

T.C.
SİİRT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KSİLANDAN KSİLOOLİGOSAKKARİT ÜRETİMİ İÇİN *NEOCALLIMASTIX*
PATRICIARUM KSİLANAZIN KARBOKSİLE ÇOK DUVARLI KARBON
NANOTÜPLER İLE İMMOBİLİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Buşra ATALAY
(173108003)

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Yakup ASLAN

Şubat, 2019
SİİRT

TEZ KABUL VE ONAYI

Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Buşra ATALAY tarafından hazırlanan “Ksilandan Ksilooligosakkarit Üretimi için *Neocallimastix patriciarum* Ksilanazın Karboksile Çok Duvarlı Karbon Nanotüpler ile İmmobilizasyonu” adlı tez çalışması 01/02/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Ender Sinan POYRAZOĞLU

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Yakup ASLAN

Üye

Prof. Dr. İsa CAVİDOĞLU

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.



Doç. Dr. Fevzi HANSU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması Siirt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2018-SİÜFEB-19 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yapılan bu tez çalışmasında Neocallmestix patriciarum ksilanaz (NPX) enzimi karboksile çok duvarlı karbon nanotüpler (c-MWCNT) üzerine immobilize edilmiş ve aynı enzim ksilooligosakkarit üretiminde kullanılmıştır.

Öncelikle tez çalışmalarım boyunca benden bilgi, beceri ve deneyimlerini esirgemeyen sayın,Dr. Öğretim Üyesi Yakup ASLAN'a teşekkür ederim.

İkinci olarak yüksek lisans öğrenimim boyunca her türlü desteğini ve önerilerini sunmaktan kaçınmayan Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü sayın, Doç. Dr. Fevzi HANSU'ya teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Daha sonra yüksek lisansöğrenimim boyunca maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca beni yalnız bırakmayıp bilimsel anlamda bana katkı sağlayan gerek bölüm hocalarım gerekse bölüm dışındaki değerli hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Buşra ATALAY
SİİRT-2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

iii

ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLOLAR LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Ksilan	3
2.2. Ksilanın Enzimatik Hidrolizi	3
2.3. Ksilandan XOS Üretimi	5
2.4. Enzim İmmobilizasyonu	6
2.4.1. Enzim immobilizasyon metotları	8
2.4.1.1. Adsorpsiyon	8
2.4.1.2. Entrapment (Hapsetme)	8
2.4.1.2.1. Enzimlerin kalsiyum alginat ile immobilizasyonu	9
2.4.1.3. Çapraz bağlama.....	10
2.4.1.4. Kovalent bağlama	11
2.5. Enzim immobilizasyon Matriksi Olarak Karbon Nano Tüpler (CNT)	11
2.6. c-MWCNT ile İlgili Enzim İmmobilizasyonu Çalışmaları.....	11
2.7. NPX'in İmmobilizasyonu ile İlgili Çalışmalar	14
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1. Materyaller	15
3.2. Metotlar	15
3.2.1. c-MWCNT'ler ile NPX immobilizasyonu	15
3.2.2. Protein (enzim) tayini	16
3.2.3. NPX aktivitesinin tayini	16
3.2.4. İmmobilizasyon ve aktivite verimlerinin hesaplanması	16
3.2.5. İmmobilizasyon şartlarının optimizasyonu	17
3.2.4.1. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon etkinliğine etkisi ..	17
3.2.4.2. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi	18
3.2.4.3. Matriks miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisi.....	18
3.2.4.4. İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon etkinliğine etkisi	19
3.2.5. Serbest ve immobilize NPX'in karakterizasyonu.....	19
3.2.5.1. Optimum pH tayini	19
3.2.5.2. Optimum sıcaklık tayini.....	19
3.2.5.3. pH kararlılığının tayini.....	20
3.2.5.4. Isıl kararlılık tayini.....	20
3.2.5.5. Kinetik sabitlerin tayini	20
3.2.5.6. İmmobilize NPX'in kullanım kararlılığı	21
3.2.5.7. İmmobilize NPX'in depolama kararlılığı.....	21
3.2.6. İmmobilize NPX kullanılarak ksilandan XOS üretimi.....	21
3.2.6.1. Ksilan derişiminin XOS verimine etkisi	21
3.2.6.2. İmmobilize NPX miktarının XOS verimine etkisi	21
3.2.6.3. Hidroliz süresinin XOS verimine etkisi	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	23
4.1. Protein (Enzim) Tayini.....	23
4.2. NPX Aktivitesinin Tayini	23

4.3. İmmobilizasyon Şartlarının Optimizasyonu	23
4.3.2. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon etkinliğine etkisi.....	23
4.3.3. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi	23
4.3.4. Matriks miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisi	24
4.3.5. İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon etkinliğine etkisi	25
4.4. Serbest ve İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu	25
4.4.1. Optimum pH tayini.....	25
4.4.2. Optimum sıcaklık tayini	25
4.4.3. pH kararlılığının tayini	26
4.4.4. Isıl kararlılık tayini	27
4.4.5. Kinetik sabitlerinin tayini	27
4.4.6. İmmobilize NPX'in kullanım kararlılığı	28
4.4.7. İmmobilize NPX'in depolama kararlılığı.....	28
4.5. İmmobilize NPX Kullanılarak Ksilandan Ksilooligosakkarit Üretimi	29
4.5.1. Ksilan derişiminin XOS verimine etkisi.....	29
4.5.2. İmmobilize NPX miktarının XOS verimine etkisi	29
4.5.3. Ksilan hidroliz süresinin XOS verimine etkisi	29
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	31
5.1. Sonuçlar.....	31
5.2. Öneriler	31
6. KAYNAKLAR	32
ÖZGEÇMİŞ	36

TABLULAR LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Adsorbsiyonla immobilizasyonda kullanılan adsorbentler.....	9
Tablo 2.2. SWCNT ve MWCNT'nin karşılaştırılması.....	12
Tablo 4.1. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon etkinliğine etkisi	24
Tablo 4.2. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi....	24
Tablo 4.3. c-MWCNT miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisi.....	25



ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Xylan'ın yapısı ve bozunmasına katılan ksilanolitik enzimler	4
Şekil 2.2. Ksilandan enzimatik hidroliz ile XOS üretimi	6
Şekil 2.3. Enzim immobilizasyon metotları	9
Şekil 2.4. Alginat polimerlerinin molekül yapısı	10
Şekil 2.5. Karbon nanotüplerin üç boyutlu yapıları.....	11
Şekil 2.6. c-MWCNT ile enzim immobilizasyonu	12
Şekil 3.1. BSA standart grafiği	17
Şekil 3.2. Ksiloz standart grafiği	17
Şekil 4.1. Serbest ve immobilize NPX'in aktivitesine pH'nın etkisi.....	26
Şekil 4.2. Serbest ve immobilize NPX'in aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	26
Şekil 4.3. Serbest ve immobilize NPX'in kararlılığına pH'ın etkisi	27
Şekil 4.4. Serbest ve immobilize NPX'in kararlılığına sıcaklığın etkisi.....	27
Şekil 4.5. Serbest ve immobilize NPX'in Lineweaver-Burk grafiği	28
Şekil 4.6. İmmobilize NPX'in kullanım kararlılığı.....	29
Şekil 4.7. İmmobilize NPX'in depolama kararlılığı	29
Şekil 4.8. Ksilan derişiminin XOS verimine etkisi	30
Şekil 4.9. İmmobilize NPX miktarının XOS verimine etkisi	30
Şekil 4.10. Ksilan hidroliz süresinin XOS verimine etkisi.....	30

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

<u>Kısaltma</u>	<u>Acıklama</u>
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μmol	: Mikromol
BSA	: Bovine Serum Albumin
c-MWCNT	: Karboksillenmiş çok duvarlı karbon nanotüp
g	: Gram
IU	: Uluslararası Enzim Birimi
L	: Litre
M	: Molarite
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
NPX	: <i>Neocallimastix patriciarum</i> ksilanaz
$^{\circ}\text{C}$: Celsius
pH	: $-\log[\text{H}^+]$
rpm	: Dakikadaki dönme sayısı
SWCNT	: Tek duvarlı karbon nanotüp
UV	: Ultraviyole
v	: Hacim
w	: Kütle

ÖZET
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KSİLANDAN KSİLOOLİGOSAKKARİT ÜRETİMİ İÇİN *NEOCALLIMASTIX*
PATRICIARUM KSİLANAZIN KARBOKSİLE ÇOK DUVARLI KARBON
NANOTÜPLER İLE İMMOBİLİZASYONU**

Buşra ATALAY

**Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

Danışman: Dr. Öğr. üyesi Yakup ASLAN

2019, 36 + x Sayfa

Kimyasal katalizörlere göre üstün özellikleri sayesinde biyolojik katalizörler olan enzimler, endüstride çok sayıda uygulama alanlarına sahip olmuşlardır. Ancak çözünür formdaki enzimler endüstrideki sürekli proseslere uygun olmadıkları için kesikli proseslerde bir kere kullanılıp ya ürünle beraber tüketilmekte veya çok pahalı teknikler kullanılarak üründen ayrılmaktadırlar.

Bu tez çalışmasında, *Neocallimastix patriciarum* ksilanaz immobilizasyonu, immobilizasyon matriksi c-MWCNT üzerine adsorbsiyon ile gerçekleştirildi. Immobilizasyon koşullarını optimize ederek, % 100 immobilizasyon ve % 160.35 aktivite verimleri elde edildi. Enzim optimum pH aralığı (5.5-6.0) ve enzimin optimum sıcaklığı (55 °C) immobilizasyon sonrasında değişmemiştir. Serbest ve immobilize enzimin kinetik sabitleri ayrıca Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak belirlendi. Serbest ve immobilize enzimin substrat olarak Beechwood Ksilan için K_m değerleri sırasıyla, 1019.5 ve 704.2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ iken, V_{\max} değerleri sırasıyla 0.043 $\mu\text{mol} / \text{mg.dk}$ ve 0.069 $\mu\text{mol} / \text{mg.dk}$ olarak saptanmıştır. Immobilize enzim, tekrarlanan yirmi kullanım sırasında ve yirmi günlük depolama sırasında başlangıç aktivitesini kaybetmemiştir. Immobilize enzim kullanılarak, beech wood ksilan, 150 rpm çalkalama hızındaki orbital çalkalayıcı ve ısıtmalı bir inkübatörde optimum sıcaklıkta, iki saat boyunca hidrolize edilmiştir. Proteinlerin hidrolizinin 120 dakikada tamamlandığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında elde edilen immobilize *Neocallimastix patriciarum* ksilanaz, prebiyotik özelliğe sahip olan ksilooligosakkaritlerin endüstriyel üretimi için kullanılabileceği söylenebilir.

Anahtar Sözcükler: Enzim immobilizasyonu, fiziksel adsorpsiyon, karbon nanotüp, kovalent bağlanma, ksilan, ksilanaz, ksilooligosakkarit, *Neocallimastix patriciarum*

ABSTRACT

MSc. THESIS

IMMOBILIZATION OF *NEOCALLIMASTIX PATRICIARUM* XYLANASE ON CARBOXYLATED MULTY WALLED CARBON NANOTUBES TO PRODUCE XYLOOLIGOSACCHARIDES FROM XYLAN

Buşra ATALAY

**The Graduate School of Natural and Applied Science of Siirt University
The Degree of Master of Science
In Food Engineering**

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Yakup ASLAN

2019, 36 + x Pages

Enzymes, which are biological catalysts due to their superior properties compared to chemical catalysts, have many applications in the industry. However, since the enzymes in soluble form are not suitable for continuous processes in the industry, they are used once in batch processes or consumed together with the product or separated from the product by using very expensive techniques.

In this thesis, *Neocallimastix patriciarum* xylanase immobilization was performed by adsorption on immobilization matrix c-MWCNT. By optimizing the immobilization conditions, 100% immobilization and 160.35% activity efficiencies were obtained. The optimum pH range of the enzyme (5.5-6.0) and the optimum temperature of the enzyme (55 °C) did not change after immobilization. The kinetic constants of the free and immobilized enzymes were also determined using the Lineweaver-Burk graph. Km values of free and immobilized enzyme as substrate for Beechwood Xylan were 1019.5 and 704.2 µg / mL, respectively, while Vmax values were 0.043 µmol / mg.dk and 0.069 µmol / mg.dk respectively. The immobilized enzyme did not lose its initial activity during repeated twenty batch use and during twenty days of storage. Using the immobilized enzyme, beach wood xylan was hydrolyzed at the end of two hours at the optimum temperature in an orbital shaker and heated incubator at a shaking rate of 150 rpm. Hydrolysis of proteins has been shown to be completed in 120 minutes.

In conclusion, it can be said that the immobilized *Neocallimastix patriciarum* xylanase obtained in this thesis study can be used for industrial production of xylooligosaccharides with prebiotic properties.

Keywords: Carbon nanotube, covalent bonding, enzyme immobilization, *Neocallimastix patriciarum*, physical adsorption, xylan, xylanase, xylooligosaccharide

1. GİRİŞ

Kimyasal katalizörlere göre üstün özellikleri sayesinde biyolojik katalizörler olan enzimler, endüstride çok sayıda uygulama alanlarına sahip olmuşlardır. Ancak çözünür formdaki enzimler normalde birçok avantaja sahip olmalarına rağmen endüstrideki sürekli proseslere uygun olmadıkları için kesikli proseslerde bir kere kullanılıp ya ürünle beraber tüketilmekte veya çok pahalı teknikler kullanılarak üründen ayrılmaktadırlar. Bu da ürün maliyetini artırmaktadır. Ayrıca, yüksek sıcaklıklar, ekstrem pH'lar, kimyasal inhibitörler ve kullanım koşulları çözünür formdaki enzimlerin aktivitelerinin azalmasına neden olmaktadır. Bu yüzden immobilizasyon işlemi bu anlamda birçok avantaj sağlamaktadır.

Enzim moleküllerinin birbirlerine veya suda çözünmeyen katı bir desteğe kimyasal bağlarla bağlanarak veya bu moleküllerin desteğin içerisine hapsedilerek hareketlerinin kısıtlanması olan immobilizasyon; çözünür enzimlerin dezavantajlarını ortadan kaldırmak için en etkili metottur. Ancak immobilize enzimlerin en önemli dezavantajı, kullanım şartlarında destekten koparak aktivitelerinin zamanla azalmasıdır. Bu bağlamda kullanılan birkaç enzim immobilizasyon metotları mevcuttur. Enzim immobilizasyonunda kullanılan yöntemler arasında, en etkili olan kovalent bağlamadır. Bu yöntemde, enzim molekülleri desteğe en güçlü kimyasal bağ olan kovalent bağ ile bağlandıkları; ve kullanım sırasında enzim molekülleri destekten koparak ayrılmayıp aktivitelerini uzunca bir süre korudukları için sürekli proseslerde yüzlerce kez kullanılarak ürün maliyetini azaltılmaktadırlar. Bu nedenle 1960lı yıllardan itibaren endüstride enzimlerin immobilize formda kullanılmaları tercih edilmektedir. Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik yüzlerce katı materyal destek olarak kullanılmaktadır. Kullanılacak destek materyalinin dayanıklı, gıdayla temas halinde de kullanılabilirdiğinden toksik olmama, ucuz ve kolay bulunabilen, doğal olma gibi bazı özelliklere sahip olması beklenmektedir. Bir immobilizasyon çalışmasında destek olarak kullanılan materyalin fizikokimyasal özellikleri bağlanma ve aktivite verimlerini oldukça etkilemektedir. Nanoteknoloji ürünü olan karbon nanotüpler, enzim immobilizasyonunda destek olarak da kullanılmaktadır. Geniş yüzey alanına sahip olduklarından yüksek enzim bağlama kapasitesine sahiptirler. Ayrıca inert ve antitoksik bir yapıya sahip olduklarından gıda proseslerinde güvenle kullanılabilirler.

Ksilanaz, endüstriyel enzimlerin biridir ve substrat olarak ksilan polisakaritini kullanır. Ksiloz birimlerinden oluşur. Ksiloz birimleri birbirlerine β -1,4-glikosidik bağlarla bağlanır. Ksilanazlar; hemiselülozu daha basit birimlere parçalayan bir enzim sınıfıdır. Ksilan, doğada selülozdan sonra ikinci en sık rastlanan polisakarittir. Temel olarak ksilanın doğada dört farklı formu bulunur:

- α -L-arabinofuranosilin tek terminal birimlerinin yan zincirlerini içeren arabinoksilanlar,
- α -D-glukuronik asit ve bunun 4-O-metil eter türevine dayalı glukuronoksilanlar,
- Yapısında hem α -D-glukuronik (hem de 4-O-metil- α -D-glukuronik) asit hem de α -L-arabinoz bulunan glukurono arabinoksilanlar,
- Ksilanlardaki kompleks oligosakkarid yan zincirlerinde terminal β -D-galaktopiranozil kalıntıları ile karakterize olan galakto glukurono arabinoksilanlar (Burlacu ve ark., 2016).

Ksilanazlar, başta gıda endüstrisi olmak üzere yem ve kağıt endüstrilerinde çok yaygın kullanım alanına sahiptir. Bunun dışında; tekstil sanayisinde ve biyoyakıt üretim proseslerinde de kullanıldığı bilinmektedir (Burlacu ve ark., 2016). Aynı şekilde birbirlerine β -(1,4) bağı ile bağılı ksiloz monosakkaritlerinden oluşan ksilooligosakkaritler en önemli prebiyotiklerdendir. Prebiyotikler, insan sindirim sistemi tarafından sindirilmediklerinden kalorisizdirler ve kalınbağırsaktaki probiyotik bakterilerin çoğalmasını uyararak dolaylı yoldan bağırsak fonksiyonlarını düzenler, kalsiyum emilimini hızlandırarak kemik erimesini yavaşlatır ve kalınbağırsaktaki patojen mikroorganizmaların ürettiği kanserojen maddeleri elimine ederek kolon kanserini de önlerler. Sindirim sistemi tarafından hidrolize ve absorbe edilmediğinden ksilooligosakkaritler, bağırsaktayaşayan bakterilere substrat oluşturur. Bağırsak mikroflorasını daha sağlıklı bir yapı olması açısından değiştirir. Kabızlık, kanser, osteoporoz, kalp hastalıkları ve obezite gibi hastalıkları önlediğinden sağlığa olumlu etkilerde bulunur. Ayrıca minerallerin biyolojik olarak kullanımını iyileştirmektedirler (Erdoğan ve Akpınar, 2006). 1990'lı yıllardan itibaren başta Japonya olmak üzere, Çin, Kore, ABD ve Almanya gibi gelişmiş ülkelerde üretilen prebiyotiklerin pazarı dünya çapında hızla artmaktadır. Ancak maalesef, prebiyotikler ülkemizde henüz üretilmediğinden dışarıdan ithal edilerek gıda endüstrisinin ve tüketicilerin bireysel kullanımlarına arz edilmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Ksilan

Ksilan, heterojen bir yapıya sahip olan karmaşık bir kimyasal bileşiktir ve doğadaki bitkilerde selülozdan sonra en bol miktarda bulunan polisakkarittir (Burlacu ve Cornea, 2016). Yapısı, farklı bitki türlerine göre değişir ve homopolimer omurga zincirine, çeşitli konumlarda farklı yan zincir grupları olabilir ve dört ana gruba ayrılırlar (Motta ve ark., 2013):

- Sadece α -L-arabinofuranosil'in tek terminal birimlerinin yan zincirlerini içeren arabinoksilanlar;
- Glukuronoksilanlar, sadece α -D-glukuronik bazda asit ve bunun 4-O-metil eter türevidir;
- Glukurono arabinoksilanlar, ki burada hem α -D-glukuronik (hem de 4-O-metil- α -D-glukuronik) asit ve α -L-arabinoz bulunur;
- Galakto glukurono arabinoksilanlar, ksilanlardaki kompleks oligosakkarid yan zincirlerinde terminal β -Dgalaktopiranosil artıklarının varlığı ile karakterizedir.

Ksilan, çeşitli doku ve hücrelerde dağılmış olarak çeşitli bitki türlerinde bulunmaktadır. Sert ağaçlarda (hücre duvarı içeriğinin % 15-30'u) ve yumuşak ağaçlarda (% 7-10) ve yıllık bitkilerde (<% 30) çok miktarda bulunur. Sert ağaçlarda, ksilan O-asetil-4-O-metilglukuronoksilan olarak ve yumuşak ağaçlarda, arapino-4-O-metilglukuronoksilan olarak, çimlen ve yıllık bitkilerde, arabinoksilan formunda bulunur. (Beg ve ark., 2001; Kulkarni ve ark., 1999).

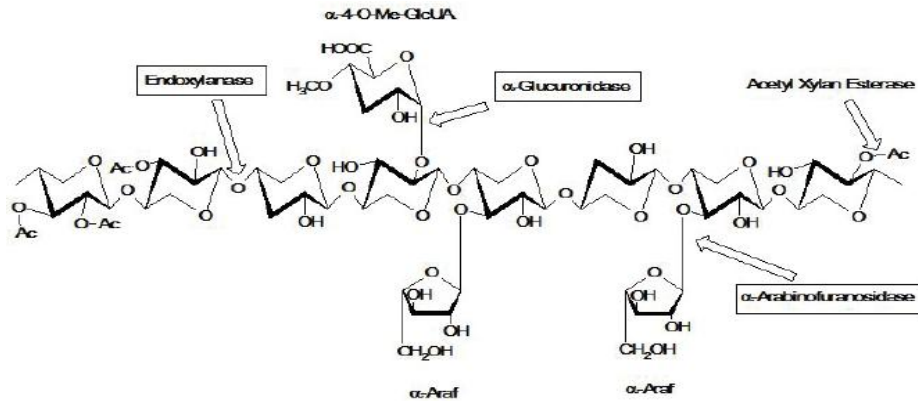
2.2. Ksilanın Enzimatik Hidrolizi

Ksilan'ın parçalanmasında enzimlerin rolü Hopper-Seyler tarafından 100 yıl önce açıklanmıştı (Bastawde, 1992). Ksilan, heterojen bir yapıya sahip olan karmaşık bir kimyasal bileşik olduğundan, tam hidrolizi, farklı aktivite ve özelliklere sahip çeşitli hidrolitik enzimlerin harekete geçilmesini gerektirir. Ksilanolitik enzim sistemi, β -1,4-endoksilanaz, β -ksilosidaz, α -glukuronidaz, α -L-arabinofuranosidaz, asetil ksilan esteraz (Motta ve ark., 2013) ve fenolik asit (ferulik ve p-kumar asit) esteraz enzimlerini içerir (Beg ve ark., 2001; Dhiman ve ark., 2008). Bütün bu enzimlerin sinerjik etkisi, ksilanı

bileşenleri olan şekerlere dönüştürür (Şekil 2.1). Monomerik ksilan molekülünün pentoz ünitelerine depolimerizasyonunda kullanılan ksilanazlar arasında, endoksilanazlar ve β -ksilosidazlar en önemlileridir. Endoksilanazlar, glikosidik bağları parçalamaya ve kısa ksiloligosakaritleri serbest bırakmaya katılırken, ekzoksilanaz olan β -ksilozidazlar, ksiloz monosakaritlerini ksilooligosakaritlerin indirgen olmayan uçlarından başlayarak serbest bırakır (Motta ve ark., 2013). Asetil esteraz, ferulik esteraz, glukuronidaz ve arabinosidaz, ksilan omurgasından farklı yan zincirlerin salınması için gereklidir (Dhiman ve ark., 2008).

Ancak endüstriyel ksilanazların genellikle mikrobiyal kaynaklı Endo-1,4- β -ksilanazlar (E.C.3.2.1.8) esas olarak bakteriler (*Bacillus sp.*, *Streptomyces sp.*) ve mantarlar (*Aspergillus sp.*, *Trichoderma sp.*) gibi mikroorganizmalar tarafından üretildiği rapor edilmiştir. Ksilanaz üreten mikroorganizmalar arasında *Bacillus sp.* ve farklı mantarların bulunduğu da bildirilmiştir (Subramaniyan ve Prema, 2002). Bununla birlikte, pek çok başka kaynağı işaret eden raporlar bulunmaktadır: aşırı olgunlaşma döneminde Japon armut meyveleri, Avrupa buğdayının unu (*Triticum aestivum*) veya tatlı su yumuşakçası gibi (Subramaniyan ve Prema, 2002).

β -ksilosidaz, ksilanın hidrolizi sırasında ksiloz salan endoksilanazlardan etkilenmeyen ksilobiyozu kolayca hidrolize edebilir. α -L-arabinofuranosidazlar (E.C.3.2.1.55), arabinanlar, arabinoksilanlar ve arabinogalaktanların indirgeyici olmayan uçtan α -L-arabinofuranosil gruplarını hidroliz eder. Bu tür enzimler; mantarlar, aktinomisetler ve diğer bakteriler (*Bacillus polymyxa*, *Rhodothermus marinus*) tarafından üretilir. α -D-glukuronidazlar (E.C.3.2.1.1), ksiloz ve D-glukuronik asit veya onun 4-O-metil eter bağlantısı arasındaki α -1,2-glikosidik bağların hidrolizini katalize

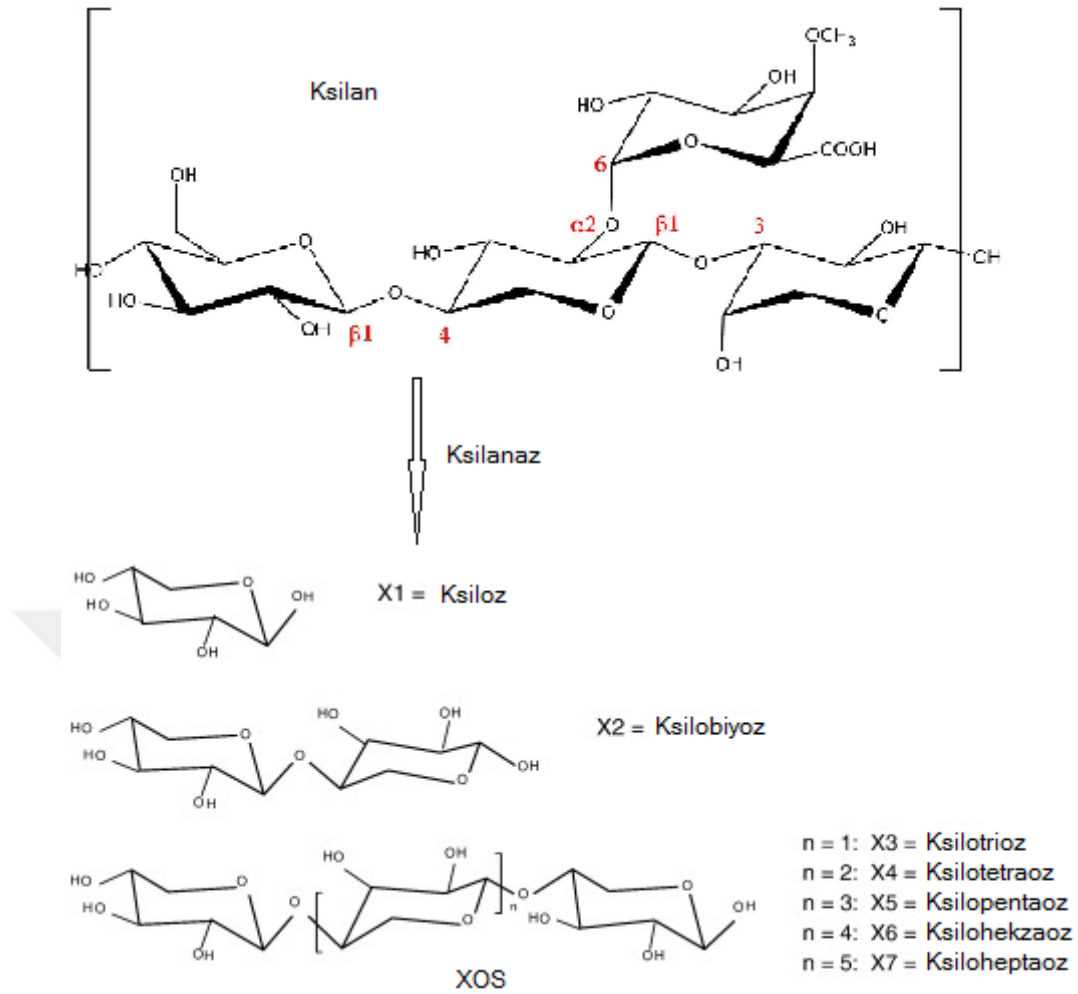


Şekil 2.1. Ksilan'ın yapısı ve bozunmasına katılan ksilanolitik enzimler. Ac: Asetil grubu; α -Araf: Arabino furanoz; α -4-0-Me-GlcA: a-4-0-Metil glukuronik asit (Sunna ve Antranikian, 1997).

eder. Bağlanmış asetik ve fenolik asitleri kaldırmak için esterazları kullanarak doğal glukuronoksilanların tam hidrolizi gereklidir. Asetilksil esteraz (EC 3.1.1.6), ksilozun asetik aside bağlanmasını keserken, feruloil esteraz (EC 3.1.1.73), arabinoz yan zincir kalıntılarını ferulik aside çevirir ve p-kumaroil esteraz, arabinoz yan zincir kalıntısını poulararik asit haline dönüştürür. Genellikle, ksilanazlar saf ksilan veya ksilanca zengin ortamda salınan uyarılabilir enzimlerdir (Balakrishnan, 1997). Ksilanazların immobilizasyonu, uygulanabilir amaçlar için gereklidir. Bu nedenle, ya mikroorganizma ya da enzimler, katı materyal üzerine immobilize edilmektedir (Beg ve ark., 2001). Bu tezde, bir endo-1,4- β -ksilanaz (E.C.3.2.1.8) olan *Neocallimastix patriciarum* ksilanaz (NPX) c-MWCNT'ler üzerine immobilize edilmiştir.

2.3. Ksilandan XOS Üretimi

XOS genellikle ksilan açısından zengin lignoselülozik materyallerden (LCM) otohizoliz (suda veya buharda ısıtarak), mineral asitlerle seyreltik sulu solüsyonlarda kimyasal işlemler (Akpınar ve ark., 2009; Parajo ve ark., 2004), linyoselülozik materyallerin doğrudan enzimatik hidroliziyle (de Mendes ve ark., 2009; Brienza ve ark., 2010; Akpınar ve ark., 2007) veya LCM'nin kimyasal fraksiyonlaması ve ksilan izolasyonunu müteakiben ksilanın XOS'a enzimatik hidrolizi (Şekil 2.2) ile üretilir (Teng ve ark., 2010). XOS'ların üretimi için tipik hammaddeler sert ağaçlar (örneğin huş ağacı, kayın ağacı), mısır koçanları, samanlar, küspeler, pirinç kabukları, malt kekleri ve kepeklerdir (Vazquez ve ark., 2000). Son yıllarda hızla büyüyen fonksiyonel gıda pazarı ve artan sayıda diğer endüstriyel uygulamalar, XOS üretiminde sert kereste ksilanı yerine yenilenebilir ve ucuz ksilan kaynaklarının kullanılmasını teşvik etmektedir. Sonuç olarak, pamuk sapları, tütün sapları ve buğday kepeği gibi tarımsal kalıntılar da yoğun olarak incelenmiştir (Akpınar ve ark., 2009). Ülkemizde 1990 yılından beri yılda ortalama 20 milyon ton buğday üretildiğinden (TMO, 2016), her yıl yaklaşık olarak 5 milyon ton buğday kepeği elde edildiği tahmin edilmektedir. Bu projede elde edilecek olan immobilize NPX enzimi, endüstride hayvan yemi ve diyet lifi üretiminde kullanılan buğday kepeğinden (Doty, 2012) gelişmiş ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de katma değeri yüksek olan XOS üretiminde kullanılabilir.



Şekil 2.2. Ksilandan enzimatik hidroliz ile XOS üretimi (Teng ve ark., 2010).

2.4. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, yüzyıllardan beri gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Biyoteknolojideki gelişmelerin sonucu olarak günümüzde ilaç ve kimya endüstrisinde de uygulama alanları bulmuşlardır. Enzimler kimyasal katalizörlere göre, son derece yüksek katalitik aktiviteye sahiptir ve belirli şartlar altında bu aktiviteleri tek bir substrata veya substrat grubuna özgüdür. Ayrıca ortam koşullarında oldukça etkili katalizörlerdir. Bu nedenle, istenmeyen ürünlerin oluşma ihtimali çok azdır. Ancak, endüstride enzimlerin doğal formlarıyla kullanılmasının önemli dezavantajları vardır. Örneğin, aynı enzim örneği ya bir kere kullanılmakta ve ürünle birlikte tüketime sunulmakta veya tekrar kullanılması için, ancak pahalı teknikler kullanılarak üründen ayrılabilirdiğinden, ürünün maliyeti yükselmektedir. Enzimlerin en büyük dezavantajı olan kısa ömürlü olmalarını gidermeye yönelik son 40 yılda yapılan araştırmalar enzimatik deaktivasyon metotlarına ve biyokatalitik yaklaşımdaki eksikleri gidermeye

yönelik olmuştur. Bir diğer dezavantajı ise, pH ve sıcaklıktaki değişimlere, kullanım şartlarına ve saklama koşullarına bağlı olarak, aktivitelerinde önemli kayıpların meydana gelmesidir. Çoğu enzim, düşük sıcaklıklarda ve nötr pH'larda sulu ortamda saklandığında stabildir. Fakat yüksek basınç ve sıcaklık, yüksek pH noktalarına sahip organik çözücüler yada dondurma, kurutma, şelatlama ve denatüre edici ajanların kullanıldığı proseslerde stabil kalmaları güçleşir. Bu dezavantajların giderilmesi için ilk yaklaşım, suda çözünen stabilizatörler ilave etmek olmuştur. Metaller, surfaktanlar, polioller, polietilenglikoller, proteinler, aminoasitler ve bazı şekerler ilave edilerek enzimlerin aktiviteleri kararlı hale getirilmiştir. Bu kararlılık artışı, enzim ve çözücü arasında non-kovalent etkileşimlerin bir sonucudur (Drevon, 2002). Ancak bu yöntem, aynı enzim örneğinin çok defa fazla kullanılması yönünde herhangi bir katkıda bulunmaz.

Diğer bir yaklaşım ise enzim immobilizasyonudur. Immobilizasyon, toksik olmayan işlemlerde enzimlerin katalizör olarak uygulanmasını sağlamak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Drevon, 2002). Ancak bu yöntem, aynı enzim örneğinin çok defa fazla kullanılması yönünde herhangi bir katkıda bulunmaz.

İmmobilizasyon, enzim aktivitesini uzun süre korumak için, suda çözünmeyen bir matrikse adsorbsiyon, kovalent bağlanma veya matriks içine hapsederek enzimin hareketinin sınırlandırılmasıdır. İmmobilizasyon çok avantajlı bir işlemdir ve endüstrilerde enzim katalizli reaksiyonlar için çözünen enzimler yerine yaygın olarak kullanılır (Shukla ve arkadaşları, 2012). Enzim immobilizasyonunda organik ve inorganik yapıda çok sayıda doğal veya yapay matriks kullanılmaktadır. Eupergit'ler, kalsiyum alginat ($C_6H_7O_6Ca$)_n, jel ve kapsülleri ile aktif karbon ile karbon nanotüpleri yaygın olarak kullanılan matrikslerdendir.

İmmobilize enzimler, kullanılan matriksin yapısına ve immobilizasyon metoduna bağlı olarak, serbest enzimlere göre farklı özellikler gösterir. İmmobilize enzimin optimum şartları, kinetik sabitleri ve ürün bileşimleri serbest enzime göre farklılık gösterebilir.

İmmobilize enzim kullanımının faydaları aşağıda gösterilmiştir:

- Reaksiyon ortamından basit yöntemlerle ayrılabilir,
- Yüksek sıcaklık ve pH'ya karşı daha dayanıklıdır,
- Sürekli proseslerin uygulanmasını mümkün kılar,

- Defalarca kullanılabilir,
- Saklama şartlarında aktivitelerini aylarca koruyabilir,
- Ürün maliyetini düşürür,
- Saf ürün eldesini mümkün kılar,
- Seçici olarak bazı malzemelerin sentezi mümkün olur,
- Ürün inhibisyonu önlenir.

İmmobilizasyon çalışmaları 1960'ların ilk yarılarında başlamış ve günümüze kadar konu ile ilgili olarak, 10.000'in üzerinde makale ve patent yayınlanmıştır. Tosa ve ark. (1966) tarafından Japonya'da İmmobilize *Aspergillus oryzae* aminoçilaz kolonlarının geliştirilmesi ve sentetik rasemik D-, L-aminoasitlerin aktif enantiyomerlere dönüştürülmesinde kullanılması, immobilize enzimlerle ilgili ilk endüstriyel uygulamadır.

2.4.1. Enzim immobilizasyon metotları

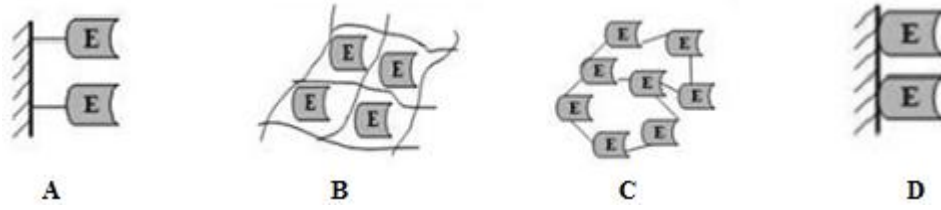
İmmobilizasyon metotları genellikle, bağlanma reaksiyonun tipine göre sınıflandırılır. Buna göre, enzim immobilizasyon metotları; adsorpsiyon, entrapment (bir polimerik jel içine hapsedme), bifonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlanma ve kovalent bağlanma (Şekil 2.3) olmak üzere başlıca dört ana grupta toplanır.

2.4.1.1. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon metodu, enzimin en zayıf çekim kuvvetleriyle inert bir matrikse bağlanmasıdır. Adsorpsiyon oldukça basit ve ekonomik bir immobilizasyon yöntemidir. İmmobilizasyon, enzim çözeltisinin uygun pH ve sıcaklıkta matriksle karıştırılmasıyla gerçekleştirilir. Enzimle matriks arasında zayıf bağlar (van der Waals ve hidrojen bağları) oluşur ve enzimler matriksten kolaylıkla ayrılırlar. İyon değiştiriciler kolaylıkla proteinleri adsorbe ederler ve enzim immobilizasyonu için endüstride yaygın olarak kullanılırlar. Tablo 2.1'de, adsorpsiyon için kullanılan adsorbentler yer almaktadır.

2.4.1.2. Entrapment (Hapsedme)

Bir polimerin oluşumu sırasında, enzimin oluşan polimer içinde hapsedilmesine entrapment denir. Bu metot için en yaygın olarak kullanılan polimerlerden birisi aljinik asittir.



Şekil 2.3. Enzim immobilizasyon metotları. A) Kovalent bağlama, B) Entrapment, C) Çapraz bağlama, D) Adsorbsiyon.

Tablo 2.1. Adsorbsiyonla immobilizasyonda kullanılan adsorbentler

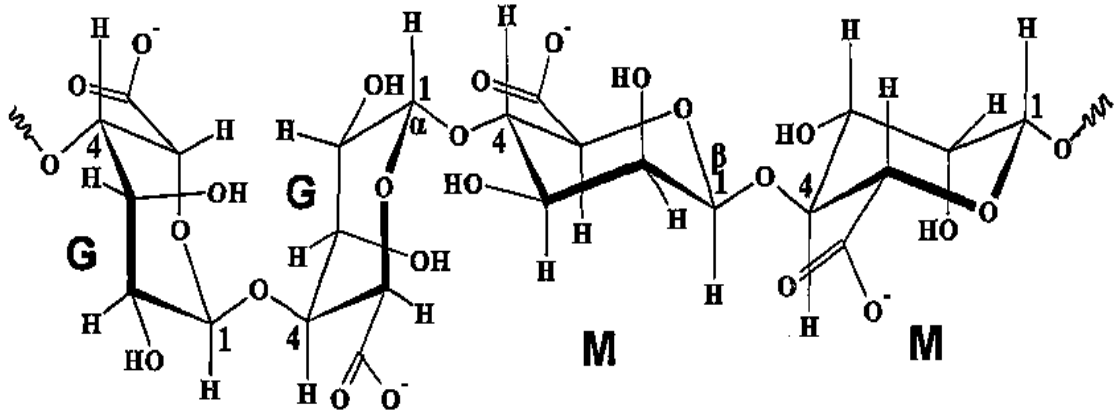
Etkileşme	Adsorbentler
Fiziksel Adsorbsiyon	Doğal Matrisler Aktif Karbon Silika jel Alumina Cam Nişasta
	Modifiye Matrisler Concanavalin A Sepharose Tannin Amino hekzil selüloz Fenoksiasetil selüloz
İyonik Bağlanma	Katyon Değişiriciler CM-selüloz Dowex 50 Amberlite CG-50 Anyon Değişiriciler DEAE-selüloz DEAE-sephadex Amberlite

2.4.1.2.1. Enzimlerin kalsiyum alginat ile immobilizasyonu

Alginatlar, kahverengi deniz yosunlarından (*Phaeophyceae*, başlıca *Laminaria hyperborea*) elde edilen, α -(1,4)-L-gluronik asit (G) ve β -(1,4)-D-mannuronik asit (M) birimlerinden oluşan anyonik, lineer bir polisakkarittir (Smidsrod ve Skjak-Braek, 1990; Blandino ve ark., 2001). Alginat molekülünün kimyasal yapısı Şekil 2.4'te görülmektedir. Alginat moleküllerinde bulunan G ve M monomerlerinin oranı ve dizilişi, alginatın elde edildiği kaynağa göre değişmektedir.

Alginatlar sulu çözeltilerinde, Ca^{+2} gibi iki değerlikli katyonlarla iyonik bağlanma yaparak jel oluştururlar. Jel oluşumu, farklı alginat zincirlerindeki G'lerin karboksil grupları ile Ca^{+2} iyonları arasındaki kooperatif bağlanma sonucu gerçekleşir.

Alginat kullanılarak enzimler değişik metotlarla immobilize edilebilir. Enzim, alginat çözeltisiyle karıştırılarak kalsiyum klorür çözeltisine damlatıldığında kalsiyum alginat beadleri oluşur. Enzim, kalsiyum klorür ile karıştırılarak alginat çözeltisine



Şekil 2.4. Alginat polimerlerinin molekül yapısı. G: Gluronik asit, M: Mannuronik asit

damlatıldığında ise kalsiyum alginat kapsülleri oluşur. Enzim-alginat-gliserol karışımı, kalsiyum klorür çözeltisine şırınga ile iplik şeklinde enjekte edildiğinde, kalsiyum alginat fiberleri oluşur. Oluşan bead, fiber veya kapsülün gözenek büyüklüğü, kullanılan alginat ve kalsiyum klorür çözeltisinin derişimine bağlıdır.

Molekül ağırlığı 300.000 dalton olan enzimler bile alginat jellerinden kaçabilmektedir. Bu nedenle, kalsiyum alginat ile immobilizasyon genellikle hücrelerin immobilizasyonunda kullanılır. Alginat ve kalsiyum klorür derişimleri optimize edilerek, enzimler de alginat içerisinde bu üç yöntemden birisi ile immobilize edilmiştir. (Blandino ve ark., 2000; Hayashi ve ark., 1994).

Alginatlar, toksik olmayan doğal polimerlerdir ve ekonomik olarak elde edilmektedir. Alginat jellerinin (bead, kapsül, fiber) gözeneklerinin büyük olması ve fosfat gibi bazı anyonlar içeren reaksiyon ortamlarında kararlılığının düşük olması, kullanılmalarını sınırlayan faktörlerdir.

2.4.1.3. Çapraz bağlama

Sulu çözeltilerde çözünebilir enzimler, bifonksiyonel çapraz-bağlayıcı reaktifler kullanılarak birbirine kovalent olarak bağlandıklarında çözünmez hale gelirler. (Chui ve Wan, 1997). Glutaraldehit bu amaç için kullanılan çapraz-bağlayıcı reaktiflerdendir (Klibanov, 1983). Bifonksiyonel glutaraldehit molekülündeki aldehit grupları, enzimlerin amino gruplarıyla reaksiyona girerek enzimleri çapraz bağlar. Çapraz bağlanma moleküller arası veya molekül içi oluşabilir ve protein çöker. Çapraz bağlı protein santrifüj ile kolaylıkla ayrılabilir.

2.4.1.4. Kovalent bağlama

Enzimler genellikle amino, karboksil, sülfidril, hidroksil veya imidazol gruplarıyla, doğal ve yapay çok sayıda katı matrikse kovalent bağlanmayla immobilize edilebilirler. Üzerinde aktif gruplar bulunduran matriksler, uygun tampon çözeltide enzimlerle muamele edilerek immobilizasyon gerçekleştirilir.

Üretan prepolimerler kovalent immobilizasyonda yaygın olarak kullanılan matrikslerindendir. Prepolimerler, diizosiyanat türevlerinin, aktif hidrojen ihtiva eden çeşitli bileşiklerle (glikol, poliglikol, poliol) reaksiyonlarından elde edilirler ve yapılarında izosiyanatlar bulunur. Prepolimerler su ile muamele edildiğinde süngerimsi yapıda polimer meydana gelir. Ortamda enzim bulunduğunda, enzimin aktif hidrojen bulunduran gruplarıyla, izosiyanat grupları kovalent bağlar oluştururlar.

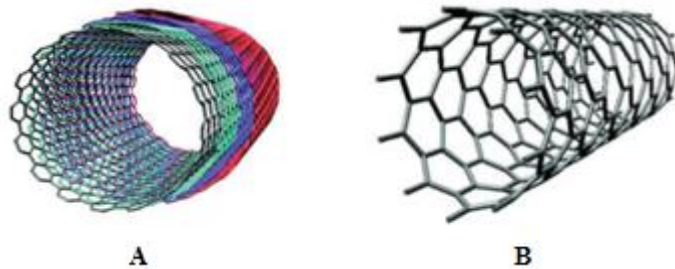
2.5. Enzim immobilizasyon Matriksi Olarak Karbon Nano Tüpler (CNT)

CNT, immobilizasyon işlemi için ilginç ve önemli özellikleri olan yüksek yüzey alanı ve mekanik stabiliteye sahip oldukları için, enzim immobilizasyon için mükemmel matrikslerdir. Bu özellikleriyle enzimler CNT yüzeyine kolaylıkla tutunur (Prlainovic et al., 2013).

Karbon nanotüpler tek duvarlı (SWCNT) ve çok duvarlı (MWCNT) olarak iki sınıfa ayrılırlar (Şekil 2.5). İki türün de birbirine göre farklı özellikleri mevcuttur (Saifuddin ve ark., 2013). İkisinin karşılaştırılması Tablo 2.2’de verilmiştir.

2.6. c-MWCNT ile İlgili Enzim İmmobilizasyonu Çalışmaları

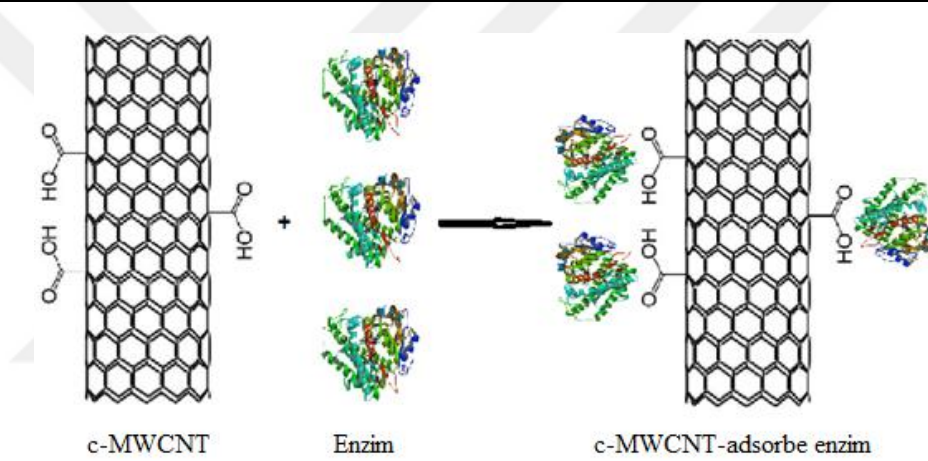
Literatürde, c-MWCNT'lerin enzim immobilizasyonunda kullanılması ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Şekil 2.6’da görüldüğü gibi, adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyon, enzim ile matriksin bir tampon çözelti ile karıştırılarak uygun sürede inkübe edilmesiyle gerçekleştirilmektedir (Garlet ve ark., 2014).



Şekil 2.5. Karbon nanotüplerin üç boyutlu yapıları. A) MWCNT, B) SWCNT

Tablo 2.2. SWCNT ve MWCNT' in karşılaştırılması

SWCNT	MWCNT
Tek grafen katmanı vardır.	Çoklu grafen katmanı vardır.
Sentez için katalizör gereklidir	Katalizör olmadan da sentezlenebilir.
Toplu olarak sentezi zordur.	Toplu halde sentezlemek kolaydır.
Tam olarak dağılmamıştır ve toplanmış yapılar oluşturur.	Paket şeklinde bir oluşum olmamakla beraber homojen şekilde dağılmıştır.
Saflik düşüktür. Fakat ark deşarj sentezi yöntemi kullanılarak % 80'e varan yüksek saflik rapor edilmiştir.	Saflik yüksektir.
Fonksiyonelleştirme sırasında bir bozukluk olma şansı daha fazladır.	Özellikle ark deşarj sentezi yöntemiyle sentezlendiğinde bir bozukluk olma şansı daha azdır.
Karakterizasyon ve değerlendirme kolaydır.	Çok karmaşık bir yapıya sahiptir.
Kolayca bükülebilir ve esneyebilir.	Kolayca bükülemez.



Şekil 2.6. c-MWNT ile enzim immobilizasyonu

immobilizasyonda ilk önce, c-CNT'ler üzerindeki karboksil (-COOH) grupları N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDAC) ile aktifleştirilmektedir. Daha sonra da bu gruplar aracılığıyla enzim molekülleri matrikse bağlanmaktadır (Jiang ve ark., 2004). Enzimler c-MWCNT yüzeyine kovalent bağlanma ve adsorbsiyon ile immobilize edilebilir. Adsorbsiyonun avantajları, enzimlerin immobilize olduktan sonra hem kendi orijinal özelliklerini hemde matriksin özelliklerini koruyabilmesi ve kolayca gerçekleştirilebilen basit bir yöntem olmasıdır (Weiser, 2015).

c-MWCNT'ler ile çeşitli enzimler kullanılarak yapılan enzim immobilizasyon çalışmaları mevcuttur. Aşağıda bu çalışmalar özetlenmiştir.

Soo-Keun ve arkadaşları 2005 yılında *Aspergillus niger* Glucose oxidase enzimini c-MWCNT üzerine immobilize etmişlerdir (Soo-Keun ve ark., 2005).

Pavlidis ve ark. (2010) *Candida antarctica* lipase B enzimini fiziksel adsorpsiyon metoduyla c-MWCNT üzerine immobilize etmiş olup, 6 ay sonunda hala % 55 aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Wang ve ark. (2011) Papain enzimini c-MWCNT üzerine immobilize edip bağlanma veriminin % 18.8, aktivite veriminin % 78.9 ve kullanım kararlılığının da 7 kullanım sonunda % 61 olduğunu bildirmişlerdir.

Rastian ve ark. (2013), *Candida rugosa* lipase enzimini MWCNT üzerine immobilize etmişler ve bağlanma verimini % 52, aktivite veriminin % 48 olduğunu belirtmişlerdir.

Garlet ve ark. (2014), *Aspergillus niger* inulinaz enzimini MWCNT üzerine adsorpsiyon yöntemiyle immobilize etmiş olup, bağlanma veriminin % 90, saklama kararlılığının 5 hafta sonunda hala % 100 aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Rastian ve ark. (2014)'nin yaptıkları diğer bir çalışmada *Candida rugosa* lipaz enziminin MWCNT ile immobilizasyonu % 86.7 bağlanma verimi ve % 492.5 aktivite verimi ile sonuçlanmıştır. Ayrıca aktivitenin 7. kullanım sonunda hala % 123.7'si korunmuştur.

Azevedo (2014) yılında ticari olarak satın alınmış peroksidaz enzimini MWCNT üzerine immobilize etmiş olup bağlanma veriminin % 100, kullanım kararlılığının 9 kullanım sonunda hiç kalmadığını, ayrıca 40 günün sonunda hala % 34 aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir.

Zniszczoł ve ark. (2016), *Pseudomonas fluorescens* lipaz enzimini kovalent bağlama metoduyla MWCNT üzerine immobilize edip, bağlanma veriminin % 59, aktivite veriminin % 1200 olduğunu, ayrıca kullanım kararlılığının 8 kullanım sonunda % 60 devam ettiğini belirtmiştir.

Feng ve arkadaşları (2015) α -Amylase ve glucoamylase enzimlerini MWCNT üzerine immobilize edip % 95.1 aktivite verimi ve 8 kullanım sonunda % 95.1 kullanım kararlılığı elde etmişlerdir. Jamie ve arkadaşları 2016 yılında yeniden *Candida rugosa* lipase enzimini immobilize edip, % 59 bağlanma verimi, % 1200 aktivite verimi ve 8 kullanım sonunda % 60 kullanım kararlılığı elde etmişlerdir.

2.7. NPX'in İmmobilizasyonu ile İlgili Çalışmalar

Yaptığımız literatür araştırmasında, NPX'in immobilizasyonu ile ilgili sadece iki çalışmaya rastlanıldı.

Bunlardan ilkinde, Liu ve ark. (1997), *Brassica napus*'ta expereze edilen rekombinant NPX kanola çekirdeğinden elde edilen oleosin proteini'nin N' ucuna füzyon yolu ile immobilize etmişlerdir.

Diğer çalışmada, Liu ve ark., (2008), *Escherichia coli*'de exprese rekombinant NPX'i, kanola çekirdeklerinden elde edilen oleosin proteini'nin N' ucuna füzyon yolu ile immobilize etmişlerdir.

Literatür araştırmalarımızın sonucu olarak; NPX'in immobilizasyonu az çalışıldığı ve c-MWCNT ile immobilizasyon çalışmalarında yüksek enzim bağlama kapasitesi ve enzim aktivitesinde 12 kata kadar aktivite artışı rapor edildiği görüldü.

Dolayısıyla bu tez çalışmasında, öncelikle NPX'in c-MWCNT üzerine immobilizasyonu ile yüzde yüz immobilizasyon verimi ve yüksek aktivite artışı sağlamak için immobilizasyon koşullarının optimizasyonu amaçlandı. İkinci amaç ise immobilize NPX'i optimum aktivite koşullarını tayin ederek karakterize edip serbest NPX ile karşılaştırmaktı. Son amaç ise, immobilize NPX kullanarak ksilanın hidroliz koşullarını optimize ederek yüzde yüz verimle XOS üretimi imkanlarını araştırmaktı.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

NPX, Mega-zyme firmasından (Troy, Amerika Birleşik Devletleri), c-MWCNT'ler (iç çapı 5-15 nm, dış çapı 28-48 nm, uzunluk 10-25 µm) Nanografi Co. Ltd. şirketinden (Ankara, Türkiye) satın alındı. Nitroselüloz membran filtreler (por çapı 0.45 µm, membran çapı 47 mm) ISO-LAB (Wertheim, Germany) firmasından satın alındı. Beech wood ksılan SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg Germany) firmasından temin edilmiştir. Ksiloz Sigma-Aldrich firmasından (St. Louis, Missouri, USA) satın alınmıştır. UV-VIS Spektrometresi (UV-6300PC), VWR firmasından (Radnor, USA); pH metre (Hanna HI 2020 edge), Hanna Instruments Ltd. firmasından (Bedfordshire, İngiltere), manyetik karıştırıcı (Heidolph MR Hei-Standard), Heidolph UK - Radleys firmasından (Shire Hill, İngiltere), saf su cihazı (Mini Pure 1, MDM-0170), MDM Co. Ltd. firmasından (Suwon-si, Güney Kore), hassas terazi (Shimadzu-ATX224), Shimadzu Corporation firmasından (Kyoto, Japonya), orbital çalkalamalı ısıtmalı inkübatör (Mipro-MCI), Protek Lab Grup Profesyonel Laboratuar Çözümleri firmasından (Ankara, Türkiye), vakum pompası (Biobase, GM-0.50A), Biobase Biodustry Co, Ltd. firmasından (Shandong, Çin) satın alındı. Bovine Serum Albumin, Sodyum Hidroksit, Sodyum Dihidrojen Fosfat, Hidro Klorik Asit, 3,5-dinitrosalisilik asit, Sodyum Potasyum Tartrat ve Bradford Reagent ise Sigma-Aldrich firmasından (Taufkirchen, Germany) ve Sodyum Azid, Merck Millipore firmasından (Darmstad, Almanya) satın alınmıştır.

3.2. Metotlar

3.2.1. c-MWCNT'ler ile NPX immobilizasyonu

Enzim immobilizasyonunda bağlanma verimini ve aktivite verimini etkileyen koşullar (immobilizasyon yapılacak tamponun pH'sı ve derişimi, matriks miktarı) sırayla değiştirilerek koşullar optimize edildi. Adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyon, Garlet ve arkadaşlarının metoduna göre adsorbsiyon ile gerçekleştirildi (Garlet ve ark., 2014).

3.2.2. Protein (enzim) tayini

Protein derişimlerinin tayini, Bradford (1976) metoduna göre, 0.25-1.4 mg/mL aralığındaki derişimlerde hazırlanan Bovine Serum Albümin Standart çözeltilerinin çift ışık yollu UV spektrometresinde 595 nm dalga boyunda ölçülen absorbanları kullanılarak oluşturulan standart grafiğine (Şekil 3.1) ait doğru denklemine (3.1) göre yapıldı.

$$Y = 0.000336 X + 0.00449 \quad (3.1)$$

3.2.3. NPX aktivitesinin tayini

NPX aktivitesi, pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponunda çözülerek hazırlanan 50 µL serbest ksilanaz çözeltisi ve 5 mL % 0.5 (w/v)'lik ksilan standart koşullarda (pH 5.5; sıcaklık 55 °C; süre 30 dakika; ve çalkalama hızı 150 rpm) yapılan reaksiyonu ile belirlendi. Bir IU NPX aktivitesi, standart koşullarda, 5 mL % 0.5 (w/v)'lik ksilan çözeltisinde 1 dakikada 1 µmol ksiloz oluşturan enzim miktarı (mg) olarak tanımlandı. Oluşan indirgen şeker derişimleri, Şekil 3.2'de görülen ksiloz standart grafiğine ait doğru denklemi (3.2) kullanılarak hesaplandı. Ksilanaz aktivitesi ise 3.3 denkleminde hesaplandı.

$$Y = 0.06686 X + 0.00013 \quad (3.2)$$

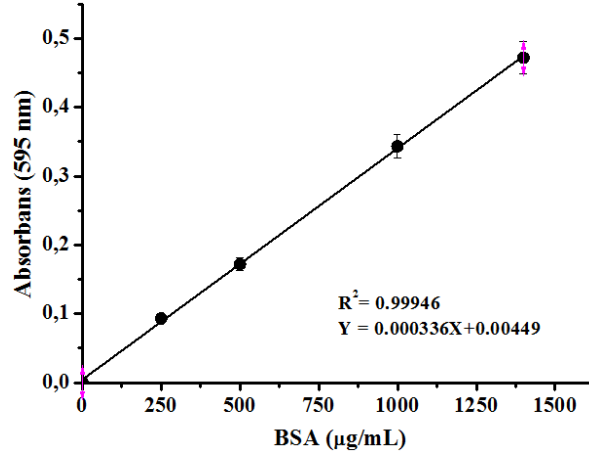
$$\text{Aktivite } (\mu\text{mol/mg.dk}) = \frac{\text{İndirgen şeker } (\mu\text{mol})}{\text{Kullanılan enzim (mg) x reaksiyon süresi (dk)}} \quad (3.3)$$

3.2.4. İmmobilizasyon ve aktivite verimlerinin hesaplanması

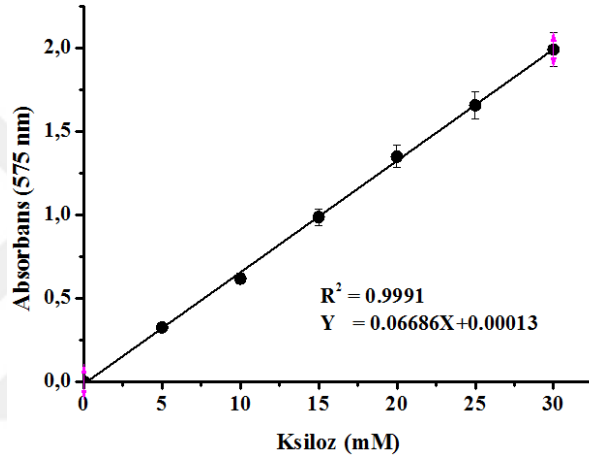
İmmobilizasyondan önce ve sonra immobilizasyon çözeltilerindeki enzim miktarları kullanılarak bağlanma ve aktivite verimleri sırasıyla denklem (3.4) ve (3.5) kullanılarak hesaplandı.

$$\text{İmmobilizasyon verimi } (\%) = \frac{(\text{İmmobilizasyonda kullanılan enzim} - \text{Süzüntüdeki enzim})}{\text{İmmobilizasyonda kullanılan enzim}} \times 100 \quad (3.4)$$

$$\text{Aktivite verimi } (\%) = \frac{\text{İmmobilize enzimin aktivitesi}}{\text{Sıvı enzimin aktivitesi}} \times 100 \quad (3.5)$$



Şekil 3.1. BSA standart grafiği



Şekil 3.2. Ksiloz standart grafiği

3.2.5. İmmobilizasyon şartlarının optimizasyonu

İmmobilizasyonda immobilizasyon tamponunun pH'sı ve molaritesi, sabit miktarda enzime karşı kullanılan matris miktarı ve immobilizasyon süresi immobilizasyon verimi ve aktivite verimini etkilediğinden (Garlet ve ark., 2014), bu faktörlerden her birinin etkisi sırayla incelenerek immobilizasyon şartları optimize edildi.

3.2.4.1. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerdeki pH'ları farklı (4.5-5.0-5.5-6.0-6.5) olan 5'er mL 25 mM'lık fosfat tamponu çözeltilerine 25 mg c-MWCNT ve pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponunda çözülerek hazırlanan 50'şer µL serbest enzim (2.17 IU) ilave ederek 25 °C'de 150 rpm hızla çalkalanan inkübatörde 30

dakika süreyle gerçekleştirildi. İmmobilizasyondan sonra immobilizasyon çözeltileri ile süzüntülerinde enzim tayini ve bağıl aktiviteler 50 µL (2.17 IU) serbest ve 186 mg immobilize NPX'ler, 5 mL % (w/v) 0.5'lik ksilan çözeltileri (pH 5.5) ile bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 20 dakika süreyle yürütülen reaksiyonlar sonucu oluşan indirgen şeker derişimleri kullanılarak aktivite tayini yapıldı. Elde edilen immobilizasyon ve aktivite verimleri tabloda karşılaştırılarak immobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon etkinliğine etkisi incelendi.

3.2.4.2. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerdeki derişimleri farklı (25-50-75-100 mM) 5'er mL fosfat tamponu çözeltilerine (pH 6.0) 10'ar mg ve pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponunda çözülerek hazırlanan 50'şer µL serbest NPX (2.17 IU) çözeltileri ilave ederek 25 °C sıcaklıkta 150 rpm hızla ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde, 30 dakika süreyle gerçekleştirildi. İmmobilizasyondan sonra immobilizasyon çözeltileri ile süzüntülerinde enzim tayini ve 50 µL (2.17 IU) serbest ve 186 mg immobilize NPX'ler, 5 mL % (w/v) 0.5'lik ksilan çözeltileri (pH 5.5) ile bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 20 dakika süreyle yürütülen reaksiyonlar sonucu oluşan indirgen şeker derişimleri kullanılarak bağıl aktivite tayini yapıldı. Elde edilen immobilizasyon ve aktivite verimleri karşılaştırılarak immobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi incelendi.

3.2.4.3. Matriks miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerdeki 5'er mL 100 mM'lık dört ayrı fosfat tampon çözeltilerine (pH 6.0) sırasıyla 20, 30 ve 40 mg c-MWCNT ve pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponunda çözülerek hazırlanan 50'şer µL serbest NPX (2.17 IU) çözeltileri ilave edilerek, 25°C'de 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 30 dakika süreyle gerçekleştirildi. İmmobilizasyondan sonra immobilizasyon çözeltileri ile süzüntülerinde enzim tayini ve pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponunda çözülerek hazırlanan 50'şer µL serbest NPX (2.17 IU) çözeltileri ve 186 mg immobilize NPX'ler, 5 mL % (w/v) 0.5'lik ksilan çözeltileri (pH 5.5) ile bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 20 dakika süreyle yürütülen reaksiyonlar sonucu oluşan indirgen şeker derişimleri kullanılarak bağıl aktivite tayini yapıldı. Elde edilen immobilizasyon ve aktivite

verimleri karşılaştırılarak immobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi incelendi.

3.2.4.4. İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon etkinliğine etkisi

Bu aşamaya kadar yapılan 30 dakika immobilizasyon maksimum bağlanma ve verim elde edildiğinden dolayı, immobilizasyon etkinliğine sürenin etkisi incelenmedi.

3.2.5. Serbest ve immobilize NPX'in karakterizasyonu

İmmobilize enzimin optimum pH ve sıcaklığı, V_{max} ve K_m sabitleri, pH kararlılığı, termal kararlılığı, kullanım kararlılığı ve saklama kararlılığı gibi kinetik özellikleri belirlenerek immobilize enzim karakterize edildi.

3.2.5.1. Optimum pH tayini

Bağıl aktiviteler, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde, pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponunda çözülerek hazırlanan 50'şer μ L serbest NPX (2.17 IU) çözeltileri ve 186'şar mg (3.48 IU) immobilize NPX'lerin 5'er mL 25 mM'lık farklı pH'lardaki (4.0-4.5-5.0-5.5-6.0-6.5-7.0-7.5-8.0) fosfat tamponu ile hazırlanmış % 0.5 (w/v)'lik ksilan çözeltileri ile 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 55 °C'de 20 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda tayin edildi. serbest ve immobilize NPX'in optimum pH aralığı, Bağıl aktivite (%) - pH grafiğinden belirlendi.

3.2.5.2. Optimum sıcaklık tayini

Bağıl aktiviteler, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponunda çözülerek hazırlanan 50'şer μ L serbest NPX (2.17 IU) çözeltileri ve 186'şar mg (3.48 IU) immobilize NPX'lerin 25mM fosfat tamponu (pH 6,0) ile hazırlanmış 5'er mL % 0.5 (w/v)'lik ksilan çözeltileri ile 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde farklı sıcaklıklarda (30-40-45-50-55-60-65-70-75-80 °C) 20 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda bağıl aktiviteler tayin edilerek, Bağıl aktivite (%) - Sıcaklık (°C) grafiğinden serbest ve immobilize NPX'in optimum sıcaklık aralığı belirlenmiştir.

3.2.5.3. pH kararlılığının tayini

pH kararlılığı, pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponunda çözülerek hazırlanan 50'şer μL serbest NPX (2.17 IU) çözeltileri ve 186'şar mg (3.48 IU) immobilize NPX'ler 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde, pH'ları farklı (3.0-3.5-4.0-4.5-5.0-5.5-6.0-6.5-7.0-7.5-8.0) olan 1'er mL 25 mM'lık fosfat tamponu çözeltilerinde, 150 rpm hızla çalkalayan ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında (50 °C), 20 dakika süreyle inkübe edildikten sonra, üzerlerine 25 mM'lık fosfat tamponu (pH 5.5) ile hazırlanmış 4'er mL % 0.5 (w/v)'lik ksilan çözeltileri eklenerek 50°C'de, 20 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda tayin edilen kalan aktiviteler karşılaştırılarak belirlendi.

3.2.5.4. Isıl kararlılık tayini

Isıl kararlılık pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponunda çözülerek hazırlanan 50'şer μL serbest NPX (2.17 IU) çözeltileri ve 186'şar mg (3.48 IU) immobilize NPX'ler 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde pH'ları 5.5 olan 1'er mL 100 mM'lık fosfat tamponu çözeltilerinde, 150 rpm hızla ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde farklı sıcaklıklarda (30-35-40-45-50-55-60-65-70-75-80 °C) 20 dakika süreyle inkübe edildikten sonra, üzerlerine 100 mM'lık fosfat tamponu (pH 5.5) ile hazırlanmış 4'er mL % 0.625 (w/v)'lik ksilan çözeltileri eklenerek 55 °C'de 20 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda tayin edilen kalan aktiviteler karşılaştırılarak belirlendi.

3.2.5.5. Kinetik sabitlerin tayini

pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponunda çözülerek hazırlanan 50'şer μL serbest NPX (2.17 IU) çözeltileri ve 186'şar mg (3.48 IU) immobilize NPX'lerin başlangıç aktiviteleri, 10 mL'lik vida kapaklı tıpalı cam şişelerde, pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık fosfat tamponu ile hazırlanmış farklı derişimlerdeki (125-1500 $\mu\text{g} / \text{mL}$) 5'er mL ksilan çözeltileri ile 150 rpm hızla ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 10 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda başlangıç hızları tayin edilerek, çizilen Lineweaver-Burk Grafiğinden V_{max} ve K_m sabitleri hesaplandı.

3.2.5.6. İmmobilize NPX'in kullanım kararlılığı

İmmobilize NPX'in kullanım kararlılığı, 186 mg (3.48 IU) immobilize NPX'in standart koşullarda tekrarlanan peş peşe 20 kez tayin edilen bağıl aktiviteleri kullanılarak çizilen grafik ile belirlendi. İmmobilize enzim her kullanımdan sonra sinterli cam süzgeç ve nitroselülöz membran filtre kullanılarak vakum altında bol miktarda saf su ile yıkandı.

3.2.5.7. İmmobilize NPX'in depolama kararlılığı

İmmobilize NPX'in depolama kararlılığı, 186 mg (3.48 IU) immobilize NPX'in 5 mL 0.250 M'lık fosfat tamponu çözeltisi içerisinde buzdolabında +4 °C'de 20 gün boyunca depolandığı süre boyunca iki günde bir, standart metoda göre tayin edilen bağıl aktiviteleri kullanılarak çizilen grafik ile belirlendi. İmmobilize enzim, her kullanımdan sonra bol miktarda saf su ile yıkandıktan sonra % 0.2 (w/v) derişiminde sodyum azid içeren 5 mL 0.25 M'lık fosfat tamponu çözeltisi içerisinde buzdolabında +4 °C'de depolandı.

3.2.6. İmmobilize NPX kullanılarak ksilandan XOS üretimi

3.2.6.1. Ksilan derişiminin XOS verimine etkisi

186 mg (3.48 IU) immobilize NPX'ler farklı derişimlerdeki (125-1500 µg / mL) 5'er mL ksilan çözeltileri (pH 5.5) ile 150 rpm hızla ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 55 °C'de 30 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda oluşan indirgen şeker derişimleri tayin edilerek, çizilen grafikten maksimum verim elde edilen ksilan derişimi tayin edildi.

3.2.6.2. İmmobilize NPX miktarının XOS verimine etkisi

5'er mL 1500 µg / mL'lik ksilan çözeltileri (pH 5.5) farklı miktarlardaki (186-1860 mg) immobilize NPX'ler ile 150 rpm hızla ısıtmalı orbital çalkalamalı inkübatörde 55 °C'de 30 dakika süreyle gerçekleştirilen reaksiyonları sonunda oluşan indirgen şeker derişimleri tayin edilerek, çizilen grafikten maksimum verim elde edilen immobilize NPX miktarı tayin edildi.

3.2.6.3. Hidroliz süresinin XOS verimine etkisi

744 mg (13.92 IU) immobilize NPX ile 10 mL 1500 µg / mL'lik ksilan çözeltisinin (pH 5.5) reaksiyonu 6 saat süreyle takip edilerek ksilan ve indirgen şeker derişimlerinin zamana karşı çizilen grafiğinden ksilanın tamamen XOS'a dönüştüğü süre belirlendi.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Protein (Enzim) Tayini

Denklem (3.1)'e göre, 50 µL serbest NPX içeren 5.05 mL immobilizasyon çözeltisi içindeki enzim konsantrasyonu 1.06 mg olarak hesaplandı. Sıvı halde bulunan NPX preparatındaki enzim konsantrasyonunda 158.625 mg / ml olarak hesaplandı.

4.2. NPX Aktivitesinin Tayini

Optimum aktivite tayini koşullarında oluşan ksiloz miktarı Denklem (3.2)'ye göre 10.325 µmol olarak bulunmuştur. Serbest NPX aktivitesi ise, Denklem (3.3)'ten 2.17 IU enzim olarak hesaplandı. Ayrıca 1 mL NPX preparasyonu 158.63 mg serbest NPX içerdiğinden, sıvı haldeki ticari NPX aktivitesinin substrat olarak Beechwood ksilan için 825.70 IU / mL olduğu hesaplandı. Öte yandan, 1 IU aktiviteye sahip olan serbest NPX miktarı da 2.05 mg olarak hesaplandı.

4.3. İmmobilizasyon Şartlarının Optimizasyonu

4.3.2. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon verimi üzerindeki etkisi Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Tabloya göre, tamponun pH'sı arttığında 6.0'a kadar immobilizasyon verimi ve aktivite veriminin arttığı ve 6.5'te düştüğü görülmektedir. Bu sonuçlara göre yüksek immobilizasyon verimi (% 55.36) aktivite verimi (% 83.18), pH 6.0'da elde edildi. İmmobilizasyonda genel olarak en yüksek immobilizasyon verimi ile en yüksek aktivite veriminin optimum pH'ta elde edildiği çok iyi bilinmektedir.

4.3.3. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi

Tablo 4.2'e göre, tampon derişimi arttığında immobilizasyon verimi ve aktivite verimi artmaktadır. Buna göre, yüksek immobilizasyon verimi (% 55.36) ve en yüksek aktivite verimi (% 112.44) 0.100 M tampon için elde edildi. Enzim immobilizasyonunda immobilizasyon ve aktivite verimleri tuzların özelliklerinden ve derişimlerinden sıklıkla etkilenmektedir. Çünkü tuzlar enzim moleküllerinin üç boyutlu yapılarını değiştirerek aktivitenin azalmasına veya artmasına neden olabilmektedir (Smalla ve ark. 1988).

Tablo 4.1. İmmobilizasyon tamponu pH'sının immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon Tamponu pH'sı	İmmobilizasyon Verimi*(%)	Aktivite Verimi**(%)
4.5	27.36 ± 0.02	71.73 ± 0.02
5.0	30.62 ± 0.04	68.18 ± 0.04
5.5	33.17 ± 0.03	74.03 ± 0.02
6.0	38.73 ± 0.04	83.18 ± 0.02
6.5	35.73 ± 0.05	75.86 ± 0.05

*İmmobilizasyon, pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 50'şer µL NPX çözeltileri ve 10'ar mg c-MWCNT'lerin farklı pH'lardaki 5 mL sodyum fosfat tamponları (25 mM) içinde, bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 30 dakika süreyle yürütülen reaksiyonları ile gerçekleştirildi.

**Aktiviteler, pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 50 µL serbest ve 186 mg immobilize NPX'lerin 5 mL % (w/v) 0.5'lik ksilan çözeltileri (pH 5.5) ile, bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 20 dakika süreyle yürütülen reaksiyonlar sonucu oluşan indirgen şeker miktarları kullanılarak hesaplandı.

Tablo 4.2. İmmobilizasyon tamponu derişiminin immobilizasyon etkinliğine etkisi

İmmobilizasyon Tamponu Derişimi (mM)	İmmobilizasyon Verimi*(%)	Aktivite Verimi**(%)
25	38.73 ± 0.04	83.18 ± 0.02
50	43.14 ± 0.03	97.44 ± 0.01
75	47.61 ± 0.01	105.12 ± 0.04
100	55.36 ± 0.04	112.44 ± 0.02

*İmmobilizasyon, 100 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 50'şer µL NPX çözeltileri ile 10'ar mg c-MWCNT'lerin, farklı derişimdeki 5 mL fosfat tamponları (pH 4.0) içinde, bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 30 dakikasüreyle yürütülen reaksiyonları ile gerçekleştirildi

**Aktiviteler, 200 µL serbest ve 186 mg immobilize NPX'ların 5 mL % (w/v) 0.5'lik ksilan çözeltileri (pH 5.5) ile, bir inkübatörde 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 20 dakika süreyle yürütülen reaksiyonlar sonucu oluşan indirgen şeker miktarları kullanılarak hesaplandı.

4.3.4. Matriks miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisi

Tablo 4.3'te görüldüğü üzere, c-MWCNT'nin arttıkça immobilizasyon verimi ve aktivite veriminin arttığı görülmektedir. Matriks miktarının artması, bağlanan enzim miktarını artırdığı için immobilizasyon ve aktivite verimi genellikle arttığı çok iyi bilinmektedir. Bu sonuçlara göre en yüksek immobilizasyon verimi (% 100) ve en yüksek aktivite verimi (% 160.35) 40 mg c-MWCNT için elde edildi.

İmmobilizasyon şartlarının optimizasyonu ile % 100 immobilizasyon verimi ve % 160.35 aktivite verimi elde edildi. Bu sonuçlar, literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında bugüne kadar elde edilen en iyi sonuçlar olduğu görülmektedir.

4.3.5. İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon etkinliğine etkisi

Bu aşamaya kadar 30 dakika süreyle uygulanan immobilizasyonun %100 immobilizasyon verimi ve oldukça yüksek aktivite verimi (% 160.35) ile sonuçlanması sebebiyle immobilizasyon süresinin immobilizasyon etkinliğine etkisi incelenmedi.

4.4. Serbest ve İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu

4.4.1. Optimum pH tayini

Şekil 4.3'te görüldüğü gibi NPX'in optimum pH aralığı (5.5-6.0), Liu ve ark. (1997)'nin çalışmasında bulunan değerle (5.5) ve Liu ve ark. (2008)'nin bulduğu değerle (6.0) uyumlu olup immobilizasyondan sonra değişmemiştir. Ayrıca immobilizasyon NPX'in denenen tüm pH aralığında aktivitesini yükseltmiştir.

4.4.2. Optimum sıcaklık tayini

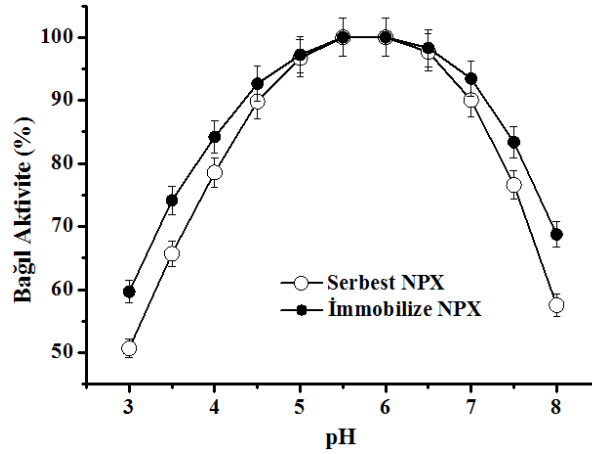
Şekil 4.2'e göre NPX'in optimum sıcaklığı 55-60 °C olup immobilizasyondan etkilenmemiştir. Bu değer Moloney ve ark. (1997)'nin çalışmasında bulunan değerden (40 °C) farklı fakat, Liu ve ark. (2008)'nin bulduğu değerle (59 °C) uyumludur. Ayrıca

Tablo 4.3. c-MWCNT miktarının immobilizasyon etkinliğine etkisi

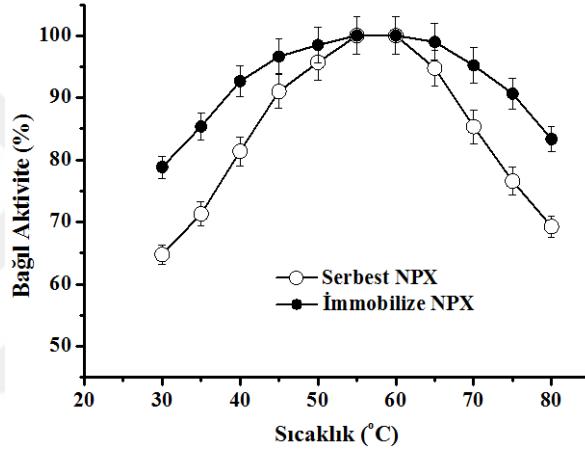
c-MWCNT (mg)	İmmobilizasyon Verimi*(%)	Aktivite Verimi**(%)
10	55.36 ± 0.04	112.44 ± 0.02
20	100.00 ± 0.03	134.38 ± 0.03
30	100.00 ± 0.01	144.26 ± 0.04
40	100.00 ± 0.02	160.35 ± 0.01

*İmmobilizasyon, 200 uL NPX'lar ile farklı miktardaki c-MWCNT'lerin, 5 mL 0.250 M'lık sodyum fosfat tamponları (pH 4.0) içinde bir inkübatörde 150 rpm hızda çalkalanarak oda sıcaklığında 30 dakikasüreyle yürütülen reaksiyonları ile gerçekleştirildi.

**Aktiviteler, pH'sı 5.5 olan 100 mM'lık sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 50 µL serbest ve 186 mg immobilize NPX'ların 5 mL % (w/v) 0.5'lik ksilan çözeltileri (pH 5.5) ile, bir inkübatörde 55 °C'de 150 rpm'de çalkalanarak 55 °C'de 20 dakika süreyle yürütülen reaksiyonları sonucu oluşan indirgen şeker miktarları kullanılarak hesaplandı.



Şekil 4.1. Serbest ve immobilize NPX'in aktivitesine pH'nın etkisi



Şekil 4.2. Serbest ve immobilize NPX'in aktivitesine sıcaklığın etkisi

immobilize NPX'in, serbest NPX ile karşılaştırıldığında daha yüksek sıcaklıklarda daha yüksek bağlı aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. İmmobilizasyon enzimlerin ısı kararlılığını artırdığı için aktivitenin serbest enzime göre daha fazla olması beklenen bir sonuçtur.

4.4.3. pH kararlılığının tayini

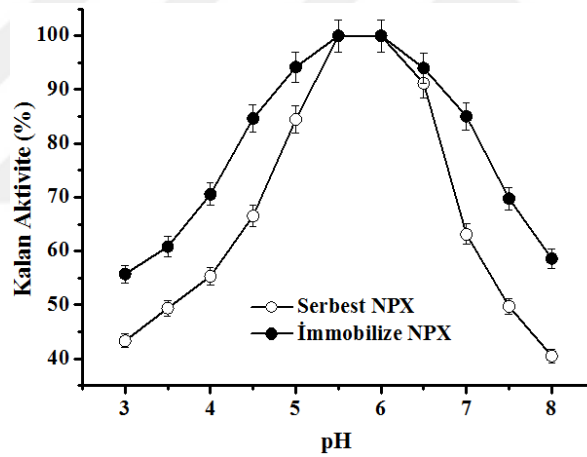
Şekil 4.3'e göre, denenen bütün pH değerlerinde immobilize NPX'in serbest NPX'ten daha kararlı olduğu görülmektedir. Şekilde ayrıca serbest ve immobilize NPX'in en kararlı pH aralığının 5.5-6.0 olduğu görülmektedir. İmmobilizasyonun enzimin pH kararlılığını artırdığı çok iyi bilinmektedir.

4.4.4. Isıl kararlılık tayini

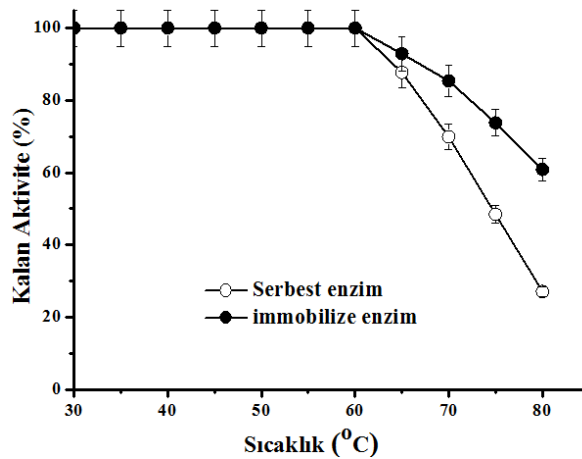
Şekil 4.4, serbest ve immobilize NPX'in kararlılığına sıcaklığın etkisini göstermektedir. Immobilize enzim daha yüksek sıcaklıklarda serbest enzimden daha karardır. 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, immobilize enzimin serbest enzimden daha karardığı görülmektedir. İmmobilizasyonun, enzimlerin ısıl kararlılığını da artırdığı çok iyi bilinmektedir.

4.4.5. Kinetik sabitlerinin tayini

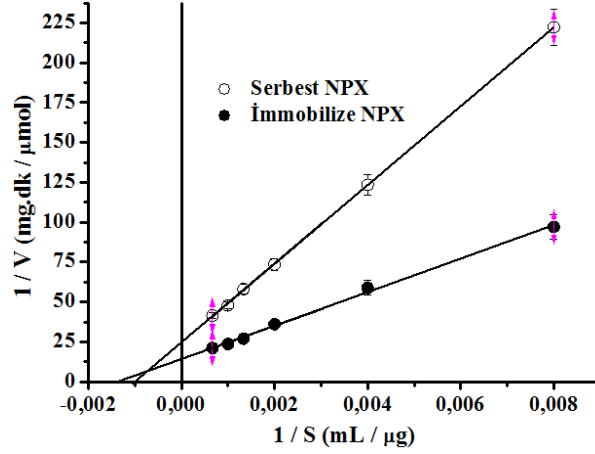
Serbest ve immobilize NPX için kinetik sabitler Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak belirlendi (Şekil 4.5). İmmobilizasyon NPX'in K_m sabitinin değerini 1019.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 'den 704.2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 'ye düşürürken, V_{max} değerini 0.0430 $\mu\text{mol} / \text{mg.dk}$ 'dan 0.0690 $\mu\text{mol/mg.dk}$ 'ya yükseltmiştir. K_m değeri, bir enzimin substrata olan ilgisini göstermektedir.



Şekil 4.3. Serbest ve İmmobilize NPX'in kararlılığına pH'nın etkisi



Şekil 4.4. Serbest ve İmmobilize NPX'in kararlılığına sıcaklığın etkisi



Şekil 4.5. Serbest ve immobilize NPX'in Lineweaver-Burk grafiği

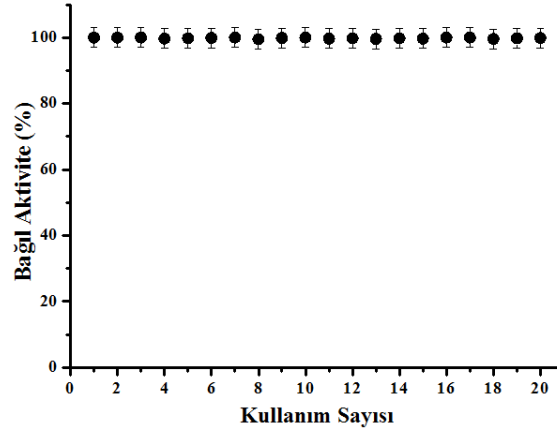
K_m küçüldükçe enzimin substrata olan ilgisi artar. İmmobilize NPX'in K_m değerinin serbest enziminkinden küçük, V_{max} değerinin ise büyük olması, immobilize enzimin serbest enzimden daha yüksek aktiviteye sahip olması ile birbirini desteklemektedir.

4.4.6. İmmobilize NPX'in kullanım kararlılığı

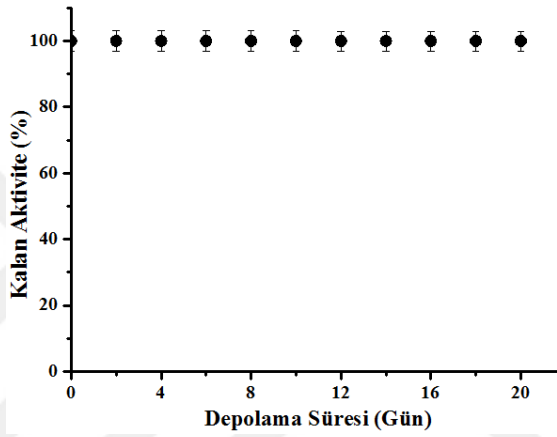
Şekil 4.6'ya göre immobilize enzim optimum koşullarda tekrarlanan yirmi kullanım süresince aktivitesini kaybetmediğinden immobilize NPX'in yüksek bir kullanım kararlılığına sahip olduğu görüldü. Bu sonuçlar daha önceki çalışmalardan daha yüksektir. Liu ve ark. (1997)'nin elde ettiği immobilize NPX'in başlangıç aktivitesi dördüncü kullanımda % 2 azalırken, Liu ve ark. (2008)'nin elde ettiği immobilize NPX'in başlangıç aktivitesi sekizinci kullanımda % 40 azalmıştır.

4.4.7. İmmobilize NPX'in depolama kararlılığı

Şekil 4.7'de görüldüğü gibi, immobilize enzim optimum depolama koşullarında yirmi gün boyunca aktivitesini kaybetmediğinden immobilize NPX'in yüksek bir depolama kararlılığına sahip olduğu gözlemlendi. İmmobilize enzimlerin teknolojik yararlarının değerlendirilmesinde en önemli parametrelerden biri de depolama sırasında aktivitesinin ne kadar koruyabildiğidir. CNT ile yapılan immobilizasyon çalışmalarında depolama kararlılığı genel olarak yüksek çıkmıştır (Boncel ve ark., 2016). Bu tez çalışmamızda elde edilen immobilize NPX'in depolama kararlılığı literatürde yer alan iki çalışmaya (Liu ve ark., 1997; Liu ve ark., 2008) göre daha iyi olduğu söylenebilir. Çünkü onlar depolama kararlılığını tayin etmemişlerdir.



Şekil 4.6. Serbest ve immobilize NPX'in kullanım kararlılığı



Şekil 4.7. İmmobilize NPX'in depolama kararlılığı

4.5. İmmobilize NPX Kullanılarak Ksilandan Ksilooligosakkarit Üretimi

4.5.1. Ksilan derişiminin XOS verimine etkisi

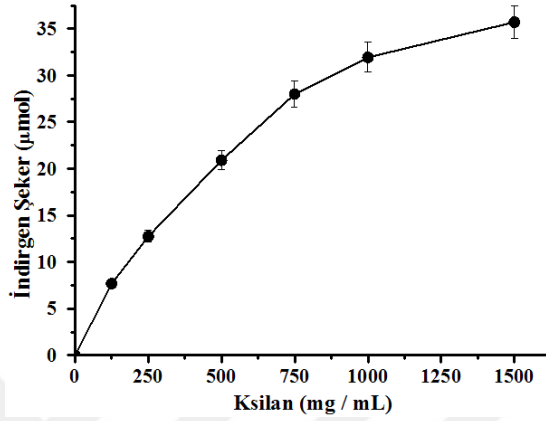
Şekil 4.8'e göre, ksilan derişimi ile oluşan XOS derişimi de artmaktadır. En yüksek verim 1500 μg / mL olduğundan bir sonraki aşamada ksilan derişimi 1500 μg / mL olarak kullanılmıştır.

4.5.2. İmmobilize NPX miktarının XOS verimine etkisi

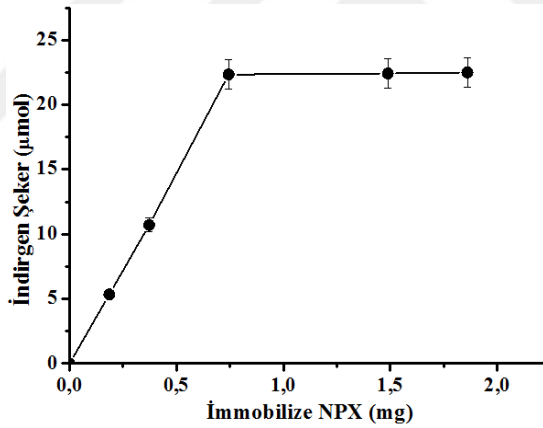
Şekil 4.9'da görüldüğü gibi, oluşan XOS derişimi immobilize NPX miktarı ile 0.744 mg'a kadar doğrusal olarak artarak sabitlendiğinden bir sonraki aşamada optimum immobilize NPX miktarı 0.744 mg olarak kullanıldı.

4.5.3. Ksilan hidroliz süresinin XOS verimine etkisi

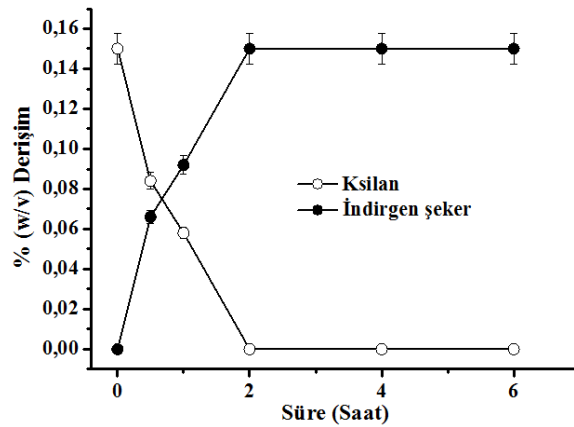
Reaksiyon süresinin XOS üretimine etkisi Şekil 4.10’da verilmiştir. Verilere göre 2 saat sonunda 10 mL % 0.15’lik ksilan çözeltisindeki ksilan tamamen XOS’a dönüşmüştür. Dolayısıyla c-MWCNT-NPX, endüstriyel XOS üretiminde en az 20 kez kullanılabilirliğinden ürün maliyetini önemli oranda düşürecektir



Şekil 4.8. Ksilan derişiminin XOS verimine etkisi



Şekil 4.9. İmmobilize NPX miktarının XOS verimine etkisi



Şekil 4.10. Ksilan hidroliz süresinin XOS verimine etkisi

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

NPX'in immobilizasyon koşulları optimize edilerek literatürdeki sonuçlardan daha yüksek immobilizasyon verimi (% 100) ve aktivite verimi (% 160.35) elde edildi.

İmmobilize enzim peş peşe tekrarlanan 20 kullanım boyunca ve buzdolabında saklandığında +4 °C'de depolandığında 20 gün süresince aktivitesini korudu.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında elde edilen immobilize NPX, prebiyotik olan endüstriyel XOS üretiminde aktivitesinde herhangi bir azalma olmadan kullanılabilirliğinden ürün maliyetini önemli oranda düşürecektir.

5.2. Öneriler

Öncelikle bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar bilim dünyasına katkı sağlamak amacıyla SCI indeksli bir dergide makale olarak ve uluslararası bir kongre veya sempozyumda sözlü bildiri olarak yayınlanabilir.

İkinci olarak, bu tez çalışmasında geliştirilen NPX'in karboksillenmiş çok duvarlı karbon nanotüp üzerine immobilizasyonu ve immobilize NPX kullanarak ksilandan XOS üretimi metotları için ulusal patent enstitüsüne başvuru yapılabilir.

Üçüncü olarak, enüstri kuruluşları ile görüşülerek XOS'un ülkemizde üretilmesine çalışılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Akpinar, O., Ak, O., Kavas, A., Bakir, U., Yilmaz, L., 2007. Enzymatic production of xylooligosaccharides from cotton stalks, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (14), 5544–5551.
- Akpinar, O., Erdogan, K., Bostanci, S., 2009. Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials, *Carbohydrate Research*, 344 (5), 660–666.
- Azevedo, R.A.M., 2014. Immobilization of peroxidase on functionalized carbon nanotubes for synthesis of biocatalysts with high performance, Master's Thesis. *Porto University*, 1-123.
- Balakrishnan, H., Srinivasan, M.C., Rele, M.V., 1997. Extracellular protease activities in relation to xylanase secretion in an alkalophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 18:599-601.
- Bastawde, K.B., 1992. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8:353-368.
- Beg, Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G.S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56:326-338.
- Blandino, A., Macias M., Cantero, D., 2001. Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules, *Process Biochemistry*, 36, 601-606.
- Blandino, A., Macias, M., Cantero, D., 2000. Glucose oxidase release from calcium alginate gel capsules, *Enzyme and Microbial Technology*; 27, 319-324
- 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.
- Brienzo, M., Carvalho, W., Milagres, A.M.F., 2010. Xylooligosaccharides production from alkali-pretreated sugarcane bagasse using xylanases from *Thermoascus aurantiacus*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162 (4), 1195–1205.
- Burlacu, A., Cornea, C.P., Israel-Roming, F., 2016. Microbial xylanase: A Review, *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, 20, 335-342.
- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P.L., Srivastava, A.K., 2016. Bacterial xylanases: biology to biotechnology, *3 Biotech.* 6, 150-164.
- Chui, W.K., Wan, L.S.C., 1997. Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres, *Journal of Microencapsulation*, 14(1), 51-61.
- de Menezes, C.R., Silva, I.S., Pavarina, E.C., Guimaro Dias, E.F., Guimaro Dias, F., Grossman, M.J., and Durrant, L.R., (2009) Production of xylooligosaccharides from enzymatic hydrolysis of xylan by the white-rot fungi *Pleurotus*, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63 (6), 673–678.
- Dhiman, S.S., Sharma, J., Battan, B., 2008. Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review, *BioResources*, 3(4), 1377-1402.

- Doty, N.C., 2012. Value-Added opportunities and Alternative Uses for Wheat and Barley. *The Agricultural Utilization Research Institute*. Minnesota, 7-33.
- Drevon, G.F., 2002. Enzyme immobilization into polymers and coatings, Ph.D Thesis. *University of Pittsburgh*, Pittsburgh, 1-245.
- Feng, W., Ji, P., 2011. Enzymes immobilized on carbon nanotubes, *Biotechnology Advances*. 29, 889–895.
- Garlet, T. B., Weber, C.T., Klaic, R., Foletto, E.L., Jahn, S.L., Mazutti, M.A., Kuhn, R.C. 2014. Carbon Nanotubes as Supports for Inulinase Immobilization, *Molecules*, 19, 14615-14624.
- Jamie, A., Alshami, A.S., Maliabari, Z.O., Ateih, M.A., Al Hamouz, O.C.S. 2016. Immobilization and Enhanced Catalytic Activity of Lipase on Modified MWCNT for Oily Wastewater Treatment, *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 35(5), 1-9.
- Jiang, K., Schadler, L.S., Siegel, R.W., Zhang, X., Zhang, H., Terrones, M., 2004. Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation, *Journal of Materials Chemistry*, 14, 37-39.
- Jung, S.K., Chae, Y.R., Yoon, J.M., Cho, B.W., Ryu, K., G., 2005. Immobilization of glucose oxidase on multi-wall carbon nanotubes for biofuel cell applications, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(2), 234–238.
- Klibanov A.M., 1983, Immobilized enzymes and cells as practical catalysts, *Science*, 219, 722-727.
- Liu, H.J., Selinger, L.B., Cheng, K.J., Beauchemin, K.A., Moloney, M.M., 1997. Plant seed oil-bodies as an immobilization matrix for a recombinant xylanase from the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Molecular Breeding*, 3, 463-470.
- Liu, J.R., Hung Y.J., Peng C.C., Tzen, J.T.C., Chen, M.J., 2008. Immobilization of *Neocallimastix patriciarum* xylanase on artificial oil bodies and statistical optimization of enzyme activity, *Bioresource Technology*, 99 (18), 8662–8666.
- Mazutti, M.A., Weber, C.T., Klaic, R., Foletto, E.L., Jahn, S.L., Kuhn, R.C., 2014. Carbon Nanotubes as Supports for Inulinase Immobilization, *Molecules*, 19(9), 14615-14624.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Motta F.L., Andrade C.C.P., Santana M.H.A., 2013. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. In: Chandel A.K., da Silva S.S. (Eds) Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass-Techniques, Applications and Commercialization, *InTech*, Croatia, 251-266.
- Parajo, J.C., Garrote, G., Cruz, J.M., Dominguez, H., 2004. Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. *Trends in Food Science & Technology*, 15 (3–4), 115–120.
- Pavlidis, I., V., Tsoufis, T., Enotiadis, A., Gournis, D., Stamatis, H., 2010. Functionalized multi-wall carbon nanotubes for lipase immobilization. *Advanced Biomaterials*, 12(5), 179-183.

- Prlainovic, N.Z., Bezbradica, D.I., Knezevic-Jugovic, Z.D., Stevanovic, S.I., Ivic, M.L.A., Uskokovic, P.S., Mijin, D.Z., 2013. Adsorption of lipase from *Candida rugosa* on multi walled carbon nanotubes. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19, 279–285.
- Qing, Q., Li, H., Kumar, R., Wyman, C., E., 2013. Xylooligosaccharides production, quantification and characterization in context of lignocellulosic biomass pretreatment. In: Wyman.C.E. (Ed). *Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals*, First Edition., John Wiley & Sons, Ltd., *Palo Alto*, 391-415.
- Rastian, Z., Khodadadadi, A.A., Vahabzade, F., Mortazavi, Y., 2013. Functionalization of Multi -Walled Carbon Nanotubes for Lipase Immobilization. *The Journal of Macro Trends in Technology and Innovation*, 1(1), 65-71.
- Rastian, Z., Khodadadadi, A.A., Vahabzade, F., Bortolini, C., Dong, M., Mortazavi, Y., Mogharei, A., Naseh, M.V., Guo, Z., 2014. Facile surface functionalization of multiwalled carbon nanotubes by soft dielectric barrier discharge plasma: Generate compatible interface for lipase immobilization. *Biochemical Engineering Journal*, 90, 16–26.
- Shrivastava, S., Lata, S., Shukla, P., 2012. An insight on recent advances on immobilization methods for industrial enzymes and its relevance to xylanases. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 6, 57-61.
- Soo-Keun, J., Chae, Y.R., Yoon, J.M., Cho, B.W., Ryu, K.G. 2005. Immobilization of Glucose Oxidase on Multi-Wall Carbon Nanotubes for Biofuel Cell Applications. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(2), 234–238.
- Subramaniyan, S., Prema, P., 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application, *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(1), 33-64.
- Sunna, A., Antranikian, G., 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria, *Critical Reviews in Biotechnology*, 17, 39-67.
- Teng, C., Yan, Q.J., Jiang, Z.Q., Fan, Z., Shi, B., 2010. Production of xylooligosaccharides from the steam explosion liquor of corncobs coupled with enzymatic hydrolysis using a thermostable xylanase. *Bioresource Technology*, 101 (19), 7679–7682.
- TMO., 2016. 2016 Yılı Hububat Raporu, Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü, Ankara. 20-29.
- Tosa, T., Mori, T., Fuse, N., Chibata, I. 1966. Studies on continuous enzyme reactions. I. Screening of carriers for preparation of water insoluble aminoacylase, *Enzymologia*, 31(4), 214–224.
- Vazquez, M.J., Alonso, J.L., Dominguez, H., Parajo, J.C. 2000. Xylooligosaccharides: manufacture and applications, *Trends in Food Science & Technology*, 11 (11), 387–393.
- Wang, Q., Zhou, L., Jiang, Y., Gao, J., 2011. Improved stability of the carbon nanotubes-enzyme bioconjugates by biomimetic silicification, *Enzyme and Microbial Technology*, 49, 11-16.

- Weiser, D., 2015. Nanostructured systems for enzyme immobilization, Doctoral Dissertation, *Budapest University of Technology and Economics, Faculty of Chemical and Bioengineering, Geroge Oláh Doctoral School*, Budapest, 3.
- Zniszczoł, A., Herman, A.P., Szymanska, K., Mrowiec-Białoń, J., Walczak, K.Z., Jarzębski, A., Boncel, S., 2016. Covalently immobilized lipase on aminoalkyl-, carboxy- and hydroxy-multi-wall carbon nanotubes in the enantioselective synthesis of Solketal, *Enzyme and Microbial Technology*, 87-88, 61–69.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Buşra ATALAY
Doğum yeri ve tarihi : 24.04.1993- BATMAN
Telefon : +90 506 318 78 58
e-posta : busranuratalay@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Adı, İlçe, İl	Mezun olduğu tarih
Lise	Raman Anadolu Lisesi	2011
Lisans	İnönü Üniversitesi	2016
Yüksek Lisans	Siirt Üniversitesi	2019

PROJELER:

1. Aslan Y (Proje Yürütücüsü), **Atalay B** (Araştırmacı). Ksilandan ksilooligosakkarit üretimi için *Neocallimastix patriciarum* ksilanazın karboksile çok duvarlı karbon nanotüpler ile immobilizasyonu. 2018, BAP Projesi. Proje No: 2018-SİÜFEB-019. Bütçe: 6.000,00 TL.