

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Mustafa Serkan YALÇIN

**SELÜLAZ ENZİMİNİN RELİZYME VE SEPABEADS DESTEKLER
ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2013

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SELÜLAZ ENZİMİNİN RELİZYME VE SEPABEADS DESTEKLER
ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

Mustafa Serkan YALÇIN

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez 09/01/2013 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Doç. Dr. Ramazan BİLGİN
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
ÜYE

.....
Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
ÜYE

.....
Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
ÜYE

.....
Doç. Dr. Gül ÖZYILMAZ
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Selahattin SERİN
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2010D1

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

ÖZ

DOKTORA TEZİ

SELÜLAZ ENZİMİNİN RELİZYME VE SEPABEADS DESTEKLER ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Mustafa Serkan YALÇIN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman :Doç. Dr. Ramazan BİLGİN

Yıl: 2013, Sayfa: 75

Jüri :Doç. Dr. Ramazan BİLGİN

:Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL

:Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ

:Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

:Doç. Dr. Gül ÖZYILMAZ

Bu çalışmada, *Trichoderma reesei* (*Trichoderma viride*) selülazinin Resindion Sepabeads EC-EP/M ve Resindion ReliZyme HA403/M destekleri üzerine kovalent immobilizasyonu araştırılmıştır. Enzimin bu desteklere immobilizasyonunun optimal şartları yanıt yüzey metodu kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca serbest ve immobilize selülazin optimum çalışma koşulları ve kinetik parametreleri de belirlenmiştir.

İmmobilizasyon çalışmalarında 3 faktör ve 3 seviyeli Box-Behnken deneysel dizaynı uygulanmıştır. Seçilen faktörler ve bunların minimum, orta ve maksimum noktaları immobilizasyon pH'sı için (5.0, 6.5 and 8.0), immobilizasyon süresi (6, 15 ve 24 saat) ve başlangıç enzim derişimi için (0,2-1,0 ve 1,8 mg/mL)'dir. İmmobilize selülaazar için yanıt olarakta spesifik aktivite seçilmiştir. Selülazin Sepabeads EC-EP/M desteğe en uygun immobilizasyon koşullarının 25 °C'de pH 6,5, 6 saat immobilizasyon süresinde ve enzim derişiminin 1,8 mg/mL, ReliZyme HA403/M desteğe en uygun immobilizasyon koşullarının 25 °C'de pH 6,5, 2 saat immobilizasyon süresinde ve enzim derişiminin 1,8 mg/mL olduğu belirlenmiştir.

Optimal pH, tampon konsatrasyonu ve sıcaklık serbest enzim için 4.0, 100 mM ve 45 °C olarak, Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selülaaz için pH 4,0 50 mM, 50 °C olarak, ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülaaz için pH 3,5 25 mM, 60 °C olarak belirlenmiştir. Serbest, Sepabeads EC-EP/M ve ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülaazarın V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 1,05 U/mg prot ve % 0,47, 1,1 U/mg prot ve % 1,5, 3,78 U/mg prot ve % 0,27 dir. 70 °C'deki yarı ömürleride sırasıyla 8,19-7,8-17,8 olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: RSM, Selülaaz, İmmobilizasyon, Sepabeads, ReliZyme.

ABSTRACT

PhD THESIS

IMMOBILIZATION AND CHARACTERIZATION OF CELLULASE ON SEPABEADS AND RELIZYME

Mustafa Serkan YALÇIN

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Supervisor :Assoc. Prof. Dr.Ramazan BİLGİN
Year: 2013, Pages: 75

Jury :Assoc. Prof. Dr.Ramazan BİLGİN
:Prof. Dr.S.Seyhan TÜKEL
:Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
:Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
:Assoc Prof. Dr. Gül ÖZYILMAZ

In this study, the covalent immobilizations of cellulase from *Trichoderma reesei* onto Sepabeads EC-EP/M and ReliZyme HA403/M commercial supports were studied. The optimal immobilization conditions of the cellulase onto the mentioned supports were investigated using response surface methodology. The optimal working conditions and kinetic parameters of free and immobilized cellulase preparations were also determined.

A 3-factor and 3-level Box-Behnken design was applied for the immobilization studies. The selected factors and their minimum, center and maximum investigation points were the immobilization pH (5.0, 6.5 and 8.0), immobilization time (6, 15 and 24 hours) and initial enzyme concentration (0.2, 1.0 and 1.8 mg/mL). The response was specific activity of each immobilized cellulase preparation. The optimal immobilization pH, immobilization time and cellulase concentration onto Sepabeads EC-EP/M were determined as 6.5, 6 h and 1.8 mg/mL, respectively. The corresponding immobilization values onto ReliZyme HA403/M were 6.5, 2 h and 1.8 mg/mL.

The optimal pH, buffer concentration and temperature were determined as 4.0, 100 mM and 45 °C, respectively for the free cellulase; 4.0, 50 mM and 50 °C, respectively for the cellulase immobilized onto Sepabeads EC-EP/M and 3.5, 25 mM and 60 °C, respectively for the cellulase immobilized onto ReliZyme HA403/M. K_m - V_{max} values were estimated as 0.47%–1.05 U/mg prot. for the free cellulase, 1.5%–1.1 U/mg prot. for the cellulase immobilized onto Sepabeads EC-EP/M and 0.27%–3.78U/mg prot. for the cellulase immobilized onto ReliZyme HA403/M.

Keywords: RSM, Cellulase, Immobilization, Sepabeads, ReliZyme.

TEŞEKKÜR

Doktora çalıőmam boyunca değerli zamanını, dűőünce ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen danıőmanım sayın hocam Doç. Dr. Ramazan BİLGİN'e sonsuz teőekkürlerimi sunarım. Çalıőmalarımnda bana her zaman destek olan sayın hocalarım, Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL ve Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e teőekkür ederim. Deneysel çalıőmalarım sırasında bana her zaman çok destek olan Öğr. Gör. Dr. Deniz YILDIRIM'a ve Öğr. Gör. Dr. Dilek ALAGÖZ'e doktora öğrencisi arkadaşlarım Öğr. Gör. Nuri GÜLEŐÇİ ve Öğr. Gör. Ercan ÇINAR'a, Arő. Gör. Ali TOPRAK'a ve diğer arkadaşlarıma çok teőekkür ederim.

Beni her zaman destekleyen sevgili babam, annem ve kardeşlerime sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	3
1.1.1. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri.....	5
1.1.2. Çapraz Bağlama Yöntemleri.....	7
1.1.3. Tutuklama Yöntemleri.....	8
1.2. Selülazlar (EC 3.2.1.4).....	9
1.2.1. Selülazların Uygulama Alanları.....	10
1.3. Yanıt Yüzey Metodu (Response Surface Methodology, RSM).....	10
1.3.1. Deneysel Tasarım.....	11
1.4. Destek Materyallerinin Seçimi.....	14
1.4.1. ReliZyme ve Sepabeads Destek Materyalleri.....	15
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	17
3. MATERYAL VE METOD.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar.....	23
3.1.2. Kullanılan Cihaz ,Araç ve Gereçler.....	23
3.2. Metod.....	23
3.2.1. Protein Tayini.....	23
3.2.2. ReliZyme HA403/M Desteğinin Selülaz İmmobilizasyonu İçin Hazırlanması.....	24
3.2.3. Sepabeads EC-EP/M Desteğinin Selülaz İmmobilizasyonu İçin Hazırlanması.....	25

3.2.4. Selülazın ReliZyme HA403/M Desteği Üzerine Kovalent İmmobilizasyonu	25
3.2.5. Selülazın Sepabeads EC-EP/M Desteği Üzerine Kovalent İmmobilizasyonu	26
3.2.6. Serbest veya İmmobilize Selülaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	27
3.2.7. Standart Glukoz Eğrisi Çizimi	29
3.2.8. Selülazın İmmobilizasyonu İçin İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu	29
3.2.9. Serbest ve İmmobilize Selülazın Karakterizasyonu	32
3.2.10. İmmobilize Selülazın Hidrolitik Aktivitesi Açısından Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi.....	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	35
4.1. Bulgular	35
4.1.1. Selülazın Sepabeads EC-EP/M ve ReliZyme HA403/M Desteklere İmmobilizasyonu İçin İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu ..	35
4.1.1.1. Selülazın Sepabeads EC-EP/M Desteğe İmmobilizasyonu İçin İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu.....	35
4.1.1.2. Selülazın Relizyme HA403/M Desteğe İmmobilizasyonu İçin İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu.....	44
4.1.2. Serbest, Sepabeads EC-EP/M ve Relizyme HA403/M Desteklere İmmobilize Edilmiş Olan Selülazların Karakterizasyonu	51
4.2. Tartışma.....	63
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	67
5.1. Sonuçlar	67
5.2. Öneriler.....	67
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. Desteklerin sınıflandırılması.....	14
Çizelge 3.1. Değişkenlerin kodları.....	30
Çizelge 3. 2. Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilizasyon için RSM programı tarafından önerilen seney setleri.....	31
Çizelge 3. 3. ReliZyme HA403/M desteğe immobilizasyon için RSM programı tarafından önerilen seney setleri.....	32
Çizelge 4.1. Selülazın Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilizasyonunda, immobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak aktivite değerleri	36
Çizelge 4.2. Selülazın Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilizasyonunda RSM kullanılarak elde edilen deney setlerinin aktivite değerleri	37
Çizelge 4.3. Selülazın Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilizasyonunda yanıt yüzey yöntemi için ANOVA değerleri.....	38
Çizelge 4.4. Deneysel sonuçlar ile tahminlenen sonuçların karşılaştırılması.....	39
Çizelge 4.5. Selülazın ReliZyme HA403/M desteğe immobilizasyonunda, immobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak aktivite değerleri	44
Çizelge 4.6. Selülazın ReliZyme HA403/M desteğe immobilizasyonunda RSM kullanılarak elde edilen deney setlerinin aktivite değerleri	45
Çizelge 4.7. Selülazın ReliZyme HA403/M desteğe immobilizasyonunda yanıt yüzey yöntemi için ANOVA değerleri.....	46
Çizelge 4.8. Deneysel sonuçlar ile tahminlenen sonuçların karşılaştırılması.....	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Enzimlerin özelliklerini geliştirmek için kullanılan biyolojik ve kimyasal teknikler	3
Şekil 1.2. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması	4
Şekil 1.3. Enzimin desteğe kovalent kovalent bağlanması.....	5
Şekil 1.4. Enzimin desteğe adsorbsiyon yöntemi ile bağlanması	6
Şekil 1.5. Enzimin desteğe iyonik bağlanması.....	6
Şekil 1.6. Enzimin desteğe affinite yöntemi ile bağlanması.....	6
Şekil 1.7. Enzimin desteğe geçiş metalleri kullanılarak bağlanması.....	7
Şekil 1.8. Destek ve enzim arası çapraz bağlama.....	7
Şekil 1.9. Enzimin matriks içinde tutuklanması.....	8
Şekil 1.10. Selüloz, β -D glukoz polimeri.....	9
Şekil 1.11. Deneysel strateji	13
Şekil 1.12. ReliZyme ve Sepabeads desteğin tanecik görüntüsü	16
Şekil 3.1. ReliZyme HA403/M desteğin glutaraldehit ile aktifleştirilmesi...	25
Şekil 3.2. Sepabeads EC-EP/M desteği.....	25
Şekil 3.3. Glutaraldehit ile aktifleştirilmiş ReliZyme HA403/M desteğe selülazın immobilizasyonu.....	26
Şekil 3.4. Sepabeads EC-EP/M desteğe selülazın immobilizasyonu.....	27
Şekil 4.1. Deneysel ve tahmini spesifik aktivite sonuçlarının karşılaştırılması.....	40
Şekil 4.2. Enzim derişimi ve pH' nın bir fonksiyonu olarak spesifik üç boyutlu aktivitenin grafiği.....	41
Şekil 4.3. İmmobilizasyon zamanı ve pH' nın bir fonksiyonu olarak spesifik aktivitenin üç boyutlu grafiği.....	42
Şekil 4.4. Enzim derişimi ve immobilizasyon zamanının bir fonksiyonu olarak spesifik aktivitenin üç boyutlu grafiği.....	43
Şekil 4.5. Deneysel ve tahmini spesifik aktivite sonuçlarının karşılaştırılması.....	48

Şekil 4.6. Enzim derişimi ve pH' nın bir fonksiyonu olarak spesifik aktivitenin üç boyutlu grafiği.....	48
Şekil 4.7. İmmobilizasyon zamanı ve pH' nın bir fonksiyonu olarak spesifik aktivitenin üç boyutlu grafiği.....	49
Şekil 4.8. Enzim derişimi ve immobilizasyon zamanının bir fonksiyonu olarak spesifik aktivitenin üç boyutlu grafiği.....	50
Şekil 4.9. Serbest, Sepabeads EC-EP/M ve ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülağların aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimi.....	51
Şekil 4.10. Serbest, Sepabeads EC-EP/M ve ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülağların aktivitelerinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi.....	52
Şekil 4.11. Serbest, Sepabeads EC-EP/M ve ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülağların aktivitelerinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi.....	53
Şekil 4.12. Serbest selülağ için Lineweaver-Burk grafiği.....	54
Şekil 4.13. Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selülağ için Lineweaver-Burk grafiği.....	55
Şekil 4.14. ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülağ için Lineweaver-Burk grafiği.....	56
Şekil 4.15. Serbest selülağın 45 ve 70 °C'de aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi.....	57
Şekil 4.16. Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selülağın bağlı aktivitesinin 50 ve 70 °C'de inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi.....	57
Şekil 4.17. ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülağın bağlı aktivitesinin 60 ve 70 °C'de inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi.....	58
Şekil 4.18. Serbest selülağın bağlı aktivitesinin 5 °C ve oda sıcaklığında (25 °C) depolama süresine bağlı olarak değişimi.....	59

Şekil 4.19. Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selülazın bağlı aktivitesinin 5 °C ve oda sıcaklığında (25 °C) depolama süresine bağlı olarak değişimi.....	60
Şekil 4.20. ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülazın bağlı aktivitesinin 5 °C ve oda sıcaklığında (25 °C) depolama süresine olarak değişimi.....	61
Şekil 4.21. Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selülazın tekrar kullanım kararlılıklarının belirlenmesi.....	62
Şekil 4.22. ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülazın tekrar kullanım kararlılıklarının belirlenmesi.....	62

1.GİRİŞ

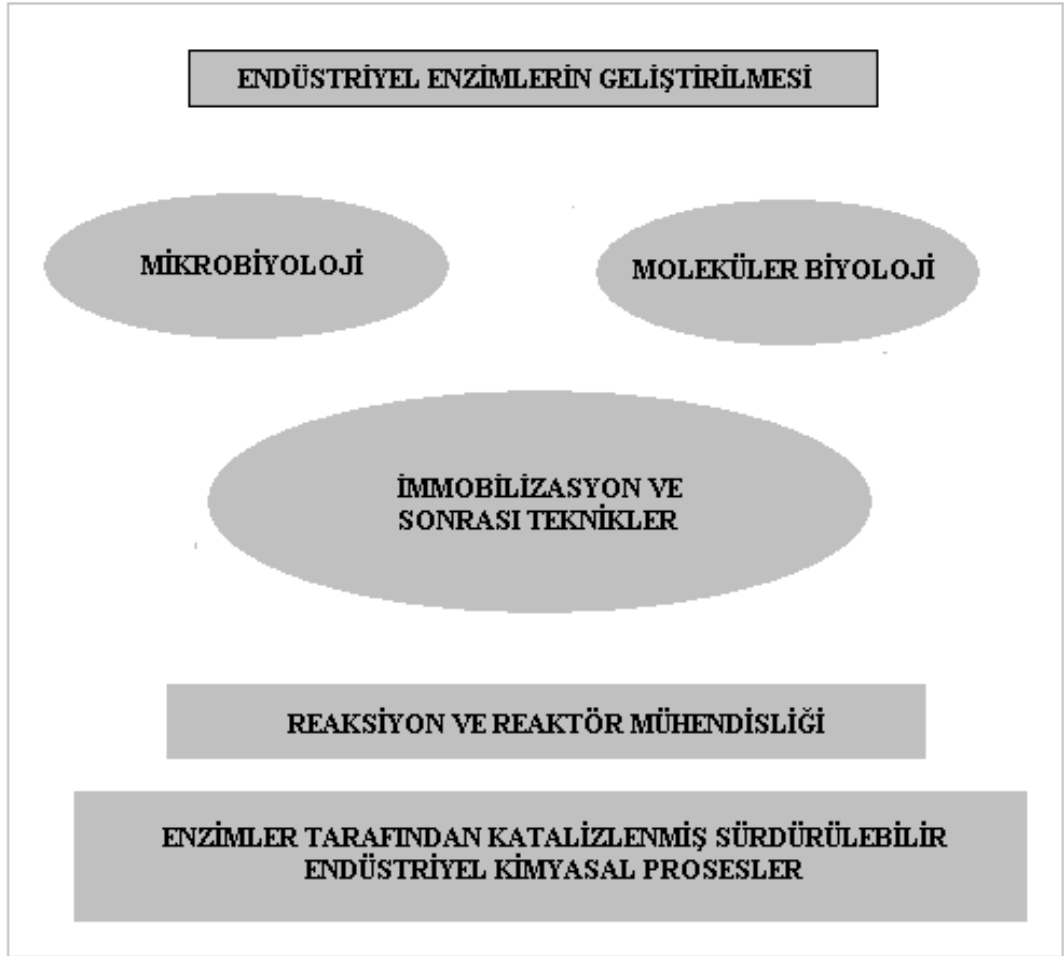
Enzimler, biyolojik sistemlerdeki en basitinden en kompleksine kadar birçok kimyasal reaksiyonu, canlılığa ve çevreye zarar vermeyecek ılımlı koşullar altında katalizleme yeteneğine sahip çoğu protein yapısında olan spesifik biyokatalizörlerdir. Yeterli *in vitro* koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları, substratlarına karşı yüksek seçicilik göstermeleri, ılımlı reaksiyon koşullarında yüksek aktivite gösterebilmeleri ve yüksek geri dönüşüm sayılarına sahip olmaları nedeniyle enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkanını ortaya çıkarmaktadır. Buna rağmen enzimler temel kimya, gıda kimyası, analiz, tedavi amaçlı gibi biyolojik olmayan uygulamalarda kullanılırken şartlar uygun değilse düşük aktivite göstermeleri, stabil olmamaları, sentetik sübstratlarına karşı zayıf seçiciliğe sahip olmaları gibi sınırlayıcı faktörlere sahiptir. Bu nedenle endüstriyel amaçlı kimyasal proseslerin, enzimler tarafından kataliz edilmesi amacıyla laboratuvarından endüstriye olan dönüşüm biyoteknolojinin en kompleks ve bir o kadar da heyecan verici yönüdür. Bu hedefe ulaşmak amacıyla da enzimlerin daha ekonomik ve kullanışlı hale getirilmesi çalışmaları hızlanmıştır (Guisan, 2006).

Enzimler canlılar tarafından üretildiklerinden endüstriyel veya analitik amaçlı kullanımları için doku, kan, mikroorganizma gibi canlı veya canlı kökenli kaynaklardan saflaştırılırlar. Enzim üretiminde hammadde olarak canlıların kullanımı ekonomik açıdan sınırlayıcı bir durum olsa da bu sorun mikrobiyal kaynaklar sayesinde büyük ölçüde çözülmüş görünmektedir. Bununla birlikte enzimlerin mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılması oldukça masraflı bir iştir. Endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması çok zordur. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılmadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör kullanılması düşünülebilir. Ancak serbest enzim tarafından kirlenmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırmaktadır. Katalizör

olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu durum enzimlerin spesifik ama o ölçüde pahalı katalizör olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir. Ayrıca serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanamazlar. Bu nedenle endüstriyel uygulamalar için enzimlerin basit ve uygun maliyetli protokoller ile uzun süreli ve tekrar tekrar kullanılabilmesi amacıyla immobilize etme gerekliliği doğmaktadır (Katchalski-Katir,1993; Bickerstaff, 1995). Bu nedenlerle bilimsel literatüre girmiş çok sayıda enzim immobilizasyon tekniği bulunmaktadır. Fakat kullanılacak enzimin seçiciliğinin, aktivitesinin ve stabilitesinin en yüksek olacağı şartları sağlayan yöntemlerin seçilmesi en uygundur. Enzim immobilizasyonu, enzimin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanması, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılması ve suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklanması işlemidir (Klibanov,1983).

İmmobilize enzimin serbest enzime göre bazı üstünlükleri aşağıda sıralanmıştır.

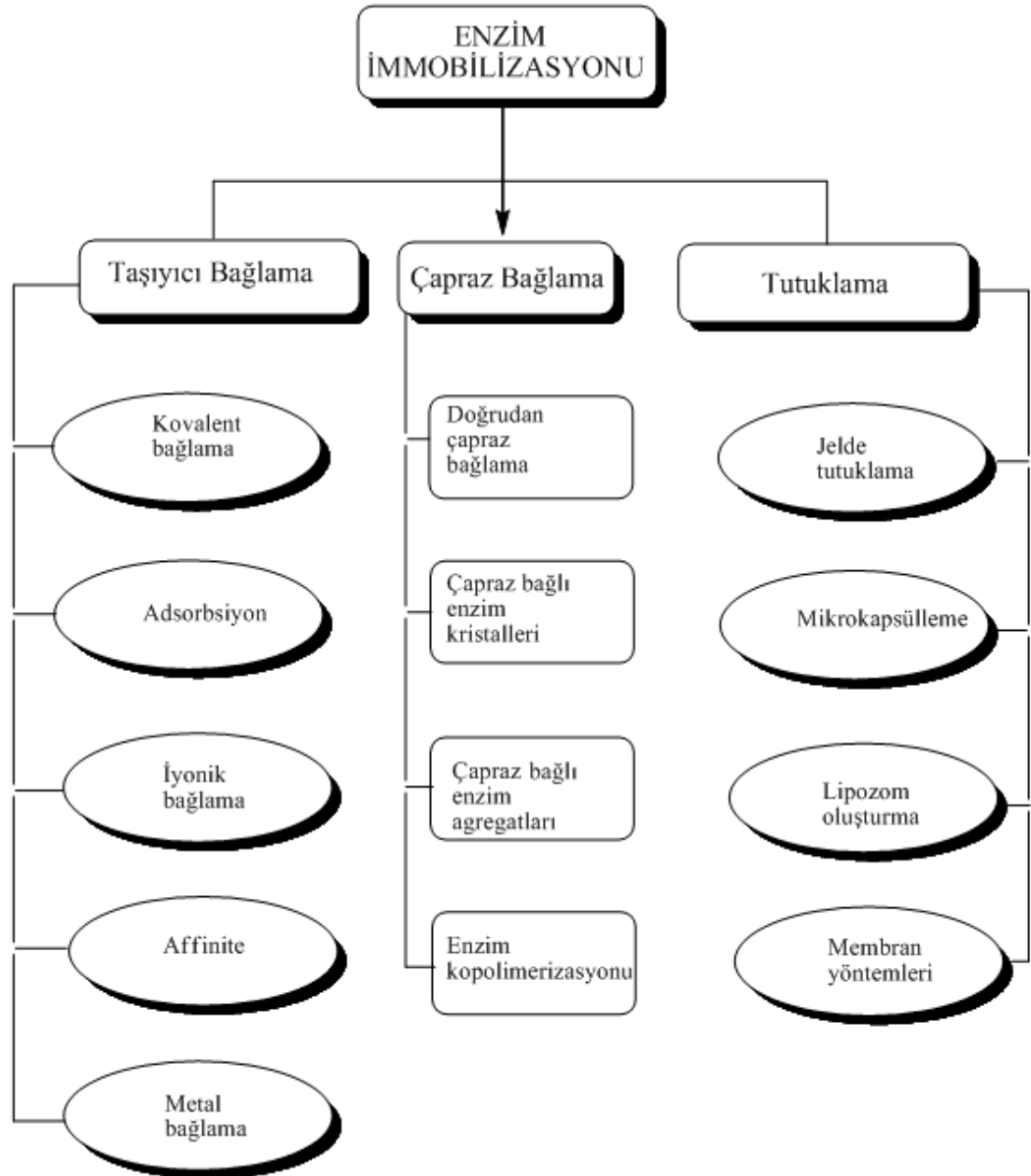
- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme ve santrifüjleme v.b.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.b.) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzime daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır.



Şekil 1.1. Enzimlerin özelliklerini geliştirmek için kullanılan biyolojik ve kimyasal teknikler (Guisan, 2006).

1.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyonu yöntemleri için çok farklı sınıflandırmalar olmakla beraber Şekil 1.2’de olduğu gibi bir sınıflandırma yapmak mümkündür.



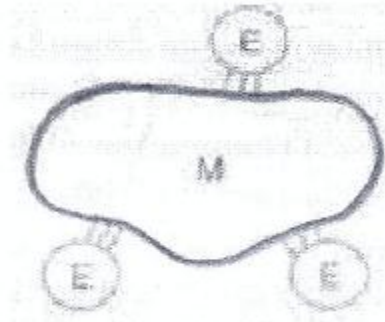
Şekil 1.2. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Tischer ve Wedekind., 1998).

1.1.1. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri

Taşıyıcıya bağlama yöntemleri kovalent bağlama, adsorpsiyon, iyonik bağlama, affinite ve metal bağlama olmak üzere beş gruba ayrılır.

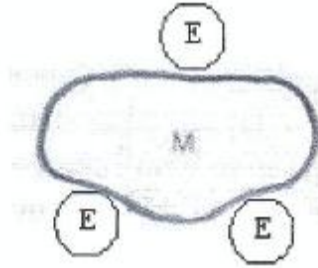
Kovalent Bağlama: Kovalent enzim immobilizasyonu kovalent bağın doğası gereği enzim molekülü ve destek arasındaki bağın kararlı olması ve bu yüzden enzimin destek yüzeyinden kolaylıkla ayrılmasının mümkün olmaması sebebiyle enzim immobilizasyonunda çok yaygın olarak kullanılan metodlardan birisidir. Bu bağlanma Şekil 1.3'de gösterilmiştir. Ancak, kovalent enzim immobilizasyonunda dikkat edilecek önemli nokta bağlanmanın enzimin aktif bölgesinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir (Guisan, 2006).

Kovalent enzim immobilizasyonunda kullanılan desteğin yüzeyindeki aktif fonksiyonel gruplara bağlı olarak çok farklı bağlanma türleri meydana gelebilmektedir. Destek yüzeyinde aktif fonksiyonel grupların hazırlanmasında monomerlerin uygun koşullarda polimerleştirilmesi çeşitli aktivasyon yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir (Cao, 2005).



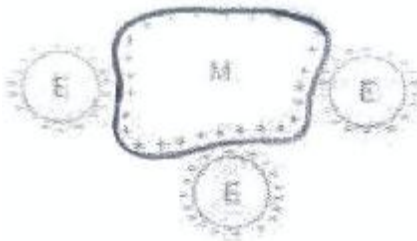
Şekil 1.3. Enzimin desteğe kovalent kovalent bağlanması.

Adsorpsiyon: Enzim immobilizasyonunda ilk kullanılan enzim immobilizasyon metodlarından birisidir. Fiziksel adsorpsiyonda enzim desteğe hidrojen bağları, Vander Waals ve hidrofobik etkileşimler gibi zayıf etkileşimlerle bağlanmaktadır (Şekil 1.4) (Woodward, 1985).



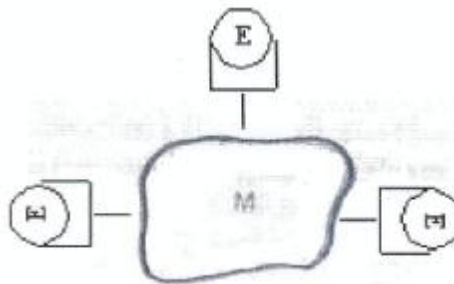
Şekil 1.4. Enzimin desteğe adsorbsiyon yöntemi ile bağlanması.

İyonik Bağlama: Bu yöntem, suda çözünmeyen ve net bir yüke sahip taşıyıcılara enzim molekülünün iyonik etkileşimlerle bağlanması temeline dayanır (Solaz ve ark., 1994).



Şekil 1.5. Enzimin desteğe iyonik bağlanması.

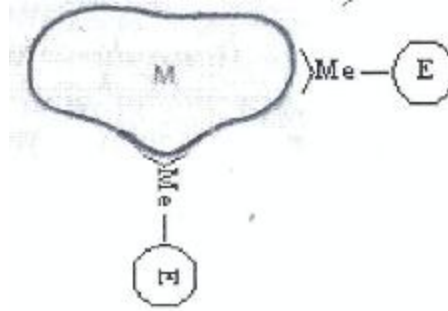
Affinite: Enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanarak enzim immobilize edilebilir (Hermanson ve ark., 1992).



Şekil 1.6. Enzimin desteğe affinite yöntemi ile bağlanması.

Metal Bağlama: Bu immobilizasyon yönteminde geçiş metallerinin özellikle titanyum ve zirkonyumun tuzları veya hidroksitleri kullanılır (Kennedy ve Cabral., 1985; Cabral ve ark., 1986). Metalin tuzu veya hidroksit formu destek yüzeyine

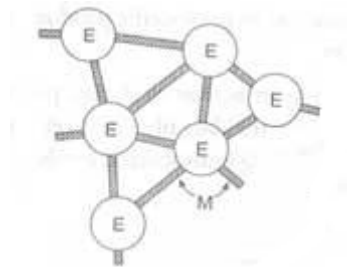
(selüloz, kitin, alginik asit, silikat gibi) ısıtma veya nötralizasyon yöntemi ile çöktürülür.



Şekil 1.7. Enzimin desteğe geçiş metalleri kullanılarak bağlanması.

1.1.2. Çapraz Bağlama Yöntemleri

Çapraz bağlama ile immobilizasyon yönteminde küçük molekülü bi- veya multi fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen kompleksler oluşturmaktadır (Sheldon ve ark., 2005; Shah ve ark., 2006). En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, kloroformat ve karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar ve epiklorohidrinlerdir. Genellikle pahalı olmadığı ve ticari olarak kolay bulunduğu için glutaraldehit çapraz bağlama reaktifi yaygın olarak kullanılmaktadır. Çapraz bağlama yöntemleri doğrudan çapraz bağlama, çapraz bağlı enzim kristalleri (CLEC), çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) ve enzim kopolimerizasyonu olmak üzere 4 alt sınıfa ayrılabilir.

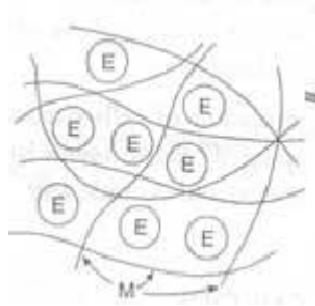


Şekil 1.8. Destek ve enzim arası çapraz bağlama.

1.1.3. Tutuklama Yöntemleri

Tutuklama yönteminde enzim moleküllerin, substrat ve reaksiyon ürünlerinin geçişine izin veren ancak enzim moleküllerinin dışarıya çıkmasını önleyen bir matris içerisinde tutuklanması esasına dayanmaktadır (Şekil 1.9) (O'Driscoll, 1976). Polimerik matris oluşumu kimyasal (çapraz bağlama) ve fiziksel yöntemlerle gerçekleştirilmektedir.

Polimer matrisinde tutuklama yöntemi, monomer, ko-monomer ve enzim içeren çözeltide monomer ve ko-monomerin polimerleştirilmesi sonucu enzimin polimer içerisinde tutuklanması esasına dayanır. Bu yöntemde çok sıklıkla kullanılan monomerlerin bazıları akrilamid, akrilik asit ve glisidilakrilat, 2-hidroksietilmetilakrilat, N-vinilpirolidon, 2-hidroksi propilamid ve polietilen glikol metilakrilat'dır.



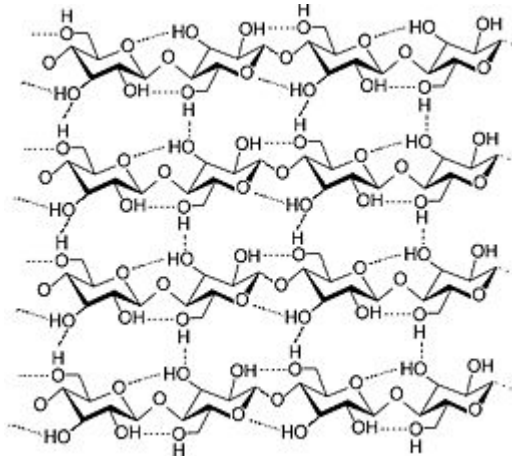
Şekil 1.9. Enzimin matris içinde tutuklanması.

1.2. Selüloz (EC 3.2.1.4)

Selülazlar, selülozu glikoza parçalayabilme kapasitesindeki hidrolitik enzim grubudurlar. Memeliler hariç mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar tarafından üretilen selüloz sistemi birden fazla farklı enzimden oluşur (Emert ve ark.,1974; Whitaker, 1971).

Dünya üzerinde en bol bulunan doğal organik kaynak olan selüloz bitkisel kaynaklı olup, glukoz rezidülerinin β -1,4-glikozidik bağlar ile lineer bir şekilde bağlanması ile oluşan bir polisakkarittir (Şekil 1.10). Selüloz fibröz yapıda sert bir madde olup bitkilerin hücre duvarında yer almakta ve bitki biyokütlesinin yaklaşık %

40'ını oluşturmaktadır. Mikrokristalin selüloz suda çözünmeyen fakat suda hidrojen bağları ile sık paketlenmiş fiberler meydana getiren 15 ile 10.000 glukoz ünitesinden oluşan susuz glukoz zincirlerinden oluşmuştur. Yoğun ve kompleks bir yapısı olması nedeniyle eğer önceden kimyasal veya mekanik şişme veya bozunma işlemine tabi tutulmazsa hidrolize karşı oldukça dirençlidir. Doğal selüloz genel olarak diğer polisakkaritler ile özellikle de xylan ve lignin ile bağlantılıdır. Bitki hücre duvarlarının iskelet yapısını oluştururlar. Spano ve ark.(1975)' a göre selüloz yiyecek, yakıt ve kimyasalların en bol bulunan organik kaynağıdır. Selüloz, endoglukanaz, ekzoglukanaz ve β -glukosidaz enzimleri ile monomeri olan glikoza hidroliz olabilmektedir.



Şekil 1.10. Selüloz, β -D glukoz polimeri.

Selülaz enzim sistemi bileşenleri, başlangıçta katalitik etki şekillerine göre sınıflandırılırken, günümüzde sınıflandırma yapısal özellikler dikkate alınarak yapılmaktadır. Üç ana enzimatik aktivite tipi söz konusudur. Bunlar:

- Endoglukanazlar (endo-1,4- β -glucanases, yada 1,4- β -D-glucan-4-glucanohydrolases, EC 3.2.1.4).
- Ekzoglukanazlar (Sellodekstrinazlar, 1,4- β -D-glucan glucanohydrolases) (EC 3.2.1.74) ve Sellobiyohidrolazlar (exo-1,4- β -glucanases, ya da 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolases, EC 3.2.1.91).
- Sellobiyazlar (b-glucosidases, yada β -D-glucoside glucohydrolases, EC 3.2.1.21).

Endoglukanazlar, selülozu meydana getiren polisakkarit zincirinin iç bölgelerinde rastgele hidroliz yaparlar ve değişik uzunlukta oligosakkaritler meydana getirirler. Ekzoglukanazlar ise selüloz zincirinin indirgenen ve indirgenmeyen ucundan itibaren sırasal olarak hidroliz yaparlar ve son ürün olarak glukoz (glukanohidrolaz) ya da sellobioz (Sellobiohidrolaz) açığa çıkarırlar. Ekzoglukanazlar aynı zamanda mikrokristalin selülozu da hidrolize etmektedirler. β -Glikozidazlar sellodekstrin ve sellobiozu glukozu parçalayan enzimlerdir. Selülazların çoğunluğunun genel özelliği, hem katalitik hem de karbohidrat bağlayan yapıları içeren modüler bir şekilde olmalarıdır. Selüloz bağlayan modül (CBM: Cellulose Binding Module) çözünmeyen selülozda muhtemelen katalitik bölgeyi substrata yaklaştırıp selülozun hidrolizini kolaylaştırmaktadır. CBM özellikle ekzoglukanazların hidroliz işlevinin başlangıcında önemlidir (Aygan, 2008).

1.2.1. Selülazların Uygulama Alanları

Selülozu hidrolize eden selülaz enzimleri büyük ölçüde fungus ve bakterilerden elde edilmekte ve çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadır. Selülitik enzimler, alkol üretiminde sıvı kazancını arttırmak ve iyi bir renk elde etmek için kullanılmaktadır. Selülazın diğer kullanım alanları, selülozik biyokütlenin ve yemlerin besin değerini ve sindirilebilirliğini arttırmak, zirai ve endüstriyel atıkların enzimatik olarak daha basit bileşenlere parçalanmasını sağlamaktadır (Niehaus ve ark., 1999). Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde atık materyallerinin geriye dönüşümünü arttırmada kağıtlarla muamele edilen farklı selülaz sistemleri kullanılmaktadır (Yu, 1996) . Selülazların diğer uygulama alanları gıda, tekstil, biyo yakıt, kimya, tıbbi ve farmasötik endüstrisi, protoplast üretimi, genetik mühendisliği ve kirlilik giderimidir (Bhat ve Bhat, 1997).

1.3.Yanıt Yüzey Metodu (Response Surface Methodology, RSM)

Yanıt yüzey yöntemi (RSM) sahip olduğu avantajlardan dolayı günümüzde uygulamalı bilim ve mühendislik dallarında kullanılan matematiksel ve istatistiksel

bir yöntemdir (Box ve Wilson, 1951). Bu yöntem teknolojik proseslerin matematiksel modellemelerinde ve optimizasyonunda sıkça kullanılmaktadır. Box ve Wilson en az sayıda gözlem değeri ile yanıt yüzeyi üzerinde yanıt değişkeninin maksimum değerini aldığı noktaya erişilmesi amaçlanan deneme düzenlerini ortaya koymuşlardır. Bu yöntem bir çok deney türü için ortaya çıkan problemleri eş zamanlı olarak çözmek ve cevapları da eş zamanlı olarak optimize etmekte faydalanılan kullanışlı ve etkili bir metoddur (Chen, 1994). Yanıt yüzey yöntemi model regresyon analizi yardımıyla oluşturulur. Bir faktörün temel etkisinin veya diğer faktörlerle etkileşiminin yanıt değişkeninin değerinde ne derece önemli etkiye sahip olduğuna regresyon katsayıları yardımıyla karar verilir. Yanıt yüzey yöntemi kullanılarak birden fazla değişkenin örneğin pH, konsantrasyon, zaman, sıcaklık gibi yanıt üzerindeki etkileri araştırılıp optimum değerleri tespit edilebilir. Sonuçlar üç boyutlu grafik ve kontur haritası olarak verilebilir. Az sayıda deneysel kombinasyon kullanılarak test edilmeyen faktör değeri ve bunların kombinasyonları hakkında tahmin yapılabilir (Joglekar ve May, 1987).

Yanıt yüzey oluşturmadaki amaç deneysel bir çalışmada sonuç üzerinde etkili olan çok sayıdaki parametreden oluşan bir tasarım düzleminde belirli özellikleri sağlayan bir bölgeyi ve bu bölgeye ait optimum noktayı tahmin etmektir. Elde edilen fonksiyon deneysel verileri temsil etmekle birlikte, model uyumunun fazla olması büyük önem taşımaktadır. Bu amaçlı çalışmalarda;

$$Y=f(X_1,X_2,\dots,\dots,X_n)+\varepsilon$$

eşitliği esas alınır. Burada Y bağımlı yanıt değişkeni, f bağımsız değişkenler olarak bilinen kantitatif değişkenler olan X_1,X_2,\dots,X_n 'in fonksiyonu ve ε ise tesadüfi hata terimidir.

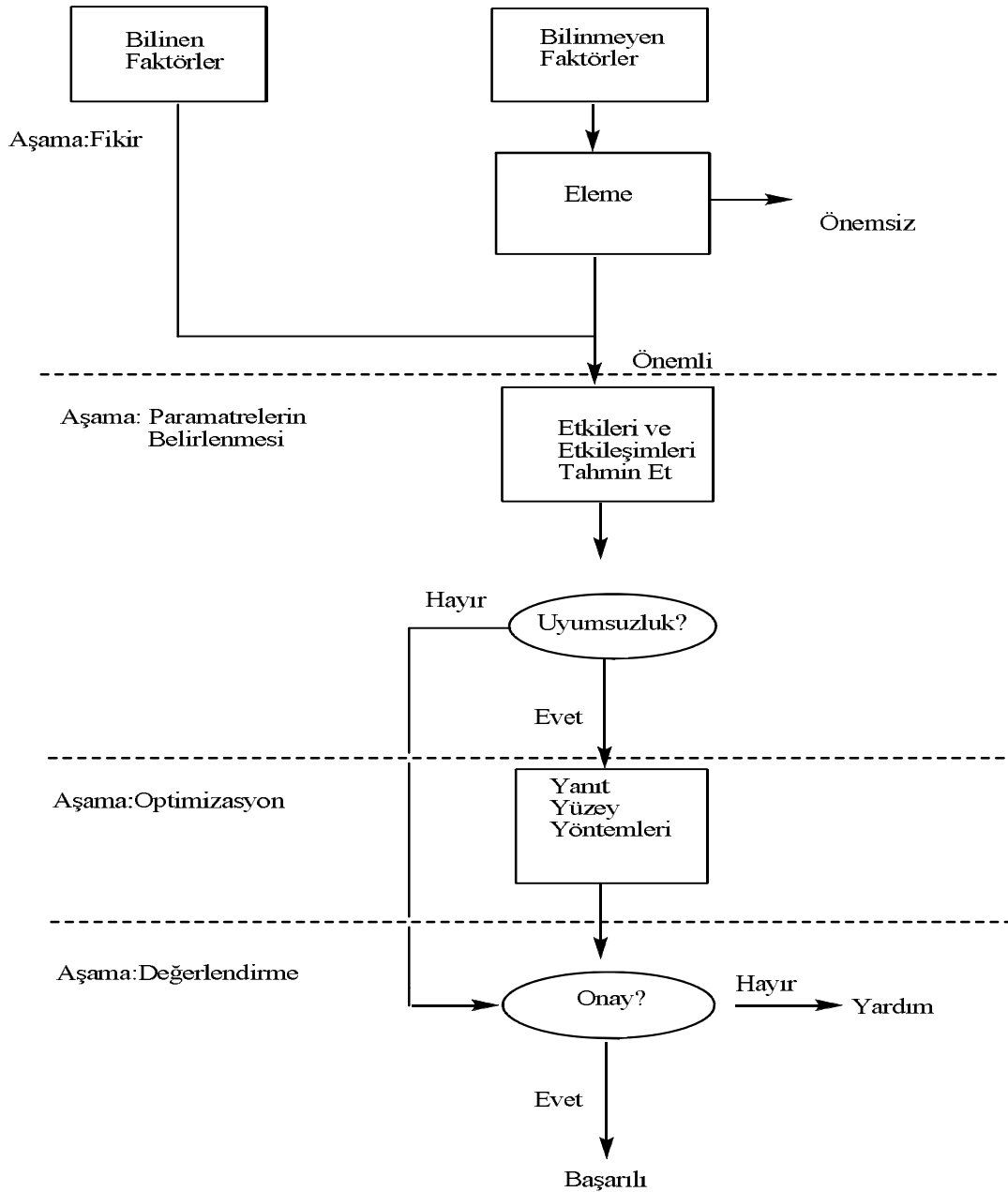
1.3.1. Deneysel Tasarım

Deneysel tasarım yani istatistiksel tasarım en az sayıda deneyle maksimum bilgiyi elde etmek için deneylerin nasıl planlanacağı ve yapılacağına metodudur.

Tasarım uygulanmadan önce literatürler taranarak ve ön deneyler yapılarak yanıtı etkileyen bağımsız değişkenlerin minimum ve maksimum değerleri belirlenmelidir (Türk, 2008). Deneysel tasarım seçimi yapılmadan önce ise aşağıdaki aşamalar tespit edilmelidir (Montgomery, 1996).

- Problemin durumu ve tanımlanması,
- Faktörler, seviye ve aralıklarının seçilmesi,
- Cevap değişkeninin seçilmesi,
- Deneysel tasarım matrisi oluşturulması,
- Deneylerin gerçekleştirilmesi,
- Verilerin istatistiksel analizinin yapılması,
- Sonuçların değerlendirilmesi

Deneysel tasarım birkaç faktörün eş zamanlı değiştirilebilmesi ve her bir faktörün bağımsızca değerlendirilmesini mümkün hale getirdiğinden geleneksel deney yöntemlerini göre daha az deney yapılarak daha kısa sürede daha doğru sonuç alınmasını sağlar. Deneysel tasarımda ön görülen strateji Şekil 1.11' de görüldüğü gibi özetlenebilir (Anderson ve Whitcomb, 2005).



Şekil 1.11. Deneysel strateji

Deneysel çalışmaların tasarlanması ve optimizasyonunda kullanılan tasarım türleri uygun yazılıma sahip paket programlar yardımıyla anlaşılır ve kolay hale gelmiştir. Bazı tasarım yöntemleri şunlardır; merkez kompozit tasarım (Central Composite Design, CCD), Box-Behnken tasarımı, hibrid tasarım, bir faktör tasarımı, üç düzeyli tasarım, pentagonal tasarım, hegzagonal tasarım, D-optimal tasarım, kullanıcı tanımlı tasarımdır (Turan ve Altundoğan, 2011).

1.4. Destek Materyallerinin Seçimi

İmmobilizasyon için seçilecek desteğin özellikleri immobilize enzim sisteminin performansının belirlenmesinde büyük önem taşımaktadır. İdeal bir destekte bulunması gereken özellikler şöyle sıralanabilir; basınç ve sıkıştırma durumlarına karşı fiziksel dirençli, hidrofilik karakterli, enzimle bağlanmanın dışında herhangi bir reaksiyon vermeyecek özellikte, biyoyumlu, mikrobiyal tehlikeye dirençli ve düşük maliyetli olmalıdır (Guisan, 2006).

Destekler kimyasal kompozisyonlarına göre organik ve inorganik olarak sınıflandırılabilirler (Çizelge 1.1). Organik desteklerde doğal ve sentetik polimerler olarak alt gruplara ayrılırlar (Cabral ve Kennedy, 1991).

Çizelge 1.1. Desteklerin sınıflandırılması

Organik

Doğal polimerler

- Polisakkaritler: selüloz, dekstran, agar, agaros, kitin, aljinat
- Proteinler: kollojen, albümin
- Karbon

Sentetik polimerler

- Diğer polimerler: Polisitiren, poliakrilat polimetakrilat, poliakrilamid, poliamit, vinil ve alil polimerler

İnorganik

Doğal mineraller: bentonit, silika

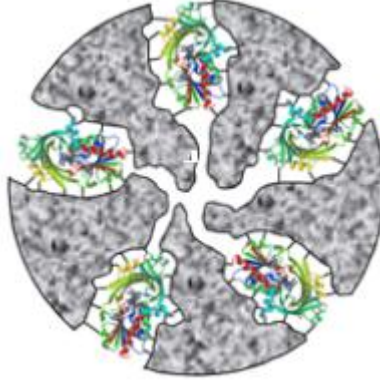
İşlenmiş materyaller: cam (gözeneksiz ve kontrollü gözenekli), metaller, kontrollü gözenekli metal oksitler

1.4.1. ReliZyme ve Sepabeads Destek Materyalleri

Amino ve epoksid fonksiyonel gruplar bağlı destekler, proteinlerin ve enzimlerin immobilizasyonu amacı ile hem laboratuvar hem de sanayi alanlarında kullanılan oldukça ideal matrislerdir. Bu destekler hem depolama hem de nötral sıvı ortamlarda bekletilme esnasında oldukça stabildirler. Bundan dolayı immobilizasyon amaçlı kullanımları oldukça caziptir. Dahası ılımlı deneysel koşullarda bu destekler farklı protein grupları ile (amino, tiyol, fenolik v.b.) oldukça kararlı kovalent bağlı formlar oluşturabilirler. Bu destekler ile enzimler arası immobilizasyon işlemi iki adımda oluşmaktadır. İlki destek ve protein arasında oluşan fiziksel adsorbsiyon ve sonrasında da adsorbe olmuş protein ve amino veya epoksi grup arasında oluşan kovalent bağlanmadır. Bu avantajlarına rağmen epoksi grubu bağlı desteklere immobilizasyon bazı problemleri de beraberinde getirebilir (Guisan, 2006). Bunlar:

- Yüksek iyonik şiddet içeren ortamlarda, bazı enzimlerin kararlılığı etkilenebilir.
- Immobilizasyonun olabilmesi için enzime hidrofobik alan gerekir.
- Enzimin hidrofobik alanından immobilizasyonu, enzimin kararlılığı açısından uygun olmayabilir.
- Bu immobilizasyon için hidrofobik destekler gereklidir ama bu durum enzim kararlılığında negatif bir etkiye neden olabilir.

Hegzametildiamino fonksiyonel grubuna sahip destek olan ReliZyme HA403/M ve epoksid fonksiyonel grubuna sahip destek olan Sepabeads EC-EP/M farklı gözenek büyüklüğüne sahip metakrilik polimer matris materyallerdir. Fiziksel ve kimyasal olarak oldukça stabil, gözenek oranı yüksek, hidrofilik aktive adsorbentlerdir ve düşük şişme oranına sahiptirler. Partikül boyutları 100-300 (S Grade) ve 200-500 (M Grade) µm ve ortalama gözenek çapı ReliZyme HA403/M için 40-60, Sepabeads EC-EP/M için 10-20 nm dir. Fonksiyonel grup olarak epoksid (oksiran), amino v.b. gruplar içerir (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. ReliZyme ve Sepabeads desteğin tanecik görüntüsü.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Mishraa ve ark., (1983), *penicillium funiculosum*dan üretilen 3 selülaaz komponentini karbodiimid kullanarak çözünür, yüksek molekül ağırlıklı polimer (polivinil alkol) üzerine immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimler selülaaz, exo- β -d-glukanaz ve β -d-glulozidaz başlangıca göre % 90 oranında aktivitelerini korumuşlardır. İmmobilize enzimler serbestlerine göre şeker kamışı, şeker pancarı ve üzüm posasından oluşan karışımı daha yüksek verimle hidroliz etmişlerdir. İmmobilize sistemin tekrar kullanım potansiyelini membran filtre kullanarak araştırmış ve sistemin 3 kat daha aktif olduğunu bildirmişlerdir.

Shimizu ve Ishihara., (1987), ticari amaçlı olarak *Trichoderma viride* ve *Aspergillus niger* kaynaklı selülaaz enzimini gözenekli cam boncuklar ve seramik üzerine titanyum tetraklorid ve gluteraldehit ara kolu üzerinden immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimin miktarı metoda ve taşıyıcının türüne bağlı olarak 10-50 mg/g'dır. Aktiviteleri sübstrat olarak CMC, xylan, aryl- β -glulozid ve aryl- β -xyloside kullanıldığında serbest enzimin % 3-53'ü oranındadır. Optimum pH asidik tarafa kayarken, optimum sıcaklık neredeyse değişmemiştir. İmmobilize enzimin aktivitesi 60 günlük sürekli CMC sübstatı ile kullanımda değişmemiştir. Sonuçta xylan immobilize enzim ile hidrolize edilmiş ve şeker içeriği araştırılmıştır.

Ge ve ark., (1997), moleküler depozisyon tekniği kullanarak p-trimetilamin polistiren boncuklar üzerine sadece selülaazı ve de glukoz izomeraz ile birlikte selülaazı immobilize etmişlerdir. Co-immobilize enzim sistemi selulozu direkt olarak glukoz ve fruktoza 60:40 oranda dönüştürmüştür ve sistem 50°C'de 4 tekrar kullanımda başlangıç aktivitesinin % 50'sini korumuştur.

Murai ve ark., (1997), yaptıkları çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* mayasının hücre duvarı üzerine selülaazı genetik olarak immobilize etmişlerdir.

Yuan ve ark., (1999), selülaazı gluteraldehit üzerinden akrilamid graft akilonitril kopolimer membrana immobilize etmişlerdir. Bağlanmayı X-ray fotoelektron spektroskopisi kullanarak kontrol ettikten sonra serbest ve immobilize enzimin aktivitesini CMC sübstratından açığa çıkan glukoz miktarını ölçerek tespit etmişlerdir. İmmobilizasyon şartlarının immobilize selülaaz üzerine bazı etkilerinin

olduğunu bildirmişlerdir. İmmobilize selüloz serbest göre daha yüksek Km değerine sahiptir; pH ve sıcaklık değişimlerinde ise immobilize enzim daha stabildir.

Dinçer ve Telefoncu., (2007), çeşitli endüstri alanlarında selüloz enziminin ekstrem pH ve sıcaklık değerlerindeki kullanımında stabilitesinin etkilenmemesi gerekmektedir. Bu amaçla bu çalışmada nötral pH değerinde asit selülazın stabilitesinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için polivinil alkol (PVA), maleik anhidrit ile modifiye edilmiştir. Kitosan boncuklar polianyonik modifiye PVA ile kaplanmış ve selüloz bu destek üzerine immobilize edilmiştir. Bu modifikasyonun sonucu olarak enzimin optimum pH sı 4.0 den 7.0 ye kaymıştır ve immobilize selüloz nötral pH'da serbest olandan daha stabildir. Selüloz immobilizasyon sonrasında başlangıç aktivitesinin % 87' sini korumuştur, optimum sıcaklıkta ise değişim gözlenmemiştir.

Hilterhaus ve ark., (2008), endoglukanaz, *Pseudomonas putida* kaynaklı benzilformat dekarboksilaz, *Candida antarctica* kaynaklı lipaz enzimlerini Sepabeads EC-EP, Sepabeads EC-EA ve Sepabeads EC-BU destekleri üzerine immobilize etmişlerdir. Öncelikle enzimler için hangi desteğin kullanılacağını belirlemek amacıyla sırayla her enzimi desteklere ayrı ayrı immobilize etmişler ve o enzim için bağlanmanın maksimum olduğu desteği belirlemişlerdir. Lipaz için maksimum bağlanma Sepabeads EC-EP, benzilformat dekarboksilaz enzimi için Sepabeads EC-EA, endoglukanaz enzimin için ise Sepabeads EC-BU desteklerinde gerçekleşmiştir. Daha sonraki deneyler bu enzim-destek eşleşmesine göre yapılmıştır. Bu immobilize biyokataliz proseslerin çeşitli kimyasalların sentezinde kullanılabileceğini önermişlerdir. Farklı reaktörler kullanarak enzimlerin tekrar kullanım kararlılıklarını incelemişlerdir. Lipazın Sepabeads EC-EP desteğine immobilizasyonunda sekiz kez tekrar kullanımında, benzilformat dekarboksilazın Sepabeads EC-EA desteğine immobilizasyonunda altı kez tekrar kullanımında başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Endoglukanazın Sepabeads EC-BU desteğinin immobilizasyonunda tekrar kullanımına baktıklarında ikinci kullanımda aktivite tespit edemediklerini rapor etmişlerdir. Buna neden olarak ta ilk kullanımdan sonra yapılan yıkama işleminde; enzimin desteğe zayıf bir bağlanma tipi olan hidrofobik bağlanma ile bağlandığından dolayı yıkama ile tutunduğu yerden kopup yıkama suyu

ile atıldığı veya yıkama sonrası enzimin inaktive olduğu yönünde görüş bildirmişlerdir.

De Bari ve ark., (2008) bu çalışmada biyoetanol üretimi üzerine selülazın enzimatik hidrolizinin optimizasyonunu incelenmiştir. Ticari olarak sağlanmış iki tür selülazı (celluclast 1.5, novozyme 188) epoksi Sepabeads desteğe immobilize etmişlerdir. Enzimler desteğe % 60 oranında bağlanmış ve tekrarlı yıkamalarda % 90 oranında stabil kaldığı tespit edilmiştir.

El-Ghaffar ve ark., (2010), selülazı kitosan üzerine kovalent ve çapraz bağlama metodları kullanarak immobilize etmişlerdir, pH 7.0 ve 25 °C de % 1'lik glutraldehit (GDA) çapraz bağlı kitosanın üzerine immobilize edilmiş selülazın aktivitesi serbest enzime göre % 65.52 korunmuştur. Tekrar kullanım durumunda immobilize selülaz 6. kez kullanımdan sonrada aktivitesini % 60 oranında korumuştur.

Khoshnevisan ve ark., (2011), selülazı süperparamanyetik nanopartiküller üzerine immobilize etmişler ve dynamic light scattering (DLS) ve transmission electron microscopy (TEM) metodlarını kullanarak enzimin ve bağlandığı destek materyali ile olan ilişkisinin boyutsal ve yapısal özelliklerini karakterize etmişlerdir. Selülaz desteğe fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile bağlanmıştır (iyonik etkileşimler). Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) kullanarak bağlanma başarısına bakılmış Bradford yöntemi kullanılarak bağlanma oranı % 95 olarak verilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi sübstrat olarak karboksi metil selüloz (CMC) kullanıldığında 0.1 unit/mL ($\mu\text{mol}/\text{min mL}$) tespit edilmiştir. Adsorpsiyon kapasitesi 31 mg/g'dır. Sonuç olarak selülazın, aktivite ve stabilitesinin manyetik nanopartiküller üzerine fiziksel adsorpsiyon metoduyla immobilize edildiğinde arttığı bildirilmiştir.

Hung ve ark., (2011), yaptıkları çalışmada destek olarak poliakilonitril (PAN) nanofibröz membran kullanarak selülazı immobilize etmişlerdir. Yüksek hidrolitik aktiviteye sahip immobilize selülaz için aktivasyon süresi, enzim konsantrasyonu, immobilizasyon süresi, sıcaklık gibi şartları optimize etmişlerdir. Bu şartlar altında selülazı 30 mg/g destek olarak bağlanmışlar ve spesifik aktiviteyi 3.2 U/mg protein olarak belirlemişlerdir. Hidroliz reaksiyon şartlarının optimizasyonunda yanıt yüzey

yöntemi (RSM) kullanılmıştır, Box-Behnken deneysel dizaynına göre deneyler yapılmıştır. İmmobilize selüloz tespit edilen sıcaklık ve pH şartlarında indirgen şeker üretmek için mikroalg hücre duvarını hidrolize etme amacıyla kullanılmıştır.

Prlainovic ve ark., (2011), *Candida rugosa* lipazını immobilize etmek için en uygun Sepabeads destek türünü tespit etmek amacıyla bu çalışmayı yapmışlardır. Bu çalışmada üç farklı destek kullanmışlar, bu desteklerden ikisi sırası ile iki ve altı karbonlu zincire amino grubu bağlı (Sepabeads EC-EA ve Sepabeads EC-HA) diğeri ise epoksi grubu bağlı (Sepabeads EC-EP) desteklerdir. Lipazın bu desteklere immobilizasyonunu iki farklı geleneksel yöntemle gerçekleştirmişlerdir. İlki epoksi grubu üzerinden immobilizasyon ve glutaraldehit aktifleştirilmesi yapılarak immobilizasyon ikincisi ise periyodat kullanılan metod ile lipazın aktifleştirilmesi yöntemleridir. İmmobilizasyon sonrası aktivitelere bakıldığında epoksi grubu üzerinden yapılan immobilizasyonda aktivite % 94.8, periyodatla aktifleştirme sonrasında % 87.6 oranında korunurken glutaraldehit ile aktifleştirilerek yapılan immobilizasyon sonucunda sadece % 12.7 oranında aktivitenin korunduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar sonrasında lipazın immobilizasyonu için önceden periyodat oksidasyonu ile lipazın modifikasyonu sonrası amino grubu üzerinden immobilizasyonun böyle bir modifikasyon olmadan epoksi grubu üzerinden olana göre çok daha yararlı olduğunu kanıtlamışlardır. Çünkü daha yüksek reaksiyon sıcaklıklarında ve daha yüksek termal stabilitede daha yüksek aktivite göstermiştir.

Bu çalışmanın amacı;

1. Ticari olarak kullanılan selülozlar, endüstriyel olarak kağıt endüstrisi, hayvansal gıda üretimi, zirai ve endüstriyel atıkların enzimatik olarak parçalanması, biyoyakıt, kimya, tekstil v.b. bir çok alanda kullanılmaktadır. Bundan dolayı enzim immobilizasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan Sepabeads EC-EP/M ve ilk kez bu çalışmada kullanılan ReliZyme HA403/M destekler üzerine immobilizasyonunun gerçekleştirilmesi ve en uygun immobilizasyon koşulların yanıt yüzey metodunu (RSM) kullanılarak belirlenmesidir.
2. Serbest ve immobilize selülozın maksimum aktivite gösterdiği koşulların ve kinetik parametrelerinin (K_m , V_{max} , termal ve

depolama kararlılıkları) ve tekrar kullanım kararlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır.

Böylece selüloz enziminin endüstriyel olarak kullanılabilme imkanları dolayısıyla da ülke endüstrisine katkı ve daha sonra yapılacak çalışmalara veri sağlaması hedeflenmiştir.

3.MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Trichoderma reesei (*Trichoderma viride*) selüloz 130 U/mgDW, immobilizasyon desteği olarak Resindion Sepabeads EC-EP/M (partikül büyüklüğü 200-500 µm) ve Resindion ReliZyme HA403/M (partikül büyüklüğü 200-500 µm) destekleri, glutaraldehit, karboksimetilselüloz (CMC), glukoz monohidrat, sodyum karbonat, sodyum hidroksit, sodyum potasyum tartarat, 3,5-dinitrosalisilik asit, fenol, sodyum sülfid, sodyum fosfat, nitrik asit, aseton, bakır (II) sülfat, folin-ciocalteu çözeltisi, sodyum klorür, fosforik asit (% 85,v/v), hidroklorik asit (% 37,v/v), glasiyel asetik asit, sitrik asit, borik asit, sığır serum albumin (BSA).

3.1.2. Kullanılan Cihaz, Araç ve Gereçler

Design Expert 8.0.6 bilgisayar programı, UV-Vis spektrofotometre (ATI UNICAM), pH metre (HANNA 8417), magnetik karıştırıcı, inkübatör (ES 500), santrifüj, girdap karıştırıcı, analitik terazi, otomatik pipet, termostatlı çalkalayıcı su banyosu.

3.2. Metod

3.2.1. Protein Tayini

Serbest ve immobilize enzimin protein içeriklerini tespit etmek amacıyla protein tayini yapılmıştır.

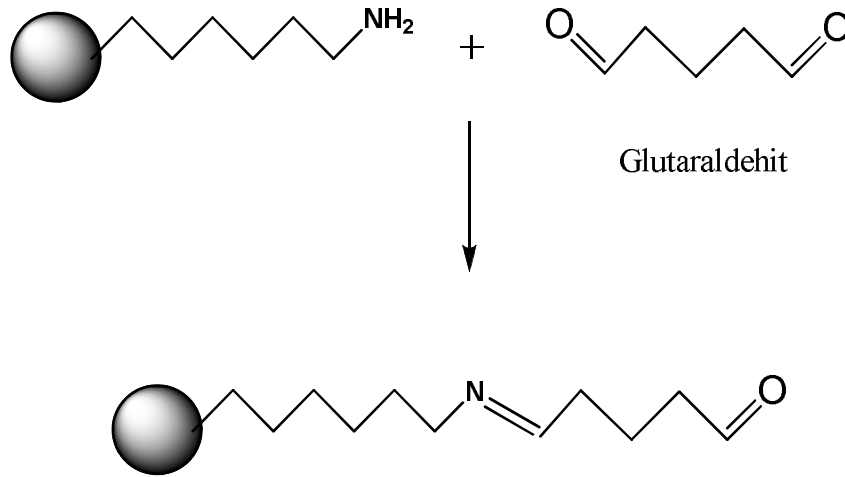
Protein tayini için Lowry ve ark. (1951) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bunun için içerikleri bildirilen A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

- 1) Çözelti A: Bu çözelti 20 g Na_2CO_3 , 4 g NaOH saf suda birlikte çözülerek son hacim 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 2) Çözelti B: 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, % 1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülerek son hacim aynı çözelti ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 3) Çözelti C: 50 mL A çözeltisi ile 1 mL B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır. (Kullanılacağı zaman taze olarak hazırlanmıştır.)
- 4) Folin-Ciocalteu çözeltisi: Folin-Ciocalteu saf su ile 1:2 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.
- 5) Standart protein çözeltisi: 100 mL'de 3,95 mg sığır albümini olacak şekilde % 0,9'luk NaCl çözeltisi ile hazırlanmıştır.
- 6) Standart protein eğrisinin çizimi: 8 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla 0,0 50,0, 100,0, 125,0, 250,0, 500,0, 750,0 ve 1000,0 μL olacak şekilde standart protein çözeltisinden konulmuştur. Her tüp içeriğinin hacmi serum fizyolojik ile 1 mL'ye tamamlanmış, her tüpe 5 mL C çözeltisi ilave edilmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 1:2 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0,5 mL eklenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında bekletilip tüp içeriklerinin absorbansları köre karşı 750 nm'de okunmuştur, bu değerler derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Örneklerin protein içerikleri aynı yöntemle standart protein grafiği kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.2. ReliZyme HA403/M Desteğinin Selülaz İmmobilizasyonu İçin Hazırlanması

ReliZyme HA403/M desteğinin fonksiyonel grubu amino grubu olduğundan enzim immobilizasyonundan önce glutaraldehit ile aktifleştirme işlemi yapılmıştır. Glutaraldehitin bağlanmasında Cho ve Rhee (1993) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 1 g destek üzerine 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda % 2,5 (w/v) olacak şekilde hazırlanmış glutaraldehit çözeltisinin 25 mL'si eklenerek oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırılmıştır (Şekil 3.1). Destek saf su ile süzültüde glutaraldehit gözlenmeyinceye kadar iyice yıkanmış ve 50 °C'de 1 gece

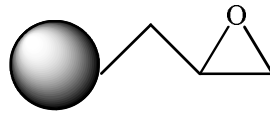
kurutulmuştur. Süzüntüde glutaraldehit olup olmadığını kontrol etmek için literatürde Boratynski ve Zal'ın (1990) önerdiği yöntem kullanılmıştır. Alkilamin türevine glutaraldehitin bağlanması sonrasında arta kalan serbest amino grubu miktarının tayini Alptekin ve ark., (2009) tarafından önerilen yöntemle yapılmıştır. Bu işlemten sonra desteğimiz enzim immobilizasyonuna hazır hale gelmiştir.



Şekil 3.1. ReliZyme HA403/M desteğinin glutaraldehit ile aktifleştirilmesi.

3.2.3. Sepabeads EC-EP/M Desteğinin Selüloz İmmobilizasyonu İçin Hazırlanması

Sepabeads EC-EP/M desteğinin fonksiyonel grubu epoksid grubu olduğundan enzim immobilizasyonundan önce herhangi bir aktifleştirme işlemine gerek duyulmamıştır. Destek immobilizasyona hazır halde bulunmaktadır.

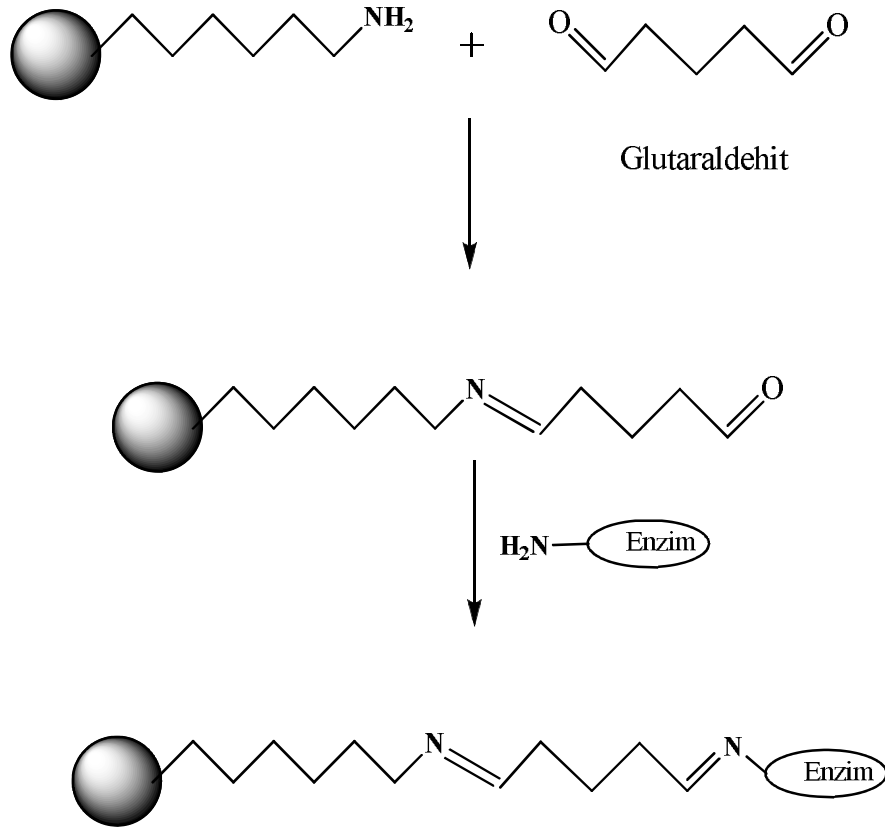


Şekil 3.2. Sepabeads EC-EP/M desteği.

3.2.4. Selülazın ReliZyme HA403/M Desteği Üzerine Kovalent İmmobilizasyonu

Selülazın ReliZyme HA403/M desteği üzerine kovalent immobilizasyonunda Alptekin ve ark. (2010) önerdiği yöntem kullanılmıştır. 0,05 g destek üzerine

derişimi 1 mg/mL olacak şekilde 50 mM pH 6,5 fosfat tamponunda hazırlanmış selüloz çözeltisinin 1 mL'si ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. İmmobilizasyon süresi sonunda immobilize selüloz örnekleri tampon ile yıkanarak desteğe bağlanmayan serbest selüloz enzimlerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Süzüntülerde protein miktarı tayini Lowry ve ark. (1951) önerdiği yöntemine göre yapılmış ve başlangıçta ortama ilave edilen protein miktarından süzüntüde bulunan bağlanmayan protein miktarı çıkartılarak desteğe bağlanan protein miktarı hesaplanmıştır.

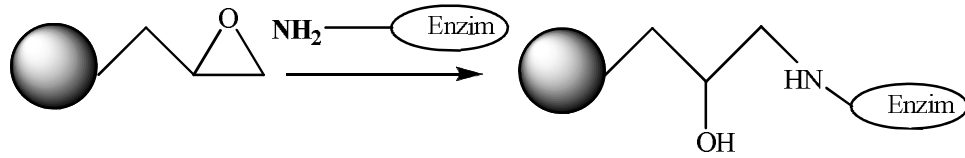


Şekil 3.3. Glutaraldehit ile aktifleştirilmiş ReliZyme HA403/M desteğe selülozün immobilizasyonu.

3.2.5. Selülozün Sepabeads EC-EP/M Desteği Üzerine Kovalent İmmobilizasyonu

Selülozün Sepabeads EC-EP/M desteği üzerine kovalent immobilizasyonunda Alptekin ve ark. (2010) önerdiği yöntem kullanılmıştır. 0,1 g destek üzerine derişimi

1 mg/mL olacak şekilde 50 mM pH 6,5 fosfat tamponunda hazırlanmış selüloz çözeltisinin 1 mL'si ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 6 saat karıştırılmıştır. İmmobilizasyon süresi sonunda immobilize selüloz örnekleri tampon ile yıkanarak desteğe bağlanmayan serbest selüloz enzimlerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Süzüntülerde protein miktarı tayini Lowry ve ark. (1951) önerdiği yöntemle yapılmış ve başlangıçta ortama ilave edilen protein miktarından süzüntüde bulunan bağlanmayan protein miktarı çıkartılarak desteğe bağlanan protein miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 3.4. Sepabeads EC-EP/M desteğe selülazın immobilizasyonu.

3.2.6. Serbest veya İmmobilize Selüloz Aktivitesinin Belirlenmesi

Selülazın aktivite tayini için, selülozun hidrolizi sonucu açığa çıkan β -D glükoz miktarı dinitrosalisilik asit (DNSA) yöntemi ile belirlenmiştir.

DNSA yöntemi ilk kez Sumner (1921) tarafından uygulanmıştır. Yöntem bir indirgen şekerin 3,5-Dinitrosalisilik asit ile yükseltgenmesi esasına dayanmaktadır. Bu çalışmada kullanılan DNSA reaktifinin bileşimi (w/v) olarak aşağıda verilmiştir (Wang ve ark., 1997).

- % 1 DNSA
- % 0,2 Fenol
- % 0,05 Sodyum Sülfid
- % 1 Sodyum Hidroksit
- % 30 Sodyum-Potasyum Tartarat

Serbest enzimin DNSA metodu ile aktivite tayini yapılırken, derişimi 1mg/mL olacak şekilde hazırlanan çözeltiden 0,5 mL, kör içinse sadece 0,5 mL saf

su alınıp üzerine sübstrat olarak karboksimetilselülaz (CMC) 0,5 mL (%1 w/v olacak şekilde 100 mM pH 4 asetat tamponda hazırlanmış) eklenmiştir. Hafifçe karıştırıldıktan sonra 45°C de 15 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için üzerine 1 mL DNSA reaktifi eklenip kaynar su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. Tüm tüpler aynı anda su banyosundan alınarak buz içerisinde 2-3 dakika soğutulup santrifüjlenmiş üstteki sıvı kısımdan 0,6 mL alınıp üzerine 4,4 mL saf su ilave edilip spektrofotometrede 530 nm'de okunmuştur. Açığa çıkan β -D glukoz miktarı standart glukoz eğrisinden faydalanılarak bulunmuştur. Enzimin aktivitesi $\mu\text{mol dk}^{-1}\text{mg}^{-1}$ protein olarak hesaplanmıştır.

Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize edilen enzimin DNSA metodu ile aktivite tayini yapılırken, 0,05 g immobilize enzim üzerine 0,5 mL 50 mM pH 4 asetat tamponu ilave edilmiş, kör içinse 0,5 mL saf su ve 0,5 mL 50 mM pH 4 asetat tamponu kullanılmıştır. Üzerine sübstratımız olan karboksimetilselülaz (CMC) 0,5 mL (% 1 w/v olacak şekilde 50 mM pH 4 asetat tamponda hazırlanmış) eklenmiştir. Hafifçe karıştırıldıktan sonra 50°C de 120 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için üzerine 1 mL DNSA reaktifi eklenip kaynar su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. Tüm tüpler aynı anda su banyosundan alınarak buz içerisinde 2-3 dakika soğutulup santrifüjlenmiş ve üstteki sıvı kısımdan 0,6 mL alınıp üzerine 4,4 mL saf su ilave edilip spektrofotometrede 530 nm'de okunmuştur. Enzimin aktivitesi $\mu\text{mol dk}^{-1}\text{mg}^{-1}$ protein olarak hesaplanmıştır.

ReliZyme HA403/M desteğe immobilize edilen enzimin DNSA metodu ile aktivite tayini yapılırken, 0,04 g immobilize enzim üzerine 0,5 mL 25 mM pH 3,5 sitrat tamponu ilave edilmiş, kör içinse sadece 0,5 mL saf su ve 0,5 mL 25 mM pH 3,5 sitrat tamponu kullanılmıştır. Üzerine sübstrat karboksimetilselülaz (CMC) 0,5 mL (%1 w/v olacak şekilde 25 mM pH 3,5 sitrat tamponda hazırlanmış) eklenmiştir. Hafifçe karıştırıldıktan sonra 60°C' de 120 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için üzerine 1 mL DNSA reaktifi eklenip kaynar su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. Tüm tüpler aynı anda su banyosundan alınarak buz içerisinde 2-3 dakika soğutulup santrifüjlenmiş ve üstteki sıvı kısımdan 0,6 mL alınıp üzerine 4,4 mL saf su ilave edilip spektrofotometrede 530 nm'de okunmuştur. Enzimin aktivitesi $\mu\text{mol dk}^{-1}\text{mg}^{-1}$ protein olarak hesaplanmıştır.

3.2.7. Standart Glukoz Eğrisi Çizimi

Standart glukoz eğrisinin çizimi için glukoz monohidrattan derişimi 5 mM olacak şekilde çözeltili hazırladıktan sonra seyreltme yapılarak 4-3-2-1-0,5 mM olacak şekilde 6 farklı tüp hazırlanmıştır. 300 µL son hacimli bu tüplere sırasıyla 300 µL de DNSA reaktifi eklenip 15 dakika kaynar su banyosunda bekletilen tüpler aynı anda su banyosundan alınarak buz içerisinde 2-3 dakika soğutulup santrifüjlenmiş ve üzerine 4,4 mL saf su ilave edilip spektrofotometrede 530 nm’de okunmuştur. Okunan absorbanslar derişime karşı grafiğe geçirilmiştir. Örneklerin indirgen şeker içerikleri aynı yöntemle bu eğri kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.8. Selülazın İmmobilizasyonu İçin İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Selülazın immobilizasyon koşullarının optimizasyonu amacıyla Response Surface Metodology (RSM) yani yanıt yüzey modelinin oluşturulması için bir istatistiksel bilgisayar programı olan Design Expert 8.0.6 kullanılmıştır. Bu yöntemden yararlanmak için öncelikle enzimi immobilize ettiğimiz her destek için 3 farklı bağımsız değişken bir de sabit bağımsız değişken belirlenmiştir. Bu bağımsız değişkenler pH, süre ve enzim derişimi parametreleridir ve sıcaklık parametresi de sabit bağımsız değişken olarak belirlenmiştir. İmmobilizasyon sıcaklığının tespiti amacıyla 15, 25 ve 35 °C’de ön çalışmalar yapılmış ve en uygun sıcaklık değeri 25 °C olarak tespit edilmiştir. Belirlediğimiz bu parametreler belli aralıklar içinde programa uygulanmış ve Box-Behnken deneysel dizaynı seçilmiştir. Design Expert bilgisayar programı kullanılarak oluşturulan Box-Behnken dizaynının matematiksel ifadesi Eşitlik 3.1’de verilmiştir.

$$y = b_{k0} + \sum_{i=1}^k b_{ki} c_i + \sum_{i=1}^k b_{kii} c_i^2 + \sum_{i \neq j=2}^k b_{kij} c_i c_j \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte y spesifik aktivite verimi, X_i, X_j, X_{ij} , sırasıyla pH , süre, enzim derişimi dir. β_{ko} , β_{ki} , β_{kij} ise programdan bulunan katsayıları göstermektedir. İncelenen her bir parametrenin en düşük, orta ve en yüksek değerleri -1, 0, +1 olarak kodlanmıştır ve Çizelge 3.1’de verilmiştir. Seçilen bu deneysel program bize 15 tane farklı deneyden oluşan deney setlerini vermiştir (Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3). Çizelgelerden görüldüğü gibi farklı pH, süre ve enzim derişimlerinde ve sabit 25°C sıcaklıkta ve bu deneyler uygulanmış ve her bir desteğimize maksimum bağlanmanın olduğu ve enzimin maksimum aktivite gösterdiği şartlar bu yöntemle tespit edilmiştir. Bu deney setlerinden maksimum aktivitenin tespit edildiği deneydeki pH, süre ve enzim derişimi bundan sonraki deneylerimizde kullandığımız immobilizasyon denemeleri için optimum koşullar olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Değişkenlerin kodları

Değişkenler		Değişkenlerin kodları		
		En düşük	Orta	En yüksek
	semboller	-1	0	+1
pH	A	5	6,5	8
Süre (sa)	B	6	15	24
Enzim Derişimi (mg/mL)	C	0,2	1	1,8

Çizelge 3. 2. Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilizasyon için RSM programı tarafından önerilen deney setleri

Deneme sayısı	pH	Süre (saat)	Enzim Derişimi (mg/mL)	Sıcaklık (°C)
1	6,5	15	1,0	25
2	8,0	15	1,8	25
3	6,5	6	1,8	25
4	5,0	24	1,0	25
5	6,5	24	0,2	25
6	5,0	15	0,2	25
7	8,0	24	1,0	25
8	6,5	15	1,0	25
9	5,0	6	1,0	25
10	8,0	15	0,2	25
11	6,5	24	1,8	25
12	8,0	6	1,0	25
13	6,5	6	0,2	25
14	5,0	15	1,8	25
15	6,5	15	1,0	25

Çizelge 3. 3. ReliZyme HA403/M desteğe immobilizasyon için RSM programı tarafından önerilen deney setleri

Deneme sayısı	pH	Süre (saat)	Enzim Derişimi (mg/mL)	Sıcaklık (°C)
1	8,0	5	0,2	25
2	6,5	5	1,0	25
3	5,0	5	0,2	25
4	8,0	2	1,0	25
5	6,5	2	1,8	25
6	5,0	2	1,0	25
7	6,5	8	1,8	25
8	6,5	5	1,0	25
9	5,0	8	1,0	25
10	6,5	2	0,2	25
11	8,0	5	1,8	25
12	8,0	8	1,0	25
13	5,0	5	1,8	25
14	6,5	5	1,0	25
15	6,5	8	0,2	25

3.2.9. Serbest ve İmmobilize Selülazın Karakterizasyonu

Selülazın desteklerimize en iyi bağlandığı immobilizasyon koşulları belirlendikten sonra immobilize selülazın maksimum aktivite gösterdiği koşullar ve bu koşullardaki kinetik parametreleri belirlenmiştir.

- Serbest ve immobilize selüloz için optimum pH'nın belirlenmesinde pH 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 ve 7,0' de aktivite ölçülmüştür.
- Serbest, ve immobilize selüloz örnekleri için en uygun tampon derişiminin belirlenmesinde optimum pH'da 25, 50, 75, 100 ve 200 mM tampon derişiminde selüloz aktivitesi ölçülmüştür.
- Serbest ve immobilize selüloz örnekleri için optimum sıcaklığın belirlenmesi amacıyla 25, 30, 37, 45, 50 ve 60 °C'de selüloz aktivitesi ölçülmüştür. Aşağıda verilen Arrhenius eşitliği kullanılarak serbest ve immobilize selülozun aktivasyon enerjileri hesaplanmıştır.

$$V=k.e^{-E_a/RT} \text{ (Arrhenius eşitliği)}$$

V; reaksiyon hızı, E_a ; aktivasyon enerjisi; R gaz sabiti, k bir katsayıdır. Bu denklem;

$$\ln V = \ln k - E_a/RT$$

şeklinde ifade edilirse, $\ln V$ ile $1/T$ arasında çizilen grafikten aktivasyon enerjisi hesaplanmıştır.

- Belirlenmiş olan optimum koşullarda, % 0,01, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 1,5 CMC (Karboksimetilselüloz) derişimleri için serbest ve immobilize selüloz aktiviteleri ölçülmüştür. Maksimum aktivite (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitinin (K_m), grafiksel değerlendirilmesinde, $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ değerlerinin çizilmesi ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği kullanılmıştır. Ayrıca serbest ve immobilize selülozlar için geri dönüşüm sayısı ($k_{cat} = V_{max}/[E]_T$) ve katalitik etkinlik (k_{cat}/K_m) hesaplanmıştır.
- Serbest ve immobilize selüloz örneklerinin termal kararlılığının belirlenebilmesi için, serbest ve immobilize selülozun maksimum aktivite gösterdikleri sıcaklıkta ve 70 °C'de belirli sürelerde bekletildikten sonra kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Serbest ve immobilize selüloz örneklerinin yarı ömrü ($t_{1/2}$), aşağıdaki matematiksel eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\ln V = \ln V_0 - k_d t$$

V_0 : Başlangıçtaki enzim aktivitesi

V : t süre sonunda ölçülen aktivite

k_i : 1. dereceden inaktivasyon sabiti.

- Serbest ve immobilize selülozların depolama kararlılığının belirlenmesinde selüloz örnekleri 5 °C ve oda sıcaklığında bekletilerek belirli aralıklarla belirli günlerde kalan aktiviteleri ölçülmüştür.

3.2.10. İmmobilize Selülozın Hidrolitik Aktivitesi Açısından Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi

Sepabeads EC-EP/M ve ReliZyme HA403/M desteğe immobilize edilmiş selülozın CMC hidrolizi için tekrar kullanım kararlılığını tespit etmek amacıyla immobilize enzimin aktivite tayini yapılmış ve başlangıç aktivitesi belirlenmiştir. İkinci kullanımda aktivite tayinini yapmak için immobilize enzim preparatı saf su ile yıkanmış ve tekrar sübstrat yüklenerek aynı şekilde tekrar kullanım için aktivite tayini yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Bu çalışmada *Trichoderma reesei* (*Trichoderma viride*) selülazının Sepabeads EC-EP/M ve ReliZyme HA403/M ticari desteklerine immobilizasyonu araştırılmıştır. İmmobilizasyon için gerekli optimum koşulların (pH, tampon derişimi, sıcaklık, immobilizasyon süresi ve enzim derişimi) belirlenmesi amacıyla RSM yöntemi kullanılmıştır. Belirlenen optimum koşullar diğer aşamalarda kullanılmıştır. Serbest ve immobilize selülaz örneklerinin karakterizasyonu (optimum pH, tampon derişimi, sıcaklık, kinetik parametreler, termal ve depolama kararlılıkları) selülaz örneklerinin belirlenen optimum koşullarda hidrolitik aktiviteleri ölçülerek yapılmıştır.

4.1.1. Selülazın Sepabeads EC-EP/M ve ReliZyme HA403/M Desteklere İmmobilizasyonu İçin İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

4.1.1.1. Selülazın Sepabeads EC-EP/M Desteğe İmmobilizasyonu İçin İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Selülazın Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilizasyonu için optimizasyon şartlarının RSM metodu kullanarak belirlenmesi amacıyla Design Expert programına önceden belirlediğimiz farklı bağımsız değişken parametrelerimiz olan pH (5-8), immobilizasyon süresi (6-24 saat), enzim derişimi (0,2-1,8 mg/ml) ve sabit bağımsız değişken olan sıcaklık (25 °C) şeklinde uygulanmıştır. Burada sabit bağımsız değişken olan sıcaklığın tespiti amacıyla 15, 25, 35°C’de ön immobilizasyon çalışmaları yapılmış olup en uygun sıcaklık 25 °C olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1.Selülazın Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilizasyonda, immobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak aktivite değerleri.

İmmobilizasyon Sıcaklığı (°C)	pH	Süre (saat)	Enzim Derişimi (mg/ml)	Spesifik Aktivite (U mg prot ⁻¹)
15	6,5	6	1,8	45,7
25	6,5	6	1,8	54,0
35	6,5	6	1,8	33,2

Değişkenlerin programa uygulanmasının sonrasında Box-Behnken deneysel dizaynına göre Çizelge 4.2' de gösterilen deney setlerine ulaşılmıştır. Bu 15 deney setinde verilen şartlarda ayrı ayrı immobilizasyonlar yapılmış ve spesifik aktivite sonuçları Çizelge 4.2 de gösterilmiştir. Elde edilen spesifik aktivite değerleri Design Expert bilgisayar programı kullanılarak analiz edilmiş Eşitlik 3.1'de verilen β_{ko} , β_{ki} , β_{kii} katsayıları aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

$$Y=18-3,075.A+2,25.B+11,025.C+3,15.AB+1,2.AC-14,55.BC-5,25.A^2 +8,1.B^2+14,85.C^2$$

Çizelge 4.2. Selülozın Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilizasyonda RSM kullanılarak elde edilen deney setlerinin aktivite değerleri.

Deneme sayısı	pH	Zaman (saat)	Enzim Derişimi (mg/mL)	Sıcaklık (°C)	Spesifik Aktivite U mg prot ⁻¹
1	6,5	15	1,0	25	17,4
2	8,0	15	1,8	25	38,4
3	6,5	6	1,8	25	54,0
4	5,0	24	1,0	25	14,4
5	6,5	24	0,2	25	57,0
6	5,0	15	0,2	25	19,2
7	8,0	24	1,0	25	15,6
8	6,5	15	1,0	25	18,0
9	5,0	6	1,0	25	32,4
10	8,0	15	0,2	25	9,6
11	6,5	24	1,8	25	45,6
12	8,0	6	1,0	25	21,0
13	6,5	6	0,2	25	7,2
14	5,0	15	1,8	25	43,2
15	6,5	15	1,0	25	18,6

Eşitlik 3.1’de önerilen matematiksel modelin selülozın Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilizasyonu sonunda elde edilen spesifik aktivite değerleri için uygunluğu en küçük kareler yönteminin kullanıldığı varyans analizi (ANOVA) ve model uygunsuzluğu testi (Lack of fit) ile incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Selülazın Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilizasyonda yanıt yüzey yöntemi için ANOVA değerleri

Kaynak	Kareler toplamı	df	Ortalama kareler	F değeri	p değeri Prob>F	
Model	3152.05	9	350.23	3.10	0.1131	anlamsız
<i>A-pH</i>	75.64	1	75.64	0.67	0.4507	
<i>B-Zaman</i>	40.50	1	40.50	0.36	0.5757	
<i>C-Enzim Derisimi</i>	972.41	1	972.41	8.6	0.0326	anlamlı
AB	39.69	1	39.69	0.35	0.5794	
AC	5.76	1	5.76	0.051	0.8304	
BC	846.81	1	846.81	7.49	0.0410	anlamlı
A ²	101.77	1	101.77	0.90	0.3864	
B ²	242.25	1	242.25	2.14	0.2032	
C ²	814.24	1	814.24	7.20	0.0437	anlamlı
kalıntı	565.65	5	113.13			
Regresyon Katsayısının uyumluluğu	564.93	3	188.31	523.08	0.0019	anlamlı

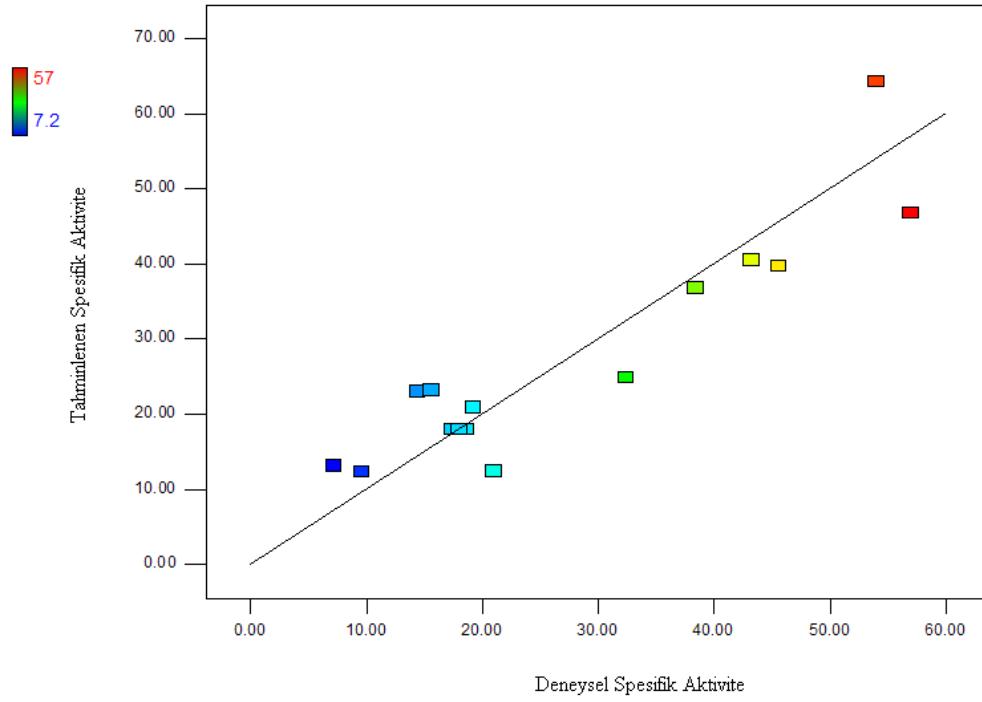
Önerilen matematiksel model için F değeri 3,10 ve Prob>F değeri 0,1131 olarak hesaplanmış ve yanılma payı % 11,3 verilmiştir. Regresyon modelinin belirleyicilik katsayısı (R^2) 0.85 bulunmuştur. Bu sonuç önerilen matematiksel modelin toplam değişimin % 85'ini açıkladığını göstermektedir. Prob>F değeri 0,0500 den daha küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Model uygunsuzluğu testinde Prob>F 0,0019 bulunduğu için anlamlıdır. Selülazın Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilizasyonunda elde edilen deneysel spesifik aktivite sonuçlarının,

$$Y=18-3,075.A+2,25.B+11,025.C+3,15.AB+1,2.AC-14,55.BC-5,25.A^2 +8,1.B^2+14,85.C^2$$

eşitliği kullanılarak elde edilen tahmini spesifik aktivite sonuçları ile karşılaştırılması Çizelge 4.4 ve Şekil 4.1’de verilmiştir. Deneysel spesifik aktivite sonuçları ile tahmini spesifik aktivite sonuçları birbirlerine ne kadar yakın ise Şekil 4.1’de gösterilen renkli kutucuklar o oranda birbirlerine yakın olacaklar ve orta çizgi üzerinde toplanacaklardır.

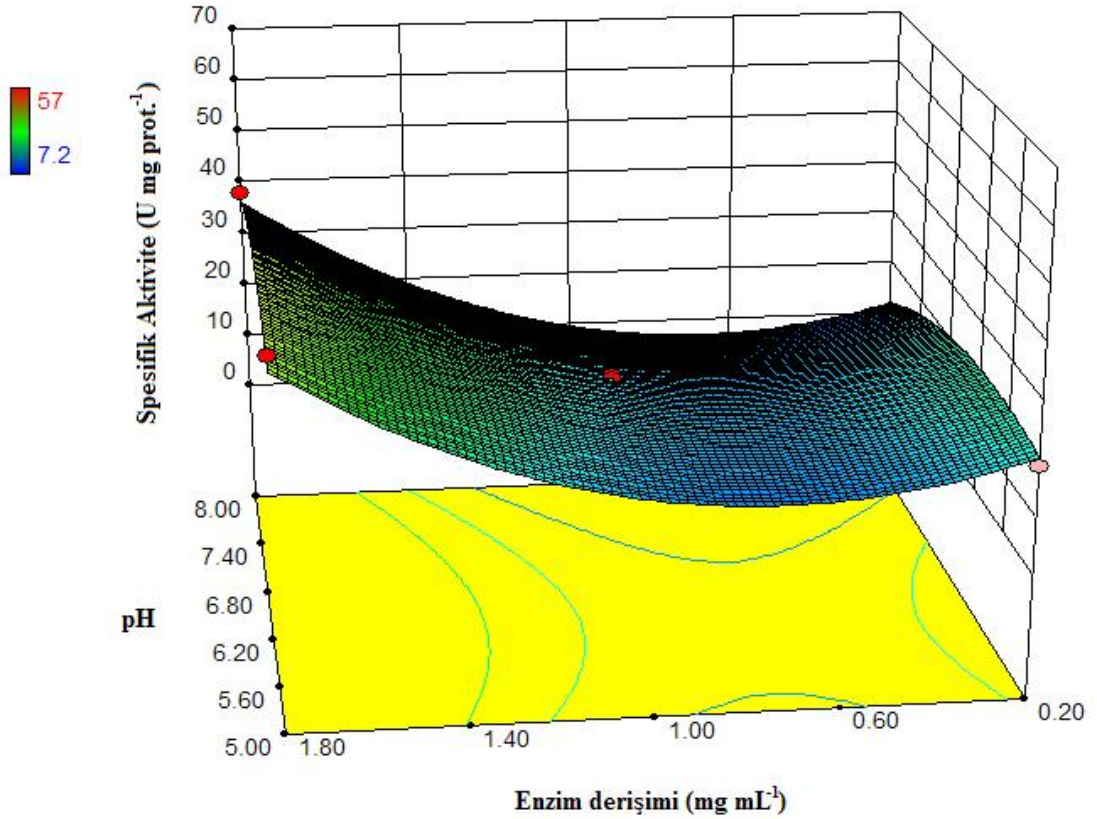
Çizelge 4.4. Deneysel sonuçlar ile tahminlenen sonuçların karşılaştırılması

Deneme Sayısı	Spesifik Aktivite (U mg prot ⁻¹)	Tahminlenen Aktivite (U mg prot ⁻¹)
1	17,4	18,00
2	38,4	36,75
3	54,0	64,28
4	14,4	23,03
5	57,0	46,73
6	19,2	20,85
7	15,6	23,18
8	18,0	18,00
9	32,4	24,83
10	9,6	12,30
11	45,6	39,68
12	21,0	12,38
13	7,2	13,13
14	43,2	40,50
15	18,6	18,00



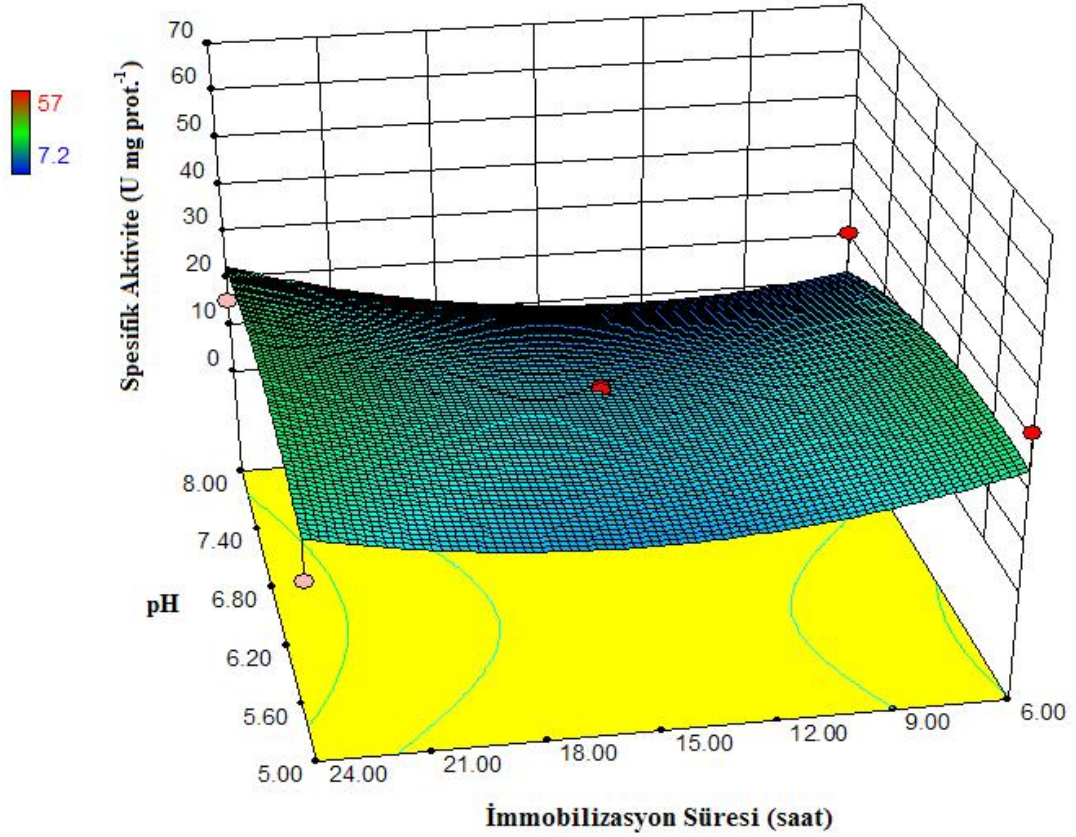
Şekil 4.1. Deneysel ve tahmini spesifik aktivite sonuçlarının karşılaştırılması.

Design Expert programı kullanılarak oluşturulan üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.2- 4.4' de gösterilmektedir.



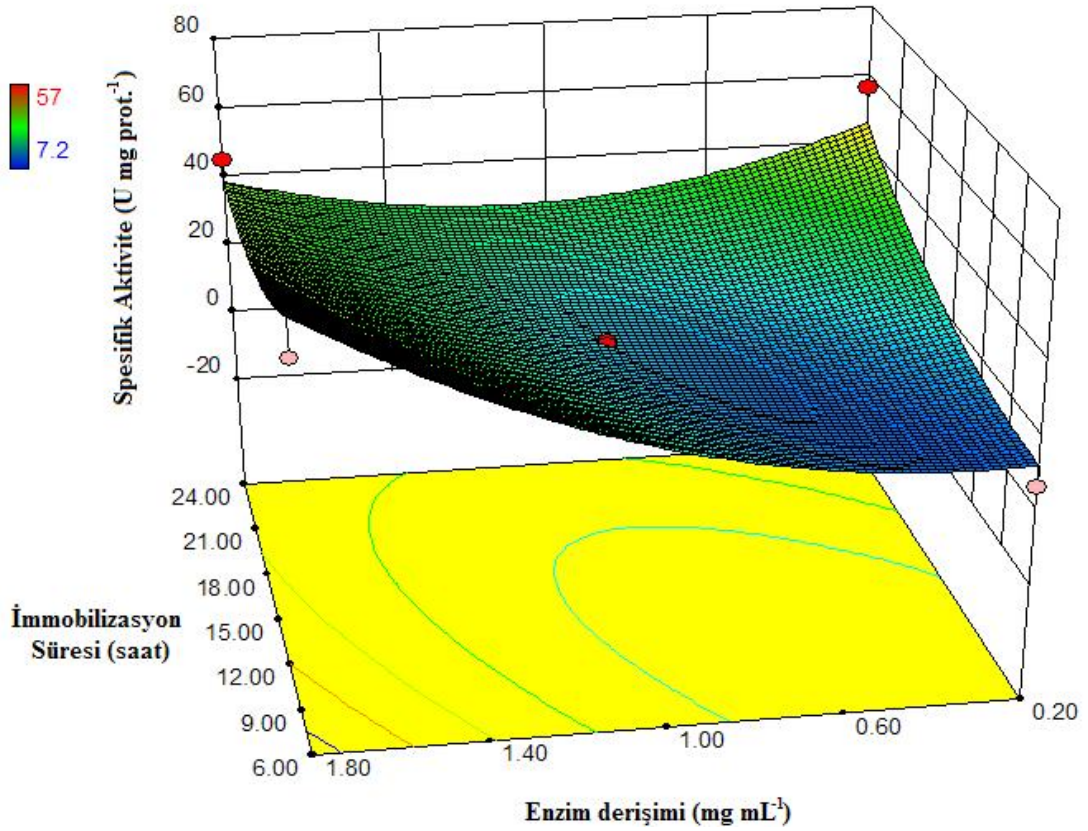
Şekil 4.2. Enzim derişimi ve pH' nın bir fonksiyonu olarak spesifik aktivitenin üç boyutlu grafiği.

Şekil 4.2' de enzim derişimi ve pH' nın bir fonksiyonu olarak sabit immobilizasyon süresinde spesifik aktivitenin üç boyutlu grafiği verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi enzim derişiminin 0,20 mg/mL olduğu koşullarda pH' nın 5,0 den 8,0'e yükselmesi ile spesifik aktivite 19,2 U mg prot⁻¹ den 9,6 U mg prot⁻¹ e azalmıştır. Dolayısıyla pH artışı spesifik aktiviteye negatif yönde etki etmiştir. Enzim derişimi ise pH' nın 5,0 olduğu koşullarda 0,2 mg/ml den 1,8 mg/mL' ye çıktıkça spesifik aktivite 19,2 U mg prot⁻¹den 43,2 U mg prot⁻¹e yükselmiştir. Enzim derişiminin artmasının spesifik aktiviteye pozitif yönde etki ettiği belirlenmiştir.



Şekil 4.3. İmmobilizasyon süresi ve pH' nın bir fonksiyonu olarak spesifik aktivitenin üç boyutlu grafiği.

Şekil 4.3' de immobilizasyon süresi ve pH' nın bir fonksiyonu olarak sabit enzim derişiminde spesifik aktivitenin üç boyutlu grafiği verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi 6. saatte pH' nın 5,0 den 8,0'e doğru çıkması ile spesifik aktivite 32,4 U mg prot⁻¹den 21,0 U mg prot⁻¹e azalmıştır. pH artışı spesifik aktiviteye negatif yönde etki etmiştir. pH' nın 5,0 olduğu koşullarda sürenin etkisi incelendiğinde 6. saatten 24. saate gidildiğinde spesifik aktivite 32,4 U mg prot⁻¹den 14,4 U mg prot⁻¹e azalmıştır. İmmobilizasyon süresinin artmasının spesifik aktiviteye negatif yönde etki ettiği belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Enzim derişimi ve immobilizasyon süresinin bir fonksiyonu olarak spesifik aktivitenin üç boyutlu grafiği.

Şekil 4.4' de enzim derişimi ve immobilizasyon süresinin bir fonksiyonu olarak sabit pH da spesifik aktivitenin üç boyutlu grafiği verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi enzim derişiminin 0,20 mg/mL olduğu koşullarda sürenin 6. saatten 24. saate doğru çıkması spesifik aktiviteyi 7,2 U mg prot⁻¹den 57 U mg prot⁻¹e arttırmıştır. Dolayısıyla zamanın artışı spesifik aktiviteye pozitif yönde etki etmiştir. Enzim derişimi ise sürenin 6. saatinde 0,2 mg/mL den 1.8 mg/ml' ye çıktıkça spesifik aktivite 7,2 U mg prot⁻¹den 54 U mg prot⁻¹e yükselmiştir. Enzim derişiminin artmasının spesifik aktiviteye pozitif yönde etki ettiği belirlenmiştir.

Bu sonuçlara göre selülağın Sepabeads EC-EP/M destek üzerine immobilizasyonu için en uygun şartlar Çizelge 4.2'de deneme sayısı 3 olan deneyin şartlarıdır yani pH 6,5, 50 mM fosfat tamponunda, 6 saat immobilizasyon süresinde, 25 °C sıcaklıkta ve enzim derişiminin 1,8 mg/mL olduğu şartlardır. Çizelge 4.2' deki deneme sayısı 5 olan deneyin aktivitesi en yüksek görünse de bu yüksek sonucun

nedeninin enzimin desteğe bağlanmasının çok az olmasından kaynaklandığı ve bu nedenle spesifik aktivite değerinin yüksek çıktığı düşünülebilir..

4.1.1.2. Selülazın ReliZyme HA403/M Desteğe İmmobilizasyonu İçin İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Selülazın ReliZyme HA403/M desteğe immobilizasyonu için optimizasyon şartlarının RSM metodu kullanarak belirlenmesi amacıyla Design Expert programına önceden belirlediğimiz farklı bağımsız değişken parametrelerimiz olan pH (5-8), immobilizasyon süresi (2-8 saat), enzim derişimi (0,2-1,8 mg/mL) ve sabit bağımsız değişken olan sıcaklık (25 °C) şeklinde uygulanmıştır. Burada sabit bağımsız değişken olan sıcaklığın tespiti amacıyla 15, 25, 35 °C’de ön immobilizasyon çalışmaları yapılmış olup en uygun sıcaklık 15 ve 25 °C olarak tespit edilmiştir. Bu iki sıcaklık değerinde yapılan immobilizasyon sonucunda belirlenen aktivite sonuçları birbirine yakın olduğundan 25 °C tercih edilmiştir. (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Selülazın ReliZyme HA403/M desteğe immobilizasyonda, immobilizasyon sıcaklığına bağlı olarak aktivite değerleri.

İmmobilizasyon Sıcaklığı (°C)	pH	Süre (saat)	Enzim Derişimi (mg/ml)	Spesifik Aktivite (U mg prot ⁻¹)
15	6,5	2	1,8	42,8
25	6,5	2	1,8	41,4
35	6,5	2	1,8	37,7

Değişkenlerin programa uygulanmasının sonrasında Box-Behnken deneysel dizaynı seçildiğinde Çizelge 4.6’ da gösterilen deney setlerine ulaşılmıştır. Bu 15 deney setinde verilen şartlarda ayrı ayrı immobilizasyonlar yapılmış ve spesifik aktivite sonuçları Çizelge 4.6’ da gösterilmiştir. Elde edilen spesifik aktivite değerleri Design Expert bilgisayar programı kullanılarak analiz edilmiş Eşitlik 3.1’de verilen β_{ko} , β_{ki} , β_{kii} katsayıları aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

$$Y=16,6+0,2625.A-1,09.B+9,15.C-0,325.AB-1,6.AC-4,85.BC+1,66.A^2 +5,76.B^2+7,29.C^2$$

Çizelge 4.6. Selülazın ReliZyme HA403/M desteğe immobilizasyonunda RSM kullanılarak elde edilen deney setlerinin aktivite değerleri.

Deneme sayısı	pH	Süre (saat)	Enzim Derişimi (mg/mL)	Sıcaklık (°C)	Spesifik Aktivite (U mg prot ⁻¹)
1	8,0	5	0,2	25	16,2
2	6,5	5	1,0	25	16,2
3	5,0	5	0,2	25	12,6
4	8,0	2	1,0	25	27,1
5	6,5	2	1,8	25	41,4
6	5,0	2	1,0	25	25,8
7	6,5	8	1,8	25	32,2
8	6,5	5	1,0	25	16,5
9	5,0	8	1,0	25	21,6
10	6,5	2	0,2	25	17,4
11	8,0	5	1,8	25	35,3
12	8,0	8	1,0	25	21,6
13	5,0	5	1,8	25	38,1
14	6,5	5	1,0	25	17,1
15	6,5	8	0,2	25	27,6

Eşitlik 3.1’de önerilen matematiksel modelin selülazın ReliZyme HA403/M desteğe immobilizasyonu sonunda elde edilen spesifik aktivite değerleri için uygunluğu en küçük kareler yönteminin kullanıldığı varyans analizi (ANOVA) ve model uygunsuzluğu testi (Lack of fit) ile incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7.Selülazın ReliZyme HA403/M desteğe immobilizasyonda yanıt yüzey yöntemi için ANOVA değerleri

kaynak	Kareler toplamı	df	Ortalama kareler	F değeri	p değeri Prob>F	
Model	1083,13	9	120,35	12,87	0.0058	anlamli
<i>A-pH</i>	0,55	1	0,55	0,059	0.8178	
<i>B-Zaman</i>	9,46	1	9,46	1,01	0.3607	
<i>C-Enzim Derisimi</i>	669,78	1	669,78	71,62	0.0004	anlamli
AB	0,42	1	0,42	0,045	0.8401	
AC	10,24	1	10,24	1,09	0.3433	
BC	94,09	1	94,09	10,06	0.0248	anlamli
A ²	10,21	1	10,21	1,09	0.3441	
B ²	122,61	1	122,61	13,11	0.0152	anlamli
C ²	166,09	1	166,09	20,97	0.0060	anlamli
kalıntı	46,76	5	9,35			
Regresyon Katsayısının uyumluluğu	46,34	3	15,45	73,56	0.0134	anlamli

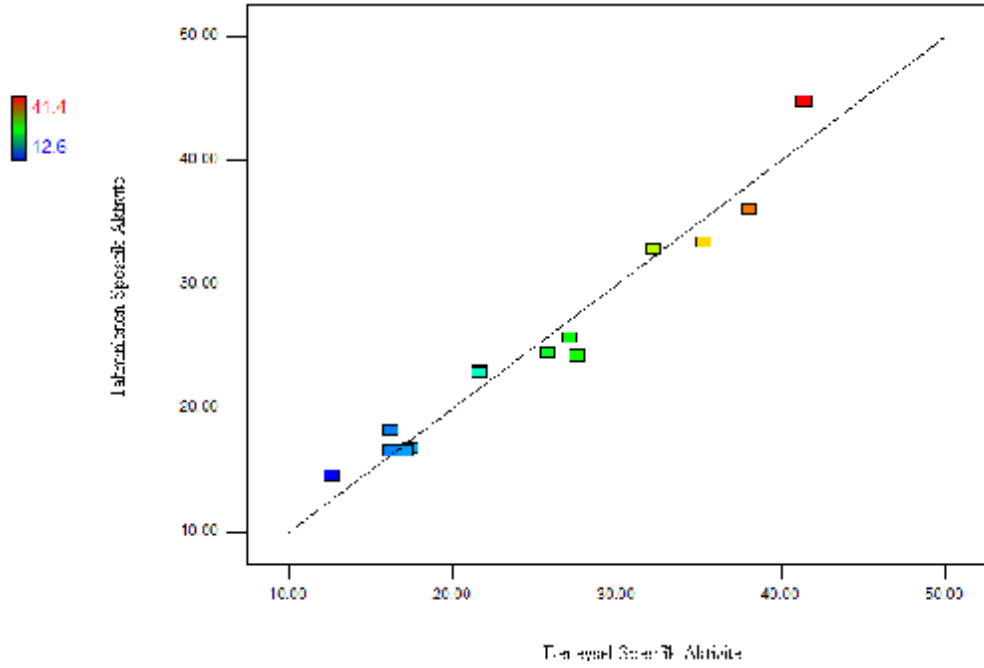
Önerilen matematiksel model için F değeri 12,87 ve Prob>F değeri 0,0058 olarak hesaplanmış ve yanılma payı % 0,58 verilmiştir. Regresyon modelinin belirleyicilik katsayısı (R²) 0.96 bulunmuştur. Bu sonuç önerilen matematiksel modelin toplam değişimin % 96'sını açıkladığını göstermektedir. Prob>F değeri 0,0500 den daha küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Model uygunsuzluğu testinde Prob>F 0,0134 bulunduğu için anlamlıdır. Selülazın ReliZyme HA403/M desteğe immobilizasyonunda elde edilen deneysel spesifik aktivite sonuçlarının,

$$Y=16,6+0,2625.A-1,09.B+9,15.C-0,325.AB-1,6.AC-4,85.BC+1,66.A^2 +5,76.B^2+7,29.C^2$$

eşitliği kullanılarak elde edilen tahmini spesifik aktivite sonuçları ile karşılaştırılması Çizelge 4.8 ve Şekil 4.5’de verilmiştir. Deneysel spesifik aktivite sonuçları ile tahmini spesifik aktivite sonuçları birbirlerine ne kadar yakın ise Şekil 4.5’de gösterilen renkli kutucuklar o oranda birbirlerine yakın olacaklar ve orta çizgi üzerinde toplanacaklardır.

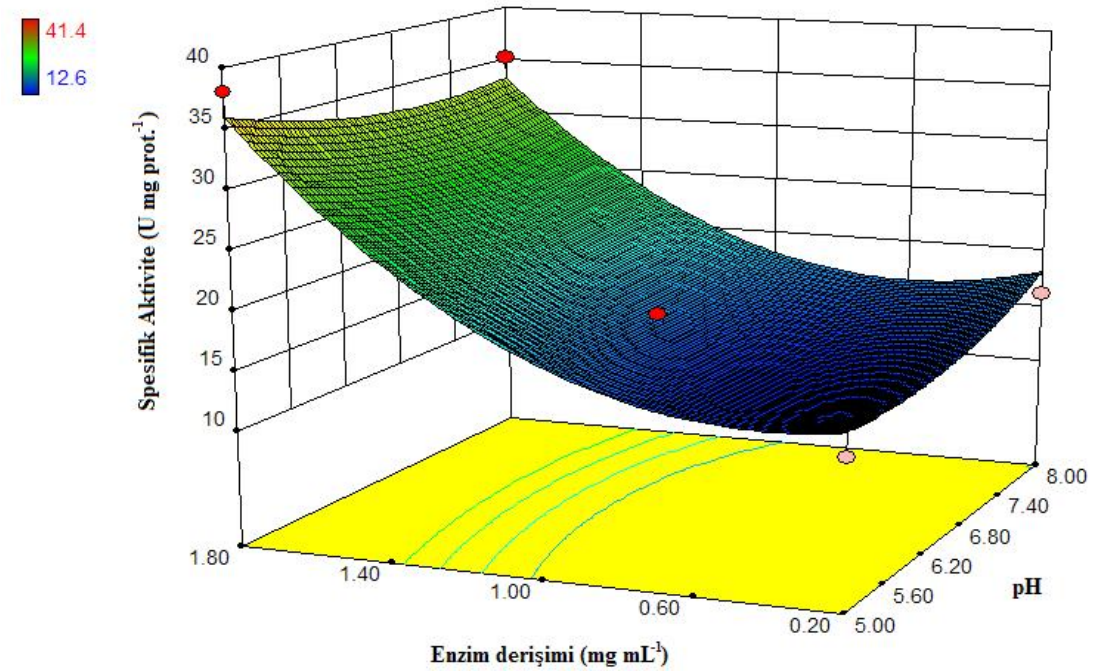
Çizelge 4.8. Deneysel sonuçlar ile tahminlenen sonuçların karşılaştırılması

Deneme sayısı	Spesifik Aktivite (U mg prot ⁻¹)	Tahminlenen Aktivite (U mg prot ⁻¹)
1	16,2	18,26
2	16,2	16,60
3	12,6	14,54
4	27,1	25,70
5	41,4	44,74
6	25,8	24,53
7	32,2	32,86
8	16,5	16,60
9	21,6	23,00
10	17,4	16,74
11	35,3	33,36
12	21,6	22,87
13	38,1	36,04
14	17,1	16,60
15	27,6	24,26



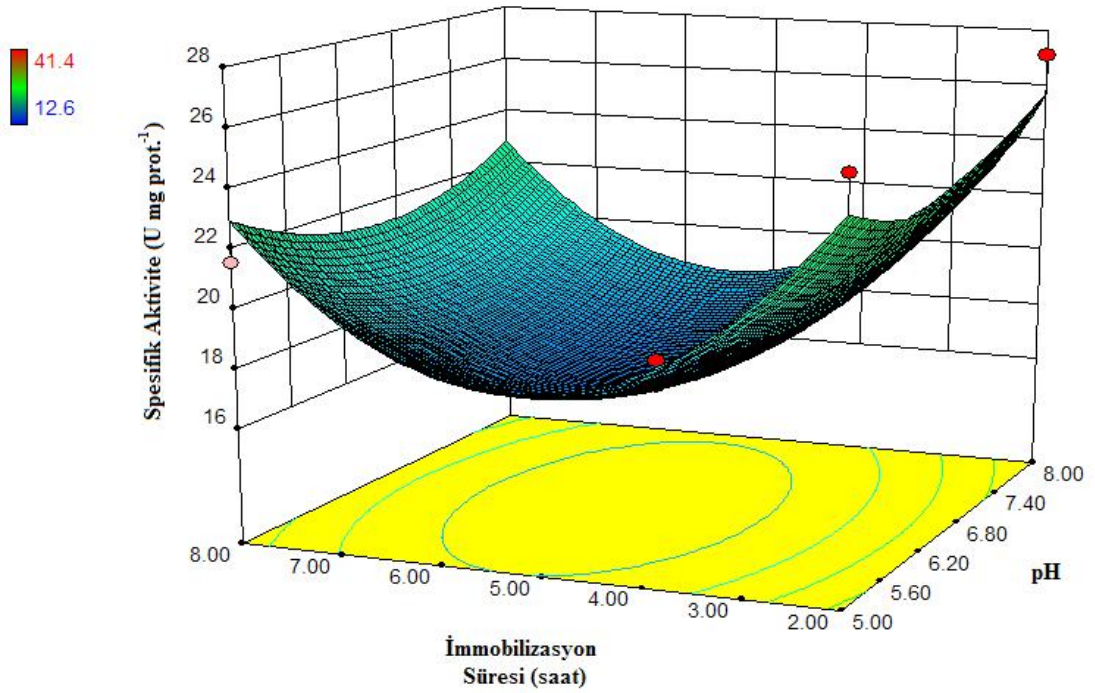
Şekil 4.5. Deneysel ve tahmini spesifik aktivite sonuçlarının karşılaştırılması.

Design Expert programı kullanılarak oluşturulan üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.6- 4.8' de gösterilmektedir.



Şekil 4.6. Enzim derişimi ve pH' nın bir fonksiyonu olarak spesifik aktivitenin üç boyutlu grafiği.

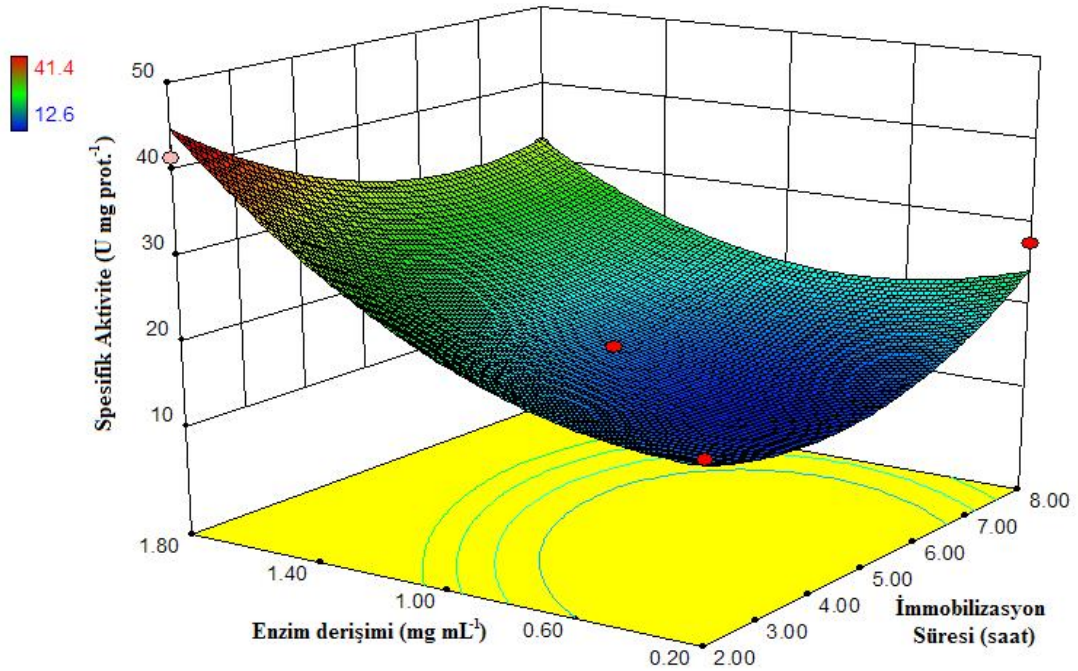
Şekil 4.6' de enzim derişimi ve pH' nın bir fonksiyonu olarak sabit immobilizasyon süresinde spesifik aktivitenin üç boyutlu grafiği verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi enzim derişiminin 0,20 mg/ml olduğu koşullarda pH' nın 5,0 den 8,0'e yükselmesi ile spesifik aktivite 12,6 U mg prot⁻¹den 16,2 U mg prot⁻¹e artmıştır. Dolayısıyla pH artışı spesifik aktiviteye pozitif yönde etki etmiştir. Enzim derişimi ise pH' nın 5,0 olduğu koşullarda 0,2 mg/mL den 1.8 mg/mL' ye yükseltildiğinde spesifik aktivite 12,6 U mg prot⁻¹den 38,1 U mg prot⁻¹e çıkmıştır. Enzim derişiminin artmasının spesifik aktiviteye pozitif yönde etki ettiği belirlenmiştir.



Şekil 4.7. İmmobilizasyon süresi ve pH' nın bir fonksiyonu olarak spesifik aktivitenin üç boyutlu grafiği.

Şekil 4.7' de immobilizasyon süresi ve pH' nın bir fonksiyonu olarak sabit enzim derişiminde spesifik aktivitenin üç boyutlu grafiği verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi zamanın 2,0 saat olduğu koşullarda pH' nın 5,0 den 8,0'e doğru yükselmesi ile spesifik aktivite 25,8 U mg prot⁻¹den 27,1 U mg prot⁻¹e artmıştır. pH artışı spesifik aktiviteye pozitif yönde etki etmiştir. pH' nın 5,0 olduğu koşullarda zamanın etkisi incelendiğinde 2. saatten 8. saate gidildiğinde spesifik aktivite 25,8 U

mg prot⁻¹den 21,6 U mg prot⁻¹e azalmıştır. İmmobilizasyon süresinin artmasının spesifik aktiviteye negatif yönde etki ettiği belirlenmiştir.



Şekil 4.8. Enzim derişimi ve immobilizasyon süresinin bir fonksiyonu olarak spesifik aktivitenin üç boyutlu grafiği.

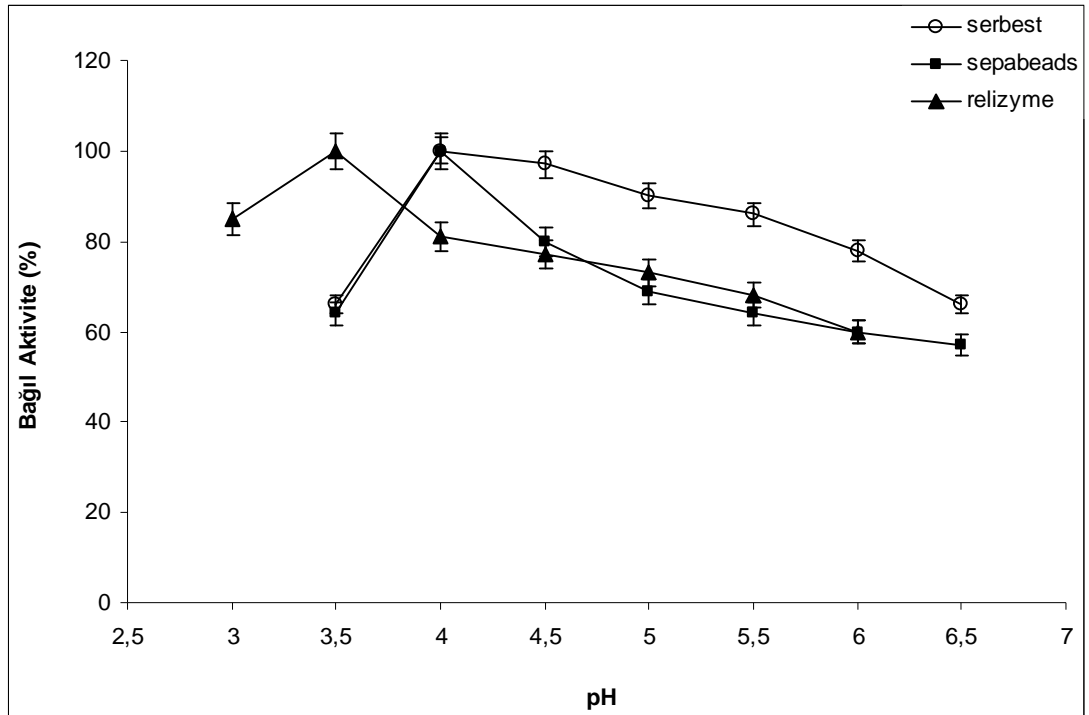
Şekil 4.8' de enzim derişimi ve immobilizasyon süresinin bir fonksiyonu olarak sabit pH da spesifik aktivitenin üç boyutlu grafiği verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi enzim derişiminin 0,20 mg/mL olduğu koşullarda sürenin 2. saatten 8. saate yükselmesi spesifik aktiviteyi 17,4 U mg prot⁻¹den 27,6 U mg prot⁻¹e arttırmıştır. Dolayısıyla sürenin artışı spesifik aktiviteye pozitif yönde etki etmiştir. Enzim derişimi ise sürenin 2 olduğu koşullarda 0,2 mg/mL' den 1.8 mg/mL' ye yükseldikçe spesifik aktivite 17,4 U mg prot⁻¹den 41,4 U mg prot⁻¹e yükselmiştir. Enzim derişiminin artması spesifik aktiviteye pozitif yönde etki etmektedir.

Bu sonuçlara göre selülazın ReliZyme HA403/M destek üzerine immobilizasyonu için en uygun şartlar Çizelge 4.6'da deneme sayısı 5 olan deneyin şartlarıdır yani pH 6,5, 50 mM fosfat tamponunda, 2,0 saat immobilizasyon

zamanında, 25 °C sıcaklıkta ve enzim derişiminin 1,8 mg/mL olduğu koşullarda gerçekteşirilmifitir.

4.1.2. Serbest, Sepabeads EC-EP/M ve ReliZyme HA403/M Desteklere İmmobilize Edilmiř Olan Selülaźların Karakterizasyonu

Serbest, Sepabeads EC-EP/M ve ReliZyme HA403/M desteęe immobilize edilmiř selülaźların optimum pH'sının belirlenmesinde serbest selülaź için pH'sı 3,5-6,5, Sepabeads EC-EP/M desteęe immobilize selülaź için pH'sı 3,5-6,5, ReliZyme HA403/M desteęe immobilize selülaź için pH'sı 3,0-6,0 arasında deęiřen 50 mM farklı tampon çözeltileri (3,0 sitrat-Na₂HPO₄, 3,5 sitrat, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 asetat, 6,0 sitrat, 6,5 fosfat) kullanılmıřtır ve sonuçlar Őekil 4.9'da gösterilmiřtir.

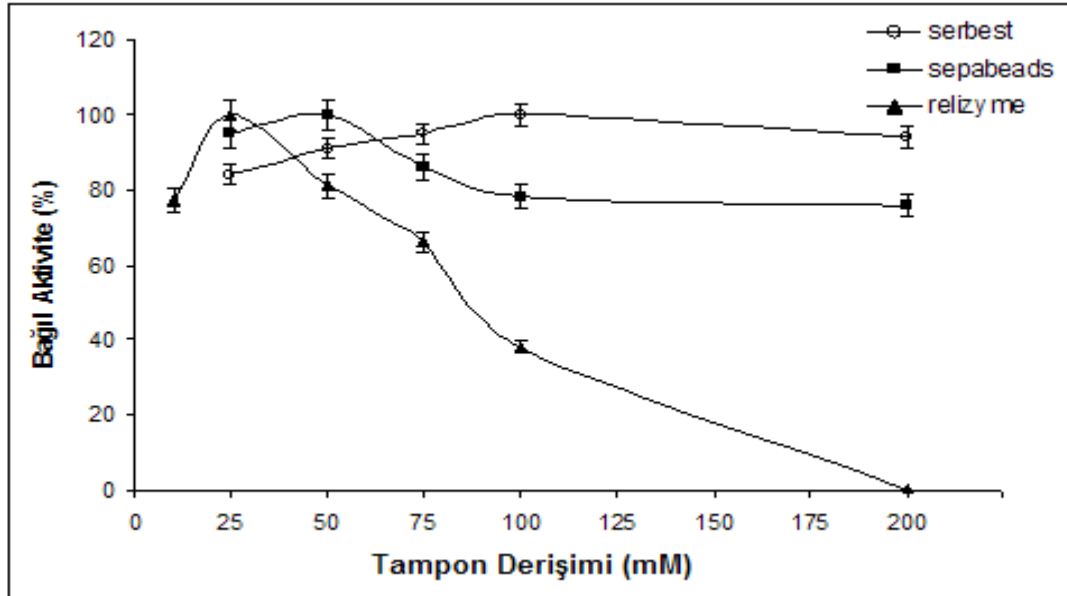


Őekil 4.9. Serbest, Sepabeads EC-EP/M ve ReliZyme HA403/M desteęe immobilize selülaźların aktivitelerinin pH'ya baęlı deęiřimi.

Őekil 4.9'dan görüleceęi gibi serbest selülaź için optimum pH 4,0 olarak belirlenmiřtir. Serbest selülaźın geniř bir pH aralıęında (pH 4,0-6,0) yüksek aktivite

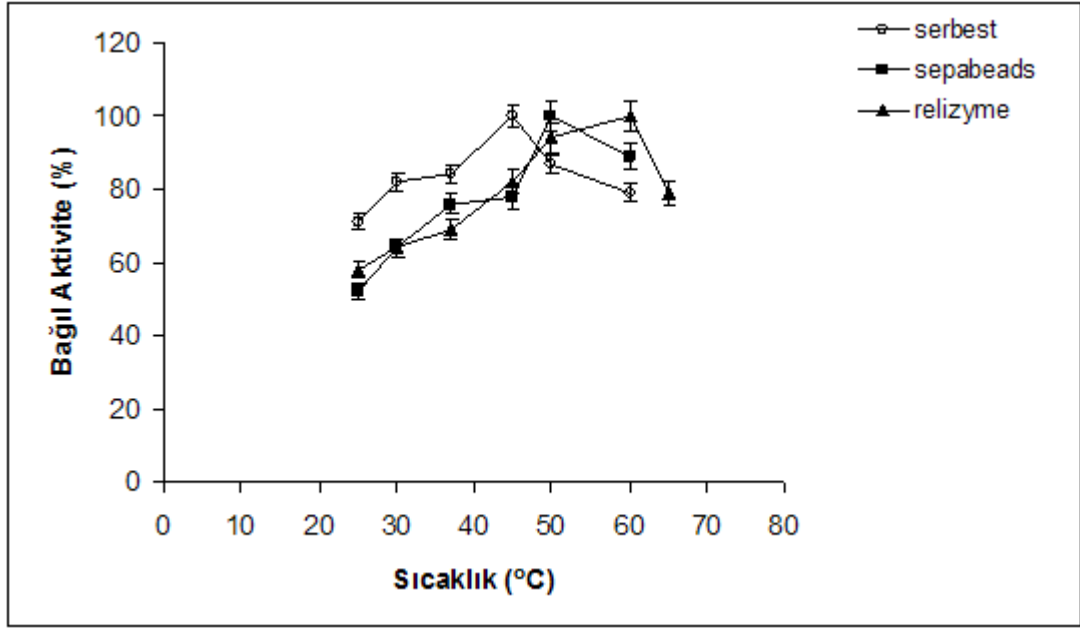
gösterdiği görülmektedir. Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selülazında optimum aktivitesi pH 4,0'da gösterdiği ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülazın ise pH 3,5'de optimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Belirlenen optimum pH'larda farklı derişimlerde (25,50,75,100 ve 200 mM) tampon çözeltileri hazırlanarak serbest ve immobilize selülazların aktiviteleri ölçülmüştür. Şekil 4.10'den görüldüğü gibi serbest selülaz için optimum tampon derişimi 100 mM, Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selülazın optimum tampon derişimi 50 mM, ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülazın ise 25 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Serbest, Sepabeads EC-EP/M ve ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülazların aktivitelerinin tampon derişimine bağlı olarak değişimi.

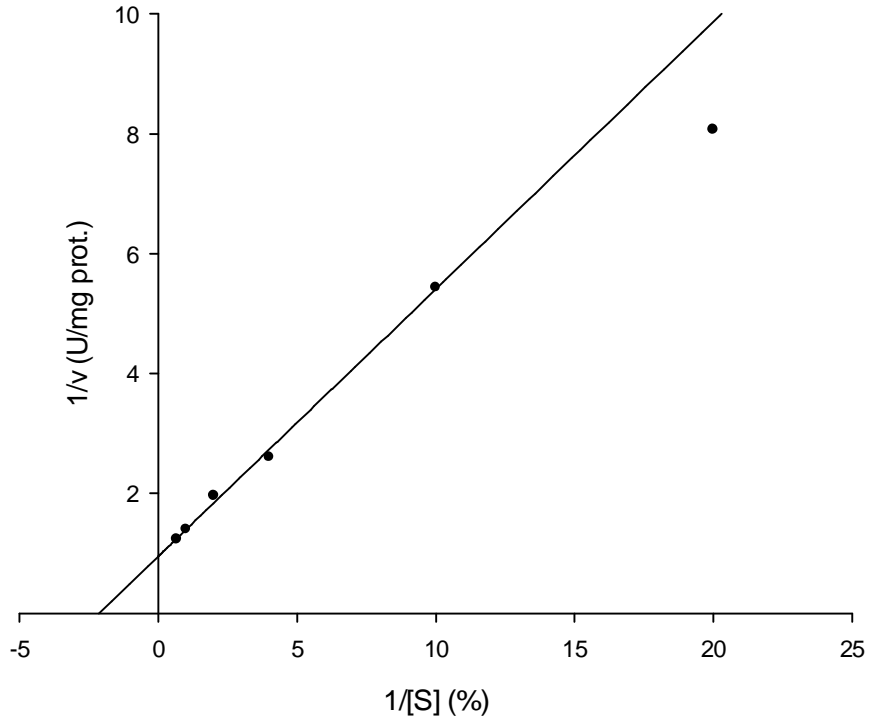
Serbest ve immobilize selülazların belirlenen optimum pH ve tampon derişimlerinde farklı sıcaklıklardaki (25,30,37,45,50,60 ve 65 °C) aktiviteleri Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Serbest, Sepabeads EC-EP/M ve ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülozların aktivitelerinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi.

Serbest selülozün optimum çalışma sıcaklığı 45 °C olarak belirlenmiştir. Bu sıcaklık değerlerinin altındaki sıcaklıklarda aktivitede keskin bir düşme gözlenmiştir. 60 °C’de serbest selülozün aktivitesi başlangıç aktivitesinin % 79’unu koruduğu gözlenmiştir. Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selülozün maksimum aktivitesini 50 °C’ de, ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selüloz ise 60 °C’ de gösterdiği belirlenmiştir.

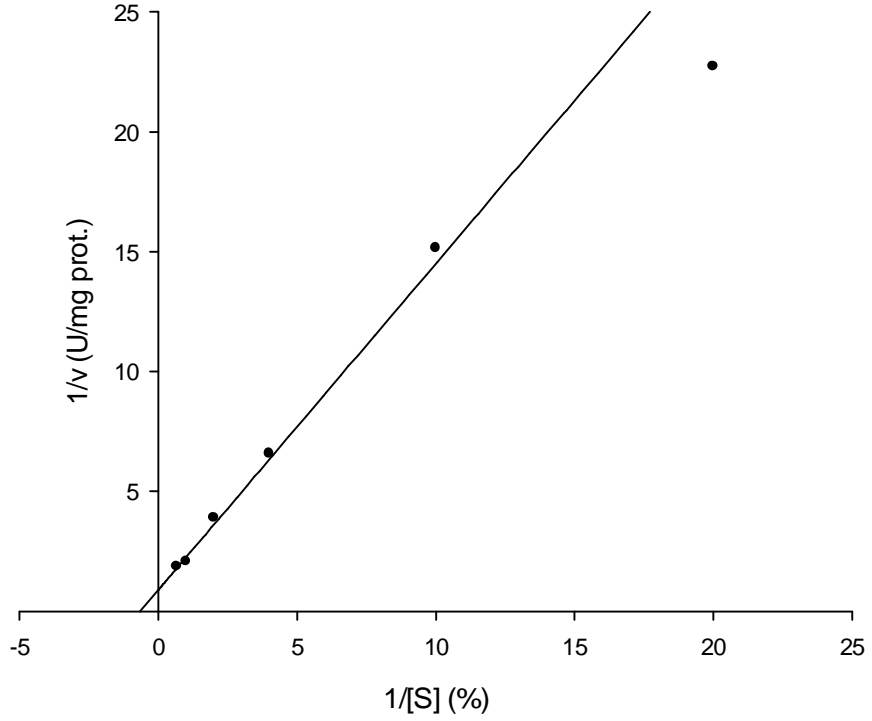
Belirlenen optimum koşullarda farklı karboksimetilselüloz derişimlerinde serbest ve immobilize selülozların aktiviteleri ölçülerek Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiş ve sonuçlar 4.12-4.14’de gösterilmiştir.



Şekil 4. 12. Serbest selülag için Lineweaver-Burk grafiği.

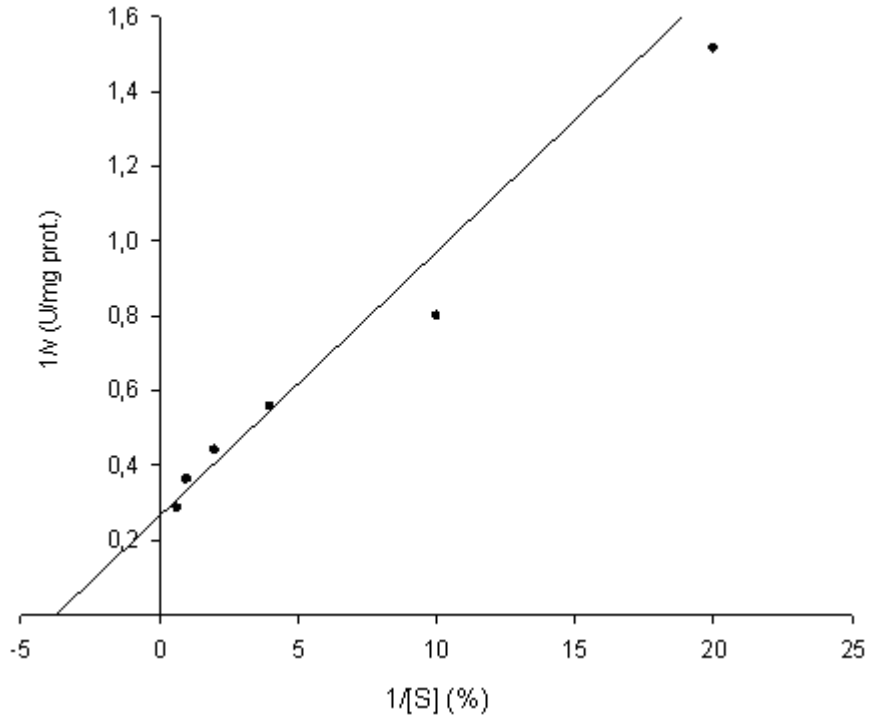
Serbest selülag için $V_{\max}=1,05$ U/mg prot., $K_m=0,47$ %, geri dönüşüm katsayısı ($k_{\text{kat}}=4,06$ dk⁻¹) olarak bulunmuştur (Şekil 4.12).

Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selülag için $V_{\max}=1,1$ U/mg prot., $K_m=1,5$ %, geri dönüşüm katsayısı ($k_{\text{kat}}=4,25$ dk⁻¹) olarak bulunmuştur (Şekil 4.13).



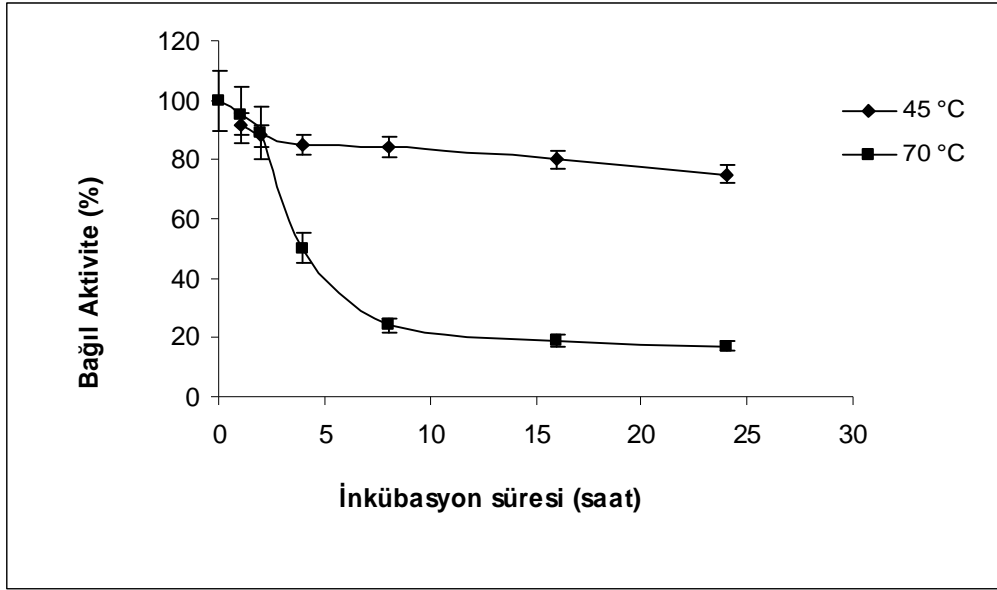
Şekil 4.13. Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selülaz için Lineweaver-Burk grafiği.

ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülaz için $V_{max}=3,78$ U/mg prot., $K_m=0,27$ %, geri dönüşüm katsayısı ($k_{kat}=14,62$ dk⁻¹) olarak bulunmuştur (Şekil 4.14).



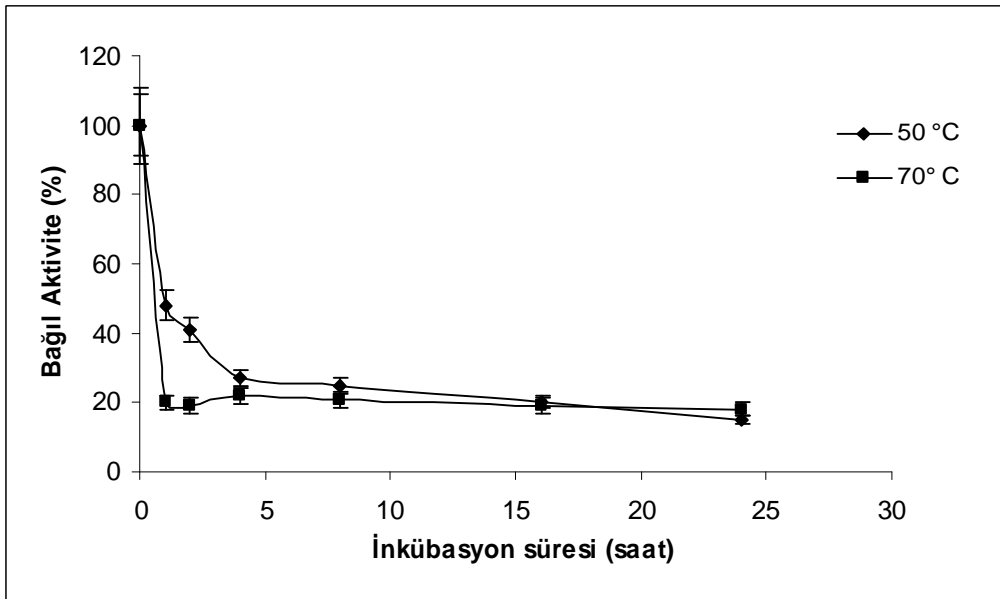
Şekil 4.14. ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülag için Lineweaver-Burk grafiği.

Serbest selülagın termal kararlılığının belirlenmesi için derişimi 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanmış selülag 45 ve 70 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (1,2,4,8,16 ve 24 saat) örnekler alınarak belirlenen optimum koşullarda, kalan aktiviteleri ölçülmüştür (Şekil 4.15). 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda serbest selülagın 45 ve 70 °C'de başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 75 ve 17'sini koruduğu belirlenmiştir. Serbest selülagın 45 ve 70 °C'deki termal inaktivasyon sabitleri (k_i) sırasıyla 0,0132 ve 0,0846 saat⁻¹ ve yarı ömürleri ($t_{1/2}$) ise 52,5 ve 8,19 saat olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.15. Serbest selülazin 45 ve 70 °C’de aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi.

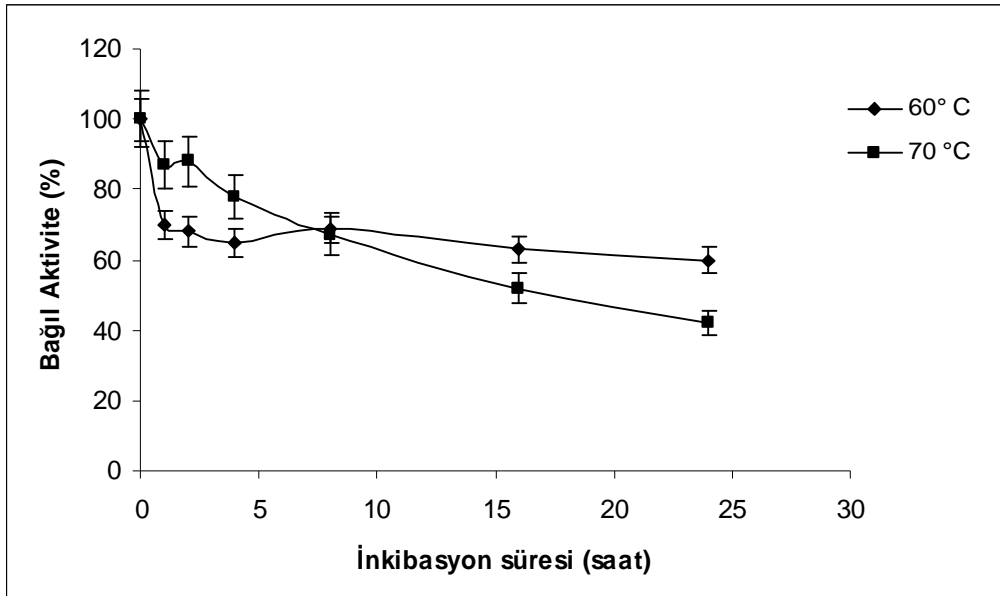
Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize edilmiş selülazin termal kararlılığının belirlenmesinde 50 ve 70 °C’de 24 saat boyunca inkübe edilen immobilize enzimden belirli zaman aralıklarında eşit miktarlarda örnekler alınarak kalan aktiviteleri ölçülmüştür (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selülazin bağıl aktivitesinin 50 ve 70 °C’de inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi.

Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selülazın 50 ve 70 °C’de 24 saat inkübasyon süresi sonunda başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 15 ve % 17’sini koruduğu ve aktivitede önemli bir düşüşün olduğu belirlenmiştir. 50 ve 70 °C’deki termal inaktivasyon sabitleri (k_i) ise sırasıyla 0,092 ve 0,089 saat⁻¹ ve yarı ömürleri ($t_{1/2}$) ise 7,5 ve 7,8 saat olarak belirlenmiştir.

ReliZyme HA403/M desteğe immobilize edilmiş selülazın termal kararlılığının belirlenmesinde 60 ve 70 °C’de 24 saat boyunca inkübe edilen immobilize enzimden belirli zaman aralıklarında eşit miktarlarda örnekler alınarak kalan aktiviteleri ölçülmüştür (Şekil 4.17).

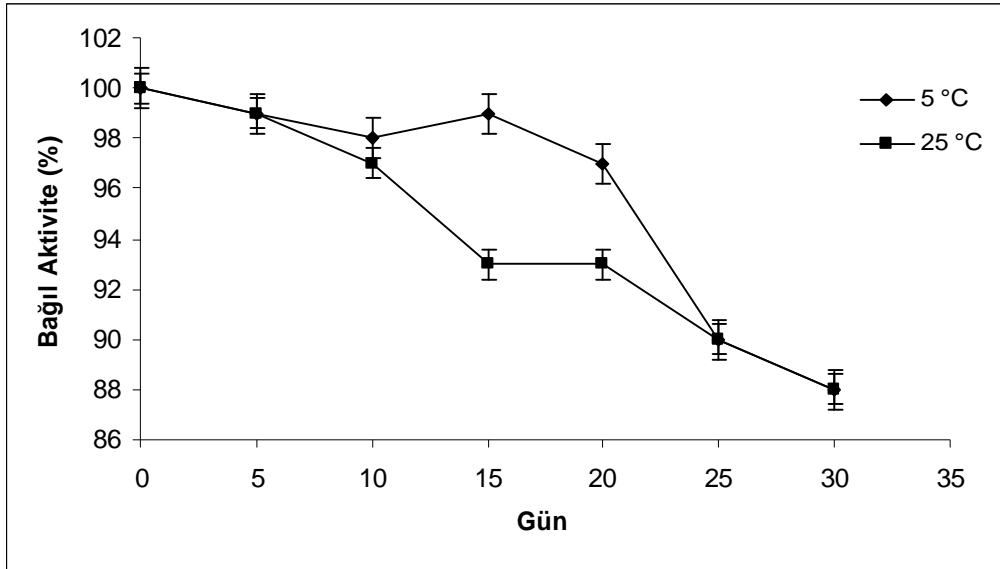


Şekil 4.17. ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülazın bağıl aktivitesinin 60 ve 70 °C’de inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi.

ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülazın 60 ve 70 °C’de 24 saat inkübasyon süresi sonunda başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 60 ve 42’sini koruduğu belirlenmiştir. 60 ve 70 °C’deki termal inaktivasyon sabitleri (k_i) ise sırasıyla 0,024 ve 0,039 saat⁻¹ ve yarı ömürleri ($t_{1/2}$) ise 28,9 ve 17,8 saat olarak belirlenmiştir.

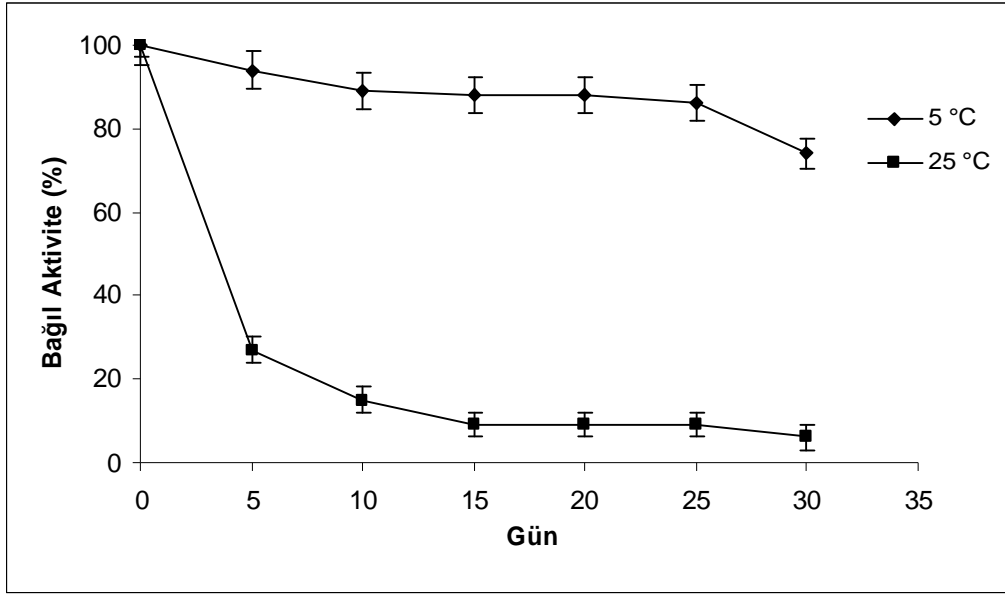
Serbest selülazın depolama kararlılığının belirlenmesi için derişimi 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanmış selülaz 5 °C ve oda sıcaklığında (25 °C) inkübe edilmiş ve belirli zaman aralıklarında eşit miktarlarda örnekler alınarak selülazın kalan

aktivitesi ölçülmüştür. 30 gün depolama süresi sonunda selülazın 5 °C ve oda sıcaklığında (25 °C) başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 88'ini korudukları belirlenmiştir (Şekil 4.18).



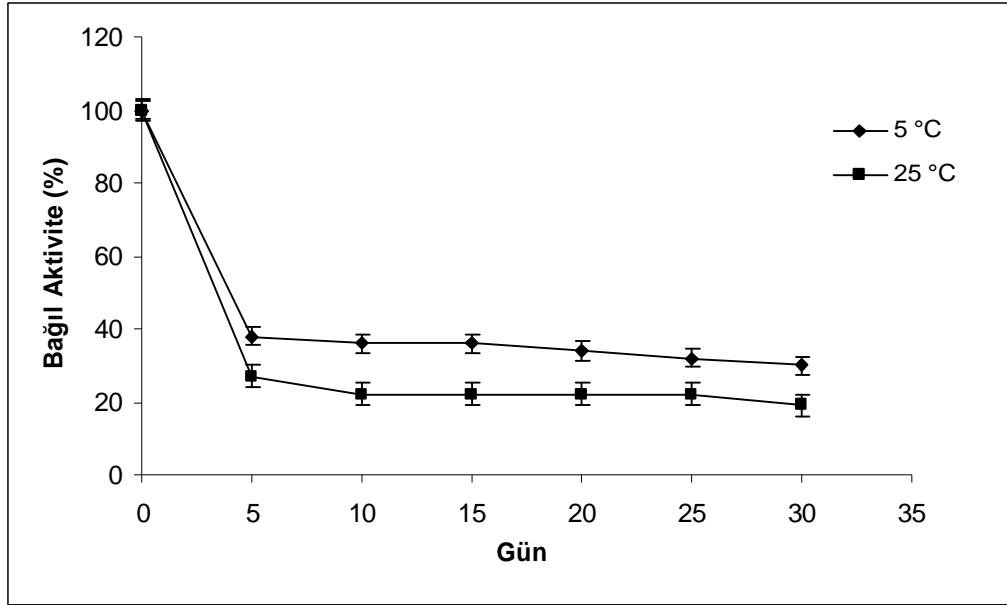
Şekil 4.18. Serbest selülazın bağıl aktivitesinin 5 °C ve oda sıcaklığında (25 °C) depolama süresine bağlı olarak değişimi.

Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selülazın depolama kararlılığının belirlenmesi için ise 5 °C ve oda sıcaklığında (25 °C) inkübe edilmiş ve belirli zaman aralıklarında eşit miktarlarda örnekler alınarak immobilize selülazın kalan aktivitesi ölçülmüştür. 30 gün depolama süresi sonunda 5 °C'de depolanan immobilize selülazın başlangıç aktivitesinin % 74'ünü, oda sıcaklığında depolananın ise başlangıç aktivitesinin sadece % 6'sını koruduğu belirlenmiştir (Şekil 4.19).



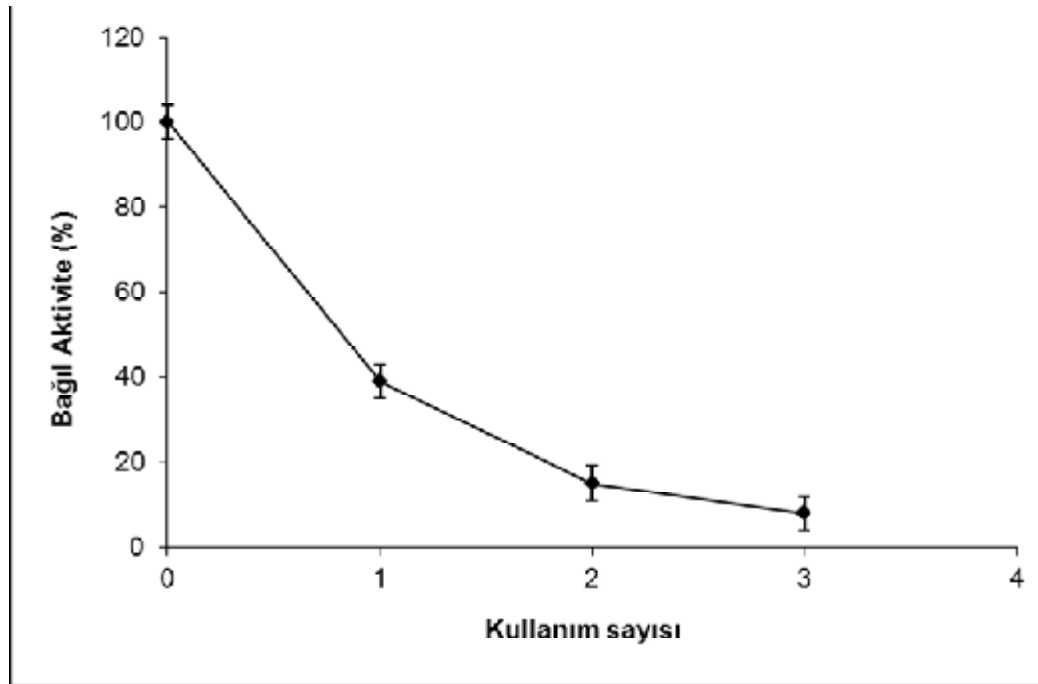
Şekil 4.19. Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selülazın bağıl aktivitesinin 5 °C ve oda sıcaklığında (25 °C) depolama süresine bağlı olarak değişimi.

ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülazın depolama kararlılığının belirlenmesi için ise 5 °C ve oda sıcaklığında (25 °C) inkübe edilmiş ve belirli zaman aralıklarında eşit miktarlarda örnekler alınarak immobilize selülazın kalan aktivitesi ölçülmüştür. 30 gün depolama süresi sonunda 5 °C'de depolanan immobilize selülazın başlangıç aktivitesinin % 30'unu, oda sıcaklığında depolananın ise başlangıç aktivitesinin sadece % 19'unu koruduğu belirlenmiştir (Şekil 4.20).

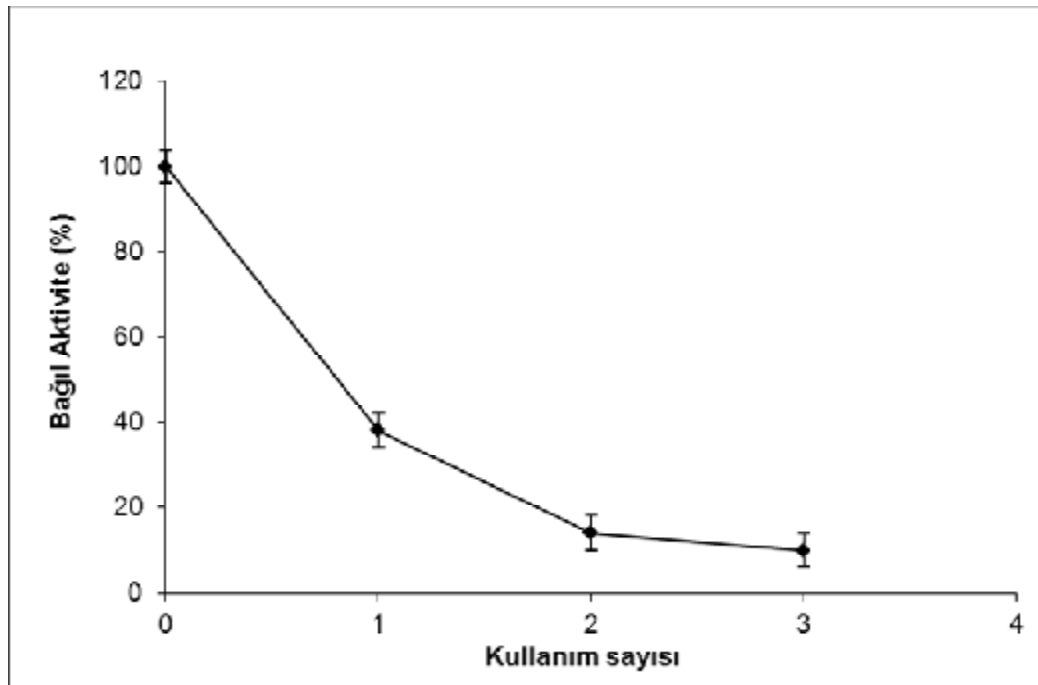


Şekil 4.20. ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülazın bağıl aktivitesinin 5 °C ve oda sıcaklığında (25 °C) depolama süresine bağlı olarak değişimi.

Sepabeads EC-EP/M ve ReliZyme HA403/M desteklere immobilize selülaz enziminin karboksimetilselüloz hidrolizi için tekrar kullanım kararlılığı Şekil 4.21 ve Şekil 4.22’de verilmiştir. Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selülaz 3. kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin % 8’ini korurken ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülazın % 10’unu koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.21. Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selülozün tekrar kullanım kararlılıklarının belirlenmesi.



Şekil 4.22. ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülozün tekrar kullanım kararlılıklarının belirlenmesi.

4.2. Tartışma

Enzimler çeşitli koşullar altında örneğin sıcaklık, pH, iyonik şiddet, denatüre edici ajanlar, basınç veya mekanik güçler gibi etkilerle inaktive olabilirler (Dinçer ve Telefoncu., 2007). Bu olumsuzlukların giderilmesi için enzimleri immobilize etme ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Doğru immobilizasyon metodunun seçimi, yüksek aktivite elde edilmesi ve uzun süre kullanılabilen bir biyokatalizlenmenin sağlanabilmesi önemli zorunluluktur (Hilterhaus ve ark., 2008). Bu çalışmada sanayide birçok kullanım alanına sahip olan selüloz enziminin ticari olarak satılan epoksid fonksiyonel grubu içeren Sepabeads EC-EP/M desteğe ve ilk kez olarak hegzametildiamino fonksiyonel grubu içeren ReliZyme HA403/M desteklere immobilizasyon şartları incelenmiş ve optimum aktivitenin alındığı koşullar tespit edilmiştir.

İmmobilizasyon işlemine başlamadan önce amin fonksiyonel grubu içeren desteklerin glutaraldehit ile aktifleştirilmesi ve sonrasında enzimin immobilizasyonu çoğu araştırmacı tarafından yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Tükel ve Alptekin, 2004; Taylor ve ark., 2005; Betancor ve ark., 2006; Alptekin ve ark., 2010). Bu amaçla hegzametildiamino fonksiyonel grubu içeren ReliZyme HA403/M desteğe glutaraldehit ile aktifleştirme işlemi uygulanmıştır. Epoksid fonksiyonel grubu içeren Sepabeads EC-EP/M destek ise herhangi bir ön işlem uygulanmadan immobilizasyon yapılmıştır.

Her iki desteğe selüloz immobilizasyonunun optimum koşullarını belirlemek amacıyla yanıt yüzey metodu kullanılmıştır. Yaptığımız ön çalışmalarda ve literatürlerde, kullandığımız desteklere enzimin immobilizasyonu için uygun inkübasyon sıcaklığının 25 °C olduğu belirlenmiştir (Mateo ve ark., 2006). Sıcaklık sabit tutulup yanıt yüzey metodu kullanarak elde ettiğimiz deney şartlarına uygun olarak denemeler yapıldığında Sepabeads EC-EP/M desteğe selüloz enziminin immobilizasyonu için en uygun bağlanma pH'sı 6,5, immobilizasyon süresi 6 saat ve selüloz enzim derişimi ise 1,8 mg/ml olarak bulunmuştur. ReliZyme HA403/M desteğe selüloz enziminin immobilizasyonu için en uygun bağlanma pH'sı 6,5 immobilizasyon süresi 2 saat ve selüloz enzim derişimi ise 1,8 mg/ml olarak

bulunmuştur. Bu sonuçlar heriki destek için immobilizasyon süresi haricinde diğer parametrelerin benzer olduğunu göstermektedir.

Enzim immobilizasyon çalışmalarının en önemli basamağı olan pH seçimi için Şekil 4.10'da görüleceği gibi serbest ve immobilize selülazın geniş bir pH (3,5-6.5) aralığında aktivitesinin çok düşüğe uğramaması bazik bölgelere göre asidik bölgelerde aktivitenin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Asidik pH da immobilizasyonun verimli olması uzun süreli çalışmalardaki mikrobiyal kontaminasyonların engellenmesi açısından avantajlı bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır (Dinçer ve Telefoncu., 2007; Kubitzki ve ark., 2008; Okutucu ve ark.,2010; Bayraktar ve ark.,2011).

Serbest ve immobilize selülazın aktivitelerinin tampon derişimine bağıli değişimleri incelendiğinde aktivitelerinin denenen aralıklardaki tampon derişiminden etkilendiği gözlenmiştir. Serbest enzimin maksimum aktivite gösterdiği tampon derişiminin immobilize enzime oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. İmmobilize selülazın maksimum aktivite gösterdiği reaksiyon ortamının iyonik şiddetinin düşük olması enzimin desteğe daha hızlı ve verimli şekilde bağlandığını göstermektedir (Kubitzki ve ark., 2008; Bayraktar ve ark.,2011)

Yüksek sıcaklık değerleri reaksiyon sistemine fazladan enerji sağlayabilir ve immobilizasyon prosesini hızlandırabilir fakat aynı zamanda proteini denatüre edebilir ve selülaz enziminin aktivitesini düşürür (Hung ve ark.,2011). 25-65 °C arası deneysel çalışmamız sonunda serbest selülaz için optimum sıcaklık 45 °C, Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selülaz için 50 °C, ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülaz için ise 60 °C olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi 45 °C'den yüksek sıcaklıklarda serbest enzimin aktivitesi azalmıştır. Bu sonuç 45 °C' nin üstündeki sıcaklıklarda enzimin denatüre olmaya başladığını düşündürmektedir. (Yiğitoğlu ve Temoçin.,2010). İmmobilizasyondan sonra ise selülaz enziminin maksimum aktivitesinin belirlendiği sıcaklık 50-60 °C aralığı olduğu sonuçlarımıza göre söylenebilir. İmmobilizasyon sonucunda yüksek sıcaklıklarda enzimin stabil kalabilmesinin nedeni enzim ve destek arasında rijit bir yapının oluşması nedeni ile açıklanabilir (Bayramoğlu ve ark.,2002).

Serbest selüloz için $V_{max}=1,05$ U/mg prot., $K_m=0,47$ %, geri dönüşüm katsayısı ($k_{kat}=4,06$ dk⁻¹) olarak bulunmuştur.

Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selüloz için $V_{max}=1,1$ U/mg prot. $K_m=1,5$ %, geri dönüşüm katsayısı ($k_{kat}=4,25$ dk⁻¹) olarak bulunmuştur. Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selülazın serbest enzime göre K_m değerinin yaklaşık 3 kat artmış olması sübstrata olan ilgisinin azalmış olduğunu göstermektedir.

ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selüloz enzimi için $V_{MAX}=3,78$ U/mg prot., $K_m=0,27$ %, geri dönüşüm katsayısı ($k_{kat}=14,62$ dk⁻¹) olarak bulunmuştur. ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülazın serbest enzime göre K_m değerinin yaklaşık yarısı kadar azalmış olması sübstrata olan ilgisinin artmış olmasını göstermektedir.

Serbest, Sepabeads EC-EP/M ve ReliZyme HA403/M desteklere immobilize selülazların 70 °C'deki yarı ömürleri sırasıyla 8,19, 7,8 ve 17,8 saat olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre serbest selüloz ile Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selülazın termal kararlılıkları arasında önemli bir fark tespit edilememişken ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülazın termal kararlılığının arttığı belirlenmiştir. Literatürde çeşitli enzimlerin çeşitli desteklere immobilize edilmesi sonucunda termal kararlılığın arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Prlainovic ve ark., 2011; Bayraktar ve ark.,2011; İnce ve ark., 2012). İmmobilizasyon amaçlı kullanılan desteklerin enzimleri termoinaktivasyona karşı koruduğu literatürden ve bizim sonuçlarımızdan da anlaşılmaktadır.

Serbest ve immobilize enzimleri 30 gün süreyle 5 ve 25 °C'de depo edip belli sürelerde kalan aktivitelerini incelediğimizde serbest enzimin aktivitesinin önemli bir düşüşe uğramadığı, Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize enzimin ise 5 °C' de depo edilmiş olanın % 74 oranında başlangıç aktivitesini koruduğu ancak oda sıcaklığında depo edilen ve diğer desteğimiz olan ReliZyme HA403/M desteğimize immobilize olmuş enziminde hem 5 °C hem de 25 °C'de başlangıç aktivitesini önemli bir şekilde kaybettiği belirlenmiştir.

İmmobilize selüloz örnekleri tekrar kullanım kararlılıklarının tespit edilmesi amacıyla kesikli reaktör sisteminde incelenmiş 3 kullanım sonunda Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize selüloz başlangıç aktivitesinin % 8'ini, ReliZyme

HA403/M desteğe immobilize selülaz ise yine 3 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin % 10'unu koruyabilmiştir. Bu aktivite kaybının nedeni birkaç faktörden kaynaklanabilir bunlar; enzimin ilk kullanım sonucunda bağlandığı yerden kopması, protein denatürasyonu, son ürün inhibisyonu veya bir enzim sistemi olan selülaz kompleksini oluşturan bir veya daha fazla enzimin kaybı olabilir. Ayrı enzimlerin oluşturduğu selülaz enzim kompleksi aynı zamanda çok sayıda fonksiyonel grup içermektedir ve bu fonksiyonel gruplar enzimin aktif bölgesinde yer alırlar ve her birisi selülozu oluşturan glukoz monomerlerini farklı yerlerden parçalarlar. İmmobilizasyon sırasında enzimin aktif bölgesinde yer alan bu fonksiyonel gruplardan birinin etkinliğini kaybetmesi enzimin stabilitesinin kaybolması ile sonuçlanmış olabilir (Hilterhaus ve ark., 2008; Jordan ve ark., 2011).

Sonuç olarak, ReliZyme HA403/M ve Sepabeads EC-EP/M desteklere optimum koşullarda selülaz enzimi immobilize edildiğinde enzimin desteğe bağlanma kapasitesi açısından ReliZyme HA403/M desteğinin, Sepabeads EC-EP/M desteğe oranla daha yüksek enzim bağlama kapasitesi olduğu tespit edilmiştir. ReliZyme HA403/M desteğe immobilize selülazın Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize olana göre daha yüksek k_{kat}/K_m oranına sahip olduğu dolayısıyla da katalitik etkinliğinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Termal kararlılık açısından incelendiğinde ReliZyme HA403/M desteğe immobilize edilen selülaz enziminin Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize edilene göre daha yüksek yarı ömre sahip olduğu bulunmuştur. Her iki immobilize enzim tekrar kullanım kararlılıkları yönünden incelendiğinde yine ReliZyme HA403/M üzerine immobilize edilen enzimin çok az da olsa tekrar kullanım kararlılığının daha iyi olduğu, depolama kararlılığı yönü ile incelendiğinde ise ReliZyme HA403/M desteğin daha az kullanışlı olduğu belirlenmiştir. Bu yönler toplu bir şekilde ele alındığında ReliZyme HA403/M desteğimizin Sepabeads EC-EP/M desteğe oranla selülaz enziminin immobilizasyonu için daha elverişli olduğu görülmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. *Trichoderma reesei* (*Trichoderma viride*) selülozu için optimum pH, tampon derişimi, sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 4,0, 100 mM, 45 °C, % 0,47 ve 1,05 U/mg prot., olarak belirlenmiştir.
2. *Trichoderma reesei* selülozunun Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilizasyonunda en uygun immobilizasyon pH'sı, tampon derişimi, sıcaklık, immobilizasyon süresi ve selüloz derişimi sırasıyla 6,5, 50 mM, 25 °C, 6 saat ve 1,8 mg/mL olarak belirlenmiştir.
3. *Trichoderma reesei* selülozunun ReliZyme HA403/M desteğe immobilizasyonunda en uygun immobilizasyon pH'sı, tampon derişimi, sıcaklık, immobilizasyon süresi ve selüloz derişimi sırasıyla 6,5, 50 mM, 25 °C, 2 saat ve 1,8 mg/mL olarak belirlenmiştir.
4. Sepabeads EC-EP/M desteğe immobilize edilen *Trichoderma reesei* selülozu için optimum pH, tampon derişimi, sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 4,0, 50 mM, 50 °C, % 1,5 ve 1,1 U/mg prot., olarak belirlenmiştir.
5. ReliZyme HA403/M desteğe immobilize edilen *Trichoderma reesei* selülozu için optimum pH, tampon derişimi, sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 3,5, 25 mM, 60 °C, % 0,27 mM ve 3,78 U/mg prot., olarak belirlenmiştir.
6. Immobilize enzimler kesikli reaktörde 3 tekrar kullanımdan sonra başlangıç aktivitelerinin yaklaşık % 10'unu korumuşlardır.

5.2. Öneriler

1. Farklı destekler ve farklı kaynaklı selüloz enzimleri kullanılarak immobilizasyon çalışmaları yapılabilir.
2. Yanıt yüzey yöntemi serbest ve immobilize enzimlerin optimum çalışma koşullarını belirlemek amacıyla kullanılabilir.

3. İmmobilize selüloz enzimlerinin farklı reaktörlerde tekrar kullanım kararlılığına bakılabilir.

KAYNAKLAR

- ALPTEKİN, Ö., TÜKEL, S.S, YILDIRIM, D., and ALAGÖZ D., 2010. Immobilization of catalase onto Eupergit C and its characterization, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 64:177–183.
- ALPTEKİN, Ö., TÜKEL, S.S., YILDIRIM, D., and ALAGÖZ, D., 2009. Characterization and properties of catalase immobilized onto controlled pore glass and its application in batch and plug-flow type reactors, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 58:124-131.
- ANDERSON, M. J., and WHITCOMB, P.J., 2005. RSM Simplified – optimizing processes using response surface methods for design of experiments, Productivity Inc., New York NY.
- AYGAN, A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus sp.* izolasyonu, amilaz, selüloz ve ksilanaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi, Adana.
- BAYRAKTAR, H., SERILMEZ, M.,KARKAS, T., CELEN, E.B., and ONAL, S.,2011. Immobilization and stabilization of α -galactosidase on Sepabeads EC-EA and EC-HA,International Journal of Biological Macromolecules,49:855-860.
- BAYRAMOĞLU,G., KACAR, Y., DENİZLİ, A., and ARICA,M.Y.,2002. Covalent immobilization of lipase onto hydrophobicgroup incorporated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based hydrophilic membrane matrix, Journal of Food Engineering, 52:367–374
- BETANCOR, L.,GALLEGO, F.L., HİDALGO, A.,MORALES, N.A., MATEO,G.D.O.C.,LAFUENTE, L.F., and GUÍS´AN, J.M., 2006. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions, Enzyme and Microbial Technology, 39 :877–882
- BHAT, M.K., and BHAT, S., 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. Biotechnology Advances, 15: 583-620.

- BICKERSTAFF, G. F., 1995. Impact of genetic technology on enzyme technology, *Genetic Engineering Biotechnologist*, 15:13-30.
- BORATYNSKI, J., and ZAL, T., 1990. Colorimetric micromethods for glutaraldehyde determination by means phenol and sulfuric acid or perchloric acid. *Analytic Biochemistry*, 184:259-262.
- BOX, G. E. P., and WILSON, K.B., (1951) On the Experimental Attainment of Optimum Conditions (with discussion). *Journal of the Royal Statistical Society Series B*, 13(1):1-45
- CABRAL, J. M. S., NOVAIS, J. M., and KENNEDY J. F., 1986. Immobilization studies of whole microbial cells on transition metal activated inorganic supports, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 23:157-162.
- CABRAL, J.M.S. and KENNEDY, J. F., 1991. Covalent and coordination immobilization of proteins. In: *Protein immobilization. Fundamentals and Applications* (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, New York, NY, pp. 73-138.
- CAO, L., 2005. *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design*. Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co. Kгаа, Weinheim.
- CHEN, H., 1994. Responce-surface methodology for optimizing citric acid fermentation by *Aspergillus foetidus*, *Proses Biochem.*, 29: 399-405.
- CHO, S.W., and RHEE, J.S., 1993. Immobilization of lipase for effective interestification of fats and oils in organic solvents, *Biotechnology and Bioengineering*, 41:204-210.
- DE BARI, I., VERARDI, A., and CALABRO, V., 2008. Immobilization of Cellulase Enzymes on Epoxy Sepabeads® for the Hydrolysis of Lignocellulosic Materials, 18th European Biomass Conference and Exhibition.
- DİNÇER, A., and TELEFONCU, A., 2007. Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45 (2007) 10-14
- EL-GHAFFAR, M.A., and HASHEM, M.S., 2010. Chitosan and its amino acids condensation adducts as reactive natural polymer supports for cellulase immobilization, *Carbohydrate Polymers*, 81 (2010) 507-516.

- EMERT, G., GUM, E., and LANG, J., 1974. Cellulases, in food related enzymes, (Whitaker, J., ed.) , Advances in Chemistry Series 136, Amer. Chem. Soc., Washington, DC
- GE, Y., BURMAA, B., and ZHANG, S., 1997. Co-immobilization of cellulase and glucose isomerase by molecular deposition technique, *Biotechnology Techniques*, Vol 11, No 5, May 1997, pp. 359–361.
- GUISAN, M., 2006. *Immobilization of Enzymes and Cells*, Second Edition, Humana Press.
- HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., and SMITH, P.K., 1992. Immobilized affinity ligand techniques, Academic Press, London, pp: 283-284.
- HILTERHAUS, L., MINOW, B., MULLER, J., BERHEIDE, M., QUITMANN, H., KATZER, M., THUM, O., ANTRANIKIAN, G., ZENG, A.P., and LIESE, A., 2008. Practical application of different enzymes immobilized on sepabeads, *Bioprocess Biosyst Eng.*, 31:163–171.
- HUNG, T.C., FU, C.C., and SU, C.H., 2011. Immobilization of cellulase onto electrospun polyacrylonitrile (PAN) nanofibrous membranes and its application to the reducing sugar production from microalgae, *Enzyme and Microbial Technology*, 49 (2011) 30–37.
- INCE, A., BAYRANOĞLU, G., KARAGOZ, B., ALTINTAS, B., BICAK, N., and ARICA M.Y., 2012. A method for fabrication of polyaniline coated polymer microspheres and its application for cellulase immobilization, *Chemical Engineering Journal*, 189-190:404-412
- JOGLEKAR, A.M., and MAY, A.T., 1987. Product excellence through design of experiments, *Cereal Foods World*, 32 (12), 857-860.
- JORDAN, J., KUMAR, C.S.S.R., THEEGALA, C., 2011. Preparation and characterization of cellulase-bound magnetite nanoparticles, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68:139-146.
- KATCHALSKI-KATZIR, E., 1993. Immobilized enzymes: Learning from past successes and failures, *Trends of Biotechnology*, 11:471-478.
- KENNEDY, J.F., and CABRAL, J.M.S., 1985. Immobilization of biocatalysts by metallink/chelation processes, *Immobilized Cells and Enzymes*, 1:19-37.

- KHOSHNEVISAN, K., BORDBAR, A.K., and ZARE D., 2011. Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability ,*Chemical Engineering Journal*, 171 (2011) 669– 673.
- KLIBANOV, A.M., 1983. Immobilized Enzymes and Cells as Practical Catalysts. *Science*, 219:722-727.
- KUBITZKI, T., NOLL, T., and LUTZ, S., 2008. Immobilisation of bovine enterokinase and application of the immobilised enzyme in fusion protein cleavage, *Bioprocess Biosyst Eng.*, 31:173–182
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., and RANDALL, R.J., 1951. Protein Measurement with Folin Phenol Reagent.*Journal of Biological Chemistry*, 193:265-275.
- MATEO,C.,PESELA,B.C.C.,GRAZU,V.,GALLEGO,F.L.,TORRES,R.,FUENTES, M.,HÍDALGO,A.,PALOMO,J.M.,BETANCOR,L.,LORENTE,G.F.,ORTÍZ, C.,ABIÁN, O.,GUÍSAN,J.M., and LAFUENTE,R.F., 2006. Immobilization and Stabilization of Proteins by Multipoint Covalent Attachment on Novel Amino-Epoxy-Sepabeads® Immobilization of Enzymes and Cells:*Methods in Biotechnology*, 22:153-162
- MISHRAA, C., DESHPANDES, V., and RAO, M., 1983. Immobilization of *Penicillium funiculosum* cellulase on a soluble polymer, *Enzyme and Microbial Technology*, 5,5 ,342-344.
- MONTGOMERY, D.C., 1996. *Design and analysis of experiments* 4th ed. John Wiley and Sons Ltd., USA, 575-651.
- MURAI, T., UEDA, M., and ATONI, H., 1997. Genetic immobilization of cellulase on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl.Microbiol. Biotechnol*, (1997) 48: 499-503.
- NIEHAUS, F., BERTOLDO, C., KAHLER, M., and ANTRANIKIAN, G.1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Microbiology Biotechnology*, 51: 711-729.
- O'DRISCOLL, K. F., 1976. Techniques of enzyme entrapment in gels, *Methods in Enzymology*, 44:169-183.

- OKUTUCU, B., CELEM, E.B., and ONAL S., 2010. Immobilization of α -galactosidase on galactose containing polymeric beads, *Enzyme and Microbial Technology*, 46: 200–205
- PRLAINOVIC, N.Z., KNEZEVIC-JUGOVIC, Z.D., MIJIN D.Z., and BEZBRADICA, D.I., 2011. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Sepabeads: the effect of lipase oxidation by periodates. *Bioprocess Biosyst Eng.*, 34:803–810
- SHAH, S., SHARMA, A, and GUPTA, M.N., 2006. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder, *Analytical Biochemistry*, 351:207-213.
- SHELDON, R.A., SCHOEVAART, R., and VAN LANGEN, L.M., 2005. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization a review, *Biocatalysis and Biotransformation*, 23(3/4):141-147.
- SHIMIZU, K., and ISHIHARA, M., 1987. Immobilization of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes on inorganic supports, *Biotechnology and Bioengineering*, 29, 2, 236–241.
- SOLAS, M.T, VICENTE C, XAVIES L, and LEGAZ M.E, 1994. Ionic adsorption of catalase on bioskin: Kinetic and ultrastructural studies, *Journal of Biotechnology*, 33:63-70.
- SPANO, L., MEDEIROS, J., and MANDELS, M., 1975 . Enzymatic hidrolisis of cellulosic waste to glukose, Pollution Abatement Div., Food Svcs. Lab, US Army Natick Labs, Natick, MA.
- SUMNER, J.B., 1921. Dinitrosalicylic acid: A reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *J. Biol. Chem.* 47:5-9.
- TAYLOR, R.H., FOURNIER, S.M., SIMONS, B.L., KAPLAN, H., and HEFFORD, M.A., 2005. Covalent protein immobilization on glass surfaces: Application to alkaline phosphatase, *Journal of Biotechnology*, 118:265-269
- TISCHER, W., and WEDEKIND, F., 1998. Immobilized enzymes: Methods and applications, *Topics in Current Chemistry*, 20:96-126.

- TÜKEL, S.S., and ALPTEKİN, Ö., 2004. Immobilization and kinetics of catalase onto magnesium silicate, *Process Biochemistry*, 39(12): 2149-2155.
- TURAN, M.D., ve ALTUNDOĞAN, H.S., 2011. Hidrometalurjik araştırmalarda yanıt yüzey yöntemlerinin kullanımı, *Madencilik*, 50;3:11-23.
- TÜRK, B., 2008. İmmobilize lipaz enzimi kullanılarak etil bütirat üretimi, A.Ü. Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- WANG, G., MICHAİLİDES, T.J., and BOSTOCK, R.M., 1997. Improved Detection of Polygalacturonase Activity Due to *Mucor piriformis* with a Modified Dinitrosalicylic Acid Reagent. *Techniques*, 87:161-163.
- WHITAKER, D., 1971. Cellulases, in the enzymes. V, (Boyer, p., ed.), Academic Press, NY,273.
- WOODWARD, J., 1985. Immobilized enzymes: adsorption and covalent coupling, *Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach*, IRL, Oxford, UK, pp: 3-17.
- YİGİTOĞLU, M., TEMOCIN, Z.,2010. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glutaraldehyde-activated polyester fiber and its application for hydrolysis of some vegetable oils, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66:130–135
- YU, P. 1996. Analysis of a municipal recyclable material recycling program. *Resour. Conserv.Recy.*, 17: 47-56.
- YUAN, X.Y., SHEN, N.X., and SHENG, J., 1999. Immobilization of cellulase using acrylamide grafted acrylonitrile copolymer membranes, *Journal of Membrane Science*, 155 (1999) 101-106.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Mersin ilinin Mut ilçesinde dünyaya geldi. İlk ve orta öğrenimimi burada tamamladı. 2001 yılında Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldu. Askerlik vazifesini tamamladıktan sonra 2004 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı. 2007 yılında bu eğitimini tamamlayarak aynı bölümde doktora eğitimine başladı.