 2005; Davies and Henrissat, 1995).

Bu katalitik mekanizmaya sahip olan enzimler, ilk adımda genel-asit katalizi ile ayrılacak grubun ayrılmasını sağlayan bir karboksilik artık ve ardından genel-baz katalizi ile su molekülünün nükleofilik olarak karbohidrat halkasının karşı tarafına bağlanmasını sağlayan ikinci karboksilik artığın yardımıyla glikolitik bağın hidrolizini gerçekleştirdikleri belirtilmiştir. İnversiyon mekanizmasına sahip enzimlerde iki karboksilik artık arasındaki mesafe retansiyon mekanizmasına sahip enzimlerden daha az kısıtlanmıştır ve bu aralık 6.5–9.5 Å kadardır (Sinnot, 1990; McCarter and Withers, 1994).

Clostridium thermocellum sellobiyohidrolazının (CelS) inversiyon mekanizması ile selooligosakkarit hidroliz mekanizması Şekil 1.17’de verilmiştir (Saharay et al., 2010).



Şekil 1.17 *Clostridium thermocellum* sellobiyohidrolazının (CelS) inversiyon mekanizması ile selooligosakkarit hidroliz mekanizması (Saharay et al., 2010).

Enzimlerin reaksiyon mekanizmalarının aydınlatılmasında bağlanma merkezi ve katalitik merkezde görev alan aminoasitler görev almaktadır. Bu doğrultuda kullanılan X-ışınları yöntemi uygundur ancak en çok kullanılan yöntem seçimli olarak reaksiyon veren reaktiflerle yapılan modifikasyon çalışmaları olarak bilinmektedir (Uslan, 1997).

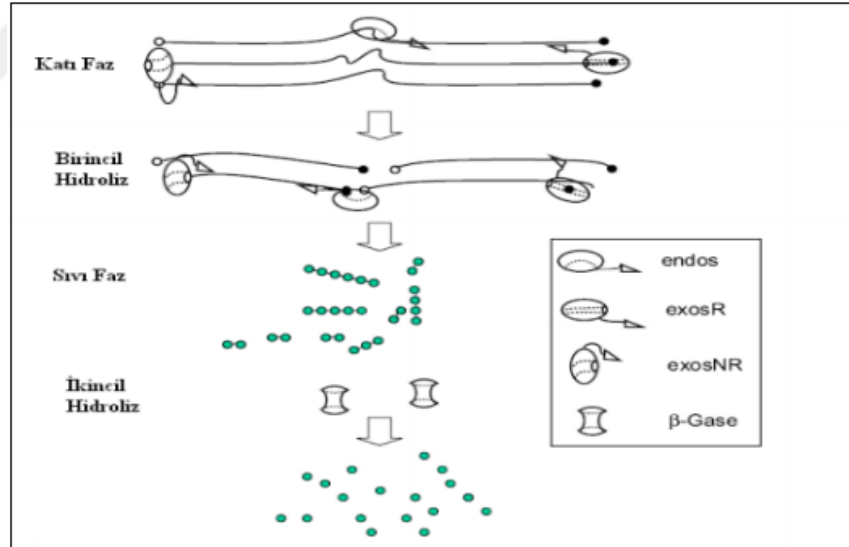
1.1.4 Sinerjizm

Selülitik enzimler arasındaki sinerji, iki veya daha fazla enzimin birleşik etkisinin, tek tek olan etkisinin toplamından daha yüksek bir etki hızına yol açtığı zaman ortaya çıkar (Mansfield *et al.*, 1999).

Kompleks olmayan selülitik sistemde endoglukanaz ve ekzoglukanaz enzimleri bir kombinasyon halindedir ve bireysel enzimlerin sinerjistik aktivitelerini içermektedir (Ohyima *et al.*, 1997).

Selülaz sistemi üç enzim grubundan oluşan (endoglukanaz, ekzoglukanaz ve β -glukozidaz) ve selülozun verimli bir şekilde degradasyonu için koordineli çalışan sistemlerdir (Lynd *et al.*, 2002).

Selülozun hidrolizinin ilk adımı endoglukanaz ve ekzoglukanaz tarafından katı substrat üzerinde, ikinci adım ise β -glukozidaz tarafından sıvı fazda gerçekleşmektedir (Zhang *et al.*, 2006; Andersen, 2007) (Şekil 1.18).



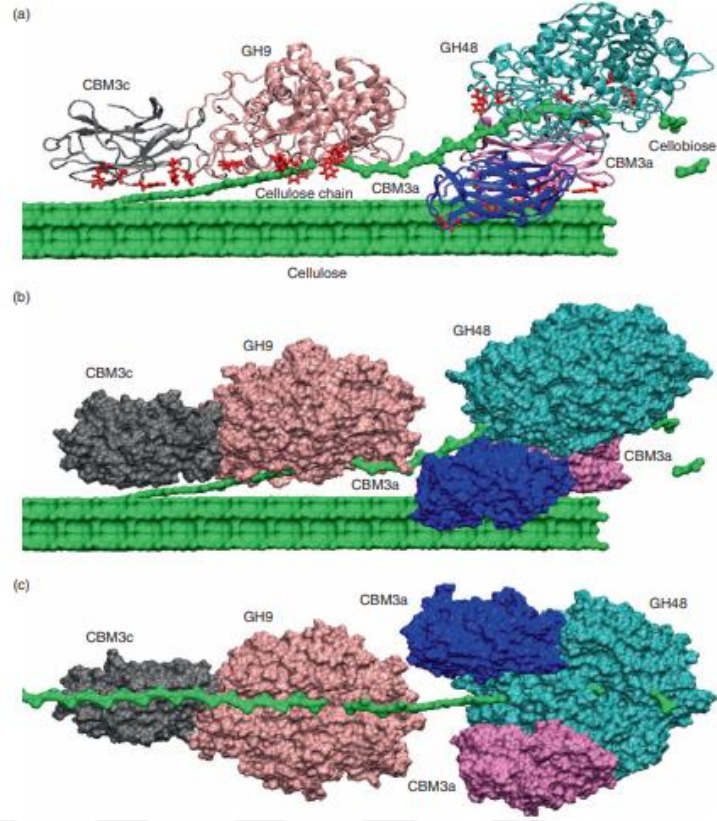
Şekil 1.18 Kompleks olmayan selülaz sistemi tarafından selülozun enzimatik degradasyonunun şematik gösterimi (Zhang *et al.*, 2006).

Selülaz sistemi, enzimlerin tek başına gösterdiği aktiviteden daha yüksek bir aktiviteye sahiptir. Sinerjizm olarak adlandırılan bu olgunun dört formu bulunmaktadır:

1. Endoglukanaz ve ekzoglukanaz arasındaki sinerji (Beldman *et al.*, 1988; Nidetzky *et al.*, 1993; Nidetzky *et al.*, 1994)
2. Ekzoglukanaz- ekzoglulanaz arasındaki sinerji (Henrissat *et al.*, 1985; Medve *et al.*, 1994)
3. β -glukozidaz ve ekzoglukanaz arasındaki sinerji
4. Katalitik alan ve selülaaz bağlayıcı alanlar arasındaki sinerji

Kompleks selülaaz sistemi diğeri bir adıyla selülozomların yapılarındaki selülaazlar arasında optimum düzeyde sinerjizm bulunmaktadır. Selülozomlar, selüloz hidroliz ürünlerinin hücreye olan mesafesini kısaltıp bu oligosakkaritlerin verimli bir şekilde hücre içine alınmasını sağlamaktadır (Bayer *et al.*, 1998).

Çok işlevli bir selülaazın varsayımsal etki mekanizması ve *A. thermophilum* Cel9A/Cel48A enziminin tüm modüllerinin (GH9-CBM3c-CBM3a-CBM3a-GH48) selüloz yüzeyindeki varsayılan sıralaması ve düzenlemesi Şekil 1.19'da gösterilmiştir. GH9 modülünün yarığındaki (aktif bölge) selüloz zinciri ve CBM3'lerin selüloz ile etkileşimi, tüm enzimin alt görünümünde (c) gösterilmektedir. Bu panelde bir dekrystalize selüloz zinciri görüntülenmektedir. Bu beş modül, kristalin selülozun hidrolizi için sinerjik olarak işlev görmektedir. Mavi ve leylak rengi ile gösterilen iki CBM3a, tüm enzim molekülünü selüloza bağlamak için kristalin selülozun bitişik yüzeylerine spesifik olarak bağlanmaktadır. Gri olarak gösterilen CBM3c'nin selüloz yüzeyini bozduğu ve pembe GH9'un rastgele bir dahili pozisyonda selüloz zincirini kırabileceği bildirilmektedir. Daha sonra kırık zincir, selüloz zincirinin selobiyoz hidrolize edildiği GH48 tünelinin girişine yönlendirilmektedir. Bu beş modüldeki varsayılan anahtar bağlama kalıntıları (a)'da kırmızı çubuk modelleri olarak gösterilmektedir. Tünelden çıkan iki sellobiyoz kalıntısı yeşil renkte gösterilmiştir. Uzatılmış modüler bağlayıcı peptitler ise gösterilmemiştir (Xu *et al.*, 2011).



Şekil 1.19 Çok işlevli bir selüloz enziminin varsayımsal etki mekanizması ve *A. thermophilum* Cel9A/Cel48A enziminin tüm modüllerinin (GH9-CBM3c-CBM3a-CBM3a-GH48) selüloz yüzeyindeki varsayılan sıralaması ve düzenlemesi (Xu *et al.*, 2011).

Saflaştırılmış selüloolitik enzimler arasındaki sinerji üzerine yapılan çok sayıda çalışma mevcuttur. Yapılan bu çalışmalar, sinerjinin tek tek enzimlerin oranına, substrat doygunluğuna yani enzim konsantrasyonuna ve substratın fizikokimyasal özelliklerine bağlı olduğunu doğrulamaktadır. (Woodward *et al.*, 1988; Nidetzky *et al.*, 1993; Henrissat *et al.*, 1985) Örneğin; mikrokristal selülozun hidrolizinde sinerjizm derecesinin belirlenmesi için selüloz konsantrasyonlarının rolü üzerine yapılan bir çalışmaya göre, *T. reesei*'den saflaştırılan Cel5A (EG II), Cel7A (CBH I) ve Cel6A (CBH II) enzimlerinden 20 µg/ml kullanıldığında optimum sinerjizm derecesi (DS) 2.03 elde edilmiştir. Enzim miktarları 10 µg/mL'ye düşürüldüğünde ise sinerjizm derecesi 1.49'a düştüğü görülmüştür. Daha yüksek enzim yüklemeleri kullanılarak, sinerji derecesinde ilave bir düşüş gözlenmiş ve bunun ekzoglukanazların (CBH) endoglukanazlara göre (EG) daha çok tercih edilen adsorbe edilmiş enzim olduğu ve rekabetçi adsorpsiyondan kaynaklandığı öne sürülmüştür (Woodward *et al.*, 1988).

Bir diğ er çalışmada ise; üç grup selülitik enzim arasındaki sinerji, Avicel ve fosforik asitte şişirilmiş selüloz / Avicel substratlarının hidrolizi üzerinden incelenmek istenmiştir. Çalışmada, *Humicola insolens* 'ten Cel45A (EG V) ve Cel6A (CBH II) enzimlerinin ve *Penicillium brasilianum* 'dan ise Cel3A (β -glukozidaz) enziminin farklı mol yüzdelerinin yirmi karışımı kullanılmıştır. β -glukozidazın fazla ilave edilmediği veya ilave edilmediği önceki çalışmaların aksine, burada maksimum toplam şeker üretimi için ikili ve üçlü selüloz karışımına (Cel3A'nın farklı mol yüzdeleri dahil) odaklanılmıştır. özünür hidroliz ürünlerinin konsantrasyonuna dayanan hassas hidroliz modelinin belirlenmesi ve ürünlerin tespitinin yapılmasında uygun metodun seçilmesinin önemi vurgulanmıştır (Andersen *et al.*, 2008).

1.1.5 Selülozların izolasyonu ve saflaştırılması

Enzimler çok çeşitli biyokimyasal yöntemler kullanılarak izole edilmekte ve saflaştırılabilmektedir. Enzimlerin izolasyon ve saflaştırılmasında her zaman etkili, en hızlı ve en ekonomik yöntemler belirlenmeye çalışılır. İzolasyon adımında genellikle homojenizasyon ve homojenatın hazırlanması, saflaştırma adımında ise deriştirme yöntemleri ve kromatografik teknikler kullanılmaktadır (Telefoncu, 1996.)

Selüloz kaynağı olarak mikrobiyal, hayvansal ve bitkisel kaynaklar seçilerek, bilinen genel ekstraksiyon yöntemleri ile enzim izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. Saflaştırılan bu enzimler farklı uygulama alanları için karakterize edilmiştir. İzolasyon ve saflaştırmada kullanılan teknikler; amonyum sülfat ve organik çözgen ile fraksiyonlama, ısı muamelesi, asidifikasyon, iyon değişim kromatografisi, jel kromatografisi ve izoelektirik fokuslama vb. olarak sıralanabilmektedir.

Selüloz enziminin izolasyon, saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarında mikrobiyal kaynak olarak *Trichoderma koningii* (Wood and McCrae, 1978), *Gloephyllum sepiarium* (EGS) ve *Gloephyllum trabeum* (EGT) (Mansfield *et al.*, 1998), *Melanocarpus albomyces*, *Myceliophthora thermophila*, *Chaetomium thermophilum* ve *Sporotrichum thermophilum* (Miettinen-Oionen *et al.*, 2003), *Trichoderma lignorum* (Baig *et al.*, 2004), *Trichoderma reesei* (Ahamed and Vermette, 2008), *Trichoderma virid* (Beldman *et al.*, 1985), *Pseudomonas fluorescens* (Bakare *et al.*, 2005), *Aspergillus niger* ve *Aspergillus nidulans* (Ali

and El-Dein, 2008), *Aspergillus heteromorphus* (Singh *et al.*, 2009), *Acremonium cellulolyticus* C-1 (Fang *et al.*, 2008), *Clostridium thermocellum* (Romeniec *et al.*, 1992), *Bacillus subtilis* (Kim *et al.*, 1997), *Paenibacillus campinasensis* BL11 (Ko *et al.*, 2010), *Bacillus licheniformis* (Aygan *et al.*, 2011), *Bacillus cereus* (Yan *et al.*, 2011) gibi kaynaklar kullanılmıştır.

Hayvansal kaynak olarak *Aulacophora atripennis*, *Aulacophora abdominalis*, *Chrotogonus trachypterus*, *Dysdercus koenigii*, *Aulacophora foveicollis*, *Oxya chinensis*, *Hieroglyphus banian*, *Coccinella scutellaris*, *Mylabris pustulata*, *Apis dorsata* ve *Apis mellifera* gibi böcek türleri (Sami and Shakoori, 2007), Japon deniz kestanesi (Nishida *et al.*, 2007) ve birkaç metazoan tarafından sentezlenen endojen selülazlar için bazı termitler, salyangozlar ve solucanlar örnek verilmektedir (Bignell *et al.*, 2011; Watanabe *et al.*, 1998; Watanabe and Tokuda, 2001). Bitkisel kaynak olarak bezelye (Wong *et al.*, 1977), avokado (Hatfield and Nevins, 1986) örnek kaynaklardır. Yakın zamanda, selülazlar *Chlamydomonas reinhardtii*, *Gonium pectorale* ve *Volvox carteri* gibi yeşil mikroalglerde de araştırılmış ve GH9 ailesine ait katalitik alanları (CD), metazoan endojen selülazlara yüksek sekans homolojisini gösterdiği bulunmuştur. Alg selülazları modülerdir ve bazı üyelerde varsayılan immunoglobulin (Ig) benzeri ve bilinmeyen alanlara ek olarak varsayılan yeni sistein bakımından zengin karbonhidrat bağlama modülleri (CBM'ler), prolin/serin (PS) bakımından zengin bağlayıcılardan oluşmaktadır. *Gonium pectorale*'den elde edilen selülazın, bağlayıcılar, bir C-terminal ve CBM ile ayrılmış iki CD'den oluştuğu bulunmuştur (Guerriero *et al.*, 2018). Bu kaynaklardan izole edilen enzimler için birden fazla saflaştırma yöntemi bir arada kullanılmıştır. Örneğin; *Trichoderma virid* selülazları için jel filtrasyon kromatografisi, anyon değişim kromatografisi, katyon değişim kromatografisi ve affinite kromatografisi yöntemleri kullanılmıştır (Beldman *et al.*, 1985). *Gloeophyllum sepiarium* (EGS) ve *Gloeophyllum trabeum* (EGT) endoglukanazları için; amonyum sülfat ile çöktürme, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri kullanılmıştır (Mansfield *et al.*, 1998). Avokado selülazı için ise izoelektrik odaklama ve jel filtrasyon yöntemleri kullanılmıştır (Hatfield and Nevins, 1986). Saflaştırılan selülazlar endüstriyel pek çok prosede uygulama alanı bulmuştur (Ko *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2011).

1.1.6 Selülafların fiziksel özellikleri

1.1.6.1 Selülafların multimoleküler formları ve moleköl kütleleri

Genellikle proteinlerin saflığının kontrolü, saf proteinin alt birim yapılarının incelenmesi ve moleköl kütleleri tayini için poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yöntemleri kullanılmaktadır. Poliakrilamid jel elektroforezinin en yaygın olarak kullanılanı Laemmli tarafından geliştirilen Sodyum Dodesil Sülfat Poli-Akrilamid Jel Elektroforezidir (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). SDS-PAGE ile proteinler biyolojik ve biyokimyasal aktivitelerini yitirmektedirler ve bu durumda doğal koşullar altında elektroforez (PAGE) tercih edilmektedir. Proteinlerin moleköl kütlelerinin belirlenmesinde kullanılan SDS-PAGE'ne alternatif bir metod olarak moleköl boyuta göre ayırma yapan jel filtrasyon kromatografisi kullanılmaktadır (Zihnioğlu, 1996).

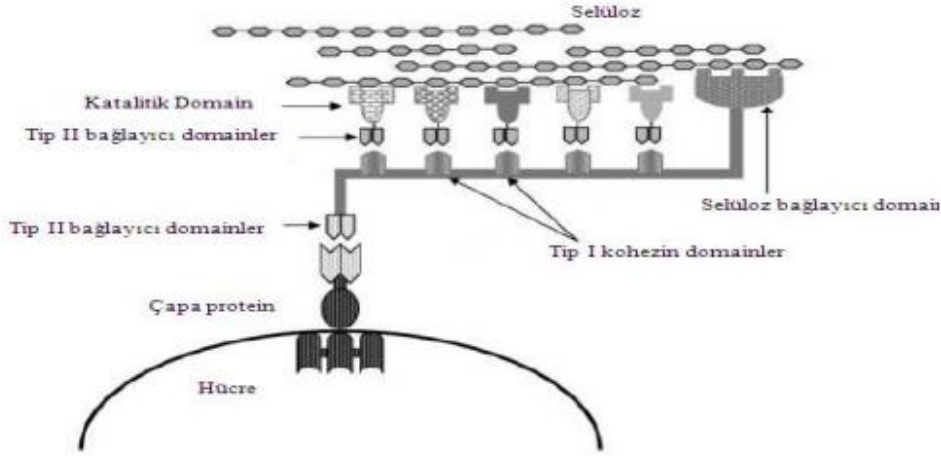
Selülafların moleköl kütleleri ve yapıları türden türe ve kullanılan metotlara bağlı olarak farklılık göstermektedir. Örneğin; *Aspergillus niger* ticari selülaflının SDS-PAGE ile moleköl ağırlığının 26 kDa olduğu bulunmuştur (Hurst *et al.*, 1977). *C. thermocellum*'dan bir endoglukanaz (1,4- β -D-glukan glukanohidrolaz, EC 3.2.1.4) saflaştırılmış ve SDS-PAGE ile moleköl ağırlığı 76 kDa olarak bulunmuştur (Romeniec *et al.*, 1992). Organik atık kompostundan *B. subtilis* CK-2 suşu saflaştırılmış ve saflaştırılan enzimin SDS-PAGE'te yaklaşık olarak 35,5 kDa ağırlığında olduğu görölmüştür (Aa *et al.*, 1994). İzole edilen iki endoglukanazın (*Gloeophyllum sepiarium* (EGS) ve *Gloeophyllum trabeum* (EGT) kaynaklı) saflaştırılması için çeşitli kromatografik yöntemler kullanılmıştır. EGS'nin moleköl kütleleri 45,1 kDa ve EGT'nin EGS ile benzerlik göstererek 40,5 kDa moleköl ağırlığında olduğu bulunmuştur (Mansfield *et al.*, 1998). Mutant *B. pumilus*'ın ürettiği enzim saflaştırılmış ve saflaştırılan bu enzimin SDS-PAGE ile 80 kDa ve jel filtrasyon kromatografisi ile de 170 kDa moleköl ağırlığında olduğu belirlenmiştir. (Kotchoni *et al.*, 2006). *T. viride* 'den izole edilen ticari selülaflardan, kitosanaz ve karboksimetil selülafl (CMCaz) enzimleri saflaştırılmış ve SDS-PAGE ile moleköl ağırlığının 66 kDa olduğu bulunmuştur (Liu and Xia, 2006). Deniz sularından karboksimetil selülozu hidrolizleyen mikroorganizmalar saflaştırılmıştır. Saflaştırılan karboksimetil selülaflın moleköl kütlelerinin SDS-PAGE ile 56 kDa civarında olduğu bulunmuştur (Kim *et al.*, 2009). *H. insolens* 'ten izole edilen Cel45A enziminin moleköl kütleleri SDS-PAGE ile 43 kDa iken, *H.*

insolens 'ten izole edilen Cel6A enziminin molekül kütlesi 65 kDa'dır (Andersen *et al.*, 2008). EG III (düşük moleküler kütleli endo- β -1,4-glukanaz) genini kodlayan genomik ve cDNA klonlarını *Trichoderma reesei* QM9414'ten izole edilmiştir. SDS-PAGE 'ni izleyen immüno blot analizi ile rekombinant EG III enzimlerinin molekül kütleleri sırasıyla; *E. coli*, *S. cerevisiae* ve *Schizosaccharomyces pombe* için 25, 28, 29 kDa olarak bulunmuştur. Maya rekombinant EG III enziminin parçalarının molekül kütlesinin, endoglukanaz H ve α -mannozidaz ile işlem den sonra 25 kDa'ya kadar düştüğü görülmüştür (Okada *et al.*, 1998). *Trichoderma virid*'den izole edilen selülaz enziminin homojen şekilde saflaştırılması DEAE-Sepharose anyon değişim kromatografisi ile gerçekleştirilmiş ve molekül kütlesi SDS-PAGE ile 87 kDa olarak bulunmuştur (Yasmin *et al.*, 2013). Pirinç çeltik tarla toprağından elde edilen *Bacillus sp.*, MSL2 suşundan izole edilen selülaz enzimi boyut dışlama kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan selülazın molekül kütlesinin, SDS-PAGE ve zimogram analizi ile 48 kDa olduğu görülmüştür (Sriariyanun *et al.*, 2016).

Kompleks selülaz sistemi selülozom olarak adlandırılmaktadır. Selülozomlar, hücre selülozik materyal üzerinde geliştiğı zaman selüloolitik bakterilerin hücre duvarında çıkıntı benzeri yapılar oluşturmaktadır. Farklı mikroorganizmlardan elde edilen selülozomlarla yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Sonuç olarak, her ne kadar selülozom içeriğı türden türe değışiklik gösterse de mikroorganizmaların selülozomlarının aynı yapıyı gösterdiği bulunmuştur (Lynd *et al.*, 2002

C.thermocellum selülozomunun yapısı, biyokimyasal, immunokimyasal, ultrayapısal ve genetik teknikler kullanılarak çözülmüştür. (Bayer *et al.*, 1994).

Selülozom 197 kDa ağırlığında olup büyük ve katalitik olmayan iskelet proteini (CipA) içermektedir. 9 kohesin, 4 X-modülü (hidrofilik modül) ve selüloz bağlayıcı alan (CBM) içeren bu protein multidomainli bir yapıdır. Katalitik kısımlar selülozom oluşturmak için bağlayıcı (dockerin) kısımları ile CipA proteininin kohesini ile birleşmektedir (Şekil 1.20). Katalitik alanların iskelet protein üzerinde birleşimleri, içerikleri ve sinerjistik aktivite gibi yetenekleri netlik kazanamamıştır. Selülozom bileşiminin değışebileceğı ve katalitik alanların belirli kohesinlere bağlanmadığı varsayılmaktadır (Bèguin and Lemaire, 1996).



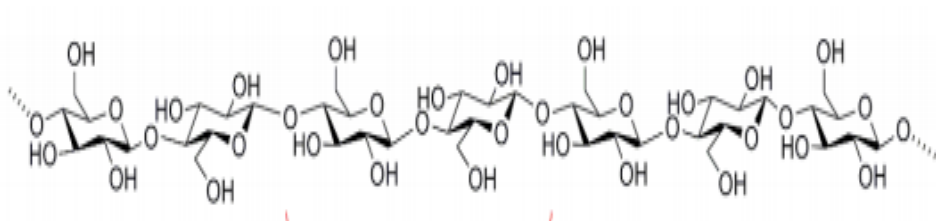
Şekil 1.20 *C. thermocellum*'a ait selülozomun selüloz üzerindeki etkisi (Pérez *et al.*, 2002).

Selülozomlar kararlı ve büyük komplekslerdir. Molekül kütleleri 2-16 MDa ve poliselülozom olduğunda ise 100 MDa'a ulaşmaktadır. Selülozomların özellikle iskelet kısımları büyük ölçüde glikozillenmiştir (Bèguin and Lemaire, 1996; Coughlan, 1990; Schwarz, 2001). Selülozomların proteazlara karşı korumasında ya da kohesin-dockerin tanınmasında glikozil grupları görev almaktadır (Gerwig *et al.*, 1993).

1.1.7 Selülazların kinetik özellikleri

1.1.7.1 Selülazların aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisi ve substrat spesifiklikleri

Selüloz, D-anhidroglukopiranoz birimleri ve bu birimlerin β -1,4-glikozidik bağlarla bir araya gelmesiyle oluşmuş lineer yapıya sahip bir polimerdir (Şekil 1.21).



Şekil 1.21 Selülozun yapısal olarak tekrarlayan sellobiyoz birimleri (Andersen, 2007).

Selülozun enzimatik degradasyonunu etkileyen faktörler iki grupta incelenmektedir. Bunlar enzimle ilgili faktörler; enzim konsantrasyonu, adsorpsiyon, sinerji gibi (Andersen, 2007) ve substrat ile ilgili faktörler; kristalizasyon yüzdesi (CrI), polimerizasyon yüzdesi (DP), erişilebilirlik şeklinde sıralanabilmektedir. Kristalizasyon yüzdesi substrat reaktivitesinin bir göstergesi olarak belirtilmektedir. Selülozik substratların polimerizasyon derecesi (DP) ise uç ve iç kısımlardaki β -glukozidik bağların çokluğuyla ifade edilir (Zhang and Lynd, 2004).

Selülaz aktivitesini belirlemede kullanılan substratlar çözünür ve çözünür olmayan türdedir. Çözünür substratlar düşük polimerizasyon derecesine sahip sellodektrinler, 2-6 şeker biriminden oluşan şeker yapıları ve onların türevleri ile CMC gibi uzun polimerizasyon derecesine sahip selüloz türevleridir (Zhang *et al.*, 2006). Selülaz aktivitesi için çözünür olmayan substratlar; mikrokristal selüloz gibi saflığa yakın selülozlar ve α -selüloz saf olmayan selülozlardır.

Farklı kaynaklardan saflaştırılan selülazların çeşitli substratlara karşı gösterdiği spesifiklikler farklı çalışmalarda incelenmiştir. Hücre dışı bir endoglukanaz, ksilanaz üreten *Aspergillus niger* BO3 suşunun kültür sıvısından izole edilmiştir. Enzimin substrat spesifikliği; karboksimetil selüloz, filtre kağıdı ve farklı glikozidler kullanılarak belirlenmiştir. İzole edilen endoglukanaz enzimi, 21.01 mg/mL K_M değeri ile karboksimetil selülozda maksimum aktivite göstermiştir (Dobrev and Zhekova, 2012). GH12 endoglukanazları, genellikle çözünür ve çözünmez substratlara karşı farklı aktiviteler sergilemektedir. EglA'nın CMC'ye yönelik aktivitesi; Whatman® kağıdı ve Avicel®'e yönelik aktivitelerinden sırasıyla 14 kat ve 145 kat daha yüksek bulunmuştur (Bauer *et al.*, 1999). *T. neopolitana*'dan izole edilene iki endoglukanaz CelA ve CelB enzimlerinin, amorf selüloza kıyasla CMC'ye sırasıyla 130 kat ve 40 kat daha fazla aktivite görülmüştür (Bok *et al.*, 1998). *Gloephyllum trabeum*' dan izole edilen Cel12A enziminin de CMC'ye yönelik amorf çözünmez selüloza (fosforik asitte şişirilmiş selüloz) olandan 800 kat daha fazla aktivite gösterdiği bulunmuştur (Cohen *et al.*, 2005).

Yüksek karboksimetil selüloz indirgeme aktivitesi gösteren bir *Bacillus subtilis* suşu olan BEC-1, orman toprağı örneğinden izole edilmiştir. Biyokimyasal özelliğini karakterize etmek için endoglukanaz geni Egl173 suştan klonlanarak *Escheria coli*'de eksprese edilmiştir. Saflaştırılmış Egl173'ün farklı aktivitelerle; CMC, filtre kağıdı, β -glukan, metil-selüloz, kitin gibi hem çözünür hem de çözünür olmayan selülozları hidrolize ettiği görülmüştür (Zhu *et al.*, 2011). Termofilik bakteri *Acidothermus cellulolyticus* 11B ABK52392 rekombinant AcCel12B enziminin çeşitli substratlar üzerine etkisi araştırılmıştır. Rekombinant AcCel12B 'nin arpa β -glukanlarına (β -1,3-1,4 bağlantıları) karşı yüksek spesifik aktivite gösterdiği bulunmuştur. AcCel12B; CMC, RAC ve Avicel®'e karşı da yüksek aktivite gösterirken, laminarin (β -1,3 bağı), nişasta (α -1,4 bağı) ve ksilana (β -1,4 bağı ksiloz alt birimleri) karşı bir aktivite göstermemiştir. Sodyum karboksimetil selüloz (CMC) ve rejenere amorf selüloz (RAC) için hidrolitik aktivite değerleri sırasıyla 118,3 ve 104,0 U/mg olarak bulunmuştur. CMC için K_M ve V_{max} değerleri de sırasıyla 25,47 mg/mL ve 131,75 U/mg olarak hesaplanmıştır (Wang *et al.*, 2015). Geniş substrat spesifikliğinin fungal β -D-glukozidazların genel özelliklerinden olduğu bilinmektedir. *H. grisea* var. *thermoidea*'dan izole edilen β -D-glukozidaz enziminin geniş substrat spesifikliği incelenmiştir. Enzimin; pNP-Fuc, pNP-Gal, pNP-Glc gibi sentetik substratlar üzerinde daha etkili olduğu görülmüştür. Sentetik substratların yüksek hız ve affinite üzerinde daha etkili olmasının fungal kaynaklı β -D-glukozidazların kinetik özelliklerinden olduğu bilinmektedir. (Nascimento *et al.*, 2015). Çizelge 1.1'de çeşitli kaynaklardan izole edilen selülazlar için hesaplanan K_M değerleri verilmiştir.

Çizelge 1.1 Çeşitli kaynaklardan izole edilen selülozlar için hesaplanan K_M değerleri.

Selüloz Kaynağı	Selüloz	Substrat	K_M	Referans
<i>Melanocarpus sp.</i> MTCC 3922	EG I	CMC	20 mg/mL	Kaur <i>et al.</i> , 2007
	EG II	CMC	13,3 mg/mL	
	EG I	Barley- β -glukan	2,0 mg/mL	
	EGII	Barley- β -glukan	6,66 mg/mL	
<i>Aspergillus niger</i> B03	Ekstraselüler selüloz	CMC	21,01 mg/mL	Dobrev and Zhekova, 2012
<i>Jonesia quinghaiensis</i>	Endoglukanaz (JgCel5A)	CMC	8,69 mg/mL	Lin <i>et al.</i> , 2016
<i>Peniophora sp.</i> NDVN01	Endoglukanaz	Barley- β -glukan	5.9 mg/mL	Trinh <i>et al.</i> , 2013
		CMC	34.8 mg/mL	
<i>Trichoderma viride</i>	Selüloz	Selüloz	0,31 mg/mL	Aung <i>et al.</i> , 2001
		CMC	0,35 mg/mL	
		Pamuk fibrili	0,33 mg/mL	
<i>Aspergillus oryzae</i>	β -glukozidaz	p-NP β G Sellobiyoz	0,55 mM 7,0 mM	Riou <i>et al.</i> , 1998
<i>Bacillus sp.</i> MSL2	CMCaz	CMC	0.8 mg/mL	Sriariyanun <i>et al.</i> , 2016
<i>Bacillus subtilis sp.</i> BC1	Ekstraselüler selüloz	CMC	1,243 mg/mL	Dehghanikhah <i>et al.</i> , 2020
<i>Bacillus circulans</i>	Avicelaz I	Avicel	87 mg/mL	Kim ,1995
<i>Caldibacillus cellulovorans</i>	CMCaz	CMC	3,4 mg/mL	Huang and Monk, 2004

1.1.7.2 Selüloz aktivitesi ve kararlılığına sıcaklığın etkisi

Tüm kimyasal reaksiyonlar gibi enzim katalizli reaksiyonlar da sıcaklığa bağımlıdır ve reaksiyonun hızı sıcaklıkla artış göstermektedir. Bu artış durumu sürekli değildir. İnkübasyon süresine bağımlı olarak önce bir duraklama ve sonrada gerileme göstermektedir. Protein yapısındaki enzimler sıklıkla denatürasyona uğramaktadır. Belirli çalışma koşullarında farklı sıcaklıklarda enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa *optimum sıcaklık* denir. Optimum sıcaklık inkübasyon süresine bağımlı bir parametredir (Telefoncu, 1986).

Selülozlar da kaynaklarına bağlı olarak çeşitli kararlılık dereceleri gösterirler. Genellikle selülozların çoğunun optimum sıcaklık değeri 40-50°C arasında değişmektedir. Fakat mikrobiyal kaynaklı termostabil selülozlar için bu değer 50°C'nin çok üstüne de çıkabilmektedir. Örneğin; *Trichoderma sp.* IS-05'in (Andrade *et al.*, 2011) optimum sıcaklık değeri 60° C iken, *Paenibacillus alvei*

(Mostafa *et al.*, 2020), *Bacillus vallismortis* RG-07 (Gaur and Tiwari, 2015) selülaazları için optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 70 ve 95°C olarak belirlenmiştir.

Trichoderma sp. IS-05 suşundan elde edilen selülaaz enziminin optimum sıcaklık, pH ve kararlılık değerleri incelenmiştir. Selülaaz enziminin pH 3,0 ve 60 °C'de optimum değerlere ulaştığı görülmektedir. 60 °C'de 4 saatlik inkübasyon sonunda da termal kararlılık göstermekte ve maksimum aktivitesinin % 59,6'dan fazlasını korumaktadır. *Trichoderma sp.* IS-05 suşunun biyoetanol üretimi için uygun koşulları sağladığı görülmektedir (Andrade *et al.*, 2011).

Beyaz çürükçül bir fungus olan *Pycnoporus sanguineus*'tan izole edilen endoglukanaz, β -glukozidaz ve FPaz (filtre kağıdı aktivitesi) enzimlerinin aktiviteleri 30-80°C aralığında incelenmiştir. Her bir enzimin optimum değerinin farklı sıcaklıklarda olduğu belirlenmiştir. Endoglukanaz için optimum sıcaklık 60°C, FPaz ve β -glukozidaz için ise 55°C olarak bulunmuştur. 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda FPaz ve β -glukozidaz aktivitelerinde önemli ölçüde azalma gözlenirken, endoglukanaz aktivitesinin 70°C'de %83 olduğu görülmüştür. Enzimlerin termal kararlılığı 40, 50 ve 60°C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta 48 saatlik bir inkübasyondan sonra incelenmiştir. 40° C'de tüm selülaaz enzimleri iyi bir termal kararlılık gösterip aktivitelerini önemli ölçüde korurken 50°C'de özellikle β - glukozidaz aktivitesinde hafif bir düşüş gözlenmiştir. 60°C'de ise aktivitelerde belirgin azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar, *P. sanguineus* kaynaklı endoglukanazların tekstil endüstrisi gibi yüksek sıcaklık gerektiren endüstriyel proseslerde kullanılabilceğini göstermektedir. Ayrıca 40-50°C'de yüksek termal kararlılık göstermesi selülaazların biyokütle dönüştürme işlemlerinde kullanılmak üzere yeterli özelliklerde olduğunu da açıklamaktadır (Falkoski *et al.*, 2012).

Karbon kaynağı olarak *Eichhorna crassipes* (su sümbülü) kullanılarak yerel fungus izolatından saflaştırılan selülaaz enziminin boya degradasyon potansiyeli incelenmiştir. Sıcaklığın selülaaz aktivitesine etkisi 30-80°C aralığında araştırılmıştır ve optimum sıcaklık 40°C olarak bulunmuştur. 40°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda termal kararlılıktaki azalmanın sıcaklığa bağlı denatürasyondan kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Yapılan çalışma boya giderme işlemi için

fungus biyokütlesinin tekrar kullanılabilceğini göstermektedir (Talekar *et al.*, 2011).

Gryllotalpa africana'nın selülitik bağırsak izolatu olan *Acinobacter junii* GAC 16.2'den saflaştırılan selülaz enziminin optimum sıcaklık değeri 50 °C olarak bulunmuştur. GAC 16.2 selülazı, pH 6,0-9,0 ve 40-60°C sıcaklık aralıklarında % 60'ın üzerinde kararlılık göstermiştir. *A. junii* GAC 16.2 selülazının selülozik atıkları parçalama potansiyelinin endüstriyel uygulamalarda etkili bir biyoteknolojik araç olarak kullanılabilceği düşünülmüştür (Banerjee *et al.*, 2020).

Farklı termal su örneklerinden izole edilen termofilik *Bacillus* suşları kaynaklı enzim aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada yüksek sıcaklıklarda aktivite gösteren enzimleri üreten birkaç suş tanımlanmıştır. İzole edilen B62 ve B120 suşlarının her ikisinin de amilaz, proteaz, selülaz, ksilanaz ve mannaz enzimlerini ürettiği görülmüştür. B100 suşundan izole edilen selülaz enziminin *Geobacillus sp.* T1 ile benzer özellikler gösterdiği ve 70 °C'de en yüksek aktivite değerini gösterdiği bulunmuştur. B22 ve B160 suşlarından izole edilen selülaz enzimleri ise 90 °C'de yüksek aktivite göstermiştir. Sonuçlar doğrultusunda yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen biyoteknolojik prosesler için uygun türlerden olabileceği ifade edilmiştir (Thebti *et al.*, 2016).

Fungus kaynaklı ürün kaybını önlemek amacıyla kimyasal fungusitlere alternatif olarak bitkisel fungusit kullanılmasının ekolojik açıdan daha güvenli olacağı düşünülerek yeni stratejiler geliştirilmiştir. Yapılan çalışmada; *Kaempferia angustifolia* Rosc., dar yapraklı tavus kuşu zencefilinin sulu yaprak ekstresi kullanılarak bitkiler üzerinde zararlı etkileri olan *Fusarium oxysporum*'un yayılmasını kontrol etmek amaçlanmıştır. *Neurospora crassa* 987A ve 988A ve *Fusarium oxysporum* suşlarından selülaz üretimi gerçekleştirilmiştir. *N. crassa* ile *F. oxysporum*'un selülitik inhibisyonunu karşılaştırmak için *N. crassa* kontrol amaçlı kullanılmıştır. Optimum sıcaklık denemeleri her enzimin optimum pH değerinde gerçekleştirilmiştir. *N. crassa* 987A için pH 6,0 fosfat tamponu ve 70°C optimum değerler olarak bulunurken *F.oxysporum* için pH 4,0 asetat tamponu ve 60°C optimum değerler olarak bulunmuştur (Basak and Rangan, 2018).

β -glukozidaz, selülaz enzim kompleksinin önemli bir bileşenidir. Sellobiyozu ve kısa zincirli selooligosakkaritleri glukozu hidrolize etmenin yanı sıra sellobiyozun, β -1,4-endoglukanaz ve ekzoglukanaz üzerindeki inhibisyonunu da önlemektedir. *Penicillium simplicissimum*'dan izole edilen β -glukozidaz enziminin optimum sıcaklık değerini belirlemek için; 30, 40, 50, 60, 70 ve 80 °C'de çalışılmıştır. Optimum sıcaklık değerinin 60°C olduğu ve sıcaklık 60°C'nin üzerine çıkarıldığında aktivitede keskin bir düşüş olduğu görülmüştür. Enzim, 50°C'de 4 saatlik bir ön inkübasyon boyunca iyi bir termal kararlılık göstermiştir. 80°C ve daha yüksek sıcaklıkların ise enzim denatürasyonuna neden olduğu gözlenmiştir. Enzimin, 50°C'de 4 saat boyunca gösterdiği kararlılık lignoselülozik biyokütlelerin enzimatik hidrolizi sırasında kullanımı için oldukça uygun özellikte olduğu belirtilmiştir (Bai *et al.*, 2013).

Bacillus kaynaklı alkalın selülazların çoğu 40°C-6 °C arasında maksimum aktivite göstermektedir. Termal kararlılık analizleri enzimin 20°C-45°C sıcaklık aralığında oldukça kararlı olduklarını göstermiştir. *Bacillus subtilis* AS3 alkalın selülazının optimum sıcaklık değeri 45°C bulunurken, enzimin 20-45°C aralığında yüksek kararlılık gösterdiği görülmüştür. Enzim 60°C'de, 30 dakikalık inkübasyon sonrasında aktivitesinin % 50'den fazlasını, 60 dakikalık inkübasyon sonrasında ise % 40'ını korumaktadır. 80°C'de 60 dakikalık bir inkübasyon sonrasında ise enzim aktivitesi gözlenmemektedir (Deka *et al.*, 2013).

Büyük endüstriyel uygulamalar için oldukça önemli olan selülaz enziminin üretimi için farklı deniz aktinomisetleri incelenmiştir. En yüksek verimde enzim üretimi *Streptomyces ruber*'de olmuştur ve optimum sıcaklık değeri 40°C olarak belirlenmiştir (El-Sersy *et al.*, 2010). Çizelge 1.2'de çeşitli selülazların termal kararlılıkları ile ilgili bazı sonuçlar verilmiştir.

Çizelge 1.2 Selülozların termal kararlılıkları.

Selüloz kaynağı	Sıcaklık (° C)	Zaman (saat)	Aktivite kaybı (%)	Referans
<i>Pseudomanas sp.</i>	50	1	0	Goel <i>et al.</i> , 2019
<i>Neurospora crassa</i> (ekzoglukanaz)	50	6	30	Yazdı <i>et al.</i> , 1990
<i>Jonesia quinghaiensis</i> JgCel5A	60	1	20	Lin <i>et al.</i> , 2016
<i>Thermobifida fusca</i> UPMC901	70	24	6	Zaunidin <i>et al.</i> , 2019
<i>Trichoderma sp.</i> IS-05	60	4	40,4	Andrade <i>et al.</i> , 2011
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	40	1	0	Hamdan and Jasim,2018
<i>Paenibacillus alvei</i> (CMCaz)	70	1	4,34	Mostafa <i>et al.</i> , 2020
<i>Bacillus vallismortis</i> RG-07	95	1	5	Gaur and Tiwari, 2015
<i>Neurospora crassa</i> (β-glukozidaz)	55	36	80	Yazdı <i>et al.</i> , 1990

1.1.7.3 Selüloz aktivitesi ve kararlılığına pH'ın etkisi

Enzimlerin aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden bir diğeri de pH'dır. İnkübasyon ortamının pH'sı, protein molekülünün tamamının yük ve dissosiasyon durumu yanında aktif merkezini de etkilemektedir. pH etkisi ile, enzim proteinin tersinir olmayan denaturasyonu ve optimum pH bölgesi dışında koenzim veya prostetik grupların aktif merkezden ayrılması gibi durumlar görülebilmektedir. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri pH, *optimum pH* olarak adlandırılmaktadır. H⁺ iyonu konsantrasyonundaki değişim özellikle aktif merkezinde asidik veya bazik gruplar taşıyan enzimler, hidrolazlar için oldukça önemlidir ve enzimin aktivite gösterdiği pH skalası ise oldukça dardır (Telefoncu, 1986).

Selülozların optimum pH değerleri kullanılan enzim kaynağına, substrata, inkübasyon zamanı ve sıcaklığına göre oldukça geniş bir aralıkta farklılık göstermektedir.

Selülaz aktivitesine pH etkisini belirlemek için yapılan çalışmalarda yaygın olarak çözümlü substrat kullanımı tercih edilmektedir. Birçok çalışmada pH 4,0-5,0 arasında çan şeklindeki pH profilleri bildirilmektedir. Saf selüloza etki eden selülazların, çözümlü ve çözümlü substratlar üzerinde pH profillerindeki farklılıklar tespit edilmiş fakat sistematik bir tablo ortaya çıkmamıştır. Kullanılan substratın doğası ve kinetik parametreler üzerindeki ayırt edici özelliği nedeni ile pH etkisi sistematik bir çalışma gerektirmektedir. Bu doğrultuda, hem çözümlü hem de çözümlü substratlar için farklı sıcaklık aralıklarında pH çalışmaları yapılmıştır. pH'nin enzimatik aktivite üzerine etkisini incelemek amacıyla; *Trichoderma reesei*'den Cel7A, Cel7B, Cel6A ve *Rosamsonia emersonii*'den Cel7A enzimleri saflaştırılmıştır. pH 2,0-7,0 ve sıcaklık 20°C-70°C arasında değiştirilmiş ve farklı konsantrasyonlarda hem çözümlü pNPL (4-nitrofenil-D-laktopiranosid) hem de çözümlü olmayan Avicel kullanılmıştır. Çözümlü olmayan Avicel kullanıldığında her iki Cel7A enziminin asidik koşullara tolerans gösterdiği gözlenmiştir. pNPL kullanıldığında ise, dört enzimin tümü için optimal pH'nin hem üstünde hem de altında ciddi bir aktivite kaybı olmuştur. Optimum pH ise her iki substrat türü için pH 4,0-5,0 değerleri arasında bulunmuştur. Yapılan çalışmada, selülaz aktivitesi üzerine pH etkisinin genel karakterizasyonu için çözümlü substratların yaygın olarak kullanılması gerektiği vurgulanmaktadır (Røjel *et al.*, 2019).

Selülaz aktivitesine pH'nin etkisinin anlaşılması, pH etkisinin enzim kaynağı ve substrata göre değişiminin incelenmesi açısından oldukça önemlidir. *Clostridium straminissolvens* (CSK1) bakteri suşundan izole edilen selülaz enzim aktivitesi CMC varlığında pH 2,0-12,0 arasında incelenmiş ve optimum pH değeri 6,0 olarak bulunmuştur. pH 5,0-10,0 arasında enzimin % 90'dan daha fazla aktivite gösterdiği ve nötre yakın pH değerlerinde nispeten daha kararlı olduğu görülmüştür (Wang *et al.*, 2017). *Bacillus subtilis* Bc1'den izole edilen hücre dışı selülazının optimum pH değeri ve kararlılığı incelenmiş ve optimum pH değeri 8,0 olarak bulunmuştur. Ayrıca sonuçlarda, enzimin pH 4,0-10,0 gibi geniş bir aralıkta oldukça kararlı olduğu ve aktivitesinin % 75'ini koruduğu tesbit edilmiştir (Dehghanikhah *et al.*, 2020). *Bacillus coagulans* karboksimetil selülazının ise geniş bir pH aralığına sahip olduğu bulunmuş ve optimum pH değeri ise 6,0 olarak belirlenmiştir. Alkali pH değerlerinde ise aktivitede azalma görülmektedir (Odeniyi *et al.*, 2009).

Fungal selülaazlar için optimum pH değeri türden türe değişim göstermektedir. Çoğu zaman bu değişim pH 3,0-6,0 arasındadır fakat farklı pH aralıkları da mevcuttur. *Aspergillus niger* NRRL 567'den saflaştırılan ekzoglukanaz ve endoglukanaz enzimleri için optimum pH değeri pH 3,5 (Ghori *et al.*, 2012), *Trichoderma longibrachiatum* selülaazının optimum pH'sı 4,8 ve pH 3,0-6,0 aralığında kararlı (Pachauri *et al.*, 2018), *Rhizopus oryzae*'den saflaştırılan iki hücre dışı endoglukanaz enzimleri için optimum pH 5,0-6,0 arasında bulunurken (Murashima *et al.*, 2002); *Aspergillus niger*'den saflaştırılan Fpaz, CMCaz ve β -glukozidaz enzimleri için optimum pH 6.0-7.0 ve *Trichoderma sp.*'den saflaştırılan aynı enzimler için optimum değer pH 6,5 olarak bulunmuş ve enzim aktivitelerinin de pH 5,0-8,0 arasında kararlı olduğu belirlenmiştir (Gautam *et al.*, 2010). *Aspergillus terreus*'tan saflaştırılan selülaaz enzimi için ise optimum pH değerinin pH 4,0-7,0 arasında olduğu bildirilmiştir (Megha *et al.*, 2015). Çeşitli selülaazların optimum pH değerleri Çizelge 1.3'te verilmiştir.

Çizelge 1.3 Selülaazların optimum pH değerleri.

Selülaaz kaynağı	Selülaaz	Substrat	Optimum pH	Referans
<i>Clostridium straminisolvans</i> (CSK1)	Selülaaz	CMC	6,0	Wang <i>et al.</i> , 2017
<i>Cellulomonas sp.</i> ASN2	Endoglukanaz	CMC	7,5	Irfan <i>et al.</i> , 2012
<i>Tribolium castaneum</i>	Endoglukanaz	Agar ve CMC	4,8 ve 6,8	Rehman <i>et al.</i> , 2009
<i>Helminthosporium sp.</i>	Selülaaz	Filtre kağıdı	3,0	Sivaramanan, 2014
<i>Bacillus subtilis</i> 1AJ3	Cel5A	-----	4,5	Ma <i>et al.</i> , 2020
<i>Rasamsonia emersonii</i>	Cel7A	Avicel	4,5	Røjel <i>et al.</i> , 2019
<i>Aspergillus niger</i> IFO31125	Endoglukanaz	CMC	6,0	Akiba <i>et al.</i> , 1995
<i>Aspergillus terreus</i> M11	Endoglukanaz	Filtre kağıdı	2,0	Gao <i>et al.</i> , 2008
<i>Aspergillus oryzae</i>	β -glukozidaz	pNPG	5,0	Riou <i>et al.</i> , 1998
<i>Penicillium simplicissium</i> H-11	β -glukozidaz	Salisin	4,4-5,2	Bai <i>et al.</i> , 2013

1.1.7.4 Selülaaz aktivitesine çeşitli kimyasallar ve inhibitörlerin etkisi

İnhibitörler enzimatik reaksiyonun hızını azaltan yada yok eden maddelerdir. İnhibisyon oluşturan maddelerin etki şeklinin belirlenmesi sonucunda söz konusu enzimlerin metabolizmadaki önemlerini aydınlatılmak için inhibisyon çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bazı durumlarda inhibitörlerin faydaları da söz konusudur. Birçok enzim için spesifik inhibitörler üretilmektedir. Bu inhibitörler kontaminasyona neden olan ve ana enzim preparatından ayrılması güç veya imkansız olan enzim aktivitelerinin ortadan kaldırılmasında kullanılmaktadır (Telefoncu, 1986).

Selülaazlarla yapılan inhibisyon çalışmaları genel olarak; metal iyonları, kimyasal ve organik bileşikler, şekerler ve türevleri üzerine olmuştur. Metal iyonları, aminoasitlerin amino veya karboksilik asit grubu ile etkileşime girerek enzimatik aktiviteyi etkinleştirme veya inhibe etme özelliği göstermektedir (Ishida *et al.*,1980). Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Hg^{+2} ve Fe^{+3} gibi mono-, di-, trivalent metal iyonları selülaazların karakterizasyon çalışmalarında yaygın olarak incelenmiştir (Mandels and Reese, 1965). Yapılan bir çalışmada, otlar beslenen bir süt ineğinin rumenindeki bakteri topluluğundan selülaaz enzimlerini tanımlamak için işlevsel metagenomik tarama gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda izole edilen rekombinant Cel14b22 enziminin aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi incelendiğinde; aktivitenin Mn^{+2} ile önemli ölçüde arttığı, Cu^{+2} ve Fe^{+3} ile de önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Gong *et al.*, 2012). Karbon kaynağı olarak şeker pancarı küspesinin kullanıldığı ortamda büyütülen *A. glaucus* XC9 endoglukanazının, kültür filtratı ile yapılan bir çalışmada, enzim aktivitesinin Fe^{+2} ve Mn^{+2} iyonları ile artarken Cd^{+2} , Pb^{+2} ve Cu^{+2} iyonları ile aktivitenin inhibisyona uğradığı görülmüştür (Tao *et al.*, 2010). Bir başka çalışmada ise, *Trichoderma sp.* IS-05 suşundan izole edilen selülaaz enzimlerinin; Co^{+2} , Cu^{+2} ve Mn^{+2} varlığında inhibe olduğu ve aktivitelerinin azaldığı gözlenmiştir. Bu iyonların, birçok mikrobiyal selülaaz için inhibitör etkisi gösterdiği de bilinmektedir (Andrade *et al.*,2011). Ayrıca EDTA (etilen diamin tetra asetik asit), β -merkaptotanol ve DPPE (1,2-bis difenilfosfino-etilen) gibi şelatlama ajanları, inhibitörlerin metal iyonları ile kompleks oluşturarak bazı enzim aktivitelerini özellikle selülaazları aktive veya inhibe edebilmektedir (Miyano *et al.*, 1985). Örneğin; *Bacillus vallismortis* RG-07

selülaı EDTA ile aktive olurken (Gaur and Tiwari, 2015), *Trichoderma viride* selülaı EDTA ile inhibe olmaktadır (Igbal *et al.*, 2011).

İki değerkli iyonların selülaı üzerindeki etkisi net bir şekilde aydınlatılamamıştır. Aminoasitler üzerinde redoks etkisi göstererek aktiviteyi arttırdıkları veya azaltıkları düşünölmektedir (Tejirian *et al.*, 2010). İyonik yükün yanı sıra, iyon yarıçapının enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerinde etkisi oldukça büyüktür. Büyük yarıçapın katalitik aminoasitler üzerinde etkisi daha az iken, küçük yarıçapın ise enzimin genel yapısını değıştiren yüklü aminoasitler üzerinde daha yoğun bir çekim kuvveti uyguladığı görölmüştür (Coolbear *et al.*, 1992; Zeng *et al.*, 2014). Selülaı aktivitesine çeşitli bileşiklerin etkisi Çizelge 1.4'te verilmiştir.

Kimyasal ve organik bazı bileşikler de selülaı aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi göstermektedir. İzopropanol, dimetilformamid (DMF) gibi organik çözücüler, 2,3-diklorür-1,4-naftokinon gibi ilaçlar, fenilmerkürük asetat ve etilen-bis-ditiyokarbamat gibi fungusitler, fenilmerkürük nitrat ve 8-hidroksikinolin gibi dezenfaktan ve antibiyotikler, Triton X-100 ve Tween 20, 40, 60, 80 ve 100 gibi non-iyonik yüzey aktif maddeler ve sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi iyonik yüzey aktif maddeler, şeker ve türevleri, fenolik bileşikler, oksin gibi bitki hormonları, oktil gallat gibi gıda katkı maddeleri, sodyum azid gibi iyonik katılar aktiviteye etki eden bileşikler olarak sıralanmaktadır (Reese and Mandels, 1957; Li *et al.*, 2013; Hsieh *et al.*, 2015; Azadian *et al.*, 2017).

Bacillus sonorensis HSC7 selülaının aktivitesine organik çözücülerin etkisi incelendiğinde enzimin metanol, kloroform ve dietileter ile aktive olduğu; izopropanol ve DMF ile inhibe olduğu görölmüştür (Azadian *et al.*, 2017). Vanilin, trans-sinamik asit, hidroksibenzoik asit, tannik asit, gallik asit gibi fenolik bileşikler lignin veya selülozun hidrolizi sırasında açığa çıkabilmektedir. Bu bileşikler hidroksil, karbonil, metoksil gruplarının varlığına bağlı olarak endo-/ekzoglukanazlar ve β -glukozidaz aktiviteleri için potansiyel inhibitörlerdir (Jönsson *et al.*, 2013; Qin *et al.*, 2016; Ximenes *et al.*, 2011). Örneğin; *Aspergillus niger*'den izole edilen glukozidaz enziminin, *Trichoderma reesei*'den izole edilen enzimlere göre fenolik bileşiklere karşı daha dirençli olduğu görölmüştür. Fenol molekülleri arasında tannik asidin hem deaktivasyona hem de geri dönüşümlü

inhibisyona neden olduğu bulunmuştur. İnhibisyon gücünün; enzim türüne, mikroorganizma türüne ve mevcut fenolik bileşiklerin türüne bağlı olduğu bilinmektedir (Ximenes *et al.* 2011).

Çizelge 1.4 Çeşitli inhibitörlerin selüloz aktivitesine etkisi.

Selüloz kaynağı	İnhibitör	Konsantrasyon	Bağlı Aktivite (%)	Referans
<i>Pseudomonas sp.</i>	Triton X-100	5 mM	0	Goel <i>et al.</i> , 2019
	SDS	5 mM	0	
	SDS	1 mM	37,16	
<i>Bacillus sonorensis</i> HSC7	Cu ⁺²	1 mM	57,61	Azadian <i>et al.</i> , 2017
	İzopropanol	% 5 (v/v)	73	
	DMF	% 5 (v/v)	61	
	SDS	5 mM	56	
<i>Penicillium simplicissium</i> H-11	Cu ⁺²	10 mM	29,08	Bai <i>et al.</i> , 2013
	Fe ⁺²	10 mM	73,05	
<i>Bacillus vallismortis</i> RG-07	Hg ⁺²	5 mM	46	Gaur and Tiwari, 2015
		10 mM	25	
<i>Aspergillus niger</i> <i>subsp. awamori</i>	Triton X-100	5 mM	33,9	Pachauri <i>et al.</i> , 2018
	Pb ⁺²	5 mM	63,5	
<i>Aspergillus terreus</i> M11	EDTA	10 mM	61	Gao <i>et al.</i> , 2008
	Cu ⁺²	2 mM	41	
	Hg ⁺²	2 mM	23	
<i>Bacillus sp.</i> BEC-1 (Egl173)	Mn ⁺²	1 mM	56	Zhu <i>et al.</i> , 2011
	Hg ⁺²	1 mM	32	
<i>Rhizopus oryzae</i> RCE1 RCE2 RCE1 RCE2 RCE1 RCE2	Co ⁺²	10 mM	33	Murashima <i>et al.</i> , 2002
		10 mM	30	
	Zn ⁺²	10 mM	27	
		10 mM	30	
	Pb ⁺²	10 mM	13	
		10 mM	10	

Bacillus sonorensis HSC7 selülaının aktivitesine organik çözücülerin etkisi incelendiğinde enzimin metanol, kloroform ve dietileter ile aktive olduğu; izopropanol ve DMF ile inhibe olduğu görülmüştür (Azadian *et al.*, 2017). Vanilin, trans-sinamik asit, hidroksibenzoik asit, tannik asit, gallik asit gibi fenolik bileşikler lignin veya selülozun hidrolizi sırasında açığa çıkabilmektedir. Bu bileşikler hidroksil, karbonil, metoksil gruplarının varlığına bağılı olarak endo-/ekzoglukanazlar ve β -glukozidaz aktiviteleri için potansiyel inhibitörlerdir (Jönsson *et al.*, 2013; Qin *et al.*, 2016; Ximenes *et al.*, 2011). Örneğin; *Aspergillus niger*'den izole edilen glukozidaz enziminin, *Trichoderma reesei*'den izole edilen enzimlere göre fenolik bileşiklere karşı daha dirençli olduğu görülmüştür. Fenol molekülleri arasında tannik asidin hem deaktivasyona hem de geri dönüşümlü inhibisyona neden olduğu bulunmuştur. İnhibisyon gücünün; enzim türüne, mikroorganizma türüne ve mevcut fenolik bileşiklerin türüne bağılı olduğu bilinmektedir (Ximenes *et al.*, 2011).

Şekerler ve türevlerinin selülaız aktivitesine inhibisyon etkisi gösterdiği bilinmektedir. Glukozidaz aktivitelerinin glukoz tarafından inhibisyonu sıklıkla karşılaşılan bir durumdur (de Cassia Pereira *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2015). Selüloz yıkım ürünleri olan selo-oligosakkaritlerin ve sellobiyozun endo- ve ekzoglukanazları inhibe ettiği bilinmektedir. Sellobiyoz ve ksilobiyoz gibi disakkaritler, mannoz ve galaktoz gibi monosakkaritler bazı ekzoglukanaz aktivitelerini; ksilooligomerler ise, ksiloglukan ve ksilan üzerine etki eden endoglukanazları inhibe edebilmektedir (Payne *et al.*, 2015; Qing *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2014).

1.1.8 Selülaızların uygulama alanları

Selülaız enziminin kullanımı ilk olarak 1980'lerin başında hayvan yemlerindeki uygulama ile başlamış ve gıda uygulamaları, kâğıt, deterjan ve tekstil alanındaki uygulamalar ile devam etmiştir. Son 20 yılda selülaızların biyoetanol üretimi, mürekkebin uzaklaştırılması, kumaşlarda biyoparlatım ve yumuşaklığının artırılması, kâğıt doğal fibrillerinin biyoişlenmesinde kullanımı (özellikle tekstil alanında) dikkat çekici olmuştur. Selülaız ile muamelenin kaba odun fibrillerinin (Douglas çamı gibi) şekil ve yapısını değiştirmeyi sağladığı görülmüştür (Karmakar

and Ray, 2011). Selülaaz enzimi ile yapılan immobilizasyon (Pazarlıoğlu *et al.*, 2005) ve zirai ve endüstriyel atıkların sakkarifikasyonu gibi çalışmalar da bulunmaktadır (Kıran *et al.*, 2006).

Dünyada son zamanlarda selülaaz ve hemiselülaazları yoğun miktarda içeren enzim preparatlarının kullanımı yoğun ilgi görmüştür. Bu preparatların kullanımı ile yemlerin besleyici özelliği, geviş getiren hayvanların süt verimi ve vücut ağırlığı artırmak amaçlanmıştır (Karmakar and Ray, 2011). Bu doğrultuda, enzim preparatlarının *in vivo* ve *in vitro* deneylerle karakterize edilmesi gerekmektedir (Bhat, 2000).

Yapılan bir çalışmada, *Trichoderma* selülaazının yem katkı maddesi olarak kullanılmasının yemden yararlanma oranını ve tahıl bazlı gıdanın sindirilebilirliğini önemli ölçüde iyileştirdiği görülmüştür (Bedford *et al.*, 2003). Geviş getirenlerin yemleri selüloz, hemiselüloz, pektin ve lignin içeren bileşimden dolayı oldukça karmaşıktır. Bir dizi başka çalışma, yem sindirilebilirliğini artırmak için selülaaz preparatlarının kullanılmasının mümkün olduğunu ileri sürmüştür (El-Adawy *et al.*, 2008; Murad *et al.*, 2009). Selülaazlar, lignoselüloz materyallerin, β -glukanların kısmi hidrolizini, tahıl tanelerinin kabuklarının soyulmasını sağladığı için daha iyi bir sindirim sağlamakta ve sonuçta hayvanların besin emilimini iyileştirmektedir (Cowan, 1996; Dhiman *et al.*, 2002). İyileştirilmiş sindirim ve besin emilimi, hayvanların sağlığı üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir (Bhat, 2000; Karmakar and Ray, 2011; Shrivastava *et al.*, 2011).

Geviş getiren hayvanların besin emilimi üzerinde olumlu etkisi olan selülaazla muamele edilmiş bir diyetle beslenen ineklerden elde edilen sütte yağ ve protein içeriğinin daha zengin olduğu görülmüştür. alışmalar aynı zamanda, enerji ve protein sindiriminde bir değişiklik olduğunu ve protein sentezinde artış olduğunu da göstermiştir (Murad and Azzaz, 2010; Zheng *et al.*, 2000; Knowlton *et al.*, 2002).

Selülaazların bir diğer kullanım alanı gıda uygulamalarıdır. Meyve sularının bulanıklığı; selüloz, hemiselüloz, lignin, pektin, nişasta, metaller, proteinler ve tanenler gibi yapıların varlığından kaynaklanmaktadır (Vaillant *et al.*, 2001). Selülaazlar, hemiselülaazlar ve pektinazlar üzerindeki araştırmalar ile birlikte meyve bileşenleri üzerindeki bilginin artması sağlanmıştır (Grassin and Fauquembergue, 1996).. Maserasyon enzimleri olarak bilinen selülaaz, hemiselülaaz ve pektinazlar ile

meyve suyu üretiminde verimi arttırmak, uygulama süresini azaltmak ve değerli meyve bileşenlerinin izolasyonunu geliştirmek hedeflenmiştir. (Karmakar and Ray, 2011).

Gıdaların duyuşsal özellikleri gıda biyoteknolojisinde önemli rol oynayan meyvelerin aroma özelliklerini, tatlarını ve dokusunu içermektedir. Çeşitli meyve ve sebzelerin duyuşsal özellikleri, pektinazlar ve selülozlar gibi enzimlerin infüzyonu ile değiştirilebilmektedir (Baker and Wicker, 1996). Enzim bileşimlerinin, meyvelerin aromasının yanı sıra besin değeri üzerinde artırıcı bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Shoseyov and Bravdo, 2001). İmmobilize β -glukozidaz, çay ve benzeri içeceklere eklendiğinde uçucu yağların içeriğindeki artışa bağlı olarak önemli bir aroma artışı ile sonuçlanmıştır (Su *et al.*, 2010). Meyve sularının enzim destekli işlenmesinin renk kalitesini, meyve suyu verimini ve sağlık yararlarını iyileştirdiği bulunmuştur.

Geniş çeşitlilikteki meyve ve sebzelerden ekstraksiyon veriminin artışı için de bu enzimlerin kullanımı mevcuttur. Selülozların tek başına veya pektinazlar gibi diğer hidrolitik enzimlerle kombinasyon halinde kullanımının zeytinyağının yanı sıra ekstraksiyon üzerinde verim artırıcı bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Sharma *et al.*, 2013). Bu enzimler, zeytin hamurunda bulunan koloidal ve lipoprotein yapılarına önemli ölçüde etki ederek gelişmiş kalite ve görünüme sahip yağın salınımını sağlamaktadır (Najafian *et al.*, 2009; Sharma and Sharma, 2007; Ranalli *et al.*, 2005; de Faveri *et al.*, 2008). Ekstrakte edilen zeytinyağında fenolik içerik ve antioksidan aktivitedeki önemli artış kalitesini de yükseltmektedir (Mortabit *et al.*, 2014; De Faveri *et al.*, 2014).

Enzimler, ekmek ve hamur kalitesini iyileştirmedeki etkilerinden dolayı fırıncılık endüstrisinde büyük ilgi görmüştür. Selülozlar ve diğer hidrolitik enzimleri içeren enzim kombinasyonları ekmeğın hacmini, kalitesini ve saklama stabilitesini iyileştirmek ve böylece ekmek yapım işlemlerinde emülgatörlerin kullanımını azaltmak için kullanılmıştır (Pilar and Rafael, 2004). Selülozlar, hemiselülozlar, amilazlar, lipazlar ve fosfolipazları içeren enzim karışımının kullanılması hamurun tadında iyileşme, uzun raf ömrü ve pişirme sonrası hacimde artışla sonuçlanmıştır (Boutte *et al.*, 2009).

Selülozların ksilanaz ve ligninazlar ile birlikte kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisinde kullanımı son yıllarda yoğun ilgi görmüştür. Enzimlerin kullanılması büyük oranda enerji tasarrufunun sağlanmasına katkıda bulunmuştur. Selülozlar, selülozun öğütülerek kâğıt haline getirilme aşamalarında üretilen küçük partikülleri degrede ederek, kâğıt hamurunun süzülme özelliklerinin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır. Selülozlar ayrıca mürekkebin kâğıttan çıkmasını sağlayarak geri dönüştürülmüş kâğıtların tekrar kâğıt yapımında kullanılma özelliklerini geliştirmektedir. Enzimatik olarak mürekkebin uzaklaştırılması daha az kimyasal kullanımını sağlayarak kâğıt endüstrisinin çevreye karşı oluşturduğu olumsuz etkiyi azaltmaktadır. Genellikle enzimatik olarak mürekkep giderimi fibrillerin direncinde ya çok az ya da hiç kayba neden olmazken uygulamanın genel yeterliliği toner miktarı ve tipi ve diğer kontaminantların varlığı gibi değişkenlere bağlı olarak değişmektedir. Küçük partiküllerin önemli miktarda hidrolizinin fibriller arası bağları zayıflatmasından dolayı fazla enzim kullanımından kaçınılmalıdır (Karmakar ve Ray, 2011). Selülozlar ayrıca kolaylıkla biyodegrede edilebilen kalın kartonların hazırlanmasında, kâğıt havlu ve hijyenik kâğıtlar dahil yumuşak kâğıtların üretiminde de kullanılmaktadır (Sukumaran, 2005).

Selülozların en çok görülen tekstil uygulamaları biyotaşlama ve biyoparlatma işlemleridir. Hem selüloz sisteminin tamamı hem de selüloz sistemi komponentleri tekstil endüstrisinde kullanılarak kumaşın özelliklerini geliştirmektedir. Örneğin; bazı selüloz sistemi enzimleri pamuklu kumaşların tüylerinin uzaklaştırılması ya da temizlenmesinde kullanılırken, saf endoglukanaz ya da endoglukanaz enzimi ile zengin karışım eskimiş görünümlü ve yumuşak kumaşların üretilmesinde kullanılmaktadır. Taşlamada kullanılan enzimler ya optimum aktivite pH 4,5 civarında olan asidik selülozlar ya da optimum aktivite pH 7,0 ve altı civarında olan nötral selülozlardır (Bhat, 2000; Karmakar and Ray, 2011).

Selüloz enzimi kumaşlardaki sert çıkıntı şeklindeki yapıları uzaklaştırarak daha düz ve parlak kumaşların hazırlanmasını sağlamaktadır. Bu teknik biyoparlatma olarak adlandırılmaktadır ve aynı zamanda renk parlaklığını geliştirmede de kullanılmaktadır (Karmakar and Ray, 2011).

Petrol ürünlerinden ya da biyokütleden üretilen etanolün çoğu yenilenebilir kaynaklardandır. Tarımsal atıklar gibi lignoselülozik biyokütlenin etanol üretiminde kullanımı da önemli seviyededir. Son yıllardaki teknolojik

ilerlemelerle lignoselülozik biyokütleden daha az bir maliyetle etanol üretimi mümkün kılınmıştır (Joshi *et al.*, 2011).

Fermantasyon ürünlerine ya da biyokütlenin etanole dönüştürülmesi için saf enzim kullanımı şu anda ekonomik değildir fakat etkili stratejiler ve aktif araştırmalar yapılmaktadır. Genel olarak selülozik biyokütle, substrat olarak kullanılan dikkat çekici bir kaynak özelliği göstermektedir (Karmakar and Ray, 2011).

Selülaz enzimlerinin uygulama alanları arasında yeni yaklaşımlar da mevcuttur. Pigment ekstraksiyonunda enzim kombinasyonlarının kullanımı nispeten yeni bir yaklaşımdır. Karotenoidler, toksik olmaması ve geniş renk yelpazesine sahip olma gibi önemli biyolojik özelliklerinden dolayı doğal gıda boyası olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada; *Physalis alkekengi L.*'nin çanak yapraklarından (sepallerinden) karotenoid ekstraksiyonu için selülazların ve hemiselülazların bir kombinasyonu kullanılmıştır. Bu durum, solvent ekstraksiyonuna kıyasla pigmentlerin daha iyi geri kazanımı ile sonuçlanmıştır (Bunea *et al.*, 2009). Bir başka çalışmada ise pektinolitik, selüloolitik ve hemiselüloolitik aktivitelere sahip enzim preparatlarının, domates kabuklarından likopen geri kazanımında önemli ölçüde artış sağladığı bulunmuştur. Böylelikle katı atık olan domates posasından ve domatesten enzim destekli likopen ekstraksiyonunun, atık ürünlerden yüksek verimli pigment ekstraksiyonu için ekonomik olarak fayda sağlayacağı görülmüştür (Lavecchia and Zuorro, 2010).

Selülazlar, bitkilerden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda da uygulama alanı bulmuştur. Enzimlerin tek başına veya kombinasyonları halinde, bitki hücrelerinden biyoaktif maddelerin salınımını arttırdığı yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. *Stevia rebaudiana* bitkisinden bir tatlandırıcı olan steviosid, enzim destekli ekstraksiyon ile yüksek verimle ekstrakte edilmiştir (Puri *et al.*, 2011). Selülazların karotenoidler, antosiyaninler, glikozidler, flavonoidler, fenolikler, vanilin gibi birçok biyoaktif bileşiğin ekstraksiyonunda kullanılabileceği kanıtlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda enzimlerin; gıda takviyeleri, nutrasötikler ve fonksiyonel gıdalar olarak kullanılabilen çeşitli doğal bileşiklerin salınımı için süreci katalize ettiği ortaya çıkmaktadır (Khandare *et al.*, 2011; Puri *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2008).

Selülazlar, farmasötik endüstrisinde ticari biyokatalizörler olarak uygulama alanı bulmuştur. Bitkilerden veya bitki ürünlerinden tıbbi olarak ilgili bileşiklerin

salınmasında önemli rol oynadıkları görülmüştür. Polifenoller gibi bileşikler, antioksidan özelliğe sahiptir ve serbest radikal temizleyiciler olarak kabul edilmektedirler. Bu sayede çok sayıda hastalığın görülme sıklığını azaltmaktadırlar. Selüloz, proteaz ve amilaz enzimlerinin farklı tahıllardan biyoaktif polifenollerin ekstraksiyonunda verim artışı sağladığı sonucuna ulaşılmıştır (Bhanja *et al.*, 2009; Do *et al.*, 2009).

İnsan metabolizmasının selülozu sindirmekte güçlük çekmesi sebebiyle selüloz takviyelerinin günümüzdeki kullanımı önemli artış göstermiştir. Örneğin; Digestin, P-A-L Plus Enzimler, Polienzim Plus gibi selüloz içeren takviyeler sindirime yardımcı araçlar olarak kullanılmaktadır (Karmakar and Ray, 2011). Bir başka yeni yaklaşım ise, selülozların prebiyotiklerde kullanılmasıdır. Diyetlerdeki prebiyotikler, üst gastrointestinal sistemi geçen ve kalın bağırsakta yararlı bakterilerin büyümesi için bir substrat görevi gören ve sindirilemeyen lifleri içermektedir. Bu liflerin, selüloz ve mannazların etkisiyle daha verimli prebiyotik etki gösterdiği bulunmuştur. Selülozların ve mannaz hidrolizatlarının etkili prebiyotikler olarak kullanılması, çalışmalarda görüldüğü gibi hızla gelişim göstermektedir (Chen *et al.*, 2005; Al-Ghazzewi *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2007).

Bakteriyel biyofilmin giderilmesi konusunda selüloz enzimi ile çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalarda, bakteriyel biyofilm oluşumunu engellemek için; amilazlar, selülozlar ve proteazlar gibi karbohidratlar üzerinde etkili olan enzim bileşimleri kullanılmıştır (Orgaz *et al.*, 2006). Bu doğrultuda çeşitli enzim kombinasyonları içeren kitler geliştirilmiştir. Bu kitler; selülozlar, hemiselülozlar, proteazlar, amilazlar ve esterazlar gibi enzimlerin farklı miktarlarını içermektedir. Kitler, katı yüzeylerde biyofilm oluşumunu önlemek için *P. aeruginosa*'ya karşı test edilmiştir. Kitlerin asidik, nötr ve bazik pH değerinde, cıvık küfün % 80'ini gidermede önemli ölçüde etkili olduğu görülmüştür (Kumar, 2008; Barnett *et al.*, 2011).

Biyoteknolojik çalışmalar için selüloz enziminin değerli bir araç olabileceği öngörülmektedir. Bu doğrultuda gelişmiş sindirilebilirliğe sahip transgenik biyoyakıt ürünleri geliştirmek için sentetik bir glikozil hidrolaza bitkiden türetilmiş bir karbohidrat bağlama modülü eklenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan CEL-HYB1- CBM enzimi, hibrit mikrobiyal selüloz olan CEL-HYB1 ve domates (*Solanum lycopersicum*) SICel9C1 selülozunun CBM'sinden oluşturulmuştur. CEL-HBY1 ve CEL-HBY1-CBM enzimleri *Pichia pastoris* kullanılarak *in vitro*

üretilmiştir. Böylelikle, endojen bir bitkiden üretilmiş CBM'nin selüloz enzimlerine eklenmesinin hidrolitik aktiviteyi arttırabileceği görülmüştür (Byrt *et al.*, 2012). Selüloz enzimi ile yapılan immobilizasyon (Pazarlıoğlu *et al.*, 2005) çalışmaları, zirai ve endüstriyel atıkların sakkarifikasyonu gibi çalışmalar da bulunmaktadır (Kıran *et al.*, 2006).

2. SULU İKİLİ-FAZ SİSTEMİ (ATPS)

Rekombinant proteinlerin ve enzimlerin üretimi için uygun maliyete yeterli saflaştırmayı gerçekleştirebilen yöntemlerin geliştirilmesine gereksinim duyulmaktadır. Farklı makromoleküllerin endüstriyel kullanımının son yıllarda artış göstermesiyle önemli ölçüde saflık sağlayan, düşük maliyetli ve büyük ölçekte uygulanabilen yeni izolasyon ve saflaştırma yöntemleri geliştirmek için çalışılmaktadır. Bu noktada sıvı- sıvı ekstraksiyon sistemleri ilgi çekmektedir. Sıvı-sıvı ekstraksiyon sistemlerinde genel olarak organik çözügen kullanılmaktadır. Bu durum proteinlerin çözünmemesine ve denaturasyonuna sebep olmaktadır.

Sıvı-sıvı ikili faz sistemleri iki polimer veya polimer/tuz çözeltileri kullanılarak da oluşturulabilmektedir. İlk kez 1896 yılında Martinus Willem Beijerinck tarafından nişasta ve jelatinin karıştırılmasıyla ikili fazın gözlemlenmesi sonucunda bulunmuştur. Sonrasında bu sistemler “Sulu İkili-Faz Sistemleri (Aqueous Two-Phase System, ATPS)” olarak adlandırılmış ve Albertson tarafından 1956 yılında ilk kez biyomoleküllerin geri kazanımında kullanılmıştır. Albertson çalışmaları ile biyolojik moleküllerin fazlar arasında seçimli dağıldığını ortaya koymuştur. Diğer çalışmalarında ise farklı sistemler oluşturularak farklı polimer konsantrasyonlarının ve molekül kütlelerinin etkilerini incelemiş ve bu sistemlerin faz diyagramlarını oluşturmuştur (Goja *et al.*, 2013; Igbal *et al.*, 2016).

Sulu ikili-faz sistemleri artık günümüzde biyolojik moleküllerin (örneğin; protein, hücre, organel ve biyolojik membranlar) ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında kullanılan seçimli ve etkin bir methodur. En yaygın sulu ikili-faz sistemleri hidrofilik ve farklı iki polimer (genellikle polietilen glikol (PEG) ve dekstran) veya bir polimer ve bir tuz (örneğin, fosfat, sülfat veya sitrat tuzları) tarafından oluşturulan polimer-polimer veya polimer-tuz sistemleridir. Bu komponentlerin kritik konsantrasyonları üzerinde ikili-faz kendiliğinden

oluşmaktadır. Polimer-polimer sisteminde her bir faz kendisini oluşturan polimerce zengindir. Polimer-tuz sisteminde ise fazlardan bir tanesi sistemi oluşturan polimerce, diğer faz ise tuzca zengindir. Polimer polimer sistemlerinde fazlar kendilerini oluşturan polimerce zengindir. Polimer tuz sistemlerinde ise fazlardan biri tuzca diğeri ise polimerce zengindir. PEG/Dekstran sistemleri küçük ölçekte makromoleküllerin, membranların, hücre partiküllerinin ya da hücrelerin ayrılmasında kullanılırken PEG/Tuz sistemleri daha çok büyük ölçekteki ekstraksiyonlarda kullanılırlar. PEG/Tuz sistemleri, PEG/Dekstran sistemlerine göre daha düşük viskozite ve maliyete sahip olduklarından daha avantajlıdır. Her iki sistemde biyouyumludur ve % 70–90 gibi oldukça yüksek su içeriğinden dolayı biyomoleküller için toksik olmayan ılımlı bir çevre oluşturmaktadır. Ayrıca polimerlerin protein ve enzim aktivitesi ile yapısına stabilize edici etkileri vardır. Sulu ikili-faz sistemlerinin bilinen kromatografi, filtrasyon, santrifüjleme ve elektroforez gibi ayırma ve saflaştırma tekniklerine göre bazı avantajları vardır. Tek bir adımdan oluşan işlem sayesinde istenilen proteinin deriştirilmesi ve saflaştırmasını sağlamaktadır. Sulu ikili-faz sisteminin bir başka olumlu yanı ise ölçek büyütmenin mümkün olmasıdır. Diğer olumlu yanları ise; ara yüzey geriliminin düşük olması nedeniyle biyomoleküllerin degradasyonunu minimize etmesi, uygulama zamanı ve enerji tasarrufu sağlaması, yüksek verimle ayırmanın gerçekleştirilebilmesi ve maliyetinin oldukça az olması şeklindedir (Yue *et al.*, 2007; Negrete *et al.*, 2007).

Faz sistemine, moleküllerin genel karakteristik özellikleri ve ortamdaki etkileşimlerine bağlı olarak moleküller iki faz arasında seçimli olarak dağılırlar. Fazlar arasında küçük moleküller tarafsızca dağılırken, makromoleküllerin dağılımı değişkendir. Pek çok bilim adamı proteinlerin neye göre dağıldığını modelleme yapmaya çalışmışsa da bu çok güçtür. Bu sebeple yol gösterecek geniş kapsamlı bir teori veya kuram yoktur. Biyomoleküllerin fazlara dağılımını açıklamak için genellikle sistematik araştırma yapmak gerekmektedir. Dağılımı etkileyen faktörlerin belirlenmesi ve bu faktörlerden lehte olanlarla bir veya daha fazla set varyasyonlar oluşturularak en iyi ayırımı sağlayan koşul elde edilmeye çalışılmaktadır.

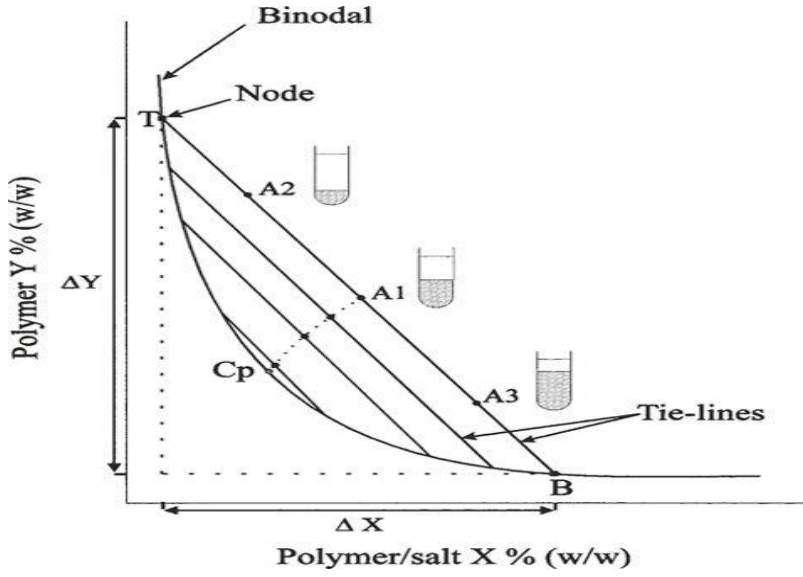
Sulu ikili-faz sistemi iki adımdan oluşan bir prosesdir. İlk adım dengeleme ve son adım da faz ayırımının gerçekleşmesidir. Dengeleme; sistemi oluşturan komponentlerin (protein ekstraktı, polimer ve tuz) ilave edilmesi ve karıştırılması

ile iki fazın kendiliğinden dengeye gelmesi için dispersiyonunu içerir. Dengeleme adımı çoğu zaman hızlı bir prosestir (25°C 'de 2–3 dk hafif vorteksleme ve 15 dk bekletme). Faz ayırımı adımı ise, iki faz arasındaki ayırımın belirgin olma aşamasıdır. Fazlar arasındaki yoğunluk ve viskoziteleri arasındaki küçük farklanmalardan dolayı birkaç dakikadan birkaç saate kadar değişen aralıklarda santrifüj işleminin (4000 rpm, 10 dk gibi) yer aldığı operasyon basamağıdır.

2.1 Faz Diyagramları

Faz diyagramı belirli bir sulu ikili-faz sistemi için potansiyel çalışma alanını açıklar ve pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonu gibi belirli koşullar altında bu sisteme özgüdür (Şekil 2.1). Faz diyagramları, fazları oluşturan bileşenlerin (PEG ve tuz gibi) konsantrasyonları, alt ve üst fazlardaki diğer bileşenlerin konsantrasyonları ve faz hacimlerinin oranları hakkında bilgi vermektedir.

Faz diyagramları binodiyal eğri ve “tie-line” olarak adlandırılan özel ve bağlantılı bölgelerden oluşmaktadır. Binodiyal eğri, faz diyagramını ikiye bölmektedir. Eğrinin üst bölgesi birbiri içinde karışmayan olması muhtemel sulu ikili faz sisteminin, eğri ve eğrinin alt bölgesi ise tek fazın olduğu bilgisini vermektedir. Olması beklenen tüm sulu ikili-faz sistemleri binodiyal eğri üzerindeki birbiri ile bağlantılı iki nod arasında çizilen ve “tie-line” olarak adlandırılan hatlar üzerinde koordinatlanmış halde bulunmaktadır. Tie –line hatları alt ve üst fazlardaki bileşenlerin olması gereken son konsantrasyonlarını belirtmektedir (T ve B).



Şekil 2.1 Faz Diyagramları (Hatti – Kaul, 2000).

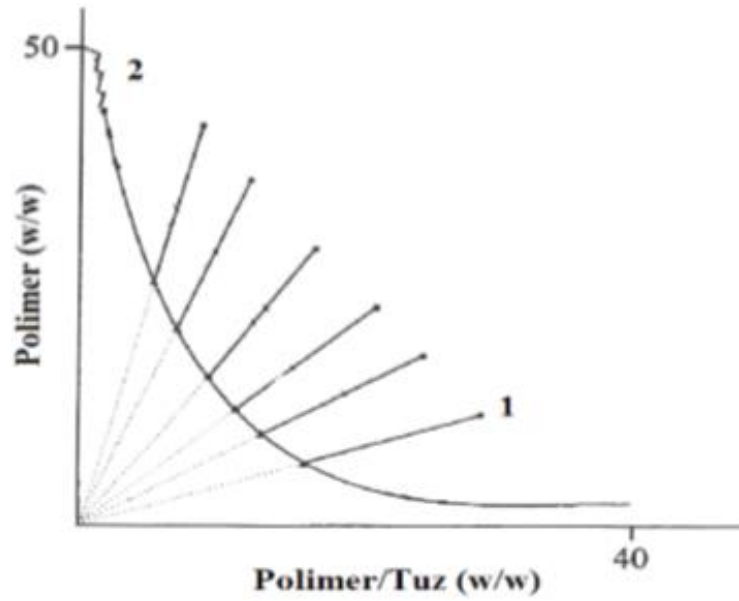
Aynı bağlantılı hatlar üzerinde ilerlendiğinde alt ve üst fazdaki bileşenlerin son konsantrasyonu değişmezken, fazların total kompozisyonları ve faz hacimleri farklanır (A1, A2 ve A3). Binodiyal eğri ve üzerinde iki fazın total kompozisyonu ile hacimlerinin eşit olduğu noktalara “kritik nokta (Cp)” denilmektedir. Kritik noktaya yaklaşıldıkça, binodiyal eğri alt ve üst faz bileşimlerinin konumu ve eğilimi bazında tahmin edilebilmektedir. Kritik nokta tie-line hattının orta noktalarının ekstrapole edilmesi ile belirlenmektedir (Hatti-Kaul, 2000; Salabat, 2001).

2.1.1 Binodiyal eğri

Sulu ikili-faz sistemlerinin oluşumu, iki polimerin ya da bir polimer ve tuzun karıştırılması ve sadece belirli konsantrasyon aralıklarında buldukları zaman gözlenmektedir. Sulu ikili-faz sistemlerinde hazırlık aşamalarında kullanılmak üzere binodiyal eğri oluşturmak için sistem parametrelerinin seçilmesi gerekmektedir. PEG/Dekstran ve PEG/Tuz sistemleri için faz diyagramları oluşturulmuştur. Bazı metotlar ile polimer-polimer ya da polimer-tuz sistemleri için binodiyal eğri geliştirilebilmektedir. Binodiyal eğri oluşturmak için iki metot; türbidometrik titrasyon metodu (1) ve cloud-point metodu (2) bulunmaktadır (Şekil 2.2).

Türbidometrik titrasyon metodu (1) oldukça hızlı ve yaygın bir metottur. Bilinen total bileşim ve ağırlıktaki faz bileşenleri karıştırılarak bulanık sistem

serileri hazırlanır. Su veya diğer çözügenlerin yardımıyla berrak ve tek bir faz oluşuncaya kadar karışım seyreltilir. Bulanıklıktan berraklığa geçiş olan noktada faz bileşimi hesaplanır ve eğri üzerinde işaretlenir. Cloud –point metodu (2) da aynı prensibe dayanmaktadır. Konsantrasyonu bilinen bir polimer bir test tüpüne alınır. Daha sonra konsantrasyonu bilinen başka bir polimer ya da tuz çözeltisi yavaşça ilave edilir ve karıştırılır. Karışım ilk başlarda berraktır fakat ilave edilen ikinci çözelti belirli bir değerin üzerine çıkmaya başladığı kritik noktadan (cloud-point) itibaren karışım bulanıklaşmaya ve iki faza ayrılmaya başlar. Bu karışımın kütlesi hesaplanır ve oluşan ikili fazın bileşimi hesaplanır, eğride işaretlenir. Karışım seyreltilerek prosedür tekrarlanır. Bu metotlar Dekstran/metilselüloz gibi birbirinden farklı büyüklükteki polidispers polimerler ile çalışıldığında hatalı sonuçlar vermektedir (Hatti –Kaul, 2000; Vazquez, 2018).



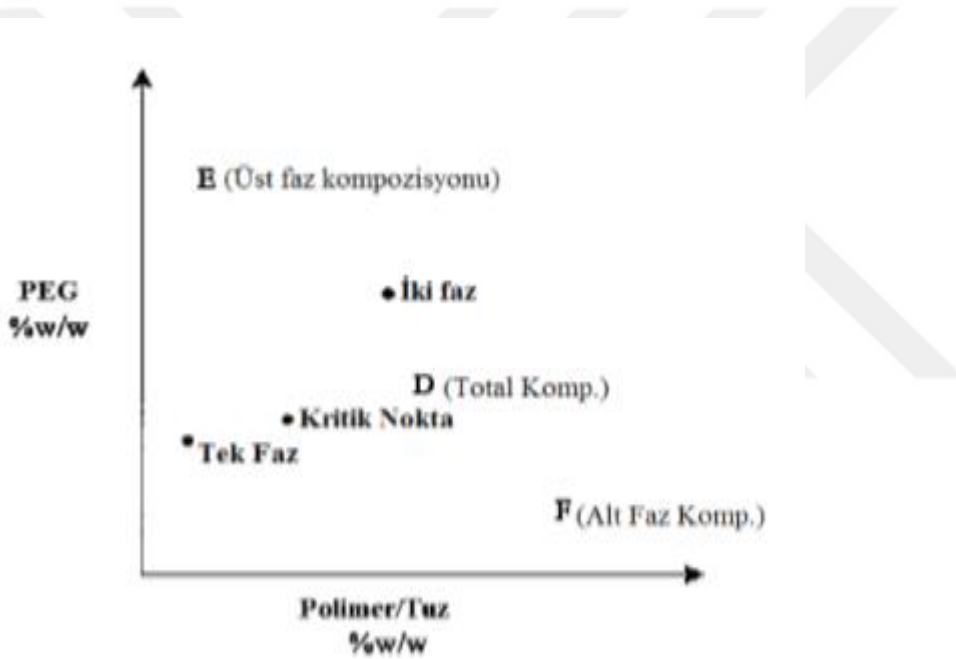
Şekil 2.2 Turbidometrik titrasyon ve cloud-point metodları (Hatti –Kaul and Kaul, 2000; Vazquez, 2018).

2.1.2 Tie –line hatları

Tie –line hatlarının uzunluklarının birimi faz bileşimlerinin konsantrasyon birimleri gibi % (w/w) şeklinde ifade edilir. Tie-line hatlarının uzunluğu ve fazların kütlesi aşağıdaki denklem ile bağlantılıdır;

$$V_{üst} \rho_{üst} / V_{alt} \rho_{alt} = DF / ED$$

“ V ” ve “ ρ ” ifadeleri üst ve alt fazların sırasıyla hacim ve yoğunluklarını ve DF ile ED ise gösterilen tie-line hatlarının uzunluklarını ifade etmektedir (Şekil 2.3). Tie-line hatları genellikle paraleldir ve bu nedenle eğimi diğerlerinin çizilmesinde kullanılmaktadır. Faz bileşimlerinin analizi ve her bir fazdaki polimer ve tuz konsantrasyonlarının belirlenmesi rutin olarak optik rotasyon (polarize ışık düzlemini döndürebilen asimetrik bir merkez içeren faz bileşenleri), kırılma indisi, kuru ağırlık veya iletkenlik ölçümlerinin bir kombinasyonu kullanılarak yapılmaktadır (Glyk *et al.*, 2014).



Şekil 2.3 Tie –line hatları (Glyk *et al.*, 2014).

Faz diyagramlarının bir diğer önemli özelliği ise, verimli ölçüde saflaştırma yapabilmek için gerekli optimum sistem bileşenlerinin belirlenmesini sağlamasıdır. Protein geri kazanımı ve saflaştırılması için uygun sulu ikili-faz sistemi seçmek için hedeflenen proteinin selektivitesinin diğer proteinlerden yüksek olmalıdır. Selektivite (α);

$$\alpha = K_P / K_C$$

şeklinde ifade edilmektedir. K_P , hedeflenen proteinin dağılım katsayısı iken K_C diğer proteinlerin dağılım katsayısını ifade etmektedir. Aynı tie-line hattı üzerinde proteinlerin dağılım katsayısı aynı kalmaktadır. Bu nedenle hedeflenen proteinin

seçimliliği de belirli bir tie –line hattı üzerindeki tüm faz bileşimleri için sabittir. Sabit seçimlilik, istenilen proteinin saflaştırılması sırasında saflaştırma faktörünün faz oranlarının çeşitlendirilerek iyileştirilmesine olanak sağlaması açısından önemlidir. Faz oranı;

$$\text{Faz Oranı} = \text{Üst Faz Kütlesi} / \text{Alt Faz Kütlesi} = \text{DF} / \text{ED}$$

şeklinde ifade edilmektedir. Düşük faz oranı, yüksek saflaştırma faktörü anlamına gelmektedir. ED uzunluğundaki yükselme faz oranını düşürmektedir. Faz oranının düşmesi nedeniyle istenilen proteinin verimi de düşmektedir. Bu sebeple, verim ve saflaştırma faktörü arasındaki dengeyi sağlayan optimum faz oranının seçimine dikkat edilmelidir (Hatti- Kaul, 2000; Balasubramaniam, 2003).

2.2 Dağılma Katsayısı (K)

Sulu ikili-faz sistemlerinde moleküllerin fazlar arasındaki dağılımı, dağılma katsayısı (K) ile;

$$K = C_{\text{üst}} / C_{\text{alt}}$$

ifade edilmektedir. $C_{\text{üst}}$ ve C_{alt} sırasıyla üst ve alt fazlardaki protein konsantrasyonlarını belirtmektedir. Dağılma katsayısı fazların, materyallerin ve sıcaklık özelliklerinin bir fonksiyonudur. Çözünen konsantrasyonundan ve fazların hacim oranlarından bağımsızdır. Proteinin dağılım katsayısı belli bir tie-line hattındaki tüm sistemler için sabittir. Dağılma işlemi pek çok faktör tarafından etkilenmektedir. Dağılma katsayısını belirlemek için bu faktörlerin deneysel çalışma ile optimize edilmesi gerekmektedir. Dağılım katsayısı ve onu etkileyen faktörlerin logaritmik formu aşağıdaki denklemde olduğu gibi ifade edilebilmektedir :

$$\ln K = \ln K^0 + \ln K_{\text{elec}} + \ln K_{\text{hfob}} + \ln K_{\text{biosp}} + \ln K_{\text{büy}} + \ln K_{\text{konf}} +$$

Burada K_{elec} ; proteinin net yükü, pH; iyon dağılımı ve polimerin yükü tarafından belirlenen elektrostatik etkileri, K_{hfob} ; hidrofobikliği, K_{biosp} ; sistemin içinde bulunan ligandla olan afiniteye dayalı etkileşimleri, $K_{\text{büy}}$; protein ve polimerin büyüklüğünü, K_{konf} ; konformasyonel etkileri ve K^0 ise hesaba katılmayan diğer faktörleri ifade

etmektedir. Farklı faktörler birbirinden bağımsız olmayabilir. Örneğin; bir proteinin hidrofobikliği polimer-polimer ya da polimer- tuz sistemleri için belirleyici bir dağılım faktörü olabilmektedir (Igbal *et al.*, 2016).

2.3 Dağılım Mekanizması

Sulu ikili-faz sistemlerinde dağılmayı kontrol eden mekanizma genellikle bilinmemektedir. Fazda yer alan partiküller kendisini çevreleyen moleküllerle hidrojen bağı, hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler ve van der Waals gibi zayıf güçler oluşturarak etkileşim halinde olabilmektedir. Ancak bu etkileşimlerin katkılarını tahmin etmek oldukça zordur ve muhtemelen net etkileri iki fazda farklı olmaktadır (Gündüz, 2000). Dengedeki bir sistemde, bir partikülün bir fazdan diğer faza hareketi için gerekli olan enerji (ΔE) ile dağılım katsayısı arasındaki ilişki;

$$C_1 / C_2 = e^{\Delta E/kT}$$

olarak ifade edilir. C_1 ve C_2 sırasıyla faz 1 ve faz 2'deki partiküllerin konsantrasyonlarıdır, "k" Boltzman sabiti ve "T" ise mutlak sıcaklıktır.

ΔE dağılan partikülün büyüklüğüne bağlıdır. Partikül ne kadar büyük olursa kendisini çevreleyen fazla birlikte o kadar çok atomla etkileşim içinde olacaktır. Brønsted dağılımı ile ilgili olarak aşağıdaki eşitliği;

$$C_1 / C_2 = e^{\lambda M/kT}$$

önermektedir. M moleküler ağırlık ve λ ise moleküler ağırlık dışındaki özelliklere bağlı faktördür. Küresel bir partikül için ise eşitlikte M yerine partikülün yüzey alanını (A) ifade eden eşitliğin;

$$C_1 / C_2 = e^{\lambda A/kT}$$

dikkate alınmasını gerektiğini belirtmektedir. Bu durumda λ yüzey alanı dışındaki özelliklere bağlı faktörü göstermektedir. Yüzey özellikler yüzey gerilimi, birim alandaki yüzey serbest enerjisi ile ifade edilmelidir. Bundan dolayı hem büyüklük hem de yüzey alanı özellikleri dağılmayı belirlemede büyük öneme sahiptirler. Bu eşitlik yüksek derecede seçiciliği ifade ettiği için yüzey alanı dışındaki özelliklerde meydana gelen küçük değişiklikler dağılım katsayısında

nispeten büyük değişikliklere neden olacaktır (Silva and Franco, 2000). Aynı zamanda partikülün net yüküde (Z) dağılmayı etkilemektedir. Eğer ki fazlar arasında U_1-U_2 şeklinde bir elektrik potansiyel farkı bulunuyorsa eşitlikte Z (U_1-U_2) enerji terimi de olmalıdır;

$$C_1 / C_2 = \exp ((\lambda A + Z (U_1-U_2)) / kT)$$

Eşitlikte λ büyüklük ve net yük dışındaki faktörleri göstermektedir. Böylelikle, dağılmayı etkileyen toplam etki büyüklük, hidrofobisite, yüzeyin yükü ve partikülün ya da makromolekülün konformasyonu gibi faktörlere bölünmektedir (Albertsson, 1986).

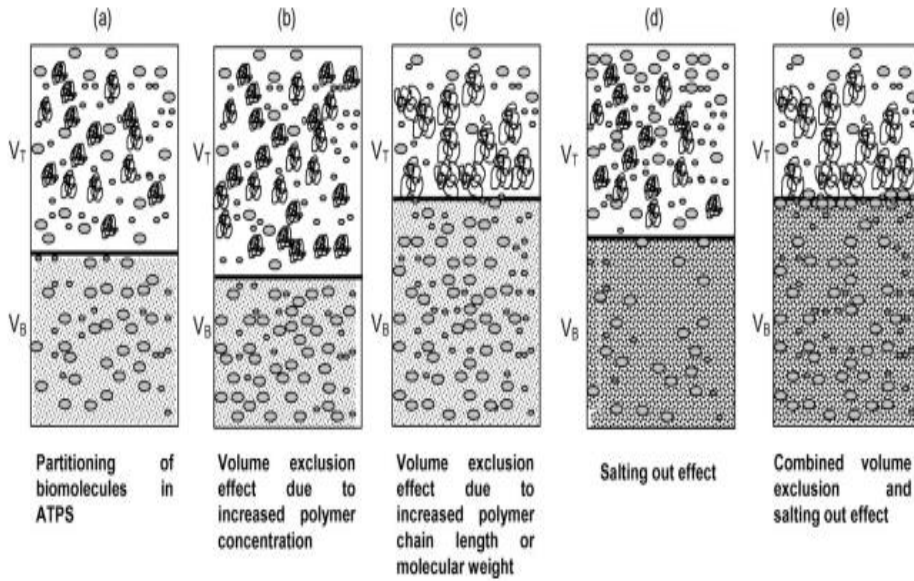
2.4 Protein Dağılımını Etkileyen Parametreler

Proteinler, canlı organizmalarda en önemli biyomoleküllerden biridir; metabolizma, biyoproses, sinyal iletimi, hücresel ve hücre dışı yapılar gibi birçok reaksiyon ve fonksiyonellikten sorumludurlar. Proteinlerin fizikokimyasal özellikleri çok iyi bilinmektedir ve nükleik asit, polisakkarit veya lipitlere göre daha kolay karakterize ve izole edilebilmektedir (Goja *et al.*, 2013).

Faz sisteminin ve moleküllerin genel karakteristik özelliklerine ve ortamdaki etkileşimlerine bağlı olarak moleküller iki faz arasında seçimli olarak dağılmaktadırlar. Sistem komponentlerinin tipi, polimerin molekül ağırlığı, pH, sistemde bulunan iyonların türü ve konsantrasyonu gibi proteinlerin dağılmasını etkileyen faktörler hakkında oldukça fazla bilgiye ulaşmak mümkündür. Proteinin kendi dağılımını etkileyen özellikleri ise; hidrofilik/hidrofobiklik karakteri ile yüküne etkileyen molekül kütlesi ve yüzeyinde yer alan amino asit artıklarıdır. Ancak farklı sistemlerde, tüm bu yüzey özelliklerinin proteinin dağılımına ne gibi katkıda bulunacağına dair çok az şey bilinmektedir (Berggren *et al.*, 2000). Sulu ikili-faz sistemlerinde proteinlerin dağılmasında; polimer türü ve molekül ağırlığı, tuz türü ve konsantrasyonu, sıcaklık, pH gibi parametreler de etkilidir.

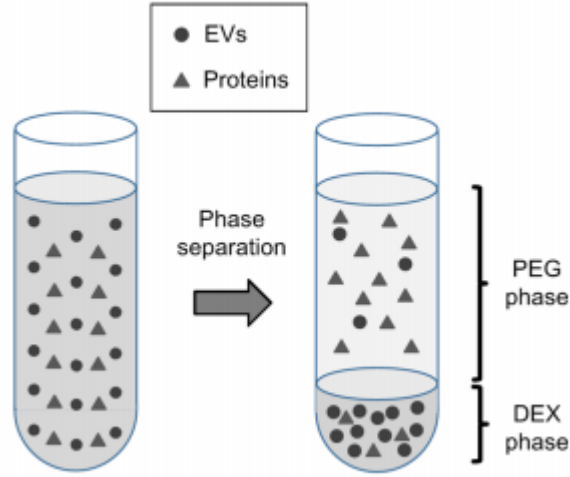
PEG/Tuz sistemlerinde biyomoleküllerin dağılımını gösteren temel mekanizma şematik olarak Şekil 2.4'te gösterilmiştir. PEG/Tuz sistemlerinde

biyomoleküllerin dağılımı, üst fazda bulunan polimerin “hacimsel dışlama ilkesi” ve alt fazda bulunan, tuz fazını oluşturan tuzun “salting-out” etkisine bağlıdır (Şekil 2.4a). Üst fazda polimer tarafından işgal edilen hacim polimerin derişiminin artması ile artmaktadır (Şekil 2.4b). Bu durum polimer zincir uzunluğunun ve molekül kütlesinin artması ile üst fazda biyomoleküller için yeterince alan kalmamasıyla sonuçlanacaktır. Bu durumda biyomoleküller alt faza yönelme eğiliminde olacaklardır (Şekil 2.4c). Bu etki “hacimsel dışlama etkisi” olarak adlandırılmaktadır. Biyomoleküllerin çözünürlüğü alt fazdaki tuz konsantrasyonunun artışıyla azalmaktadır. Bu durumun etkisiyle alt fazdaki biyomoleküller üst faza dağılım eğiliminde olmaktadır ve bu etkiye ” salting –out” denilmektedir (Şekil 2.4d). Yüksek polimer konsantrasyonu ve molekül kütlesi ve yüksek tuz konsantrasyonu içeren sulu ikili-faz sistemlerinde biyomoleküller faz ayrımının olduğu ara kesitte birikmektedir (Şekil 2.4e) (Babu *et al.*, 2008; Raja *et al.*, 2011).



Şekil 2.4 PEG/Tuz sistemlerinde biyomoleküllerin dağılımı (Babu *et al.*,2008).

PEG/Dekstran sistemlerinde, üst faz PEG açısından alt faz ise bağlı yoğunlukları nedeniyle dekstran açısından zengindir (Kim *et al.*, 2015) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 PEG/Dekstran sistemlerinde biyomoleküllerin dağılımı (Kim *et al.*, 2015).

2.4.1 Polimer konsantrasyonu ve molekül kütesinin etkisi

Polietilen glikol (PEG) ve dekstran sulu ikili-faz sistemlerinde yaygın olarak kullanılan polimerlerdir. Her iki polimer de toksik etki göstermediği için gıda ve farmasötik uygulamalarda kullanılmaktadır. Sulu ikili-faz sistemleri için çok sayıda polimer ile çalışılmıştır. PEG/Dekstran, PEG/Fikol, Dekstran/Fikol sistemleri örnek olarak verilebilir (de Barros *et al.*, 2016). Dekstran yüksek saflıkta olup pahalı bir materyal olduğu için endüstriyel uygulamalarda PEG/Tuz sistemleri daha çok tercih edilmektedir (Synder *et al.*, 1992).

Genellikle polimer konsantrasyonunun artması ile proteinlerin dağılımı tek taraflı olmaktadır. Bu durum dağılma katsayısının 1'in yukarısına çıkması ya da altına düşmesiyle açıklanmaktadır. Eğer bir polimer türü kendisinden daha düşük molekül kütleli polimer türü ile yer değiştirirse, proteinlerin dağılımı polimeri içeren faza doğru olacaktır. Bu sebeple genelde yüksek molekül kütleli ve düşük konsantrasyona sahip polimerler tercih edilmektedir. Polimer konsantrasyonu arttıkça, yoğunluk, kırılma indisi ve fazlar arasındaki viskozite artmaktadır (Raja *et al.*, 2011).

Polietilen glikol (PEG) hidrofobik karaktere sahip bir polimerdir. Bu nedenle molekül kütlesinin artması ile hidrofobik karakteri de artacaktır. PEG molekül kütlesinin protein dağılımına etkisi Flory Huggins teorisi temel alınarak açıklanmaktadır. Protein ve PEG arasındaki seçimli ilişki, PEG molekül kütlesinde belli bir noktadaki artış ile proteinleri dışlamaya başlamasından sonra azalacaktır. Bu dışlama etkisi ile proteinler tuz fazına yönelecektir. Bu nedenle yüksek molekül kütleli PEG türleri protein saflaştırılmasında hedeflenen protein için uygulanacak prosedürlerde tercih edilmemektedirler (Johansson *et al.*, 2011). Düşük molekül kütlesine sahip PEG türleri kullanıldığında da neredeyse tüm proteinler üst faza geçecek ve kontamine proteinlerin varlığı sebebiyle etkin olmayan bir ayırma ve saflaştırma meydana gelmiş olacaktır.

Bu nedenle genellikle orta dereceli molekül kütlesine sahip PEG türleri tercih edilmektedir. PEG'in zincir uzunluğundaki artış hidrofobik karakterini de arttırmaktadır. Hidrofobik karakter arttıkça hidrofobik karakterdeki proteinler üst faza daha kuvvetli geçme eğiliminde olacaktır. Seçimli ayırma ve saflaştırma için optimum PEG konsantrasyonu ve molekül kütlesi seçilmelidir (Su and Chiang, 2006).

2.4.2 Tuz türü ve konsantrasyonunun etkisi

Sulu ikili-faz sistemlerini oluşturmada genellikle $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ve MgSO_4 gibi tuzlar kullanılmaktadır. Tuzların seçimi, fazlar arasındaki hidrofobisiteyi artırma yeteneklerine göre olmaktadır. Buna bağlı olarak PEG ve protein arasındaki hidrofobisite arttıkça daha etkili bir ekstraksiyon gerçekleşmiş olur (Goja *et al.*, 2013).

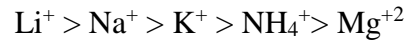
Sulu ikili-faz sistemlerinde tuz türü ve konsantrasyonu biyomoleküllerin dağılıma davranışını ve ekstraksiyon verimliliklerini etkilemektedir. Sulu ikili-faz sistemlerinde tuzların dağılmaya olan etkisi alt ve üst fazlar arasındaki tuz iyonlarının eşitsizliği ve bu dağılım sonucunda oluşan elektrik akımındaki farklanma şeklinde olmaktadır. Bu farklanma sebebiyle pek çok durumda alt faz negatif yüklü, üst faz ise pozitif yüklüdür. Bunun sonucunda oluşan elektriksel itme kuvvetleriyle pozitif yüklü iyonlar alt faza, negatif yüklü iyonlar ise üst faza gitme eğilimi göstermektedir (Han and Lee, 1997; Sripokar *et al.*, 2017).

Dağılmaya etki eden tuzların molekül büyüklüğü ve konformasyonu, fazlar arasındaki elektrik potansiyeli, hidrofobik karakteri gibi özelliklerinden en baskın olanı hidrofobik karakteristiktir. Hidrofobik etki moleküllerin apolar kalıntılarının su ile olan etkileşimi olarak açıklanmaktadır. Bir materyalin hidrofobisitesi sulu ortamdaki hidrojen bağı, van der Waals, elektrostatik etkileşim gibi bütün etkileşimlerinin ölçümü olarak da tanımlanabilmektedir (Goja *et al.*, 2013).

PEG/Tuz sistemlerinde tuz türü ve konsantrasyonu protein ve hidrofobik ortam arasındaki hidrofobik etkileşimlere etki etmektedir. Tuz iyonları, protein üzerinde bulunan karşıt yüklü iyonlarla etkileşerek çift katlı iyon grupları oluşturmaktadır. Buna bağlı olarak proteini saran tuzların etrafından su molekülleri uzaklaşır ve proteinin hidrofobik kısımları tuz konsantrasyonundaki artışla beraber kademeli olarak açıkta kalmaya başlar (Bonomo *et al.*, 2006). Tuz iyonlarının proteinin davranışına etkisi genellikle Hofmeister serisindeki pozisyonlarıyla ilişkilidir. Hofmeister serisi anyonlar için;



ve katyonlar için;



şeklinde etki etmektedir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında, serinin sol tarafında yer alan iyonlar “salting- out” etkisiyle proteinlerin çözünürlüklerini azaltarak hidrofobik etkileşimlerini arttırmış olurlar. Bunun sonucunda proteinler tuz bakımından fakir ve polimer bakımından zengin olan üst faza yönelirler (Glyk *et al.*, 2017).

Yüksek tuz konsantrasyonları, proteinlerin üst faza dağılması, saflaştırma veriminin düşük olması, proteinlerin çökmesi, enzimlerin aktivitesinin kaybolması gibi pek çok soruna neden olabilmektedir. Bu nedenle tuz türü ve konsantrasyonu saflaştırılması hedeflenen proteinin iyi bir saflaştırma katsayısı ve geri kazanımla saflaştırılabilmesi açısından kritiktir ve en uygun optimum koşulları belirlenmelidir (Sripokar *et al.*, 2017).

2.4.3 pH etkisi

Sulu ikili-faz sistemlerinde protein dağılımı sistemin pH'ına da bağlıdır. Genel olarak bir sistemdeki protein dağılım katsayısı ve pH aralığının iyonik kompozisyondan etkilendiği bilinmektedir. Sulu ikili-faz sisteminin pH'ı proteinin iyonize olabilen gruplarına ve yüzeyindeki yüklere etki etmektedir. Net yükün sıfır olduğu nokta izoelektrik noktadır. Bu noktada protein dağılımı pH'dan bağımsız olarak hareket etmekte olup çoğunlukla PEG ve tuzun protein üzerindeki hidrofobik etkileşimleri kuvvetli hale gelmektedir. İzoelektrik noktanın altındaki pH değerlerinde ise iyonik etkileşimler hidrofilik dağılım gösterecektir ve pozitif yüklü proteinlerin/enzimlerin negatif yüklü alt faza doğru dağılımı söz konusu olacaktır. İzoelektrik noktanın üstündeki pH değerlerinde ise iyonik etkileşimler hidrofobik dağılım gösterecektir ve negatif yüklü proteinlerin/enzimlerin pozitif yüklü üst faza doğru dağılımı söz konusu olacaktır (Johansson, 1985; Saravanan *et al.*,2008; Kavakçioğlu ve Tarhan, 2013).

2.4.4 Sıcaklığın etkisi

Yapılan diğer çalışmalarda da ifade edildiği gibi polimer-tuz etkileşimleri termodinamik açıdan endotermik yani ısı alan etkileşimlerdir. Sıcaklığın artışı bu reaksiyonun gerçekleşmesini daha istemli hale getirecektir (Pei, 2009). Sıcaklık faz bileşimini etkileyip protein dağılımına etki edeceğinden ve polimerin ve tuzun çözünürlüğünü etkileyeceğinden önemli bir parametredir. Faz oluşumu için gerekli sistem sıcaklığı, polimer ve tuzun kritik sıcaklığının üzerinde olmalıdır ve sabit tutulmalıdır. Bir yandan polimer varlığında proteinler denaturasyona karşı daha dayanıklı hale geldiklerinden yüksek sıcaklıklarda bile protein dağılımı olabilmektedir (Bamberger *et al.*, 1985; Ratanapongleka, 2010).

2.4.5 Hidrofobik etkileşimler

Sulu ikili-faz sistemlerinde hidrofobik etkileşimler proteinlerin saflaştırılmasında etkin rol oynarken aynı zamanda bu sistemlerin kimyasal kimliğini oluşturmaktadır. Bir polimere hidrofobik grupların kovalent bağlanmasıyla hidrofobik etkileşimler arttırılabilmektedir. Bir protein yüzeyinde ya

da aktif merkezinde hidrofobik gruplar varsa protein dağılım katsayısı değiştirilebilmektedir ve afinite dağılımı adını almaktadır. Yöntem çeşitli hücre ve hücre partiküllerinin hidrofobik özelliklerini belirlemede ve hidrofobikliğe bağlı ayırmada kullanılabilmektedir (Asenjo and Andrews, 2011).

2.4.6 Protein konsantrasyonunun etkisi

Protein konsantrasyonu doygunluk noktasına yaklaştıkça sistemde doygun hal durumu gözlenecektir. Protein konsantrasyonu doygunluk noktasının üzerine çıkarıldığında ideal protein dağılımından sapma gözlenebileceği için çökmeye neden olacak ve buna bağlı olarak geri kazanım düşük olacaktır. Bu nedenle, sulu ikili-faz sistemlerinde protein konsantrasyonu doygunluk noktasının altında bir değer olmalıdır. Genellikle 1 gramlık bir ikili-faz sisteminde 1 mg protein konsantrasyonu optimum değerdir (Schmidt, 1995).

2.4.7 Zamanın etkisi

Sistemde bulunan küçük damlaların, karıştırma işlemi sırasında bütünleşerek büyük damlalar oluşturması ve en sonunda da sistemin disperse halden homojen hale geçmesi için belli bir zamana ihtiyaç duyulmaktadır. Fazların farklı yoğunluk ve viskozite özellikleri gereği faz ayrımının gerçekleşmesi sistemden sisteme farklı zamanlarda gerçekleşmektedir. PEG/dekstran ve PEG/tuz sistemleri en kısa sürede oluşan sistemler olarak bilinmektedir (Albertsson, 1986).

2.4.8 Düşük molekül kütleli maddelerin etkisi

İyonik olmayan polimerlerden oluşan sistemler 0.1–1.0 M arasındaki şeker veya NaCl, KCl, Na₂CO₃, NaClO₄ gibi tuzların ilavesinden oldukça etkilenmektedir. Bunun yanı sıra bu maddelerin eklenmesiyle faz diyagramı ve kritik nokta çok fazla etkilenmemektedir. Faz sistemi sadece 1 M'dan yüksek tuz konsantrasyonlarından etkilenmektedir (Albertsson, 1986; Ferreira and Teixeira, 2011). Sulu ikili-faz sistemine faz oluşturucu tuzun yanında ikinci bir tuzun ilave

edilmesi spesifik proteinlerin belirli bir fazdaki dağılıma katsayısını değiştirme imkanını arttırmaktadır (Yue *et al.*, 2007).

2.5 Sulu İkili-Faz Sisteminin Uygulama Alanları

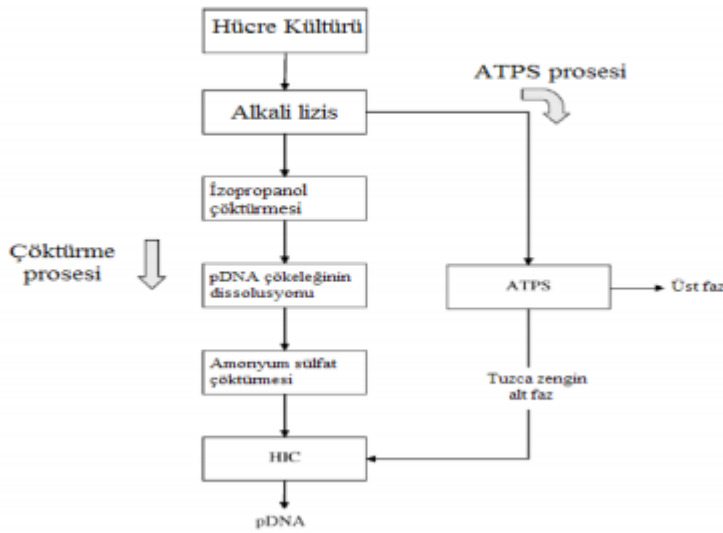
Protein gibi biyolojik moleküller genellikle çok seyreltik solüsyonlarda bulunduğu için geri kazanımında çoğunlukla ilk adım deriştirme işlemi olmaktadır. Biyolojik moleküllerin saflaştırılmasında ve geri kazanımında pek çok geleneksel yöntem mevcuttur. Bu yöntemlerde saflaştırma işlemi santrifüjleme, filtrasyon ve deriştirme gibi bir dizi adım içermektedir. Bu geleneksel yöntemlerin her bir aşamasında hedef enzim ya da proteinde bir miktar kayıp olacağı için geri kazanımda düşük olmaktadır. Uygun bir optimizasyona sahip sulu ikili-faz sistemi, berraklaştırma, deriştirme ve kısmi saflaştırma gibi bir dizi adımın entegre olduğu tek adımlı bir saflaştırma sağlamaktadır. Bu sayede geleneksel yöntemlerdeki eksikliklerin üstesinden gelinmektedir. Geri kazanım ve verimin yüksek olması, minimum protein denatürasyonu, yüzey geriliminin ve maliyetin düşük olması yöntemin kullanılabilirliğini arttırmaktadır. Uygun faz kompozisyonları seçilerek bir ya da daha fazla adımlı sulu ikili-faz sistemleri kullanılarak biyolojik moleküllerin saflaştırılması gerçekleştirilebilmektedir (Ketnawa *et al.*, 2017). Örneğin; *Rhodotorula glutinis* fenilamonyak liyaz (PAL, EC 4.1.3.5) enzimi geleneksel tuz çöktürme yöntemleri ile 1,32–2,5 kat arasında saflaştırılmış ve yöntemin verimi % 52,8–80,0 arasında değişiklik göstermiştir. Enzim sulu ikili-faz sistemi ile önce % 11,0 PEG-1000 / % 14,0 Na₂SO₄ ve daha sonra ikinci adımda % 11,0 PEG-1000 / % 14,0 Na₂SO₄ / % 5,3 Na₂CO₃ sistemi ile 9,3 kat saflaştırma katsayısı ve % 80,6 verim ile saflaştırılmıştır (Yue *et al.*, 2007). *Lentinus polychrous* Lev lakkaz (benzendiol: oksijen oksidoredüktaz; EC 1.10.3.2) enzimi % 12,0 PEG–4000 / % 16,0 KH₂PO₄ / % 0-5 NaCl (pH 7.0) sulu ikili-faz sistemi ile 3,01 kat ve % 99,08 verim ile saflaştırılmıştır (Ratanapongleka, 2012). Tavuk yumurtası lizozim (EC 3.2.1.17) enzimi % 16,1 PEG–6000 / % 12,0 Na₂SO₄ / 500 mM NaClO₄ (25 °C ve pH 10,0) sulu ikili-faz sistemi sayesinde oldukça verimli ve ekonomik bir şekilde 7,6 kat ve % 70 verim ile saflaştırılmıştır (Su and Chiang, 2006). *Clostridium perfringens* proteaz enzimi bir fermantasyon ortamından % 22 PEG- 10000 / % 8 Na-sitrat (pH 8.5) sistemi ile 0,57 dağılıma katsayısı, 4,3 saflaştırma katsayısı ve % 131 verimle saflaştırılmıştır (Porto *et al.*, 2007).

Albacore Tuna (*Thunnus alalunga*) mide proteaz enzimi, mide ekstraktı ve asitlendirilmiş mide ekstraktı olarak iki farklı örnek halinde incelenmiştir. Mide ekstraktı için; % 25 PEG -1000 / % 20 MgSO₄ sulu ikili-faz sistemi ile 7,2 kat ve % 85,7 verim ile saflaştırma sağlanırken, asitlendirilmiş mide ekstraktı için; % 15 PEG -2000/ % 15 MgSO₄ sulu ikili-faz sistem ile 2,4 kat ve % 89,1 verim ile saflaştırma sağlanmıştır (Nalinanon *et al.*, 2009). *Phanerochaete chrysosporium* katalaz enzimi (hidrojen peroksit oksidoredüktaz; EC 1.11.1.6) % 18 PEG -1000 / % 12 K₂HPO₄ (pH 8,2) sistemi ile 5,72 kat ve % 91,95 verimle saflaştırılmıştır (Kavakçioğlu ve Tarhan, 2012).

Sulu ikili-faz sistemi ayrıca bitki dokularından enzimlerin verimli bir şekilde saflaştırılmasında da kullanılmaktadır. Örneğin; *Carica papaya* latex bitkisinin yapraklarından papain (EC 3.4.22.2) % 14 PEG- 3350 / % 20 potasyum sitrat / % 5 NaCl (4 ° C ve pH 7,0) sulu ikili-faz sistemi ile 12 kat ve % 74,17 verimle saflaştırılmıştır (Tswiio *et al.*, 2017). Ananas bitkisinden (*Ananas comosus* L. Merrly) enzim karışımı halinde meyve bromelain (EC 3.4.22.33) enzimi ve polifenol oksidaz (PPO, EC 1.14.18.1) enzimi % 15 PEG -1500 / % 14 fosfat sulu ikili-faz sistemi ile 4,0 kat ve % 228 verimle meyve bromelaini, 2,7 kat ve % 90 verimle polifenol oksidaz saflaştırılmıştır (Babu *et al.*, 2007). *Ipomoea palmetta* bitkisinin yapraklarından peroksidaz (POD, EC 1.11.1.7) enzimi PEG/amonyum sülfat sistemi ve ardından jel fitrasyon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. % 24 PEG-6000 / % 7,5 (NH₄)₂SO₄ / % 2 NaCl sistemi kullanılarak ekstrakt hacminde istenen deriştirme sağlanmış ve enzim 0,042 dağılma katsayısı, 2,18 saflaştırma katsayısı ve % 91,5 verim ile deriştirilerek saflaştırılmıştır (Srinivas *et al.*, 1999). Bazı uygulamalarda sulu ikili-faz sistemleri kısmi saflaştırma sağlayarak bir ön işlem olarak da kullanılabilir. Örneğin; *Morus rotundiloba* dut yapraklarından peroksidaz (POD, EC 1.11.1.7) enzimi % 20 PEG – 8000 / % 8.9 (NH₄)₂SO₄ sistemi kullanılarak enzim 0,018 kat saflaştırılmıştır. Ardından iyon değişim kromatografisi için DEAE selüloz kolon ve çift jel filtrasyon kromatografisi için Sephadex G -75 kolonları kullanılarak ekstrakt için uygun deriştirme sağlanmış % 43,4 verimle 157,4 kat deriştirilerek saflaştırılmıştır (Luanghiran *et al.*, 2004).

Sulu ikili-faz sistemleri, DNA izolasyonunda geleneksel yöntemler olarak bilinen izopropanol ve amonyum sülfat çöktürmelerine gerek duyulmadan tek adımda ve hızlı bir şekilde DNA izolasyonunun gerçekleşmesini sağlamaktadır

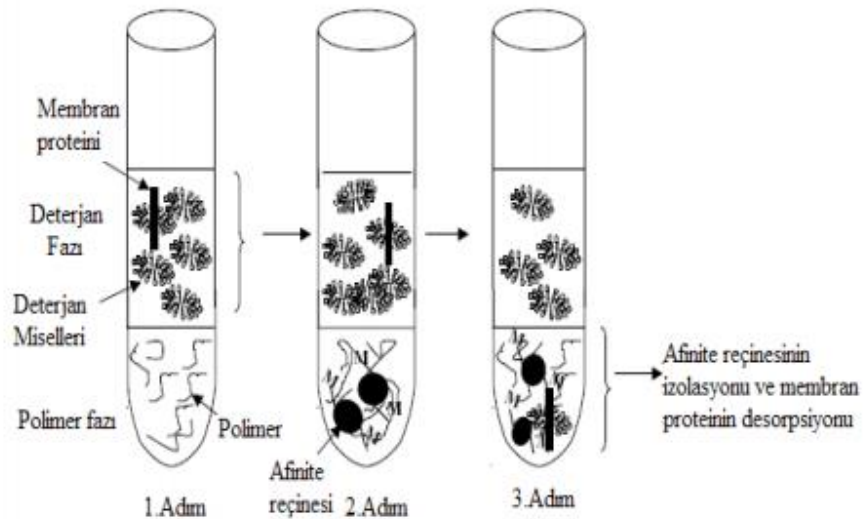
(Şekil 2.5). Kaotropik ajan ve deterjan içeren PEG/Tuz sistemleri ile nükleik asitler alt faza oldukça yüksek bir verimle dağılmaktayken istenmeyen proteinler ve diğer hücre materyalleri üst faza dağılmaktadır. Örneğin; *Escherichia coli* hücrelerinin lizisi ile açığa çıkan alkali lizatta yer alan plazmid DNA'sı (pDNA) % 19 PEG-600 / % 16.5 sodyum sitrat-amonyum sülfat / % 20 lizat (pH 6,9) sistemi ile tuzca zengin alt fazda % 91,1 verim ile % 17,2 saflıkta izole edilmektedir. Sulu ikili-faz sisteminin birkaç adımda tekrarlanmasıyla pDNA üst fazda daha yüksek saflıkta elde edilmiştir (Gomes *et al.*, 2009). Bir başka çalışmada ise polietileniminin (PEI) sulu ikili-faz sistemlerinde bir affinite ligandı olarak kullanılması ve alkali lizatta bulunan plazmit DNA (pDNA)'nın polipeksler (DNA'yı korumak için tasarlanmış polimer –DNA kompleksi) halinde elde edilmesi amaçlanmıştır. İki adımda saflaştırma sağlanmıştır. İlk adımda PEG-600 /amonyum sülfat sistemi hazırlanarak safsızlıklar üst fazda toplanmıştır. İkinci adımda PEG 3350 / dekstran 110 sistemi hazırlanmış ve RNA'nın pDNA ile aynı fazda olmaması için sisteme 0,2-0,5 M amonyum sülfat ilave edilmiştir. % 0,2 pPEI içeren PEG-3350 / dekstran-110 sistemi ile, istenmeyen pek çok RNA ve proteinden uzaklaştırılarak pDNA alt fazda % 100 verimle saflaştırılmış ve gen terapisi uygulamaları için 53 nm boyutlu polipeksler elde edilmiştir (Duarte *et al.*, 2007).



Şekil 2.6 Sulu ikili faz sistemi ile DNA izolasyonu (Trindade *et al.*,2005).

Membran proteinlerinin izolasyonu normalde oldukça zor ve zaman isteyen bir prosedürdür. Ancak sulu ikili-faz sisteminin kullanılması bu sorunun çözümünü

mümkün hale getirmiştir. Non-iyonik deterjanlar (Örneğin; Triton X-114, Tween - 20, C₁₂EO₅; penta etilen glikol mono-*n*-dodesil eter gibi) kullanılarak yüksek sıcaklıklarda kompleks biyolojik sistemlerden integral membran proteinlerince zengin preparatlar hazırlanabilmektedir (Sivars and Tjerneld, 2000). Örneğin; *Nocardia rhodochrous* kolesterol oksidaz (EC 1.1.3.6) enzimi etoksilenmiş non-iyonik C₁₂EO₅ deterjanı ile oluşturulmuş sulu ikili-faz sistemi ile tek adımda kısmi olarak 5 kat saflaştırma katsayısı ve % 90 verimle saflaştırılabilmektedir (Minuth *et al.*, 1995). 11-β-hidroksistireoid dehidrogenaz membran proteini ilk adımda Tween 20/Dekstran 500 sistemi ile *in-situ* olarak % 75 geri kazanımla üst fazda (deterjan fazı) toplanmıştır. Protein yeterli saflıkta olmadığı için alt faz (polimer fazı) atılmış ve ikinci adımda sisteme metal-afinite reçinesi içeren bir polimer ilave edilerek son adımda, alt fazda membran proteinin seçimli bir şekilde saflaştırılması sağlanmıştır (Şekil 2.6) (Roobol-Bóza *et al.*, 2004). Bir başka çalışmada ise; *Escherichia coli*'den sitokrom *bo*₃ ubikinol oksidaz membran proteini için metal şelatlayıcı içeren polimerler (PEG – iminodiasetik asit – Cu⁺² gibi) ve non –iyonik deterjanlar (Triton, Tween gibi) kullanılarak oluşturulan sulu ikili-faz sistemi ile, 0,015 kat olan dağılım katsayısı 4 katlık bir saflaştırma ile polimer fazında membran proteinin saflaştırılması sağlanmıştır (Sivars *et al.*, 2000).

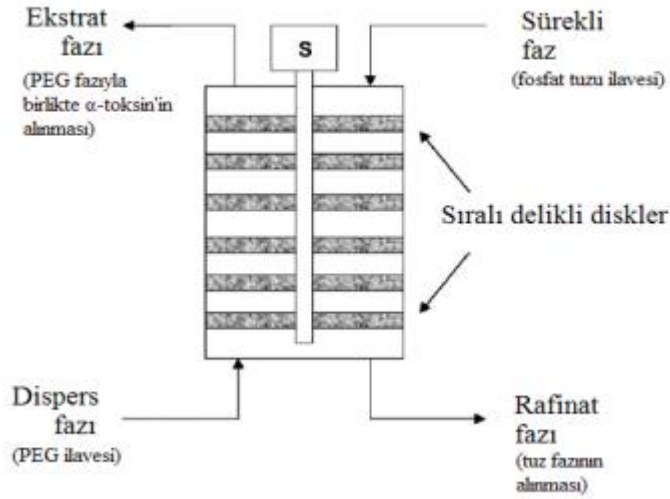


Şekil 2.7 Sulu ikili faz sistemiyle membran proteinin izolasyonu (Roobol-Bóza *et al.*, 2004).

Sulu ikili-faz sistemleri ile aminoasit ve peptit gibi düşük molekül kütleli biyomoleküllerin saflaştırılmasına yönelik çeşitli çalışmalar mevcuttur. Aminoasit ve peptitlerin polimerce zengin (PEGce) üst fazda toplanması hidrofobik karakterlerinin artırılmasıyla sağlanmıştır. Sonrasında PEG fazında bulunan aminoasit ve peptitlere çöktürme işlemi uygulanarak oldukça temiz bir çözelti elde edilmiştir. Bu çalışmalar daha karmaşık proteinlerin sulu ikili-faz sistemlerindeki davranışlarının anlaşılmasına yardımcı olmuştur (Eiteman and Gainer, 1990). Örneğin; PEG/K₂HPO₄ (293 K) sulu ikili-faz sisteminde L-glutamik asit, L-fenilalanin ve L-lizin aminoasitlerinin dağılımı incelenmiştir (Großmann *et al.*, 1997). PEG/Dekstran sulu ikili-faz sisteminin elektroforez yöntemiyle birlikte kullanıldığı bir çalışmada; glutamik asidin, fenilalanin ve triptofan aminoasitlerinden seçimli bir şekilde ayrımı gerçekleştirilmiştir (Zhai *et al.*, 2001). Glisin, alanin, 2- aminobütirik asit, valin, lösin, treonin, metiyonin, triptofan ve tirozinin iyonik sıvı bazlı ve fosfat tuzu içeren sulu ikili-faz sistemlerinde hidrofobikliğe bağlı ayrışma davranışları incelenmiştir (Pei *et al.*, 2012).

Biyoteknoloji alanında en fazla ilgiyi ham materyallerden protein izolasyonu ve saflaştırılmasını sağlayan sulu ikili-faz sistemleri çekmektedir. Sulu ikili-faz sistemleri sanayide büyük ölçeklerde protein geri kazanımı için de kullanılmaktadır. Örneğin; *Escherichia coli* homojenatından ZZ-kutinaz-(WP)₄ proteini iki adımlı ATPS ile büyük ölçekte çalışılmıştır. EO₅₀PO₅₀/Amilopektin ve EO₅₀PO₅₀/C₁₂₋₁₈EO₅ sistemleri ile 500 litrelik bir fed- batch reaktöründe yaklaşık konsantrasyonu 2,36 g/L olacak şekilde elde edilmiştir (Kepka *et al.*, 2003). *Ipomoea palmetta* yapraklarından elde edilen peroksidaz enzimi için sulu ikili-faz sistemi ve ultrafiltrasyon yöntemi birlikte kullanılmıştır. PEG -1550 / K₂HPO₄ / % 2 NaCl ATPS ile; 5,9 saflaştırma katsayısı, 9,7 kat aktivite kazancı ve % 76 geri kazanım sağlamak amacıyla ultrafiltrasyon yöntemiyle kombine edilerek büyük ölçekte çalışılmıştır (Srinivas *et al.*, 2002). Rekombinant *Trichoderma reesei* kaynaklı bir füzyon proteinin kültür ortamından ayrımı non-iyonik deterjan (Agrimul NRE 1205) kullanılarak oluşturulan sulu ikili-faz sistemi ile sağlanmıştır. Hacim ölçek büyütme yapılarak 10 mL'den 1200 L'ye başarılı bir şekilde çıkarılmıştır (Selber *et al.*, 2003). Sürekli karıştırmalı kontaktör (Şekil 2.7) içerisinde *Clostridium perfringens* Tip A mikroorganizmasının bulunduğu ham materyalden % 15 PEG -8000 / % 20 NaH₂PO₄ (pH 8,0) sulu ikili-faz sistemi ile

α -toksin, 113,9 dağılma katsayısı, 4,6 saflaştırma katsayısı ve % 230 verimle PEGce zengin üst fazda toplanmıştır (Cavalcanti *et al.*, 2007). Ancak, sulu ikili-faz sisteminin sahip olduğu bütün iyi özelliklere rağmen dağılma mekanizması tam olarak bilinmediğinden büyük sistemdeki çalışmaların deneysel olarak optimize edilmesi gerekmektedir.



Şekil 2.8 Sürekli karıştırılmalı kontaktör (Cavalcanti *et al.*, 2007).

Sulu ikili-faz sistemleri ile gıda, kozmetik ve ilaç endüstrisinde de sıklıkla kullanılan, suda çözünebilir ve doğal renklendirici olarak bilinen fenolik bileşik ve flavonoid sınıfından olan betalain ve antosiyaninlerin de saflaştırılması mümkün olmaktadır. Örneğin; PEG – 6000 / Amonyum sülfat sistemi ile betalainlerin % 70-75 verimle üst fazda toplanması sağlanmıştır. Şeker yapılarının betalainlerden uzaklaştırılması amaçlandığı için % 80-90 verimle şeker artıkları alt fazda toplanmıştır (Chethana *et al.*, 2007). Dut (*Morus atropurpurea* Roxb.) antosiyaninleri % 30 etanol / % 20 amonyum sülfat / % 10 dut ekstraktı / % 40 distile su (pH 4,5) ATPE sistemi ile antosiyaninler % 90 alt fazda toplanan şeker artıklarından uzaklaştırılmıştır. Antosiyaninler % 85 verimle üst fazda toplanarak saflaştırılmıştır. Ardından HPLC–ESI–MS/MS ile 5 tür antosiyanin tanımlanmıştır (Wu *et al.*, 2011). *Vaccinium uliginosum* Linn meyvesinin antosiyaninleri % 30 etanol / % 19 amonyum sülfat ATPS ile % 96,09 geri kazanımla ekstrakte edilmiştir. Antosiyaninler, sulu ikili-faz sistemi sonrasında kolon kromatografisi yöntemi kullanılarak saflaştırılmıştır (Hua *et al.*, 2013).

Sulu ikili-faz sistemleri biyoteknolojik alandaki uygulamalarla sınırlı kalmayıp analitik uygulamalara da sahiptir. Sulu ikili-faz sisteminde moleküllerin dağılması, faz bileşenlerinin etkilerinin yanında kendilerinin yüzeysel ve konformasyonel özellikleriyle de ilgili olduğundan analitik analizler yapılabilmektedir. Hücre fragmanlarını alt popülasyonlara ayırarak yük ve yüzeysel hidrofobik özelliklerinin ve bununla birlikte tuz ve pH koşullarının değiştirilmesi ile proteinlerin izoelektrik noktalarının belirlenmesini sağlamaktadır (Hatti-Kaul, 2000). Örneğin; PEG-8000 / Fosfat ATPS sistemi ile *E. coli* hücresinin fragmanlarından inklüzyon parçaları fraksiyonlarına ayrılmıştır (Walker and Lyddiatt, 1998). Bir başka çalışmada ise; 39 streptokok suşu ve 12 stafilokok suşu yüzey yükü ve hidrofobiklik özellikleri açısından incelenmiştir. Bakterilerin izoelektrik noktaları Dekstran / PEG sistemleri ile belirlenmiştir (Miörner *et al.*, 1982).

Sulu ikili-faz sistemlerinin uygulama alanları her geçen gün diğer endüstriyel uygulamalar ve atık giderimlerini içerecek şekilde genişletilmektedir. Çevresel sorunların çözülmesinde ve endüstriyel alanda delim, kesim, ezme gibi proseslerde kullanılan su bazlı soğutucu sıvılarda meydana gelen mikrobiyal büyümenin biyodegradasyonunu sağlamak zordur ve operatörler için mesleki riskler taşımaktadır. Bu soğutucu sıvılardan, mikroorganizmaların ve inorganik partiküllerin uzaklaştırılması sulu ikili-faz sistemleri ile sağlanabilmektedir (Hatti-Kaul, 2000). Tekstil alanında kullanılan boyalar, çevre kirliliğine yol açan metal iyonları ve organik maddeler, ham petroldeki aromatiklerin uzaklaştırılması gibi atık değerlendirmesinde sulu ikili-faz sistemlerinin daha çok kullanılabileceği düşünülmektedir (Hatti- Kaul, 2000; Rito Palomares, 2002). Ayrıca affinite kromatografisi ile birlikte terapötik antikorların analitik veya klinik amaçlı uygulamalarda kullanımı için çalışmalar yapılmaktadır (Platis and Labrou, 2009).

3. MATERYAL VE METOD

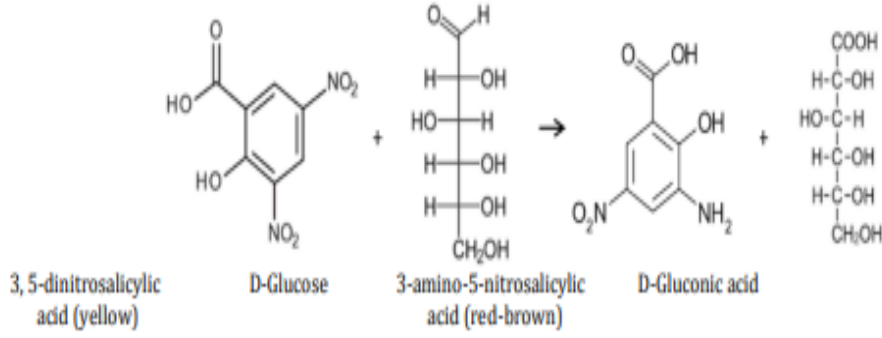
3.1 Materyal

Bu çalışmada kullanılan cihazlar ve yöntemlere ait bilgiler ilgili bölümlerde ayrıntılı olarak verilmiştir.

Kullanılan kimyasal maddeler; D(+)-Glukoz monohidrat ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$), Polietilen Glikol (PEG, MW; 3000, 4000, 6000, 8000, 10000) Fluka Biochemika'dan, Amonyum Sülfat ($(NH_4)_2SO_4$), Sodyum Hidroksit (NaOH), Magnezyum Sülfat ($MgSO_4$), Sodyum Sülfat (Na_2SO_4), Potasyum Klorür (KCl), Sodyum Sitrat ($Na_3C_6H_8O_7$), Sodyum Klorür (NaCl), Sodyum Karbonat (Na_2CO_3), Magnezyum Klorür ($MgCl_2$), Baryum Klorür ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$), Kalsiyum Klorür ($CaCl_2$), Mangan Sülfat ($MnSO_4 \cdot H_2O$), Çinko Sülfat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), Demir Klorür ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), E. Merck (Darmstadt-FRG)'den, Coomassie-Brilliant Blue Bio-Rad laboratuvarları, (Richmond CA) ve BDH Ltd. (Poole, UK)'den temin edilmiştir. Na/K Tartarat, Etanol, Fosforik Asit, Bakır Sülfat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), Mangan Klorür ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$), Nikel Klorür ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$), Civa Klorür (Hg_2Cl_2) ve Asetik Asit Riedel-de Haën'den, Sodyum Asetat, Karboksimetil selüloz (CMC), 3,5-Dinitrosalisilik Asit (DNS), Sığır Serum Albumini (Albumin Fraksiyon V) Sigma Chemical Co. (St. Louis, CA)'den temin edilmiştir. Kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

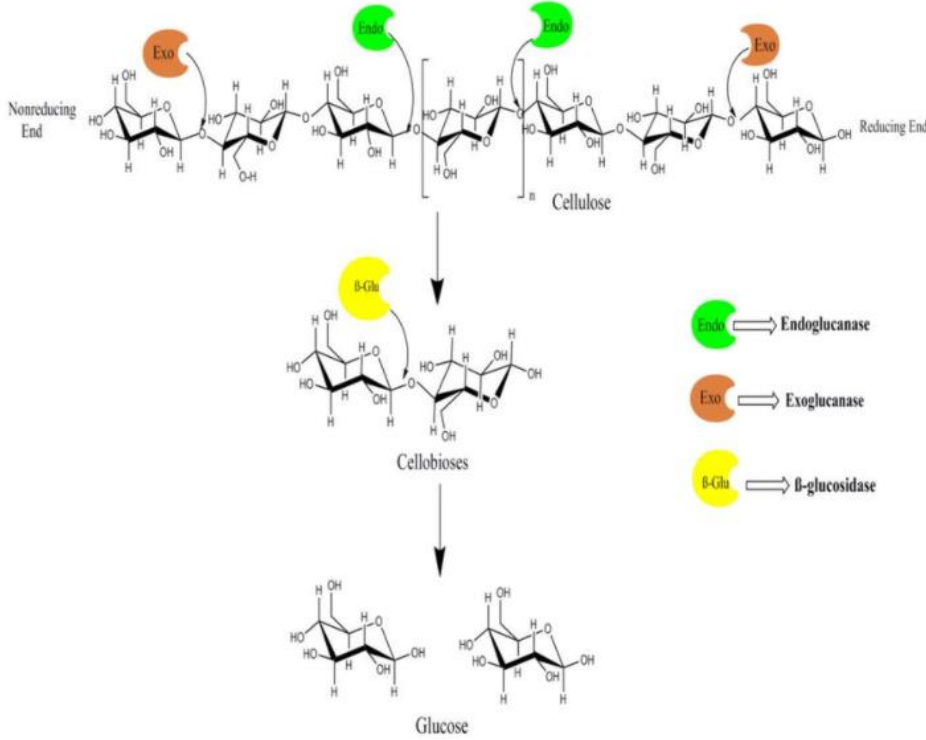
3.2 Selülaz Aktivitesi Tayini

Selülaz enziminin aktivite tayini, substrat olarak karboksimetil selüloz (CMC) kullanılarak enzimatik reaksiyon sonucunda açığa çıkan indirgen şeker miktarının Dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi ile belirlenmesine dayanmaktadır. Aktivite tayininde inkübasyonlar çalkalamalı su banyosunda (Memmert Su Banyosu, WNB Serisi), spektrofotometrik ölçümler ise Perkin Elmer marka spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonda bir mol glukoz bir mol 3,5-Dinitrosalisilik asit ile reaksiyona girerek 3-amino-5-nitrosalisilik asit oluşturmaktadır (Garriga *et al.*, 2017). Reaksiyon sonucu oluşan ürün konsantrasyonu 546 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir.



Şekil 3.1 DNS yönteminin prensibi (Garriga *et al.*, 2017).

Selülaz enzimi Şekil 3.2’de gösterilen reaksiyon ile CMC’nin yıkımını katalizler. Reaksiyonu sonucunda oluşan glukoz ve fruktoz indirgen şekerler olduğu için bu karışım “indirgen şeker” olarak adlandırılır.



Şekil 3.2 Selülozun selülaz ile hidroliz reaksiyonu (Sankarraj and Nallathambi, 2017).

Yapılarındaki anomerik karbonu açıkta olan şekerler indirgen şekerlerdir. Bunlar kimyasal olarak düz zincirli ya da halkalı yapıda bulunabilmektedir. Bu iki yapı formu kendi aralarında denge halindedir. Bir şeker oksitlendiği zaman onun karbonil grupları olarak bilinen aldehit ve keton grupları karboksil grubuna dönüşmektedir. Çifte bağın varlığı ve enol anyonundaki negatif yük, glukozun bakır

(Cu⁺²) ve demir (Fe⁺³) gibi orta derecede oksitleyici etkenlerle oksitlenebilen aktif bir indirgeyici madde haline gelmesini sağlamaktadır.

DNS Reaktifi: Tartılan 1 g DNS, 20 mL 2 N NaOH çözeltisine eklenir ve ısıtılarak çözülür. Son hacim distile su yardımı ile 50 mL'ye tamamlanır. Üzerine 30 g Na/K Tartarat ilave edilir ve karıştırılarak toplam hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

Selülaz aktivite tayini için reaksiyon ortamında; 0,25 mL distile su, distile suda hazırlanmış 0,25 mL % 1'lik (w/v) CMC ve 0,25 mL enzim çözeltisi içerir. Reaksiyon karışımı 50 ° C' de 5 dakika boyunca lineer karıştırılmalı su banyosunda çalkanalarak inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında reaksiyon ortamına 0,5 mL DNS reaktifi ilave edilerek kaynar su banyosunda 10 dakika inkübe edilir. Karışım soğutulduktan sonra 5 mL distile su ilave edilerek vorteks ile karıştırılır. Açığa çıkan invert şeker miktarı 546 nm' de spektrofotometrik olarak belirlenir. Kör 0,25 mL enzim çözeltisi yerine distile su içerir. Enzim aktivite miktarlarının hesaplanmasında 0,1-10 µmol glukoz konsantrasyon aralığı ile hazırlanan standart grafiği kullanılır.

Bir selülaz aktivite birimi, yukarıda belirtilen koşullar altında dakikada 1 µmol glukoz açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (U/mL). Enzimin spesifik aktivitesi (U/mg) aktivitenin (U/mL) protein miktarına (mg/mL) oranlanması ile hesaplandı.

3.3 Protein Tayini

Selülaz enzim preparatının protein konsantrasyonlarının tayini Bradford (Bradford, 1976) metodu ile gerçekleştirildi. Boya bağlama temelli yöntemlerin en yaygını, Bradford tarafından geliştirilen ve Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanıldığı yöntemdir. Yöntem, organik boyaların asidik grupları ile proteinlerin bazik gruplarının (Lys, Arg) etkileşerek renk oluşturmasını esas almaktadır.

Sığır serum albümininin (Bovine serum albümin; BSA), distile suda hazırlanmış 0,25 mg/mL'lik stok çözeltisinden 0,02–0,25 mg/mL konsantrasyon aralığı ile hazırlanan standart grafiği kullanılarak örnek protein konsantrasyonları hesaplandı.

Bradford Reaktifi: 40 mg Coomassie Brilliant Blue G250 % 95'lik (w/v) 50 mL etanolde 20-30 dakika boyunca karışmaya bırakılarak çözülür. Üzerine 55 mL % 88'lik (v/v) fosforik asit ilave edilerek 20 dakika daha karıştırılır. Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanır ve filtre edilir.

Her bir örneğin (standartlar ve bilinmeyen protein örnekleri) protein miktarı aşağıdaki prosedüre göre belirlenmiştir;

- a) 0,1 mL standart protein, bilinmeyen ve uygun oranda seyreltilmiş protein örneği ve distile su (kör için) plastik ölçüm küvetlerine pipetlenir.
- b) 2 mL Bradford reaktifi eklenir ve vorteks ile karıştırılır.
- c) Tüm plastik ölçüm küvetleri oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.
- d) Her bir örneğin absorbansı 595 nm'de okunur.

Protein konsantrasyonları, hazırlanan standart grafiği (0,02-0,25 mg/mL BSA standartları) kullanılarak hesaplanır.

Selülaz enziminin izolasyonu ve sulu ikili-faz sistemi ile saflaştırılması sırasında gerekli protein tayinleri bu yöntemle gerçekleştirilmiştir.

3.4 Sulu İkili-Faz Sistemi (ATPS) ile Selülazın Bezelyeden (*Pisum Sativum*) İzolasyonu ve Saflaştırılması

Selülaz (E.C 3.2.1.4) enzim kaynağı olarak, kolay temin edilebilen, ekonomik ve yüksek enzim aktivitesi içeren bezelye (*Pisum sativum*) seçilmiştir. Bir çok selülaz saflaştırma çalışmasında enzim, çeşitli mikrobiyal ve bitkisel kaynaklardan bilinen genel izolasyon ve saflaştırma metodları kullanılarak izole edilip, saflaştırılarak, fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenmiştir (Tangnu *et al.*, 1981; Mansfield *et al.*, 1998; Mawadze *et al.*, 2000; Bakare vd., 2005; Zhou *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018).

Selülaz enziminin saflaştırılması güç ve maliyeti yüksek bir işlemdir. Elde edilen enzim çoğunlukla yüksek aktiviteli olmasına rağmen çok az miktardadır. Çalışmada daha sonraki hedefimize uygun için selülaz enzimi bezelyeden izole edilerek kısmi olarak saflaştırılmıştır. Enzimin izolasyonu ve kısmi saflaştırılmasında sırasıyla öğütme, homojenizasyon, ve santrifüjleme gibi işlem basamakları yer almıştır ve izole edilen enzim sulu ikili-faz saflaştırma sisteminde kullanılmıştır.

Bezelye tartılıp porselen havan içerisinde öğütüldü ve üzerine 50 mM sodyum asetat tamponu (pH 4,5) eklendi. Karışım homojen bir preparat elde edilinceye kadar önce blender ile ve ardından homojenizatör ile homojenize edildi. Hücre kalıntılarını uzaklaştırmak için homojenat 5000 rpm'de 10 dakika, +4 ° C'de santrifüjlendi (Hettich 30RF, FRG). Çökelek atıldıktan sonra geriye kalan santrifüjate daha sonraki saflaştırma çalışmalarında kullanılmak üzere derin dondurucuda (Uğur, Nazilli) -20 ° C'de saklandı. Hazırlanan bu preparat hem protein miktarı hem de selülaz aktivitesi açısından sulu ikili-faz saflaştırma sistemi için oldukça uygun bir preparattır. Saflaştırma çalışmalarında kullanılacak olan bezelye selülazının protein miktarı, aktivitesi ve spesifik aktivite değerleri ilgili bölümlerde yeri geldikçe verildi.

3.4.1 Sulu ikili faz sisteminin hazırlanması

Stok PEG (% 50, w/v), amonyum sülfat (% 50, w/v), magnezyum sülfat (% 50, w/v), sodyum sülfat (% 30, w/v) ve sodyum sitrat (% 50, w/v) çözeltileri distile su ile hazırlanmıştır. Sulu ikili-faz sistemi (ATPS) uygun PEG ve tuz miktarları ile 1,25 mL selülaz santrifüjate ilave edilerek 15 mL'lik dereceli santrifüj tüplerinde hazırlanmıştır. PEG molekül ağırlığının (PEG MW; 3000, 4000, 6000, 8000 ve 10000) ve tuzların [(NH₄)₂SO₄, MgSO₄, Na₂SO₄ ve Na₃C₆H₈O₇] selülaz enziminin dağılımına etkisini incelemek için farklı polimer-tuz kompozisyonlarına sahip ATPS'ler hazırlanmıştır. Sistemlerin faz kompozisyonları konu ile ilgili makalelerde (Klompkloa *et al.*, 2005; Salabat, 2006; Yue *et al.*, 2007; Chaiwut *et al.*, 2010 Ferreira and Teixeira, 2011) mevcut olan faz diyagramlarına dayanmaktadır. 10 g olan son sistem ağırlığını ayarlamak için bidistile su kullanılmıştır. Sistemin pH'ı gereksinim doğrultusunda NaOH veya HCl kullanılarak ayarlanmıştır. Sistem 2-3 dakika hafif bir vorteksleme yapılmış ve faz ayrımının gerçekleşmesi için oda

sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir (Hettich 30RF, FRG). Alt ve üst fazlar Pasteur pipeti ile dikkatlice birbirinden ayrıldıktan sonra fazların hacimleri kaydedilmiştir. Her bir fazda enzimatik aktivite ve protein miktar tayinleri yapılmıştır. Sulu ikili-faz sistemi parametrelerinin analizi için tüm denemeler oda sıcaklığında ($25 \pm 2^{\circ}$ C 'de) her bir deneme seti için üç set halinde çalışılarak gerçekleştirilmiştir. Sulu ikili-faz sisteminin optimizasyonunda kullanılan koşullar Sonuçlar ve Tartışma bölümünde detaylı olarak açıklanmıştır.

3.4.2 Dağılım parametrelerinin belirlenmesi

Hedef biyomolekülün etkili bir ayrımının yapılabilmesi için fazlar arasındaki dağılım davranışları aşağıdaki parametrelerin değerlendirilmesi ile mümkündür:

Faz hacim oranı (V_R); üst fazın hacminin ($V_{Üst}$) alt fazın hacmine (V_{Alt}) oranıdır :

$$V_R = \frac{V_{Üst}}{V_{Alt}}$$

Proteinlerin dağılım katsayısı (K_p); sırasıyla alt ve üst fazdaki protein miktarlarının oranı şeklinde tanımlanmaktadır:

$$K_p = \frac{P_{alt}}{P_{üst}}$$

$P_{üst}$; üst fazdaki protein konsantrasyonunu, P_{alt} ; alt fazdaki protein konsantrasyonunu ifade etmektedir.

İnvertaz enziminin dağılım katsayısı (K_e); sırasıyla alt ve üst fazdaki selüloz enziminin aktivitelerinin oranı şeklinde belirtilmektedir:

$$K_e = \frac{A_{alt}}{A_{üst}}$$

$A_{üst}$; üst fazdaki selüloz aktivitesini, A_{alt} ; alt fazdaki selüloz aktivitesini ifade etmektedir.

Spesifik aktivite (SA); her bir fazdaki enzimatik aktivitenin (U/mL) yine her fazdaki protein konsantrasyonuna (mg/mL) oranı olarak ifade edilir ve U/mg protein olarak gösterilir:

$$SA = \frac{\text{Bir fazdaki enzimatik aktivite}}{\text{O fazdaki protein konsantrasyonu}}$$

Saflaştırma katsayısı (PF); alt fazdaki spesifik aktivitenin (SA) santrifüjatin spesifik aktivitesine oranı ile hesaplanmaktadır ve;

$$PF = \frac{SA_{alt}}{SA_{santrifüjat}}$$

olarak belirtilmektedir.

İnvertaz enziminin **geri kazanımı (% R)**; alt fazdaki selülozün enzimatik aktivitesinin sisteme ilave edilen selülozün başlangıç aktivitesine oranıdır ve;

$$R \% = \frac{\text{Alt fazdaki enzimatik aktivite}}{\text{Sisteme ilave edilen toplam aktivite}}$$

şeklinde gösterilir.

Sulu ikili faz sisteminde alt fazın **verimi (% Y)**; aşağıdaki formül ile hesaplanır:

$$Y \% = \frac{100V_{alt} K_e}{V_{alt} K_e + V_{üst}}$$

İnvertaz enziminin **selektivitesi (α)**; selülozün dağılım katsayısının (K_e) ve proteinlerin dağılım katsayısına (K_p) oranıdır:

$$\text{Selektivite } (\alpha) = \frac{K_e}{K_p}$$

3.5 Bezelye (*Pisum Sativum*) Selülaazının Karakterizasyonu

3.5.1 pH etkisi

Enzimler protein yapısındaki moleküller oldukları için katalitik aktiviteleri çevre koşullarından önemli oranda etkilenmektedir. Bunlardan birisi de ortamın pH'sıdır. Genellikle optimum pH eğrileri yardımıyla enzim aktivitesine pH etkisi incelenir. pH'ın enzim aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek için tampon pH'sı pH 3,0 ve pH 7,5 arasında değiştirilerek standart koşullarda aktiviteleri ölçüldü. İnkübasyon ortamının içerdiği tampon türü ve pH değerleri glisin-HCl tamponu (pH 3,0-3,5), asetat tamponu (pH 4,0-5,5) ve fosfat tamponu (pH 6,0-8,0) olarak seçildi. Enzim aktivitesi (% Bağlı Aktivite) ve pH ile oluşturulan grafikten enzimin optimum pH değeri belirlendi. Ölçümler üç tekrarlı yapıldı.

3.5.2 Sıcaklık etkisi

Enzimlerin katalitik aktivitesi sıcaklığa bağlıdır. Belirli sıcaklık değerlerinin üzerinde denaturasyon meydana geldiği için aktivitede düşme gözlenir. Sıcaklığın etkisi genellikle optimum sıcaklık eğrileri yardımıyla izlenir. Genellikle inkübasyon süresi arttıkça termal denaturasyon nedeniyle optimum sıcaklık düşer. Selülaaz enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağımlılığını incelemek ve optimum sıcaklığı belirlemek amacıyla inkübasyon sıcaklığı 20-85 ° C (20, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 85 ° C) sıcaklık aralığında değiştirilerek enzim aktivitesi ölçüldü. Enzim aktivitesi (% Bağlı Aktivite) ve sıcaklık arasında oluşturulan grafikten enzimin optimum sıcaklık değeri belirlendi. Ölçümler üç tekrarlı yapıldı.

3.5.3 Substrat konsantrasyonu etkisi

Doygunluk substrat konsantrasyonunu ve K_M ile V_{max} değerlerini belirlemek için düzenlenen deney setinde, distile suda hazırlanmış % 2 ve % 5'lik (% w/v) stok karboksimetilselüloz çözeltileri kullanılarak farklı karboksimetilselüloz konsantrasyonlarında (% 0,01- 2,5, w/v) aktivite tayini yapıldı.

Karboksimetilselüloz konsantrasyonu ve aktivite arasında oluşturulan grafik yardımıyla substrat doyumluk konsantrasyonu belirlenirken, $1/S$ ile $1/V$ arasında

çizilen Lineweaver-Burk diyagramından ise K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Her bir substrat konsantrasyonu için iki deneme yapıldı.

3.5.4 Efektör türü ve konsantrasyonunun etkisi

Bir enzimin aktivitesi yalnızca fiziksel etmenlerden değil kimyasal etmenlerden de etkilenmektedir. Bu etkiler aktiviteyi arttıran (aktivasyon) veya düşüren yada yok eden (inhibisyon) yönde olabilir.

Efektör olarak NaCl, KCl, MgCl₂.6H₂O, MgSO₄.7H₂O, BaCl₂.2H₂O, CaCl₂, MnSO₄.H₂O, MnCl₂.H₂O, ZnSO₄.7H₂O, Na₂CO₃, CuSO₄, FeCl₃.6H₂O, Ni⁺ ve Hg⁺in farklı konsantrasyonları (0,1-1,0-2,5 mM) reaksiyon ortamına eklenerek enzim aktiviteleri üzerine etkileri incelendi.

Her bir efektör türünün stok çözeltisi distile suda hazırlanarak 0,1-1,0-2,5 mM olacak şekilde seyreltildi. Farklı konsantrasyonlardaki efektörlerin 0,125 ml'si örnek tüplerine ilave edildi. Üzerlerine sırasıyla 0,125 mL % 2'lik (w/v) CMC (suda hazırlanmış) ve enzim preparatından 0,25 mL enzim eklenip 50 ° C'de 5 dakika inkübasyon sonrası standart koşullarda aktiviteleri ölçüldü.

3.6 Kararlılık Testleri

Enzim preparatları özellikle endüstriyel proseslerde kullanılacaklarsa en önemli kriterlerden birisi bu preparatların kararlılığıdır. Enzimin kararlılığı konusunda anlaşılan belirli çalışma koşullarında enzim aktivitesinin zamana bağlı olarak korunmasıdır. Aktivite kaybı ise, mikrobiyal yıkım, termik, pH veya kimyasal inaktivasyon gibi nedenlere dayanır. Bezelyeden saflaştırılan selüloz enziminin kararlılığını belirlemek için termal, pH ve depolama kararlılıkları incelenmiştir.

3.6.1 Termal kararlılık

Sıcaklık artışı kimyasal reaksiyonların hızını arttırdığı gibi enzim katalizli reaksiyonların hızını da arttırmaktadır fakat bu artış durumu sürekli değildir. Enzimlerin protein yapısında olmaları ve ısıya karşı dayanıklı olmamaları, sıcaklık

yükseldikçe inkübasyon süresine bağlı olarak aktivite kaybını hızlandırır. İnkübasyon süresine bağlı olarak aktivitede önce duraklama ve sonra da gerileme görülür. Sıcaklık sabit tutulduğunda ise inkübasyon süresinin uzaması denatürasyon sonucu aktivite kaybına neden olur.

Selülozlar da kaynaklarına bağlı olarak çeşitli kararlılık dereceleri gösterirler. Termal kararlılık tayininde, aynı miktarda protein içeren enzimler için hem sıcaklığa bağlı hem de zamana bağlı denemeler yapıldı. Sıcaklığa bağımlı termal kararlılık denemeleri için 20-85 ° C arası sıcaklık değerleri seçildi ve inkübasyon süresi sabit tutuldu. İnkübasyon süresine bağımlı termal kararlılık denemeleri için ise optimum sıcaklık değerinde 15-180 dakika arası inkübasyon sürelerinde denemeler yapıldı.

3.6.1.1 Sıcaklığa bağımlı termal kararlılık

Aynı miktar protein içeren enzimler, 30 dakika boyunca farklı sıcaklıklarda (20, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 85 ° C) lineer karıştırmalı su banyosunda (Mermert Su Banyosu, WNB Serisi) inkübe edildi. Daha sonra standart aktivite ölçüm koşullarında (50 ° C'de) aktivite tayinleri yapıldı. Selüloz aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı; 0,25 mL distile su, 0,25 mL distile suda hazırlanmış % 1'lik (w/v) CMC (karboksimetil selüloz) ve 0,25 mL enzim çözeltisi içerir. Reaksiyon karışımı 50 ° C' de 5 dakika boyunca lineer karıştırmalı su banyosunda (Mermert Su Banyosu, WNB Serisi) çalkanalarak inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında reaksiyon ortamına 0,5 mL DNS reaktifi ilave edilerek kaynar su banyosunda 10 dakika inkübasyona bırakılır. Karışım soğutulduktan sonra 5 mL distile su eklenerek vorteks yardımı ile karıştırma işlemi uygulanır. Açığa çıkan indirgen şeker miktarı 546 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenir. Kör tüpünde enzim çözeltisi yerine distile su bulunmaktadır. Her bir sıcaklık için örnekler çift çalışılmıştır.

3.6.1.2 İnkübasyon süresine bağımlı termal kararlılık

Aynı miktar protein içeren enzimler, optimum sıcaklıkta (55 ° C) belirli sürelerde (15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 dakika) lineer karıştırmalı su banyosunda (Mermert Su Banyosu, WNB Serisi) inkübe edildikten sonra standart aktivite tayin koşullarında aktivite tayinleri yapıldı. Selüloz aktivitesi ölçümünde reaksiyon

karışımı; 0,25 mL distile su, 0,25 mL distile suda hazırlanmış % 1'lik (w/v) CMC (karboksimetil selüloz) ve 0,25 mL enzim çözeltisi içerir. Hazırlanan reaksiyon karışımları, 50 ° C' de 5 dakika boyunca lineer karıştırılmalı su banyosunda (Mermert Su Banyosu, WNB Serisi) çalkanalarak inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında reaksiyon ortamına 0,5 mL DNS reaktifi ilave edilerek kaynar su banyosunda 10 dakika inkübasyona bırakılır. Karışım soğutulduktan sonra 5 mL distile su eklenerek vorteks yardımı ile karıştırma işlemi uygulanır. Açığa çıkan indirgen şeker miktarı 546 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenir. Kör tüpünde enzim çözeltisi yerine distile su bulunmaktadır. Her bir sıcaklık için örnekler çift çalışılmıştır.

3.6.2 pH kararlılığı

Enzimlerin aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden birisi de pH'dır. İnkübasyon ortamının pH'sı, protein molekülünün tamamının yük ve dissosiasyon durumu yanında aktif merkezini de etkiler. Selülazların optimum pH değerleri kullanılan enzim kaynağına, substrata, inkübasyon zamanı ve sıcaklığına göre oldukça geniş bir aralıkta farklılık gösterir.

Ortamın pH'sının enzim aktivite ve kararlılığına etkisini incelemek amacıyla hem pH bağımlı hem de inkübasyon süresine bağımlı deney setleri hazırlanmıştır. pH bağımlı pH kararlılığı denemelerinde; 3,0-7,5 pH aralıkları için farklı tampon türleri hazırlandı. İnkübasyon sıcaklığı ve süresi sabit tutularak çalışıldı. İnkübasyon süresine bağımlı pH kararlılığı denemelerinde ise; optimum pH değerinde ve + 4° C'de farklı inkübasyon sürelerinde çalışıldı.

3.6.2.1 pH'ya bağımlı pH kararlılığı

pH'ya bağımlı pH kararlılığını incelemek için hazırlanan deney setinde enzim 50 mM glisin-HCl (pH 3,0-3,5), 50 mM asetat (pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5) ve 50 mM sodyum fosfat (6,0; 7,0; 7,5) tamponlarının farklı pH değerlerinde 1 saat boyunca + 4 ° C' de inkübe edildi. Ardından standart aktivite koşullarında aktivite tayinleri yapıldı. Selülaz aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı; 0,25 mL distile su, distile suda hazırlanmış 0,25 mL % 1'lik CMC (% w/v, karboksimetil selüloz) ve 0,25 mL enzim çözeltisi içerir. Reaksiyon karışımı 50 ° C' de 5 dakika boyunca lineer

karıştırmalı su banyosunda (Memmert Su Banyosu, WNB Serisi) çalkanalarak inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında reaksiyon ortamına 0,5 mL DNS reaktifi ilave edilerek kaynar su banyosunda 10 dakika inkübe edilir. Karışım soğutulduktan sonra 5 mL distile su ilave edilerek vorteks ile karıştırılır. Açığa çıkan invert şeker miktarı 546 nm’de spektrofotometrik olarak belirlenir. Kör 0,25 mL enzim çözeltisi yerine distile su içerir. Her bir deneme çift çalışılmıştır.

3.6.2.2 İnkübasyon süresine bağımlı pH kararlılığı

İnkübasyon süresine bağımlı pH kararlılığını incelemek için hazırlanan deney setinde enzim optimum pH değerinde (pH 4,5) ve 4⁰ C’ de belirli sürelerde (1, 2, 3, 4, 5, 6 saat) inkübe edildikten sonra standart aktivite koşullarında (pH 4,5) aktivite tayinleri yapıldı. Selülaz aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı; 0,25 mL distile su, distile suda hazırlanmış 0,25 mL % 1’lik CMC (% w/v, karboksimetil selüloz) ve 0,25 mL enzim çözeltisi içerir. Reaksiyon karışımı 50⁰ C’ de 5 dakika boyunca lineer karıştırmalı su banyosunda (Memmert Su Banyosu, WNB Serisi) çalkanalarak inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında reaksiyon ortamına 0,5 mL DNS reaktifi ilave edilerek kaynar su banyosunda 10 dakika inkübe edilir. Karışım soğutulduktan sonra 5 mL distile su ilave edilerek vorteks ile karıştırılır. Açığa çıkan invert şeker miktarı 546 nm’ de spektrofotometrik olarak belirlenir. Kör 0,25 mL enzim çözeltisi yerine distile su içerir. Her bir deneme çift çalışıldı.

3.6.3 Depo kararlılığı

Depo kararlılığı, enzim uygulamalarını ilgilendiren önemli bir parametre olup uzun süre saklama durumunda enzimin aktivite kaybının bir ölçüsüdür. Depo kararlılığını belirlemek için, ölçek büyütme sonrasında porsiyonlanan ve -20⁰ C’de saklanan enzim örnekleri kullanıldı. 63 gün sonunda örnek alınarak standart aktivite koşullarında aktivitesi tayin edildi. Selülaz aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı; 0,25 mL distile su, distile suda hazırlanmış 0,25 mL % 1’lik CMC (% w/v, karboksimetil selüloz) ve 0,25 mL enzim çözeltisi içerir. Reaksiyon karışımı 50⁰ C’ de 5 dakika boyunca lineer karıştırmalı su banyosunda (Memmert Su Banyosu, WNB Serisi) çalkanalarak inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında reaksiyon ortamına 0,5 mL DNS reaktifi ilave edilerek kaynar su banyosunda 10 dakika inkübe edilir. Karışım soğutulduktan sonra 5 mL distile su ilave edilerek vorteks ile karıştırılır.

Açıĝa çıkan invert Şeker miktarı 546 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenir. K r 0,25 mL enzim  zeltisi yerine distile su içerir. Her bir deneme çift çalışıldı.



4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 Selülazın Bezelyeden (*Pisum sativum*) İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması

Selülaz enziminin çok çeşitli uygulama alanlarından dolayı, enzimin farklı kaynaklardan izolasyonu ve saflaştırılması oldukça önem kazanmıştır. Enzim; mikrobiyal (Myers and Norcote, 1959; Selby and Maitland, 1967; Tangnu *et al.*, 1981; Beldman *et al.*, 1985; Fukumori *et al.*, 1985; Chan and Au, 1987; Mawadze and Zvauya, 1996; Bok *et al.*, 1998; Krishna *et al.*, 2000; Domingues *et al.*, 2001; Bukhtojarov *et al.*, 2004; Juhász *et al.*, 2005; Narasimha *et al.*, 2006; Kotchoni *et al.*, 2006; Nazir *et al.*, 2009; Aygan *et al.*, 2011; Shahriarinnour *et al.*, 2011), bitkisel (Wong *et al.*, 1977; Hatfield and Nevins, 1986; Guerriero *et al.*, 2018) ve hayvansal (Watanabe *et al.*, 1998; Sami and Shakoori 2007; Bignell *et al.*, 2011; Andriani *et al.*, 2011) kaynaklardan bilinen izolasyon ve saflaştırma teknikleri kullanılarak izole edilip saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılarak uygulamaya sunulmuştur. Selülaz enzimi; yem katkı maddesi olarak (Bedford *et al.*, 2003) ve yemlerin besin değerlerini arttırmak amacıyla monogastrik ve ruminant yemlerinin üretimi için yem endüstrisinde (Bhat, 2000; Kıran *et al.*, 2006), meyve sularının ekstraksiyonu ve berraklaştırılması (Grassin and Fauquembergue, 1996), zeytinyağı ekstraksiyonu (Fantozzi *et al.*, 1997) ve ekmek ve hamur kalitesini iyileştirmek için (Yurdugul *et al.* 2012) gıda endüstrisinde, kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde (Liu and Hu, 2012; Mai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007) ve tekstil endüstrisinde (Heikinheimo *et al.*, 2000) kullanılmıştır. Ayrıca endüstriyel ölçekte deterjanlarda da kullanılmış (Kottwitz and Schambil, 2005) ve proteazlar ve lipazlar ile kombinasyon halinde kullanımı yeni araştırma konularından olmuştur (Singh *et al.*, 2007). Selülaz enzimi bu alanlar dışında; immobilizasyon çalışmaları (Pazarlıoğlu *et al.*, 2005), pigment ekstraksiyonu ve kombinasyonlarının kullanımı (Bunea *et al.*, 2009), biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu (Puri *et al.*, 2011), bakteriyel biyofilmin giderilmesi (Bhanja *et al.*, 2009), ticari biyokatalizör olarak farmasötik endüstri (Connolly *et al.*, 2010), biyokütlenin etanole dönüştürülmesi (Wilkins *et al.*, 2007), zirai ve endüstriyel atıkların sakkarifikasyonu (Kıran *et al.*, 2006) gibi endüstriyel ve biyoteknolojik uygulama alanlarında uygulanma imkanı bulmuştur. Selülazlar genellikle bir sistem halinde ve sinerjistik halde hücre içerisinde ve diğer

çeşitli glikozidazlarla bir arada bulunurlar. Bu nedenle, çoğu kez bu aktiviteleri birbirinden ayırmak oldukça zor olmaktadır. Eğer hazırlanan enzim preparatı selüloz sistemi içindeki enzimlerden biri ve diğer enzimlerce kontamine edilmiyor ise yukarıda belirtilen bir çok kullanım alanı için uygun olacaktır.

Bu çalışmada, enzim kaynağı olarak bezelye (*Pisum sativum*) seçildi. Enzim kaynağı tarama çalışması sonucunda, bezelyenin diğer enzim kaynaklarına kıyasla yüksek bir selüloz aktivitesine sahip olması, protein içeriğinin yüksek olması nedeniyle sulu ikili-faz sistemi (ATPS) ile selüloz enziminin saflaştırılmasında uygun bir kaynak olacağına karar verildi. Ayrıca bezelye, üretimi bol, ucuz ve her zaman kolaylıkla temin edilebilir olması nedeniyle de tercih edildi. Enzim, “Materyal ve Metod” kısmında açıklandığı gibi bilinen ve basit yöntemler ile bezelyeden saflaştırılıp, çalışmanın amacına yönelik uygun kısmi saf preparat hazırlandı. Çalışmada kullanılan selüloz preparatının protein içeriği, aktivite ve spesifik aktivite değerleri yeri geldikçe ilgili bölümlerde ve çizelgelerde verildi.

Bezelye ekstraktından (5,7 mg protein/mL, 3,5 U/mg protein) yola çıkılarak optimize sulu ikili-faz sistemi (% 15, w/w, PEG-6000 / % 10, w/w, Na₂SO₄ / pH 6,0 / 1,8 mL enzim) ile selüloz enzimi santrifüjate kıyasla 2 kat saflaştırıldı (6,2 mg protein/mL, 7,3 U/mg protein) ATPS optimizasyonu ve saflaştırma çalışmalarından elde edilen sonuçlar aşağıda detaylı olarak açıklandı.

4.2 Sulu İkili Faz Sistemi (ATPS) ile Bezelye (*Pisum sativum*) Selülozünün Saflaştırılması

Bezelyeden izole edilen selüloz enziminin (5,7 mg protein/mL, 3,5 U/mg protein) saflaştırılmasında sulu ikili-faz sistemlerinden polimer-tuz sistemi kullanıldı. Bu amaçla, polimer olarak polietilenglikol (PEG) ve tuz olarak farklı sülfat tuzları ve sodyum sitrat tuzu tercih edildi. ATPS’de faz oluşturan bileşenlerin seçimi en önemli noktalardan birisidir. Bu sistemlerde moleküllerin fazlar arasındaki dağılım davranışları hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları, yük, sterik etkiler ve biyomoleküllerin özellikleri gibi çeşitli faktörlerden dolayı oldukça kompleksdir. Uygun sistemlerin seçimi ve tasarımını sağlayacak kapsamlı ve mekanistik bir teori mevcut değildir. Bu yüzden, bu metodun uygulamalarında

biyomoleküllerin optimum dağılımını sağlayan en uygun ve verimli sistemin hazırlanabilmesi için deneysel optimizasyon çalışmalarına ihtiyaç duyulur. Bu çalışmada tercih edilen sulu ikili-faz sistemi (PEG-Tuz) tek adımda saflaştırma, yüksek seçicilik, düşük maliyet ve düşük viskoziteden dolayı birçok sisteme kıyasla daha avantajlı sistemlerdir. ATPS’de faz oluşturucu polimer olarak PEG’in seçilmesindeki ana kriter; düşük maliyet ve dengeye çok hızlı ulaşmasıdır. Bu sistemlerde diğer önemli bir bileşen ise tuzdur. ATPS sistemlerinin oluşturulmasında farklı türde tuzlar (fosfat, sitrat, sülfat gibi) kullanılabilir (Benavides *et al.*, 2008; Goja *et al.*, 2013). Bu çalışmada, polimer-tuz sistemlerinin hazırlanmasında sıklıkla kullanılan tuzlardan olan sülfat ve sitrat tuzları tercih edildi.

Selülaz enziminin saflaştırılmasında kullanılacak olan sulu ikili-faz sistemini optimize etmek ve böylece enzimi yüksek bir verim ve oranda saflaştırmak için sistem için önemli olan temel parametreler (PEG molekül kütlesi ve konsantrasyonu, tuz türü ve konsantrasyonu, pH ve enzim miktarı) incelendi. 10 mL’lik sulu ikili-faz sistemi, 15 mL’lik dereceli santrifüj tüpleri kullanılarak uygun tür ve konsantrasyonlardaki PEG ve tuzlar ile bölüm 3.5.1’de açıklandığı gibi hazırlandı.

4.2.1 Tuz türünün belirlenmesi

Çeşitli tuzların $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, \text{MgSO}_4, \text{Na}_2\text{SO}_4, \text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7]$ farklı konsantrasyonları ile hazırlanan sulu ikili-faz sistemlerinde bezelye selülazının dağılımı ve ayırımı gerçekleştirildi ve sonuçlar Çizelge 4.1’de verildi. Tuz türünün belirlenmesi çalışmalarında polimer olarak PEG-3000 kullanıldı.

Çizelge 4.1’den görüldüğü gibi bezelye selülazı farklı bileşimlerdeki faz kompozisyonlarının çoğunda dağılabilmektedir. Sulu ikili-faz sistemi hazırlandıktan sonra iki faz oluşur; bu fazlar PEG’ce zengin üst faz ile tuzca zengin alt fazdır. Sulu ikili faz sistemleri ile yapılan ayırım çalışmalarında enzimler çoğunlukla PEG’ce zengin üst faza dağılmaktadır. Fakat bezelye selülazı seçimli bir şekilde alt fazı (tuz fazı) tercih etmektedir ve geri kazanımı da oldukça yüksektir. PEG’ce zengin üst fazın hidrofobisitesi alt fazdan daha yüksek olduğu için bu durum enzimin oldukça hidrofilik olduğunu göstermektedir (Wu *et al.*, 2000).

Çizelge 4.1 Selülaz enziminin dağılımına faz bileşimi ve tuz türünün etkisi.

Faz Kompozisyonu (% , w/w)	SA _{üst}	SA _{alt}	K _p	PF (fold)	V _R	R (%)
% 10 PEG-3000 + % 10 (NH ₄) ₂ SO ₄ *	-	-	-	-	-	-
% 10 PEG-3000 + % 15 (NH ₄) ₂ SO ₄	0,23	0,3	6,66	0,1	0,36	11,5
% 15 PEG-3000 + % 10 (NH ₄) ₂ SO ₄	0,63	1,5	0,8	0,6	4	57,7
% 15 PEG-3000 + % 15 (NH ₄) ₂ SO ₄ *	-	-	-	-	-	-
% 10 PEG-3000 + % 10 MgSO ₄ *	-	-	-	-	-	-
% 10 PEG-3000 + % 15 MgSO ₄ *	-	-	-	-	-	-
% 15 PEG-3000 + % 10 MgSO ₄ *	-	-	-	-	-	-
% 15 PEG-3000 + % 15 MgSO ₄	14,8	0,5	7,2	0,2	1,75	19
% 10 PEG-3000 + % 10 Na ₂ SO ₄	1,3	2,5	10	0,96	0,5	96
% 10 PEG-3000 + % 15 Na ₂ SO ₄	1,1	3,3	11	1,3	0,28	128
% 15 PEG-3000 + % 10 Na ₂ SO ₄	3,3	2,8	8,6	1	0,75	107,7
% 15 PEG-3000 + % 15 Na ₂ SO ₄	2	5	8	2	0,4	192
% 10 PEG-3000 + % 10 Na ₃ C ₆ H ₈ O ₇ *	-	-	-	-	-	-
% 10 PEG-3000 + % 15 Na ₃ C ₆ H ₈ O ₇	1,36	2,4	3,5	0,9	0,5	92,3
% 15 PEG-3000 + % 10 Na ₃ C ₆ H ₈ O ₇ *	-	-	-	-	-	-
% 15 PEG-3000 + % 15 Na ₃ C ₆ H ₈ O ₇	1,2	1,8	3,1	0,7	1	69,2

* Bu faz kompozisyonlarında faz oluşumu gözlenmemiştir.

Genellikle, negatif yüklü proteinler PEG/Tuz sistemlerinde üst faza, pozitif yüklü proteinler ise alt faza seçimli olarak dağılmaktadır (Glyk *et al.*, 2017; Sripokar *et al.*, 2017). Bu nedenle alt faza dağılan selülaz enziminin pozitif yüklü olması muhtemeldir. Çeşitli faz kompozisyonları ile hazırlanan sulu ikili-faz sistemlerine ait tuz fazındaki spesifik aktivite (SA_{alt}), saflaştırma faktörü (PF) ve geri kazanım % R değerleri kıyaslandığında tuz olarak Na₂SO₄'ın kullanıldığı faz sistemleri ile elde edilen sonuçlar oldukça dikkat çekicidir (Çizelge 4.1). Amonyum sülfat ve sodyum sitrat kullanılarak hazırlanan farklı bileşimlerdeki faz sistemlerinde SA_{alt}, PF ve R değerlerinin düşük olması, çoğu faz bileşiminde faz oluşumunun gözlenmemesi ve faz hacim oranının (V_R) 1 ve üzerinde olması nedeniyle selülaz enziminin dağılımında etkin olmadıkları belirlendi. Çizelge 4.1'den görüldüğü gibi, MgSO₄ tuzu kullanılan ATPS sistemlerinin çoğunda faz oluşumu gözlenmemiş olup sadece % 15 (w/w) PEG – 3000 + % 15 (w/w) MgSO₄ sisteminde faz oluşumu gerçekleşmiştir. Bu sistemde enzim, kullanılan diğer tuz türlerinden farklı bir davranış göstermiş ve üst faza yönelmiştir. Üst fazda elde

edilen SA ve PF değerleri yüksek olmasına rağmen sistemde çözünme probleminin olması ve çökelme meydana gelmesi nedeniyle bu koşullar tercih edilmemiştir. % 10 (w/w) PEG -3000 + % 15 (w/w) Na₂SO₄ sistemi ile bezelye selülazı % 128 geri kazanım ile 1,3 kat saflaştırıldı. % 15 (w/w) PEG -3000 + % 15 (w/w) Na₂SO₄ sistemi ile enzim % 192 geri kazanım ile 2 kat saflaştırıldı. Fakat tuz konsantrasyonu nedeniyle aktivite geri kazanımının aksine protein geri kazanımı düşük olduğu için tercih edilmemiştir. Sülfat tuzlarından Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄ ve MgSO₄ tuzlarına kıyasla proteinler arasındaki hidrofobik etkileşimleri çok daha fazla arttırma yeteneğine sahip olduğundan selülaz enzimini daha kuvvetli bir şekilde tuz fazına yönlendirmektedir. PEG/Na₂SO₄ ATPS sistemi selülaz enziminin çoğunu alt faza ynlendirdiğinden enzimin sistemde dağılımı hidrofobisite ile etkilenmektedir. Fazlar arasındaki hidrofobik farkın arttırılması PEG ve protein molekülleri arasındaki hidrofobik etkileşimlerin olma olasılığını daha da arttıracadığından daha iyi bir saflaştırmaya neden olacaktır.

Farklı tuz türleri kullanılarak yapılan literatür çalışmalarında tuz türünün etkisi araştırılmıştır. Örneęin bir çalışmada, PEG-6000 ve farklı tuz türleri kullanılarak hazırlanan sulu ikili-faz sistemlerinde tuz türünün etkisini belirlemek amaçlanmış ve elde edilen sonuçlar, MgSO₄'ın salting-out gücünün Na₂SO₄ ve (NH₄)₂SO₄'tan daha büyük olduğunu göstermiştir (Salabat *et al.*, 2001). Bir başka çalışmada ise balık proteinlerinin MgSO₄, K₂HPO₄, Na₃C₆H₅O₇, Na₂SO₄, (NH₄)₂PO₄, K₃C₆H₅O₇ gibi farklı tuzlar kullanılarak sulu ikili-faz sisteminde dağılımı incelenmiş ve Na₂SO₄ içeren sistemin protein dağılım katsayısının (K_p) daha yüksek olduğu grlmştir (Nagaraća and Iyyaswami, 2014). *Calotropis procera* lateksinden elde edilen proteazın sulu ikili-faz sisteminde ayırımı sırasında Na-sitrat, MgSO₄, K₂HPO₄ ve (NH₄)₂SO₄ gibi farklı tuz türleri kullanılmıştır. En yüksek proteaz geri kazanımı, MgSO₄ tuzu içeren sistemde ve PEG açısından zengin fazda bulunmuştur (Chaiwut *et al.*, 2010). Literatür çalışmalarında belirli tuz türleri kullanılarak hazırlanan sulu ikili-faz sistemleri ve bu sistemlerin K_p, verim, saflaştırma katsayısı, geri kazanım gibi değerleri de hesaplanmıştır. Örneęin; (NH₄)₂SO₄ tuzu kullanılarak hazırlanan bir sistemde arpa β -galaktozidazı ve β -glukozidazı sırasıyla, 2,7 ve 2,6 K_p değerleri ile % 98,26 ve % 92,58 verimle saflaştırılmıştır (Hemavathi and Raghavaro, 2011). Mısır ekstraktlarından protein geri kazanımı için yapılan bir başka çalışmada, sistemde Na₂SO₄ tuzu kullanılmış

ve % 93 verim elde edilmiştir (Gu and Glatz, 2007). PEG/sitrat sistemi ile karboksimetil selüloz için, % 88.82 geri kazanım ve 4.8 saflaştırma katsayısına ulaşılmıştır (Ho *et al.*, 2017). Sonuç olarak, çeşitli tür tuzlar sistemdeki suyun yapısına ve hidrofobik etkileşimlere farklı şekilde etki ederler (Gündüz, 2000). Bu nedenle, daha sonraki çalışmalarda tuz olarak Na_2SO_4 kullanılmak üzere PEG/ Na_2SO_4 ayırma sistemleri ile devam edildi.

4.2.2 PEG molekül kütlelerinin belirlenmesi

Sulu ikili-faz sistemleriyle gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda seçimli ve yüksek verimli saflaştırma sağlayan optimum sistemi bulmak hedeflenir. Bu nedenle sistemin optimizasyonunda uygun polimer molekül kütlelerinin seçimi en önemli noktalardan bir tanesidir. Polimer molekül kütlesi materyalin dağılımında önemlidir. Faz diyagramını değiştirerek (örneğin faz bileşimine etki ederek) ya da polimer-enzim etkileşimlerinin sayısını değiştirerek materyalin fazlara dağılımını etkiler (Engel *et al.*, 2000; Su and Chiang, 2006). PEG molekül kütlelerinin faz hacimlerinin oranına (V_R), enzimin dağılıma katsayısına (K_e), proteinlerin dağılıma katsayısına (K_p), saflaştırma katsayısı ve enzimin geri kazanımına etkisi % 10 (w/w) PEG / % 15 (w/w) Na_2SO_4 sistemi kullanılarak incelendi ve sonuçlar Çizelge 4.2'de verildi.

Selüloz enziminin PEG/ Na_2SO_4 sisteminde dağılımı PEG'in molekül kütlelerine bağlıdır. Bu özellik genelde PEG'in zincirleri ve biyomateryalin hidrofobik alanı arasındaki hidrofobik etkileşimlere dayandırılmaktadır. Genellikle PEG molekül kütlelerinin artması ile ekstraksiyon verimi azalmaktadır. Yüksek molekül kütlelerinde PEG ve protein domaini arasındaki etkileşim düşmektedir ve buna bağlı olarak K_e düşmektedir. Polimerin molekül ağırlığındaki artışın polimerin dışlama etkisini yükseltmesi bu durumun sebeplerinden biridir. Bunun sonucunda polimer kendi içerisinde oluşturduğu intramoleküler hidrofobik etkileşimler ile daha sıkı bir konformasyon kazanır ve biyomolekülün üst faza dağılımını engeller. Bu durum yüksek viskozite ve düşük tekrarlanabilirlik ile sonuçlanır (Mohamadi *et al.*, 2007; He *et al.*, 2005). Düşük molekül ağırlığına sahip polimerlerde dışlama etkisi azalacağından istenilen protein yanında istenmeyen proteinler de üst faza geçecek ve elverişli bir ayırım gerçekleştirmek için yetersiz kalacaktır (Cascone *et*

al., 1991, Su and Chiang, 2006). Bu nedenle genellikle orta seviyede molekül kütlesine sahip PEG türleri sulu ikili-faz sistemi için en iyi seçim olacaktır (Su and Chiang, 2006).

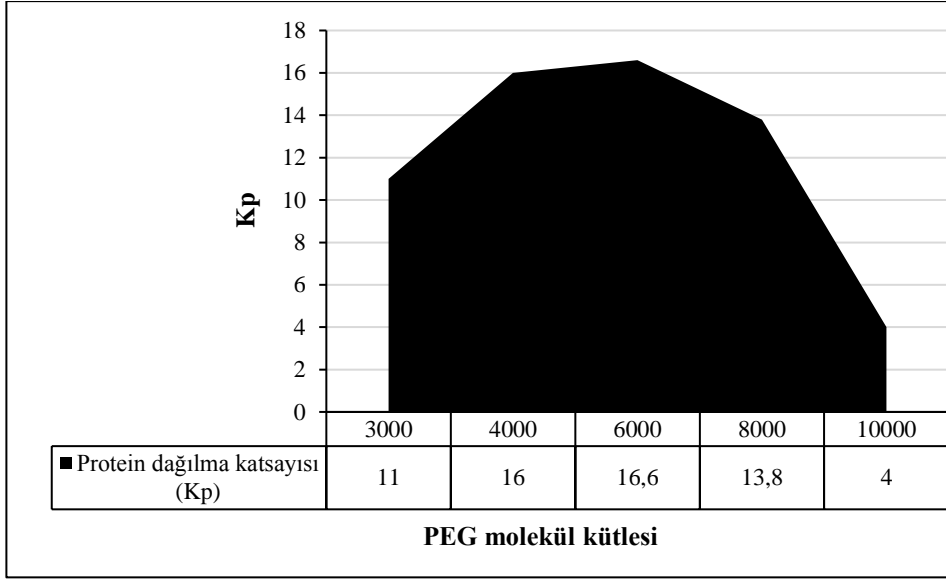
PEG/Tuz sistemlerinde, PEG türü ve konsantrasyonunu belirlemek için yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır. Örneğin; *Aspergillus oryzae* CBS 819.72'nin bir kültür süpernatantından α -amilazın dağılımı ve saflaştırılması, sulu ikili-faz sisteminde incelenmiştir. PEG/sitrat ile hazırlanan sistemde amilaz enziminin dağılımındaki ana faktörleri belirlemek ve saf ticari enzim preparatının (Bakezyme P500; DSM, Fransa) dağılımını incelemek amacıyla PEG-1000, 6000 ve 8000 kullanılmıştır. PEG- 8000 ve 6000 kullanıldığında ticari enzimin üst faza geçtiği, PEG-1000 kullanıldığında ise faz oluşumunun gerçekleşmediği görülmüştür. α -Amilaz için % 2 ile 87 arasında değişen bir verim ve 1,0-2,0 katlık bir saflaştırma faktörü bildirilmiştir (Kammoun *et al.*, 2009). *Bacillus subtilis* ZJF-1A5'in berraklaştırılmış ve bütün fermentasyon besiyerlerinden β -1,3-1,4-glukanaz, α -amilaz ve nötr proteazların ayırım davranışları araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, PEG moleküler ağırlığı 2000'den 6000'e yükseldikçe toplam proteinin katsayısı ve ekstraksiyon hızının arttığı görülmüştür. Özellikle PEG konsantrasyonları arttığında, daha düşük PEG moleküler ağırlıklarında daha yüksek ayırma katsayıları ve ekstraksiyon oranları görülmüştür. Bu nedenle, daha sonraki çalışmalar için faz bileşeni olarak düşük molekül ağırlıklı PEG-2000 seçilmiştir. PEG-2000 konsantrasyonunun ise % 20 (w/w)'ye çıkarılması ile dağılım katsayısında 2,3 katlık artış görülmesine rağmen ekstraksiyon oranı ve dağılım katsayısı % 16 (w/w)'lık PEG konsantrasyonunda % 20 (w/w)'ye göre sabit bir seviye göstermiştir. Bu nedenle, çalışmanın devamında PEG-2000 konsantrasyonu % 16 (w/w) olarak seçilmiştir (He *et al.*, 2005). *Pangasianodon gigas*'ın (dev yayın balığı) iç organ özünden proteaz saflaştırılması için en uygun sulu ikili-faz koşulu, %15 (w/w) PEG-2000/ %15 (w/w) $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ / % 1 (w/w) NaCl olarak belirlenmiştir. Enzimin saflaştırma katsayısı 3,33 ve geri kazanım verimi ise % 64,18 olarak bulunmuştur (Ketnawa *et al.*, 2013). PEG- 6000/potasyum fosfat sistemi ile; faz bileşimi (tie-line uzunluğu, TLL), pH, protein konsantrasyonu ve faz hacim oranı gibi proses parametrelerinin etkisi incelenmiştir. En iyi geri kazanım, %23,9, w/w, TLL'lik faz bileşiminde gözlenmiş ve ekstraksiyon sırasında daha yüksek faz hacmi oranlarının, ekstraksiyon fazında proteinlerin geri kazanılmasını iyileştirdiği görülmüştür (Anandharamakrishnan *et al.*, 2005).

Bacillus thuringiensis H14 alkalın proteaz üretimi, PEG 9000, 6000, 4000 ve potasyum fosfattan oluşan sulu ikili-faz sistemi ile yapılan ekstraktif fermantasyonla incelenmiştir. Üst faz sürekli ve PEG açısından zengindir, alt faz ise dağılmış ve fosfat bakımından zengindir. Mikrobiyal hücreler alt fazda ve arayüzde tutulur. Üretilen alkalın proteaz ise iki faz arasında dağılmıştır. Ayırım katsayısı, daha yüksek moleküler kütleden (9000) daha düşük moleküler kütleye (4000) doğru yükselmiştir. Ancak varyasyon fazla olmadığı için daha ileri çalışmalarda üç PEG moleküler kütlesi de göz önünde bulundurulmuştur. Ancak PEG-4000, PEG-6000 ve 9000'den daha yüksek bir verim değeri göstermiştir (Hotha and Banik, 1997).

Çizelge 4.2 Selüloz enziminin dağılımına PEG moleküler kütlesinin etkisi.

PEG MW (kDa)	V _R	K _c	K _p	PF	R (%)
3000	0,28	31,4	11	1,3	128
4000	0,26	24	16	1,5	153,8
6000	0,23	25	16,6	1,7	165,4
8000	0,20	15	13,8	1,5	146
10000	0,18	11	4	1,8	176,9

Çizelge 4.2'den görüldüğü gibi dengeden sonra sistemdeki faz hacim oranları (V_R) 0.18-0.28 arasında çok az değişmektedir. Buradan ve literatür çalışmalarından anlaşıldığı gibi dağılma parametrelerindeki farklanmanın PEG moleküler boyutuna bağlı olduğu açıktır. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi PEG moleküler kütlesinin PEG-6000'den PEG-10000'e artması ile polimerin dışlama etkisi de arttığından proteinlerin dağılma katsayısı (K_p) giderek azalmaktadır. Pek çok protein için benzer davranışa çeşitli PEG/Dekstran ve PEG/Tuz sistemlerinde rastlanmıştır (Engel *et al.*, 2000; Albertsson *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1994; Picó *et al.*, 2006).



Şekil 4.1 % 15 (w/v) PEG / % 10 (w/v) Na₂SO₄ sisteminde PEG molekül kütlesinin protein dağılma katsayısına (K_p) etkisi.

PEG molekül kütlesinin selüloz enziminin dağılma katsayısına (K_e) etkisi de Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3 % 15 (w/v) PEG/ % 10 (w/v) Na₂SO₄ sisteminde PEG molekül kütlesinin selüloz enziminin dağılma katsayısına (K_e) etkisi.

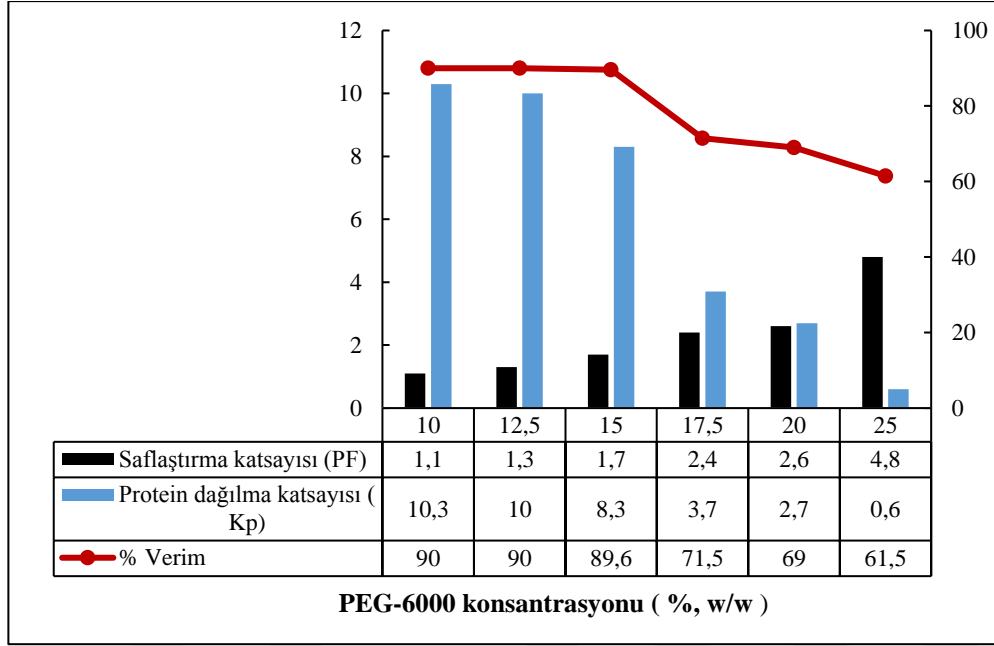
PEG MW (Da)	Selüloz Enziminin Dağılma Katsayısı (K_e)
3000	31,4
4000	24
6000	25
8000	15
10000	11

PEG molekül kütlesi arttıkça hidrofobik karakteri de artmakta ve selüloz enzimi daha seçimli dağılmaktadır. PEG 6000 molekül ağırlığında yüksek saflaştırma katsayısı (1,7 kat) ve geri kazanım değerine (% 165,4) ulaşılmaktadır. PEG 3000, 4000 ve 6000’ de en yüksek K_e değerlerine ulaşılmıştır ve bu sonuçlar literatürdeki diğer çalışmalarla oldukça benzerlik göstermektedir (Mohamadi *et al.*,

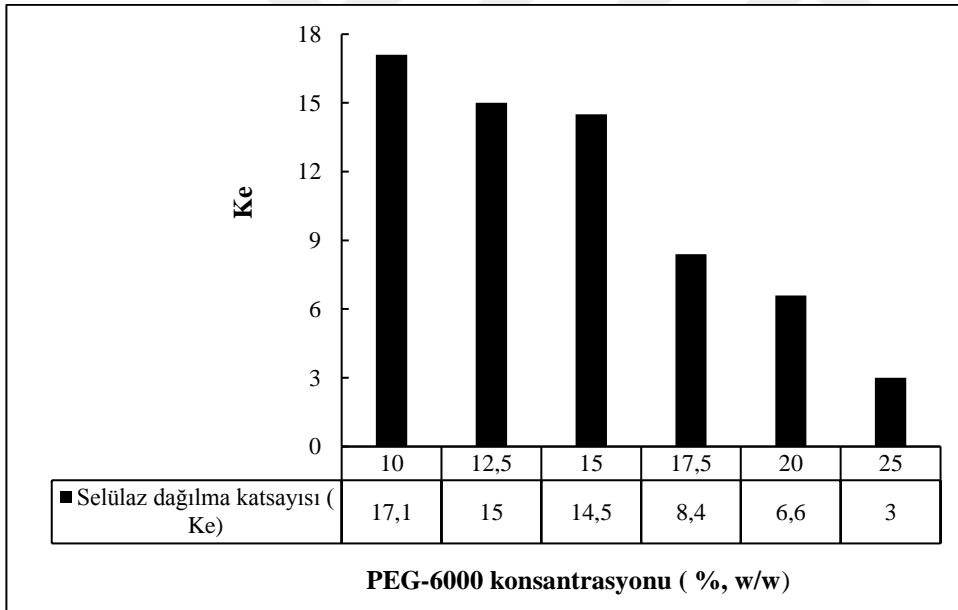
2007; Chaiwut *et al.*, 2010; Engel *et al.*, 2000). PEG–10000 ile hazırlanan sulu ikili-faz sisteminde selülaz enzimi için en yüksek saflaştırma katsayısı (1,8 kat) elde edildi. Ancak, PEG-4000'den itibaren PEG molekül kütlesi arttıkça ortamın viskozluğu oldukça artmaktadır (Engel *et al.*, 2000). Bu nedenle, PEG molekül kütlesinin enzimin dağılıma katsayısına (K_e), proteinlerin dağılıma katsayısına (K_p), saflaştırma katsayısına (PF) ve enzimin geri kazanımına (% R) etkisi kıyaslandığında PEG–6000'nin ATPS için en uygun polimer molekül kütlesi olduğuna karar verildi.

4.2.3 PEG (6000) konsantrasyonunun belirlenmesi

Selülaz enziminin PEG/Na₂SO₄ sisteminde dağılımına PEG konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla PEG'in farklı konsantrasyonları (% 10-25, w/w) ve % 15 (w/w) Na₂SO₄ kullanıldı ve sonuçlar Şekil 4.2 ve 4.3'de gösterildi. Genellikle polimer konsantrasyonunun artışı ile fazlar arasında hidrofobik fark artışı gözlenecektir. Bu durum, protein ve PEG molekülleri arasındaki hidrofobik etkileşimlerin artışı ve proteinlerin üst faza yönelimi ile sonuçlanacaktır (Spelzini *et al.*, 2005; Vaidya *et al.*, 2006, Malpiedi *et al.*, 2009). Şekil 4.3'den de görüldüğü gibi polimer konsantrasyonunun artması ile alt fazda bulunan proteinler üst faza doğru yönelmektedirler. PEG konsantrasyonundaki bu artış ile K_p değerleri 10,3'ten 0,6'ya ve verim ise % 91,7'den % 61,5'a kadar azalmıştır. Polimer konsantrasyonu selülaz dağılımında etkilidir. Selülaz enzimi polimer (PEG-6000) konsantrasyonu arttıkça özellikle % 10'dan % 15'e geçildiğinde alt faza yaklaşık 2 kat daha seçimli bir dağılım göstermekte (Şekil 4.2 ve 4.3) ve en yüksek saflaştırma katsayısına (1,7) ulaşmaktadır. Bu nedenle en uygun PEG konsantrasyonu hem saflaştırma katsayısı hem de seçimlilik açısından % 15 (w/w) olarak seçildi.



Şekil 4.2 PEG-6000 konsantrasyonunun PEG/Na₂SO₄ sisteminde selülaz ekstraksiyonuna ve dağılımına etkisi.



Şekil 4.3 PEG-6000 konsantrasyonunun PEG-Na₂SO₄ sisteminde selülaz dağılım katsayısına (K_e) etkisi.

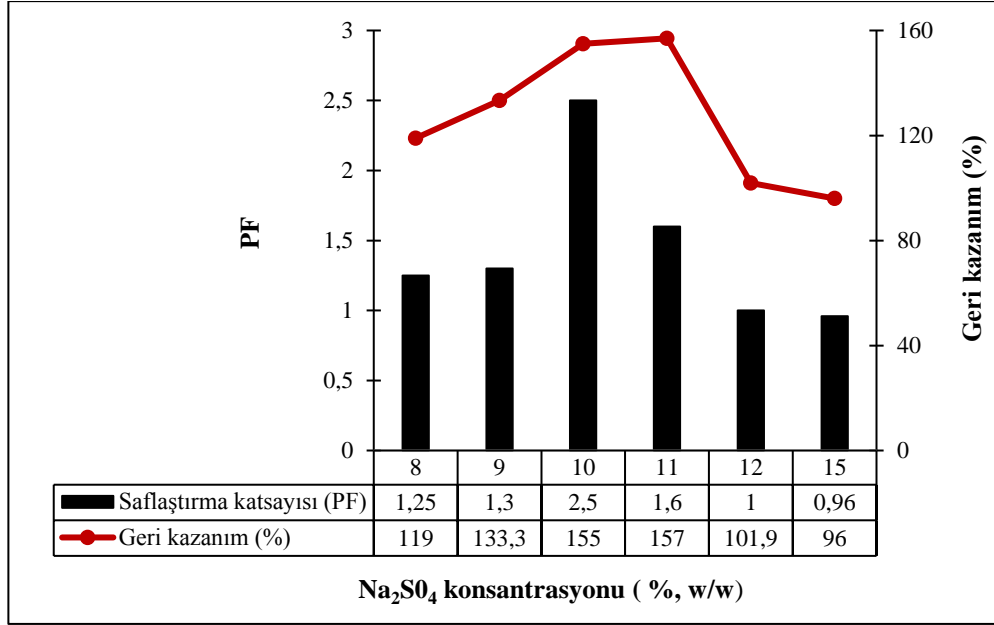
PEG konsantrasyonunun enzim ve protein dağılımı üzerindeki etkisi farklı enzimler kullanılarak hazırlanan sulu ikili-faz sistemleri ile yapılan literatür çalışmaları doğrultusunda incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar diğer literatür çalışmaları ile benzerdir. Örneğin; *Bacillus licheniformis* 44MB82-G suşundan

termostabil α -amilazın saflaştırılması için polimer-polimer bazlı sulu ikili-faz sistemleri kullanılmıştır. Hazırlanan PEG-6000/fikol sistemi için optimum polimer konsantrasyonu % 15 (w/w) olarak belirlenmiştir. PEG-6000/fikol sisteminde, amilazın %90'a kadarı alt fazda toplam proteinin ($K = 22.8$) yaklaşık %95'i ve proteinazın %60-75'i üst fazda bulunmuştur (Ivanova *et al.*, 2001). *Aureobasidium pullulans* α -amilazının sulu ikili-faz sistemlerinde dağılımı yanıt yüzeyi metodolojisi yoluyla optimizasyonu ve termodinamik ve kinetik özellikleri araştırılmıştır. % 20 (w/v) PEG-6000/ % 10 (w/v) Na-sitrat/ % 7,5 (w/v) NaCl sisteminde, saflaştırma faktörü 4,2 ve verim değeri % 88 olarak bulunmuştur (Ademakinwa *et al.*, 2019). ATPS kullanılarak tavuk yumurta akından lizozimin saflaştırıldığı bir başka çalışmada da, PEG-6000 kullanılmıştır. Optimum koşul olarak ise, 500 mM sodyum perklorat ilavesiyle %16,1 (w/w) PEG ve %12 (w/w) sodyum sülfat konsantrasyonu belirlenmiştir (Su and Chiang, 2006).

4.2.4 Na₂SO₄ konsantrasyonunun belirlenmesi

Selülaz enziminin PEG/Na₂SO₄ sisteminde dağılımına tuz konsantrasyonunun etkisini incelemek için Na₂SO₄'ın farklı konsantrasyonları (% 8-15, w/w) ve % 15 (w/w) PEG-6000 kullanıldı ve sonuçlar Şekil 4.4'te verildi.

Sulu ikili-faz sistemlerinde enzimin yüzey özellikleri tuz konsantrasyonu ile değişmektedir. Tuz konsantrasyonunun artışı ile proteinler hidrofobik özellik kazanacağından hidrofobik üst faza yönelme eğilimi göstereceklerdir. Ayrıca tuz konsantrasyonunun artışı ile üst faza yönelen proteinler geri çevrilmekte ve proteinlerin aşırı faz ayrımının olduğu yerde çökmektedir. Enzimlerin yüksek tuz konsantrasyonunun bir sonucu olan "salting-out" etkisi ile denatüre olmaları nedeniyle aktiviteleri ve geri kazanımları da düşmektedir (Spelzini *et al.*, 2005, Klomkloa *et al.*, 2005; Antov *et al.*, 2006, Vaidya *et al.*, 2006; Yue *et al.*, 2007).



Şekil 4.4 Na_2SO_4 konsantrasyonunun PEG/ Na_2SO_4 sisteminde selüloz ekstraksiyonuna ve dağılımına etkisi.

Tuz konsantrasyonu selüloz enziminin dağılımı ve geri kazanımında oldukça önemlidir. Şekil 4.4'ten de görüldüğü gibi Na_2SO_4 konsantrasyonu % 8(w/w)'den % 10(w/w)'a arttırıldığında saflaştırma katsayısı 2 kat artış gösterip 1,25'ten en yüksek değeri olan 2,5'e çıkmakta ve enzimin geri kazanımı % 155 olmaktadır. Tuz konsantrasyonunun % 8'den % 15'e arttırılması protein dağılım katsayısını (K_p) 16,2'den 19,5'e çıkarmaktadır. Tuz konsantrasyonunun artması ile alt fazda bulunan proteinlerin hidrofobik özellikleri artacağından üst faza yönelme durumu söz konusudur. Sonuç olarak, enzimin dağılım katsayısı (K_p), saflaştırma katsayısı ve geri kazanımı açısından çalışmanın devamında optimum Na_2SO_4 konsantrasyonu % 10 (w/w) olarak belirlendi.

Tuz konsantrasyonunun enzim ve protein dağılımı üzerindeki etkisi farklı enzimler kullanılarak hazırlanan sulu ikili-faz sistemleri ile yapılan literatür çalışmaları doğrultusunda incelenmiştir. Örneğin; *Bacillus pumilus* kaynaklı katalaz enzimi için pH 7,0'de %15 (w/w) PEG-4000 kullanılarak hazırlanan ATPS'de %7,5 - %22,5 (w/w) arasında değişen Na_2SO_4 konsantrasyonlarında katalaz enziminin dağılımı incelenmiştir. Katalaz dağılımı için optimum koşullar, %15 (w/w) PEG-4000 ve %10 (w/w) Na_2SO_4 olarak belirlenmiştir. Saflaştırma faktörü 3.6 ve geri kazanım ise % 98 olarak bulunmuştur (Karakus and Isik, 2019).

Domates invertazının sulu ikili-faz sistemleri ile saflaştırılması için yapılan çalışmada, %10 - %16 (w/w) arasında değişen Na₂SO₄ konsantrasyonlarında invertaz enziminin dağılımı incelenmiştir. Tuz konsantrasyonundaki %10'dan %16'ya artış, toplam proteinin (K_p) dağılım katsayılarında sırasıyla 0.48'den 1.12'ye bir artışla sonuçlanmıştır. İvertaz enzimi için optimum koşullar %15 (w/w) PEG-3000/ %12 (w/w) Na₂SO₄ ve %5 (w/v) KCl (pH 4,5) olarak belirlenmiştir (Yücekan ve Önal, 2011).

4.2.5 pH etkisinin belirlenmesi

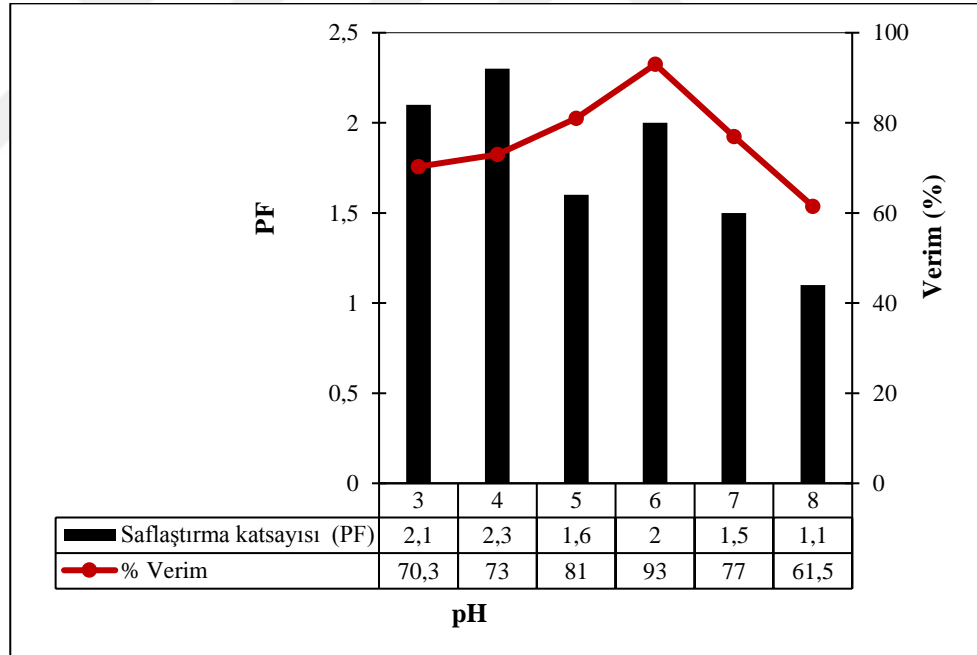
ATPS'de biyomoleküllerin dağılımını etkileyen bir diğer önemli faktör de sistemin pH değeridir. Biyomoleküllerin dağılımı sistemde bulunan iyonların türü ve konsantrasyonu ile de belirlenmektedir. Saflaştırılması hedeflenen proteinin ve iyon kompozisyonunun yüküne, kontaminantların yüzey karakteristiğine etki eden Ph, fazlar arasında dağılımı farklılaştırmaktadır (Gautam and Simon, 2006, Mohamadi *et al.*, 2007). PEG/Tuz sistemlerinde genellikle asidik izoelektrik noktaya (pI) sahip negatif yüklü proteinlerin büyük bir kısmı üst faza yönelirken, pozitif yüklü proteinler ise alt faza yönelmektedir. pH'ın yükselmesi ile proteinler negatif yüklü hale gelecektir ve beklenildiği gibi PEG'ce zengin üst faz ile proteinler arasındaki etkileşimler daha kuvvetli olacaktır ve proteinlerin dağılım katsayısı (K_p) ise büyüyecektir (Albertsson, 1986; Rito-Palomares, 2004; Hatti-Kaul, 2000).

Pek çok literatür çalışmasında sulu ikili-faz sistemlerinde proteinlerin dağılımına pH'ın etkisi araştırılmıştır. Örneğin; Kaju fıstığı ağacı sakızı ve PEG bazlı sulu ikili-faz sistemlerinde proteinlerin dağılımı üzerine yapılan bir çalışmada, sığır serum albümini (BSA) ve tripsinin dağılımı incelenmiştir. Dağılım üzerinde etkili olan; polimer konsantrasyonu, pH, tuz ilavesi ve sıcaklık gibi çeşitli parametrelerin etkisi araştırılmıştır. pH'ın dağılım katsayıları üzerindeki etkisi, proteinler arasında ve sistem tipine göre değişiklik göstermiştir. BSA ve tripsin için pH 6.0, 7.0 ve 8.0'de dağılım katsayıları elde edilmiştir. Bu pH aralığında, her iki protein de moleküler net yüke sahiptir. BSA negatif olarak (pI; 5,1), tripsin ise pozitif olarak (pI; 9,2) yüklenmiştir. BSA ve tripsin dağılımı, sistem pH'ını değiştirerek çok az değişiklik göstermiştir ancak her iki protein için pH 6,0'dan 8,0'e yükseltildiğinde dağılım katsayısında küçük bir artış tespit edilebilmiştir

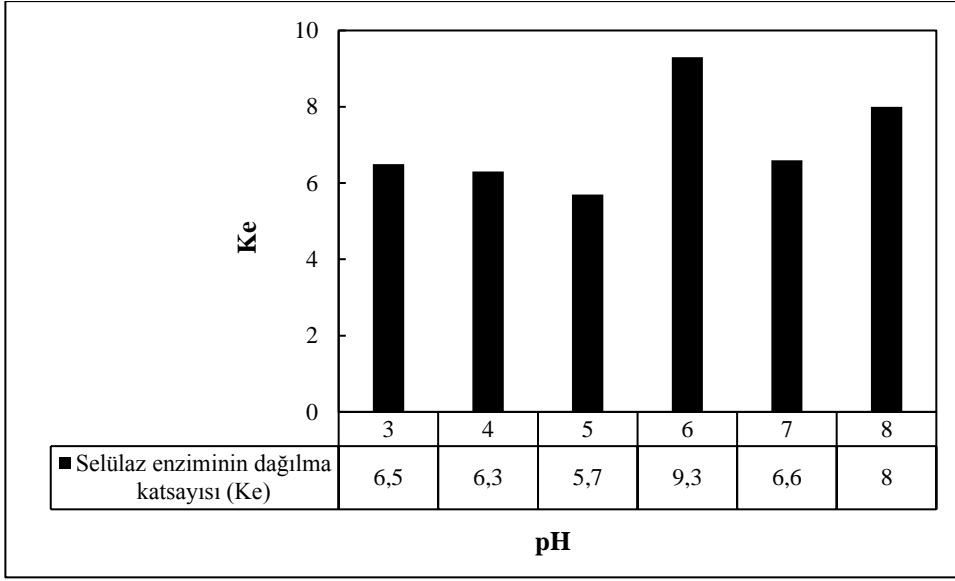
(Sarubbo *et al.*, 2004). *Polyporus squamosus*'un sulu ikili-fazda kültivasyonu sırasında üretilen endo-pektinaz ve ekzo-pektinazın dağılımı, PEG-4000 ve ham dekstrandan oluşan sistem ile farklı başlangıç pH değerlerinde çalışılmıştır. Büyütme işleminin tüm aşamalarında üretilen biyokütle pH'dan bağımsız olarak yalnızca alt faza dağılım göstermiştir. Kltivasyonun ikinci gününde, ilk olarak pH 5,0'de endo-pektinazın maksimum dağılım katsayısı değerı 2,45 ve maksimum üst faz verimi ise %80,22 olarak bulunmuştur. Ekzo-pektinazın dağılım katsayısı ise, daha düşük başlangıç pH'sındaki dağılım parametrelerine kıyasla, ekimin üçüncü gününde yaklaşık 2,5 kat ve üst faz verimi de %45'e kadar iyileşme göstermiştir. *P. squamosus*, pH 7,0 başlangıç değerinde sulu ikili-faz kltivasyonunda endo-pektinaz üretmemiştir (Antov *et al.*, 2004). % 8 (w/w) PEG-4000/ % 13 (w/w) potasyum fosfat tuzu kullanılarak hazırlanan sistemde pH ve sıcaklığın, *Trichoderma reesei* β -glukozidazı ve toplam proteinin dağılım katsayısı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Dağılım katsayıları, pH; 6,0–7,5; sıcaklık; 25–55°C değer aralıklarında araştırılmış ve bu aralıklarda dağılım katsayısı artış göstermiştir. En yüksek seçicilik pH 6,5 ve 25°C sıcaklıkta elde edilmiştir. 7.0'den düşük pH değerleri ve 35°C'nin altındaki sıcaklıklar için alt fazda %92'nin üzerinde bir β -glukozidaz verimi elde edilmiştir (Gautam and Simon, 2006). *Clostridium perfringens* tip A α -toksininin sulu ikili-faz sistemlerindeki dağılımının incelenmesi için, iki ardışık yarı fraksiyon tasarımı yapılmıştır. Tasarımda, PEG moleküler kütlesi ve konsantrasyonu, fosfat konsantrasyonu ve pH dikkate alınmıştır. En yüksek saflaştırma faktörü, verim ve dağılım katsayısı sonuçları % 15 (w/w) PEG-8000/ % 20 (w/w) fosfat ve pH 8,0 ile bulunmuştur. Bu sistem tek bir adımda, PEG açısından zengin fazda %230'luk aktivite verimi ve 113,9'luk dağılım katsayısı ile 4,6 katlık bir toksin saflaştirmasını sağlamıştır (Cavalcanti *et al.*, 2006). Yanıt yüzeyi metodolojisi kullanılarak ATPS ile *Bacillus velezensis* A4'ten bir selülazın saflaştırılması optimize edilmiştir. Enzimin maksimum geri kazanım oranı % 67,8 ve saflaştırma faktörü 1,14 olarak % 20,75 (w/w) PEG-4000/ % 8.5 (w/w) K₂HPO₄/ pH 8,5 sulu ikili-faz sistemi ile elde edilmiştir (Liu *et al.*, 2019).

PEG/Na₂SO₄ sisteminde selülaz enziminin dağılımına pH etkisini incelemek için sistemin pH'sı 3,0- 8,0 arasında değiştirildi ve sonuçlar Şekil 4.5' de verildi. Şekilden görüldüğü gibi, enzim pH 6,0'da % 93,1 verimle 2 kat saflaştırıldı. Bu pH değerinin altında ve üstündeki pH değerlerinde saflaştırma katsayısı (PF) ve verimde farklılıklar grlmştr. Şekil 4.5'den görüldüğü gibi pH 3,0 ve 4,0

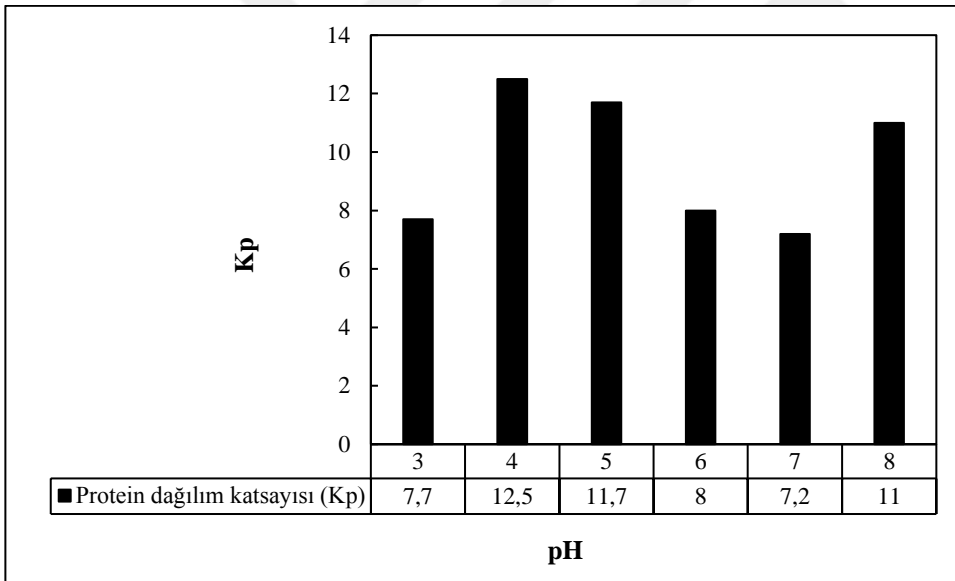
değerlerindeki saflaştırma katsayıları daha yüksektir. Bu durum sistemdeki proteinlerin alt fazda çökmesinden ve buna bağlı olarak geri kazanılan protein miktarının az olmasından kaynaklanmaktadır. Şekil 4.6 ve 4.7'den görüldüğü gibi, selülaz enziminin K_e ve K_p değerleri çok kararsızdır. Mikrobiyal kaynaklı selülazların izoelektrik noktaları (pI) farklılıklar göstermektedir. Örneğin; *Chrysosporium lucknowense*'nin mutant bir suşunun kültür ortamından izole edilen altı endoglukanaz enzimi için EG: 25 kDa, pI 4.0; 28 kDa, pI 5.7; 44 kDa, pI 6.0; 47 kDa, pI 5.7). 51 kDa, pI 4.8; 60 kDa, pI 3.7 ve iki selobiyohidrolaz için CBH I, 65 kDa, pI 4.5; CBH II, 42 kDa, pI 4.2 (Bukhtojarov *et al.*, 2004), *Thermotoga neapolitana*'dan saflaştırılan iki termostabil endoselülazdan CelA için 29 kDa, pI 4.6, CelB için ise 30 kDa, pI 4.1 olarak bulunmuştur (Bok *et al.*, 1998). Bu yüzden sulu ikili-faz sistemlerinde sistemin pH'ı, selülazların dağılımına düzensiz etki etmektedir. Sonuç olarak, literatür çalışmalarına da bakıldığında PEG/Na₂SO₄ sulu ikili-faz sistemi ile selülazın saflaştırılmasında en uygun pH 6,0 olarak belirlendi.



Şekil 4.5 % 15 (w/v) PEG-% 10 (w/v) Na₂SO₄ sisteminde selülaz ekstraksiyonuna ve dağılımına pH'nın etkisi.



Şekil 4.6 % 15 (w/v) PEG-% 10 (w/v) Na₂SO₄ sisteminde pH'ın selülaz dağılım katsayısına (K_e) etkisi.



Şekil 4.7 % 15 (w/v) PEG-% 10 (w/v) Na₂SO₄ sisteminde pH'ın protein dağılım katsayısına (K_p) etkisi.

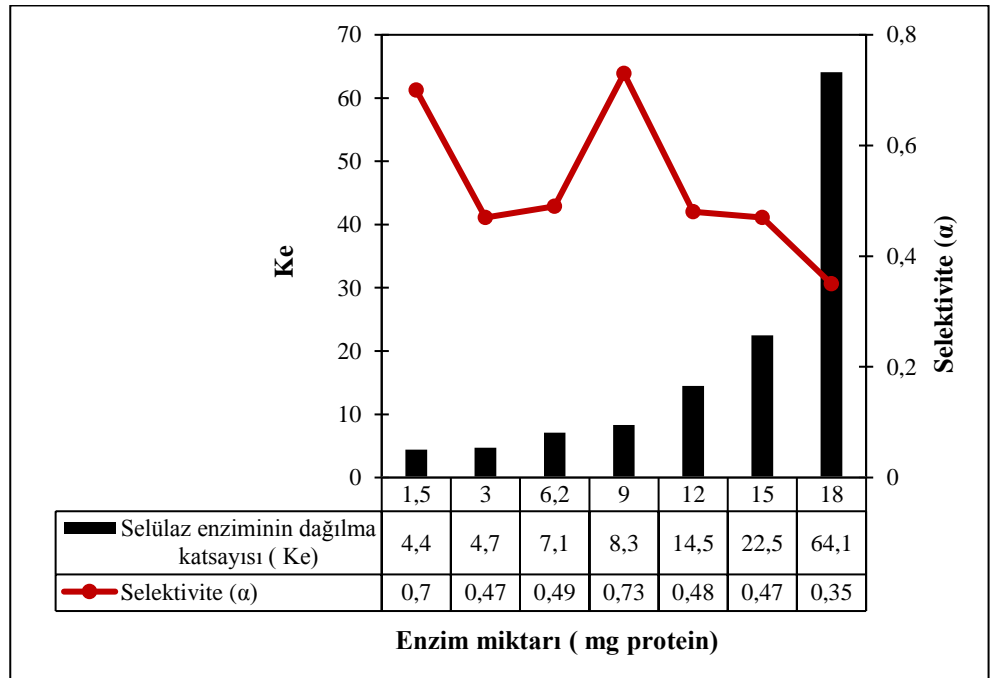
4.2.6 Selülaz konsantrasyonunun dağılım etkisi

Hedef molekülün ayrımı ve saflaştırılmasında sulu ikili-faz sistemine yüklenen protein miktarı özellikle büyük ölçekli prosesler için oldukça önemlidir (Antov *et al.*, 2006). Protein konsantrasyonu doygunluk sınırına yaklaştıkça,

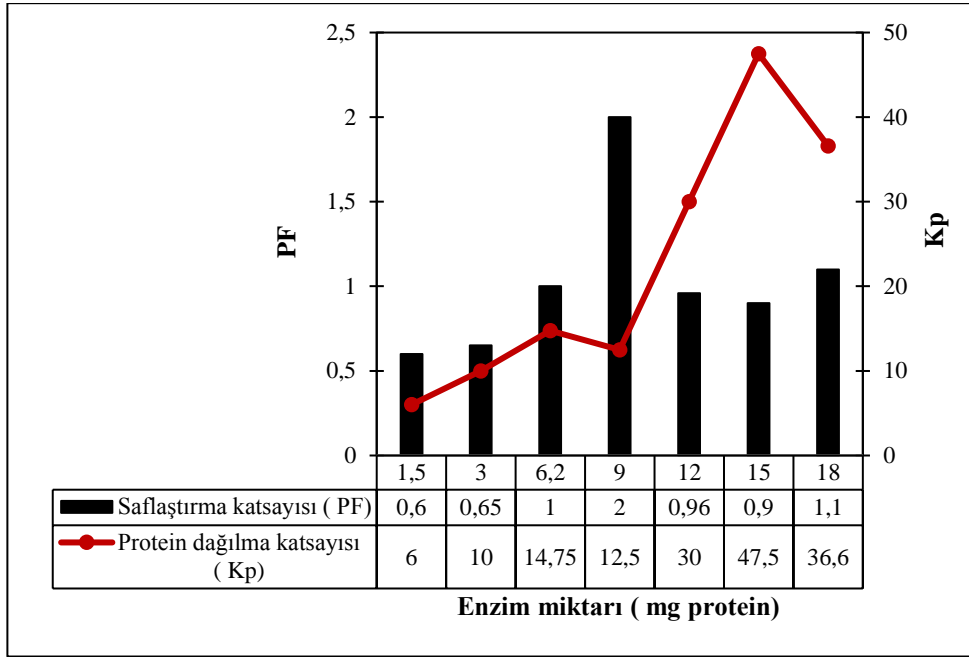
sistemde doymuş hal durumu gözlenmektedir. Protein konsantrasyonunun bu sınırdan daha yükseğe çıkarılması proteinin çökmesine neden olmakta ve sonuç olarak geri kazanım düşük olmaktadır. Bu nedenle, sulu ikili-faz sisteminde protein konsantrasyonu doymuşluk sınırının altında olmalıdır. Genellikle her bir gramlık sisteme 1 mg protein konsantrasyonu genellikle optimal kabul edilir (Engel *et al.*, 2000).

Bezelyeden izole edilerek hazırlanan selüloz ekstraktı, % 15 (w/w) PEG-6000 / % 10 (w/w) Na₂SO₄ / pH 6,0 sistemine 1,5-18 mg değerleri arasında (0,3-3,6 mL) farklı miktarlarda ilave edilerek enzim konsantrasyonunun selüloz enzimi dağılımına etkisi incelendi ve sonuçlar Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterildi.

Şekillerden görüldüğü gibi, selüloz enzim miktarı ve diğer protein konsantrasyonları dağılıma etki etmektedir. % 15 (w/w) PEG-6000 / % 10 (w/w) Na₂SO₄ / pH 6,0 / 1,5 mg protein sisteminde selüloz enzimi alt faza karşı yüksek bir selektivite göstermesine rağmen (Şekil 4.8) saflaştırma katsayısı düşüktür. Enzim konsantrasyonu değiştikçe K_e , K_p , α ve PF değerleri farklılaşmaktadır. Sisteme yüklenen enzim miktarı, hem faz hacim oranını hem de faz bileşimini değiştirerek enzimlerin dağılımına etki etmektedir (Antov *et al.*, 2006). % 15(w/w) PEG-6000 / % 10 (w/w) Na₂SO₄ / pH 6,0 / 9 mg protein içeren sistem saflaştırma katsayısı (2) açısından en optimal sonucu verdiği için en uygun sistem olarak seçildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.8 % 15 (w/v) PEG-6000 / % 10 (w/v) Na₂SO₄ / pH 6,0 sisteminde selülazın dağılımına (K_e) ve selektivitesine (α) enzim miktarının etkisi.



Şekil 4.9 % 15 PEG-6000 / % 10 Na₂SO₄ / pH 6,0 sisteminde selülaz saflaştırma katsayısı ve protein dağılım katsayısına enzim miktarının etkisi.

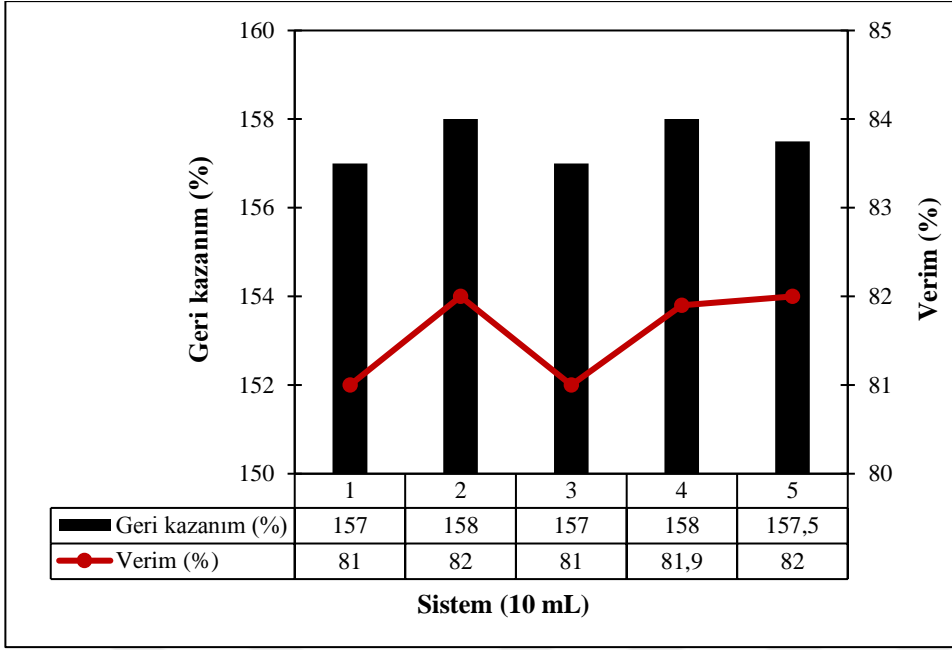
Sulu ikili-faz sistemlerinde enzim miktarı ve protein konsantrasyonunun dağılım üzerine etkisi ile yapılan çeşitli çalışmalar literatürde mevcuttur. Örneğin; ATPS'de protein dağılımını etkileyen faktörlerin ve faz özelliklerinin değişiminin protein dağılım katsayısına etkisini incelemek için saf sığır serum albümininin sulu ikili-faz sistemlerindeki dağılım davranışı araştırılmıştır. Sığır serum albümini (BSA), % 0,1 (w/w) konsantrasyonda olacak şekilde sisteme ilave edilmiştir. 20^o C'de % 8 (w/w) PEG-3350/ % 6 (w/w) dekstran 37 500/ 0,05 M fosfat tamponundan oluşan sulu ikili-faz sisteminde NaCl konsantrasyonu 0.0195 M ve pH 8,9 iken optimum protein dağılım katsayısı (K_p) değeri 0.018 olarak bulunmuştur (Gündüz, 2000).

Selülozun sürekli biyolojik dönüşümü için bir faz sistemi tasarlama amacı ile *Trichoderma reesei* OM 9414'ten endo- β -glukanaz, ekzo- β -glukanaz ve β -glukozidazın sulu ikili-faz sistemlerindeki dağılımları incelenmiştir. Dekstran ve polietilen glikol (PEG) bazlı sistemlerin, enzimlerin alt faza tek taraflı olarak dağılımı için optimal olduğu görülmüştür ve polimer molekül ağırlıkları, polimer konsantrasyonu, ortamın iyonik bileşimi, pH, sıcaklık ve enzimlerin selüloza

adsorpsiyonunun enzim dağılım katsayıları üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ham dekstran ve PEG'e dayalı bir faz sisteminde, fazla selüloz mevcutken endo- β -glukanaz için dağılım katsayısı 0,16 ve β -glukozidaz için 0,14 olarak bulunmuştur (Tjerneld *et al.*, 1985). *Aspergillus japonicus* URM5620 tarafından üretilen selülitik komplekslerden selülazların ayrıştırılması ve saflaştırılması için yapılan bir çalışmada da ATPS kullanılmıştır. Polietilen glikol (PEG) moleküler kütlesi (1000–8000 g/mol), PEG konsantrasyonu (% 20–24, w/w), sodyum sitrat konsantrasyonu (%15–20, w/w) ve pH (6.0-8.0), etkisini değerlendirmek için bir faktöriyel tasarım modeli kullanılmıştır. β -glukozidaz (β G), endoglukanaz (CMCaz) ve toplam selülazdan (FPaz) oluşan selülitik kompleksin diferansiyel bölümlenmesi ve saflaştırılması sağlanmıştır. Toplam sistemin %20'sini temsil eden selülaz içeren ham enzim tüplere ilave edilmiştir. Enzim aktivitesinin ve protein içeriğinin analizini gerçekleştirmek için de yaklaşık 1,5 mL örnek kullanılmıştır. β -glukozidaz tercihen tuz fazına dağılım göstermiş ve pH 8,0'de % 20 (w/w) PEG- 8000 ve % 10 (w/w) sodyum sitrat ile en iyi sonuçlar elde edilmiştir. Enzim dağılım katsayısı (K_e) yaklaşık olarak 2,9, aktivite verimi % 77 ve saflaştırma faktörü 1,9 olarak bulunmuştur. FPaz ve CMCaz tercihan üst faza dağılım göstermiştir ve en yüksek enzim dağılım katsayısı değerleri 2,9 ve 3,0 olarak bulunmuştur (Herculano *et al.*, 2012).

4.2.7 Optimize edilmiş sistemin tekrarlanabilirliği

Sulu ikili-faz sisteminin tüm optimizasyon aşamaları tamamlandıktan sonra optimize edilmiş sistemin (% 15, w/w, PEG-6000 / % 10 w/w, Na₂SO₄ / pH 6,0 / 9 mg protein) tekrarlanabilirliği 5 tekrarlı olarak aynı koşullarda çalışılmıştır. Alt fazdaki aktivite ve protein değerleri standart aktivite ve protein tayin yöntemleri ile belirlendi. Hazırlanan 5 optimize sistemde de hem aktivite ve protein değerleri hem de verim ve geri kazanım değerleri büyük ölçüde benzerlik gösterdi (Şekil 4.10).



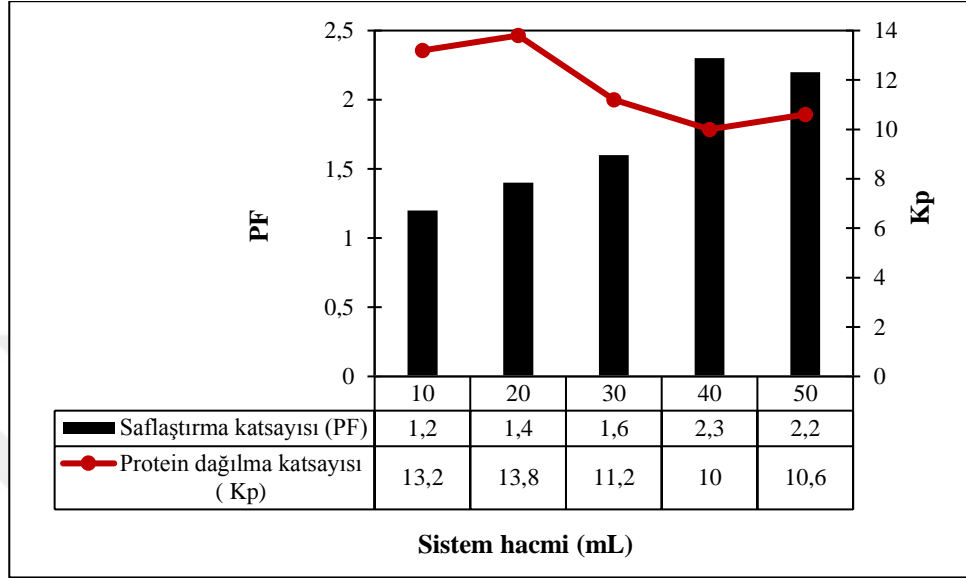
Şekil 4.10 Optimize edilmiş % 15 (w/v) PEG-6000 / % 10 (w/v) Na₂SO₄ / pH 6,0 sisteminin tekrarlanabilirliği.

4.2.8 Büyük ölçekli sulu ikili-faz sistemi

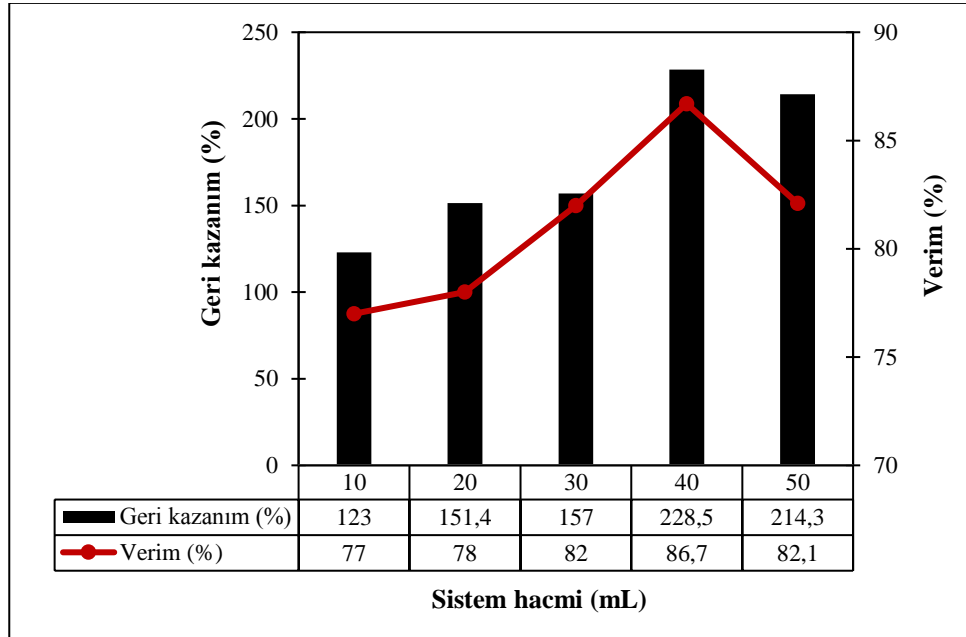
Son yıllarda sulu ikili-faz sistemleri ile büyük ölçekli protein saflaştırılması başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Bu yeniliğin getirmiş olduğu en önemli özelliklerden biri kimya endüstrisinde çoğunlukla kullanılan organik temelli ekstraksiyon yöntemlerine alternatif olarak kullanılabilmesinin düşünülmesidir. Ayrıca saflaştırma adımlarının tek bir aşamada birleştirilmesi ve faz ortamının toksik olmaması önemli özelliklerindedir. Faz oluşumu ve protein dağılımının tam olarak anlaşılabilmesi gibi nedenlerden dolayı sulu ikili-faz sistemlerinin uygulanması hala sınırlıdır (Hatti- Kaul, 2000; Porto *et al.*, 2008). Ancak sistemlerin ölçek büyütme için uygun olması ve sürekli işlemler için uygulanabilir olması büyük ölçekli endüstriyel uygulamalar için onları cazip kılmaktadır (Marcos *et al.*, 1999).

PEG molekül kütlesi ve konsantrasyonu, tuz türü ve konsantrasyonu, pH, protein miktarı gibi koşulların optimize edildiği sulu ikili-faz sistemi [(% 15, w/w, PEG-6000 / % 10, w/w, Na₂SO₄ / pH 6,0 / 9 mg protein) (sistem hacmi 10 mL)] farklı hacim ölçeklerinde (10, 20, 30, 40 ve 50 mL) hazırlandı ve selülaz enziminin saflaştırılmasında kullanılacak büyük ölçekli sistemler değerlendirildi. Şekil

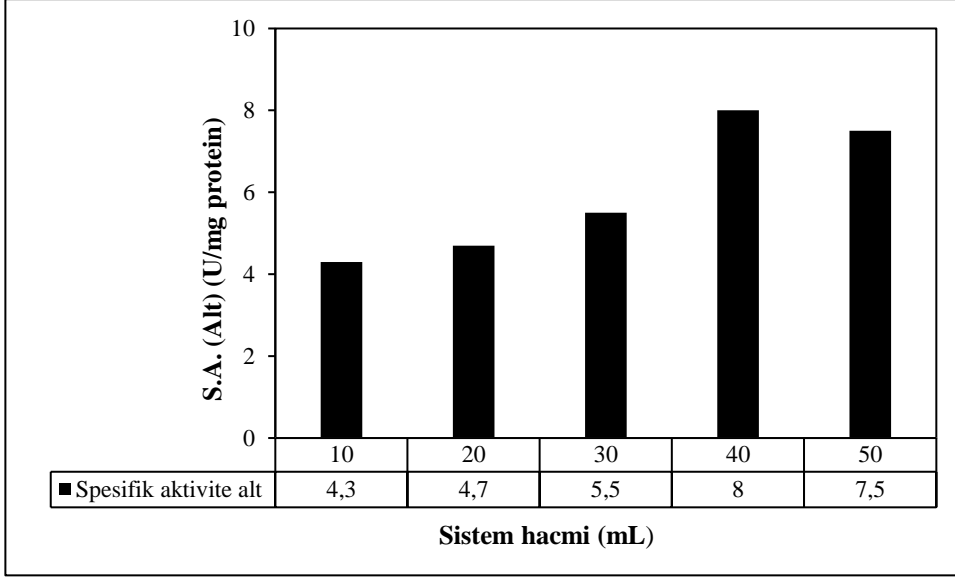
4.11 ve 4.12'den görüldüğü gibi 40 mL'lik sistem ile enzim % 86,7 verim ve % 228,5 geri kazanımla 2,3 kat, 50 mL'lik sistem ile % 82,1 verim ve % 214,3 geri kazanımla 2,1 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesi 40 mL'lik sistem için 8 U/mg ve 50 mL'lik sistem için ise 7,5 U/mg olarak belirlendi (Şekil 4.13).



Şekil 4.11 Büyük ölçekli PEG 6000- Na₂SO₄ sisteminde selüloz enziminin saflaştırma sonuçları (saflaştırma katsayısı ve protein dağılım katsayısı).



Şekil 4.12 Büyük ölçekli PEG 6000- Na₂SO₄ sisteminde selüloz enziminin saflaştırma sonuçları (geri kazanım ve verim).



Şekil 4.13 10,20,30, 40 ve 50 mL'lik sistemlerde saflaştırılan selüloz enziminin spesifik aktivite değerleri.

Ölçek büyütme çalışmalarında hazırlanan 40 ve 50 mL'lik sistemlerin ayırım sonrası alt fazları birleştirildi, toplam hacimleri ölçüldü ve diyalizlendi. Diyaliz işleminden sonra diyalizatın hacmi kaydedildi ve fraksiyonda aktivite ve protein tayinleri yapılarak total aktivite, protein miktarı ve spesifik aktivite değerleri hesaplandı (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Diyaliz öncesi ve sonrası toplam alt faz hacimlerine ait total aktivite ve protein değerleri.

Diyaliz Öncesi Hacim (mL)	Total Aktivite (U)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)
40	138	40	3,450
Diyaliz Sonrası Hacim (mL)	Total Aktivite (U)	Total Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)
45	123	35,5	3,465

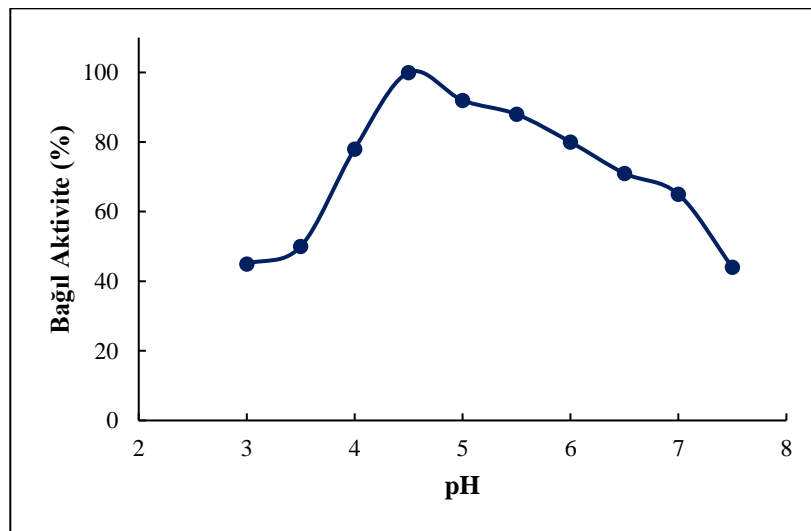
Sonuçlar, selüloz enzimi ve farklı enzimler kullanılarak hazırlanan ATPS'ler ile yapılan literatür çalışmaları incelendi. Örneğin; yumurta akı lizoziminin PEG/sülfat sistemi ile saflaştırma faktörü 4,0 ve verim değeri % 87 olarak bulunmuştur (Balasubramaniam *et al.*, 2003). Termoseparasyon polimerleri ile hazırlanan sulu ikili-faz sistemleri ile ananas meyvesinden saflaştırılan bromelain için (Rabelo *et al.*, 2004) saflaştırma faktörü 1,25 ve verim değeri % 79,5 ve

hipertermofil *Methanococcus jannaschii* termostabil rekombinant α -amilazı için ise saflaştırma faktörü 3,31 ve verim değeri % 90 olarak bulunmuştur (Li and Peoples, 2004). *Bacillus subtilis* karboksimetil selülazının kısmi saflaştırılması için PEG-6000/sitrat sulu ikili-faz sistemi kullanılmıştır ve saflaştırma faktörü 4,8 ve verim değeri ise % 88,82 olarak bulunmuştur (Ho *et al.*, 2017). *Candida mogii* ksiloz redüktaz enziminin saflaştırılması için PEG/fosfat ATPS kullanılmıştır ve üst faz için saflaştırma faktörü 1,89 ve verim değeri ise % 103,5 olarak bulunmuştur (Mayerhoff *et al.*, 2004).

4.3 Bezelye (*Pisum sativum*) Selülazının Karakterizasyonu

4.3.1 Selülaz aktivitesine pH etkisi

Enzimlerin aktivitesine etki eden en önemli faktörlerden birisi pH etkisidir. Bir enzimin optimum pH'sı; reaksiyon süresi, sıcaklık, substrat yapısı ve konsantrasyonu, tampon türü ve konsantrasyonu, ortamın iyonik şiddeti ve enzimin saflığı gibi pek çok deneysel parametreye bağımlı bir değişkendir. Biyokimyasal reaksiyonlar, *in vivo* koşullarda ve sulu ortamda gerçekleştiğinden pH, enzimin yük durumunu dolayısıyla aktivitesini çok etkiler. Selülaz aktivitesine pH'ın etkisi ve optimum pH'ın belirlenmesi bölüm 3.6.1'de açıklandığı gibi incelendi ve sonuçlar Şekil 4.14'de verildi.

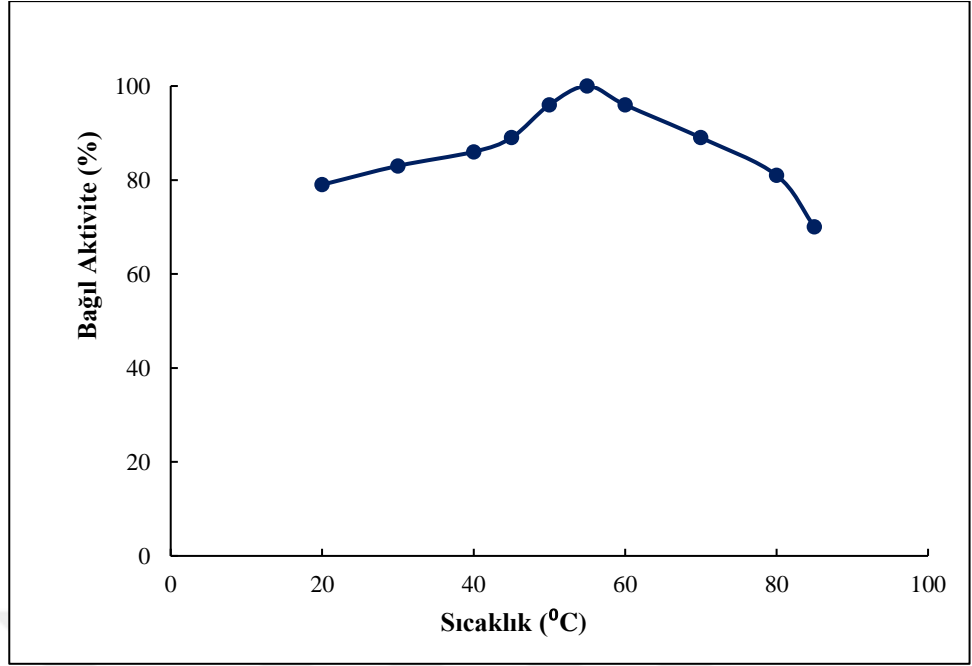


Şekil 4.14 Selülaz aktivitesine pH'ın etkisi (*optimum pH*) (Substrat: Karboksimetil selüloz (CMC), Sıcaklık: 50 ° C, Tamponlar: 50 mM pH; 3,0-3,5; Glisin, 4,0-5,5; Asetat, 6,0-8,0 Fosfat).

Bunun için tampon pH'sı 3,0–7,5 arasında değiştirilerek enzimin aktivitesi standart koşullarda ölçüldü. Şekil 4.14'den görüldüğü gibi bezelye selülazının optimum pH'sı 4,5 olarak bulundu. Selülazların optimum pH değerleri kullanılan enzim kaynağına, substrata, inkübasyon zamanı ve sıcaklığına göre oldukça geniş bir aralıkta farklılık göstermektedir. Farklı kaynaklardan saflaştırılan selülazların optimum pH değerlerine bakıldığında genellikle 2,0-7,5 arasında değiştiği görülmektedir. Örneğin; *Aspergillus terreus* M11 endoglukanazı için (Gao *et al.*, 2008) pH 2,0, *Helminthosporium sp.* selülazı (Sivaramanan, 2014) için pH 3,0, *Bacillus subtilis* 1AJ3 Cel5A enzimi için (Ma *et al.*, 2020) pH 4,5, *Aspergillus oryzae* β -glukozidazı için (Riou *et al.*, 1998) pH 5,0, *Tribolium castaneum* endoglukanazı için pH 4,8 ve 6,8 (Rehman *et al.*, 2009), *Cellulomonas sp.* ASN2 endoglukanazı için ise pH 7,5 optimum değerler olarak bulunmuştur (Irfan *et al.*, 2012). Taze şeker kamışı ve depolanmış şeker kamışından saflaştırılan ve karakterize edilen selülaz enzimlerinin optimum pH ve sıcaklık değerleri incelenmiştir. Taze şeker kamışı selülazı için pH 4,0 ve depolanmış şeker kamışı selülazı için ise pH 7,0 ve her iki kaynağın selülaz enzimi için optimum sıcaklık ise 40°C olarak bulunmuştur (Adetuyi *et al.*, 2018). *Nectria catalinensis* selülaz sisteminin (endoglukanaz, ekzoglukanaz ve sellobiaz) aktivitesi ve kararlılığı üzerinde sıcaklık ve pH'ın etkisi araştırılmıştır. Farklı enzimler için maksimum aktivite pH 4,2-5,8 arasında kaydedilmiştir ve pH 4,8 tüm stabilite çalışmaları için optimale yakın olarak değerlendirilmiştir (Pardo and Forchiassin, 1999). Greyfurt kabuğu atıklarının selülaz ve pektinaz enzimleri ile hidrolizi için yapılan bir çalışmada, 0, 1, 2, 5 ve 10 mg protein/g kabuk kuru maddesinin pektinaz ve selülaz yüklemeleri 45°C'de test edilmiştir ve optimum pH 4,8 olarak bulunmuştur (Wilkins *et al.*, 2007).

4.3.2 Selülaz aktivitesine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık enzimlerin katalitik aktivitesi üzerinde etkilidir. Bağlı aktivitenin sıcaklık ile değişimini gösteren optimum eğrilerinden enzimin optimum sıcaklık değerine ulaşılır. Sıcaklığın selülaz aktivitesine etkisi bölüm 3.6.2'de açıklandığı gibi enzimin aktivitesinin farklı sıcaklıklarda standart koşullarda ölçülmesiyle belirlendi ve bu ilişki Şekil 4.15'de verildi.



Şekil 4.15 Selülaaz aktivitesine sıcaklığın etkisi (*optimum sıcaklık*) (Substrat: Karboksimetil selüloz (CMC); İnkübasyon süresi: 5 dakika).

Şekil 4.15’den görüldüğü gibi enzim için optimum sıcaklık değeri 55°C olarak bulundu. Enzimler protein yapıdaki oldukça büyük ve komplike moleküllerdir. Üç boyutlu yapısının korunması aktivitenin de korunmasını ifade etmektedir. Aktiviteye etki eden önemli parametrelerden biri de sıcaklıktır. Reaksiyon hızı sıcaklık artışı ile artar fakat belli bir sıcaklıktan sonra enzim proteinin denaturasyonu sonucu aktivitede düşme olur. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık (*optimum sıcaklık*) özellikle operasyonel bir parametre olması açısından önemlidir.

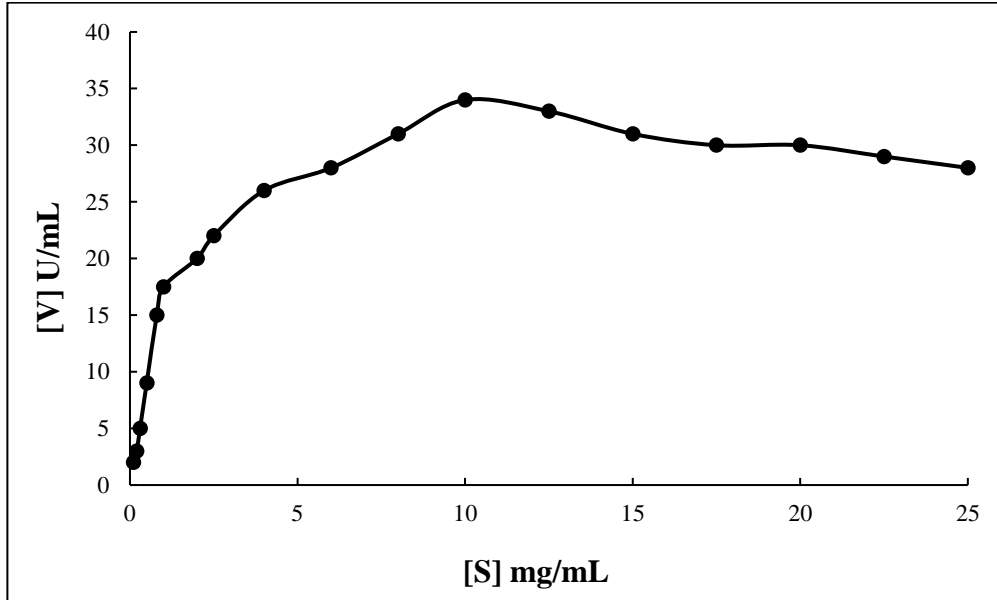
Şekil 4.15’den görüldüğü gibi enzim için optimum sıcaklık değeri 55 °C olarak bulundu. Literatür çalışmalarına bakıldığında selülaazların optimum sıcaklık değerinin genellikle kaynağa ve inkübasyon süresine bağlı olarak 40-60°C arasında değiştiği görülmektedir. Örneğin; *Streptomyces ruber* selülaazı (El-Sersy *et al.*, 2010) için 40 °C, *Penicillium* sp 51 selülaazları (Toghueo *et al.*, 2017) için 40-50 °C, *Monascus purpureus* NRRL1992 (Daroit *et al.*, 2008) ve *Fomitopsis pinicola* KMJ812 (Joo *et al.*, 2009) β-glukozidaz enzimleri için 50 °C, *Pycnoporus sanguineus*’tan izole edilen endoglukanaz, β- glukozidaz ve FPaz enzimleri için sırasıyla 60 °C ve 55 °C (Falkoski *et al.*, 2012) olarak optimum sıcaklık değerleri

bulunmuştur. Fakat mikrobiyal kaynaklı termostabil selülaazlar için bu değer 60 °C'nin çok üstüne de çıkabilmektedir. Örneğin; *Aspergillus japonicas* (Korotkova *et al.*, 2009) ve *Paecilomyces thermophila* (Yang *et al.*, 2008) β -glukozidaz enzimleri için optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 65 °C ve 75 °C olarak bulunmuştur. *Bacillus vallismortis* RG-07 selülaazının optimum sıcaklık değeri ise 95 °C olarak bulunmuştur (Gaur and Tiwari, 2015).

4.3.3 Selülaaz aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisi

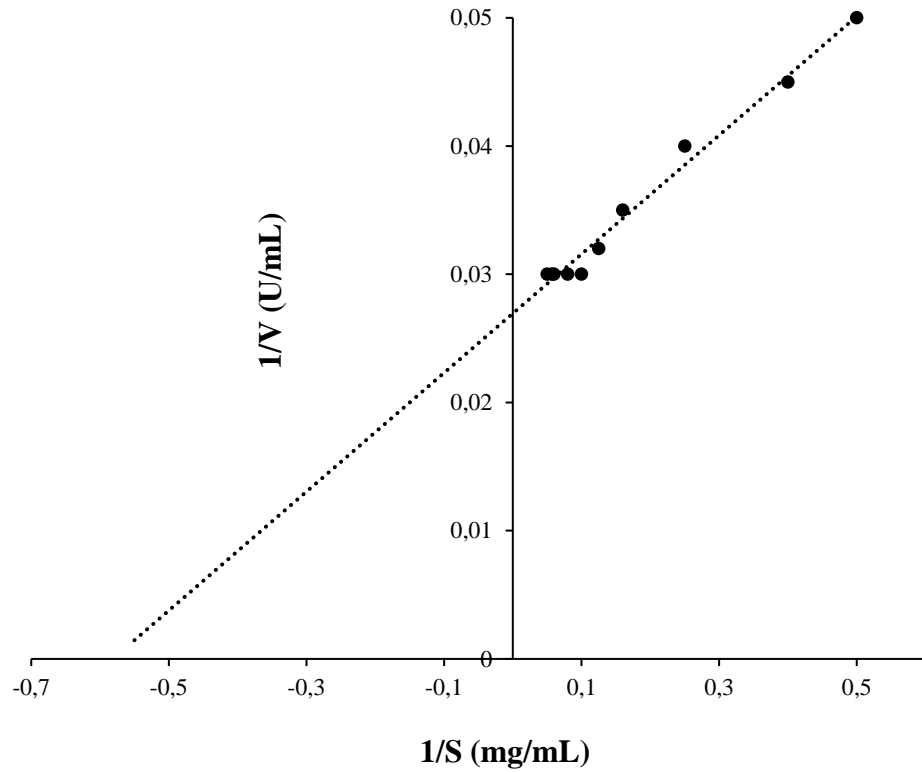
Selülaazların kinetik sabitleri genellikle kaynaklarına ve substratlarına bağlı olarak değişmektedir. Bezelye selülaazının K_M değeri (substrat: karboksimetil selüloz, CMC) birçok selülaaz ile benzerlik göstermektedir. Literatür çalışmalarına bakıldığında enzimin substrata afinitesini yansıtan K_M değerinin değişkenlik gösterdiği görülmektedir.

Bezelye selülaazının kinetik parametreleri doğal substratlardan CMC kullanılarak bölüm 3.6.3'de açıklandığı gibi test edilerek belirlendi (Şekil 4.16). Doygunluk substrat konsantrasyonunu ve K_M ile V_{max} değerlerini belirleyebilmek için 0,1-25 mg/mL CMC konsantrasyon aralığı kullanılarak enzim aktiviteleri standart koşullarda (50 °C'de 5 dakika inkübasyon) ölçülmüştür.



Şekil 4.16 Karboksimetil selüloz (CMC) konsantrasyonunun selülaaz aktivitesine etkisi (Substrat [S]: Karboksimetil selüloz, Sıcaklık: 50 °C, İnkübasyon süresi: 5 dakika) (Michaelis Menten grafiği).

Şekil 4.16'dan görüldüğü gibi doygunluk substrat konsantrasyonu 10 mg/mL olarak belirlendi. Bu değerlerin üzerindeki konsantrasyonlarda aktivitede belirgin bir değişiklik gözlenmemektedir. Selülaz enziminin kinetik parametrelerinin hesaplanmasında CMC için hazırlanan Lineweaver-Burk diyagramı ($1/S$ 'a karşı $1/V$) (Şekil 4.17) kullanıldı. Lineweaver-Burk diyagramından K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 1,7 mg/mL ve 37,2 U olarak belirlendi.



Şekil 4.17 Selülaz enziminin Lineweaver-Burk diyagramı (Substrat [S]: Karboksimetil selüloz, Sıcaklık: 50 ° C, İnkübasyon süresi: 5 dakika).

Selülazların kinetik sabitleri genellikle kaynaklarına ve substratlarına bağlı olarak değişmektedir. Bezelye selülazının K_M değeri (Substrat: CMC) *Bacillus subtilis* kaynaklı birçok selülaz ile benzerlik göstermektedir. Örneğin; *B. subtilis* CH43 ve *B. subtilis* HR68 için K_M değerleri sırasıyla 1,5 mg/mL ve 1,7 mg/mL (Mawadze *et al.*,2000), *Bacillus subtilis* Bc1 için 1,243 mg/mL (Dehghanikhah *et al.*, 2020) ve *Bacillus vallismortis* RG-07 için ise 1,923 mg/mL (Gaur and Tiwari, 2015) olarak bulunmuştur. Literatür çalışmalarına bakıldığında enzimin CMC afinitesini yansıtan K_M değerleri oldukça geniş bir aralıkta farklılık göstermektedir.

Örneğin; *Bacillus subtilis* (AS3) hücre dışı alkalın karboksimetilselüloz için 0,13 mg/mL (Deka *et al.*, 2013), taze ve depolanmış *Saccharum officinarum* L (şeker kamışı) selülozları için sırasıyla 0.540 mg/mL ve 0.09 mg/mL (Adetuyi *et al.*, 2018), *Bacillus sp.* MSL2 suşu selüloz için 0,8 mg/mL (Sriariyanun *et al.*, 2016), alkalofilik *Bacillus sp.* No. 1139 selüloz için 0,48 mg/mL (Fukumori *et al.*, 1985), *Caldibacillus cellulovorans* endoglukanazı için 3.4 mg/ mL (Huang and Monk, 2004) termofilik aktinomiset selüloz için 5 mg/mL (Aboul-Enein *et al.*, 2010), koyun rümeninden izole edilen selüloz için 6,35 mg/mL (Francis *et al.*, 1978), *Poronia oedipus* selüloz için 11.1 mg/mL (Denison and Koehn, 1977), *Aspergillus terreus* GN1 selüloz için 13.1 mg/mL (Garg and Neelakantan, 1982) *Aspergillus oryzae* CMC-1 endoglukanazı için 20 mg/mL (Javed *et al.*, 2009), *Aspergillus niger* B03 suşu hücre dışı endoglukanazı için 21.01 mg/ mL (Dobrev and Zhekova, 2012), *Acidothermus cellulolyticus* 11B kaynaklı endoglukanaz AcCel12B için 25.47 mg/mL (Wang *et al.*, 2015), *Peniophora sp.* hücre dışı endoglukanazı için 34.8 mg/mL (Trinh *et al.*, 2013) ve *Aspergillus niger* endoglukanazı için 40 mg/mL (Farinas *et al.*, 2010) olarak farklı K_M değerleri elde edildiği literatürde belirtilmiştir.

4.3.4 Efektör türü ve konsantrasyonunun etkisi

Bölüm 3.6.4' de açıklandığı gibi bazı efektörlerin (metal iyonları ve kimyasal bileşikler) farklı konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Çizelge 4.5'de bezelyeden saflaştırılan selüloz enzim preparatı için çeşitli efektörlerin enzim aktivitesine etkisi gösterilmektedir.

Çizelge 4.5'den görüldüğü gibi selüloz aktivitesi metal iyonlarına karşı oldukça dirençlidir. Mn^{+2} iyonlarının 1,0 ve 2,5 mM konsantrasyonları aktivatör etkisi göstermektedir. Ba^{+2} iyonu ise 2,5 mM konsantrasyonda selüloz aktivitesini yaklaşık % 51 oranında inhibe etmektedir. Ni^{+} ve Hg^{+} iyonlarının 0,1; 1,0 ve 2,5 mM konsantrasyonları da inhibitör etkisi göstermektedir. Bunların yanı sıra diğer efektörlerin enzimi konsantrasyonlarına bağlı olarak çok düşük oranda aktive ya da inhibe ettiği belirlendi.

Çizelge 4.5 Çeşitli efektörlerin selülaaz aktivitesine etkisi.

Efektör Türü Konsantrasyonu	% Bağlı Aktivite		
	0,1 mM	1 mM	2,5 mM
Kontrol	100	100	100
NaCl	89	91	95
CuSO ₄	106	95	64
CaCl ₂	102	76	57
BaCl ₂	67	68	49
KCl	87	88	95
MnSO ₄ .H ₂ O	112	157	187
MnCl ₂ .H ₂ O	74	119	137
FeCl ₃ .6H ₂ O	74	75	55
MgCl ₂ .6H ₂ O	88	94	98
MgSO ₄ .7H ₂ O	55	65	61
ZnSO ₄ .7H ₂ O	85	80	72
Na ₂ CO ₃	101	83	86
Ni ⁺	48	58	52
Hg ⁺	58	50	30

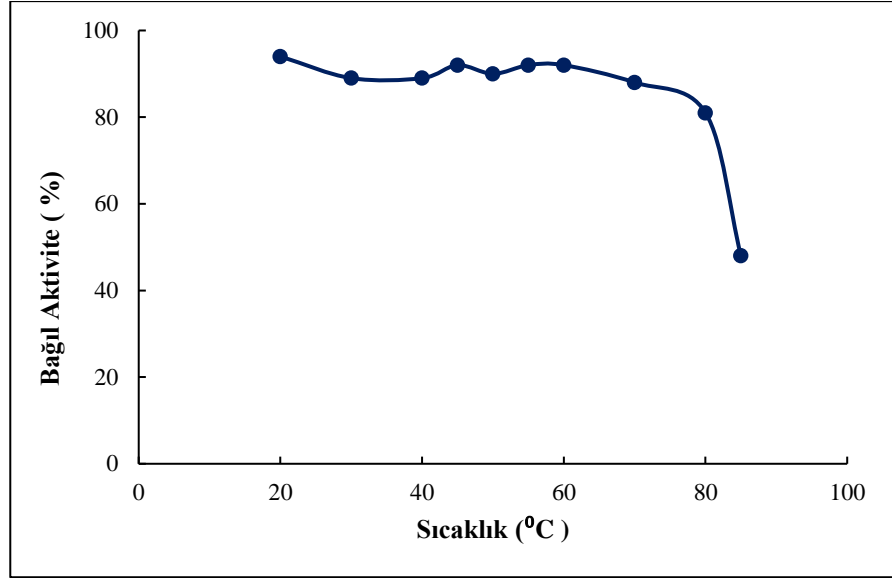
Çeşitli iyon ve bileşiklerin mikrobiyal kaynaklı selülaaz enzimlerinin aktivitesine etkisinin incelendiği çalışmalar literatürde mevcuttur. *Pseudomonas* sp. selülaazının aktivitesi K⁺, Na⁺, Ca⁺² iyonlarının yüksek konsantrasyonları (5 mM, 10 mM) ile azalmış ve düşük konsantrasyonlarında (1 mM) ise aktivite korunmuştur. Cu⁺², Zn⁺², Fe⁺² iyonlarının yüksek konsantrasyonlarında da inhibisyon etkisi gözlenmiştir. Bu iyonlara kıyasla, Mn⁺² iyonlarının yüksek konsantrasyonları (10 mM) ile önemli oranda aktive olmuştur (Goel *et al.*, 2019). Cu⁺², Mg⁺², Ca⁺², Fe⁺², Mn⁺² iyonları *Fusarium oxysporum* (Olajuyigbe *et al.*, 2016) selülaazını aktive ederken; *Aspergillus niger* 322 (Peshin *et al.*, 1999) selülaazı Mn⁺² ve Fe⁺² ile, *Melanocarpus* sp. (Kaur *et al.*, 2007) selülaazı ise Cu⁺² ile inhibe olmaktadır. *Aspergillus fumigatus* (Pol *et al.*, 2012) ve *Penicillium pinophilum* selülaazları Hg⁺ ve Ni⁺ iyonları ile önemli ölçüde inhibe olmuştur (Bagewadi *et al.*, 2015).

4.4 Kararlılık Testleri

Enzim preparatlarının kararlılığı, belirli koşullar altında enzim aktivitesinin zamana bağımlı olarak korunmasını tanımlar. Enzimlerin kararlılığı denince genellikle proteinin konformasyonel kararlılığından söz edilir. Enzimin termal, pH ve depo kararlılıkları büyük ölçüde konformasyonel kararlılığı ile belirlenir ve denaturasyon sonucu da inaktivasyon gerçekleşir. Bir enzimin kararlılığı; sıcaklık, pH, iyon şiddeti, tampon türü, substratın varlığı ve yokluğu, enzim konsantrasyonu, inkübasyon zamanı, aktivatör ya da inhibitörlerin varlığı ve yokluğuna bağlı olarak değişkenlik gösteren önemli bir parametredir. Çünkü enzimler oldukça karmaşık yapıya sahiptirler. Enzimin üç boyutlu yapısına etki edecek bir faktör, enzimin aktivitesini de etkiler (Telefoncu, 1997). Bezelyeden saflaştırılan selülazın kararlılıkları ile ilgili sonuçlar ilgili bölümlerde grafiklerle açıklanmıştır.

4.4.1 Selülazın termal kararlılığı

Enzimlerin kararlılığına etki eden parametrelerden en önemlisi sıcaklıktır. Genellikle düşük sıcaklıklarda daha kararlı olan enzim yapıları yüksek sıcaklıklarda hızla termal denaturasyona uğramaktadır. Selülazın hem sıcaklığa bağlı hem de inkübasyon süresine bağlı termal kararlılığı bölüm 3.7.1.1 ve 3.7.1.2’de açıklandığı gibi belirlendi (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19). Enzim ilk olarak farklı sıcaklıklarda (20-85 °C) inkübasyona bırakıldıktan sonra standart koşullarda (Substrat: Karboksimetil selüloz, CMC; Sıcaklık: 50 °C; İnkübasyon süresi: 5 dakika) aktiviteleri ölçüldü. Selülazın inkübasyon süresine bağlı termal kararlılığı için optimum sıcaklıkta (55 °C) ve farklı sürelerde (15-180 dakika) inkübe edildikten sonra standart koşullarda aktiviteleri ölçüldü.

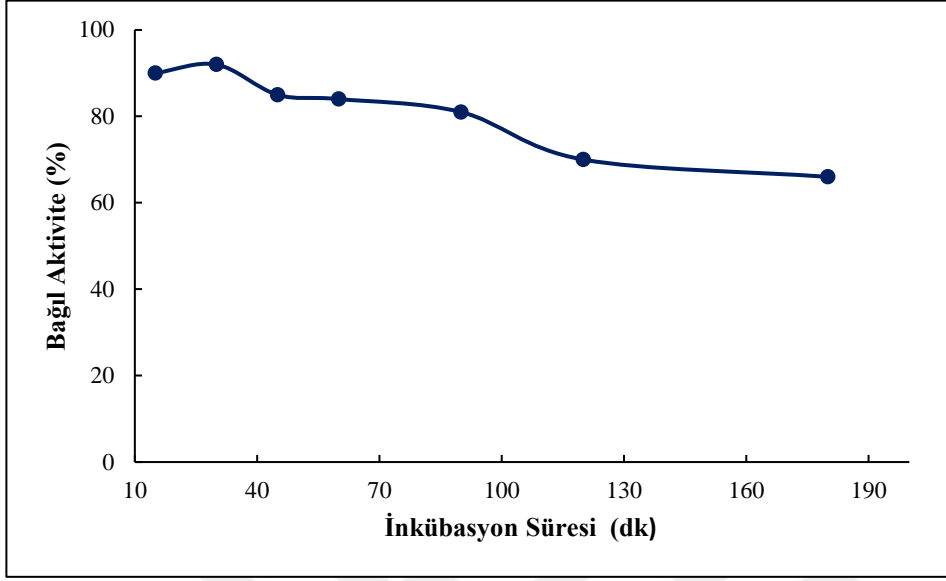


Şekil 4.18 Selülazın termal kararlılığı (Substrat: CMC; Sıcaklık: 50⁰ C; İnkübasyon süresi: 5 dakika).

Şekil 4.18'den görüldüğü gibi enzimin sıcaklığa bağlı termal kararlılığının 20-70 °C arasında oldukça iyi olduğu ve 70 °C'de enzimin aktivitesinin % 88'ini koruduğu görüldü. 70 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise enzim aktivitesi hızlı bir şekilde azalmaktadır. Selülaz enzimi kaynağa bağlı olarak farklı sıcaklık aralıklarında kararlılık göstermektedir. Örneğin; *Penicillium simplicissimum* β-glukozidazı için 30-80 °C sıcaklık değerleri arasında çalışılmıştır ve sıcaklık 60 °C'nin üzerine çıkarıldığında aktivitede keskin bir düşüş olduğu görülmüştür (Bai *et al.*, 2013). *Myceliophthora thermophila* termofilik selülaz enzimi için 40-80 °C arasında çalışılmıştır. En yüksek aktivite 65 °C'de ve en yüksek termal kararlılık 60 °C'de görülmüştür (Matsakas *et al.*, 2015). *Clostridium straminisolvans* (CSK1) bakteri suşu selülazının 70 °C'nin altındaki sıcaklık değerinde termal kararlılık gösterdiği bulunmuştur (Wang *et al.*, 2017). Leopar güvesinin simbiyotik *Bacillus subtilis* BC1'inden alkalofilik selülazının 20-80 °C aralığında termal kararlılık gösterdiği belirlenmiştir (Dehghanikhah *et al.*, 2020).

Şekil 4.19'da enzimin inkübasyon süresine bağlı termal kararlılık sonuçları verilmektedir. Şekilden görüldüğü gibi optimum sıcaklıkta enzimin inkübasyon süresine bağlı termal kararlılığının 15-90 dakika arasında oldukça iyi olduğu, 90.'ıncı dakikada enzim aktivitesinin % 81'ini koruduğu belirlendi. 90 dakikanın

üzerindeki inkübasyon sürelerinde ise enzim aktivitesini oldukça yavaş bir şekilde kaybetmektedir.



Şekil 4.19 Selülazın inkübasyon süresine bağımlı termal kararlılığı (Substrat: CMC; Sıcaklık: 50 ° C; İnkübasyon süresi: 5 dakika).

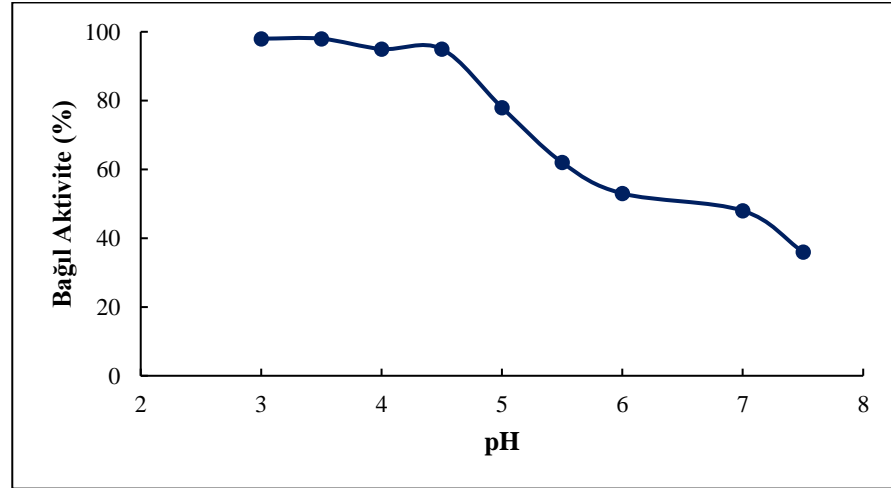
Selülaz enzimi kaynağa bağlı olarak optimum sıcaklıkta inkübasyon süresine bağlı olarak farklı kararlılık dereceleri göstermektedir. Örneğin; *Pycnopus sanguineus* PF-2 selülazları (Falkoski *et al.*, 2012) 40 °C ve 50 °C’de 48 saat, leopar güvesinin simbiyotik *Bacillus subtilis* BC1 alkalofilik selülazı (Dehghanikhah *et al.*, 2020) 80 °C’de 1 saat, *Thermobifida fusca* UPMC901 selülazı (Zaunidin *et al.*, 2019) 70 °C’de 24 saat, *Trichoderma longibrachiatum* selülazı (Hamdan and Jasim, 2018) 40 °C’de 1 saat termal kararlılık göstermiştir. Yerli *Bacillus* sp. S-41 asidik selülazı 50, 60 ve 100 °C’de 60 dakika termal kararlılık göstermiştir ve enzim aktivitesini sırasıyla % 100, % 93 ve % 70 oranlarında korumuştur (Kocamaz and Kocamaz, 2019). *Bacillus subtilis* AS3 alkalın selülazı 60 °C’de, 30 dakikalık inkübasyon sonrasında aktivitesinin % 50’den fazlasını, 60 dakikalık inkübasyon sonrasında ise % 40’ını korumuştur. 80 °C’de 60 dakikalık bir inkübasyon sonrasında ise enzim aktivitesi gözlenmemiştir (Deka *et al.*, 2013). Karajenan katı atıklarından izole edilen *Bacillus* suşları tarafından üretilen termostabil selülazın karakterizasyonu için yapılan bir başka çalışmada ise enzimin aktivitesini 50 °C’de

90 dakika inkübasyondan sonra % 50'nin üzerinde koruduğu görülmüştür (Listyaningrum *et al.*, 2018).

4.4.2 Selülazın pH kararlılığı

Tüm enzimler birer protein yapısında oldukları için, kararlılıklarına etki eden her bir faktör proteinin sekonder, tersiyer ve/veya kuarter yapılarını etkilemektedir. Çoğu enzim aşırı asidik ya da bazik koşullarda tersinmez denaturasyona uğrar.

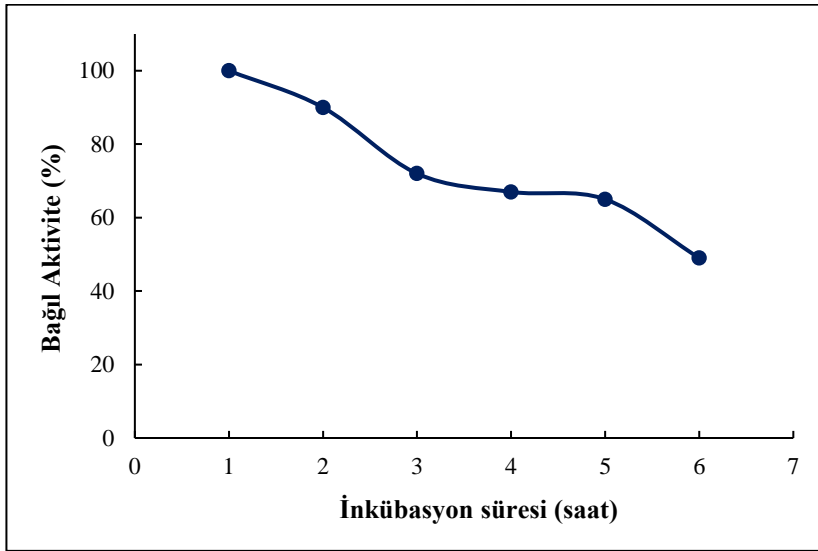
Bir enzimin pH kararlılığı birçok faktör (inkübasyon koşulları, sıcaklık, inkübasyon süresi, tampon türü ve konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, iyonik şiddet gibi) ile modifiye edilebilir. Selülazın hem pH'a bağlı hem de inkübasyon süresine bağlı pH kararlılığı bölüm 3.7.2.1 ve 3.7.2.2'de açıklandığı gibi belirlendi (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21). Bunun için enzim önce farklı pH'lardaki tamponlarda 1 saat boyunca bekletildi ve ardından standart koşullar altında (Substrat: Karboksimetil selüloz, CMC; Sıcaklık: 50 ° C; İnkübasyon süresi: 5 dakika) aktiviteleri ölçüldü. Selülazın inkübasyon süresine bağımlı pH kararlılığı için enzim optimum pH değerinde (pH 4,5) farklı sürelerde (1-6 saat) inkübe edildikten sonra standart koşullarda aktiviteleri ölçüldü.



Şekil 4.20 Selülazın pH kararlılığı (Substrat: CMC; Sıcaklık 50 ° C; Tamponlar 50 mM: pH 3,0-3,5; Glisin, pH 4,0- 5,5; Asetat, pH 6,0-7,5 Fosfat; İnkübasyon süresi: 5 dakika).

Şekil 4.20'den görüldüğü gibi selülaz, pH 3,0–4,5 arasında oldukça kararlıdır ve aktivitesini yaklaşık % 95 oranında korumaktadır. pH 5,5-7,5 arasında ise enzim

aktivitesi önemli ölçüde azalmaktadır. Selülozlar kaynak türü, sıcaklık ve substrat türüne bağlı olarak farklı pH aralıklarında farklı kararlılık dereceleri göstermektedirler. Örneğin; *Aspergillus terreus* endoglukanazı (Nazir *et al.*, 2009) arpa β -glukana ve ksiloglukana karşı 50°C'de geniş bir pH aralığı olan 3,0-5,0 aralığında, *Aspergillus niger* proteaz dirençli selülaz (Akiba *et al.*, 1995) karboksimetil selüloza karşı pH 5,0-10,0 aralığında, endofitik *Fusarium oxysporum* karboksimetil selülazı (Dar *et al.*, 2013) karboksimetil selüloza karşı 50 °C'nin altındaki sıcaklıklarda pH 4,0-8,0 aralığında, *Trichoderma longibrachiatum* selülazı (Pachauri *et al.*, 20) pH 3,0-6,0 aralığında iyi bir termal kararlılık göstermiştir.



Şekil 4.21 Selülazın inkübasyon süresine bağımlı pH kararlılığı (Substrat: CMC; Sıcaklık 50° C; Tamponlar 50 mM: pH 3,0- 3,5; Glisin, pH 4,0- 5,5; Asetat, pH 6,0-7,5 Fosfat; İnkübasyon süresi: 5 dakika).

Şekil 4.21'de ise optimum pH değerindeki enzimin inkübasyon süresine bağımlı pH kararlılığının 1-5 saat arasında oldukça iyi olduğu ve başlangıç aktivitesinin % 50'sinden fazlasını koruduğu, 2 saat sonunda ise enzim aktivitesinin % 90'ını koruduğu belirlendi. Selülozlar, inkübasyon süresine bağlı olarak farklı pH aralığında kararlılık göstermektedirler. Örneğin; *Peniophora sp* NDVN01 endo-beta-1,4-glukanazı pH 3,5-5,5 aralığında 24 saat boyunca aktivitesini % 80'nin üzerinde korumuştur (Trinh *et al.*, 2013). *Bacillus sonorensis* HSC7 asido-termofilik ve organik solvante dayanıklı karboksimetil selülaz enziminin pH

kararlılığı araştırılmıştır. Karboksimetil selülazın pH kararlılığı asidik pH 3,0-6,0 aralığında çalışılmıştır. 1 saatlik inkübasyon sonunda en yüksek kararlılığın pH 5,0'de olduğu bulunmuştur (Azadian *et al.*, 2017). *Jonesia quinghaiensis* endoglukanazı, pH 3,0-11,0 aralığında 1 saatlik inkübasyondan sonra %95'in üzerinde aktivitesini korumuş ve geniş bir pH aralığında yüksek kararlılık göstermiştir (Lin *et al.*, 2016). Ksilanaz üreten bir *Aspergillus niger* B03 suşundan izole edilen hücre dışı endoglukanaz enzimi, 40 °C'de, pH 3,0'de 210 dakika iyi bir termal kararlılık göstermiştir (Dobrev and Zhekova, 2012).

4.4.3 Selülazın depo kararlılığı

Depo kararlılığı, enzimlerin uygulama alanı ile ilgili olduğundan oldukça önemlidir. Enzimin depolama koşullarına bağlı bir parametredir. ATPS sistemi ile saflaştırılan selülazın depo kararlılığı bölüm 3.7.3'de belirtildiği gibi ölçüldü. Bezelye selülazının depo kararlılığı oldukça iyi olup 63 gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 94'ünü korumuştur.

4.5 Genel Değerlendirme

Selülozlar (E.C 3.2.1.4) ile ilgili izolasyon, saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları uzun yıllardan beri devam etmektedir. Bir çok farklı kaynaktan; mikrobiyal (Myers and Norcote, 1959; Hurst *et al.*, 1976; Wood and McCrae, 1978; Fukumori *et al.*, 1985; Horikoshi, 1999; Mawadze *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2011; Chinedu *et al.*, 2011), bitkisel ve hayvansal (Hatfield and Nevins, 1986; Watanabe *et al.*, 1997; Andriani *et al.* 2011; Guerriero *et al.*, 2018) bilinen genel izolasyon ve saflaştırma teknikleri kullanılarak izole edilip saflaştırılan enzimin, karakterizasyonu yapılarak uygulamaya sunulmuştur. Bölüm 1.1.8'de ayrıntılı bir olarak açıklandığı gibi enzim birçok farklı alanda uygulama olanağı bulmuştur. Selüloz enzimi; yem katkı maddesi olarak (Bedford *et al.*, 2003) ve yem besin değerlerini arttırmak amacıyla monogastrik ve ruminant yemlerinin üretimi için hayvan yemi endüstrisinde (Bhat, 2000; Kıran *et al.*, 2006), meyve sularının ekstraksiyonu ve berraklaştırılması (Grassin and Fauquembergue, 1996), meyve suyu üretiminde hemiselüloz ve pektinazların selüloz enzimi ile kullanımı (Soares *et al.*, 2001), zeytinyağı ekstraksiyonu (Fantozzi *et al.*, 1977) ve ekmek ve hamur kalitesini iyileştirmek için (Yurdugul *et al.*, 2012) gıda endüstrisinde, kağıttan mürekkebin enzimatik olarak uzaklaştırılması (Schafer *et al.*, 2007), kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde (Liu and Hu, 2012; Mai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007) ve tekstil endüstrisinde (Heikinheimo *et al.*, 2000) kullanılmıştır. Ayrıca endüstriyel ölçekte deterjanlarda da kullanılmış (Kottwitz and Schambil, 2005) ve protezlar ve lipazlar ile kombinasyon halinde kullanımı yeni araştırma konularından olmuştur (Singh *et al.*, 2007). Selüloz enzimi bu alanlar dışında; immobilizasyon (Pazarlıoğlu *et al.*, 2005), pigment ekstraksiyonu ve kombinasyonlarının kullanımı (Bunea *et al.*, 2009), biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu (Puri *et al.*, 2011), bakteriyel biyofilmin giderilmesi (Hemandez- Mena and Friend, 1993), ticari biyokatalizör olarak farmasötik endüstride (Connolly *et al.*, 2010), biyokütlenin etanole dönüştürülmesi (Wilkins *et al.*, 2007), zirai ve endüstriyel atıkların sakkarifikasyonu (Kıran *et al.*, 2006) gibi endüstriyel ve biyoteknolojik uygulama alanları da bulmuştur. Yüksek saflıkta ve tamamen homojen bir selüloz preparatının elde edilebildiği az sayıda çalışma mevcut ise de, dikkat edilmesi gereken nokta daha sonraki çalışmalarda kullanılabilmesi ve amaca uygun olarak hazırlanmasıdır. Selülozlar genellikle bir sistem halinde ve sinerjistik halde hücre içerisinde ve diğer çeşitli

glikozidazlarla bir arada bulunurlar. Bu nedenle çoğu kez bu aktiviteleri birbirinden ayırmak oldukça zor olmaktadır. Eğer hazırlanan enzim preparatı selüloz sistemi içindeki enzimlerden biri veya diğerlerince kontamine edilmiyor ise yukarıda belirtilen birçok kullanım alanı için uygun olacaktır.

Rekombinant proteinlerin ve enzimlerin üretimi için uygun maliyetle yeterli saflaştırmayı gerçekleştiren yöntemlerin geliştirilmesine gereksinim duyulmaktadır. Son yıllarda, protein geri kazanımı ve saflaştırılması için sıvı-sıvı ekstraksiyon sistemleri üzerinde durulmaktadır. sıvı-sıvı ekstraksiyonda organik çözüngenlerin kullanımı söz konusudur ancak proteinler organik çözüngenlerde çözünemeyip denaturasyona uğramaktadırlar.

Sıvı-sıvı ikili-faz sistemleri polimer/polimer veya polimer/tuz çözeltileri kullanılarak oluşturulabilmektedir. Sulu ikili-faz sistemleri (Aqueous Two Phase Systems: ATPS) biyolojik moleküllerin (örneğin; protein, hücre, organel ve biyolojik membranlar) ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında kullanılan seçimli ve etkin bir methoddur. Sulu ikili-faz sistemleri biyo-uyumluluğa sahiptir ve % 70–90 gibi oldukça yüksek su içeriğinden dolayı biyomoleküller için toksik olmayan ılımlı bir çevre oluşturmaktadır. Ayrıca polimerlerin protein ve enzim aktivitesi ile yapılarının üzerinde stabilize edici etkileri vardır. Sulu ikili-faz sistemlerinin bilinen kromatografi, filtrasyon, santrifüjleme ve elektroforez gibi ayırma ve saflaştırma tekniklerine göre bazı avantajları bulunmaktadır. Tek bir adımdan oluşan işlem sayesinde istenilen proteinin deriştirilme ve saflaştırma işlemleri gerçekleştirebilmektedir. Sulu ikili-faz sisteminin bir başka olumlu yanı ise ölçek büyütmenin kolayca mümkün olmasıdır. Diğer olumlu yanları ise; ara yüzey geriliminin düşük olması nedeniyle biyomoleküllerin degradasyonunu minimize etmesi, uygulama zamanı ve enerji tasarrufunun olması, yüksek verimlilikle ayırımın gerçekleştirilebilmesi ve maliyetin oldukça az olmasıdır (Yue *et al.*, 2007; Negrete *et al.*, 2007).

Bu çalışmada, bezelye selülozünün sulu ikili-faz sistemi ile saflaştırılması ve karakterizasyonu amaçlandı. Enzim kaynağı tarama çalışması sonucunda, bezelyenin diğer enzim kaynaklarına göre daha yüksek bir selüloz aktivitesine sahip olması ve aktivite tayin aşamalarında şeker girişiminin olmamasından dolayı selüloz enziminin sulu ikili-faz sistemi ile saflaştırılmasında uygun bir kaynak olacağına karar verildi. Ayrıca bezelyenin, kolaylıkla temin edilebilen, ucuz ve bol bulunan bir kaynak olması da bir diğer tercih nedenlerindedir.

Selülaz enzimi bezelyeden (*Pisum sativum*) izole edilerek optimize edilmiş (% 15, w/w, PEG-6000 / %, w/w, 10 Na₂SO₄ / (pH 6,0, 25 ° C) ATPS ile saflaştırıldı. Enzimin genel biyokimyasal özelliklerini belirlemek için enzim aktivitesine etki eden bazı parametrelerin (inkübasyon süresi, pH, sıcaklık, substrat miktarı, efektör türü ve konsantrasyonu) etkisi incelenerek kararlılık testleri (termal, pH, depo) gerçekleştirildi. Enzim aktivite tayini dinitrosalisilik asit (DNS) metodu, protein miktar tayini ise Bradford metodu ile gerçekleştirildi.

ATPS'de biyomoleküllerin fazlara dağılımı değişken olduğu için dağılımı etkileyen faktörler belirlenmeli ve bu faktörlerle çeşitli varyasyonlar oluşturularak en iyi ayırımı sağlayan koşul belirlenmelidir. Selülaz enziminin saflaştırılmasında kullanılacak sistemi optimize etmek için sistemi etkileyen parametreler (PEG molekül kütlesi ve konsantrasyonu, tuz türü ve konsantrasyonu, pH, selülaz enzimi miktarı) incelendi. Optimizasyon sonunda en uygun faz sisteminde PEG molekül kütlesi 6000 Da, PEG konsantrasyonu % 15 (w/w), tuz türü Na₂SO₄, tuz konsantrasyonu % 10 (w/w), pH 6.0 ve protein miktarı 9 mg olarak belirlendi. % 15 (w/w) PEG-6000 / % 10 (w/w) Na₂SO₄ / (pH 6,0, 25⁰ C) optimize sistem kullanılarak hazırlanan sulu ikili-faz sisteminde selülaz enzimi tuzca zengin alt fazda baskın olarak toplandı. Enzim bu sistemde % 87 verim ile 2 kat saflaştırıldı. Enzimin optimum pH ve sıcaklığı ise sırasıyla pH 4,5 ve 55⁰ C olarak belirlendi. Enzimin K_M ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk diyagramı kullanılarak sırasıyla 1,7 g/mL ve 37,2 U olarak hesaplandı. Polimer-Tuz tabanlı ATPS ile saflaştırılan bezelye selülazının geniş bir pH ve sıcaklık aralığında oldukça kararlı bir enzim preparatı olduğu görüldü.

Enzimlerin ve proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan geleneksel kromatografik yöntemlere kıyasla selülaz enziminin saflaştırılmasında kullanılan bu tek adımlı ekstraksiyon yöntemi (ATPS) basit, ekonomik ve etkili bir yöntemdir. Sulu ikili-faz sistemleri çeşitli biyolojik maddelerin geri kazanımında kullanılabilen ve halen gelişim gösteren bir tekniktir. Klasik faz sisteminin yanı sıra günümüzde alternatif faz sistemleri de geliştirilmektedir. ATPS proseslerinin uygulamalarında potansiyel eğilim özellikle gıda ve kozmetik endüstrisi için biyolojik maddelerin ayırımıdır. Bu endüstrilerde ATPS proseslerinin kullanımı ticari öneme sahip biyolojik bileşiklerin geri kazanımı için geliştirilmesinin önemini arttıracaktır. Bu çalışmada, sulu ikili-faz sistemlerinden klasik polimer/tuz sistemi kullanılarak saflaştırılan selülaz enzimi sahip olduğu katalitik özellikleri bakımından gıda

sanayindeki uygulamalarında (meyve ve sebze sularının üretiminde ekstraksiyon, berraklaştırma ve stabilizasyon işlemleri) ve yem sanayinde hayvan yemlerinin hazırlanmasında kullanılabilir uygun bir preparattır. Ayrıca sulu ikili-faz sistemi biyouyumlu bir proses olduğu için bu sistemle hazırlanan selülaz enzim preparatları gıda ve yem sanayilerinde güvenle kullanılabilir. Saflaştırılan enzim hem serbest formda hem de immobilize edilerek de gıda sanayinde çeşitli üretim proseslerinde ileride kullanılabilir bir protein preparatıdır.

Endüstriyel pek çok alanda selülaz enzimi ticari bir önem taşımaktadır. Bu doğrultuda sulu ikili-faz sistemleri ile yapılan saflaştırma çalışmaları mevcuttur. Örneğin; *Trichoderma reesei* kaynaklı β -glukozidaz enzimi için sulu ikili-faz sistemi hazırlanmış ve pH ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir. ATPS % 8 (w/w) PEG-4000/ % 13 (w/w) potasyum fosfat tuzu ile hazırlanmış ve en yüksek selektivite pH 6.5 ve 25⁰ C sıcaklıkta elde edilmiştir. 7.0'den düşük pH değerleri ve 35⁰ C'nin altındaki sıcaklıklar için alt fazda % 92'den fazla β -glukosidaz verimi elde edilmiştir. β -glukosidaz enzimi, kağıt, tekstil ve gıda endüstrilerinin yanı sıra etanol üretiminde de önemli bir rol oynamaktadır (Gautam and Simon, 2006). Yanıt yüzeyi metodolojisini kullanarak ATPS ile *Bacillus velezensis* A4'ten bir selülazın saflaştırılması optimize edilmek istenmiştir. Bu doğrultuda, % 20,75 (w/w) PEG-4000/ % 8.5 (w/w) K₂HPO₄/ pH 8,5 sulu ikili-faz sistemi hazırlanmıştır ve enzimin maksimum geri kazanım oranı %67,8 ve saflaştırma faktörü 1,14 olarak bulunmuştur. Selülaz enzimleri, biyodönüşüm, kağıt hamuru ve kağıt, tekstil ve deterjan endüstrisi gibi endüstrilerde ve özellikle biyoenerji üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Liu *et al.*, 2019). *Bacillus subtilis* karboksimetil selülazının kısmi saflaştırılması için sulu ikili-faz sistemi PEG/sitrat ile hazırlanmış ve karboksimetil selülaz için, % 88,82 geri kazanım ve 4,8 saflaştırma katsayısına ulaşılmıştır. Karboksimetil selülaz; hayvan yemleri, atıksu arıtma tesisleri, tekstil ve kağıt endüstrilerinde kullanılmaktadır. Ayrıca, substrat olarak lignoselülozik biyokütle kullanılarak biyoetanol üretiminde de yaygın olarak uygulama alanı bulmuştur (Ho *et al.*, 2017).

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aa K., Flengsrud R., Lindahl V., Tronsmo A.,** 1994. Characterization of production and enzyme properties of an endo- β -1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* CK2 isolated from compost soil, *Antonie van Leeuwenhoek*, 66:319-326 pp.
- Aboul-Enein, A., E. Serour, and T. Hussien,** 2010, Purification and characterizat on of a novel thermoactive cellulase from thermophilic actinomycetes isolated from soil sample of Egypt, *International Journal of Academic Research*, 2: 81-86 pp.
- Ademakinwa, A.N., Agunbiade, M.O., Ayinla, Z.A., Agboola, F.K.,** 2019, Optimization of aqueous two-phase partitioning of *Aureobasidium pullulans* α -amylase via response surface methodology and investigation of its thermodynamic and kinetic properties, *International Journal of Biological Macromolecules*, 140: 833-841 pp.
- Adetuyi, F.O., Akintimehin, E.S., Karigidi, K.O., Okonji, R.E., and Adeniyi, D.A.,** 2018, Partial purification and characterisation of cellulase from sugarcane as affected by postharvest storage of sugarcane (*Saccharum officinarum L*) stem, *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 41(1): 379-392 pp.
- Agrawell, K.M.L., Bahl, O.P.,** 1968, Glycosidases of *Phaseolus vulgaris* II: Isolation and general properties, *The Journal of Biological Chemistry*, 243: 13-18 pp.
- Ahamed, A., Vermette, P.,** 2008, Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions, *Biochemical Engineering Journal*, 40: 399-407 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Akiba, S., Kimura, Y., Yamamoto, K., and Kumagai, H.,** 1995, Purification and characterization of a protease-resistant cellulase from *Aspergillus niger*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79: 125-130 pp.
- Alberto, F., Bingon, C., Sulzenbacher, G., Henrissat, B., Czjzek, M.,** 2004, The three-dimensional structure of invertase (β -fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases, *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 18903-18910 pp.
- Ålbertsson, P.Å.,** 1986, Partition of cell particles and macromolecules, 3rd ed. Wiley, New York.
- Al-Ghazzewi, F. H., Khanna, S., Tester, R. F., & Piggott, J.,** 2007, The potential use of hydrolysed konjac glucomannan as a prebiotic. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 1758-1766 pp.
- Ali, U. F., El-Dein, H. S. S.,** 2008, Production and partial purification of cellulase complex by *Aspergillus niger* and *A. nidulans* grown on water hyacinth blend. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(7): 875-891 pp.
- Amid, M., Manap, Y., and, Zohdi, N.K.,** 2014, A novel aqueous two phase system composed of a thermo-separating polymer and an organic solvent for purification of thermo-acidic amylase enzyme from red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel, *Molecules*, 19: 6635-6650 pp.
- Anandharamakrishnan, C., Raghavendra, S.N., Barhate, R.S., U. Hanumesh, U., and Raghavarao, K.S.M.S.,** 2005, Aqueous two-phase extraction for recovery of proteins from cheese whey, *Trans IChemE, Part C, Food and Bioproducts Processing*, 83(C3): 191-197 pp.
- Andersen, N.,** 2007, Enzymatic hydrolysis of cellulose, Denmark, Ph.D. Thesis, 154, Technical University of Denmark.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Andersen, N., Johansen, K.S., Michelsen, M., Stenby, E.H., Krogh, K.B.R.M., Olsson, L.,** 2008, Hydrolysis of cellulose using mono-component enzymes show synergy on phosphoric acid swollen cellulose (PASC), but competition on Avicel, *Enzyme and Microbial Technology*, 42(4): 362-370 pp.
- Andrade, J.P., da Rocha Bispo, A.S., Marbach, P.A.S., and do Nascimento, R.P.,** 2011, Production and partial characterization of cellulases from *Trichoderma sp.* IS-05 isolated from sandy coastal plains of Northeast Brazil, *Enzyme Research* Article ID 167248, 7 p.
- Andriani, D., Sunwoo, C., Ryu, H. W., Prasetya, B., and Park, D. H.,** 2011, Immobilization of cellulase from newly isolated strain *Bacillus subtilis* TD6 using calcium alginate as a support material, *Bioprocess Biosystem Engineering*, 35: 29-33 pp.
- Annamalai, N., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S., and Balasubramanian, T.,** 2011a, A novel thermostable and halostable carboxymethylcellulase from marine bacterium *Bacillus licheniformis* AU01, *World Journal Microbiol Biotechnology*, 27: 2111-2115 pp.
- Antov, M.G.,** 2004, Partitioning of pectinase produced by *Polyporus squamosus* in aqueous two-phase system polyethylene glycol 4000/crude dextran at different initial pH values, *Carbohydrate Polymers*, 56: 295-300 pp.
- Antov, M.G., Peričin, D.M., Dašić, M.G.,** 2006, Aqueous two-phase partitioning of xylanase produced by solid-state cultivation of *Polyporus squamosus*, *Process Biochemistry*, 41: 232-235 pp.
- Asenjo, J.A., Andrews, B.A.,** 2011, Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective, *Journal of Chromatography A*, 1218: 8826-8835 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Aung, S., Aung, O., Aung, M., 2001, “Kinetic studies on *Trichoderma viride* cellulase”, <http://www.iaea.org>, Proc. O/M.A.A.S (Feb. 2001) (Erişim tarihi: 28 Kasım 2019).

Aygan, A., Karcioğlu, L., Arıkan, B., 2011. Alkaline thermostable and halophilic endoglucanase from *Bacillus licheniformis* C108. *African Journal of Biotechnology*, 10(5): 789-796 pp.

Azadian, F., Badoei-dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A., Karami, Z., Hassanshahian, M., 2017, Production and characterization of an acidothermophilic, organic solvent stable cellulase from *Bacillus sonorensis* HSC7 by conversion of lignocellulosic wastes, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15: 187-196 pp.

Babu, B.R., Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S.M.S., 2008, Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two phase system, *Chemical Engineering and Processing*, 47: 83-89 pp.

Bagewadi, Z.K., Ninnekar, H.Z., 2015. Production, purification and characterization of endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic waste, *International Journal of Biotechnology and Biomedical Sciences*, 1: 25-32 pp.

Bai, H., Wang, H., Sun, J., Irfan, M., Han, M., Huang, Y., Han, X., Yang, Q., 2013, Production, purification and characterization of novel beta glucosidase from newly isolated *Penicillium simplicissimum* H-11 in submerged fermentation, *EXCLI Journal*, 12: 528-540 pp.

Baig, M.M.V., Baig, M.L.B., Baig, M.I.A., Yasmeen Majeda, 2004. Saccharification of banana agro-waste by cellulolytic enzymes. *African Journal of Biotechnology*, 3(9): 447-450 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bakare, M.K., Adewale, I.O, Ajayi, A., Shonukan, O.O.,** 2005, Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*, *African Journal of Biotechnology*, 4 (9): 898-904 pp.
- Baker, R. A., & Wicker, L.,** 1996, Current and potential applications of enzyme infusion in the food industry, *Trends in Food Science and Technology*, 7: 279-284 pp.
- Balasubramaniam, D.,** 2003, Lysozyme separation from tobacco extract by aqueous two-phase extraction, http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-02192003-164258/unrestricted/final_thesis.pdf (Erişim tarihi: 28 Kasım 2019).
- Balasubramaniam, D., Wilkinson, C., Cott, K.V., Zhang, C.,** 2003, Tobacco protein separation by aqueous two-phase extraction, *Journal of Chromatography A*, 989: 119-129 pp.
- Bamberger, S., Seaman, G.V.F., Brown, J.A., Brooks D.E.,** 1984, The partition of sodium phosphate and sodium chloride in aqueous dextran poly(ethylene glycol) two-phase systems, *Journal of Colloid and Interface Science*, 99: 187-193 pp.
- Banerjee, S., Maiti, T.K., and Roy, R.N.,** 2020, Production, purification, and characterization of cellulase from *Acinetobacter junii* GAC 16.2, a novel cellulolytic gut isolate of *Gryllotalpa africana*, and its effects on cotton fiber and sawdust, *Annals of Microbiology*, 70: 28 pp.
- Barnett, C.C., Manoj, K., & Whited, G.M.** (2011). Enzymatic prevention and control of biofilm. US Patent. 20110195059.
- Barr, B.K., Hsieh, Y-L., Ganem, B., Wilson, D.B.,** 1996. Identification of two functionally distinct classes of exocellulases, *Biochemistry*. 35: 586-592 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Basak, S., Rangan, L.,** 2018, Production, characterization and inhibition of fungal cellulases utilizing rice bran as substrate in solid state fermentation, *Microbiology Current Research.*, 2(3): 69-74 pp.
- Bauer, M.W., Driskill, L.E., Callen, W., Snead, M.A., Mathur, E.J., Kelly, R.M.,** 1999, Endoglucanase, EglA, from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* hydrolyzes β -1,4 bonds in mixed-linkage (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -D-glucans and cellulose, *Journal of Bacteriology*, 181: 284-290 pp.
- Bayer, E. A., Morag, E., and Lamed, R.,** 1994. The cellulosome—a treasure-trove for biotechnology. *Trends in Biotechnology.*, 12: 379-386 pp.
- Bedford, M.R., Morgan, A.J., Fowler, T., Clarkson, K.A., Ward, M.A., Collier, K.D., & Larenas, E.A.,** 2003, Enzyme feed additive and animal feed including it. US Patent. 6562340 (to Genencore International Inc., USA).
- Béguin, P., and M. Lemaire.** 1996, The cellulosome: an exocellular, multiprotein complex specialized in cellulose degradation, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 201-236 pp.
- Beldman, G., Voragen, A.G.J., Rombouts, F.M., Pilnik, W.,** 1988, Synergism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglucanases purified from *Trichoderma viride*, *Biotechnology and Bioengineering*, 31: 173-178 pp.
- Beldman, G., Searle-Van Leeuwen, M.F., M. Rombouts, F., Voragen, F.,** 1985, The cellulase of *Trichoderma viride*, *European Journal of Biochemistry*, 146: 301-308 pp.
- Benavides, J., Aguilar, O., Lapizco-Encinas, B.H., Rito-Palomares, M.,** 2008, Extraction and purification of bioproducts and nanoparticles using aqueous two-phase systems strategies, *Chemical Engineering Technology*, 31: 838-845 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Berggren, K., Nilsson, A., Johansson, G., Bandmann, N., Nygren, P., Tjerneld, F.,** 2000, Partitioning of peptides and recombinant protein–peptide fusions in thermoseparating aqueous two-phase systems: effect of peptide primary structure, *Journal of Chromatography B*, 743: 295-306 pp.
- Bhanja, T., Kumari, A., & Banerjee, R.,** 2009, Enrichment of phenolics and free radical scavenging property of wheat koji prepared with two filamentous fungi, *Bioresource Technology*, 100: 2861-2866 pp.
- Bhat, M.K., Bhat, S.,** 1997, Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications, *Biotechnology Advances*, 15:583-620 pp.
- Bhat, M. K.,** 2000, Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18: 355-383 pp.
- Bignell, D.E., Roisin, Y., Lo, N.,** 2011, Biology of termites: A modern synthesis, *Springer Netherlands*, 576 pp.
- Boisset, C., Frascini, C., Schulein ,M., Henrissat, B., Chanzy, H.,** 2000, Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A, *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1444-1452 pp.
- Bok, J.-D., D. A. Yernool, and D. E. Eveleigh.,** 1998, Purification, characterization, and molecular analysis of thermostable cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neopolitana*, *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (12): 4774-4781 pp.
- Bonomo, R.C.F., Minim, L.A., Coimbra, J.S.R., Fontan, R.C.I., Da Silva, L.H.M., Minim, V.P.R.,** 2006, Hydrophobic interaction adsorption of whey proteins: Effect of temperature and salt concentration and thermodynamic analysis, *Journal of Chromatography B*, 844: 6-14 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Boutte, T.T., Sargent, K.L., & Feng, G.,** 2009, Enzymatic dough conditioner and flavor improver for bakery products. US Patent. 20090297659.
- Bradford, M.M.,** 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254 pp.
- Bukhtojarov, F.E., Ustinov, B.B., Salanovich, T.N., Antonov, A.I., Gusakov, A.V., Okunev, O.N., and Sinitsyn, A.P.,** 2004, Cellulase complex of the fungus *Chrysosporium lucknowense*: Isolation and characterization of endoglucanases and cellobiohydrolases, *Biochemistry (Moscow)*, 69(5):542-551 pp.
- Bunea, A., Lujerdean, A., Pinte, A., Andrei, S., & Socaciu, C.,** 2009, Using cellulases and hemicellulases to improve better extraction of carotenoids from the sepals of *Physalis alkekengi* L., *Journal of Animal Science and Biotechnologies*, 66: 1-2 pp.
- Byrt, C.S., Cahyanegara, R., and Grof, C.P.L.,** 2012, *Frontiers in Plant Science*, 3:254 pp.
- Cascone, O., Andrews, B.A., Asenjo, J.A.,** 1991, Partitioning and purification of thaumatin in aqueous two-phase systems, *Enzyme and Microbial Technology*, 13: 629-635 pp.
- Cavalcanti, M.T.H., Carneiro-da-Cunha, M.G., Brandi, I.V., Porto, T.S., Converti, A., Lima Filho, J.L., Porto, A.L.F., Pessoa A.,** 2007, Continuous extraction of α -toxin from a fermented broth of *Clostridium perfringens* Type A in perforated rotating disc contactor using aqueous two-phase PEG-phosphate system, *Chemical Engineering and Processing*, 47: 1771-1776 pp.
- Cazy, Carbohydrate-Active Enzymes, Glycoside Hydrolase.**
http://www.cazy.org/fam/acc_GH.html (20 Ekim 2019).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chaiwut, P., Rawdkuen, S., Benjakul, S.,** 2010, Extraction of protease from *Calotropis procera* latex by polyethylene glycol–salts biphasic system, *Process Biochemistry*, 45: 1148-1155 pp.
- Chan, K., Au, K. S.,** 1987, Studies on cellulase production by a *Bacillus subtilis*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 53: 125-136 pp.
- Chen, H., Hayn, M., Esterbauer, H.,** 1992, Purification and characterization of two extracellular betaglucosidases from *Trichoderma reesei*. *Biochimica et Biophysica Acta*, Volume eklenecek, 11 pp.
- Chen, H. L., Fan, Y. H., Chen, M. E., & Chan, Y.,** 2005, Unhydrolysed and hydrolysed konjac glucomannans modulated cecal and fecal microflora in Balb/c mice. *Nutrition*, 21: 1059-1064 pp.
- Chethana, S., Nayak, C.A., Raghavarao, K.S.M.S.,** 2007, Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains, *Journal of Food Engineering*, 81: 679-687 pp.
- Cohen, R.; Suzuki, M.R.; Hammel, K.E.,** 2005, Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 2412-2417 pp.
- Collèn, A., Penttilä, M., Stålbrand, H., Tjerneld, F., Veide, A.,** 2001, Extraction of endoglucanase I (Cel7B) fusion proteins from *Trichoderma reesei* culture filtrate in a poly(ethylene glycol)– phosphate aqueous two-phase system, *Journal of Chromatography A*, 943: 55-62 pp.
- Connolly, M. L., Lovegrove, J., & Touhy, K. M.,** 2010, Konjac glucomannan hydrolysate beneficially modulates bacterial composition and activity within the faecal microbiota, *Journal of Functional Foods*, 2: 219-224 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Coolbear, T., Whittaker, J.M., Daniel, R.M.,** 1992, The effect of metal ions on the activity and thermostability of the extracellular proteinase from a thermophilic *Bacillus*, strain EA.1. *Biochemistry Journal*, 287(2): 367-374 pp.
- Coughlan, M. P.** 1990. Cellulose degradation by fungi, In W.M. Fogarty and C.T. Kelly (ed.), *Microbial enzymes and biotechnology*, 2nd ed. *Elsevier Applied Science*, London, United Kingdom, 1-35 pp.
- Cowan, W.D.** (1996). Animal feed. *Industrial Enzymology*, 2nd edn. In: Godfrey, T. and West, S. (eds). Macmillan Press, UK, 360-371 pp.
- Dar, R.A., Saba, I., Shahnawaz, M., Sangale, M.K., Ade, A.B., Rather, S.A., Qazi, P.H.,** 2013, Isolation, purification and characterization of carboxymethyl cellulase (CMCase) from endophytic *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin, *Advances in Enzyme Research*, 1: 91-96 pp.
- Daroit, D.J., Simonetti, A., Hertz, P.F., Brandelli, A.,** 2008, Purification and characterization of an extracellular beta-glucosidase from *Monascus purpureus*, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(5): 933-941 pp.
- Das, A., Bhattacharya, S., and Murali, L.,** 2010. Production of cellulase from a thermophilic *Bacillus sp.* isolated from cow dung, *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, 8(6): 685-691 pp.
- Davies, G.J., Dadson, G.G., Hubbart, R.E., Tolley, S.P., Dauter, Z., Wilson, K.S., Hjort, C., Mikkelsen, J.M., Rasmussen, G., Schulein, M.,** 1996, Structure and function of endoglucanase V. *Nature.*, 365: 362-364 pp.
- Davies, G.J., Dodson, G., Moore, M.H., Tolley, S.P., Dauter, Z., Wilson, K.S., Rasmussen, G., Schulein, M.,** 1993, Structure determination and refinement

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

of the *Humicola insolens* endoglucanase V at 1.5 Å resolution, *Acta Crystallographia D* 52: 7-17 pp.

Davies, G., Henrissat, B., 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases, *Structure*, 3: 853-859 pp.

Davies, G.J., Sinnott, M.L., 1997, Glycosyl transfer, In: Sinnott, M.L. (Ed.), *Comprehensive Biological Catalysis*, Academic Press, London, 1:119-209 pp.

de Barros, D.P.C., Campos, S.R.R., Azevedo, A.M., Baptista, A.M., Aires-Barros, M.R., 2016, Predicting protein partition coefficients in aqueous two phase system, *Journal of Chromatography A*, 1470: 50-58 pp.

de Cassia Pereira, J., Travaini, R., Paganini Marques, N., Bolado-Rodríguez, S., Bocchini Martins, D.A., 2016. Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 for sugars release and ethanol production, *Bioresource Technology*, 204: 122-129 pp.

De Faveri, D., Aliakbarian, B., Avogadro, M., Perego, P., & Converti, A., 2008, Improvement of olive oil phenolics content by means of enzyme formulations: Effect of different enzyme activities and levels, *Biochemical Engineering Journal*, 41: 149-156 pp.

De Faveri, D., Torre, P., Aliakbarian, B., Perego, P., Dominguez, J.M., & Torres, B.R., 2008, Effect of different enzyme formulations on the improvement of phenolic compound content in olive oil. In: Proceedings of the IUFoST 13th World Congress of Food Science & Technology, Nantes, France, 927-928 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Decker, C.H., Visser, J., Schreier, P.,** 2000, β -glucosidases from five black *Aspergillus* species: study of their physico-chemical and biocatalytic properties, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 4929-4936 pp.
- Dehghanikhah, F., Shakarami, J., Ahmad, A.,** 2020, Purification and biochemical characterization of alkalophilic cellulase from the symbiotic *Bacillus subtilis* BC1 of the leopard moth, *Zeuzera pyrina* (L.) (Lepidoptera: Cossidae), *Current Microbiology*, 77: 1254-1261 pp.
- Deka, D., Jawed, M., Goyal, A.,** 2013, Purification and characterization of an alkaline cellulase produced by *Bacillus subtilis* (AS3), *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 43(3): 256-270 pp.
- Denison, D.A., Koehn, R.D.,** 1977, Cellulase activity of *Poronia Oedipus*, *Mycological Society of America*, 79: 592-603 pp.
- Dhiman, T. R., Zaman, M. S., Gimenez, R. R., Walters, J. L., & Treacher, R.,** 2002, Performance of dairy cows fed forage treated with fibrolytic enzymes prior to feeding, *Animal Feed Science and Technology*, 101: 115-125 pp.
- Divne, C., Ståhlberg, J., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Pettersson, G., Knowles, J.K.C., Teeri, T.T., Jones, T.A.,** 1994, The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*, *Science* 265: 524-528 pp.
- Do, Y. K., Kim, J. M., Chang, S. M., Hwang, J. H., & Kim, W. S.,** 2009, Enhancement of polyphenol bioactivities by enzyme reaction, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56: 173-178 pp.
- Dobrev, G.T., Zhekova, B.Y.,** 2012, Biosynthesis, purification and characterization of endoglucanase from a xylanase producing strain *Aspergillus niger* B03, *Brazilian Journal of Microbiology*, 70-77 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Duarte, S.P., Fortes, A.G., Prazeres, D.M.F., Marcos, J.C.,** 2007, Preparation of plasmid DNA polyplexes from alkaline lysates by a two-step aqueous two-phase extraction process, *Journal of Chromatography A*, 1164: 105-112 pp.
- Duff, S.J.B., and Marray, W.D.,** 1996, Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review, *Bioresource Technology*. 55: 1-33 pp.
- Eiteman, M.A., and Gainer, J.L.,** 1990, Peptide hydrophobicity and partitioning in poly(ethylene glycol)/ magnesium sulfate aqueous two-phase systems, *Biotechnology Progress*, 6: 479-484 pp.
- El-Adawy, M. M., Salem, A. Z. M., Borhami, B. E., Gado, H. M., Khalil, M. S., & Abo-Zeid, A.,** 2008, *in vitro* cecal gas production and dry matter degradability of some browse leaves in presence of enzymes from anaerobic bacterium in NZW rabbit, In Proceedings of the 9th WRSA World Rabbit Congress, Italy: Verona, 643-647 pp.
- El-Sersy, N.A., Abd-Elnaby, H., Abou-Elela, G.M., Ibrahim, H.A.H., El-Toukhy, N.M.K.,** 2010, Optimization, economization and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber*, *African Journal of Biotechnology*, 9(38): 6355-6364 pp.
- Engel, S., Barak, Z., Chipman, D.M., Merchuk, J. C.,** 2000, Purification of acetoxy acid synthase by separation in an aqueous two-phase system, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 743: 281-286 pp.
- Falkoski, D.L., Guimarães, V.M., de Almeida, M.N., Alfenas, A.C., Colodette, J.L., de Rezende, S.T.,** 2012, Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166: 1586-1603 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fang, X., Yano, S., Inoue, H., Sawayama, S.,** 2008, Lactose enhances cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(2): 115-120 pp.
- Fantozzi, P., Petruccioli, G., & Montedoro, G.,** 1977, Trattamenti con additivi enzimatici alle paste di oliva sottoposte ad estrazione per pressione unica: Influenze delle cultivars, dell'epoca di raccolta e della conservazione. *Grasse*, 54: 381-388 pp.
- Ferreira, L.A., and Teixeira, J.A.,** 2011, Salt effect on the aqueous two-phase system PEG 8000-sodium sulfate, *Journal of Chemical Engineering Data*, 56: 133-137 pp.
- Foreman, P.K., Brown, D., Dankmeyer, L., Dean, R., Diener, S., Dunn-Coleman, N.S., Goedegebuur, F., Houfek, T.D., England, G.J., Kelley, A.S., Meerman, H.J., Mitchell, T., Mitchinson, C., Olivares, H.A., Teunissen, P.J., Yao, J., Ward, M.,** 2003, Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*, *Journal of Biological Chemistry*, 278:31988-31997 pp.
- Francis, G.L., Gawthorne, J.M., and Storer, G.B.,** 1978, Factors affecting the activity of cellulases isolated from the rumen digesta of sheep, *Applied and Environmental Microbiology*, 36(5): 643-649 pp.
- Fu, Y. J., Liu, W., Zu, Y. G., Tong, M. H., Li, S. M., Yan, M. M., Efferth, T., & Luo, H.,** 2008, Enzyme assisted extraction of luteolin and apigenin from pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Mill sp.) leaves, *Food Chemistry*, 111: 508-512 pp.
- Fukumori, F., Kudo, T., and Horikoshi, K.,** 1985, Purification and properties of a cellulase from alkalophilic *Bacillus* sp. No. 1139, *Journal of General Microbiology*, 131: 3339-3345 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gao, J., Weng, H., Xi, Y., Zhu, D., Han, S.,** 2008, Purification and characterization of a novel endo- β -1,4-glucanase from the thermoacidophilic *Aspergillus terreus*, *Biotechnology Letter*, 30: 323-327 pp.
- Garg, N.K., and Neelakantan, S.,** 1982, Studies on the properties of cellulase enzyme from *Aspergillus terreus* GN1, *Biotechnology and Bioengineering*, 24(3): 737-742 pp.
- Garriga, M., Almaraz, M., Marchiaro, A.,** 2017, Determination of reducing sugars in extracts of *Undaria pinnatifida* (harvey) algae by UV-visible spectrophotometry (DNS method), *Actas de Ingeniería*, 3:173-179 pp.
- Gaur, R., and Tiwari, S.,** 2015, Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07, *BMC Biotechnology*, 15: 19 pp.
- Gautam, S., and Simon, L.,** 2006, Partitioning of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* in poly(ethylene glycol) and potassium phosphate aqueous two-phase systems: Influence of pH and temperature, *Biochemical Engineering Journal*, 30: 104-108 pp.
- Gautam, S.P., Bundela, P.S., Pandey, A.K., Khan, J., Awasthi, M.K., and Sarsaiya, S.,** 2011, Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi, *Biotechnology Research International*, Article ID 810425, 8 p.
- Gerwig, G. J., J. P., Kamerling, J. F. G., Vliegenthart, E. M., Lamed, R., and Bayer, E.A.,** 1993. The nature of the carbohydrate-peptide linkage region in glycoproteins from the cellulosomes of *Clostridium thermocellum* and *Bacteroides cellulosolvens*, *Journal of Biological Chemistry*, 268: 26956-26960 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ghori, M.I., Ahmed, S., Malana, M.A., Jamil, A.,** 2012, Kinetics of exoglucanase and endoglucanase produced by *Aspergillus niger* NRRL 567. *African Journal of Biotechnology*, 11: 7227-7231 pp.
- Glyk, A., Scheper, T., and Beutel, S.,** 2014, Influence of different phase-forming parameters on the phase diagram of several PEG–Salt aqueous two-phase systems, *Journal of Chemical and Engineering Data*, 59: 850-859 pp.
- Glyk, A., Solle, D., Scheper, T., and Beutel, S.,** 2017, Evaluation of driving forces for protein partition in PEG-salt aqueous two-phase systems and optimization by design of experiments, *Journal of Chromatography Separation Techniques*, 8: 6 pp.
- Goel, N., Patra, R., Verma, S.K., Sharma, P.C.,** 2019, Purification and characterization of cellulase from *Pseudomonas sp.* isolated from waste dumping site soil, *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, 6(3): 118-124 pp.
- Goja, A.M., Yang, H., Cui, M., Li, C.,** 2013, Aqueous two-phase extraction advances for bioseparation, *Bioprocessing Biotechniques* 4: 1 pp.
- Gomes, G.A., Azevedo, A.M., Aires-Barros, M. R., Prazeres, D.M.F.,** 2009, Purification of plasmid DNA with aqueous two phase systems of PEG-600 and sodium citrate/ammonium sulfate, *Separation and Purification Technology*, 65: 22-30 pp.
- Gong, X., Gruninger, R.J., Qi, M., Paterson, L., Forster, R.J., Teather, R.M., and McAllister, T.A.,** 2012, Cloning and identification of novel hydrolase genes from a dairy cow rumen metagenomic library and characterization of a cellulase gene, *BMC Research Notes*, 5: 566 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Grassin, C., and Fauquembergue, P.,** 1996, Fruit juices, *Industrial enzymology*, 2nd edn. In: Godfrey, T. & West, S. (eds). Macmillan, UK, 226-4.
- Großmann, C., Tintinger, R., Zhu, J., Maurer, G.,** 1997, Partitioning of some amino acids and low molecular peptides in aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and dipotassium hydrogen phosphate, *Fluid Phase Equilibria*, 137: 209-228 pp.
- Gu, Z., and Glatz, C.E.,** 2007, Aqueous two-phase extraction for protein recovery from corn extracts, *Journal of Chromatography B*, 845: 38-50 pp.
- Guerriero, G., Sergeant, K., Legay, S., Hausman, J-F., Cauchie, H-M., Ahmad, I., Siddiqui, K.S.,** 2018 Novel insights from comparative in silico analysis of green microalgae cellulases, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6): 1782 pp.
- Gunata, Z., and Vallier, M.J.,** 1999, Production of a highly glucose-tolerant extracellular β -glucosidase from three *Aspergillus* strains. *Biotechnology Letters*, 21: 219-223 pp.
- Gündüz, U.,** 2000, Partitioning of bovine serum albumin in an aqueous two-phase system: optimization of partition coefficient, *Journal of Chromatography B*, 743: 259-262 pp.
- Haki, G.D., and Rakshit, S.K.,** 2003., Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresource Technology*, 89: 17-34 pp.
- Hamdan, N.T., and Jasim, H.M.,** 2018, Purification and characterization of cellulase enzyme from *Trichoderma longibrachiatum* isolated in Iraqi soil, *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry (IOSR-JBB)*, 4(1): 32-41 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Han, J.H., and Lee, C.-H.**, 1997, Effects of salts and poly(ethylene glycol)-palmitate on the partitioning of proteins and *Bacillus subtilis* neutral protease in aqueous two-phase systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 9(1-2): 109-116 pp.
- Hatfield, R., and Nevins, D.J.**, 1986, Characterization of the hydrolytic activity of avocado cellulase, *Plant Cell Physiology*, 27(3): 541-552 pp.
- Hatti-Kaul, R.**, 2000, Aqueous Two-Phase Systems, Methods and Protocols, Humana Press Inc., New Jersey, 440 pp.
- He, G.-Q., Zhang, X.-Y., Tang, X.-J., Chen Q.-H., Ruan, H.**, 2005, Partitioning and purification of extracellular β -1,3-1,4-glucanase in aqueous two-phase systems, *Journal of Zhejiang University Science*, 6B(8): 825-831 pp.
- Heikinheimo, L., Buchert, J., Miettinen-Oinonen, A., & Suominen, P.**, 2000, Treating denim fabrics with *Trichoderma reesei* cellulases, *Textile Research Journal*, 70: 969-973 pp.
- Hemavathi, A.B., Raghavarao, K.S.M.S.**, 2011, Differential partitioning of -galactosidase and -glucosidase using aqueous two phase extraction, *Process Biochemistry*, 46: 649-655 pp.
- Henrissat, B., and Davies, G.J.**, 2000, Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics, *Plant Physiol.*, 124: 1515-1519 pp.
- Henrissat, B., Teeri, T.T., and Warren, R.A.J.**, 1998, A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants, *FEBS Letters.*, 425: 352-354 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Herculano, P.N., Porto, T.S., Maciel, M.H.C., Moreira, K.A., Souza-Motta, C.M., Porto, A.L.F.,** 2012, Partitioning and purification of the cellulolytic complex produced by *Aspergillus japonicus* URM5620 using PEG–citrate in an aqueous two-phase system, *Fluid Phase Equilibria*, 335: 8-13 pp.
- Hernandez-Mena, R., and Friend, P.L.,** 1993, Enzyme treatment for industrial slime control, US Patent. 5238572.
- Ho, S.L., Lan, J.C.W., Tan, J.S., Yima, H.S., Ng, H.S.,** 2017, Aqueous biphasic system for the partial purification of *Bacillus subtilis* carboxymethyl cellulase, *Process Biochemistry*, 58: 276-281 pp.
- Hotha, S., and Banik, R.M.,** 1997, Production of alkaline protease by *Bacillus thuringiensis* H-14 in aqueous two-phase systems, *Journal Chemical Technology Biotechnology*, 69: 5-10 pp.
- Hsieh, C.W.C., Cannella, D., Jørgensen, H., Felby, C., Thygesen, L.G.,** 2014, Cellulase inhibition by high concentrations of monosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 3800-3805 pp.
- Hsieh, C.-W.C., Cannella, D., Jørgensen, H., Felby, C., Thygesen, L.G.,** 2015, Cellobiohydrolase and endoglucanase respond differently to surfactants during the hydrolysis of cellulose, *Biotechnology for Biofuels*, 8: 52 pp.
- Hua, Z., Yuesheng, D., Ge, X., Menglu, L., Liya, D., LiJia, A., and Zhilong, X.,** 2013, Extraction and purification of anthocyanins from the fruit residues of *Vaccinium uliginosum* Linn, *Journal of Chromatography Separation Techniques*, 4: 2 pp.
- Huang X. P., and Monk C.,** 2004, Purification and characterization of a cellulase (CMCase) from a newly isolated thermophilic aerobic bacterium

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Caldibacillus cellulovorans gen. nov., sp. nov. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20: 85-92 pp.

Huang, D., Liu, Q., Yang, F., & Huang, F., 2007, The health-promoting function and the application of konjac mannooligosaccharides (KMOS). *Food Science and Technology*, 159-161 pp.

Hurst, P. L., Nielsen, J., Sullivan, P. A., Shepherd, M. G., 1977. Purification and Properties of a cellulase from *Aspergillus niger*, *Biochemistry Journal*, 165: 33-41 pp.

Iqbal, H.M.N., Ahmed, I., Zia, M.,A., Irfan, M., 2011, Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2: 149-156 pp.

Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., Huang, L., Peng, D., Sattar, A., Shabbir, M.A.B., Hussain, H.I., Ahmed, S., and Yuan, Z., 2016, Aqueous two-phase system (ATPS): An overview and advances in its applications, *Biological Procedures Online*, 8: 18 pp.

Irfan, M., Safdar, A., Syed, Q., Nadeem, M., 2012, Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity, *Turkish Journal of Biochemistry*, 37(3): 287-293 pp.

Ishida, N., Okubo, A., Kawai, H., Yamazaki, S., Toda, S., 1980, Interaction of amino acids with transition metal ions in solution (I) solution structure of L-lysine with Co(II) and Cu(II) ions as studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Agricultural and Biological. Chemistry.*, 44: 263-270 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ivanova, V., Yankov, D., Kabaivanova, L., Pashkoulov, D.,** 2001, Simultaneous biosynthesis and purification of two extracellular *Bacillus* hydrolases in aqueous two-phase systems, *Microbiological Research*, 156: 19-30 pp.
- Jabbour, D., Klippel, B., Antranikian, G.,** 2012, A novel thermostable and glucose-tolerant β -glucosidase from *Fervidobacterium islandicum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93: 1947-1956 pp.
- Javed, M.R., Rashid, M.H., Nadeem, H., Riaz, M., Perveen, R.,** 2009, Catalytic and thermodynamic characterization of endoglucanase (CMCase) from *Aspergillus oryzae* CMC-1, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157: 483-497 pp.
- Jo, K. I., Lee, Y. J., Kim, B. K., Lee, B. H., Chung, C. H., Nam, S. W., Kim, S. K., and Lee, J. W.,** 2008, Pilot-scale production of carboxymethylcellulase from rice hull by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.*, 13: 182-188 pp.
- Johansson, G.,** 1985, Aqueous two-phase systems in protein purification, *Journal of Biotechnology*, 3: 11-18 pp.
- Johansson, H.O., Feitosa, E., and Junior, A.P.,** 2011, Phase diagrams of the aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) / sodium polyacrylate/salts, *Polymers*, 3: 587-601 pp.
- Joo, A-R., Jeya, M., Lee, K-M., Sim, W-I, Kim, J-S., Kim, I-W., Kim, Y-S., Oh, D-K., Gunasekaran, P., Lee, J-K.,** 2009, Purification and characterization of a β -1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Fomitopsis pinicola*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83: 285-294 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Joshi, B., Bhatt, M. R., Sharma, D., Joshi, J., Malla, R., Sreerama, L.,** 2011, Lignocellulosic ethanol production: Current practices and recent developments, *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 6(8): 172-182 pp.
- Jönsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.-O.,** 2013, Bioconversion of lignocellulose: Inhibitors and detoxification, *Biotechnology for Biofuels*, 6: 16 pp.
- Kammoun, R., Chouayekh, H., Abid, H., Naili, B., Bejar, S.,** 2009, Purification of CBS 819.72 α -amylase by aqueous two-phase systems: Modelling using response surface methodology, *Biochemical Engineering Journal*, 46: 306–312 pp.
- Karlsson, J., Siika-aho, M., Tenkanen, M., Tjerneld, F.,** 2002, Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*., *Journal of Biotechnology*, 99: 63-78 pp.
- Karmakar, M., & Ray, R. R.,** 2011, Current trends in research and application of microbial cellulases, *Research Journal of Microbiology*, 6: 41–53 pp.
- Kaur, J., Chadha, B.S., Kumar, B.A., Saini, H.S.,** 2007, Purification and characterization of two endoglucanases from *Melanocarpus sp.* MTCC 3922, *Bioresource Technology*, 98: 74–81 pp.
- Kavakçioğlu, B., ve Tarhan, L.,** 2013, Initial purification of catalase from *Phanerochaete chrysosporium* by partitioning in poly(ethylene glycol)/salt aqueous two phase systems, *Separation and Purification Technology* 105: 8-14 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kepka, C., Collet, E., Persson, J., Ståhl, Å., Lagerstedt, T., Tjerneld, F., Veide, A.,** 2003, Pilot-scale extraction of an intracellular recombinant cutinase from *E. coli* cell homogenate using a thermoseparating aqueous two-phase system, *Journal of Biotechnology*, 103: 165-181 pp.
- Ketnawa, S., Benjakul, S., Ling, T.C., Martinez-Alvarez, O., Rawdkuen, S.,** 2013, Enhanced recovery of alkaline protease from fish viscera by phase partitioning and its application, *Chemistry Central Journal*, 7: 1–9 pp.
- Ketnawa, S., Rungraeng, N., Rawdkuen, S.,** 2017, Phase partitioning for enzyme separation: An overview and recent applications, *International Food Research Journal*, 24(1): 1-24 pp.
- Khandare, V., Walia, S., Singh, M. and Kaur, C.,** 2011, Black carrot (*Daucus carota ssp. sativus*) juice: processing effects on antioxidant composition and color, *Food and Bioproducts Processing*, 89: 482-486 pp.
- Kıran, Ö. E., Çömelekçioğlu, U., Dostbil, N.,** 2006, Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1):12-19 pp.
- Kim, B., Lee, B., Lee, Y., Jin, H., Chunga, C., Lee, J.,** 2009. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis subsp. subtilis* A-53. *Enzyme and Microbial Technology*, 44: 411-416 pp.
- Kim, J., Shin, H., Kim, J., Kim, J., Park, J.,** 2015, Isolation of high-purity extracellular vesicles by extracting proteins using aqueous two-phase system, *PLoS ONE*, 10(6): e0129760.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kim, T. U., Gu, B. G., Jeong, J. Y., Byun, S. M., and Shin, Y. C.,** 1995. Purification and characterization of a maltotetraose-forming alkaline α -amylase from an alkalophilic *Bacillus* strain, GM8901, *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8): 3105-3112 pp.
- Kleywegt, G.J., Zou, J.Y., Divne, C., Davies, G.J., Sinning, I., Stahlberg, J., Reinikainen, T., Srisodsuk, M., Teeri, T.T., Jones, T.A.,** 1997, The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes, *Journal of Molecular Biology*, 272: 383-397 pp.
- Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Simpson, B.K., Kishimura, H.,** 2005, Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems, *Process Biochemistry*, 40(9): 3061-3067 pp.
- Knowlton, K. F., McKinney, J. M., & Cobb, C.,** 2002, Effect of a direct-fed fibrolytic enzyme formulation on nutrient intake, partitioning and excretion in early and late lactation Holstein cows, *Journal of Dairy Science*, 85: 3328-3335 pp.
- Ko, C., Tsai, C., Lin, P., Chang, K., Tu, J., Wang, Y., Yang, C.,** 2010, Characterization and pulp refining activity of a *Paenibacillus campinasensis* cellulase expressed in *Escherichia coli*, *Bioresource Technology*, 101: 7882-7888 pp.
- Kocamaz, S., ve Kocamaz, D.,** 2019, Isolation and characterisation of acidic cellulase enzyme from native *Bacillus* sp. S-41 strain, *Journal of Applied Biological Sciences*, 13 (1):01-05 pp.
- Korotkova, O.G., Semenova, M.V., Morozova, V.V., Zorov, I.N., Sokolova, L.M., Bubnova, T.M., Okunev, O.N., and Sinitsyn, A.P.,** 2009, Isolation

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

and properties of fungal β -glucosidases, *Biochemistry (Moscow)*, 74(5): 569-577 pp.

Korpole S., Sharma R., Verma D., 2011, Characterization and phylogenetic diversity of carboxymethyl cellulose producing *Bacillus* species from a landfill ecosystem, *Indian Journal of Microbiology*, 51(4): 531-535 pp.

Kotchoni, S. O., Gachomo, E. W., Omafuvbe, B. O. Shonukan, O. O., 2006. Purification and biochemical characterization of carboxymethyl cellulase (CMCase) from a catabolite repression insensitive mutant of *Bacillus pumilus*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 8(2): 286-292 pp

Kottwitz, B., and Schambil, F., 2005, Cellulase and cellulose containing detergent, US Patent. 20050020472.

Krishna, S. H., Sekhar Rao, K. C., Suresh Babu, J., Srirami Reddy, D., 2000. Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM9414. *Bioprocess Engineering*, 22: 467-4 pp.

Kuduğ, H., 2013, Mikrobiyal Kaynaklı Selülaz Enziminin *E. coli* 'de Rekombinant Olarak Üretilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.

Kumar, B., Bhardwaj, N., Alam, A., Agrawal, K., Prasad, H., and Verma, P., 2018, Production, purification and characterization of an acid/ alkali and thermo tolerant cellulase from *Schizophyllum commune* NAIMCC-F-03379 and its application in hydrolysis of lignocellulosic wastes, *AMB Express* 8-173 pp.

Kumar, M., 2008, Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives, US Patent. 20080019956.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lakhundi, S., Siddiqui, R., Khan, N.A.,** 2015, Cellulose degradation: a therapeutic strategy in the improved treatment of *Acanthamoeba* infections, *Parasites & Vectors* , 8: 23 pp.
- Lavecchia, R., and Zuorro, A.,** 2010, Enhanced lycopene recovery from tomato processing waste by enzymatic degradation of plant tissue components. *International Review of Biophysical Chemistry*, 1: 63-69 pp.
- Lee, C. K., Darah, I., Ibrahim, C. O.,** 2007, Enzymatic deinking of laser printed office waste papers: Some governing parameters on deinking efficiency. *Bioresource Technology*, 98: 1684–1689 pp.
- Lee, Y.J., Kim, B.K., Lee, B.H., Jo, K.I., Lee, N.K., Chung, C.H., Lee, Y.C., Lee, J.W.,** 2008, Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull, *Bioresource Technology*, 99: 378-386 pp.
- Li, M., and Peoples, T.L.,** 2004, Purification of hyperthermophilic archaeal amylolytic enzyme (MJA1) using thermoseparating aqueous two-phase systems, *Journal of Chromatography B*, 807: 69-74 pp.
- Li, P., Zhu, J., Kong, Q., Jiang, B., Wan, X., Yue, J., Li, M., Jiang, H., Li, J., Gao, Z.,** 2013, The ethylene bis-dithiocarbamate fungicide mancozeb activates voltage-gated KCNQ2 potassium channel, *Toxicology Letters*, 219:211-217 pp.
- Lin, L., Xiaozhou Liu, X., Zhou, Y., Guan, L., He, J., Huang, W.,** 2016, A novel pH-stable, endoglucanase (JqCel5A) isolated from a salt-lake microorganism, *Jonesia quinghaiensis*, *Electronic Journal of Biotechnology*, 24: 56-62 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Listyaningrum, N.P., Sutrisno, A., and, Wardani, A.K.,** 2018, Characterization of thermostable cellulase produced by *Bacillus strains* isolated from solid waste of carrageenan, IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 131 012043.
- Liu, J., and Hu, H.,** 2012, Role of cellulose binding domains in the adsorption of cellulases onto fibres and its effect on the enzymatic beating of bleached kraft pulp. *Bioresources*, 7: 878-892 pp.
- Liu, J., and Xia, W.,** 2006. Purification and characterization of a bifunctional enzyme with chitosanase and cellulase activity from commercial cellulase. *Biochemical Engineering Journal*, 30: 82-87 pp.
- Liu, Y., Guo, H., Wu, Y., and Qin, W.,** 2018, Purification and characterizations of a novel recombinant *Bacillus velezensis* endoglucanase by aqueous two-phase system, *Bioresources Bioprocessing*, 5-19 pp.
- Liu, Y., Guo, H., Gua, J., Qind, W.,** 2019, Optimize purification of a cellulase from *Bacillus velezensis* A4 by aqueous two-phase system (ATPS) using response surface methodology, *Process Biochemistry*, 87: 196-203 pp.
- Luanghiran, S., Harinnasut, P., Thongpan, A., Proomboon, A., and Ratanapo, S.,** 2004, Partial purification of mulberry (*Morus rotundiloba*) peroxidase using aqueous two-phase extraction coupling with ion-exchange and gel-filtration chromatography, *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 38: 501-509 pp.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., Pretorius I. S.,** 2002, Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnolog, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3): 506-577 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lynd, L.R., Cushman, J.H., Nichols, R.J., & Wyman, C.E.,** 1991, Fuel ethanol from cellulosic biomass, *Science*, 251: 1318- 1323 pp.
- Ma, L., Aizhan, R., Wang, X., Yi, Y., Shan, Y., Liu, B., Zhou Y., and Lü, X.,** 2020, Cloning and characterization of low-temperature adapted GH5-CBM3 endo-cellulase from *Bacillus subtilis* 1AJ3 and their application in the saccharification of switchgrass and coffee grounds, *AMB Express*, 10: 42 pp.
- Mai, C., Kues, U., & Militz, H.,** 2004, Biotechnology in the wood industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63:477-494 pp.
- Malpiedi, L.P., Romanini, D., Picó, G. A., Nerli, B.B.,** 2009, Purification of trypsinogen from bovine pancreas by combining aqueous two-phase partitioning and precipitation with charged flexible chain polymers, *Separation and Purification Technology*, 65: 40-45 pp.
- Mandels, M., and Reese, E.T.,** 1965, Inhibition of cellulases. *Annual Review of Phytopathology*, 3: 85-102 pp.
- Mansfield, S. D., Saddler, J. N., Gübitz, G. M.,** 1998. Characterization of endoglucanases from the brown rot fungi *Gloeophyllum sepiarium* and *Gloeophyllum trabeum*, *Enzyme and Microbial Technology*, 23: 133–140 pp.
- Marcos, J.C., Fonseca, L.P., Ramalho, M.T., Cabral, J.M.S.,** 1999, Partial purification of penicillin acylase from *Escherichia coli* in poly(ethylene glycol)-sodium citrate aqueous two-phase systems, *Journal of Chromatography B*, 734: 15-22 pp.
- Matsakas, L., Antonopoulou, I., and, Christakopoulos, P.,** 2015, Evaluation of *Myceliophthora thermophila* as an enzyme factory for the production of thermophilic cellulolytic enzymes, *BioResources*, 10(3): 5140-5158 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mawadza, C., and Zvauya, D. R.,** 1996. Some factors affecting endo- β -1,4-glucanase production by two *Bacillus* strains isolated from Zimbabwean hot springs, *Journal of Basic Microbiology*, 36(3): 177-185 pp.
- Mayerhoff, Z.D.V.L., Roberto, I.C., Franco, T.T.,** 2004, Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems, *Biochemical Engineering Journal*, 18: 217-223 pp.
- McCarter, J.D., and Withers, S.G.,** 1994, Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis, *Current Opinion in Structural Biology*, 4: 885-892 pp.
- Medve, J., Ståhlberg, J., Tjerneld, F.,** 1994, Adsorption and synergism of cellobiohydrolase I and II from *Trichoderma reesei* during hydrolysis of microcrystalline cellulose, *Biotechnology and Bioengineering*, 44: 1064-1073 pp.
- Megha, S.V., Maragathavalli, S., Brindha, S., Karthikeyan, V., Annadurai, B. & Gangwar, S.K.,** 2015, Isolation and purification of cellulase, *International Journal of Science and Nature*, 6(3): 474-479 pp.
- Messner, R., Hagspiel, K., Kubicek, C.P.,** 1990, Isolation of the β -glucosidase-binding and activating polysaccharide from cell walls of *Trichoderma reesei*. *Archives of Microbiology*, 154: 150-155 pp.
- Miettinen-Oinonen, A., Londesborough, J., Joutsjoki, V., Lantto, R., Vehmaanperä J.,** 2003. Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* for textile treatment at neutral pH, *Enzyme and Microbial Technology*, 34: 332-341 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Minuth, T., Thijmnes, J., Kula, M-R.,** 1995, Extraction of cholesterol oxidase from *Nocardia rhodochrous* using a nonionic surfactant-based aqueous two-phase system, *Journal of Biotechnology*, 38: 151-164 pp.
- Miörner, H., Albertsson, P.Å., and Kronvall, G.,** 1982, Isoelectric points and surface hydrophobicity of gram-positive cocci as determined by cross-partition and hydrophobic affinity partition in aqueous two-phase systems, *Infection and Immunity*, 36(1): 227-234 pp.
- Miyano, H., Toyo'oka, T., Imai, K., Nakajima, T.,** 1985. Influences of metal ions on the reaction of amino and imino acids with fluorogenic reagents, *Analytical Biochemistry*, 150: 125-130 pp.
- Mohamadi, H.S., Omidinia, E., Dinarvand, R.,** 2007, Evaluation of recombinant phenylalanine dehydrogenase behavior in aqueous two-phase partitioning, *Process Biochemistry*, 42: 1296-1301 pp.
- Mortabit, D., Zyani, M., & Koraichi, S. I.,** 2014, Improvement of olive oil quality of moroccan picholine by *Bacillus licheniformis* enzymes preparation, *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 20: 44-52 pp.
- Mosier, N.S., Hall, P., Ladisch, C.M., Ladisch, M.R.,** 1999, Reaction kinetics, molecular action and mechanisms of cellulolytic proteins, *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 65: 23-40 pp.
- Mostafa, Y.S., Alamri, S.A., Hashem, M., Nafady, N.A., Abo-Elyousr, K.A.M., Mohamed, Z.A.,** 2020, Thermostable cellulase biosynthesis from *Paenibacillus alvei* and its utilization in lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation, *Open Life Science* 15: 185-197 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Murad, H. A., and Azzaz, H. H.,** 2010, Cellulase and dairy animal feeding, *Biotechnology*, 9:238-256 pp.
- Murad, H. H., Hanfy, M. A., Kholif, A. M., Gawad, M. H. A., & Murad, H. A.,** 2009, Effect of cellulases supplementation to some low quality roughages on digestion and milk production by lactating goats, *Journal of Biological Chemistry and Environmental Sciences*, 4: 791-809 pp.
- Murashimaa, K., Nishimuraa, T., Nakamura, Y., Kogaa, J., Moriyab, T., Sumidab, N., Yaguchic, T., Kono, T.,** 2002, Purification and characterization of new endo-1,4- β -D-glucanases from *Rhizopus oryzae*, *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 319-326 pp.
- Myers, F. L., and Northcote, D. H.,** 1959. Partial purification and some properties of a Cellulase from *Helix pomatia*, *Biochemical Journal April*, 71(4): 749-756 pp.
- Nagaraja, V.H., and Iyyaswami, R.,** 2015, Aqueous two phase partitioning of fish proteins: Partitioning studies and ATPS evaluation, *Journal of Food Science and Technology*, 52(6): 3539-3548.
- Najafian, L., Ghodsvali, A., Khodaparast, M. H. H., & Diosady, L. L.,** 2009, Aqueous extraction of virgin olive oil using industrial enzymes, *Food Research International*, 42: 171-175 pp.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H.,** 2009, Partitioning of protease from stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) by aqueous two-phase systems, *Process Biochemistry*, 44: 471-476 pp.
- Narasimha, G., Sridevi, A., Buddolla, V., Subhosh, C., Rajasekhar, R.,** 2006. Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*, *African Journal of Biotechnology*, 5(5): 472-476 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nascimento, C.S., Souza, F.H.M., Masui, D.C., Leone, F.A., Peralta, R.M., Jorge, J.A., and Furriel, R.P.M.,** 2010, Purification and biochemical properties of a glucose-stimulated β -D-glucosidase produced by *Humicola grisea* var. *Thermoidea* grown on sugarcane bagasse, *Journal of Microbiology*, 48: 53-62 pp.
- Nazir, A., Soni, R., Saini, H.S., Manhas, R.K., Chadha, B.S.,** 2009, Purification and characterization of an endoglucanase from *Aspergillus terreus* highly active against barley β -glucan and xyloglucan, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25: 1189-1197 pp.
- Negrete, A., Ling, T. C., Lyddiatt, A.,** 2007, Aqueous two-phase recovery of bio-nanoparticles: A miniaturization study for the recovery of bacteriophage T4, *Journal of Chromatography B*, 854: 13-19 pp.
- Nikolov, T., Bakalova, N., Petrova, S., Benadova, R., Spasov, S., and Kolev, D.,** 2000. An effective method for bioconversion of delignified waste-cellulose fibers from the paper industry with a cellulase complex. *Bioresource Technology*, 71: 1-4 pp.
- Nishida, Y., Suzuki, K-i., Kumagai, Y., Tanaka, H., Inoue, A., Ojima, T.,** 2007, Isolation and primary structure of a cellulase from the Japanese sea urchin *Strongylocentrotus nudus*, *Biochimie*, 89(8): 1002-1011 pp.
- Nydetzky, B., Hayn, M., Maccaron, R., Steiner, W.,** 1993, Synergism of *Trichoderma reesei* cellulases while degrading different celluloses, *Biotechnology Letters*, 151: 71-76 pp.
- Nydetzky, B., Steiner, W., Hayn M, Claeysens, M.,** 1994, Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: A new model for synergistic interaction, *Biochemical Journal*, 298: 705-710 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Odeniyi, O.A., Onilude, A.A., and Ayodele, M.A.,** 2009, Production characteristics and properties of cellulase/ polygalacturonase by a *Bacillus coagulans* strain from a fermenting palm-fruit industrial residue, *African Journal of Microbiology Research*, 3(8): 407-417 pp.
- Ohyima, K., Saka K., Karita, S., Kimura, T.,** 1997, Structure of cellulase and their applications, *Biotechnology and Genetic Engineering Rewievs*, 14: 365-414 pp.
- Okada,H., Tada, K., Sekiya, T., Yokoyama, K., Takahashi, A., Tohda, H., Kumagai, H., and Morikawa Y.,** 1998, Molecular characterization and heterologous expression of the gene encoding a low-molecular-mass endoglucanase from *Trichoderma reesei* QM9414, *Applied and Environmental Microbiology*, 555-563 pp.
- Olajuyigbe, F.M., Nlekerem, C.M., Ogunyewo, O.A.,** 2016. Production and characterization of highly thermostable β -glucosidase during the biodegradation of methyl cellulose by *Fusarium oxysporum*, *Biochemistry Research International*, 1-8 pp.
- Orgaz, B., Kives, J., Pedregosa, A. M., Monistrol, I. F., Laborda, F., & Jose, C. S.,** 2006, Bacterial biofilm removal using fungal enzymes, *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 51-56 pp.
- Pachauri, P., More, S., Aranganathan, V., Deshmukh, S.S.B.,** 2018, Kinetic study and characaterization of cellulase enzyme from isolated *Aspergillus niger subsp. awamori* for cellulosic biofuels, *Journal of Scientific & Industrial Research*, 77: 55-60 pp.
- Pardo, A.G., and Forchiassin, F.,** 1999, Influence of temperature and pH on cellulase activity and stability in *Nectria catalinensis*, *Revista Argentina de Microbiologia*, 31(1):31-35 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Payne, C.M., Knott B.C., Mayes, H.B., Hansson, H., Himmel, M.E., Sandgren, M., Ståhlberg, J., Beckham, G.T.,** 2015, Fungal cellulases, *Chemical Reviews*, 115: 1308-1448 pp.
- Pazarlıoğlu, N. K., Saruşık, M., & Telefoncu, A.,** 2005, Treating denim fabrics with immobilized commercial cellulases, *Process Biochemistry*, 40: 767–771 pp.
- Pei, Y., Li, Z., Liu, L., Wang, J.,** 2012, Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems formed by imidazolium ionic liquid and dipotassium hydrogen phosphate, *Journal of Chromatography A*, 1231: 2-7 pp.
- Pei, Y., Wang, J., Wu, K., Xuan X., Lu, X.,** 2009, Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction of selected proteins, *Seperation and Purification Technology*, 64(3): 288–295 pp.
- Peng, J., Wang W., Jiang Y., Liu M., Zhang H., Shao W.,** 2011. Enhanced soluble expression of a thermostable cellulose from *Colstridium thermocellum* in *Escherichia coli*, *Current Microbiology*, 63: 523-530 pp.
- Pereira, J.C., Alonso, D., Martins, B., Gomes, E., Silva, R.,** 2015, Production and characterization of β -glucosidase obtained by the solid-state cultivation of the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae*, N31. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175: 723-732 pp.
- Pérez, J., and Muñoz-Dorado, J.,** 2002, Biodegradation and biological Treatments of cellulose, hemicellulose and Lignin: An Overview. *International Microbiology*, 5: 53-63 pp

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Peshin, A., and Mathur, J.M.S.,** 1999, Purification and characterization of β -glycosidase from *Aspergillus niger* strain 322, *Letters in Applied Microbiology*, 28: 401-404 pp.
- Picó, G., Romanini, D., Nerli, B., Farruggia, B.,** 2006, Polyethyleneglycol molecular mass and polydispersivity effect on protein partitioning in aqueous two-phase systems, *Journal of Chromatography B*, 830: 286-292 pp.
- Pilar, M.R., and Rafael, S.N.D.,** 2004, “Enzymatic composition for improving the quality of bread and pastry doughs, WO 2004084638 A1”, <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2004084638> , (Erişim tarihi: 30 Haziran 2021).
- Pirich . C.L., Picheth, G.F., Fontes, A. M., Delgado-Aguilar, M., Ramos, L.P.,** 2020, Disruptive enzyme-based strategies to isolate nanocelluloses: A review, *Cellulose*, 27: 5457-5475 pp.
- Platis, D., and Labrou, N.,** 2009, Application of a PEG/salt aqueous two-phase partition system for the recovery of monoclonal antibodies from unclarified transgenic tobacco extract, *Biotechnology Journal*, 4(6):1320 pp.
- Pol, D., Laxman, R.S., Rao, M.,** 2012, Purification and biochemical characterization of endoglucanase from *Penicillium pinophilum* MS 20. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 49: 189-194 pp.
- Porto, T.S., e Silva, G.M..M., Porto, C.S., Cavalcanti, M.T.H., B.B. Neto, B.B., Lima-Filho, J.L., Converti, A., Porto, A.L.F., Pessoa Jr., A.,** 2008, Liquid–liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system, *Chemical Engineering and Processing*, 47: 716–721 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Porto, T.S., Pessoa-Filho, P.A., Neto, B.B., Filho, J.L.L., Attilio Converti, A., Porto, A.L.F., Pessoa Jr, A.,** 2007, Removal of proteases from *Clostridium perfringens* fermented broth by aqueous two-phase systems (PEG/citrate), *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(8): 547-552 pp.
- Prates, È.T., Stankovic, I., Silveira, R.L., Liberato, M.V., Fla'vio Henrique-Silva, F.H., Jr., N.P., Igor Polikarpov, I., Skaf, M.S.,** 2013, X-ray structure and molecular dynamics simulations of endoglucanase 3 from *Trichoderma harzianum*: Structural organization and substrate recognition by endoglucanases that lack cellulose binding module, *PLoS ONE* 8(3): e59069.
- Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J.,** 2011, Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants, *Trends in Biotechnology*, 30: 7–44 pp.
- Qin, L., Li, W.-C., Liu, L., Zhu, J.-Q., Li, X., Li, B.-Z., Yuan, Y.-J.,** 2016, Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase, *Biotechnology for Biofuels*, 9: 70 pp.
- Qing, Q., Yang, B., Wyman, C.E.,** 2010, Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes, *Bioresource Technology*, 101: 9624–9630 pp.
- Rabelo, A.P.B., Tambourgi, E.B., Pessoa Jr., A.,** 2004, Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO–PPO–PEO block copolymers, *Journal of Chromatography B*, 807: 61-68 pp.
- Raja, S., Murty, V.R., Thivaharan, V., Rajasekar, V., Ramesh, V.,** 2011, Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules – A Review, *Science and Technology*, 1(1): 7-16 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rajoka, M. I., and Malik, K. A.,** 1997, Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultured in media containing different cellulosic substrates, *Bioresource Technology*, 59: 21-27 pp.
- Rämsch, C., Kleinlanghorst, L.B., Knieps, E.A., Thömmes, J., and Kula, M.R.,** 1999, Aqueous two-phase systems containing ürea: Influence on phase separation and stabilization of protein conformation by phase components, *Biotechnology Progress*, 15: 493-499 pp.
- Ranalli, A., Malfatti, A., Lucera, L., Contento, S., & Sotiriou, E.,** 2005, Effects of processing techniques on the natural colourings and the other functional constituents in virgin olive oil, *Food Research International*, 38: 873-878 pp.
- Rastogi, G., Bhalla, A., Adhikari, A., Bischoff K. M., Hughes, S. R., Christopher L. P., Sani R. K.,** 2010, Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresource Technology*, 10: 8798-8806 pp.
- Ratanapongleka, K.,** 2010, Recovery of biological products in aqueous two phase systems, *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 1: 2pp.
- Ratanapongleka, K.,** 2012, Partitioning behavior of laccase from *Lentinus polychrous* Lev in aqueous two phase systems, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 34(1): 69-76 pp.
- Reese, E.T., and Mandels, M.,** 1957, Chemical inhibition of cellulases and B-glucosidases, *Res. Rept. Pioneering Res. Div., QMRE Center, Natick, Mass., Microbial. Ser.* 17: 60 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rehman, F.U., Aslam, M., Tariq, M.I., Shaheen, A., Sami, A.J., Naveed, N.H., and Batool, A.I.,** 2009, Isolation of cellulolytic activities from *Tribolium castaneum* (red flour beetle), *African Journal of Biotechnology* ,8(23): 6710-6715 pp.
- Riou, C., Salmon, J.M., Vallier, M.J., Günata, Z., and Barre1, P.,** 1998, Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3607-3614 pp.
- Rito-Palomares, M.,** 2004, Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products, *Journal of Chromatography B*, 807: 3-11 pp.
- Rodhe, A. V., Sateesh L., Sridevi J., Venkateswarlu B., And Rao L. V.,** 2011, Enzymatic hydrolysis of sorghum straw using native cellulose produced by *T. reesei* NCM 992 under solid state fermentation using rice straw, *3 Biotech*, 1(4): 207-215 pp.
- Røjel, N., Kari, J., Sørensen, T.H., Borch, K., Westh, P.,** 2019, pH profiles of cellulases depend on the substrate and architecture of the binding region, *Biotechnology and Bioengineering*, 117: 382–391 pp.
- Romaniec, M. P. M., Fauth U., Kobayashi, T., Huskisson, N., S., Patrick J., Demain Arnold L.,** 1992, Purification and characterization of a new endoglucanase from *Clostridium thermocellum*, *Biochemical Journal*, 283: 69-73 pp.
- Roobol-Bóza, M., Dolby, V., Doverskog, M., Barrefelt, Å., Lindqvist, F., Oppermann, U.C., Alstine, K.K.V., Tjerneld, F.,** 2004, Membrane protein isolation by in situ solubilization, partitioning and affinity adsorption in

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

aqueous two-phase systems: Purification of the human type 1 11β -hydroxysteroid dehydrogenase, *Journal of Chromatography A*, 1043: 217-223 pp.

Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J.K.C., Jones, T.A., 1990, Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*, *Science*, 249: 380-386 pp.

Saharay, M., Guo, H., Smith, J.C., 2010, Catalytic mechanism of cellulose degradation by a cellobiohydrolase, CelS, *PLoS ONE*, 5(10): e12947.

Salabat, A., 2001, The influence of salts on the phase composition in aqueous two-phase systems: experiments and predictions, *Fluid Phase Equilibria*, 187(188): 489-498 pp.

Salabat, A., 2006, Prediction of liquid-liquid phase diagrams of aqueous salt + PEG systems using a thermodynamic model, *Computer Coupling of Phase Diagrams and Thermochemistry*, 30: 296-300 pp.

Sami, A.J., and Shakoori, A.R., 2007, Extracts of plant leaves have inhibitory effect on the cellulase activity of whole body extracts of insects – a possible recipe for bioinsecticides, *Proceedings Pakistan Congress of Zoology*, 27: 105-118 pp.

Sandgren, M., Shaw, A., Ropp, T.H., Wu, S., Bott, R., Cameron, A.D., Ståhlberg, J., Mitchinson, C., Jones, T.A., 2000, The X-ray crystal structure of the *Trichoderma reesei* family 12 endoglucanase 3, Cel12A, at 1.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 308: 295-310 pp.

Sandgren, M., Jerry Ståhlberg, J., Mitchinson, C., 2005, Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: Improved thermal stability,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

and ligand complexes, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 89: 246-291 pp.

Sankarraj, N., and Nallathambi, G., 2017, Effect of biopolishing on structural degradation and physical properties of cellulose, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 82(0): 1-12 pp.

Saravanan, S., Rao, J.R., Nair, B.U., Ramasami, T., 2008, Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)–poly(acrylic acid) system for protein partitioning: Influence of molecular weight, pH and temperature, *Process Biochemistry*, 43: 905-911 pp.

Sarubbo, L.A., de Oliveira, L.A., Porto, A.L.F., de Campos-Takaki, G.M., Tambourgi, E.B., 2004, Partition of proteins in aqueous two-phase systems based on cashew-nut tree gum and poly(ethylene glycol), *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47: 685-691 pp.

Schmidt, A.S., Andrews, B.A., and Asenjo, J.A., 1995, Correlations for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: Effect of overall protein concentration, *Biotechnology and Bioengineering*, 50: 617-626 pp.

Schmidt, A.S., Ventom, A.M., and Asenjo, J.A., 1994, Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase systems, *Enzyme and Microbial Technology*, 16(2): 131-142 pp.

Schwarz, W. H., 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 634-649 pp.

Selber, K., Tjerneld, F., Collén, A., Hyytiä, T., Nakari-Setälä, T., Michael Bailey, M., Fagerström, R., Kan, J., van der Laan, J., Penttilä, M., Kula, M.-R., 2004, Large-scale separation and production of engineered proteins,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

designed for facilitated recovery in detergent-based aqueous two-phase extraction systems, *Process Biochemistry* 39: 889-896 pp.

Selby, K., and Maitland, C.C., 1967, Separation of the components involved in the solubilization of cotton. *Biochemical Journal*, 104: 716-724 pp.

Shanmughapriya, S., Kiran, G. S., Selvin, J., Thomas, T. A., And Rani, C., 2010, Optimization, purification, and characterization of extracellular mesophilic alkaline cellulase from sponge-associated *Marinobacter sp.* MSI032, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162: 625-640 pp.

Shariarinour, M., Wahab, M. N. A., Mohamad, R., Mustafa, S., Arif A. B., 2011, Cyanobacterial biomass as N-supplement to Oil Palm Empty Fruit Bunch (OPEFB) fibre for improvement of cellulase production by *Aspergillus terreus* in submerged fermentation, *BioResources*, 6(3): 2663-2675 pp.

Sharma, R., and Sharma, P.C., 2007, Optimization of enzymatic pretreatments for maximizing olive oil recovery, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 66: 52-55 pp.

Sharma, R., Sharma, P.C., Rana, J.C. & Joshi, V.K., 2015, Improving the olive oil yield and quality through enzyme-assisted mechanical extraction, antioxidants and packaging, *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(2): 157-166 pp.

Sharma, S., Vaid, S., Bhat, B., Singh, S., Bajaj, B.K., 2019, Thermostable enzymes for industrial biotechnology, *Advances in Enzyme Technology*, 469-495 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shoseyov, O., and Bravdo, B.,** 2001, Enhancement of aroma in grapes and wines: Biotechnological approaches, *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine*, 225-240 pp.
- Shrivastava, B., Thakur, S., Khasa, Y. P., Gupte, A., Puniya, A. K., & Kuhad, R. C.,** 2011, White-rot fungal conversion of wheat straw to energy rich cattle feed, *Biodegradation*, 22: 823-831 pp.
- Silva, M.E., and Franco, T.T.,** 2000, Liquid-liquid extraction of biomolecules in downstream processing - A review paper, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 17(1)pp.
- Singh, A., Kuhad, R.C., & Ward, O.P.,** 2007, Industrial application of microbial cellulases, *Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects*, I. K. International Publishing House, New Delhi, India, 345-358 pp.
- Singh, A., Singh, N., Bishnoi, N. R.,** 2009, Production of cellulases by *Aspergillus heteromorphus* from wheat straw under submerged fermentation, *International Journal of Civil and Environmental Engineering*, 1(1): 23-26 pp.
- Singh, J., Batra, N., and Sobti, R. C.,** 2004. Purification and characterisation of alkaline cellulase produced by a novel isolated, *Bacillus sphaericus* JS1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31: 51-56 pp.
- Sinnott, M.L.,** 1990, Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer, *Chemical Reviews*, 90: 1171–1202 pp.
- Sivaramanan, S.,** 2014, Biodegradation of saw in plant fertilizer, *Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences*, 2(2): 13-19 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Sivars, U., and Tjerneld, F., 2000, Mechanisms of phase behavior and protein partitioning in detergent/ polymer aqueous two-phase systems for purification of integral membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1474: 133-14 pp.

Sivars, U., Abramson, J., Iwata, S., Tjerneld, F., 2000, Affinity partitioning of a poly(histidine)-tagged integral membrane protein, cytochrome *bo₃* ubiquinol oxidase, in a detergent–polymer aqueous two-phase system containing metal-chelating polymer, *Journal of Chromatography B*, 743: 307-316 pp.

Snyder, S.M., Cole, K.D., Szaig, D.C., 1992, Phase compositions, viscosities and densities for aqueous two phase systems composed of polyethylene glycol and various salts at 25° C, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 37: 268-274 pp.

Spelzini, D., Farruggia, B., Picó, G., 2005, Features of the acid protease partition in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol–phosphate: Chymosin and pepsin, *Journal of Chromatography B*, 821(1): 60-66 pp.

Sriariyanun, M., Tantayotai, P., Yasurin, P., Pornwongthong, P., Cheenkachorn K., 2016, Production, purification and characterization of an ionic liquid tolerant cellulase from *Bacillus sp.* isolated from rice paddy field soil, *Electronic Journal of Biotechnology*, 19: 23-28 pp.

Srinivas, N.D., Barhate, R.S., Raghavarao, K.S.M.S., 2002, Aqueous two-phase extraction in combination with ultrafiltration for downstream processing of *Ipomoea* peroxidase, *Journal of Food Engineering*, 54: 1-6 pp.

Srinivas, N.D., Rashmi, K.R., Raghavarao, K.S.M.S., 1999, Extraction and purification of a plant peroxidase by aqueous two-phase extraction coupled with gel filtration, *Process Biochemistry*, 35: 43-48 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sripokar, P., Chaijan, M., Benjakul, S., Yoshida, A., Klomklao, S.,** 2017, Aqueous two-phase partitioning of liver proteinase from albacore tuna (*Thunnus alalunga*): Application to starry triggerfish (*Abalistes stellaris*) muscle hydrolysis, *International Journal of Food Properties*, 20(2): 1600-1612 pp.
- Su, C.-K., and Chiang B.H.,** 2006, Partitioning and purification of lysozyme from chicken egg white using aqueous two-phase system, *Process Biochemistry*, 41(2): 257-263 pp.
- Su, E., Xia, T., Gao, L., Dai, Q., & Zhang, Z.,** 2010, Immobilization of β -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage, *Food and Bioproducts Processing*, 88: 83-89 pp.
- Sukumaran, R., Singhania, P. R., Pandey, A.,** 2005, Microbial cellulase-production, applications and challenges, *Journal of Scientific & Industrial Research*, 64: 832-844 pp.
- Talekar, S., Ghodake, V., Chavare, S., Ingrole, R., Kate, A., Magdum, S., Pillai, M.,** 2011, Production and characterization of cellulase by local fungal isolate of India using Water Hyacinth as carbon source and reuse of fungal biomass for dye degradation, *International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST)*, 3(4) pp.
- Tangu, S. K., Blanch, H. W., Wilke, C. R.,** 1981. Enhanced production of cellulase, hemicellulase, and β -glucosidase by *Trichoderma reesei* (Rut C-30), *Biotechnology and Bioengineering*, 23: 1837-1849 pp.
- Tao, Y.M., Zhu, X.Z., Huang, J.Z., Ma, S.J., Wu, X.B., Long, M.N., Chen, Q.X.,** 2010, Purification and properties of endoglucanase from a sugar cane bagasse hydrolyzing strain, *Aspergillus glaucus* XC9, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 26:58(10): 6126-6130 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Teeri, T. T.**, 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases, *Trends in Biotechnology*, 15: 160-167 pp.
- Tejirian, A., and Xu, F.**, 2010, Inhibition of cellulase-catalyzed lignocellulosic hydrolysis by iron and oxidative metal ions and complexes. *Applied Environmental Microbiology*, 76: 7673-7682 pp.
- Telefoncu, A.**, 1986, Enzimolojinin Prensbileri, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji (Yaz Okulu). Editör: A. Telefoncu, 18s.
- Telefoncu, A.**, 1996, Protein Saflaştırma Stratejisi ve Amacı, Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (Yaz Okulu), Editör A. Telefoncu, 18s.
- Terri, T.T.**, 1997, Crystalline cellulose degradation: a new insight into the function of cellobiohydrolases, *Tibtech.*, 15: 160-167 pp.
- Thebti, W., Riahi, Y., Gharsalli, R., and Belhadj, O.**, 2016, Screening and characterization of thermo-active enzymes of biotechnological interest produced by thermophilic *Bacillus* isolated from hot springs in Tunisia, *Polish Bichemical Society*, 63: (3) pp.
- Tjerneld, F., Persson, I., Albertsson, P-Å., and Hahn-Hägerdal, B.**, (1985a), Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. I, partition of cellulases from *Trichoderma reesei*. *Biotechnology and Bioengineering*, 27: 1036-1043 pp.
- Tjerneld, F., Persson, I., Albertsson, Per-Åke, Hahn-Hagerdal, B.**, 1985, Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. I. partition of cellulases from *Trichoderma reesei*, *Biotechnology and Bioengineering*, 27(7): 1036-1043 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Toghueo, R.M.K., Ejiya, I.E., Sahal, D., Yazdani, S.S., and, Boyom, F.F., 2017,** Production of cellulolytic enzymes by endophytic fungi isolated from Cameroonian Medicinal Plants, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(2): 1264-1271 pp.
- Tolan, J.S., and Foody, B., 1999.** Cellulases from submerged fermentation, *Advanced Biochemistry and Engineering/Biotechnology*, 65: 41-67 pp.
- Tomme, P., Warren, R.A.J., and Gilkes, N.R., 1995.** Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi, *Advanced Microbiology and Physiology*, 37: 1-81 pp.
- Topuz, U., Kıran, Ö. E., Çömelekçioğlu, U., 2007.** Selülaaz üreticisi *Bacillus* suşlarının enzimatik özelliklerinin araştırılması, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 10(2):13-16 pp.
- Trindade, I.P., Diogo, M.M., Prazeres, D.M.F., Marcos, J.C., 2005,** Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1082(2): 176-184 pp.
- Trinh, D.K., Quyen, D.T., Do, T.T., Nghiem, N.M., 2013,** Purification and characterization of a novel detergent- and organic solvent-resistant endo-beta-1,4-glucanase from a newly isolated basidiomycete *Peniophora sp.* NDVN01, *Turkish Journal of Biology (TÜBİTAK)*, 37: 377-384 pp.
- Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C. R. K., and Jha, B., 2011a,** Solvent tolerant marine bacterium *Bacillus aquimaris* secreting organic solvent stable alkaline cellulase, *Chemosphere*, 83: 706-712 pp.
- Tswiio, T.T., Rugchati, O., Premjet, D., and Aeksiri, N., 2017,** Application of an aqueous two-phase technique for extraction of papain from *Carica Papaya*

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

latex, *International Journal of Advances in Chemical Engineering & Biological Sciences (IJACEBS)*, 4:(1) pp.

URL-7., “Cellulase enzyme structure”, (Erişim tarihi: 08 Mayıs 2021), https://www.google.com.tr/search?q=Cellulase+enzyme+structure&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj5kcq8kuDTAhUF1ywKHYMoDyQQ_AUICigB&biw=1366&bih=672#imgdii=Di7vrpuIPjFFOM:&imgsrc=2FnHEtRYu8p x2M

Usami, S., Kirimura, K., Imura, M., Morikawa, S., 1990. Cellular localization of the constitutive β glucosidase in *Trichoderma viride*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70: 185-187 pp.

Uslan, A.A., 1997, Enzimlerin etki mekanizmaları ve aktif merkez tayini, Enzimoloji (Yaz Okulu), Editör: A. Telefoncu, 30s.

Ülger, C., ve Sağlam, N., 2001, Partitioning of industrial cellulase in aqueous two-phase systems from *Trichoderma viride* QM9414, *Process Biochemistry*, 36: 1075-1080 pp.

Vaidya, B.K., Suthar, H.K., Kasture, S., Nene, S., 2006, Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueous twophase system, *Biochemical Engineering Journal*, 28(2): 161-166 pp.

Vaillant, F., Millan, A., Dornier, M., Decloux, M., & Reynes, M., 2001, Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using cross flow microfiltration, *Journal of Food Engineering*, 48: 83–90 pp.

Vazquez, M.A., 2018. “Aqueous two-phase systems: Properties, functions and advantages”, <https://www.researchgate.net/publication/325153679> (Erişim tarihi: 28 Ekim 2019).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Waghmare, P.R., Kshirsagar, S.D., Saratale, R.G., Govindwar, S.P., and Saratale, G.D., 2014, Production and characterization of cellulolytic enzymes by isolated *Klebsiella sp.* PRW-1 using agricultural waste biomass, *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26(1): 44-59 pp.

Walker, S.G., Lyddiatt, A., 1998, Aqueous two-phase systems as an alternative process route for the fractionation of small inclusion bodies, *Journal of Chromatography B*, 711: 185–194 pp.

Wang, J., Gao, G., Li, Y., Yang, L., Liang, Y., Jin, H., Han, W., Feng, Y., and Zhang Z., 2015, Cloning, expression, and characterization of a thermophilic endoglucanase, AcCel12B from *Acidothermus cellulolyticus* 11B, *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 25080-25095 pp.

Wang, J., Hua, B., Wang, X., and Cui, Z., 2017, Characteristics of cellulase in cellulose-degrading bacterium strain *Clostridium straminisolvans* (CSK1), *African Journal of Microbiology Research*, (10): 414-421 pp.

Watanabe, T., Sata, T., Yoshioka, S., Koshijima, T., Kuwahara, M., 1992, Purification and properties of *Aspergillus niger* β -glucosidase. *European Journal of Biochemistry*, 209: 651-659 pp.

Watanabe, H., and Tokuda.,G., 2001, Animal cellulases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 1167-1178 pp.

Watanabe, H., Noda, H., Tokuda, G., Lo, N., 1998, A cellulase gene of termite origin, *Nature*, 394: 330–331 pp.

Wilkins, M. R., Widmer, W. W., Grohmann, K., & Cameron, R. G., 2007, Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. *Bioresource Technology*, 98: 1596–1601 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Williamson, G., Belshaw, N.J., & Williamson, M.P.,** 1992, O-glycosylation in *Aspergillus* glucoamylase, conformation and role in binding, *Biochemical Journal*, 287(2): 423-428 pp.
- Wolfenden, R., & Snider, M.J.,** 2001, The depth of chemical time and the powder of enzyme as catalysts, *Accounts of Chemical Research*, 34(12): 938-945 pp.
- Wong, Y.S., Fincher, G.B., and Maclachlan, G.A.,** 1977, Kinetic properties and substrate specificities of two cellulases from auxin-treated pea epicotyls, *The Journal Of Biological Chemistry*, 252(4): 1402-1407 pp.
- Wood, T.M., and McCrae, S.I.,** 1978, The cellulase of *Trichoderma koningii*. Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase, *Biochemical Journal*, 171(1): 61-72 pp.
- Woodward, J., Lima, M., Lee, N.E.,** 1988, The role of cellulase concentration in determining the degree of synergism in the hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Biochemical Journal*, 255: 895-899 pp.
- Wu, X., Liang, L., Zou, Y., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Yang, L.,** 2011, Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.), *Food Chemistry*, 129: 443-453 pp.
- Wu, Y.T., Pereira, M., Venâncio, A., Teixeira, J.,** 2000, Recovery of endopolygalacturonase using polyethylene glycol-salt aqueous two-phase extraction with polymer recycling, *Bioseparation*, 9: 247-254 pp.
- Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., Ladisch, M.,** 2011, Deactivation of cellulases by phenols, *Enzyme and Microbial Technology*, 48: 54–60 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Xu, Q., Luo, Y., S.Y., Ding, Himmel, M.E., Bu, L., Lamed, R., Bayer, E.A.,** 2011, Multifunctional Enzyme Systems for Plant Cell Wall Degradation, *Comprehensive Biotechnology* (Second Edition), 3: 15-25 pp.
- Yan H., Dai Y., Zhang Y., Yan L., Liu D.,** 2011, Purification and characterization of an endo-1,4- β -glucanase from *Bacillus cereus*, *African Journal of Biotechnology*, 10(72): 16277-16285 pp.
- Yasmin, S., Mattoo ,R. L., and Nehvi, F. A.,** 2013, Isolation, characterization and molecular weight determination of cellulase from *Trichoderma viride*, *African Journal of Biotechnology*, 12(28): 4512-4518 pp.
- Yazdi, M.T., Woodward, J.R., and Radford, A.,** 1990, The cellulase complex of *Neurospora crassa*: activity, stability and release, *Journal of General Microbiology*, 136: 1313-1319 pp.
- Yue, H., Yuan, Q., Wang, W.,** 2007, Purification of phenylalanine ammonia-lyase in PEG1000/Na₂SO₄ aqueous two-phase system by a two-step extraction, *Biochemical Engineering Journal*, 37: 231- 237 pp.
- Yurdugul, S., Pancevska, N. A., Yildiz, G. G., & Bozoglu, F.,** 2012, The influence of a cellulase bearing enzyme complex from anaerobic fungi on bread staling, *Romanian Agricultural Research*, 29: 271–279 pp.
- Yuzugullu Karakus, Y., Isik, S.,** 2019, Partial characterization of *Bacillus pumilus* catalase partitioned in poly(ethylene glycol)/sodium sulfate aqueous two-phase systems, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 49(4): 391-399 pp.
- Yücekan, İ., Önal, S.,** 2011, Partitioning of invertase from tomato in poly(ethylene glycol)/sodium sulfate aqueous two-phase systems, *Process Biochemistry*, 46: 226-232 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zainudin, M.H.M., Mustapha, N.A., Hassan, M.A., Bahrin, E.K., Tokura, M., Yasueda, H., & Shirai, Y.,** 2019, A highly thermostable crude endoglucanase produced by a newly isolated *Thermobifida fusca* strain UPMC 901, *Scientific Reports*, 9: 13526 pp.
- Zeng, J., Gao, X., Dai, Z., Tang, B., Tang, X.F.,** 2014, Effects of metal ions on stability and activity of hyperthermophilic pyrolysin and further stabilization of this enzyme by modification of a Ca²⁺-binding site, *Applied Environmental Microbiology*, 80: 2763–2772 pp.
- Zhai, S.L., Luo, G.S., Liu, J.G.,** 2001, Selective recovery of amino acids by aqueous two-phase electrophoresis, *Chemical Engineering Journal*, 83: 55-59 pp.
- Zhang, Y.-H. P., Himmel, M. E., Mielenz, J. R.,** 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies, *Biotechnology Advances*, 24: 452–481 pp.
- Zhang, Y.-H.,P., Lynd, L. R.,** 2004, Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems, *Biotechnology and Bioengineering*, 88: 797-824 pp.
- Zheng, W., Schingoethe, D. J., Stegeman, G. A., Hippen, A. R., & Treacher, R. J.,** 2000, Determination of when during the lactation cycle to start feeding a cellulase and xylanase enzyme mixture to dairy cows, *Journal of Dairy Science*, 83: 2319–2325 pp.
- Zhou, J., Wang, Y-H., Chu, J., Zhuang, Y-P., Zhang, S-L., Peng, Y.,** 2008, Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride* T 100-14, *Bioresource Technology*, 99(15): 6826-6833 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zhu, C., Xu, Z., Song, R., 2011, The endoglucanase from *Bacillus subtilis* BEC-1 bears halo-tolerant, acidophilic and dithiothreitol-stimulated enzyme activity, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27: 2863–2871 pp.

Zihnioğlu, F., 1996, Elektroforetik yöntemler, Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (Yaz Okulu), Editör A. Telefoncu, 150 s.

Zuorroa, A., Fidaleob, M., & Lavecchiaa, R., 2011, Enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste, *Enzyme and Microbial Technology*, 49: 567–573 pp.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamın her aşamasında kıymetli görüşlerinden, desteğinden ve yardımından yararlandığım danışmanım Sayın Prof. Dr. Seçil ÖNAL'a, Biyokimya bölümü öğretim elemanlarına ve bölüm asistanlarından Arş. Gör. Dr. Umut MENGÜLLÜOĞLU'na, desteklerini esirgmeden her an yanımda olup güç veren değerli aileme ve çalışmamın her aşamasında desteklerini hissettiğim değerli arkadaşlarım Dilay SEVER'e, Tuba TULUÇ'a ve Ufukcan DORUK'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

02/ 08/ 2021

Yeliz TÜRKEKEL

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Yeliz TÜRKEKEL

Yabancı Dil: İngilizce

Eğitim Durumu: İlköğretim eğitimini Halıdere/ Kocaeli Halıdere İlkokulunda, orta eğitimini Halıdere Ortaokulunda ve lise eğitimini ise Gölcük Atatürk Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2017 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümünden Biyokimyager olarak mezun oldu.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında (Proceedings) Basılan Bildiriler:

Abi, N., Özçelik, Y., Türkel, Y., Önal, S., "Extraction and purification of black mulberry anthocyanins with aqueous-two phase extraction (ATPE) system", IV. International Conference on Engineering and Natural Sciences, ICENS 2018 Kiev/UKRAYNA 2-6 May 2018.