

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

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA BİLİM DALI**

**SELÜLAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU, KARAKTERİZASYONU VE
UYGULAMALARI**

Duygu BAKIR

**Danışman
Prof. Dr. Tülin AYDEMİR**



MANİSA-2019

DuyguBAKIR

**SELÜLAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU, KARAKTERİZASYONU VE
UYGULAMALARI**

2019

TEZ ONAYI

Duygu BAKIR tarafından hazırlanan "**SELÜLAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU, KARAKTERİZASYONU VE UYGULAMALARI**" adlı tez çalışması **25/07/2019** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Biyokimya Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman	Prof. Dr. Tülin AYDEMİR Celal Bayar Üniversitesi
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Leman TARHAN Dokuz Eylül Üniversitesi
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Ayşe DİNÇER Celal Bayar Üniversitesi
Yedek Jüri Üyesi	Prof. Dr. Nurdan PAZARLIOĞLU Celal Bayar Üniversitesi
Yedek Jüri Üyesi	Prof. Dr. Raziye ÖZTÜRK ÜREK Dokuz Eylül Üniversitesi

TAAHHÜTNAME

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

Duygu BAKIR



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	II
ŞEKİLLER DİZİNİ	III
TABLO DİZİNİ.....	IV
TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Enzim İmmobilizasyon Tekniği Hakkında Genel Bilgiler	2
2.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	4
2.2.1. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri.....	4
2.2.1.1. Kovalent Bağlama Metodu	4
2.2.1.2. İyonik Bağlama Metodu	5
2.2.1.3. Fiziksel Adsorpsiyon Metodu	6
2.2.1.4. Biyospesifik Bağlama Metodu	7
2.2.2. Çapraz Bağlama Metodu	7
2.2.3. Tutuklama Metodu	7
2.3. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması	9
2.4. Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Taşıyıcılar.....	10
2.4.1. Kitin ve Kitosan.....	12
2.4.2. Kitin ve Kitosanın Kullanım Alanları	14
2.5. Manyetik partiküller	14
2.6. Selüloz Enzimi	16
2.6.1. Selüloz Enzimlerinin Sınıflandırılması.....	17
2.6.2. Selüloz Enziminin Karakterizasyonu ve Özellikleri.....	18
2.6.3. Selüloz Enzimlerinin Substratları ve İnhibitörleri.....	18
2.6.4. Selüloz Enzimlerinin pH ve Sıcaklık Stabiliteleri.....	21
2.6.5. Selülozların Uygulama Alanları	22
2.6.5.1. Gıda endüstrisi.....	22
2.6.5.2. Tekstil endüstrisi.....	23
2.6.5.3. Çamaşır ve deterjan endüstrisi.....	23
2.6.5.4. Hayvan yemi endüstrisi.....	24
2.6.5.5. Kağıt endüstrisi.....	24
2.6.5.6. Bira ve şarap endüstrisi	25
2.6.5.7. Biyoyakıt endüstrisi	25
2.7. Karakterizasyon Yöntemleri	25
2.7.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)	25
2.7.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM).....	26
2.7.3. X-Işını Toz Kırınım Ölçümleri(XRD).....	26
2.7.4. Termogravimetrik analiz (TGA)	27
2.7.5. Manyetik Duyarlılık Ölçümleri(VSM)	27
2.8. Genipin	27
2.9. Lignoselülozik Biyokütle	28
2.9.1. Hemiselüloz	29
2.9.2. Lignin.....	30
2.9.3. Selüloz	30

2.10. Enzimatik Hidroliz	31
2.11. Tezin Amacı.....	33
3. DENEYSEL KISIM (veya MATERYAL VE YÖNTEMLER).....	34
3.1. Materyal	34
3.1.1. Kimyasallar	34
3.1.2. Selülozik Biyokütle	34
3.1.3. Kullanılan Aletler.....	34
3.2. Yöntemler.....	35
3.2.1. Manyetit(Fe_3O_4) Hazırlanması	35
3.2.2. Kitosan Boncukların Oluşturulması(CS).....	35
3.2.3. Kitosan-Manyetit Boncukların Oluşturulması(CS- Fe_3O_4).....	36
3.2.4. Kompozit Boncukların Karakterizasyonu	36
3.2.4.1. Boncuk boyutu	37
3.2.4.2. Şişme karakterizasyonu	37
3.2.4.3. Mekanik özelliklerin belirlenmesi.....	38
3.2.5. Kompozit Boncukların Glutaraldehit ile Aktivasyonu	38
3.2.6. Kompozit Boncukların Genipin ile Aktivasyonu	39
3.2.7. Kompozit Boncuklara Selülazın İmmobilizasyonu	39
3.2.8. Taşıyıcı Üzerine Bağlanan Protein Miktarının Belirlenmesi	40
3.2.9. Glikoz Standart Eğrisinin Oluşturulması ve Selülazın Aktivitesinin Belirlenmesi.....	41
3.2.10. İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu	43
3.2.10.1. Optimum Sıcaklık ve Termal Stabilite	43
3.2.10.2. Optimum pH.....	45
3.2.10.3. Enzim Kinetiği	45
3.2.10.4. Depolama Kararlılığı	46
3.2.10.5. Serbest ve İmmobilize Selülaz Üzerine Bazı Aktivatör ve İnhibitörlerin Etkisi.....	46
3.2.10.6. Tekrar Kullanılabilirlik	46
3.2.11. Kompozit Boncuklar Üzerine İmmobilize Edilen Selülaz ile Lignoselülozik Atıkların Sakkarifikasyonu	46
3.2.11.1. Selülozik Atıkların Ön İşlemden Geçirilmesi, Lignin, Hemiselüloz ve Selüloz Miktarlarının Belirlenmesi.....	47
3.2.11.2. Selülozik Atıkların Sakkarifikasyonunu Etkileyen Faktörler	47
3.2.11.2.1. Sakkarifikasyon Üzerine NaOH Konsantrasyonunun Etkisi	47
3.2.11.2.2. Sakkarifikasyon Üzerine pH Etkisi	48
3.2.11.2.3. Sakkarifikasyon Üzerine Sıcaklık Etkisi	48
3.2.11.2.4. Sakkarifikasyon Üzerine Reaksiyon Süresinin Etkisi	48
3.2.11.2.5. Sakkarifikasyonda Kullanılan İmmobilize Selülazın Tekrar Kullanılabilirliği	48
3.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler.....	48
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	50
4.1. Kompozit Boncukların Karakterizasyonu	50
4.2. Kompozit Taşıyıcılar Üzerine Bağlanan Protein Miktarı ve İmmobilizasyon Verimi	67
4.3. Serbest ve İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu	72
4.3.1. Sıcaklık ve pH'ın Etkisinin Belirlenmesi	72

4.3.2.Enzim Kinetiği	79
4.3.3.Depolama Kararlılığı.....	81
4.3.4.İmmobilize Selülazın Tekrar Kullanılabilirliği	83
4.3.4.Serbest ve İmmobilize Selülaz Üzerine Aktivatör ve İnhibitörlerin Etkisi	84
4.4. İmmobilize Selülaz ile Lignoselülozik Atıkların Sakkarifikasyonu	86
4.4.1. Sakkarifikasyon Üzerine NaOH Konsantrasyonunun Etkisi	89
4.4.2. Sakkarifikasyon Üzerine pH Etkisi	90
4.4.3. Sakkarifikasyon Üzerine Sıcaklık Etkisi	90
4.4.4.Sakkarifikasyon Üzerine Reaksiyon Süresinin Etkisi	91
4.4.5.Lignoselülozik Atıkların ve Lignoselülozik Atıkların Sakkarifikasyonu Sonrası Meydana Gelen Ürünlerin Karakterizasyonu	93
4.4.6.Sakkarifikasyonda Kullanılan İmmobilize Selülazın Tekrar Kullanılabilirliği	99
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	100
KAYNAKLAR.....	102
ÖZGEÇMİŞ.....	112

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	:Sığır serum albümin
CMCNa	:Karboksimetilselüloz Sodyum Tuzu
DNS	:Dinitrosalisilik asit
DP	:Polimerleşme derecesi
Ea	:Aktivasyon enerjisi ($J mol^{-1}$)
EDTA	:Etilen diamino tetra asetik asit
GA	:Glutaraldehit
GP	:Genipin
IR	:İnfrared
KBr	:Potasyum bromür
K_M	:Michaelis-Menten hız sabiti (mg/ml)
M	:Molar
mg	:Miligram
Mm	:Milimolar
mL	:Mililitre
rpm	:Dakikadaki dönüş sayısı (Revolutions per minute)
T	:Sıcaklık
t	:Zaman(saat)
TPP	:Sodyum trifosfat pentabazik
V_{max}	:Maksimum hız
v/v	:Hacim/hacim
w/v	:Kütle/ hacim
μL	:Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Kitinin kimyasal yapısı.....	12
Şekil 2.2. Selülozun kimyasal yapısı	12
Şekil 2.3. Kitosanın kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.4. Kitinin NaOH ile deasetilasyonu ve kitosan oluşumu	14
Şekil 2.5. Selülaz enziminin çalışma mekanizması	15
Şekil 2.6. Enzimatik hidroliz	18
Şekil 2.7. Genipinin yapısı	29
Şekil 2.8. Lignoselülozik biyokütlenin yapısı ve bileşimi	30
Şekil 2.9. Selülozun yapısı	32
Şekil 3.1. Fe ₃ O ₄ partiküllerinin sentezi.....	36
Şekil 3.2. CS-Fe ₃ O ₄ Boncuklarının Oluşturulmasının Şematik Gösterimi	37
Şekil 3.3. Kitosan boncukların şişme karakterizasyonu	39
Şekil 3.4. Enzimin polimer üzerine tutuklanması.....	40
Şekil 3.5. Bradford yöntemi ile aktivite tayini çalışması	41
Şekil 3.6. Protein Standart Grafiği.....	41
Şekil 3.7. DNS yöntemi ile aktivite tayini çalışması	42
Şekil 3.8. Glikoz standart grafiği.....	43
Şekil 4.1. Kitosan kompozit boncuklara ait mikroskopik fotoğraflar.....	50
Şekil 4.2. Kitosanın, genipin ile olası çapraz bağlanma ve selülaz immobilizasyon reaksiyonunun şeması	50
Şekil 4.3. Kitosanın, monomerik ve polimerik glutaraldehit formları ile olası çapraz bağlanma ve selülazın immobilizasyon reaksiyonunun şeması	52
Şekil 4.4. Kitosan ve kompozit boncukların SEM görüntüleri	53
Şekil 4.5. Kitosan Kompozit Boncukların IR Spektrumlarının karşılaştırılması	55
Şekil 4.6. Kitosan ve kitosan kompozit boncukların XRD spektrumları.....	58
Şekil 4.7. Glutaraldehit ve genipin çapraz bağlı boncukların kompozit boncukların TGA eğrileri	60
Şekil 4.8. Fe ₃ O ₄ ve CS- Fe ₃ O ₄ boncuklarına ait VSM histerisis eğrileri.....	62
Şekil 4.9. CS-Fe ₃ O ₄ boncuklarının dış manyetik alana maruz kalmadan önceki ve sonraki durumu	63
Şekil 4.10. Kitosan ve Kompozit boncukların pH 7.0 ve pH 5.0'de şişme grafiği	65
Şekil 4.11. Kompozit boncukların GP (% w/v) ve GA (% v/v) konsantrasyonuna bağlı olarak pH 5.0'de sergiledikleri şişme grafiği	66
Şekil 4.12. Selülaz immobilizasyonunda genipin ve glutaraldehit ile aktive edilen boncuklar üzerindeki immobilizasyon süresinin etkisi	68
Şekil 4.13. 50 °C'de serbest (■) ve genipin (▲) ve glutaraldehit (●) kullanılarak aktive edilen kitosan ve kitosan kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen selülazın aktivitesine pH ve sıcaklığın etkisi	72
Şekil 4.14. Serbest ve kompozit boncuklar (genipin ve glutaraldehit) üzerine immobilize edilen selülaz enzimine ait Arrhenius grafiği	76
Şekil 4.15. Serbest ve kitosan kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen selülazın 40(a), 50(b), 60(c) ve 70(d) °C de zamana karşı aktivite grafiği	77
Şekil 4.16. Serbest selülaz enzimi, GA-CS-Fe ₃ O ₄ ve GP-CS-Fe ₃ O ₄ üzerine immobilize edilen selülazın Lineweaver- Burk grafiği	79

Şekil 4.17. 4°C’de serbest, GA-CS-Fe ₃ O ₄ ve GP-CS-Fe ₃ O ₄ üzerine immobilize edilen selüla ₂ ın depolama kararlılığı	81
Şekil 4.18. Kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen selüla ₂ ın CMC-Na substratına karşı tekrar kullanılabilirliği	82
Şekil 4.19. Serbest ve immobilize selüla ₂ üzerine farklı konsantrasyonlardaki aktivatör ve inhibitörlerin etkisi	84
Şekil 4.20. İşlem akışı	86
Şekil 4.21. NaOH konsantrasyonunun sakkarifikasyon üzerindeki etkisi	88
Şekil 4.22. pH değerinin sakkarifikasyon üzerindeki etkisi	89
Şekil 4.23. Sıcaklık değerinin sakkarifikasyon üzerindeki etkisi	90
Şekil 4.24. Kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen selüla ₂ ile zamana karşı sakkarifikasyon grafiği	91
Şekil 4.25. Lignoselülozik biyokütlelerin SEM görüntüleri.	94
Şekil 4.26. Hidrolizde kullanılan enginar yaprakları(a), çam ağacı kabuğu(b) ve mısır yapraklarına(c) ait IR Spektrumlarının karşılaştırılması	97
Şekil 4.27. Sakkarifikasyon reaksiyonunda GA-CS-Fe ₃ O ₄ ve GP-CS-Fe ₃ O ₄ boncukların tekrar kullanılabilirliği	99

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması	9
Tablo 2.2. Selüloz üretiminde kullanılan bakteri ve mantar türleri	16
Tablo 4.1. Kitosan kompozit boncukları için mekanik kararlılık tablosu.....	66
Tablo 4.2. Selüloz enziminin kitosan kompozit boncuklar üzerine immobilizasyonunda optimizasyon çalışmaları	69
Tablo 4.3. Taşıyıcı üzerine immobilize edilen selülozün protein miktarı ve yükleme etkinliği	70
Tablo 4.4. Serbest ve kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edile selülozün termal inaktivasyon parametreleri	78
Tablo 4.5. Serbest selüloz ve kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen selülozün kinetik parametreleri	79
Tablo 4.6. Lignoselülozik atıkların ön işlem sonrası lignin, selüloz+hemiselüloz miktarlar	87

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın seçilmesinde, yürütülmesinde ve her türlü araştırma laboratuvar imknlarının sağlanmasında ve sonuca ulaőtırılmasında değerli katkılarını esirgemeyen ve tecrübeleri ile bana yol gösteren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Tülin AYDEMİR'e sonsuz teőkrlerimi sunarım.

Deneysel çalıőmalarım süresince her konudaki fikir, destek ve yardımlarını gördüğüm Arő. Grv. Ahmet ESER ve Seda ÇINAR'a teőkr ederim.

Mesleki açıdan geliőmemi sağlayan, bilgilerini esirgemeyen tüm hocalarıma ve de eğitimim boyunca bana destek olan arkadaőlarıma en içten teőkrlerimi sunarım.

Her türlü maddi ve manevi özveride bulunarak bugünlere gelmemde büyük katkıları olan, beni her konuda daima destekleyen ve motive eden baőtta annem Zerrin BAKIR'a, babam Murat BAKIR'a ve kardeőim Ahmet BAKIR'a minnet ve Őükranlarımı sunarım.

Duygu BAKIR

Manisa, 2019

ÖZET

Yüksek Lisans

SELÜLAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU, KARAKTERİZASYONU VE UYGULAMALARI

Duygu BAKIR

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tülin AYDEMİR

Lignoselülozik biyokütle, monomerik şekerlerin selülotik enzimle hidrolizi ile üretiminde, potansiyel yenilenebilir kaynaklardır. Endoglukanaz, ekzoglukanaz ve β -glükozidaz enzim karışımlarından oluşan selüloz enzimi, bu enzimlerin sinerjik etkileriyle selülozu glikoza parçalar. Bu enzimler başta mantarlar olmak üzere çok çeşitli mikroorganizmalar ile üretilebilmektedir. Bu çalışmada *Trichoderma reesei* ATCC 26921'den saflaştırılan ticari selüloz, iki farklı çapraz bağlama maddesi: glutaraldehit ve genipin kullanılarak sentezlenen kitosan ve manyetik kitosan boncukları üzerine immobilize edildi. Immobilize selülazın fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal özellikleri ve bunun lignoselülozik biyokütle sakkarifikasyonunda kullanımı kapsamlı bir şekilde araştırıldı. Sentezlenen kompozit boncukların yapısı ve morfolojisi SEM, TGA, FTIR ve VSM analizleriyle karakterize edildi. Serbest ve immobilize selülazın optimum sıcaklık ve pH değeri sırasıyla 50°C ve pH 5.0 olarak bulundu. Genipin ve glutaraldehit ile aktive edilmiş kompozit boncuklar üzerine immobilize edilmiş selülazın pH ve sıcaklıktaki değişikliklere karşı daha yüksek tolerans gösterdiği gözlemlendi. Aynı zamanda kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen selülaz, serbest selülaza göre daha iyi depolama stabilitesi gösterdi. Optimizasyon çalışmalarında en yüksek aktivitenin gözlemlendiği optimum konsantrasyon genipin ve glutaraldehit için sırasıyla % 0.6 (w/v) ve % 4 (v/v) olarak belirlendi. Yüzde geri kazanılan enzim aktivitesi, genipin ve glutaraldehit ile aktive edilmiş manyetik kitosan boncuklar için sırasıyla % 82 ve % 76 olarak bulundu. Immobilize enzimlerin katalitik performansının tahlil edilmesi için yapılan sakkarifikasyon çalışmasında genipin ve glutaraldehit ile aktive edilen boncukların 5 kullanımdan sonra aktivitesi sırasıyla % 78 ve %74 olarak belirlendi ve taşıyıcı morfolojisi değişmediği gözlemlendi. Sakkarifikasyon işlemi sonrası yapılan hesaplamalar neticesinde mısır yapraklarının, enginar yapraklarının ve çam ağacı kabuklarının sakkarifikasyon oranının sırasıyla % 92, % 79, % 68 olduğu belirlendi. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar enzim immobilizasyonunda çapraz bağlayıcı olarak çok sık kullanılan glutaraldehit yerine alternatif bir çapraz bağlama eko-dostu olarak genipinin kullanılabilirliğini desteklemekte ve her iki immobilize enzimin sakkarifikasyon işleminde kullanılabilirliğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Selülaz, Genipin, Glutaraldehit, Çapraz bağlama, Immobilizasyon, Kitosan, Manyetik

2019, 127 sayfa

ABSTRACT

M.Sc.

IMMOBILIZATION, CHARACTERISTICS AND APPLICATIONS OF CELLULASE ENZYME

Duygu BAKIR

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

Supervisor: Prof. Dr. Tülin AYDEMİR

Lignocellulosic biomass is a potential renewable resource in the production of monomeric sugars by hydrolysis of cellulosic enzymes. Cellulase enzyme consisting of endoglucanase, exoglucanase and β -glycosidase enzymes, cellulosic glycoside fragments with synergistic effects of these enzymes. These enzymes can be produced with a wide variety of microorganisms, especially fungi. In this study, cellulase from *Trichoderma reesei* ATCC 26921 was immobilized on chitosan and magnetic chitosan beads using two different crosslinking agents: glutaraldehyde and genipin. The physical, chemical and biochemical properties of immobilized cellulase and its use in lignocellulosic biomass saccharification have been extensively researched. The structure and morphology of the synthesized composite beads were characterized by SEM, TGA, FTIR and VSM analyzes. Optimum temperature and pH values of free and immobilized cellulase were 50 °C and 5.0, respectively. It was observed that the immobilized cellulase on genipin and glutaraldehyde activated composite beads showed higher tolerance to changes in pH and temperature. Also, the cellulase immobilized on composite beads showed better storage stability than free cellulase. Optimum concentration was found to be 0.6% (w / v) and 4% (v / v) for genipin and glutaraldehyde, respectively. The percent recovered enzyme activity was found to be 82% and 76% for the magnetic chitosan beads activated with genipin and glutaraldehyde, respectively. In the saccharification study to analyze the catalytic performance of immobilized enzymes, the activity of genipin and glutaraldehyde-activated beads after 5 uses was 78% and 74%, respectively, and carrier morphology was not changed. As a result of the calculations made after saccharification, the saccharification rate of corn leaves, artichoke leaves and pine bark was 92%, 79%, 68% respectively. The results obtained in this study support the use of genipin as an alternative eco-friendly alternative to glutaraldehyde, which is commonly used as crosslinker in enzyme immobilization, and demonstrate the utility of both immobilized enzymes in the saccharification process.

Keywords: Cellulase, Genipin, Glutaraldehyde, Cross-linking, Immobilisation, Chitosan, Magnetic

2019, 127 pages

1. GİRİŞ

Selülozlar dünyada bol miktarda bulunan bitkilerin major polimerik komponenti olarak tanımlanırlar ve çözünür olmayan yapıdaki selülozun degradasyonu farklı selülitik bakteri ve fungus ve aktinomisetler tarafından üretilen selülazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Selülazlar, selülozun yapısındaki β -1,4 glikozidik bağları hidrolize etmekle görevlidir. Bu enzimler glikozil hidrolaz ailesinin üyesidir ve oligosakkaritler ve polisakkaritleri hidrolizler.

Selülazlar endoglukanazlar, ekzoglukanazlar ve β -glikozidazlar olarak sınıflandırılırlar. Selülazlar biyoteknolojik uygulamalarda ve endüstride geniş bir uygulama alanına sahiptirler. Sahip olduğu önemli uygulamalardan bazıları gıda, yem, bira, şarap, tekstil, deterjan, kâğıt ve tarım endüstrisidir. Bu enzimin ticari önemi olmasına rağmen üretim maliyetinin yüksek olması selülozun dönüşümü için endüstride kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle daha stabil ve aktif enzimler için yeni ve farklı mikrobiyal selülaz kaynaklar üzerine yapılan araştırmalar artmıştır.

Bu çalışmada kitosan ve mayetik kitosan kompozit boncuklar sentezlenmiştir. Kolay bulunabilmeleri ve ekonomik olmaları nedeniyle immobilizasyon işlemlerinde taşıyıcı olarak kitosan kullanılmıştır. Sentezlenen kitosan ve kompozit boncuklar genipin ve glutaraldehit kullanılarak aktive edildikten sonra *T. Reseei*'den elde edilmiş selülaz enziminin, sentezlenen kompozit kitosan boncuklar üzerine immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kitosan ve kitosan kompozit boncukların karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Serbest ve kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen selülaz enziminin optimum pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu, termal ve depolama stabilitesi belirlenerek karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca enzimin aktivitesi üzerine bazı iyon ve sürfaktanların etkisi incelenmiştir. Genipin ve glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan kompozit boncukların üzerine immobilize edilen selülaz enzimi aynı zamanda lignoselülozik atıkların hidrolizinde kullanılarak açığa çıkan indirgen şeker miktarı belirlenerek hidroliz yüzdesi hesaplanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Enzim İmmobilizasyon Tekniği Hakkında Genel Bilgiler

İmmobilizasyon terimi, bir analitik sistem ya da reaktör içinde biyolojik olarak aktif olan katalizötün tutuklanması anlamına gelir. Enzim, enzim karışımı ya da canlı bir hücre olan biyokatalizörler, taşıyıcı materyal üzerinde ya da içinde tutuklanmaktadır. İmmobilize kompleks katı desteğin fiziksel karakteristiklerini gösterirken bunun yanı sıra serbest katalizörün temel biyokimyasal aktivesinde sahip olmaktadır. İmmobilizasyon, özel bir modül üzerinde çözünür olmayan bir kompleks oluşturarak akışkanın kolayca geçişini sağlar ve heterojen kataliz prensiplerinin biyolojik sistemlere uygulanması olarak tanımlanmaktadır. İmmobilizasyon teknolojisi kimya, biyokimya ve hücre biyolojisi disiplinleri ile biyokimyasal ve proses mühendisliklerini bir araya getirmektedir[1].

İmmobilize enzim “enzimin kinetik aktivitesini kaybetmeden belli bir bölgeye fiziksel olarak yerleştirilmesi veya hapsedilmesi” olarak tanımlanır[2]. İmmobilizasyon terimi yalnızca enzimler için değil hücrenel organeller, mikrobiyal hücreler, bitki ve hayvan hücreleri gibi tüm biyokatalizör tiplerine de uygun bir terim olarak kullanılmaktadır.

Nelson ve Griffin (1916) bir raslantı sonucu, aktif karbon üzerine adsorbe edilmiş maya interfazının sükrozun hidrolizini katalizleme yeteneğine sahip olduğunu bulduklarını bildirmişlerdir. Bu immobilize enzim kavramının ilk gösterimi olmuştur. Bu gelişmeleri çeşitli desteklere kovalent olarak bağlanmış aktif proteinlerin immobilizasyonu ile ilgili çalışmalar izlemiştir. Bu konudaki uygulamaların artışı beraberinde iyonik bağlama, fiziksel adsorpsiyon ve tutuklama gibi çeşitli immobilizasyon tekniklerin geliştirilmesini sağlamıştır[3].

İmmobilize enzimlerin ilk endüstriyel uygulaması 1969 yılında Japonya’da Tanabe Seiyoku şirketi çalışanları ve Chibata tarafından yapılmıştır ve yapılan çalışmada fungal amino açilaz, DEAE-Sephadex içine iyonik bağlanma ile immobilize edilmiştir.

Biyokatalizörler genellikle katalitik reaksiyonlar için uygun olmasın karşın yüksek sıcaklık, düşük ve yüksek pH ve bir takım organik çözümlerin varlığı gibi çeşitli etkenlerle kolaylıkla inaktive olabilirler. Biyokatalizörler serbest halde kullanıldıklarında atık reaksiyon karışımından enzimin geri kazanımı büyük bir problem teşkil eder. İmmobilizasyon yöntemi bu problemlerin üstesinden gelinmesini sağlayacak bir teknik olması sebebiyle çalışmalar için büyük bir avantaj sağlamaktadır[4]. Genel olarak immobilize katalizörler kararlı bir yapıya sahip olmasının yanı sıra kesikli reaksiyonlarda tekrarlı olarak ya da akışkan sistemlerde sürekli olarak kullanılabilirlerdir.

Biyoprosesse kullanılacak olan biyokatalizörler değerlendirildiğinde enzimlerin ve hücrelerin immobilizasyonunun diğer biyoproseselerde kullanılan biyokatalizörlere kıyasla daha pratik olduğu söylenebilir. İmmobilize biyokatalizörlerin biyoproseselerde kullanımları aşağıdaki gibidir:

- i. Bölge spesifik ve/veya stereospesifik reaksiyonlar ile yararlı bileşiklerin üretilmesi,
- ii. Biyolojik işlemler için enerji üretilmesi,
- iii. Çevresel problemlerin çözümünde kirli maddelerin seçilimli olarak arıtılması,
- iv. Çeşitli bileşiklerin yüksek duyarlılıkta ve spesifiklikte analiz edilmesi,
- v. Yeni ilaçların veya yapay organların üretilmesi[5]

Gerçekleştirilecek olan tüm bu işlemler yalnızca bir enzimin etkinliği ile değil daha kompleks reaksiyonların meydana geldiği multi enzim komplekslerinin de immobilizasyonunu gerektirmektedir.

İmmobilize biyokatalizörlerin uygulaması için, biyokatalizörün istenilen aktiviteye, karakteristiğe sahip olduğunu bilmek ve bunun yanı sıra, uygun taşıyıcının ve immobilizasyon tekniğinin seçimi de büyük bir önem arz etmektedir.

İdeal bir taşıyıcı biyokatalizör immobilizasyonu için yeterli fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır. Taşıyıcının, fiziksel, kimyasal, biyolojik kararlılığa, mekanik güce ve düşük toksisiteye sahip olması beklenir. Ayrıca çeşitli tipteki reaktörlere immobilize biyokatalizörlerin uygulanabilmesi için taşıyıcıya farklı şekiller verilebilmesi gerekir. Bununla beraber ekonomik açıdan uygunluğuna da dikkat edilmelidir.

İmmobilizasyon metodları 4 başlık altında incelenebilir: Taşıyıcıya bağlama, çapraz bağlama, tutuklama ve bu üç metodun kombinasyonudur. Bu metodların her birinin avantajlı ve dezavantajlı yanlarının olmasından dolayı, yapılan seçim biyokatalizör ,reaksiyon, reaktör gibi faktörlere bağlıdır.

2.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

2.2.1. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri

Taşıyıcıya bağlama metodu, biyokatalizörün suda çözünmeyen taşıyıcıya kovalent ve iyonik bağlar, fiziksel adsorpsiyon ya da biyospesifik etkileşimler ile bağlanması esasına dayanır. Suda çözünmeyen polisakkaritler(örn; selüloz, dekstran ve agaroz türevleri), proteinler(örn; jelatin ve albumin), sentetik polimerler (örn; polistren türevleri, iyon değişim reçineleri ve poliüretan) ve inorganik materyaller (örn; tuğla, kum, cam, seramik ve magnetit) gibi çeşitli çözünmeyen materyaller doğrudan veya özel modifikasyon veya aktivasyon sonrası kullanılabilir.[6]

2.2.1.1. Kovalent Bağlama Metodu

Kovalent bağlama metodu enzim immobilizasyonu için en sık kullanılan tekniklerden biri olup kovalent bağlayıcı ajanların toksisitesi ve doğru immobilizasyon koşullarının bulunmasının zorluğundan dolayı hücreler için kullanımı daha sınırlıdır.

Enzimler için, aktif bölge veya substrat bağlama bölgesinde bulunmayan aminoasit birimleri taşıyıcıya kovalent bağlamada kullanılabilir. Lizinin ϵ -amino grubu, aspartik asitin β -karboksil grubu, glutamik asidin γ -karboksil grubu, serin ve treoninin hidroksil grupları, sisteinin merkaptto grubu, tirozinin fenolik hidroksil grubu ve histidinin imidazol grubu; diamonyum tuzu, asit azit, izosiyanat, aktifleştirilmiş alkik halojenür veya aldehit gibi reaktif fonksiyonel gruplara sahip taşıyıcılar ile reaksiyona girebilmektedirler.

İmmobilizasyonda kullanılacak olan taşıyıcı reaktif gruplara sahip değilse, yardımcı bir reaktif ile aktive edilmesi gerekir. İmmobilizasyon optimal ve hafif koşullar (oda koşulları, nötral pH) altında gerçekleştirilmelidir. Kullanılacak taşıyıcı su içerisinde çözünmemeli, aynı zamanda da fazla hidrofobik yapıda olmamalı ve

mekanik kararlılığa sahip olmalıdır. Bu nedenle taşıyıcı seçiminde, enzim-taşıyıcı bağlanmasının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ile birlikte taşıyıcının enzimler tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesini engellemesi, pH ve çözünenlere karşı dayanıklı olması gibi; özelliklere sahip olması dikkate alınarak seçim yapılmalıdır[7].

Kovalent bağlama metodu birçok avantaja sahiptir. Bunlar;

- i. Biyokatalizör taşıyıcıdan ayrılmaz veya sızmaz,
- ii. Biyokatalizör taşıyıcı yüzeyinde tutunduğu için substrat ile kolaylıkla temasa geçebilir,
- iii. Biyokatalizör ve taşıyıcı arasındaki güçlü etkileşimden dolayı biyokatalizör kararlılığı genellikle artar.

Bu avantajların yanı sıra birtakim dezavantajlara da sahiptir. Bunlar;

- i. Biyokatalizörün toksik ajanlara ve sert reaksiyon koşullarına maruz kalmasından dolayı ürün veriminde düşüş yaşanması,
- ii. İmmobilizasyon için optimum koşulların tespit edilmesinde yaşanan zorluklar,
- iii. Taşıyıcının yenilenmesi ve biyokatalizörün taşıyıcıdan geri kazanılmasının imkansız olması şeklinde belirtilebilir.

Belirtilen bu özelliklerden dolayı, metot taşıyıcıya kovalent olarak bağlanarak kararlılığını anlamlı şekilde arttıran pahalı enzimler için çok uygun olmaktadır.

2.2.1.2. İyonik Bağlama Metodu

Katalazın iyon değiştirici selüloza bağlanma yeteneğinin keşfedilmesinden sonra iyonik bağlama metodu birçok biyokatalizörün immobilizasyonunda kullanılmıştır[8]. İyonik bağlama prosedürün basit olmakla beraber, taşıyıcının yenilenmesi ve biyokatalizörün taşıyıcıdan geri kazanımı çok kolaydır. İyonik bağlama prosedürü için aynı zamanda ortam koşulları yumuşaktır. İmmobilize enzimlerin ilk endüstriyel uygulaması L-aminoasit üretimi için DEAE-selüloz üzerine aminoasitlerin immobilizasyonu ile gerçekleştirilmiştir. İyonik bağlamada biyokatalizörün taşıyıcıya bağlanmasını kullanılan tampon, pH, iyonik şiddet ve sıcaklık gibi faktörler etkilemektedir. Biyokatalizörün taşıyıcıdan kolaylıkla

ayrılabilmesi nedeniyle fazla çeşitlilikteki iyon değişim reçineleri ve iyon değişim gruplarına sahip polisakkaritler için kullanışlıdır.

2.2.1.3. Fiziksel Adsorpsiyon Metodu

Fiziksel adsorpsiyon metodu enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntem olarak bilinmektedir[9]. Proteinler ve özellikle enzimlerin katı yüzeylere adsorpsiyonu geniş çaplı olarak araştırılmıştır. Adsorpsiyonda asıl amaç enzim immobilizasyonundan ziyade enzimin saflaştırılmasıdır fakat suda çözünmeyen taşıyıcılarda adsorpsiyon yönteminin enzim immobilizasyonunda oldukça sık kullanıldığı söylenebilir[10].

Bu method taşıyıcı ve biyokatalizör arasındaki hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler, Van der Waals etkileşimleri gibi ilişkilerin tek başına ya da bir arada neden oldukları birtakım fiziksel etkileşimlere dayanmaktadır. Biyokatalizör modifikasyon gerekmeden immobilize olabilmektedir. Fakat bu fiziksel etkileşimler iyonik bağlardan daha zayıf ve sıcaklık, çözünen madde derişimi gibi bazı çevresel faktörlere karşı daha duyarlı olduğu bilinmektedir.

Başarılı bir adsorpsiyon sağlayabilmek için genellikle taşıyıcının bir ön işlemden geçirilmesi gereklidir. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan taşıyıcılar; gözenekli cam, aktif karbon, diatome toprağı, kalsiyum karbonat, kül, kolodyum, silikajel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, kalsiyum fosfat ve gluten'dir.

Taşıyıcının yenilenmesi uygun şartlar altında gerçekleştirilebilir. Fiziksel adsorpsiyonu takip eden glutaraldehit ile çapraz bağlama bazen immobilize katalizörün kararlılığına yardımcı olabilir.

Adsorpsiyon yönteminin de birtakım avantajları bulunmaktadır. Bunlar;

- i. Enzim immobilizasyon yönteminin basit oluşu,
- ii. Değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı tanınması,
- iii. Enzim immobilizasyonu esnasında diğer yandan enzim saflaştırmasına imkan tanınmasıdır.

Bu methotta işlemin kolay olması ve yumuşak koşullar altında gerçekleşmesi aynı zamanda enzim için olumsuz etkinin az olması açısından önemlidir.

Yöntemin sakıncaları ise şunlardır;

- i. Optimum immobilizasyon koşullarının tespit edilmesinin güç olması,
- ii. Enzim ile taşıyıcı arasındaki bağım güçlü olmadığı zamanlarda enzimin reaksiyon ortamına salınarak ürünü kirletmesidir.

2.2.1.4. Biyospesifik Bağlama Metodu

Biyospesifik bağlama metodu, çoğunlukla afinite ayırması işlemlerinde kullanılan koenzimler, inhibitörler, efektörler, lektinler ve antikorlar gibi bileşikler ile enzimler arasındaki biyospesifik etkileşime dayanmaktadır. Etkileşim kuvvetli olduğunda enzim bu bileşiklerden biri ile konjugat oluşturarak taşıyıcıya bağlanmaktadır. Ayrıca, enzimler ile bağlandıklarında onları inaktive ettiklerinden dolayı antikorlar ve inhibitörler iyi bir seçim teşkil etmezler. Lektin ile spesifik karbonhidrat birimleri içeren enzimler arasındaki etkileşim, bu tarz uygulamalar için büyük ölçüde faydalı olmaktadır[11]. Glikoprotein olan lektinler, spesifik karbonhidrat birimi ile sıkı bir şekilde bağlanır. En çok kullanılan lektinlerden birisi konkanavalin A'dır. Birçok enzim glikoprotein olduğundan dolayı, lektinlerin kullanım alanları bulunmaktadır.

2.2.2. Çapraz Bağlama Metodu

Çapraz bağlama metodu, küçük moleküllü bi- ve multi- fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlamaktadır. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif derişimine, pH ve immobilize edilecek enzime doğrudan bağımlıdır. Glutaraldehit, klorformat, karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, p-benzokinon, geçiş metal iyonları ve epiklorhidrinler en çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri arasında yer almaktadırlar. Bu yöntem ile immobilize edilen biyokatalizörün aktivitesinde genellikle düşüş gözlenmektedir.

2.2.3. Tutuklama Metodu

Tutuklama prensip olarak, biyokatalizörü belirli bir mekanda durmaya zorlamak olarak nitelendirilmektedir. Bu prosedür sonrası biyokatalizör bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz duruma gelmektedir. Bu prosedür polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi ayrıca yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilmektedir. Tutuklama metodunu kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en

önemli nokta, biyokatalizörün fiziksel ve kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olması olarak belirtilebilir. Tutuklama metodu; kafes(matrikste tutuklama), mikrokapsül, lipozom, membran ve ters misel olarak 5 ana grupta sınıflandırılabilir.

Kafes tipinde, biyokatalizör çeşitli polimerlerden birinin matriksi içine tutuklanmaktadır. Polimerizasyon ve çapraz bağlamanın olduğu ortamda biyokatalizörün de bulunması halinde çapraz bağlama sonucu oluşan kafeslerde tutuklanır. Bu hedeflenerek en çok kullanılan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamid olmuştur. Yöntemin temelinde yüksek derecede çapraz bağlı bulunan polimerin biyokatalizör çözeltisi içerisinde oluşturulması yatmaktadır. Polimerleşme sonucunda biyokatalizör çapraz bağları arasında tutuklanır ve böylece ana çözeltiliye geçmesi engellenir. Çapraz bağ yüzdesinin ayarlanmasında biyokatalizörün tutuklanmasına ve bununla beraber substrat moleküllerinin biyokatalizöre ulaşmasında bir engel teşkil etmemesine dikkat edilmelidir. Taşıyıcının yüklü olması, immobilize biyokatalizörün özelliklerinde, doğal özelliklerine göre çok büyük değişikliklerin oluşmasına neden olur. Genel anlamda yöntem, çok kolay uygulanabilir olması, gerçek fiziksel bir yöntem olması ve çok az miktarda biyokatalizör ile gerçekleştirilmesi gibi avantajlara sahip olmakla birlikte kimyasal bir bağlanma olmaması yönüyle de nötral, suda çözünmeyen taşıyıcıların da kullanımına olanak tanımaktadır. Bunun yanı sıra yöntemin bir takım dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlar arasında; immobilize işlemi sırasında inaktivasyonun deney koşullarına çok sıkı bir şekilde bağlı olması ve immobilize biyokatalizörün yalnızca küçük moleküllü substratlara karşı iyi bir aktivite göstermesi yer almaktadır.

Mikrokapsül şeklinde immobilizasyon, biyokatalizörün bir yarı geçirgen sentetik polimerin mikrokapsülleri içinde tutuklanmasını esas alır. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1 ie 100 μ arasında değişiklik göstermektedir. İmmobilizasyonda kullanılacak olan yarı geçirgen membranın, gözenek çapları, substrat moleküllerinin kapsül içerisine girmesine ve ürünlerin dışarı çıkmasına müsaade edecek bir büyüklükte olması gerekir. Bu yöntem kullanılarak gerçekleştirilen immobilizasyonun verimliliği substrat moleküllerinin küçük olması ile doğru orantılı şekilde artar. Biyokatalizör immobilizasyonu bu yöntem kullanılarak iki şekilde

gerçekleştirilebilir. Bunlar; sürekli ve süreksiz yarı geçirgen membran mikrokapsüllerde tutuklama şeklindedir. Sürekli mikrokapsüllerde membran katı, süreksiz mikrokapsüllerde çerçeve membranı sıvı tabakadan meydana gelir. Süreksiz mikrokapsüllerde lipitlerden oluşmuş amfipatik sıvı-yüzey aktif madde membranı içine tutuklama gerçekleştirilir. Membran tipi içerisinde biyokatalizör, yüzey aktif madde ile bir organik çözgenin karışımı ile oluşturulan ters miseller içinde hapsolmaktadır[12-13].

Tutuklama metodu değerlendirildiğinde en büyük avantajının sadece tek bir enzimin değil çoklu enzimlerin, hücresel organellerin ve sağlam ya da işlem görmüş hücrelerinde immobilize edilebilmesine olanak tanınması olduğu söylenebilir. Bunun aksine sahip olduğu dezavantajları arasında ise yüksek molekül kütlesine sahip substratların tutuklanan biyokatalizöre ulaşmasının zorluğu ve taşıyıcının yenilenmesinin zorluğu yer almaktadır. Tüm tutuklama metodları arasında en çok tercih edilen ve kullanılan method kafes tipidir[14].

2.3.İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması

Enzimlerin birbirinden farklı kimyasal özelliklere sahip olması ve bunun yanı sıra kullanılan substratların farklı kimyasal özelliklerinin olmasından dolayı bütün enzimler için aynı yöntemi kullanmak mümkün olmamıştır. Bu nedenle her enzim için birkaç immobilizasyon yöntemi önerilmiştir. Tablo 2.1’de immobilizasyon yöntemlerinin birbirlerine karşı kıyaslanması gösterilmiştir[15].

Tablo 2.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması

Özellik	Çapraz bağlanma	Fiziksel adsorpsiyon	İyonik bağlanma	Kovalent bağlanma	Tutuklama
Hazırlanma	Zor	Kolay	Kolay	Zor	Zor
Bağlanma gücü	Kuvvetli	Zayıf	Orta	Kuvvetli	Kuvvetli
Enzim Aktivitesi	Orta	Düşük	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Tekrar kullanılabilirlik	İmkânsız	Mümkün	Mümkün	Nadiren	İmkânsız

Maliyet	Orta	Düşük	Düşük	Yüksek	Düşük
Kararlılık	Yüksek	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek
Uygulanabilirlik	Düşük	Düşük	Orta	Orta	Yüksek

2.4. Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Taşıyıcılar

Enzim immobilizasyonunda taşıyıcı olarak düşünülecek her materyalde bulunması gereken bir takım özellikler bulunur. Bunlar arasında; büyük yüzey alanı, geçirgenlik, çözünmezlik, kimyasal, mekanik ve ısıl stailite, yüksek rijidite, uygun biçim ve partikül büyüklüğü, mikrobiyal etkilere dayanıklılık, rejenere olabilme gibi birçok faktör yer almaktadır. Dikkate alınması gereken taşıyıcının fizikokimyasal parametreleri arasında ise yüzey alanı, yapı büyüklüğü, gözenekli yapısı ve yüzeyde mevcut fonksiyonel grupların tipi bulunmaktadır.

İmmobilize enzim miktarı ve enzimin immobilizasyon işlemi sonrası kalan aktivitesi taşıyıcının yapısına önemli ölçüde bağımlılık gösterir. Taşıyıcının hidrofik karakterinin ve yüzeyinin artmasıyla birlikte birim taşıyıcı başına bağlı enzim miktarında da bir artış gözlenmektedir. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak olan taşıyıcılar reaktif olmadıklarında yardımcı bir reaktif ile aktive edilmeleri gerebilmektedir.

Taşıyıcılar kimyasal yapılarına göre organik ve inorganik kökenli olmak üzere iki grupta irdelenebilir.

Organik taşıyıcılar temel olarak makromoleküler yapıda bileşiklerdir. Kendi aralarında doğal ve sentetik polimerler olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. İmmobilizasyon için en çok tercih edilen doğal polimerler polisakkaritler olmakla birlikte polisakkarit moleküllerinin en belirgin üstünlüğü bağlanan enzimi koruyan ve yapıya hidrofilik karakter sağlayan çok sayıda hidroksil gruplarını bulundurmasıdır.

Enzimlerin kovalent bağlanması için ilk kullanılan taşıyıcı malzemelerden birisi de selülozdur. Dekstranlar da enzim immobilizasyonunda kullanılan polisakkarit molekülleridir ve büyük ölçüde dallanma gösterirler. Aynı zamanda

moleküler anlamda elek özelliğine sahip olmaları nedeniyle özellikle jel filtrasyon kromatografisinde taşıyıcı olarak kullanılan dekstranlar, ticari olarak Sephadex adıyla bilinmektedirler. Dekstranların immobilizasyon işleminde kullanılabilmesi için aktive edilmesi gereklidir. Bu nedenle ilk olarak CNBr ile muamele edilirler. Aktivasyon sonucunda dekstranın imidokarbonat türevi elde edilir. Özellikle kovalent bağlama açısından uygunluk göstermektedirler.

Alg ve agoroz polisakkaritleri biyokatalizörlerin immobilizasyon işleminde en çok kullanılan taşıyıcılar olmakla beraber kürecik formunda olup zon elektroforezinde destek materyali olarak kullanılmaktadırlar. Kitin ve kitosan amino grubuna sahip polisakkaritlerdir enzim immobilizasyonunda sıkça tercih edilen pahalı olmayan taşıyıcılar arasında yer almaktadırlar[16].

Sentetik polimerler incelendiğinde, doğal polimerlere göre hazırlanma yöntemlerinin çeşitliliği ve kolay modifiye edilmeleri gibi nedenlerle tercih edilen taşıyıcılardan olduğunu söylemek mümkündür. Polistiren, proteinlerin immobilizasyonunda kullanılan ilk sentetik polimerdir. Ayrıca polipropilenler, poliakrilat ve poliakrilamidler günümüzde kullanılan ve ve kullandıkları çalışmalarda başarılı sonuçlar alınan sentetik polimerler arasında bulunmaktadır[17].

İnorganik taşıyıcılar sahip oldukları fiziksel özelliklerinden dolayı endüstriyel kullanımları açısından organik taşıyıcılara göre bir takım üstünlüklere sahiptirler. Yüksek mekanik dayanıklılık, ısı dayanıklılık, organik çözücülere karşı direnç, mikrobiyal etkilere karşı dayanıklılık, kolay işleme, uzun raf ömrü ve kolay bir proliz işlemiyle kolay rejenere edilebilme en belirgin özellikleri arasında yer almaktadır. Ayrıca inorganik maddelerin yapısında geniş pH aralığı, basınç ve sıcaklık nedeniyle bir değişikliğin yaşanmaması da önemli bir noktadır.

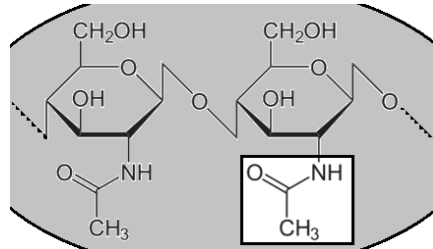
Enzimlerin immobilizasyonu amacıyla kullanılan inorganik taşıyıcı matrisler arasında; bentonit, diatome toprağı, kum, kontrollü gözenekli cam, gözenekli titanium, gözenekli alümina, gözenekli silika, alüminium silikatlar yer almaktadır.[18]

Kitin, kitosan, aljinat ve zeolit kolay bulunabilmeleri ve ekonomik olmaları nedeniyle immobilizasyon işleminde kullanımına sıkça rastlanan taşıyıcılar arasında sayılmaktadır.

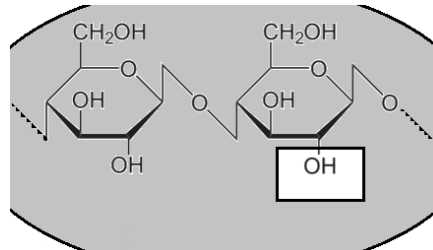
2.4.1. Kitin ve Kitosan

Kitin, immobilizasyonda taşıyıcı olarak kullanılan kompleks bir moleküldür ve kabuklu deniz ürünleri(Yengeç, karides, ıstakoz), böcek, örümcek gibi omurgasızların dış iskeletinin temel yapısını oluşturur. Bunun yanı sıra bazı mantar ve alglerin hücre duvarlarında da kitin bulunmaktadır.

Kitin selülozdan sonra doğada en sık rastlanan polisakkarit olmakla birlikte biyosferde, yılda en az 10 gigaton kitin sentezlenmektedir. Kitin β -(1 \rightarrow 4) bağlı glikandır, 2-asetamid-2-deoksi- δ -glukoz (N-asetil-D-glukozamin) birimlerinden oluşan uzun zincirli, lineer bir polimerdir. Kitin, selülozun ikinci karbonundaki hidroksil grubunun asetamid grubuyla yer değiştirmiş formudur. X-ışını analizlerinde selüloz ve kitin benzer yapıları sergilemektedir[19]. Aşağıdaki şekillerde kitin ve selülozun kimyasal yapıları gösterilmiştir;



Şekil 2. 1. Kitinin kimyasal yapısı

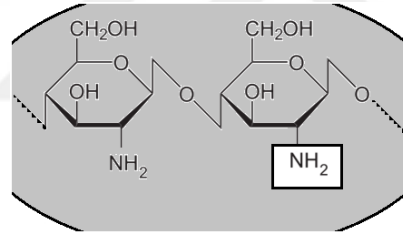


Şekil 2. 2.Selülozun kimyasal yapısı

Kitosan $[(C_6H_{11}NO_4)_n (C_8H_{13}NO_4)_m]$, ilk kez Bradconnot tarafından 1811 yılında tanımlanmış olan kitinin (β -1,4-poli-N-asetil-D-glukozamin) kısmen veya

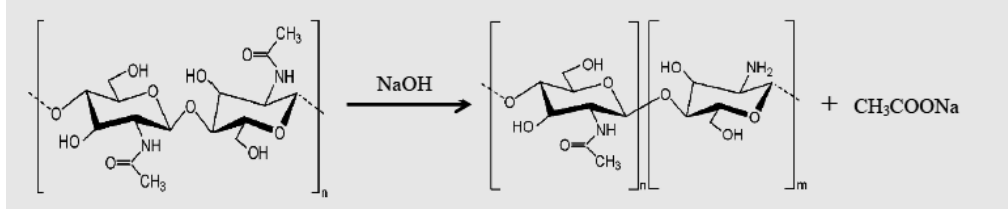
tamamen deasetilasyonu ile elde edilen antimikrobiyal özelliğe sahip bir heteropolisakarittir [1, 2]. Kitosan β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz (G1cN) ve β -(1 \rightarrow 4)-2-asetamino-2-deoksi-D-glukopiranoz (G1cNAc) birimlerinden oluşan ikili lineer bir heteropolisakarittir. Bu iki molekülün sayısı ve dizi içerisindeki sırası kitosanın fiziko-kimyasal ve biyolojik özelliklerini belirler [3]. Kitin ve kitosanın ayrımında kesin bir ölçü bulunmamasına karşın kitosan terimi, genellikle deasetilasyon derecesi % 50'den fazla olan 2-amino-2-deoksi- β -D-glukopiranoz ve 2-asetamido-2-deoksi- β -D-glukopiranozun kopolimerleri için kullanılmaktadır [4, 5]. Deasetilasyon derecesi, deasetile edilmiş amino grupları (-NH₂) sayısının, asetil-amino grupları (-NH-CO-CH₃) sayısına oranı şeklinde tanımlanmaktadır.

Kitosan da yapı olarak selüloza çok benzer; selülozun ikinci karbonundaki hidroksil grubunun amin grubuyla yer değiştirmiş şeklidir. Kitosan kitinde olduğu gibi çift bağlı karbon atomlarına sahip değildir[20].



Şekil 2. 3. Kitosanın kimyasal yapısı

Kabuklu deniz hayvanlarının atıklarından kitosan üretmek için öncelikle seyreltik HCl çözeltisi kullanılarak dekalsifikasyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Bu işlemin ardından seyreltik NaOH çözeltisiyle deproteinizasyon yapılarak kitin elde edilir fakat elde edilen kitinin renginin giderilebilmesi için % 0.5'lik KMnO₄ sulu çözeltisi ve oksalik asit sulu çözeltisi ya da güneş ışığı kullanılarak renksizleştirme işlemi yapılmaktadır. Böylece kitin üretimi gerçekleştirilmiş olmaktadır. Kitinin % 40 – 50'lik NaOH çözeltisi kullanılarak sıcak ortamda deasetilasyonu ile de kitosan üretilebilmektedir. Kabuklu deniz hayvanlarından kitin ve kitosan üretim prosesi aşağıdaki gibi gerçekleşmektedir.



Şekil 2.4.Kitinin NaOH ile deasetilasyonu ve kitosan oluşumu

2.4.2. Kitin ve Kitosanın Kullanım Alanları

Kitin, immobilizasyon dışında atık suların arıtılmasında metal iyonlarının ayrıştırılması ve içme sularının saflaştırılmasında, kozmetik sanayinde saç ve cilt bakımında, gıda sanayinde antikolesterol ve yağ bağlayıcı olarak, tarımda böcek ilacı olarak, veterinerlik uygulamalarında ve medikal uygulamalarda kullanılmaktadır.

Kitosan, biyoteknolojide enzim immobilizasyonunun yanında, hücre immobilizasyonunda, protein ayırmada, hücre geri kazanımında ve kromatografik uygulamalarda da kullanım açısından kendine yer bulmaktadır. Ayrıca, gıda sanayinde boya maddelerinin ayrılmasında, renk stabilizasyonunda ve hayvan yemi katkısı olarak, atık su arıtmada metal iyonlarının ayrılmasını sağlamakta, tarımda gübrelemede kullanılmaktadır. Medikal uygulamalarda bandajlarda, kontak lenslerde, cilt yanıklarında, kanda kolesterol düzeyinin belirlenmesinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ek olarak, kozmetik sektöründe, nemlendiricilerde, el yüz, vücut krem ve losyonlarında kitosandan faydalanılmaktadır.

2.5. Manyetik nanopartiküller

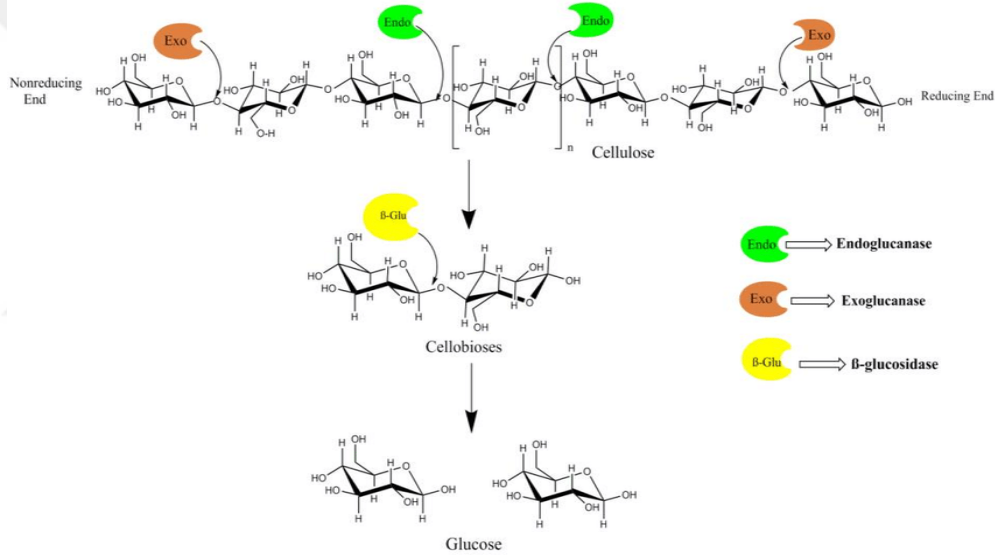
Manyetik partiküller, nano boyuttan mikron boyutuna kadar farklı boyutlarda sentezlenebilme özelliğine sahiptirler. Bu nedenle kullanım alanları çok geniştir. Manyetik nanopartiküllerin uygulanan manyetik alana cevap vererek istenilen şekilde hareket ettirilebilmeleri birçok uygulamada avantaj sağlamaktadır. Aynı avantaj yapılan immobilizasyon çalışmalarında da önemli bir yer tutmaktadır. Manyetik nanopartiküller farklı maddelerle sentezlenebilmektedir. Bunlar arasında metaller (Fe ve Co), demir oksitler (Fe_3O_4 , $\gamma-Fe_2O_3$), Spinel yapıda ferrimagnetler ($MgFe_2O_4$, $MnFe_2O_4$ ve $CoFe_2O_4$) ve alaşımlar($CoPt_3$ ve $FePt$) yer almaktadır[21-22].

Tepkime sırasındaki $Fe^{2+}:Fe^{3+}$ mol oranı ve sentez ortamının koşulları (ortamın sıcaklık ve pH değeri), oluşan demir oksitin türünü, boyutunu ve manyetik özelliklerini etkiler.

2.6. Selülag Enzimi

Selülag enzimleri, selülag materyallerin biyoyakıtlara dönüştürülmesinde önemli bir rol üstlenen glikozil hidrolazlar olarak tanımlanmaktadır[23].

Lignoselülag biyokütlelerden alternatif yakıtların ve kimyasalların üretiminde kullanılan önemli kaynaklardan olan selülaglar ve hemiselülaglar lignoselülagların glikoz, mannoz, arabinoz ve ksiloz gibi fermante şekerlere hidrolizi için gereklidirler[24].



Şekil 2. 5.Selülag enziminin çalışma mekanizması

Mikroorganizmaların büyük bir kısmı selülagu parçalayabilmesine rağmen sadece bir kısmı kristal selülagu tamamen hidrolize edebilen biyoaktif bileşenleri önemli bir miktarda üretebilmektedir[25].Selülag üretiminde genellikle bakteriler ve mantarlar kullanılmaktadır. Mantarlardan üretilen selülagın, mantarların gelişim hızlarının yavaş olması nedeniyle maliyeti yüksektir. Bunun yanı sıra mantarlar kolay saflaştırma ve ayırım için yetiştirme ortamına salınacak bol miktarda selülag ve hemiselülag üretme kapasitesine sahiptirler. Mantarların uzamış lifleri selülag yapısı üzerine mekanik baskı oluşturarak selülagın bol miktarlarda üretilmesine yardımcı olmaktadır. Çoğu mantarlardan üretilmiş selülaglar hidrolitik ve oksidatif enzimleri

salgılayarak, selüloz, hemiselüloz ve ligninin dağılmasını başarabilmektedir[26]. Bakteriyel enzimler ile mantarlardan üretilen enzimler kıyaslandığında, bakteriyel enzimlerin daha kompleks olduğunu söylemek mümkündür[27]. Bakteriyel selülaazlar genellikle üç selülaaz aktivitesinin birinden yoksundurlar. Yoksun olunan bu aktivite FPase'dır. Bununla birlikte bakterilerden üretilen selülaazlar daha verimli katalizörlerdir ve maddenin daha düşük oranda inhibe olmasını sağlamaktadırlar[28]. Bu enzimler daha hızlı gelişmekte ve daha kompleks yapıda oldukları için sinerjiyi ve işlevi artırmaktadırlar.

Tablo 2.2. Selülaaz üretiminde kullanılan bakteri ve mantar türleri (Sharada ve ark., 2013)

Mantar	Bakteri
<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
<i>Trichoderma viride</i>	<i>Bacillus subtilis (CBTK 106)</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Geobacillus pallidus</i>
<i>Alternaria alternate</i>	<i>Bacillus subtilis KO</i>
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Ruminococcus albus</i>

Selülozun enzimatik hidrolizi için genellikle selülaaz salgılayan mikroorganizmaların ortama doğrudan ilave edilmesi şeklinde uygulamalar gerçekleştirilmiş fakat yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verimin düşük olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, selülozu selülaaz ile doğrudan muamele etmek daha iyi bir çözüm olarak ortaya konmuştur. Günümüzde yapılan araştırmalar sonucunda birçok mikroorganizma tarafından selülaaz ürettildiği tespit edilmiştir.

Enzimatik hidroliz, enerjinin idareli kullanılması ve toksik maddelerin veya aşındırıcı asitlerin kullanılmasına ihtiyaç bırakmamasından dolayı oldukça avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle selülozun, selülaaz enzimi ile hidrolizi yaygın şekilde araştırılan bir konu haline gelmiştir. Selülaaz enziminin, selülozun yüzeyine yapıştığı

ve substrat boyunca hareket ederek bir takım katalitik reaksiyonları gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Enzimin, substrattan ayrılarak ve substratın başka bir bölgesine yapıştığı ve bu şekilde katalitik aktivitesini gösterdiği bilinmektedir[29].

Karbon kaynağı, selüloz kalitesi, pH değeri, sıcaklık, uyarıcıların varlığı, besi yerinin eklenmesi, havalandırma ve yetiştirilme süresi selülaz üretimin optimize edilmesinde en önemli faktörler arasında yer almaktadır. Bu parametreler arasında özellikle pH en çok önemli olan parametrelerden biridir.

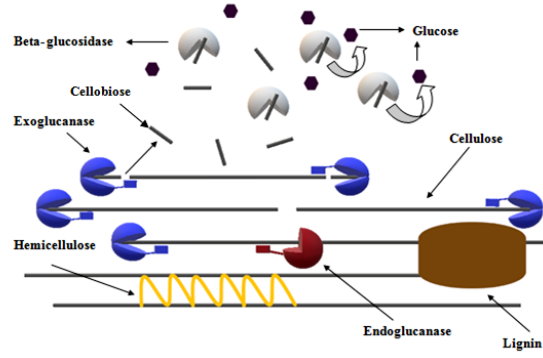
2.6.1. Selülazların sınıflandırılması

Selülazlar; selülozlardaki β -1,4 bağlarını hidroliz ederek son ürün olarak glikoz, sellobiyoz ve sello-oligosakkaritleri meydana getirmektedirler. Selülaz enzimlerinin üç ana tipi vardır. Bunlar; selülozun dış bölgesinde çalışan ekzoglukanazlar **sellobiyohidrolazlar** (1,4- β -D-glucan sellobiyohidrolaz, EC 3.2.1.91), içteki selüloz ile lif bağlarını bölen **endo- β -1,4-glukanaz** (EG yada endo-1,4- β -Dglucan 4-glukanhidrolaz, EC 3.2.14) ve çözünebilir glikoz oligosakkaritlerini hidroliz eden **β -glikozidaz** (BG, EC 3.2.1.21'dir[30].

Endoglukanazlar: Bunlar, endo β -1-4 glukanaz ve karboksi metil selülaz olarak bilinirler. Selülozun β -1-4 glukosidaz iç bağlarının hidrolizini katalizlerler. Selüloz onların doğal substratları olarak çalışır. Endoglukanazlar; sadece selülozun şekilsiz kısmında hareket edip ve aktivitesi selüloz zincirinin uzunluğu boyunca azalmaktadır.

Ekzoglukanazlar: Selüloz zincirinin indirgen ve indirgen olmayan kısımları içerisinde ilerleyen bir yolda hareket etmektedirler. Ana ürün olarak glikoz ve sellobiyohidrolazları serbest bırakırlar. Mikrokristal selüloz üzerinde hareket ederler ve dolayısıyla polisakkarit zinciri kısalır. Bunlar karboksimetil selüloz (CMC) ve hidroksietilselüloz (HEC) gibi zincirler üzerinde sınırlı etkiye sahiptir.

β - glikosidazlar: Kısa oligosakkarit zinciri ve çözünebilir sellobiyozu glikoza hidroliz etmek için gereklidir. Ayrıca β -D-glikozid glukohidrolaz olarak da adlandırılabilirler. Selüloz zincirinin boyunun artması ile aktivitesini kaybeder ve ayrıca uçta β -D- glikoz oligosakkaritlerinin hidrolizini gerçekleştirir[31].



Şekil 2. 6. Enzimatik hidroliz

2.6.2. Selülağların karakterizasyonu ve özellikleri

Selülağ enziminin endüstride en iyi performans koşulları altında kullanabilmesi için özelliklerinin tespit edilmesi büyük bir önem arz etmektedir. Selülotik enzimler dikkate alındığında göze çarpan özellikleri arasında metal gibi başka moleküllerden etkilendiğı ve selülağlar üzerinde inhibitör etki yaptıkları görülmüştür. Cıva, bakır, gümüş ve çinko selülağı inhibe edip toplam katalitik aktiviteyi düşüren iyonlar arasında yer almaktadır.

Aktiviteleri açısından ham selülağın karakterizasyonu için endoglukanazın farklı substratları kullanılmaktadır. Bununla birlikte, enzimin iki türü arasındaki sinerji, hassas bir ölçümü önlemektedir. Karboksimetil selüloz gibi çözünür bir selüloz türevi endoglukanaz aktivitesi için substrat olarak kullanılabilir. Enzim rastgele şekilde polimere saldırır ve polimerizasyon derecesinde hızlı bir değışiklik meydana getirir. Enzimatik reaksiyondan sonra karboksimetil selülağ aktivitesi olarak bilinen indirgen şeker oluşumlarının miktarı belirlenir. Ekzoglukanazların aktivitesinin ölçümü için substratlardan biri olan mikrokristal selüloz kullanılmaktadır[32].

2.6.3.Selülağ Enzimlerinin Substratları ve İnhibitörleri

Selülağ enziminin aktivitesinin ölçülmesi için kullanılan substratlar iki grupta incelenirler. Bu grupların ortaya çıkışını substratların suda çözünürlükleri belirlemektedir. Çözünebilir substratlar 2- 6 arasında düşük polimerleşme derecesine (DP) sahip sellodekstrinlerini ve DP değeri yaklaşık birkaç yüz olan selülozları içermektedirler. Bu substratlar genellikle sellülağ bileşenlerinin tek tek aktivitelerinin

ölçülmesinde kullanılırlar. Sellodekstrinler DP değerinin 6'dan küçük olduğu durumlarda kolayca çözülebilirler. DP değeri 6-12 arasında ise çözünebilirliği biraz daha zorlaşır[33]. Sellodekstrinler genellikle selülozun HCl, sülfirik asit ya da bu asitlerin karışımı (HCl ve H₂SO₄) ile hidrolizi sonucu elde edilir.

Suda çözünebilir sellodekstrinden türevlendirilen, kromojenik p-nitrofenil glikozid ve fluorojenik metilumbelliferil-D-glikozid selülazın kinetik özellikleri, reaksiyon spesifikliğı ve bağlanma bölgesinin termodinamiğinin belirlenmesi ile ilgili araştırmalarda oldukça kullanışlıdır. Bu substratlar, kromoforların substütiye glikozidden salınmaları sonucu şekerden bağımsız olarak kolayca ölçülebilmeleri nedeniyle artan selobiyoz ve glikoz varlığında inhibisyon katsayısının belirlenmesi amacıyla da kullanılmaktadırlar.

Uzun zincirli selüloz türevleri de kimyasal yapıları nedeniyle suda çözünebilirler. İyonik yapılı karboksi metil selülaz (CMC) endoglukanaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılabilir. Endoglukanazın moleküller arasındaki β-glikozitik bağları rastgele kırması sonucunda DP değerinde dramatik bir azalma görülür. Söz konusu reaksiyon CMC'deki β-glikozitik bağların kırılması olduğunda endoglukanaz CMCaz adını alır. CMC 2 önemli fiziksel parametreye sahiptir. Bunlar DS sübstütüsyon derecesi ve DP polimerizasyon derecesi'dir. CMC'nin çözünebilirliğı maksimum stökiyometrik değeri 3 olan DS değeriyle yakından ilişkilidir. CMC, DS değeri 0,3-0,7'den büyük olduğunda suda çözünebilir[34]. Ticari olarak satılan CMC'leri DS değerleri genellikle 1,5'den küçüktür. CMC indirgen şeker ve viskozite ölçümünde substrat olarak kullanılacak ise bu değer şiddetle tavsiye edilmektedir. Çünkü, DS değeri 0,7'ye eşit ise hidroliz %2 ile sınırlanmaktadır[35]. Bu değer selülazın yalnızca non-substütiye glikoza etki edebilmesi ve hidroliz reaksiyonunun en az 2 veya 3 komşu non-substütiye glikoz artığına ihtiyacı olması nedeniyle önemlidir. CMC'nin DP değeri indirgen şeker ölçümünde önemli değildir. Ancak vizkozite azalmasının ölçülmesinde büyük önem taşır. CMC su içerisinde çözülürken DP değerini düşmesinden kaçınmak amacıyla yavaşça döndürerek karıştırılmalıdır. Bununla beraber 11 iyonik CMC'nin vizkozitesi pH, iyonik şiddet ve polivalent katyon konsantrasyonundan da etkilenir. Bu nedenle endo-glukanaz aktivitesinin belirlenmesinde hidroksietil selüloz (HEC) gibi iyonik olmayan selülozlar önerilmektedir. Boyanmış çözünen CMC'ler remazol

brillant Blue R ya da Ruthenium Red gibi boyalarla CMC'nin karıştırılması ile elde edilirler. Supernatant içindeki çözünebilir selüloz türünden salınan renk substratın çöktürülmesinden sonra ölçülebilir.

Selüloz aktivitesinde kullanılan ve suda çözünmeyen substratlar oldukça saf selüloz (Whatman No1 filtre kağıdı, bakteriyel selüloz, mikrokristalize selüloz ve amorf selüloz) ve saf olmayan selüloz (boyanmış selüloz, α -selüloz, ligno-selüloz) olarak sınıflandırılabilir. Doğal selüloz selüloz I olarak isimlendirilir. İki farklı kristal formu vardır. I_{α} bakteri ve alglerde bulunur, I_{β} yüksek bitkilerde bulunur. Doğal selüloz çeşitli işlemler ile diğer kristal formlara (II-IV) dönüştürülebilir[36].

Selülozun kristalizasyon derecesi (CrI) X-ışını difraksiyon modeli ile kantitatif olarak ölçülebilir. Kristalizasyon derecesi hidroliz düzeyi ile yakından ilişkilidir. Buna rağmen, kristalizasyon derecesi selülozun çeşitli muameleler öncesi ve sonrasında karakteristiğindeki değişimleri göstermek amacıyla kullanılan uygun bir belirteçtir. Yüksek kristalize selüloza örnek olarak pamuk, bakteriyel selüloz *Valonia ventricosa* algal selülozu verilebilir. Mikrokristalize selüloz, α -selüloz, ve işlem görmemiş selülozik substratlar ortalama CrI değerine sahiptirler ve kristalize fraksiyon ile amorf fraksiyonun birleşimi olarak kabul edilebilirler. Ancak yine de iki fraksiyon arasında kesin bir sınır çizgisi yoktur.

α -selüloz ağırlıklı olarak selüloz ve az miktarda hemiselüloz içermektedir. Holoselüloz lignoselülozdan ligninin uzaklaştırılmasından sonra kalan katı yoğun kısımdır, α -selüloz ise holoselülozdan alkali ekstraksiyonu ile hemiselülozun uzaklaştırılması sonucunda kalan katı yoğun kısımdır.

Lignoselülaza bazı ön işlemler yapılarak inert yapısı bozulur bunun sonucunda selüloz tarafından daha hızlı ve etkin olarak hidrolize edilmesi sağlanır. Bu ön işlemlere örnek olarak seyreltilmiş asit ile muamele, sıcak su, amonyak ile süzme verilebilir[37]. Substratın özellikleri (DP, selüloz tarafından ulaşılabilirliği, lignin içeriği gibi) yukarıda belirtilen bu ön işlemlere ve bunun yanında lignoselülazın kaynağına bağlıdır.

Birçok kimyasal madde, enzimlerin katalitik aktivitelerine indükleyici ya da inhibe edici yönde etki etmektedir. Konuya ilişkin fazla sayıda inorganik iyonun enzimleri aktive ettiği belirtilmiştir. Aktivatör iyon, koenzim ya da kosubstrat kompleksindeki reaksiyona doğrudan dâhil edilebilir. (ör/ Fe iyonları ATP-Mg ya da flavin kompleksine bağlanır). İyonlar, enzimin bir parçası olmakla birlikte hem aktif konformasyon için düzenleyici olarak etki gösterir (alkalin fosfatazdaki Zn iyonları gibi) hem de aktif bölgeye doğrudan bağlanır (karboksipeptitazdaki Zn ya da Co iyonları gibi).İnhibitörler, enzimlerin bağlanmalarını değiştirerek aktivitelerini inhibe ederler. İnhibitörler substratın yapısına benzeyebilirler bu nedenle enzimin bağlanmasında substrat ile rekabet halindedirler. İnhibitörler, büyük organik moleküller, küçük organik moleküller veya iyonlar olabilirler[38].

2.6.4.Selülaz Enzimlerinin pH ve Sıcaklık Stabiliteleri

Enzimlerin genel olarak optimum aktivite gösterdikleri pH aralığı vardır. Ortam pH'sı substrat iyonizasyonu ve aktif bölgedeki katalitik grupların iyonizasyonunu etkiler. Bu nedenle elektostatik etkileşimler pH ile kontrol edilirler. Bir reaksiyonun pH'sı, makromolekülün 3 boyutlu yapısı için kritik amino asitleri etkileyerek enzimin konformasyonunu kontrol edilebilir [39].

Yüksek termal dayanıklılık birçok endüstriyel enzimde fazla istenen bir özelliktir, çünkü enzimlerin kullanıldığı işlemler genelde 50°C'den yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Özellikle termofillerden elde edilen enzimler sahip oldukları dayanıklılıktan dolayı günümüzde oldukça fazla ticari kullanım alanı bulmuştur. Yüksek sıcaklıklarda biyoteknolojik işlemleri gerçekleştirmek yapılan uygulamalar açısından pek çok fayda sağlamaktadır. Sıcaklığın arttırılması organik bileşiklerin çözünürlüğü ve biyolojik olarak kullanılabilme açısından önemli etkilere sahiptir. Sıcaklığın artması beraberinde viskozitenin düşmesini ve organik bileşiklerin difüzyon katsayısının artmasını da sağlamaktadır.

Selülazın yüksek spesifikliği, toksisitesinin olmaması, biyobozunur olmasıve optimum pH, sıcaklık, basınç gibi özelliklerinin ılımlı aralıklarda olması selülazın inorganik katalizörlere göre daha avantajlı olmasını sağlamaktadır[40].

2.6.5.Selülazların Uygulama Alanları

Selülazlar birçok alandaki kullanımlarından dolayı dünya genelinde üçüncü büyük endüstriyel enzimler arasında yer almaktadırlar. Mikroorganizmalar arasında aerobik, anaerobik bakteriler, beyaz çürükçül ve yumuşak çürükçül mantarlar ve anaerobik mantarlara kadar selülaz üretimi yaygındır. Selülazlara karşı ortaya çıkan talep çeşitli uygulamalarda kullanılabilirliğinden dolayı sürekli artmaktadır. Tekstil, deterjan, kağıt endüstrisi selülazların kullanıldığı birkaç endüstriyel alandır. Selülazlar ilk olarak biyokütlenin biyolojik geri dönüşümünde denemiş fakat bu daha sonralarda çekiciliğini yitirmiş ve yem, gıda, tekstil ve deterjan gibidiğer endüstrilerde ağırlıklı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Fakat fosil yakıt kaynaklarının azalmasıyla, yenilenebilir yeni alternatif yakıt ve enerji kaynaklarının bulunmasına yönelik ihtiyaçlar son zamanlarda artmış ve selülazlar ile diğer enzimler birlikte kullanılarak lignoselülozik biyokütlenin hidrolizi gerçekleştirilmeye başlanmıştır[41,42].

Son zamanlarda selüloolitik enzimler, meyve sularının berraklaştırılması işlemlerinde, kumaşlarda parlaklığın sağlanması ve yumuşaklığın elde edilmesi için deterjanlarda, kotların biyo taşlanması, endüstriyel atıkların ön işleminde ve yemlerin kalitelerinin artırılması gibi çok çeşitli uygulamalarda kullanılmaya başlanmıştır. Selülazların istenilen yönde kullanımı selülazların başarısı, yeni ve daha etkin enzimlerin izolasyonuna bağlı olduğunu söylemek mümkündür. Örneğin, tekstil endüstrisinde pamukların biyo parlatılması işlemlerinde 100°C'ye yakın sıcaklıkta stabil selülazlara gereksinim duyulmaktadır[43]. Selülaz enzimi biracılık, gıda, kağıt ve kağıt hamuru ile tekstil endüstrilerinde geniş uygulama alanı bulmuştur. Günümüzde selülazların kullanıldığı çok farklı alanlar bulunmaktadır.

2.6.5.1. Gıda Endüstrisi

Selülazlar gıda endüstrisinde, zeytinyağlarının ayrılmasında, meyve nektar ve pürelerinin üretiminde, meyve ve sebze içeceklerinin berraklaştırılması gibi alanlarda yoğun şekilde kullanılmaktadırlar.

Özellikle meyve suyu üretiminde selüloz, hemiselüloz ve pektinazların ortak kullanımı başarıyı arttırmaktadır[44]. Ayrıca fırıncılık alanında ürünlerin kalitelerinin artırılmasında da selülozların kullanılmaktadırlar[45].

2.6.5.2. Tekstil Endüstrisi

Tekstil endüstrisinde selülozlar daha çok kotların taşlanması tercih edilmektedirler. Kotların işlenmesi sürecinde ponza taşından faydalanılır fakat kullanılan ponza taşları çok emek isteyen ve kullanılan donanımlara zarar veren bir uygulamadır. Bu sebepten ötürü β -1,4-bağlarını parçalayan selülozların ponza taşının görevini üstlenmesi ile birlikte kullanıma girmesi, uygulamada verimliliğin artmasını sağlamıştır.

Selülozlar aynı zamanda kumaşlardaki küçük lif uçlarını kopartarak tüylenmeleri giderir, yumuşaklık ve defibrilasyonu sağlamaktadırlar. Kumaşlardaki selüloz liflerinin istenilen şekilde modifiye edilerek tekstil alanında dünya genelinde başarılı bir kullanım alanına sahip olmaları selülozların önemini ortaya koymaktadır.

2.6.5.3. Çamaşır ve Deterjan Endüstrisi

Diğer hidrolazların aksine selülozların lekeleri özümlememeleri deterjan enzimleri açısından büyük bir önem taşımıştır. Selülozlar lekeleri özümlemek yerine leke parçacıklarının uzaklaştırılması için pamuğun mikrofibrillerini parçalayarak etkinlik gösterirler. Bunların yanı sıra alkaline pH'daki deterjanların stabilitesi deterjan enzimi için gereklidir[46]. Alkaline selülozların keşfi ile çamaşır deterjanlarına karıştırılarak kullanılması enzim için yeni bir uygulama alanı meydana getirmiştir. Alkaline selüloz, pamuklulardan toprağın uzaklaştırılmasında etkili olup, pamuk liflerini parçalamamaktadır.

Deterjan endüstrisi içerisinde büyük öneme sahip olan selülozlar hem temizleme performansını artırarak kumaşın onarılmasına katkıda bulunurlar. Diğer yandan kumaşların onarım etkisi büyük oranda yüzey tüyü olarak görünen ve/veya kumaşın renk tonunu etkileyen ve gözle görülebilecek büyüklükte olan fragmentler gibi büyük selüloz lif fragmentlerinin uzaklaştırılmasıyla alakalıdır. Yüzeyde yer alan lif fragmentleri kumaşa yıpranmış, eskimiş bir görüntü verir ve onların uzaklaştırılmasıyla yenilenme işlemi gerçekleştirilmiş olur.

Hasar görmüş lif yüzeylerinde tutulan kirlerin uzaklaştırılabilmesi selülozların mikrofibrilleri uzaklaştırma etkisi olarak tanımlanmaktadır. Mikrofibrillerin uzaklaştırılması ve lif yüzeylerinden kirliliklerin temizlenmesi kumaş ve giysilere parlaklık vererek onların yeni gibi görünmesine olanak verecektir[46]. Deterjan uygulamalarında yalnızca endogulukanazlar istenen performans artışını sağlayabilmektedir. Ancak selülozların deterjanlarda yüksek dozlarda kullanılması tekrar tekrar gerçekleşen yıkamalar sonrası bazı pamuksu kumaşlarda zarara neden olabilmektedir. Yüksek aktiviteli modern deterjanların aktivitelerini daha fazla arttırmak için karışıma lipaz, selüloz, amilaz, proteaz gibi bir veya daha fazla enzimin karıştırılması söz konusudur[47].

2.6.5.4. Hayvan Yemi Endüstrisi

Selülozlar hayvan yemlerinin besin değerlerini artırılması amacıyla monogastrik ve ruminant yemlerinin üretimi için kullanılmışlardır.

Selülozlara ek olarak pektinaz ve hemiselülozlar gibi enzim karışımları da yemlerin besin değerlerini artırmak için yem rasyonlarına ilave edilmişlerdir.

2.6.5.5. Kağıt Endüstrisi

Selülozlar özellikle geri dönüşüm için önemli bir kaynak teşkil eden kullanılmış kağıtların, gazete kağıtlarının ve ambalaj kağıtlarının üzerindeki mürekkeplerin enzimatik yolla uzaklaştırılmasında kullanılmaktadırlar ve bu sayede kimyasal yolla uzaklaştırmanın yerini almışlardır. Bu yüzden selülozlar kağıt endüstrisinde kağıt fabrikalarının drenajlarının ağartılması, kağıtlardan mürekkebin uzaklaştırılması, kağıdın mukavemet özellikleri ve kaba mekanik kağıt hamurunun modifikasyonu için biyomekanik hamurlaştırmada tercih edilmekte ve kullanılmaktadırlar. Ayrıca selülozlar kağıt yüzeylerinde oluşan liflerin uzaklaştırılmasında da önemli etkenlerdir.

Aynı zamanda kartonların biyolojik parçalanmasını kolaylaştırmaları onlar için farklı uygulama alanları sağlamaktadır. Bunların dışında aynı zamanda selüloolitik enzimler temizlik kağıtları ve kağıt havlularının daha yumuşak olması için üretimde kullanılmaktadırlar.

2.6.5.6. Bira ve Şarap Endüstrisi

Selülozlar bira ve şarap endüstrisinde de kullanım alanı bulmuşlardır. Selülozlar şarapyapımında bitki hücrelerindeki polisakkarit duvarlarının hidroliziyle birlikte yüzeylerinin yumuşatılmasını sağlar. Aynı zamanda üzümlerin renk ekstraksiyonunda kullanılarak kalite, filtrasyon ve arıtmada işlemlerinin gerçekleşmesinde selülozlardan faydalanılmaktadır.

Biracılıkta ise selülozlar şekerlerin β -1,4-glikoz bağlarını kırarak birincil fermantasyon boyunca şeker artışını sağlamakla birlikte viskoziteyi artırarak biraların ilk fermantasyon, filtrasyon ve kalitelerinde iyileştirme gerçekleştirilmesinde büyük katkı sağlarlar [48].

2.6.5.7. Biyoyakıt Endüstrisi

Biyoyakıt üretimi için günümüzde yoğun araştırmalarının gerçekleştirildiği en önemli uygulama lignoselülozik atıkların kullanımudur. Selüloz enzimleri, selülozik materyallerin glikoz ve diğer fermante edilebilir şekerlere çevrimi ile etanol gibi çeşitli fermantasyon ürünlerinin ya da tek hücre proteinlerinin üretilmesi amacıyla degradasyonunda kullanılmaktadırlar. Bunun yanı sıra zirai ve endüstriyel atıkların enzimatik sakkarifikasyonunda da selülozlardan yararlanılmaktadır.

2.7. Karakterizasyon Yöntemleri

Bu çalışmada selüloz kitosan ve kompozit boncuklarının yapısal, morfolojik, manyetik ve ısıl özellikleri, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), X-ışınları kırınımı yöntemi (XRD), termogravimetrik analiz yöntemi (TGA) ile incelenmiştir. Ayrıca, oluşturulan kompozit taşıyıcıların yüzeyinde meydana gelen değişimler taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile araştırılmıştır. Bu bölümde, her bir karakterizasyon yönteminin temel prensipleri ile ilgili kısa bilgi verilmektedir.

2.7.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

FT-IR spektroskopisi, elektromanyetik spektrumun kızılötesi bölgesinde, örnekteki atom gruplarının ve fonksiyonel grupların kendilerine özgü dalga boylarında absorpsiyon yaparak, bir titreşim veya dönme enerji seviyesinden diğerine geçişleri vasıtasıyla belirlenmelerini sağlayan bir yöntemdir.

2.7.2.Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

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

2.7.3. X-Işını Toz Kırınım Ölçümleri (XRD)

X-Işını kırınımı yöntemi, her bir kristal maddenin kendine özgü olan X-ışını kırınım modeline göre, kristal yapıların analiz edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Tabiatta bulunan metaller genellikle kristal yapıya sahip oldukları için, kristal örgüleri içerisinde simetrik ve periyodik olarak dizilmiş 31 elementlerden oluşurlar ve karakteristik bir kırınım desenine sahiptirler. İncelenen örneğin kırınım desenindeki X-ışını kırılma açılarının, literatürde o kristal yapı için verilen kırınım desenlerindeki kırılma açılarıyla karşılaştırılması ve aynı bulunması yoluyla, örneğin

kimyasal yapısı belirlenebilir. Ayrıca malzemenin parçacık boyutu, aşağıda verilen Debye-Scherrer eşitliği kullanılarak, X-ışını kırınım desenindeki pikler yardımıyla hesaplanabilir:

$$d = k\lambda / \beta \cos\theta$$

Bu bağıntıda, d , parçacık boyutunu, $k=0,89$ olan Debye-Scherrer sabitini; λ , Cu K α ışınının dalga boyunu (0,15406 nm); β , radyan cinsinden pik yarı genişliğini ve θ , kırılma açısını göstermektedir.

2.7.4. Termogravimetrik analiz (TGA)

Termogravimetrik analiz yöntemiyle, kontrol edilen bir atmosferde, sıcaklığın programlı olarak artırılması ya da azaltılmasıyla maddenin kütleinde meydana gelen değişiklik sıcaklığın ya da zamanın fonksiyonu olarak incelenmektedir. Örneğin, sıcaklığa karşı maddenin kütleinde meydana gelen azalmayı gösteren termogramlardan, maddenin yapısal özellikleri ve içerdiği su miktarı konusunda bilgi edinilebilmektedir.

2.7.5. Manyetik Duyarlılık Ölçümleri (VSM)

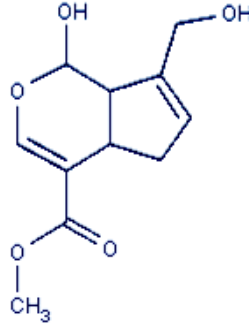
Numunelerin manyetik ölçümleri, elektriksel ve kristalografik ölçümler kadar önemli ölçümlerdir. Tüm malzemeler dışardan uygulanan bir manyetik alana karşı tepki vermektedirler. Dışardan uygulanan bu manyetik alan, malzeme içerisinde bir manyetizasyona neden olmaktadır. Elde edilen veya doğadaki her malzeme uygulanan alana karşı kendine özgü bir manyetizasyona sahiptir. Bu durum malzemenin uygulanan alana karşı göstermiş olduğu duyarlılıkla ilişkilidir. Buna malzemenin duyunluğu denmektedir. Bu durumda malzeme oluşmuş manyetizasyonun büyüklüğü, dışardan uygulanan alan ve malzemenin duyunluğu ile yakından ilişkilidir denebilir. Bunun yanı sıra uygulanan alanın, hangi sıcaklıkta uygulandığı da önemlidir.

2.8.Genipin

Genipin, Gardenya jasminoides[49,50] Ellis'in meyvesinde bulunan genipositten üretilen bir aglikondur. Djerassi ve arkadaşları 1960'larda NMR spektroskopik verileri ve kimyasal bozunma deneylerini kullanarak genipinin yapısını

keşfetmişlerdir. Genipin $C_{11}H_{14}O_5$ moleküler formülüne sahiptir ve bir dihidropiran halkası içerir. Düşük sitotoksositeye sahip, doğal olarak oluşan, biyobozunur bir molekül olduğu için, genipin birçok biyolojik uygulamada bir çapraz bağlama maddesi olarak yakın zamanda araştırılmıştır. Bir biyo-yapışma, yara sargısı ve kemik ikame maddeleri olarak kullanım için genipin çapraz bağlanmış jelatinin kullanımına ilişkin son keşifler, yeni ve güvenli bir çapraz bağlama maddesi olarak potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Kullanılan en yaygın çapraz bağlama maddesi glutaraldehit olmakla birlikte toksisitesi ile ilgili endişeler nedeniyle glutaraldehite alternatif olabilecek yeni yöntemler arasında genipin de yer almıştır.

Genipinin kendisi renksizdir fakat spontan olarak amino asitlerle reaksiyona girmesi mavi pigmentlerin oluşmasını sağlamaktadır. Meyvenin bileşenleri geleneksel Çin tıbbında ve Doğu Asya'da gıda endüstrileri tarafından mavi renklendirici olarak kullanılmıştır. Genipin yapısı, diğer özellikler ile birlikte Şekil 2.7'de gösterilmiştir.

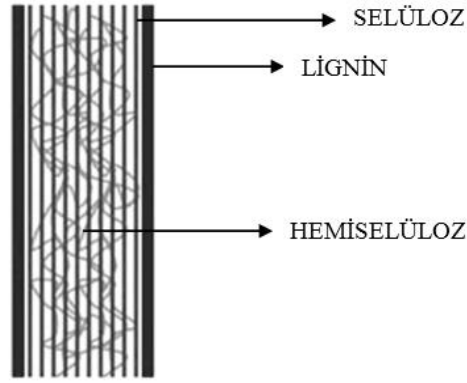


Şekil 2. 7. Genipinin yapısı

2.9. Lignoselülozik Biyokütle

Lignoselülozik biyoküttelede yapı temel olarak, selüloz ve hemiselüloz gibi yapısal karbonhidratlar ve heterojen fenolik polimer olan ligninden meydana gelmektedir. Bununla birlikte lignoselülozik biyokütlenin içeriği türlere, iklime, toprak verimliliğine ve gübrelemeye bağlı olarak farklılık göstermektedir. Lignoselüloz içerisindeki ekstraktlar ve mineraller kuru biyokütlenin ağırlığının %10'u kadardır. Akçaağaç, kavak, kızıl akçaağaç, okaliptus, meşe ağacı, karakavak gibi sert odunlu materyallerde selüloz %39-54, hemiselüloz %14-37 ve lignin %17-30 oranında bulunmaktadır. Köknar, çam gibi yumuşak odunlu materyallerde ise selüloz %41-50, hemiselüloz %11-27, lignin %20-30 oranında bulunmaktadır. Farklı

tarımsal atıkların içeriğine baktığımızda ise genel olarak selüloz %32-47, hemiselüloz %19-27, lignin ise %5-24 oranında bulunmaktadır. Lignoselüloz içerisinde bulunan diğer maddeler (ekstraktifler) ise organik çözeltiler ya da suda çözünebilen maddelerdir. Bunlar lignoselülozik maddenin çok küçük bir parçasını oluşturmaktadır (%1-5). Bu maddeler hem lipofilik hem de hidrofilik bileşenlerdir. Ekstraktif maddeler 4 büyük sınıfa ayrılabilirler: (a) terpenoidler ve steroidler, (b) yağlar ve mumlar, (c) fenolik bileşikler ve (d) inorganik bileşenlerdir. Lignoselülozik biyokütlerde birincil hücre duvarı hücre bölünmesiyle geliştirilmiştir. Kristal selüloz; mikrolifler ile hemiselüloz polisakaritlerinin matrisi içerisine gömülmüştür. Komşu hücrelerin temel duvarları orta lamel olarak adlandırılan pektinlerden oluşan yapışkan bir tabaka ile tutturulmuş olup bunun amacı, iletken doku oluşturmak üzere çok sayıda vasküler demetler halinde düzenlenmesidir.



Şekil 2. 8.Lignoselülozik biyokütlenin yapısı ve bileşimi

2.9.1. Hemiselüloz

Hemiselüloz; glikoz, galaktoz, mannoz gibi heksozları, ksiloz, arabinoz gibi pentozları ve glukuronik, galakturonik ve metil galakturonik asit gibi şeker asitlerini içeren şekilsiz, değişken yapıda formları olan bir heteropolimer olarak bilinir. Hemiselülozun ana zinciri, birincil olarak ksiloz (%90) ve arabinoz (%10) içeren β -1-4 bağlı ksilandan oluşmaktadır. Hemiselüloz içerisinde en çok bulunan bileşen ksilan olmasına rağmen ksilan derişimi her biyokütlerde farklılık göstermektedir. Selülozdan daha düşük molekül ağırlığına sahip olan hemiselüloz farklı şekerlerden oluşan kolay hidroliz edilebilir kısa zincirlerden oluşmaktadır. Selüloza göre daha şekilsiz olmakla birlikte selüloz ve lignin lifleri arasında bağlantı görevi görmektedirler. Bütün selüloz, hemiselüloz lignin ağına sertlik vermektedirler [51].

Hemiselülozun en önemli bileşeni olan ksilan hemiselülozun kolay ekstre edilebilir kısmıdır ve asit veya alkali bir ortamda daha iyi şekilde ekstre edilebilmektedir.

2.9.2. Lignin

Lignin, kovalent bağlar aracılığı ile hemiselüloza bağlanmış 10000 Dalton molekül ağırlığına sahip aromatik, sert ve suda çözünmeyen inaktif bir biyopolimerdir. Temelde üç ana bileşenden meydana gelen ligninin ana bileşenleri arasında koniferil alkol, sinapil alkol ve p-kumaril alkol yer almaktadır. Selüloz ve hemiselülozdan sonra doğada en fazla bulunan polimer olan lignin, hücre duvar içerisinde bulunmaktadır. Üç farklı fenilpropan birimlerinden oluşan lignin, şekilsizdir. Ligninin asıl amacı bitkiye destek sağlamak, mikrobiyal saldırı ve strese karşı direnç sağlamaktır. Orman ağaçları birincil olarak selüloz ve lignin polimerlerinden oluşmaktadır. En yüksek lignin seviyesine sahip olan bitkiler yumuşak ağaçlardır. Ligninin biyodönüşüm sürecinin ekonomik performansı üzerinde önemli bir etkisi vardır. Çünkü mikrobiyal gelişim ve fermantasyondaki çoğu inhibitörler ön işlem ve enzimatik hidroliz sırasında bu bileşenden gelmektedirler. Bu arada selülozdan sonra biyokütle içerisinde en çok bulunan bileşen olan lignin, yakıldığında bol miktarda enerji vermekte ve çevre dostu bir teknoloji olan kombine ısı ve güç üretimi için iyi bir seçim teşkil etmektedir. Ayrıca taşıma yakıtları ve katma değer kimyasalları içeren değişik ürünler için lignin harika bir başlangıç materyali olmasının yanı sıra biyoetanol üretimini daha ekonomik hale getirebilmektedir[52].

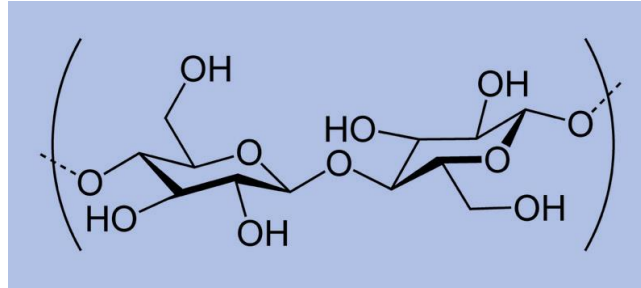
2.9.3. Selüloz

Selüloz β -1-4 glikozidik bağlarla bağlanmış β -1-4 glikoz birimlerinden oluşan dalsız bir glikoz polimeridir. Yılda 1010 ton sentezlenme hızıyla biyo dönüşümlerde en çok kullanılan moleküldür olarak bilinmektedir. Mantar ve bakteriler, hidrolitik ve oksidatif enzimleri kullanarak bu makro molekülleri parçalayabilmektedirler. Ayrıca, bu polimer yenilenebilir enerji üretiminde oldukça önemli bir role üstlenmiştir[53]. Selüloz molekülleri enzimatik hidroliz için dayanıklı, yüksek mukavemetli kristal bölge ve kristal olmayan (şekilsiz) bölgeden oluşmaktadır. Özellikle kristal bölgeler enzimatik hidroliz için daha dayanıklıdır [54]. Bu bölgeler, çok sert olmasının yanı sıra doğrusal zincirin paralel yapılanmasıyla oluşmaktadır. Onların bu paralel yapılanması selülozun çözünmezliğini sağlamaktadır. Şekilsiz bölgeler ise

diğer kısımlara göre, daha zayıf bağı selüloz zincirinden oluşmaktadır ve bu onları enzimatik hidroliz için daha kullanışlı yapmaktadır.

Selülozlar, selüloz enzimleriyle glikoza hidroliz edilen lignoselülozik biyokütlenin ana bileşenidirler. Selülozik biyokütle sık kullanılan yenilenebilir bir enerji kaynağıdır ve geniş malzeme çeşitliliği içermektedir. Dünya çapında kullanılabilirliği, şekerlere, alternatif yakıtlara ve kimyasal hammaddelere dönüşüm potansiyeli selülozik materyallerin bozunmasının araştırılmasını artırmaktadır. Bu yöntem maliyeti de azaltmasından dolayı ekonomik olarak da çok elverişlidir. Selüloz bitki derişiminin yaklaşık olarak %30 unu kapsamaktadır.

Şekil 2.9'da yapısı verilen selülozun, ana zincirinde bulunan hidroksil grupları nedeniyle suda çözünmesi beklenir fakat selüloz zincirleri arasındaki yoğun hidrojen bağları su, diğer çözücü ve çözücü karışımlarının polimer içyapısına girmesine izin vermez ve çözünmeyi engellemektedir. Ancak son yıllarda selülozun çözünmesi için NaOH/üre çözücü karışımları kullanılmaktadır. Ayrıca selülozdaki hidroksil grupları başka gruplara çevrilmesi ile (hidrojen bağlarının tamamen kaldırılması veya azaltılması) çözülebilir selüloz türevleri elde edilmektedir.



Şekil 2. 9.Selülozun yapısı

2.10. Enzimatik Hidroliz

Enzimatik Hidroliz metodu, enzimlerin bitki proteinlerinde bazı kimyasal reaksiyonlara sebep olması ile gerçekleşmektedir. Bu yöntemin uygulanmasında son yıllarda iki teknolojik gelişme sağlamış olup bunlar enzimatik ve direkt mikrobiyal dönüşüm metotlarıdır. Selüloz hidrolizinde substratın lignin ve hemiselüloz içeriği, yüzey alanı ve selülozun kristallik derecesi gibi yapısal parametreler lignoselülozik

materyallerin enzimatik hidroliz işlemini oldukça etkilemektedir. Enzimatik hidroliz işlemiyle lignoselülozlarda var olan glukanın yalnızca %20'si (wt) çözülebilir hale getirilebilirken, yapılan ön muamele işlemleri sayesinde enzimatik etkinin artırılabilceği belirtilmiştir. Ön muamelede amaç lignin ve hemiselülozu ortadan kaldırmak, selülozun kristalinitesini azaltmak ve maddenin gözenekliliğini arttırmaktır. Uygun koşullar altında ön muamele işlemiyle selülozun neredeyse tamamı orjinal materyal içinde kalmakta ve bu da enzimatik hidrolizi büyük ölçüde etkilemektedir[55]. Ön muamele şu sebeplerden dolayı gereklidir:

1. Şeker oluşumunu arttırmak
2. Bozunmadan kaçınmak ve karbonhidrat kaybını azaltmak
3. Hidroliz ve fermantasyon prosesleri sonunda oluşacak yan ürünlerden kaçınmak
4. Maliyet

Fiziksel, fizikokimyasal, kimyasal ve biyolojik prosesler lignoselülozik maddelerin ön muamelesinde kullanılmaktadır[56-57].

Selülozik substratın enzimatik hidrolizi süresince çeşitli faktörler selülaz karışımının katalitik aktivitesini sınırlamaktadır. Bu sınırlamaların enzim- ve substrat- ilişkili faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Selülazların tekrar kullanımını veya geri dönüşümünü düşünmek şu anki teknoloji ile zordur; çünkü lignoselülozik substratlar üzerine selülazların adsorbsiyonu üzerine bugüne kadar elde edilen bilgiler eksik ve yetersizdir. Öte yandan selülozun enzimatik degradasyonu oldukça karmaşık bir işlem olmakla birlikte, bu degradasyon işlemi enzimlerin hareketli bileşenleri olarak yer aldıkları katı-sıvı faz sınırında meydana gelmektedir. Selülaz enzim sistemleri çözünmez selülozik substrat üzerine etki ettiğinde eş zamanlı olarak üç süreç ortaya çıkmaktadır[58-59]. Bunlar; çözünmemiş kalıntı selülozda kimyasal ve fiziksel değişiklikler, selüloz molekülünün yüzeyinden çözülebilir kısımların ayrılmasını kapsayan birincil hidroliz işlemi ve çözülebilir ve düşük moleküler ağırlıklı kısımların ve hatta glikozun hidrolizini kapsayan ikincil hidroliz işlemleridir. Selülozik materyallerin enzimatik hidroliz oranı oldukça hızlı bir şekilde düşmektedir. Genel olarak enzimatik selüloz degradasyonu hızlı birincil

faz ve bunu takip eden ve substrat tamamen tükeneinceye kadar devam eden daha yavaş ikincil faz süreçlerinin toplamıyla karakterize edilebilir.

2.11. Tezin Amacı

Enzimlerin tekrar kullanılabilmelerine olanak tanınması için, aktivitelerinin, stabilitelerinin ve geri kazanımlarının artırılması sağlanmalıdır. Enzim saflaştırma işlemlerinin zahmetli ve pahalı olmasının yanı sıra endüstriyel uygulamalarda karşılaşılan bir takım zorlukların üstesinden gelmek için çeşitli immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir.

Genipin ile enzim immobilizasyonu nadiren karşılaşılan çalışmalar arasında yer almaktadır. Önceki yapılan çalışmalar arasında glikoamilaz, proteaz, naranginaz, lipaz, β -glikozidaz ve lakkaz gibi enzimler, genipin ile aktive edilen kitosan üzerine immobilizasyon için kullanılmıştır. Bildiğimiz kadarıyla, genipin ile aktive edilen kitosan boncuklar üzerine selülaz enziminin immobilizasyonu daha önce bildirilmemiştir. Dolayısıyla, bu çalışmanın amacı genipin ile aktive edilen kitosan ve kompozit boncuklar üzerine selülaz immobilizasyonu yoluyla lignoselülozik atık giderimini sağlamaktır.

Çalışmada kitosan ve mayetik kitosan kompozit boncukların sentezlendi. Sentezlenen kitosan ve kompozit boncuklar genipin ve glutaraldehit kullanılarak aktive edildikten sonra *T. Reseei*'den saflaştırılarak elde edilmiş selülaz enziminin, sentezlenen kompozit kitosan boncuklar üzerine immobilizasyonu gerçekleştirildi. Çalışmada kitosan ve kitosan kompozit yapılarının sentezlenmesi, immobilizasyon işlemi sonrası yüksek katalitik aktivite ve kararlılığa sahip morfolojinin tespit edilmesi ve özelliklerinin karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Genipin ve glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan kompozit boncukların üzerine immobilize edilen selülaz enzimi aynı zamanda lignoselülozik atıkların hidrolizinde kullanılarak açığa çıkan indirgen şeker miktarı belirlenerek hidroliz yüzdesi hesaplandı.

3. DENEYSEL KISIM (MATERYAL VE YÖNTEMLER)

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar

Toz formunda *Trichoderma reesei* (ATCC 26921 EC 3.2.1.4., 8 U/mg ve ≥ 1 U/mg) 'den saflaştırılmış selüloz, sığır serum albümini, kitosan (deasetilatlı kitin, CAS 9012-76-4; orta moleküler ağırlık, deasetilasyon derecesi% 75-85), glutaraldehit (% 25), Coomassie brilliantblue G-250, sodyum trifosfat pentabazik (TPP), 3,5-dinitro salisilik asit (DNS), karboksimetil selüloz sodyum tuzu(CMC-Na $C_8H_{16}NaO_8$, Moleküler ağırlık: 265.204 g/mol),potasyum bromür (KBr), sodyum metabisülfid, rochelle salt (potasyum sodyum tartrat tetrahidrat) Sigma Chemical Co.'dan (St. Louis, MO, ABD) temin edilmiştir.

Genipin (% 98), Xi'an Plant Bio-Engineering Co.Ltd. (Shaanxi, Çin (Anakara))'den temin edildi.

Deneyleerde kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler analitik saflıkta olup, Merck veya Sigma firmasından temin edildi. Tüm sulu çözeltiler, Millipore Milli-Q Plus su arıtma cihazıyla saflaştırılan saf su ile hazırlanmıştır.

3.1.2. Selülozik Biyokütle

Çalışma için lignoselülozik kaynak olarak enginar yaprakları ve sapları, mısır yaprakları ve çam ağacı kabukları(*Pinus cembroides*) kullanıldı. Bu biyoküteller sıcak havada güneş almayacak ortamda muhafaza edilmiş ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan biyoküteller bir mikser kullanılarak öğütüldü. Öğütülmüş biyokütle, -63 μ m gözenek büyüklüğüne sahip bir elek kullanılarak elendi ve hidroliz işlemi için hazır hale getirildi.

3.1.3. Kullanılan Aletler

- UV-Visible spektrofotometre (UV-1800 SHIMADZU)
- FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrometresi) (Perkin Elmer Spectrum BX)
- Soğutmalı santifüj (Sigma)

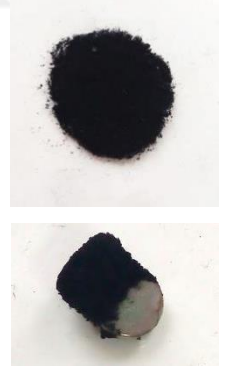
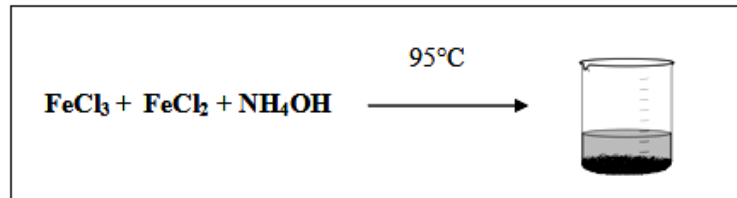
- Çalkalamalı İnkübatör (GFL)
- pH metre (Inolab WTW Series)
- Hassas terazi(Sartorius)
- Cam Malzemeler
- Etüv
- Taramalı elektron mikroskopisi (SEM, Zeis, EVO LS10, England)

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve analizi hizmet alımı karşılığında yaptırıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Manyetit(Fe_3O_4) Hazırlanması

Manyetit sentezi için, 1,7 gr $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0,63 gr $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 250 ml 1.5 M amonyak (NH_3) çözeltisine eklendi (Yuanbi et al. 2008). Karışım, bir su banyosu içinde $95^\circ C$ 'de 2 saat karıştırıldı. Karışım filtre kağıdından süzöldükten sonra etanol ve saf su ile pH nötral oluncaya kadar birkaç kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra sonra, numune $70^\circ C$ 'de 15 saat boyunca kurutuldu. Kurutulmuş koyu kahverengi manyetit partikülleri havanda ince bir toz haline getirilmiş ve ependorf içinde muhafaza edildi.



Şekil 3. 1. Fe_3O_4 partiküllerinin sentezi

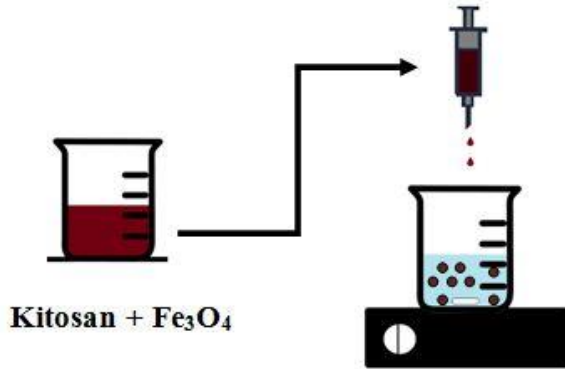
3.2.2. Kitosan Boncukların Oluşturulması(CS)

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

Kalan kitosan çözeltisi daha sonra manyetik kitosan boncukları oluşturmak için kullanılmak üzere buzdolabında 4°C’de muhafaza edildi.

3.2.3. Manyetik Kitosan Boncukların Oluşturulması(CS-Fe₃O₄)

CS-Fe₃O₄ boncuklarının oluşturulması için % 2’lik kitosan çözeltisi ve sentezlenen manyetit belirli ölçüde karıştırıldı. Manyetik kitosan boncukların sentezi için hazırlanan 100ml % 2’lik kitosan çözeltisi içerisine kurutulmuş olan manyetitten 0,5 gr eklendi. Karışım ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca karışmaya bırakıldı. Manyetit kitosan içerisinde homojen bir dağılım gösterdikten sonra manyetik karıştırıcı üzerindeki hazırlanmış TPP çözeltisi(pH 8,2) içerisine şırınga yardımıyla damlatılarak manyetik kitosan boncuklar oluşturuldu. Boncuklar TPP çözeltisi içerisinde 4 saat boyunca karıştıktan sonra TPP’den ayrılarak saf su ile yıkandı. Üzerinde bir mikte saf su konularak daha sonra kullanılmak üzere buzdolabında 4°C’de muhafaza edildi.



Şekil 3. 2. CS-Fe₃O₄ Boncuklarının Oluşturulmasının Şematik Gösterimi

3.2.4. Kitosan ve Kompozit Boncukların Karakterizasyonu

İmmobilizasyonda kullanılmak üzere hazırlanan kitosan ve kompozit boncukların IR spektrumları alındı. Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) analizi, bir Perkin Elmer spektrumu BX üzerinde, oda sıcaklığında 4000 cm⁻¹-400 cm⁻¹ tarama ile gerçekleştirildi. Numunelerin IR spektrumu katı KBr pelet hazırlama tekniği ile yapıldı. Analiz edilecek immobilize boncuklar tampondan uzaklaştırılarak kurutuldu. Kurutulan kitosan kompozit boncuklar ezilerek toz haline getirilmiş ve o şekilde

doğrudan analizde kullanıldı. Hazırlanan numunelerin her birinden belli bir miktar alınarak iyice kurutulmuş KBr ile havanda dövülerek toz haline getirilerek iyice karıştırıldı. Karışım paslanmaz çelikten bir cihaz içine konularak hidrolitik preste 200 barlık (3000 psi) bir basınçta birkaç dakika bekletildi ve KBr pelleti elde edildi. İçinde numune olmayan boş KBr pelleti background olarak okutularak hazırlanan numunelerin IR spektrumları alındı. Modifiye kitosan boncuklarının termal gravimetrik analizi, bir Perkin Elmer SII 7300 TGA analizörü ile gerçekleştirildi. Boncukların yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) (XL30-SFEG, FEI / Philips) kullanılarak incelendi. Numunelerin manyetik özellikleri, oda sıcaklığında titreşimli bir örnek manyetometre (Lake Shore VSM) ile incelendi.

Kitosan ve kitosan kompozit boncukların SEM ölçümlerinin yapılabilmesi için boncuklar içerisinde su kalmayacak şekilde iyice kurutuldu. SEM ölçümleri hizmet alımı karşılığında İzmir yüksek teknoloji enstitüsü taramalı elektron mikroskobu kullanılarak gerçekleştirildi. VSM ölçümleri hizmet alımı karşılığında Dokuz Eylül Üniversitesi titreşimli örnek manyetometre kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.4.1. Boncuk boyutu

Yaş ve kuru boncukların ortalama çapı, optik mikroskop kullanılarak belirlendi. Mikroskop merceği, mikrosferin büyüklüğünün belirlenebileceği bir mikrometre ile dolduruldu. Aynı zamanda yaş boncuklar rastgele seçilerek kumpas yardımıyla çapları ölçüldü ve ortalama değerler kıyaslandı.

3.2.4.2. Şişme karakterizasyonu

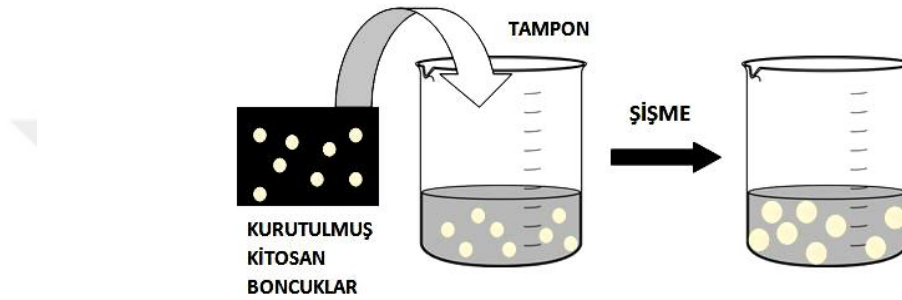
Kitosan ve kompozit boncuklarda şişme etkisini test etmek amacıyla oda koşullarında şişme testleri uygulandı ve boncuklar dikkatli bir şekilde tartılarak zamana karşı farklı pH'taki tampon çözeltiler içerisinde şişmeye bırakıldı. Boncukların çözelti içerisine bırakıldığı zaman $t=0$ olarak belirlenmiş ve belirli zaman aralıklarında(15-120 dk) çözelti içerisinden boncuklar alınarak dış yüzeyindeki fazla sıvı süzgeç kağıdı yardımı ile kurulandı. Sonra boncuklar hassas terazi kullanılarak tartıldı. Zamana bağlı olarak sabit bir kütle değeri elde edilinceye kadar şişme testine devam edildi. Zamana bağlı olarak kütle değişmediği

gözlemlendiğinde şişmenin dengeye geldiği kabul edildi ve deney sonlandırıldı. Şişme derecesini belirlemek için aşağıdaki denklem kullanıldı;

$$\text{Şişme derecesi (\%)} = \frac{W_0 - W}{W_0} \times 100$$

W

Burada W_0 ve W , sırasıyla şişmiş boncukların kütlesi ile kuru boncuk kütlesini temsil etmektedir.



Şekil 3. 3. Kitosan boncukların şişme karakterizasyonu

3.2.4.3. Mekanik özelliklerin belirlenmesi

Kitosan ve manyetik kitosan boncuklarının mekanik mukavemet çalışmaları, bir mekanik karıştırıcı kullanılarak gerçekleştirildi. 50 boncuk ve su (20 ml) 50 ml'lik bir şişeye konuldu ve farklı hızlarda karıştırıldı. 30 dakika sonra parçalar ayrıldı ve boncuklar yeniden numaralandırıldı. Mekanik mukavemet, boncuk sayısındaki kayıp yüzdesine dikkat çekilerek belirlendi. Referans örnekleri ortama konulan tüm boncuk sayısı oldu. Mekanik mukavemeti araştırmak için 0,7-1,0 mm çapında boncuklar seçildi.

3.2.5. Kompozit Boncukların Glutaraldehit ile Aktivasyonu

Hazırlanmış olan manyetik kitosan boncuklardan 1 gram alınarak %4(v/v)'lük 50 ml glutaraldehit ile 4 saat boyunca 40°C 'de muamele edilerek çapraz bağlama gerçekleştirildi. Çapraz bağlama sonrası manyetik boncuklar distile su ile defalarca yıkanarak glutaraldehitten iyice arındırıldı. Boncukların bir kısmı immobilizasyon işlemi için kullanılmak üzere ayrılırken kalan manyetik boncuklar

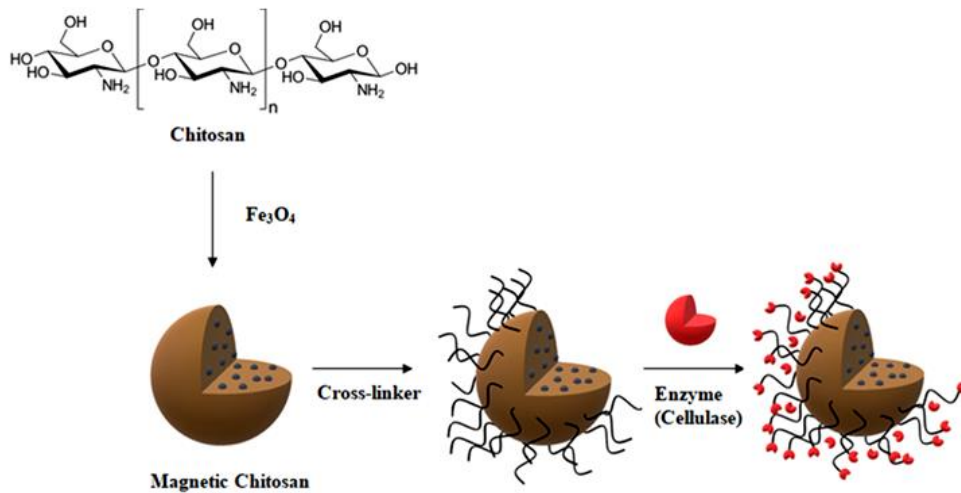
üzerine bir miktar distile su ilave edilerek daha sonra kullanılmak üzere buzdolabında (4°C) muhafaza edildi.

3.2.6. Kompozit Boncukların Genipin ile Aktivasyonu

En iyi genipin konsantrasyonunu belirlemek amacıyla manyetik kitosan boncukları için % 0,05 ile % 1 (w / v) arasında değişen farklı genipin konsantrasyonu kullanıldı. Bir gram manyetik kitosan boncuğu, değişen konsantrasyonlarda genipin ile 15 saat boyunca 150 rpm'de inkübe edildi. Aktivasyon zamanından sonra boncuklar, genipinin fazlalığını gidermek için 0.05 M asetat tamponu (pH 5,0), 1 Molar NaCl ve deiyonize su ile yıkandı ve daha sonra kullanılabilecek kadar deiyonize su içinde 4 ° C' de depolandı.

3.2.7. Kompozit Boncuklara Selülazın İmmobilizasyonu

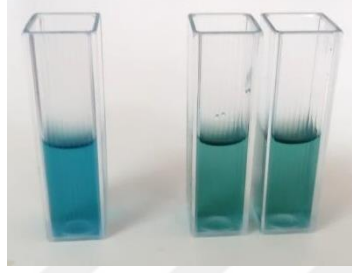
1 mg/ml'lik selülaz çözeltisi 0.05 M pH=5,0 Asetat tamponu kullanılarak hazırlandı. Aktive edilmiş manyetik kitosan boncuklarından 0,5 gram tartılarak üzerine 1 ml enzim çözeltisi konuldu. 4 saat boyunca soğuk ortamda inkübasyona bırakıldı. İmmobilizasyon işlemi sonrası çözelti ve boncuklar birbirinden ayrıldı ve 0,05 M pH=5,0 Asetat tamponu ile yıkanarak serbest enzim çözeltisinden arındırıldı. Kalan filtratta protein ve aktivite ölçümleri yapıldı. Boncuklarda da aktivite ölçümü aynı prosedür takip edilerek yapıldı.



Şekil 3. 4. Enzimin polimer üzerine tutuklanması

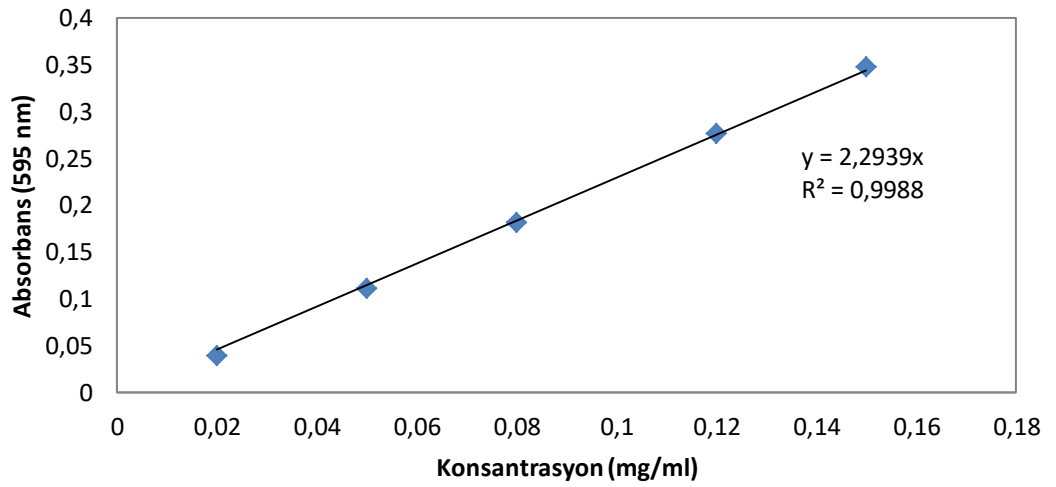
3.2.8. Taşıyıcı Üzerine Bağlanan Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarlarının tayini Bradford yöntemi ile gerçekleştirildi. Bradford tarafından geliştirilen bu yöntemde Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanıldı. Bu yöntem organik boyaların asidik grupları ile proteinlerin bazik gruplarının etkileşerek renk oluşmasını esas almaktadır(Şekil 3.5).



Şekil 3. 5. Bradford yöntemi ile aktivite tayini çalışması

Standart Protein Eğrisi için; sığır serum albüminin (BSA) saf su ile 1 mg/mL'lik çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 0,02-0,20 mg/mL arasında 6 ayrı konsantrasyonda çözeltiler oluşturuldu. Hazırlanan bu protein çözeltilerinden 0,1 mL alınarak ve üzerlerine 2 mL Bradford reaktifi eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk bekletilen örneklerin 595 nm'de spektrofotometrik cihazda ölçümü alındı. Elde edilen absorbans değerlerinin konsantrasyonlara karşı grafiği çizilerek standart protein eğrisi oluşturuldu(Şekil 3. 6.).Bu grafik örneklerin protein içeriklerinin belirlenmesinde kullanıldı.



Şekil 3. 6. Protein Standart Grafiği

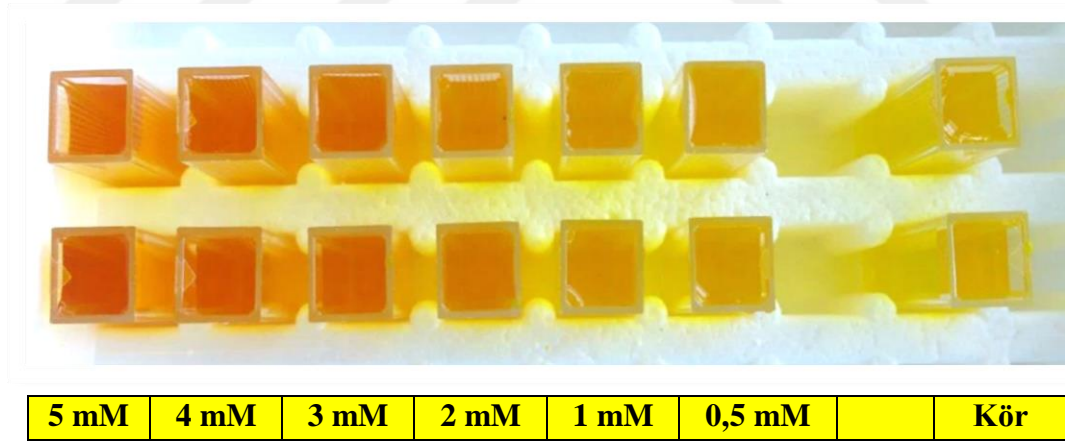
Selülaz enziminin yükleme etkinliğini hesaplamak için başlangıçtaki enzim çözeltisi, immobilizasyon sonrası kalan süpernatant ve immobilizede kullanılan manyetik kitosan boncukların yıkama sıvılarında Bradford yöntemiyle protein tayini yapılmıştır.

$$\% \text{ Yükleme etkinliği} = \frac{C_1V_1 - C_2V_2}{C_1V_1} \times 100$$

burada C_1 ve C_2 , reaksiyon için kullanılan başlangıç protein miktarı ile immobilizasyon sonrası kalan filtratta bulunan protein miktarı, V_1 ortama konan enzim çözeltisinin hacmi, V_2 filtrat hacmidir.

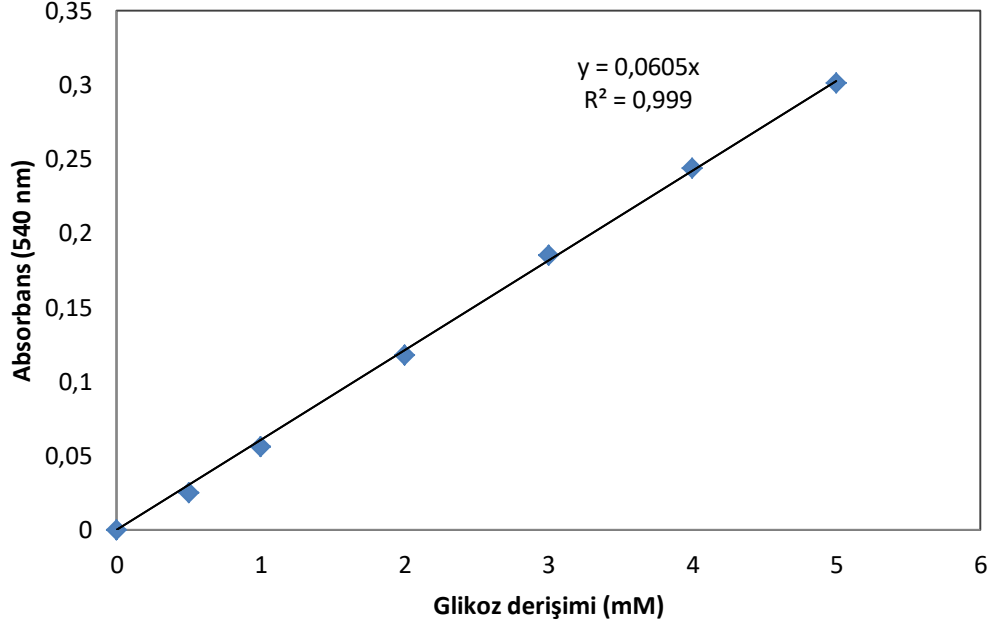
3.2.9. Glikoz Standart Eğrisinin Oluşturulması ve Selülazın Aktivitesinin Belirlenmesi

Glikoz standart eğrisinin oluşturulmasında ilk olarak 0,5-5 mM aralığında 6 ayrı konsantrasyon belirlenip bir seri glikoz standart çözeltisi saf su içerisinde hazırlanan 10 mM stok glikoz çözeltisinden yola çıkılarak hazırlandı (Şekil 3.7).



Şekil 3. 7. DNS yöntemi ile aktivite tayini çalışması

540 nm de alınan absorbans değerleri ile glikoz konsantrasyonları arasında standart grafiği çizildi (Şekil 3. 8). Selülaz aktivitesinin tayininde enzimatik reaksiyon sonunda açığa çıkan glikoz miktarı çizilen standart grafiği kullanılarak hesaplandı.



Şekil 3. 8. Glikoz standart grafiği

Selülaaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik ölçülerle tayin edildi. Aktivite ölçümü için cam tüp içerisindeki reaksiyon ortamına 100 µL selülaaz enzimi(1mg/ml), 0,5 ml CMC-Na substrat çözeltisi(%2'lik) ve 0,4 ml 50 mM (pH 5,0) Asetat tamponu konuldu. Kör olarak 0,5 ml CMC-Na substrat çözeltisi ve 0,5 ml 50 mM (pH 5,0) Asetat tamponu konuldu. Etüvde 50 °C'de, çalkalanarak 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüplerin içerisine 1 ml DNS çözeltisi eklendi ve tüpler kaynar su banyosunda(100°C) 10 dk bekletildi. Daha sonra su banyosundan alınan tüpler soğuk su altında tutularak soğutuldu ve üzerine 10 ml distile su ilave edilerek seyreltilmiş örneğin spektrofotometrede 540 nm'de köre karşı absorbans değeri okundu.

DNS reaktifi glikoz gibi indirgen şekerlerin belirlenmesinde kullanılan kolorimetrik bir metottür. Na-K tartarat içermektedir. Bu tuz çözelti içinde iyon artışını sağlayarak çözünmüş oksijen miktarını azaltır. Fenol, renk oluşum reaksiyonu boyunca oluşan rengin miktarını artırır. Sodyum bisülfid rengin stabilizasyonunu sağlar ve çözeltide çözünmüş oksijenlerin tamamı ile tepkimeye girer. Alkali ortam, DNS ile glikoz ya da diğer indirgen şekerler arasındaki redoks tepkimesi için gereklidir. DNS reaktifi enzim reaksiyonunun sonunda reaksiyonu durdurmak için ortama eklenir. Şekerdeki aldehid gruplarının karboksil gruplarına oksidasyonu ile birlikte 3,5 dinitrosalisilik asit, 3-amino-5- nitrosalisilik asite

indirgenerek renkli bileşik oluşturur[61]. Renk oluşumunun tamamlanması için örnek iyice kaynatılmalıdır.

Aktivite Hesaplaması:

Aktivite (U/ml) = (Abs (540 nm)) / Glikoz standart eğrisinin eğimi) x (1/t) x (V₁/V₂)
x seyreltme oranı

Abs (540 nm): Numunenin 540 nm dalga boyundaki absorbanans değeri

t: Reaksiyon süresi (dakika),

V₁: Reaksiyon hacmi,

V₂: Enzim hacmi

1U/mg taşıyıcı = (U/ml enzim) / (mg taşıyıcı / ml enzim)

İmmobilize selülaz enziminin aktivitesi, g taşıyıcı başına düşen aktivite olarak hesaplandı. Aşağıdaki formüllere göre de immobilizasyon verimi ve geri kazanılan aktivite değerleri yüzde olarak hesaplandı.

$$\text{İmmobilizasyon Verimi (\%)} = \frac{U_{\text{total}} - U_{\text{kalan}}}{U_{\text{total}}} \times 100$$

$$\text{Geri Kazanılan Aktivite (\%)} = \frac{\text{Total immobilize enzim aktivitesi}}{\text{Serbest Enzim Aktivitesi}} \times 100$$

3.2.10. Serbest ve İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu

3.2.10.1. Optimum Sıcaklık ve Termal Stabilité

Selülaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerlerinin belirlenmesi için 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C sıcaklıklarda enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerlerinde (pH:5,0), 0,1 ml enzim, 0,5 ml substrat (%2) ve 0,4 ml asetat tamponu ile 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda enzim substrat karışımına eşit hacimde DNS çözeltisi eklenerek 10 dakika kaynatma işlemi uygulandı ve spektrofotometrede köre karşı ölçüldü. Köre eşit hacimde 0,5 ml substrat (%2) ve 0,5 ml asetat tamponu (pH:5,0) karışımı kullanılarak hazırlandı. En yüksek absorbanans değerinin ölçüldüğü sıcaklık değeri 100 kabul edilerek diğer

sıcaklık değerlerinden elde edilen sonuçlar ise bu yüksek sonuca göre oranlanarak bağıl aktiviteler hesaplandı.

Serbest ve genipin ile glutaraldehit ile aktive edilmiş kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen selülozın termal kararlılığını incelemek amacı ile serbest enzim ve immobilize enzim 40-70 °C’de aralığındaki sıcaklıklarda tutularak 15 dk ile 120 dakika arasında 15’er dakika aralıklarla ölçümler alınarak yukarıda belirtilen yöntemle göre aktiviteleri tayin edildi. Serbest ve immobilize selüloz formlarının her ikisi için aktivasyon enerjisi(Ea), Arrhenius denklemi kullanılarak $\log v$ (yüzde aktivitenin logaritması) ve T^{-1} (K)(Kelvin cinsinden sıcaklığın tersi) arasındaki eğiminden ortaya çıkan eşitlik kullanılarak belirlendi:

$$\text{Eğim} = \frac{-E_a}{R}$$

Selüloz aktivitesi ile ilgili termodinamik parametreler, termal stabilite profilinden elde edilen verilerden belirlendi. Selüloz aktivitesinin termal inaktivasyon sabiti(k_d) ve yarı ömürleri ($t_{1/2}$) 40-70 °C’de aralığındaki sıcaklıklarda araştırıldı. Geri kazanılan aktivite 0. dakikada %100 kabul edilmiş ve diğer dakikalardaki değerle buna göre hesaplandı. Elde edilen sonuçlar birinci dereceden termal deaktivasyon sabiti(k_d) ve yarı ömür süreleri ($t_{1/2}$) aynı zamanda da D değerleri (sabit bir sıcaklıktaki selüloz aktivitesinin %90’ını inaktive etmek için gereken süre) araştırılan her bir sıcaklık için hesaplandı. Bu deneysel noktalar aşağıdaki denklemlere göre hesaplandı:

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

Burada A ısı işlem sonrası t (dk) süre sonundaki kalan aktivite, A_0 ise başlangıç aktivitesi ve k_d termal inaktivasyon hızı sabiti (dk^{-1})’dir.

Selülozın yarı ömrü ($t_{1/2}$, dk^{-1}) eşitlikten hesaplandı:

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

D değeri aşağıdaki eşitlikten hesaplandı:

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

3.2.10.2. Optimum pH

Selülazın boncuklar üzerine immobilizasyonunda ortamın pH'mın etkisini incelemek üzere 0,05 M olacak şekilde bir seri farklı pH'larda tampon çözeltiler hazırlandı. Kullanılan tamponlar sırasıyla pH: 3,0-5,0 asetat tamponu; pH: 6,0 sitrat tamponu; pH: 7,0 fosfat tamponu; pH: 8,0-9,0 Tris-HCl tamponudur. Farklı pH değerlerinde hazırlanan 1 mg/mL selülaz çözeltisi kitosan ve kitosan kompozit boncuklar üzerine eklendive optimum koşullarda inkübe edilerek boncuk üzerine tutuklanan selülaz miktarları hesaplandı.

Aktivite tayini için 0,1 mL enzim, 0,5 mL substrat ve 0,4 ml fosfat tamponu cam tüpte 50°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda enzim substrat karışımına toplam hacim(1 ml) kadar DNS ayırıcı eklenerek, 10 dakika kaynar suda bekletildi, soğutma işleminden sonra 540 nm dalga boyunda UV visible spektrofotometre kullanılarak, köre karşı absorbans değerleri kaydedildi. Kör, eşit hacimde substrat ve DNS karışımı kullanılarak hazırlandı. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değeri baz alınarak % bağıl aktivite hesaplandı. Her test üç seri tüpün ortalaması alınarak, en az üç kez tekrarlandı. Serbest ve immobilize enzim için aynı uygulama gerçekleştirildi.

3.2.10.3. Enzim Kinetiği

Michael-Menten sabiti (K_M) ve maksimum hız (V_{max}) serbest ve immobilize edilmiş selülaz için substrat olarak CMC-Na kullanılarak sodyum asetat tamponu(pH 5,0) içinde 2-12 mg ml⁻¹ arasında farklı konsantrasyonlar aralığındaki değerlerle 50 ° C'lik sıcaklıkta belirlendi. Bu deneylerde aynı miktarlarda serbest ve immobilize enzimler (aktivite açısından) kullanıldı. K_M ve V_{max} değerlerini hesaplanması Lineweaver ve Burk (1934) yöntemiyle gerçekleştirildi.

3.2.10.4. Depolama Kararlılığı

Depo kararlılığı uzun süre saklama durumunda aktivite kaybının bir ölçüsü olarak nitelendirilmektedir. Bu süre içinde enzimin katalitik potansiyelinden yararlanılmaz. Çalışmada kullanılan serbest ve immobilize selülden bir kısmı ayrılarak depolama kararlılığının tespit edilmesinde kullanıldı. Bu amaçla serbest ve immobilize enzimler +4 °C' de 3 ay süreyle muhafaza edildi ve bu 3 ay içinde standart ölçüm koşullarında (pH 5,0, 50°C), periyodik aralıklarla aktivitelerindeki değişim gözlemlendi.

3.2.10.5. Serbest ve İmmobilize Selülaz Aktivitesi Üzerine Bazı Aktivatör ve İnhibitörlerin Etkisi

Selülaz enziminin aktivitesi üzerine bazı aktivatör ve inhibitörlerin etkisinin araştırılması amacıyla serbest ve immobilize enzim üzerine Tween20 (% 1), Tween 80 (% 1), SDS (% 1 w/v), Triton X- 100 (% 1 v/v), EDTA (5 mM), CaCl₂ (5 mM), MgCl₂ (5 mM), KCl (5 mM), ZnCl₂ (5 mM) , NaCl (% 10), Na-Sülfid (5mM) eklenerek 50°C'de 1 saat ön inkübasyon işlemi uygulandı ve ön inkübasyon işleminden sonra standart aktivite tayini yapıldı. Standart aktivite tayini ile elde edilen sonuç %100 kabul edilip elde edilen sonuçlarla kıyaslanarak geri kazanılan enzim aktivitesi saptandı.

3.2.10.6. Tekrar Kullanılabilirlik

Genipin ve glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan ve kitosan kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen selülazın tekrar kullanım sayısını ölçmek amacı ile belli bir miktar alınan immobilize enzim örneğinin başlangıç aktivitesi tayin edildi. Reaksiyon sonrası kullanılan immobilize enzim yıkanarak aynı prosedürle arka arkaya karşı aktivite ölçümü yapıldı. Enzimin başlangıçtaki aktivitesi 100 olarak kabul edilerek kalan aktivite % bağıl aktivite şeklinde hesaplandı ve bu sayede immobilize enzimin hem ticari substrat olan CMC-Na hem de lignoselülozik atıkların hidrolizinde tekrar kullanılabilirliği incelendi.

3.2.11. Kompozit Boncuklar Üzerine İmmobilize Edilen Selülaz ile Selülozik Atıkların Sakkarifikasyonu

Alkali hidrolizinden sonra elde edilen selülozik atıklardan 25 mg alınarak 300 mg immobilize boncuk (~2 U/300 mg boncuk) ve 8 ml 0,05 M pH:5,0 asetat tamponu

ilave edildi. 50°C’de farklı saatlerde örnekler alınarak indirgen şeker miktarı hesaplandı.

$$\text{Sakkarifikasyon (\%)} = \frac{\text{İndirgen şeker miktarı(mg/ml)} * 0,9 * 100}{\text{Substrat(mg/ml)}}$$

0,9→ Düzeltme faktörü

3.2.11.1. Selülozik Atıkların Ön İşlemden Geçirilmesi, Lignin, Hemiselüloz ve Selüloz Miktarlarının Belirlenmesi

Hidroliz için kullanılacak olan selülozik atıklar küçük parçalara bölünerek blenderdan geçirildi. İyice toz haline getirilen atıklar -63 µm’luk elekten geçirilen ve elde edilen tozlar farklı konsantrasyonlardaki sodyum hidroksit(NaOH) (%w/v 0,5, 1,0, 1,5, 2) ile 1 saat muamele edilerek ön işleme tabi tutuldu. Çözelti sıcaklığı 80°C,100°C ve 120°C’de tutularak deneyler tekrarlandı. Ön işlem sonrası katı faz süzgeç kağıdından süzülerek ayrıldı. Süzgeç kağıdında kalan kısım pH değeri 7,0 olana kadar deiyonize su ile yıkama işlemine tabi tutuldu. Daha sonra 70°C’de etüvde kurutularak buzlukta -24°C’de enzimatik hidroliz için saklandı. NaOH ile muamele sonrası lignoselülozik atıkların selüloz ve hemiselüloz miktarı hesaplandı.

Seçilen lignoselülozik atıkların lignin, selüloz ve hemiselüloz miktarının saptanabilmesi için toz haline getirildikten sonra numunelerden 0,1 g alınarak üzerine 250 ml % 72’lik H₂SO₄ ilave edildi ve 24 saat beklemeye bırakıldı. Süre sonunda üzerine 400 ml deiyonize su ilave edildi ve 2 saat kaynatıldı. İşlem sonunda kalıntı pH nötr olana kadar yıkanıp 70°C’de kurutuldu ve tartıldı. Hem asit hidrolizi hemde alkali hidroliz sonucu bulunan lignin, selüloz ve hemiselüloz değerleri karşılaştırıldı.

3.2.11.2. Selülozik Atıkların Sakkarifikasyonunu Etkileyen Faktörler

3.2.11.2. 1. Sakkarifikasyon Üzerine NaOH Konsantrasyonunun Etkisi

Sakkarifikasyon işleminde selülozik atıkların sakkarifikasyon verimini arttıracak optimum NaOH aralığını belirlemek amacıyla, NaOH %w/v 0,5- 1-1,5- 2 aralığında çalışıldı. Sakkarifikasyon işlemi sonrası açığa çıkan indirgen şeker hesabı yapılarak elde edilen şeker verimine göre ön işlem için optimum NaOH yüzdesi belirlendi.

3.2.11.2.2. Sakkarifikasyon Üzerine pH Etkisi

Sakkarifikasyon işleminde ortam pH'nın etkisini incelemek amacıyla, selülazın enziminin optimum pH aralığını kapsayan, 0.05 M olacak pH 3.0-7.0 aralığında çalışıldı. Sakkarifikasyon işlemi sonrası açığa çıkan indirgen şeker hesabı yapılarak elde edilen şeker verimine göre optimum pH belirlendi.

3.2.11.2.3. Sakkarifikasyon Üzerine Sıcaklık Etkisi

Sakkarifikasyon işleminde ortam sıcaklığının etkisini incelemek amacıyla, selülazın enziminin optimum sıcaklık aralığını kapsayan, optimum pH'da 30-40-50-60-70°C aralığında çalışılmıştır. Sakkarifikasyon işlemi sonrası açığa çıkan indirgen şeker hesabı yapılarak elde edilen şeker verimine göre optimum sıcaklık belirlenmiştir.

3.2.11.2.4. Sakkarifikasyon Üzerine Reaksiyon Süresinin Etkisi

Yapılan çalışmada sakkarifikasyon verimi üzerine reaksiyon süresinin etkisi araştırıldı. Çalışmalarda 8, 18, 24, 48 ve 72 saat sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarı hesaplanarak sakkarifikasyon işlemi için optimum reaksiyon süresi belirlendi.

3.2.11.2.5. Sakkarifikasyonda Kullanılan İmmobilize Selülazın Tekrar Kullanılabilirliği

İmmobilize edilen selülazın sakkarifikasyonda tekrar kullanım sayısını ölçmek amacı ile belli bir miktar alınan immobilize enzim örneğinin başlangıç aktivitesi tayin edildi. Reaksiyon sonrası kullanılan immobilize enzim yıkanmış CMC substratına karşı aktivite ölçümü yapıldı. Aynı boncuklar bir sonraki sakkarifikasyon çalışmasında kullanıldı ve prosedür bu şekilde tekrarlandı. Enzimin başlangıçtaki aktivitesi 100 olarak kabul edilerek kalan aktivite % geri kazanılan enzim aktivitesi şeklinde hesaplandı ve bu sayede immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği incelendi.

3.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler

TPP Çözeltisi: 10 gr Tiamin pirofosfat (TPP) 400 ml distile su içerisinde çözdürülmüştür. Daha sonra 1 N HCl ile pH'ı 8.2 olacak şekilde pH ayarlaması

yapıldı. 500 ml'ye tamamlanıp pH'ı dengelendi. Pet şişe içerisinde konularak buzdolabında (4°C) muhafaza edildi.

%1'lik Glikoz Çözeltisi: 0.05 gr glikoz monohidrat 5 ml 0.05 M (pH=5.0) asetat tamponu içerisinde çözülerek hazırlandı.

%1'lik DNS Çözeltisi: 1.98 gr NaOH(sodyum hidroksit) 141.6 ml distile su içerisinde içerisinde çözülürdü. Üzerine 1 g 3,5-Dinitrosalisilik asit ilave edilmiş ve iyice çözünme gerçekleşene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Çözünme gerçekleştikten sonra çözeltiliye sırasıyla 30 gr Rachele tuzu(Na-K Tartarat), 0.76 ml Fenol(50°C'de sıvılaştırılarak) ve 0.83 gr sodyum metabisülfid ilave edildi. Bir süre karıştırıldıktan sonra çözelti aktivite ölçümlerinde kullanılmak üzere koyu renkli reaktif şişelerine konuldu ve o şekilde muhafaza edildi.

Bradford Reaktifi: 40 mg Coomassie Brilliant Blue, 50 ml %95 lik etanolde çözülüp, karıştırıcıda 1 saat karanlık kalacak şekilde karıştırıldı. Daha sonra üzerine 55 ml o-fosforik asit eklendi ve 30 dk boyunca karıştırılıp üzeri saf su ile 1 litreye tamamlandı.

Genipin Çözeltisi: Genipin (%98'lik) 1 ml etanol içerisinde karanlık ortamda 10 dk karıştırıldı ve daha sonra total hacmi 50 ml olacak şekilde üzerine 20 mM pH:7,0 Tris-HCl tamponu ilave edildi.

Tampon Çözeltiler:

50 mM Asetat Tamponu (pH:4,0 ve pH:5,0): 50 mM sodyum asetat ve 50 mM asetik asit çözeltileri ile ayrı pH değerlerinde hazırlandı.

50 mM Fosfat Tamponu (pH:6,0 ve pH:7,0): 50 mM K_2HPO_4 ve 50 mM K_2HPO_4 çözeltileri ile ayrı pH değerlerinde hazırlandı.

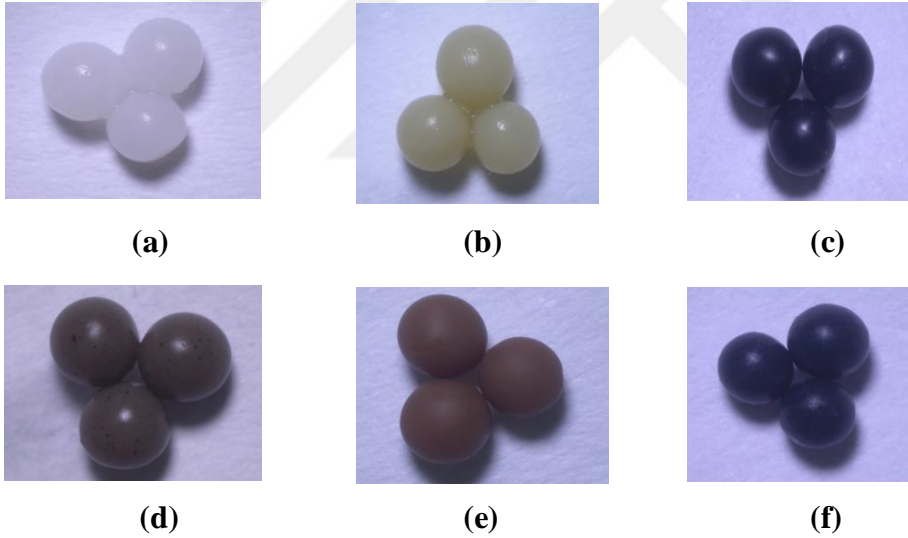
50 mM Tris-HCl Tamponu (pH:8.0 ve pH:9.0): 50 mM Tris(hidroksimetil) aminometan ve 0,1 M HCl çözeltileri ile ayrı pH değerlerinde hazırlandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Tez kapsamında hedeflenen genipin ve glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan kompozit boncuklarının sentezleri başarıyla gerçekleştirilmiş olup sentezlenen boncukların karakterizasyon çalışmalarında: FT-IR, XRD, SEM ve VSM gibi spektroskopik yöntemlerden yararlanıldı.

4.1. Kompozit Boncukların Karakterizasyonu

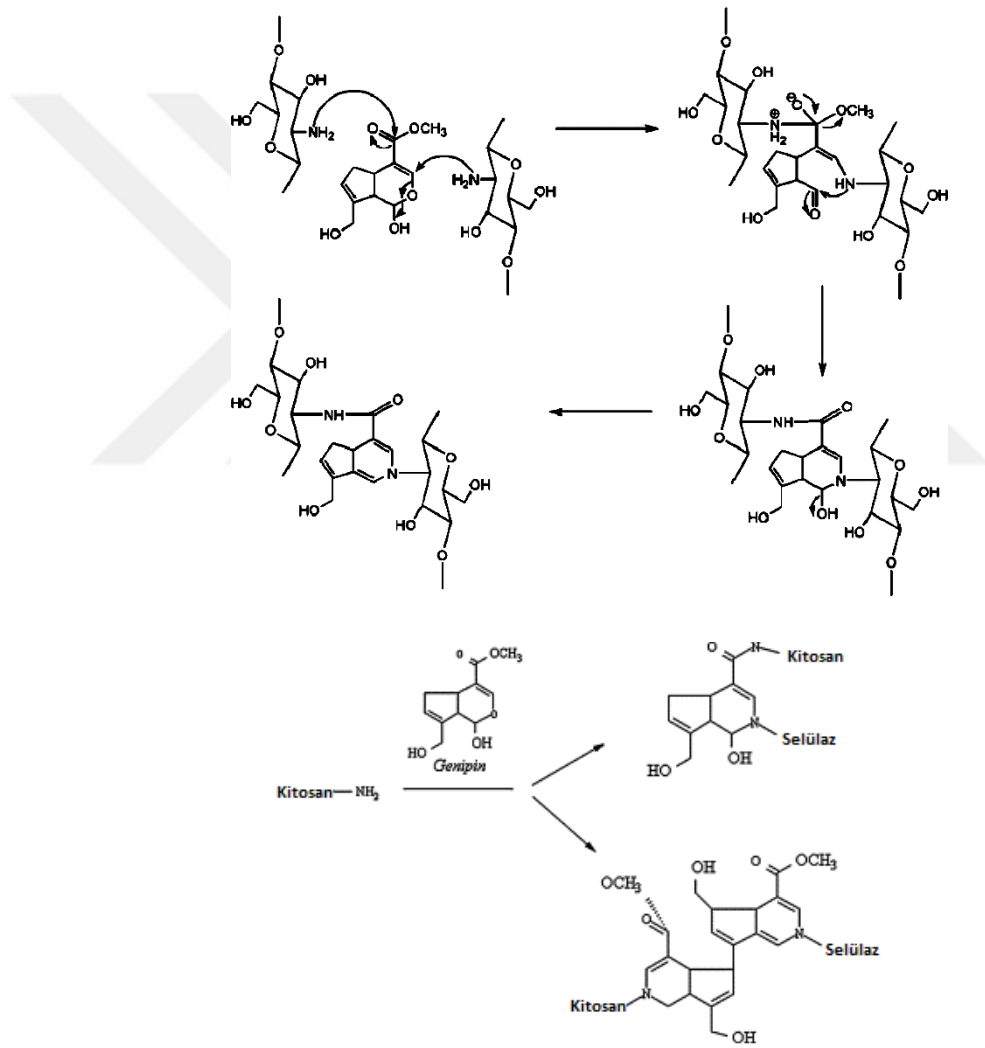
Kitosan ve kompozit boncukların mikroskopik fotoğrafları Şekil. 4.1'de gösterilmektedir. Kitosanın genipin ile çapraz bağlanması sonucu, açık sarıdan koyu maviye doğru boncuk rengindeki değişiklikler gözlemlendi (Şekil 4.1.). Bu farklı renkler, genipinin, kitosan amino grupları ile çapraz bağlanma reaksiyonunu ortaya koymaktadır. Mavi renk, kitosanın genipin ile reaksiyonunda oluşan tersiyer amin[61] ile ilgilidir[62].



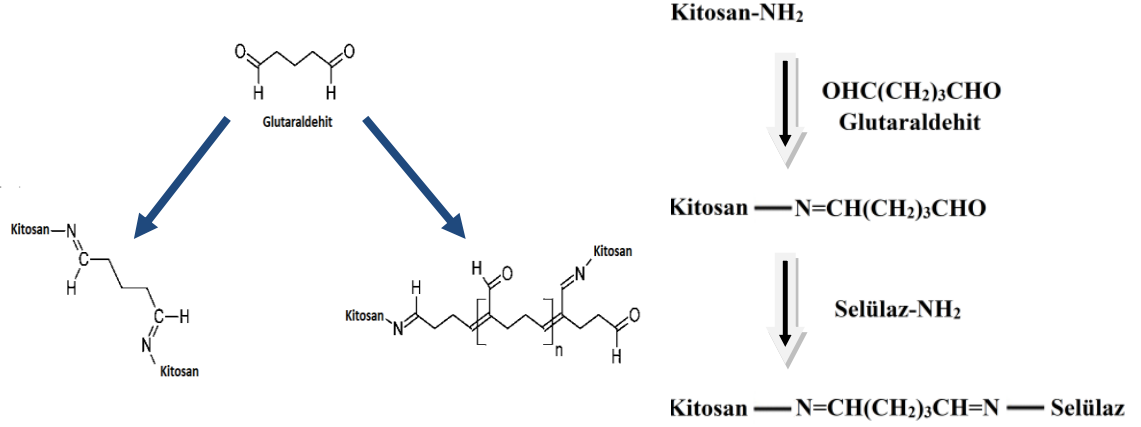
Şekil 4. 1. Kitosan kompozit boncuklara ait mikroskopik fotoğraflar CS (a), GA-CS (b), GP-CS (c) ile CS-Fe₃O₄ (d), GA-CS-Fe₃O₄ (e) ve GP-CS-Fe₃O₄ (f)

Reddy ve ark., (2015) tarafından Şekil 4.2'de gösterildiği gibi, genipin çapraz bağlı kitosanın mekanizmasına dayalı olarak kitosan boncuk aktivasyonunun varsayımsal bir planı önerilmiştir. Bu çalışmada genipinin, formiloksi gruplarına sahip doğal bir çapraz bağlama reaktifi olduğu ve aktivasyondan sonra, formiloksi grupları, ultrasonografi ve inkübasyon kullanılarak bir uzaysal ızgara matrisi oluşturmak için kitosan molekülleri üzerindeki amino gruplarına kovalent olarak

bağlandığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada kitosan boncuk yüzeyindeki amino radikalleri, peptit bağları oluşturmak için enzim moleküllerinin karboksil grupları ile reaksiyona girdiği ve sonuç olarak, selülazın çapraz-bağlayıcı genipin tarafından aşılınmış kitosan boncuklar içinde hapsedildiği belirtilmiştir[63]. **Şekil 4.3.**'de ise kitosanın glutaraldehit ile çapraz bağlanma reaksiyonunun şeması verilmiştir. Bi ve ark., (2011) yaptıkları çalışmada genipin ile çapraz bağlandıktan sonra, parçacıkların, genipinin oksijen radikalının yol açtığı polimerizasyonuna bağlı olarak koyu maviye döndüğünü bildirmişler ve çapraz bağlanmamış kitosanın aksine asit pH çözeltilerine karşı dirençli olduklarını göstermişlerdir[64].



Şekil 4. 2. Kitosanın, genipin ile olası çapraz bağlanma ve selülaz immobilizasyon reaksiyonunun şeması

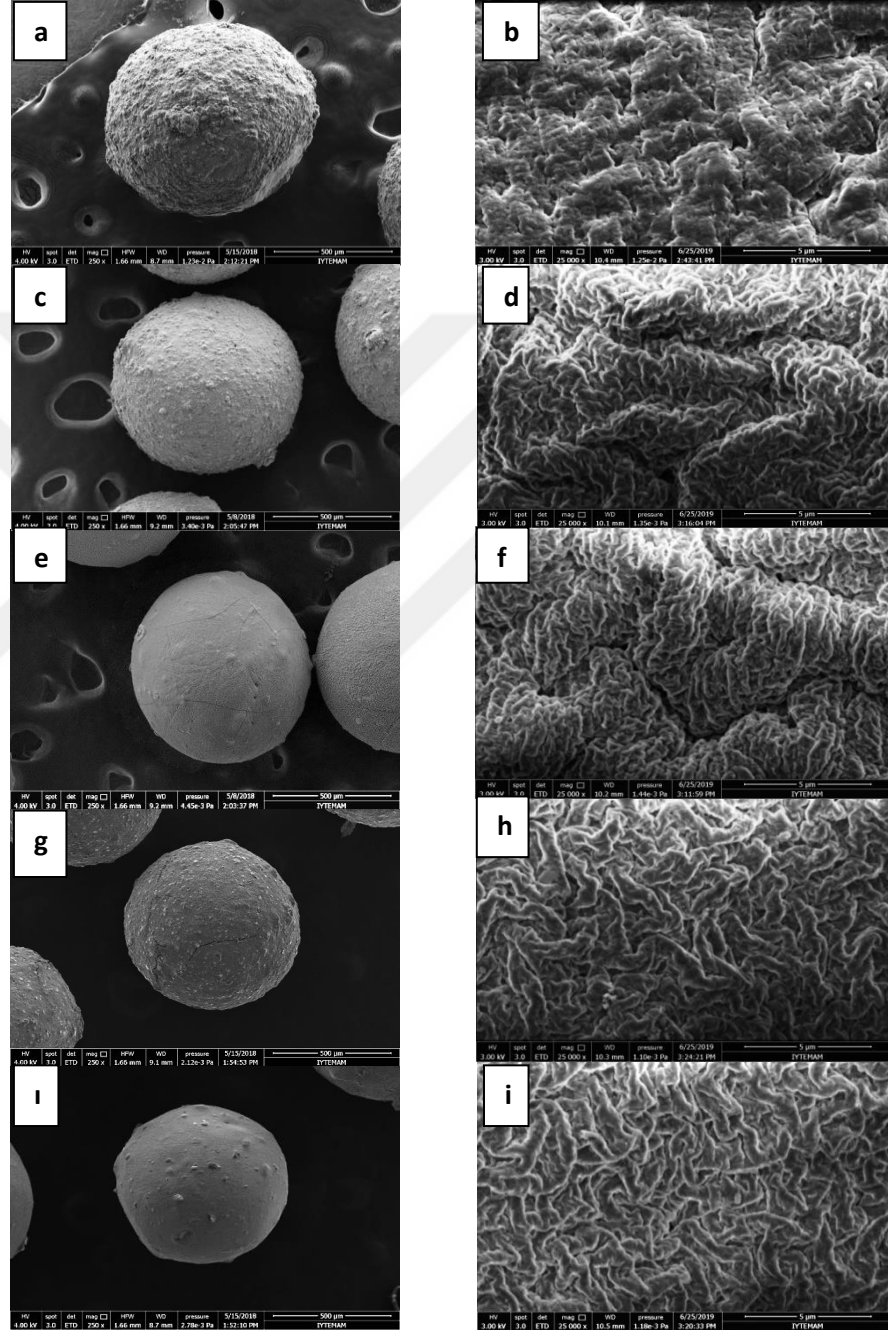


Şekil 4. 3. Kitosanın, monomerik ve polimerik glutaraldehit formları ile olası çapraz bağlanma ve selülazın immobilizasyon reaksiyonunun şeması

Çalışmamızda kitosan için kuru ve yaş boncukların ortalama çaplarının sırasıyla $0,76 \pm 0,04$ mm ve $1,08 \pm 0,02$ mm olduğu gözlemlendi. Yapılan çalışmalar esnasında genipin ve glutaraldehit ile aktive edilen kitosan boncukların aktivasyon işlemi sonrası daha sıkılaştığı ve küçüldüğü belirlendi. Genipin ve glutaraldehit ile aktive edilen yaş boncukların ortalama çaplarının sırasıyla $0,57 \pm 0,02$ ve $1,00 \pm 0,03$ şeklinde değiştiği görüldü. İmmobilizasyon öncesi depo edilen yaş boncukların immobilizasyon işlemi sonrası çaplarında bir değişiklik gerçekleşmedi. Xu ve ark., (2013) ve Dinçer ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmalarda benzer morfolojik görüntüler kitosan kompozitleri üzerinde incelenmiştir. A.Srinatha ve ark (2008) iyonik çapraz bağlı kitosan boncukları üzerine yaptıkları çalışmada ıslak boncuklar boyutlarının $2,08 \pm 0,51 - 2,31 \pm 0,24$ mm arasında kuru boncukların boyutunu ise $0,60 \pm 0,09 - 0,70 \pm 0,03$ mm olarak bildirmişlerdir.[65].

Kitosan, genipin ve glutaraldehit ile çapraz bağlı kitosan boncukların SEM görüntüleri **Şekil 4.4.**'de görülmektedir. SEM görüntüleri çapraz bağlanmamış, genipin ve glutaraldehit ile çapraz bağlı kitosan boncukların yüzeylerini göstermektedir. 25000 kat büyütme SEM görüntülerinde boş kitosan boncuklarının yüzey morfolojisinin derin olmayan girinti çıkıntılar sergilediği bunun aksine kompozit boncukların daha girintili ve çıkıntılı ve boş kitosandan daha farklı bir yapı sergilediği görüldü. Aktive edilmiş kompozit boncukların morfolojileri kıyaslandığında ise GA-CS-Fe₃O₄ ve GP-CS-Fe₃O₄ kompozit boncukların üzerindeki girinti çıkıntılarının GA-CS ve GP-CS boncuklarının yüzey morfolojisinden farklı

olarak daha kalın fakat benzer morfolojide olduğu belirlendi. İda İdayu Muhamad ve ark.(2011) yapmış oldukları çalışma ile doğal boncukların yüzeyinin düzensiz ve pürüzlü ay benzeri bir yüzey olduğunu, bunun aksine çapraz bağlanmış boncukların yüzeyi daha küresel bir şekil sergilediğini ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonu arttıkça pürüzsüz hale geldiğini bildirmişlerdir[66].



Şekil 4.4. SEM görüntüleri doğal CS boncuklar (a:250x, b:25,000×), GA-CS boncuklar(c:250x, d:25,000×), GA-CS-Fe₃O₄ boncuklar (e:250x, f:25,000×), GP-CS boncuklar (g:250x, h:25,000×), GP-CS-Fe₃O₄ boncuklar (i:250x, i:25,000×).

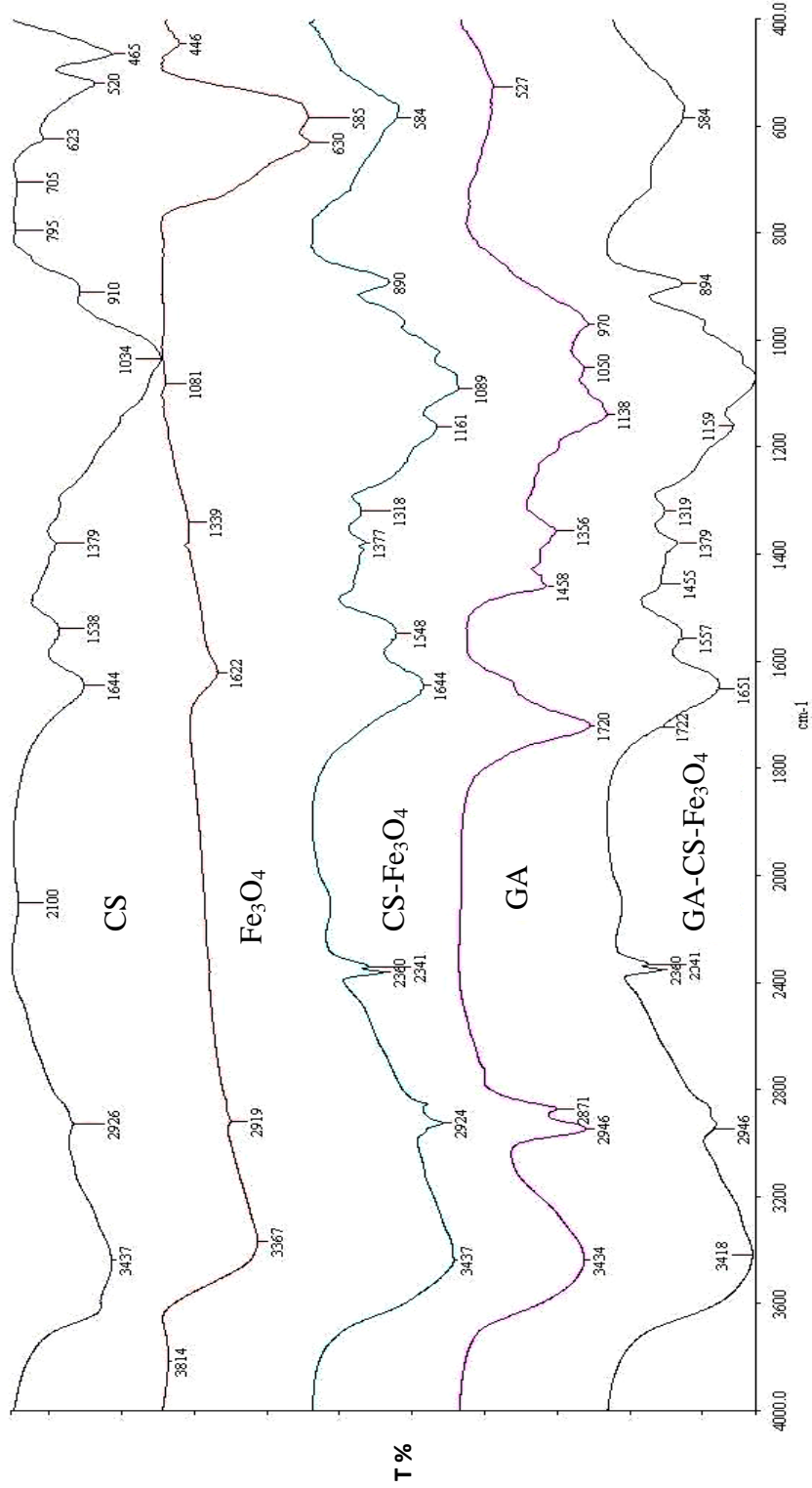
FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) analizi, moleküllerin yaymış olduğu ya da soğurmuş olduğu elektromanyetik ışınımları inceleyen moleküler spektroskopisidir. Bu yöntem ile, moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak katı, sıvı, gaz veya çözelti halindeki organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar, iki bileşiğin aynı olup olmadığı, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik ya da alifatik olup olmadığı belirlenebilmektedir. İnfrared spektroskopisinde, deneysel çalışma sırasında en önemli nokta spektrumun yorumlanması ile ilgili kısımdır. Spektrumun yorumlanması kabaca ortaya çıkan bandların moleküldeki hangi atom gruplarından kaynaklandığının belirlenmesi noktasındadır. İnfrared spektrumlar, uzak İnfrared (20-400 cm^{-1}), orta İnfrared (400-4000 cm^{-1}) ve yakın İnfrared (4000-12500 cm^{-1}) olmak üzere üç temel bölgede incelenir.

Genipin ve glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan kompozit boncukların FTIR spektrumları **Şekil 4. 5.**'de görülmektedir. Kitosan için IR spektrumu değerlendirildiğinde Kitosan'ın 3437 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bandı, O-H ve su gerilme titreşimlerinin bir sonucu olarak oldukça yoğundur. Buradaki O-H gerilme titreşimi N-H uzama titreşimi ve polisakkaritin yapısındaki molekül içi hidrojen bağlanmaları nedeniyle ortaya çıkmaktadır. 2926 cm^{-1} 'deki bant C-H gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. 1644 ve 1379 cm^{-1} 'deki bantlar, birincil aminlerden N-H bağlarının orta yoğunluğunun deformasyon titreşimine ve CH_3 grubunun C-H bağlarından düşük yoğunluğuna bağlanabilir. Fe_3O_4 'ün IR spektrumuna bakıldığında 585 cm^{-1} 'deki bant Fe-O titreşimini, 1622 cm^{-1} 'deki bant NH_2 grubunu temsil ettiği söylenebilir. 1622 cm^{-1} 'deki bant NH_2 'nin karakteristik bandı, sadece manyetit partiküllerinde gözlenmektedir. NH_2 grubu, sudan gelen OH titreşimi tarafından olası bir engellemeden dolayı 3400 cm^{-1} 'de olası NH titreşimi görülmemesi söz konusu olabilir.

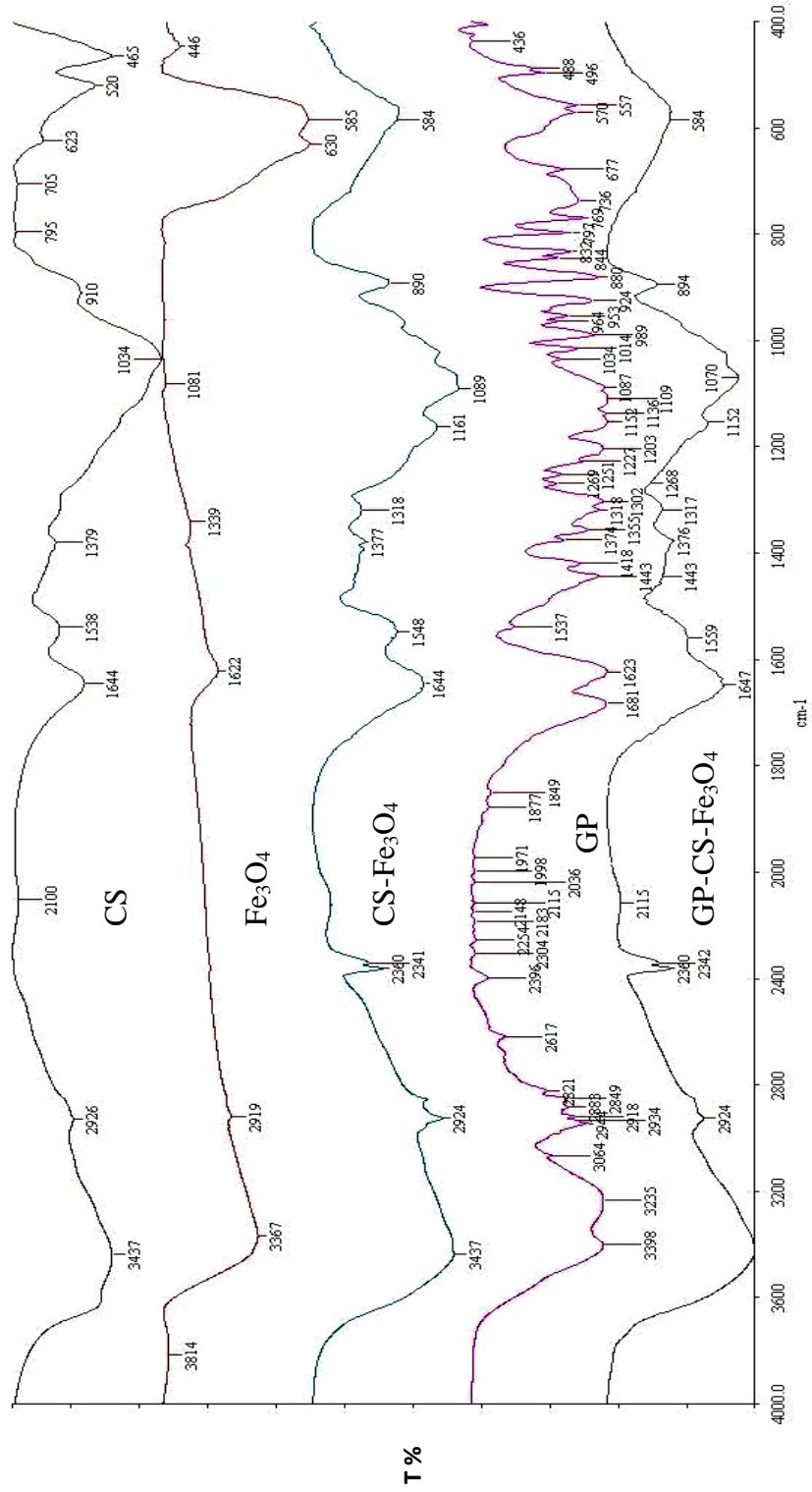
Fe_3O_4 'e ait olan FT-IR sonuçları literatürde incelenmiş ve birebir sonuçlar gözlenmiştir. $\approx 585 \text{ cm}^{-1}$ 'de bulunan Fe-O titreşimine ait pik, $\approx 1622 \text{ cm}^{-1}$ Fe_3O_4 'ün yüzeyine adsorplanan COO^- , $\approx 3367 \text{ cm}^{-1}$ 'de OH gerilmelerine ait piktir.

Jie Long ve ark.(2014), yapmış oldukları çalışmada 580 cm^{-1} civarında bulunan karakteristik tepe noktasının, Fe_3O_4 'ün FeO bağının titreşimlerine ait

olduğunu, 3400 cm^{-1} civarında tepe noktaları, NH_2 ve OH gruplarının germe titreşimine karşılık geldiğini ve $1068, 1080, 1381$ ve 1399 cm^{-1} 'deki tepe noktası CO bükme titreşimini temsil ettiğini bildirmişlerdir[67].



Şekil 4. 5a. Kitosan ve Kompozit Boncukların IR Spektrumlarının karşılaştırılması



Şekil 4. 5b. Kitosan ve Kompozit Boncukların IR Spektrumlarının karşılaştırılması

Genipinin ile kitosanın çapraz bağlanmasından sonra 1268, 1443 ve 1647 cm^{-1} seviyelerinde ek tepe noktalarını ortaya çıkmıştır. Bunlar sırasıyla, COC asimetrik gerilmesine ve metil esterin CH_3 bükülmesine ve $\text{C} = \text{C}$ halkasının gerilmesini ifade eder ve genipin ile muamele edilen biyopolimerlerle ilgili diğer FTIR çalışmaları ile uyumludur. Bu özellikler, genipinin karboksimetil grubunun, literatüre göre sekonder bir amid oluşturmak üzere amino grubu olan kitosan ile reaksiyona girdiğine işaret

etmektedir. Kitosan kompozit bocuklarda gösterilen FT-IR spektrumunda, 584 cm^{-1} 'de ortaya çıkan Fe-O gerilme titreşimi, manyetik bileşenin yapıdaki varlığını göstermektedir. Karakteristik bantların yoğunluğundaki artış, genipin ile reaksiyona giren amino gruplarının artışına göre tahmin edilir ve bu da, grupların çapraz bağlamadan amid bağlantıları olarak artmasına katkıda bulunur.

1159 cm^{-1} 'deki bant, kitosana kovalent olarak bağlanan çapraz bağlı genipin nitrojen iridoidin üçüncül aromatik amininin C-N gerilmesine aittir. Dahası, çapraz bağlı spektrumdaki 1070 cm^{-1} 'deki bant, saf genipinin spektrumundaki karşılık gelen banttan (1087 cm^{-1} 'deki banta göre) önemli ölçüde daha güçlüdür, bu da bu emilim bandının çoğunlukla çoğunlukla çapraz bağlanma sonucu oluşan modlarla ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

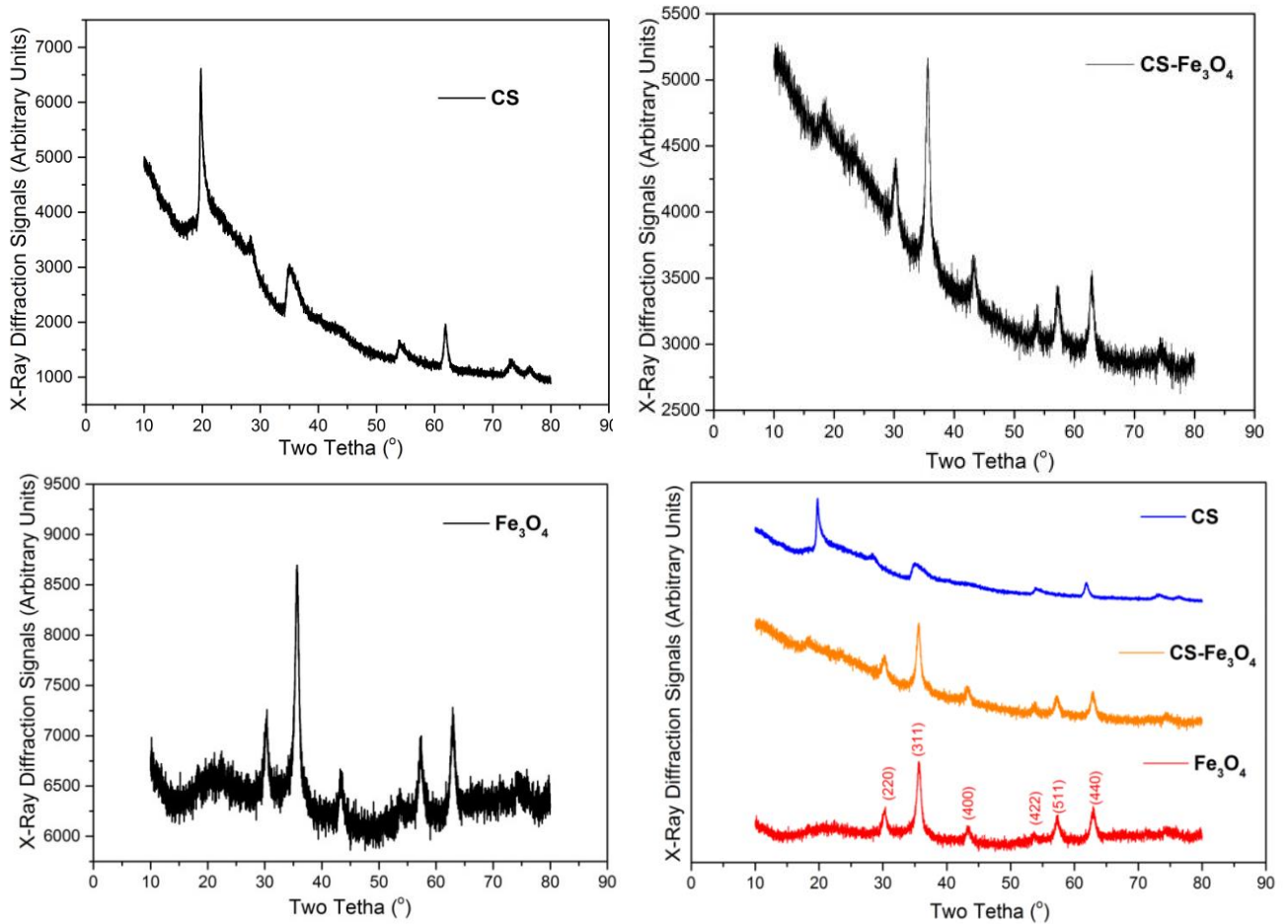
Glutaraldehit ile kitosanın çapraz bağlanmasından sonra ise bant 1559 cm^{-1} 'de (amide II), bantının ortaya çıktığı görüldü fakat kitosanda bu banta rastlanılmadı. Glutaraldehit ile aktive edilen kitosan boncuklara ait FTIR spektrumu, 3437 cm^{-1} 'de N – H ve O – H germe titreşiminin 3418 cm^{-1} 'e kaydığını, 2926 cm^{-1} 'de CH_3 simetrik gerilmenin 2946 cm^{-1} 'e kaydığını görüldü. Bin Li ve ark.(2013) glutaraldehit ile çapraz bağlı kitosanın sentezi, karakterizasyonu ve antibakteriyel aktivitesi üzerine yapmış oldukları çalışmada elde ettikleri veriler sonuçlarımızı destekler niteliktedir[68].

Adriana Marisol Rangel-Rodríguez ve ark.(2014), yaptıkları çalışma ile genipin ve kitosanın 1653 ve 892 cm^{-1} 'de absorpsiyon bandının, genipin konsantrasyonuna bağlı olarak yoğunluğunda bir artış olduğunu bildirmişler ve bu bölgelerde, genipin ve kitosan arasındaki etkileşimin mevcut olduğunu bildirmişlerdir[69]. Bu sonuçlar çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir.

Manuela P. Klein ve ark.(2015), yaptıkları çalışmada genipin ile çapraz bağlama sonrası, 1546 cm^{-1} 'deki amid II bandı, NH deformasyonun karakteristiğinin, muhtemelen genipin ester ve hidroksil gruplar ve kitosan aminogrupları arasındaki reaksiyonun bir sonucu olarak ikincil amidlerin oluşmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir. 1633 cm^{-1} 'deki pik, sekonder amidlerde CO uzamasına bağlanmıştır. Ayrıca, zirvelerde yaklaşık 1400 cm^{-1} ve 1000 cm^{-1} 'de gözlemlenen piklerin, sırasıyla

C-N germe titreşimleri ve C-OH germe titreşimlerinden kaynaklandığını bu piklerin genipin ile çapraz bağlanma sonrası daha belirgin bir şekilde gözlemlendiğini bildirmişlerdir[70].

Kitosan ve kitosan kompozit boncuklarının XRD spektrumları **Şekil 4.6.**'da gösterilmektedir. Kitosana ait olan X-Ray difaktogramında kristal bir yapı sergilediği ve CS-Fe₃O₄ boncuklarının XRD spektrumunun Fe₃O₄ parçacıklarının, X-ışını kırınım spektrumuyla birebir örtüştüğü görülmektedir. Bu nedenle, kitosan ile kaplanmasına rağmen, manyetik boncuklar faz değişimi olmaksızın Fe₃O₄'ün doğal kristal yapılarını hala koruduklarını göstermiştir.

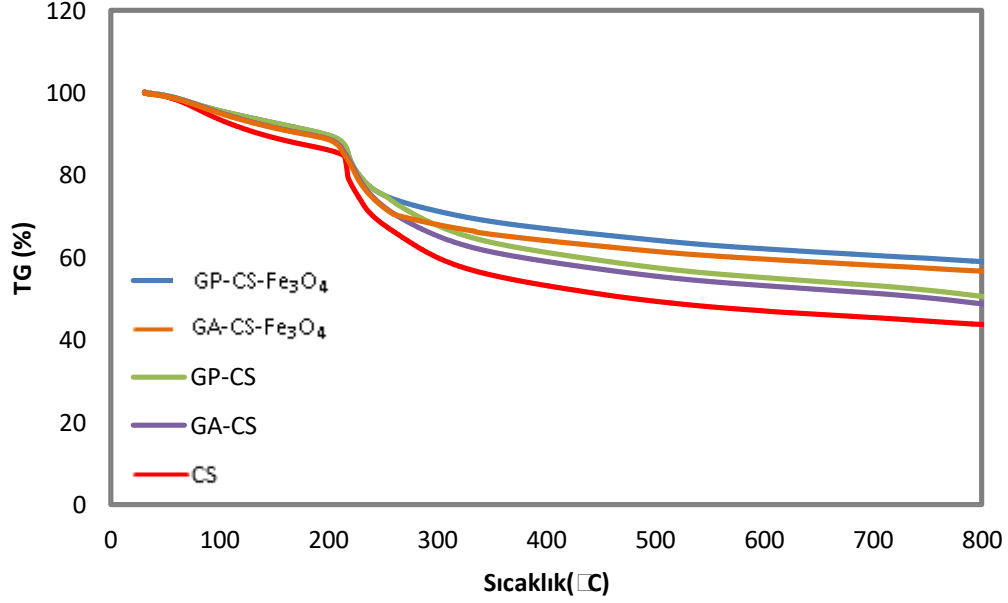


Şekil 4. 6. Kitosan ve kitosan kompozit boncukların XRD spektrumları

Kitosan ile karşılaştırıldığında Fe₃O₄ ile modifiye edilmiş kitosanın 20.0° difraktogramı pik yoğunluğunda ve pik genişliğinde bazı değişiklikler göstermiştir. Kitosanın yapısı, Fe₃O₄ komplekslerini omurgasına sabitleyerek büyük ölçüde değişime uğramıştır. Yanqing Wang ve ark.(2016), yaptıkları çalışmada kitosanın

difraktogramının 10.0° ve 20.1° iki ana tepe noktasından oluştuğunu göstermişlerdir[71]. $2\theta=10.0^\circ$ ve $2\theta=20.09^\circ$ pikleri için Li ve ark.(2013), çalışmalarında kitosanın XRD sonuçlarına göre kristal yapıda olduğunu bildirmişlerdir.[72], Arcaryulu ve ark.(2013) ise kitosan için yarı krisal yapıda olduğunu rapor etmişlerdir. Haldorl ve ark.(2013) kitosana ait XRD kırınımında 19.77° deki geniş pikin polimerin amorf yapısını gösterdiğini ifade etmişlerdir. Zang ve ark.(2014), yaptıkları çalışmada Fe_3O_4 için $2\theta=30.1^\circ$, 35.4° , 43.1° , 53.2° , 56.9° ve 62.5° 'de altı karakteristik tepe noktası olduğunu ((220), (311), (400), (422), (511) ve (440)) bildirmişlerdir. Bu karakteristik zirvelerin her ikisi de Fe_3O_4 ve CS- Fe_3O_4 partiküllerinde gözlemlediklerini ve Toz Kırınım Standartları Komitesi veri tabanında JCPDS-ICDD 2005 ve JCPDS 65-3107 ile iyi uyum içinde olduğunu belirtmişler ve özellikle, 35.43° 'teki karakteristik zirvenin varlığını, Fe_3O_4 ve CS- Fe_3O_4 nanopartiküllerinin her ikisi de bulunan Fe_3O_4 'ün spinel yapısının oluşumunu temsil ettiğinin üzerinde durmuşlardır[73]. Qikun Zhang ve ark.(2016), yaptıkları çalışmada Fe_3O_4 nanoparçacıkları $2\theta = 30.40^\circ$, 35.80° , 43.60° , 53.70° , 57.20° ve 62.70° 'de birbirinden ayrılmış kristalimsi zirvelere sahip olduğunu göstermişler, Fe_3O_4 ve Fe_3O_4 ile oluşturdukları biyokatalizörlerin XRD desenlerinin standart manyetit tarafından gösterilen desenle tutarlı olduğunu bildirmişlerdir[74].

TGA çeşitli organik ve inorganik esaslı maddelerin bozunma sıcaklıkları, nem içeriğini saptamak için kullanılan faydalı bir tekniktir. Kitosan ve kitosan kompozit kompozit boncukların termal ayrışması termogravimetrik analiz kullanılarak incelendi ve sonuçlar **Şekil 4.7.**'de gösterildi.

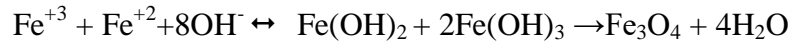


Şekil 4. 7. Glutaraldehit ve genipin çapraz bağlı boncukların kompozit boncukların TGA eğrileri

Tüm termal ayrışma profilleri, biri 100°C'den başlayıp diğeri 230°C'de olmak üzere iki ana aşama göstermektedir. 800°C'de glutaraldehit ve genipin ile çapraz bağlı manyetik kitosan boncukların kütle kaybı sırasıyla % 44 ve % 42 olduğu görüldü. 800°C'de glutaraldehit ve genipin ile çapraz bağlı kitosan boncukları için ise kütle kaybı sırasıyla % 52 ve % 51 olduğu görüldü. Çapraz bağlanmamış kitosan boncuklarda ise 800°C'de %57'lik kütle kaybı gözlemlendi. Finisie ve ark. (2001) ve Flores-Hernández ve ark. (2014), kitosandan 200-300°C'de gözlemlenen kütle kaybının muhtemelen polimerik bileşenin ayrışmasına ve eliminasyonuna karşılık geldiğini bildirmişlerdir[75,76]. Kitosanda kütle kaybının yüksek sıcaklıklarda manyetik kitosandan daha yüksek olduğu görülmektedir. Kitosana manyetik taneciklerin eklenmesi, kitosan ile karşılaştırıldığında, bozunmaya karşı genellikle daha dirençli hale getirmektedir. Bu sonuçlar Zhao ve ark. (2010), dördüncü zirvenin sıcaklığının 712°C kadar yüksek olduğunu ve kütle kaybının yüzdesinin yaklaşık % 5.8 olduğunu bildirmiştir, ki bu Fe₃O₄'ten FeO'ya faz geçişinden kaynaklanmaktadır, çünkü FeO termodinamik olarak kararlıdır[77]. Kompozit boncuklar ile kitosanın TGA eğrileri karşılaştırıldığında kompozit boncukların daha fazla termal stabiliteye sahip olduğu görülmektedir.

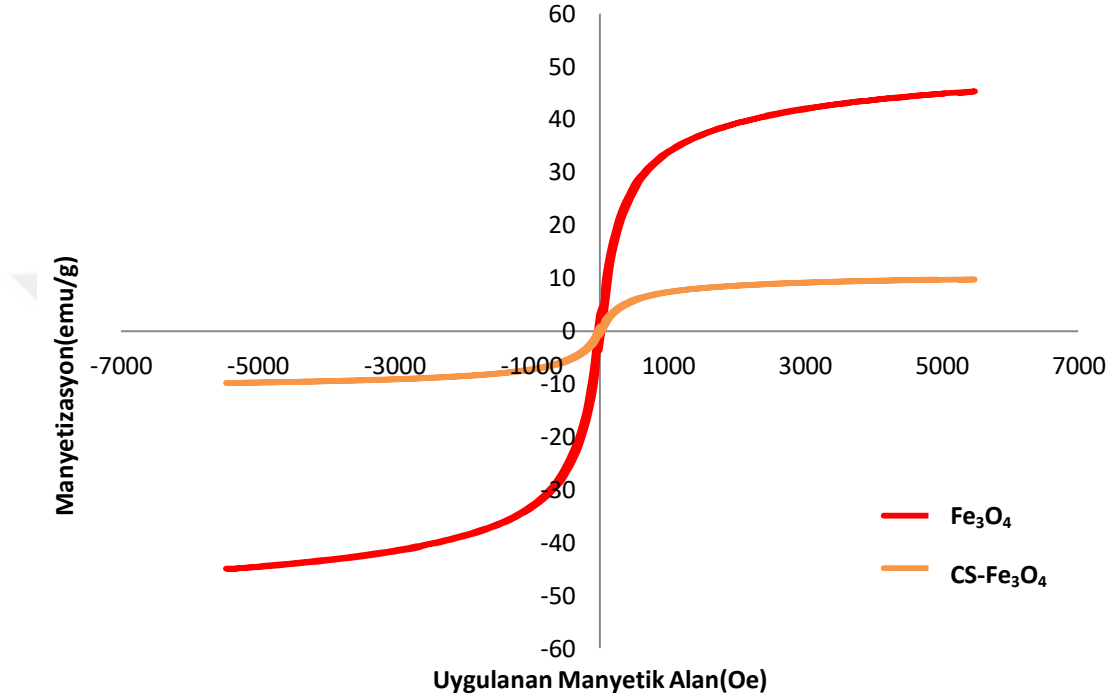
Acharyulu ve ark.(2013), kitosanın TGA spektrumunun %65'nin 840°C civarında bozunduğunu ve çalışma sonucunda kalan kitosanın %35,07'sinin tortu benzeri formda geri kaldığını rapor etmişlerdir. Shouman ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada kitosanın 100°C'ye kadar olan sıcaklık aralığında kütle kaybının %5,26 gibi düşük oranda olmasını nemin uzaklaştırılması nedeniyle olduğunu, 216-316 °C civarındaki ikinci aşamada %24,5'lük kütle kaybının depolimerizasyon reaksiyonlarından kaynaklandığını bildirmişlerdir. Ayrıca 316-600°C arasındaki sıcaklıkta ise %10,08'lik bir kütle kaybı olduğunu tespit etmişlerdir. El-Hefian ve ark.(2010) yaptıkları çalışmada TGA eğrisinde kitosanın 2 basamakta kütle kaybı gösterdiğini, birinci basamakta 30 ile 145°C arasında nemin buharlaşması nedeniyle %5'lik kütle kaybının olduğunu, ikinci basamağın ise yaklaşık 150°C civarında başladığına ve %47 kütle kaybının olduğunu belirtmişlerdir ve bu kaybın kitosanın dekompozisyonundan kaynaklandığını rapor etmişlerdir. Çalışmaları sonucunda 500°C'de toplam kütle kaybının %52 olduğunu belirtmişlerdir[78]. Arsalani ve ark. (2010) çalışmalarında Fe₃O₄'ün TGA eğrisinde toplamda %3,2'lik olarak görülen kütle kaybının absorbe edilen fiziksel ve kimyasal suyun uzaklaştırılması nedeniyle olduğunu bildirmişlerdir[79]. Mohammadi ve ark.(2013) tarafından Fe₃O₄'ün TGA eğrisinde görülen ilk kütle kaybının, 250 °C'den az bir sıcaklıkta fiziksel olarak absorbe edilen suyun uzaklaşması nedeniyle, ikinci kütle kaybının ise sentezi sırasında Fe₃O₄ nanopatikülünün yüzeyine absorbe olan hidroksil gruplarından kaynaklandığı rapor edilmiştir[80].

CS-Fe₃O₄ boncukların hazırlanmasında sentezlenen manyetit parçacıkları Fe⁺²:Fe⁺³ kasyonlarının sulu ortamda kuvvetli bir bazla çöktürülmesi reaksiyonu sonucu elde edilmektedir. Gerçekleşen bu reaksiyonun prensibi aşağıdaki gibidir:



Çalışmamızda sentezlenmiş olan Fe₃O₄ ve CS- Fe₃O₄ kompozit boncuklarının manyetik alan şiddetinin değişim eğrisi **Şekil 4. 8.**'de gösterilmiştir. Manyetometri cihazı ile alınan ölçümler sonucunda sentezlenmiş Fe₃O₄ ve CS- Fe₃O₄ boncuklarının 298K 'de manyetizasyon doygunluğunun sırasıyla 45.31 emu g⁻¹ ve 9.77 emu g⁻¹ olduğu görüldü. Fe₃O₄ ve CS- Fe₃O₄ kompozit boncuklarına ait histerisis eğrileri yumuşak (soft) manyetik malzeme olduklarını gösteren "S" şeklinde tipik bir eğri

oluşturmaktadır. Bu durum aynı zamanda yapıda süperparamanyetik özellik gösteren parçacıkların varlığını da kanıtlamaktadır. Superparamanyetik malzemelerin uygulanan manyetik alana tepkileri, manyetik alan kaldırıldıktan sonra herhangi bir manyetizasyon kalıntısı olmaması şeklindedir. Bu davranış manyetik hedef taşıyıcıları için önemli bir özelliktir.



Şekil 4. 8. Fe₃O₄ ve CS- Fe₃O₄ boncuklarına ait VSM histerisis eğrileri

Ali Nemati ve ark.(2017), Fe₃O₄ ZnO-TiO₂ nanopartikülleriyle işlevselleştirilmiş grafen oksitin nanokompozitinin sentezi ve karakterizasyonu adlı çalışmalarında Fe₃O₄'ün manyetizasyon doygunluğunu 40.96 emu g⁻¹ olarak bildirmişlerdir[81]. Mohammad Ali Ghasemzadeh ve ark.(2015) yapmış oldukları çalışmada sentezledikleri Fe₃O₄'ün manyetizasyon doygunluğunu 47.12 emu g⁻¹ olarak bildirmişlerdir[82]. Retno Rahmawati ve ark.(2017), Koprepipitasyon-Ultrasonik Işınlama Yöntemleri Kullanılarak Manyetit Nanopartiküllerinin Sentezi İçin Frekans ve Karıştırma Hızının Optimizasyonu adlı çalışmada Fe₃O₄'ün manyetizasyon doygunluğunu 25 emu/gram olarak bildirmişlerdir[83]. Roberto Valenzuela ve arkadaşları(2016) yaptıkları çalışmada Fe₃O₄'ün manyetizasyon doygunluğu(Ms) 72.0 emu g⁻¹ kaplanmış manyetik nanopatikülün 55.9 emu g⁻¹ olarak

bildirmişlerdir[84]. Xu ve arkadaşları(2013) yaptıkları çalışmada Fe_3O_4 ' ün manyetizasyon doygunluğu(Ms) 47.90 emu g^{-1} ve silanlanmış manyetik nanopatikülün manyetizasyon doygunluğu ise 33.00 emu g^{-1} olarak bulduklarını bildirmişlerdir[85]. Wang ve arkadaşları(2013) ise yaptıkları çalışmada Fe_3O_4 ' ün manyetizasyon doygunluğunu 71.9 emu g^{-1} olarak tespit etmişler ve yüksek manyetizasyon doygunluğunun iyi bir kristal yapı sergilediğini belirtmişlerdir[86]. Liu ve arkadaşları(2012) immobilizasyon çalışmalarındaki kullanılan karbon temelli manyetik kompozitin manyetizasyon doygunluğunun 4.1 emu g^{-1} olduğu ve bu manyetizasyon değerinin dışarıdan bir manyetik alan uygulandığı takdirde, materyalin sulu çözelti ortamından kolaylıkla ayrılmasına olanak sağlaması açısından yeterli olduğunu rapor etmişlerdir. Qikun Zhang ve arkadaşları(2016) yaptıkları çalışmada Fe_3O_4 nanopatiküllerin kütle doygunluğu manyetizasyonu(Ms) 71.96 emu g^{-1} olduğunu ve nanopatiküllerin süperparamanyetik davranış sergilediğini belirtmişlerdir. APTS ve enzim ile kaplandıktan sonra parçacıkların manyetizasyon doygunluğunun 71.96 'dan 54.74 emu g^{-1} 'ye (APTS- Fe_3O_4 için) ve 48.81 emu g^{-1} 'ye (biyokatalizör için) düştüğünü bildirmişlerdir[87].

Yapmış olduğumuz çalışmada sentezlediğimiz CS- Fe_3O_4 kompozit boncukların emu değeri (9.77 emu g^{-1}) ile oda sıcaklığında dışarıdan bir manyetik alan uygulandığında boncukların çözelti ortamından kolaylıkla ayrılabilceği **Şekil 4.9.**'da gösterildi.

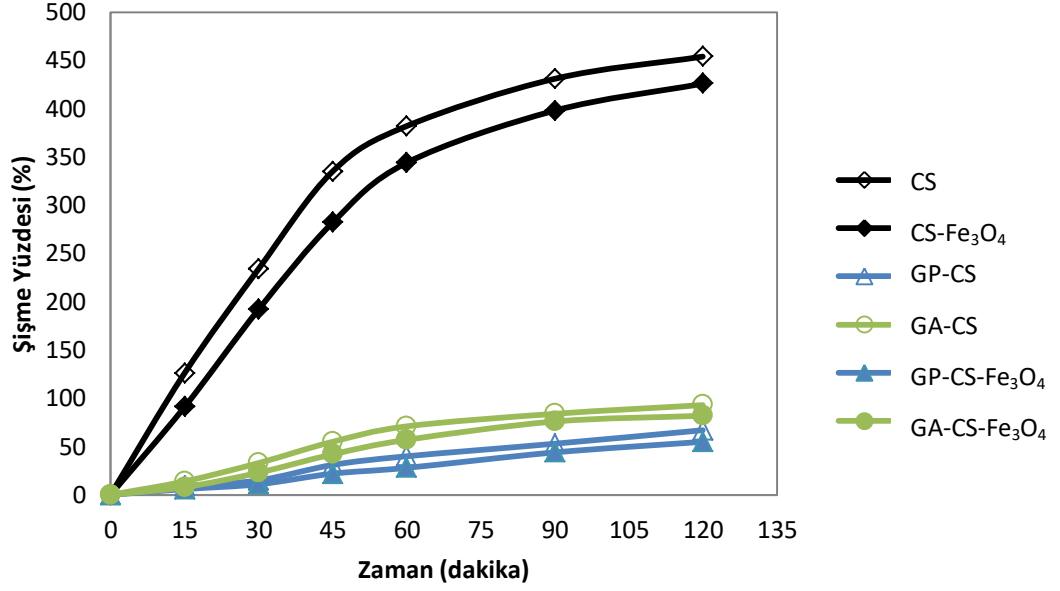


Şekil 4. 9. CS- Fe_3O_4 boncuklarının dış manyetik alana maruz kalmadan önceki(a) ve sonraki(b) durumu

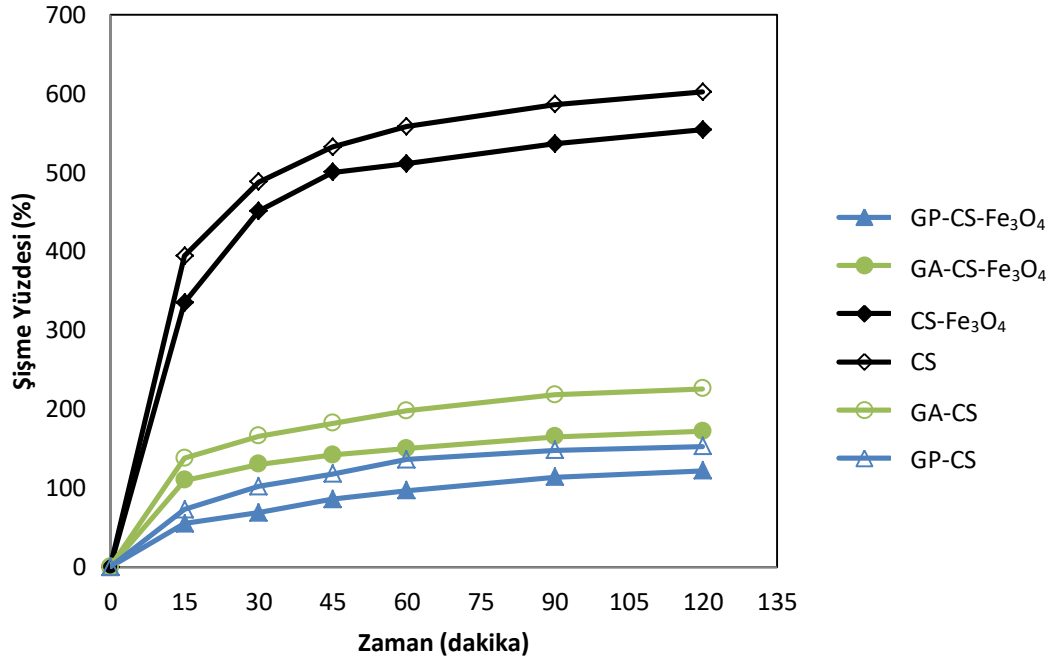
İmmobilize enzimlerin reaksiyon ortamından kolaylıkla uzaklaştırılabilmesine ve tekrar kullanılabilmesine olanak sağlaması ve bu sayede büyük bir avantaj kazandırması nedeniyle manyetik taşıyıcılara yönelik çalışmalar büyük önem kazanmıştır. Manyetik boncukların kullanımı enzim immobilizasyonu açısından da çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Bunlar arasında yüzey etkinliği açısından daha fazla spesifik yüzey alanı sağlaması, daha az kütle transferi direnci ve daha az kirlenmenin gerçekleşmesi, manyetik alan altında immobilize enzimlerin daha seçici olarak ayrılması ve bu sayede daha düşük işlem maliyetinin sağlanması ve enzim katalizli tepkimeler için sürekli sistemlerde uygulamanın gerçekleştirilmesine olanak tanınması yer almaktadır.

Şişme çalışmaları, boncukların hidrasyon derecesi ve dolaylı olarak enzimi çevreleyen hidrofilik ortamın derecesi hakkında bilgi vermektedir. Şişme davranışı, polimerik taşıyıcı için kritik bir sorundur çünkü emilen su ağ yapısını tahrip edebilir ve daha sonra immobilize enzimin stabilitesini azaltabilir. Farklı genipin ve glutaraldehit konsantrasyonları ile aktive edilen boncukların şişme kapasitesi **Şekil 4.10**'da gösterilmiştir. Tüm boncukların şişirme kapasitesi karşılaştırıldığında, genipin ile aktive edilen taneciklerin her iki pH değerinde glutaraldehit ile aktive edilmiş taneciklerden daha az şiştiği tespit edildi. Boncukların her iki ortamdaki şişme oranını karşılaştırdığımızda, boncukların asidik ortama göre pH 7.0 ortamında daha yüksek şişme derecesi sergilediği görüldü. Doğal polimer bazlı malzemelerin şişme kapasitesi, test ortamının iyonik gücünden etkilenebilmektedir. Ayrıca çalışmalar, artan genipin ve glutaraldehit konsantrasyonu ile şişme oranının azaldığını göstermektedir(**Şekil 4.11**). Genipin konsantrasyonunun artmasının, artan çapraz bağlama derecesine bağlı olarak malzemenin artan hidrofilitesini ile ilişkili olan, yapının şişme kapasitesinin azalmasıyla sonuçlandığı gösterilmiştir. Manyetik boncuklar ve manyetik olmayan boncuklarla karşılaştırıldığında, manyetik boncukların daha az şişme gösterdiği gözlenmiştir. Liu ve diğ. kitosan üzerinde hidroperoksidaz liyaz enziminin kovalent immobilizasyon çalışmalarında benzer sonuçlar elde etmişlerdir. N.Saifuddin ve ark.(2010) kitosan üzerinde moleküler baskılamayla ilgili yaptıkları çalışmada kitosan tanecikleri ve çapraz bağlı kitosan tanecikleri arasındaki şişme yüzdelerinde meydana gelen değişimi, çapraz bağlamanın kitosan taneciklerinin fiziksel gücünü arttırdığına yorumlamış ve çapraz

bağlama sonrası boncukların sertlik ve kimyasal stabilitesinin arttığını buna bağlı olarak daha az şişme gösterdiklerini rapor etmişlerdir[88].

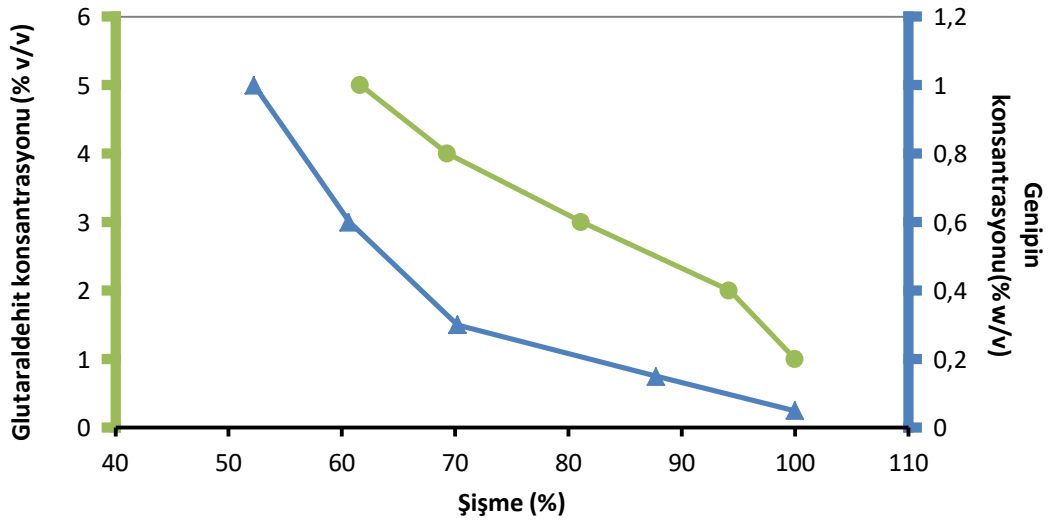


a)



b)

Şekil 4. 10. Kitosan ve Kompozit boncukların a)pH 5,0 ve b)pH 7,0'de şişme grafiği (Konsantrasyon; genipin:% 0.6 w/v, glutaraldehit %4 v/v)



Şekil 4. 11. Kompozit boncukların GP (% w/v) ve GA (% v/v) konsantrasyonuna bağlı olarak pH 5.0’de sergiledikleri şişme grafiği(Süresi:120 dakika)

Çapraz bağlanmış kitosan ve kompozit boncuklar için, kimyasal çapraz bağlanma nedeniyle geliştirilmiş mekanik kararlılık, artan gözenekliliğin neden olduğu engellemeden daha güçlü olmaktadır. Bu nedenle artan genipin ve glutaraldehit konsantrasyonları ile birlikte artan bir mekanik kararlılık gözlemlendi.

Tablo 4.1. Kitosan kompozit boncukları için mekanik kararlılık tablosu

Boncuk Tipi	Hasar gören boncuk yüzdesi için karıştırma hızları			
	600	800	1200	1500
Kitosan boncuklar	8	22	30	44
Manyetik kitosan boncuklar	4	10	18	23
Genipin(0,6% w/v) – Kitosan boncuklar	0	2	6	12
Genipin(0,05% w/v) – Manyetik kitosan boncuklar	0	6	10	16
Genipin(0,6% w/v) – Manyetik kitosan boncuklar	0	0	2	8
Glutaraldehit(4% v/v) – Kitosan boncuklar	0	4	10	16
Glutaraldehit(4% v/v) – Manyetik kitosan boncuklar	0	0	6	10

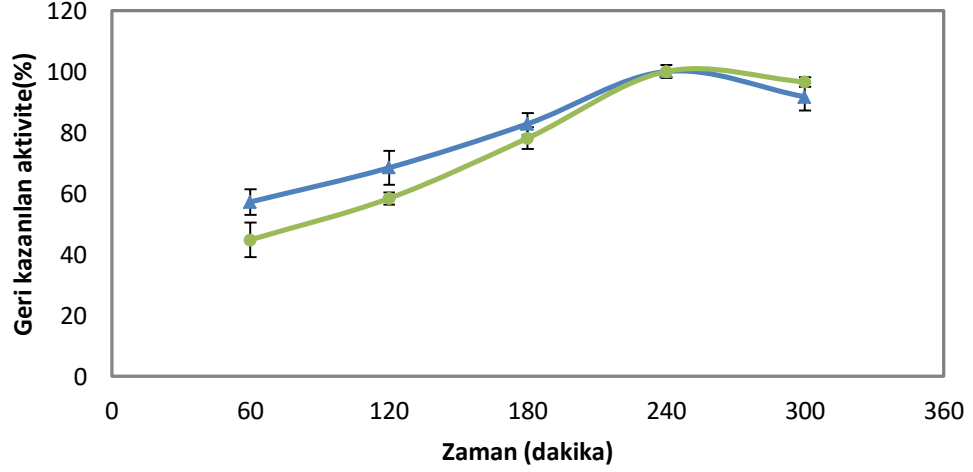
Glutaraldehit ve genipin ile aktive edilen boncuklardaki kararlılık karşılaştırıldığında genipin ile aktive edilen boncuklarda mekanik kararlılığın daha

iyi olduđu sonucuna ulařıldı. Bununla beraber çapraz bađlanmayan boncuklar çapraz bađlı boncuklarla kıyaslandıđında daha dűřuk mekanik kararlılık sergiledikleri gűrűlmektedir(**Tablo 4.1.**). Mi ve ark(2001) genipin kullanılarak kitosan membranının çapraz bađlanmasının gerilme yűkűnű, řiřme oranını ve enzimatik parçalanabilirliđi azalttıđını bildirmişlerdir. Aynı zamanda çapraz bađlı kitosanın daha dűřuk řiřme yeteneđi, normalde daha tam bir çapraz-bađlanma reaksiyonuyla elde edilen kitosandaki NH₂ bűlgelerinin intermolekűler veya intramolekűler bađlanmasındaki artışa bađlı olduđun rapor etmişlerdir. [89]. Berger ve ark.,(2004) yaptıkları çalıřmada çapraz bađlama ile oluřturulan çok sayıdaki zincir etkileřimlerinin řiřmeyi űnlediđi bildirilmiştir, bunun nedeni olarak kitosanın amino gruplarının çođunun çapraz bađlayıcı ile reaksiyona girmiş olmasından kaynaklandıđı belirtilmiştir[90].

4.2. Kompozit Taşıyıcılar űzerine Bađlanan Protein Miktarı ve İmmobilizasyon Verimi

Selűlaz enziminin kitosan űzerine kovalent bađlanma yűntemiyle immobilizasyonunda, iki farklı çapraz bađlama ajanı kullanılmış ve immobilizasyon verimleri karřılařtırıldı. GP ve GA ile aktive edilen CS ve CS-Fe₃O₄ boncukları űzerine bađlanan protein miktarının tespit edilebilmesi için serbest enzim, immobilizasyon iřlemi sonrası kalan filtrat ve yıkama sularında protein tayini yapıldı.

Yapılan çalıřmaların sonucunda glutaraldehit ve genipin için optimum immobilisasyon sűresi 4 saat olarak bulundu ve **řekil 4.12.**'de gűsterildi. alıřmalara immobilizasyon sűresinin optimum olduđu 4 saat alınarak devam edilmiştir. İmmobilize selűlazın aktivitesi gram tařıyıcı bařına dűřen aktivite olarak hesaplandı. Selűlaz enzimi kitosan űzerine kovalent bađlanma yűntemiyle immobilize edilirken **Tablo 4.2.**'deki parametreler kullanıldı. Elde edilen verimler **Tablo 4.2.**'de belirtilmektedir.



Şekil 4. 12. Selüloz immobilizasyonunda genipin (▲)ve glutaraldehit (●)ile aktive edilen kompozit kitosan boncukların üzerinde immobilizasyon süresinin etkisi

Qikun Zhang ve arkadaşları(2016) yaptıkları çalışma sonucunda immobilizasyon süresinin 0 ila 4 saat arasında artan bağlama sergilediğini, enzimatik aktivitenin, immobilize edilmiş selüloz miktarı ile arttığını belirtmişler ve optimal immobilizasyon süresi 4 saat olarak bildirmişlerdir. Bu da bulduğumuz sonucu destekler niteliktedir[91].

Tablo 4.2. Selülaaz Enziminin Kitosan Kompozit Boncuklar Üzerine İmmobilizasyonunda Optimizasyon Çalışmaları

	%İmmobilizasyon verimi	%Geri kazanılan aktivite		%İmmobilizasyon verimi	%Geri kazanılan aktivite
Glutaraldehit(%v/v) (T:40°C t:4 h)			Genipin(%m/v) (T:30°C t:15 h)		
1	54.6	51.8	0.05	23.4	21.7
2	59.9	56.3	0.15	42.6	40.3
3	65.2	62.6	0.3	72.6	70.4
4	77.4	75.9	0.60	83.5	81.2
5	61.3	60.1	1	64.6	62.3
			Genipin(%m/v) (T:40°C t:8 h)		
			0.05	24.4	22.1
			0.15	40.2	38.4
			0.3	69.8	67.3
			0.60	78.1	77.2
			1	60.2	58.6
			Genipin(%m/v) (T:50°C t:8 h)		
			0.05	21.9	19.7
			0.15	37.4	35.6
			0.3	65.4	63.2
			0.60	74.3	72.4
			1	57.7	55.9
			Genipin(%m/v) (T:40°C t:4 h)		
			0.05	14.17	13.98
			0.15	19.84	18.53
			0.3	35.19	34.27
			0.60	48.02	46.64
			1	27.12	26.09

Kitosan kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen selülaaz enziminin immobilizasyon verimi değerleri optimum koşullarda genipin ve glutaraldehit ile aktive edilen boncuklar için sırasıyla %83,54 ve %77,04 olarak bulundu. Kitosan kompozit boncuklar üzerine immobilizasyon veriminin genipin oranı ve çapraz bağlama süresinin artırılmasıyla beraber arttığı görülmektedir. Literatürlere göre, genipin oranı ve çapraz bağlama süresi arttıkça çapraz bağlama derecesinin arttığını gösterilmektedir.

Tablo 4.3'de standart protein eğrisi kullanılarak genipin ve glutaraldehit ile aktive edilen boncuklar için belirlenen protein miktarı verilmiştir. Bu değerlerden yola çıkarak yükleme etkinlikleri hesaplanmıştır.

Tablo 4.3. Taşıyıcı üzerine immobilize edilen selülazın protein miktarı ve yükleme etkinliği

	GA-CS	GP-CS	GA-CS-Fe ₃ O ₄	GP-CS-Fe ₃ O ₄
Başlangıç Protein Miktarı(mg)	1.0	1.0	1.0	1.0
Bağlanan Protein Miktarı(mg)	0.55	0.63	0.69	0.82
Yükleme Etkinliği(%)	64	71	75	86

Tao Feng ve arkadaşları(2005), yaptıkları immobilizasyon çalışmasında yüklü protein ve enzim aktivitesinin miktarı artan glutaraldehit konsantrasyonu ile birlikte arttığını, glutaraldehit konsantrasyonu % 4'ten fazla olduğunda ise yüklü protein miktarı belirgin bir değişiklik göstermediği halde enzim etkinliğinin azaldığını, bu nedenle optimal glutaraldehit konsantrasyonunu % 4 olarak bildirmişlerdir. Cui ve ark (2017) çalışmasında, glikoz oksidaz ve katalaz enzimleri genipin kullanılarak çapraz bağlanmış ve optimum genipin konsantrasyonunun % 0.8 (w/v) olduğu bildirilmiştir[92]. Nguyen Xuan Nam ve ark.(2017) invertaz enzimini kitosan üzerine immobilizasyonu çalışmasında optimum glutaraldehit konsantrasyonunu % 4 olarak rapor etmişlerdir[93]. Muzzarelli (2009) çalışmasında genipinin reaksiyona girmesi ve enzimin kovalent bağlanması için sulu çözeltideki hidroksil iyonlarının nükleofilik bir atak yoluyla meydana geldiğini bildirmiş ve % 0.1 (m / v) genipinin, Tplac'ın maksimum immobilizasyonu için optimal olduğu ve genipin yaygın olarak kullanılan glutaraldehit ile karşılaştırıldığında daha düşük sitotoksitesi nedeniyle, genipin tıbbi cihazlar olarak kullanılan biyomateryaller için tercih edilen çapraz bağlanma ilkinden biri olarak kabul edilebileceğini rapor etmiştir[94]. Barbosa ve ark.(2014), genipin, gıda uygulamaları için doğal olarak ortaya çıkan çapraz bağlayıcı bir antikordur ve geleneksel çapraz bağlayıcı olan glutaraldehite iyi bir alternatif olabileceğini rapor etmişlerdir[95]. Shao-Hua Chiou ve ark.(2007) yaptıkları lipazın kitosan boncukları üzerine immobilizasyonu için optimum genipin konsantrasyonunu 0.3% (v/v), çapraz bağlama süresini 6 saat ve immobilizasyon

süresini 3 saat ve optimum sıcaklığı ise 25 °C olarak rapor etmişlerdir[96]. Mitra ve ark.(2014) çalışmalarında glutaraldehitin proteinlerin çapraz bağlanması için en yaygın kullanılanı olmasına rağmen, aynı zamanda toksik olması nedeniyle fizyolojik koşullar altında vücuttaki DNA'ları ve fonksiyonel proteinleri de çapraz bağlayabildiğinden, gıda sürecindeki uygulamasını sınırlayan sitotoksikite veya karsinogenisiteye yol açabileceğini bildirmişlerdir[97].

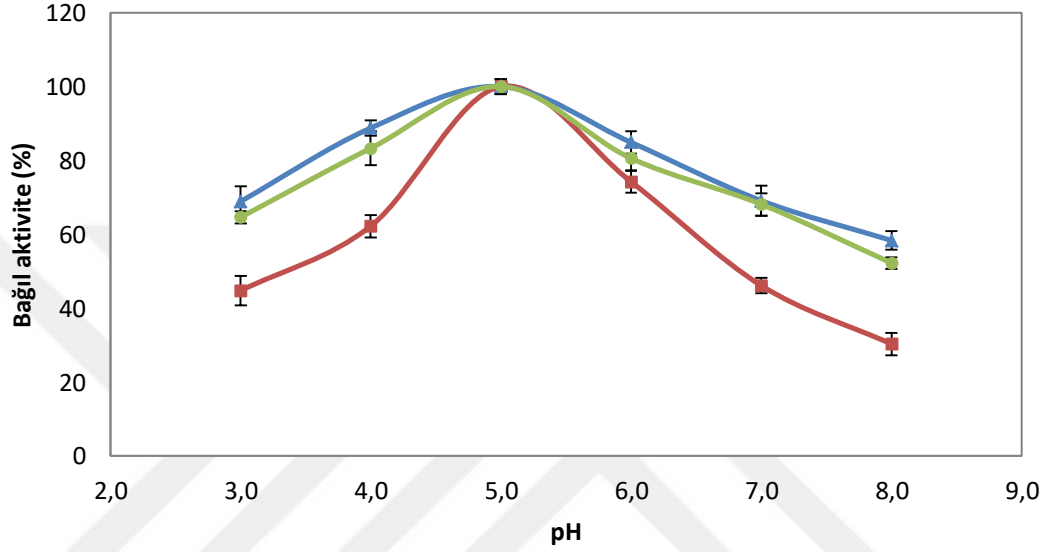
4.3. Serbest ve İmmobilize Selülazın Karakterizasyonu

Serbest ve immobilize edilen selülazın karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar ortalama 5 kez tekrarlandı ve elde edilen değerlerin ortalaması alınarak grafikler oluşturuldu.

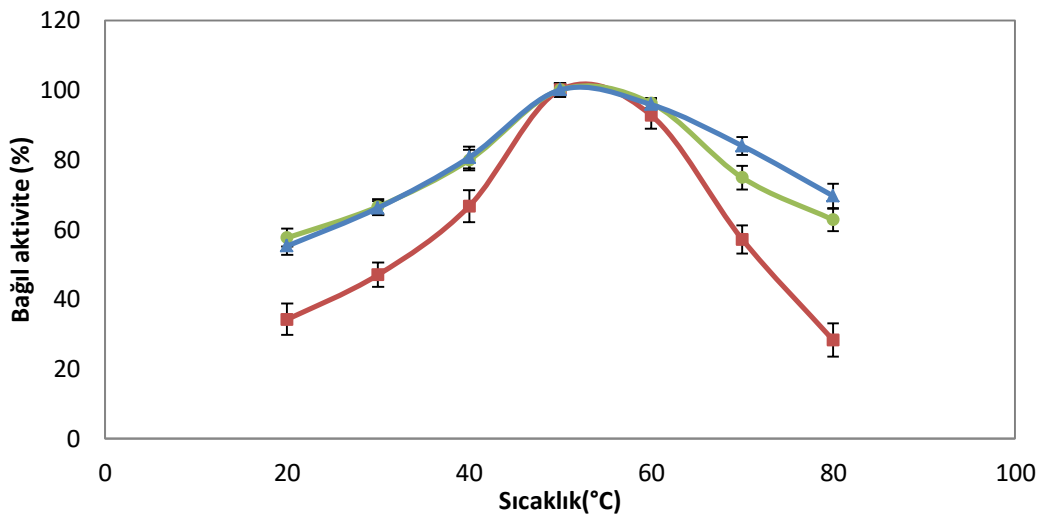
4.3.1. Sıcaklık ve pH'ın Etkisinin Belirlenmesi

Enzim özellikleri immobilizasyon sonrası değişebileceği gibi enzimin katalitik aktivitesini etkileyebilecek parametrelerin incelenmesi de önemlidir. Değişen pH ve sıcaklık koşulları altında immobilize selülazın kalıntı aktiviteleri, çapraz bağlayıcı olarak genipin ve glutaraldehit kullanılarak hazırlanan immobilize edilmiş selülazın işlem stabilitesini değerlendirmek için analiz edildi. Serbest ve immobilize selülaz enziminin aktivitesi substrat olarak CMC kullanılarak pH 3.0-8.0 aralığında ölçüldü ve yüzde bağıl aktivite değerleri hesaplandı. Deneylerde sırasıyla pH: 3,0-5,0 asetat tamponu; pH: 6,0 sitrat tamponu; pH: 7,0 potasyum fosfat tamponu; pH: 8,0 Tris-HCl tamponu kullanıldı. **Şekil 4.13a** 'da gösterildiği gibi, hidroliz CMC-Na için immobilize edilmiş selülazın optimum pH'ı 5,0 olarak bulundu. Enzimin optimum pH'ının genipin ve glutaraldehit ile aktive edilen kitosan kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen selülaz enzimi için değişmediği görüldü. **Şekil 4.13b**, reaksiyon sıcaklığının, çapraz bağlayıcı olarak genipin ve glutaraldehit kullanılarak aktive edilen kitosan boncuklar üzerine immobilize edilmiş selülaz ve serbest selülazın geri kazanılan aktiviteleri üzerindeki etkisini göstermektedir. İmmobilize edilen selülazın optimum sıcaklığı, 50°C bulunmuş ve bu durum immobilizasyonun, çözümlü selülazın optimum sıcaklığının değiştirmedikini gösterdi. Fakat immobilize selülaz, 50°C'nin üzerindeki ve altındaki sıcaklıklarda, serbest selülazınkinden daha yüksek aktiviteler sergiledi. 50°C'de, serbest enzim için geri kazanılan enzim aktivitesi % 60,09 iken, immobilize edilmiş enzimler, aynı sıcaklıkta, glutaraldehit ve genipin için sırasıyla % 87,38 ve % 92,98

geri kazanılan aktivite sergiledi. İmmobilize selülazın termal stabilitesi, serbest enzime kıyasla 60°C'den daha yüksek sıcaklıklarda büyük ölçüde arttı. Benzer sonuçlar daha önce başka immobilize selülazlar için rapor edilmiştir. **Şekil 4.13c**, serbest ve çapraz-bağlayıcı olarak genipin ve glutaraldehit kullanılarak aktive edilen kitosan ve kitosan kompozit boncuklar üzerine immobilize edilmiş selülazın geri kazanılan aktiviteleri üzerinde pH'ın etkisini göstermektedir.

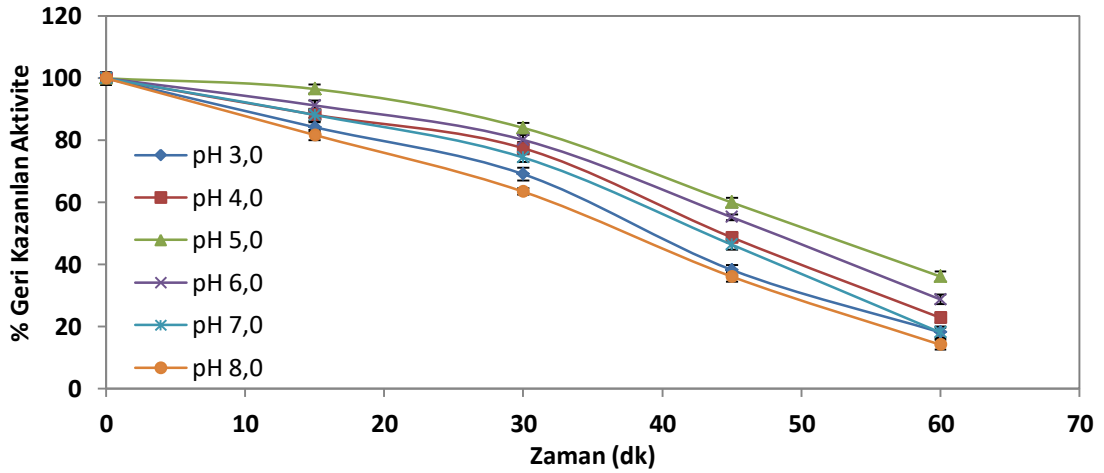


Şekil 4.13a. 50°C'de serbest (■) ve genipin (▲) ve glutaraldehit (●) kullanılarak aktive edilen kitosan ve kitosan kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen selülazın aktivitesine pH'ın etkisi

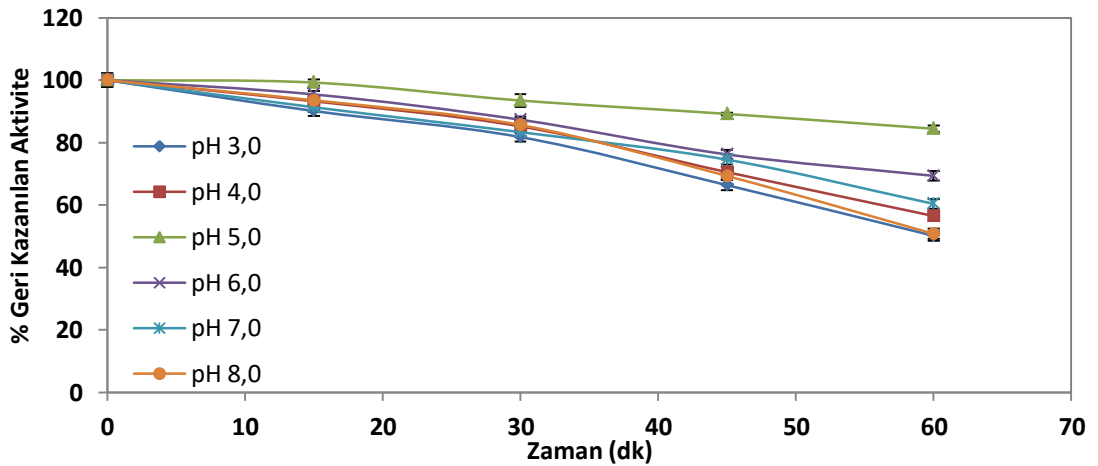


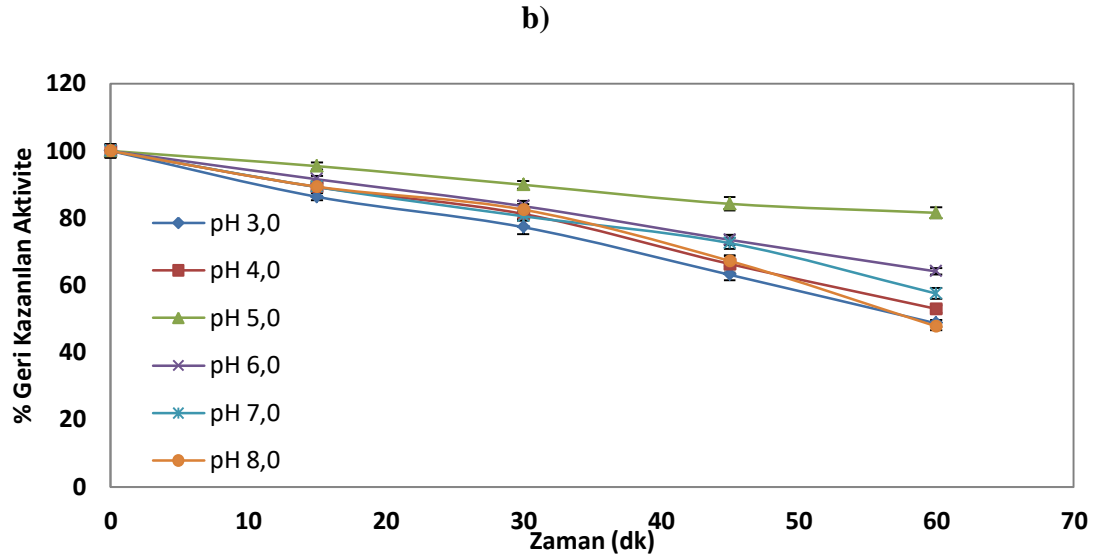
Şekil 4.13b. pH 5,0' de serbest (■) ve genipin (▲) ve glutaraldehit (●) kullanılarak aktive edilen kitosan kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen selülazın aktivitesine sıcaklığın etkisi

Elde edilen sonuçlar Falkoski ve ark. (2013), Liu ve ark. (2011), Saini ve ark. (2015) tarafından yapılan *Chrysosporthe cubensis*, *Aspergillus fumigates* ve *Penicillium oxalicum* tarafından üretilen selülozların maksimal aktivitesinin 50-60 °C arasında bulunmasıyla uyumludur[98,99,100]. Carr (1995) ve Tyndall (1992) yaptıkları çalışmalarda asit selülozlar 45-55°C, nötral selülozlar 50-60°C sıcaklık aralığında etkili olduklarını, asite dayanıklı selülozların 40°C'de %50 aktiviteye sahipken, maksimum etkinliğe 65°C'de ulaşabildiğini bildirmişler aynı zamanda emniyetli çalışma sıcaklığını 55-60°C civarında olduğunu rapor etmişlerdir. Carr (1995) yaptığı çalışmalarda asite dayanıklı selülozlarla çalışırken optimum pH aralığı olan 4-5,5 değeri, asetik asit/NaOH tampon sistemiyle sağlanabileceğini bildirmiştir. Yapılan birçok immobilizasyon çalışmasında optimum pH değeri 4,8 olarak bildirilmiştir.[101,102,103]



a)





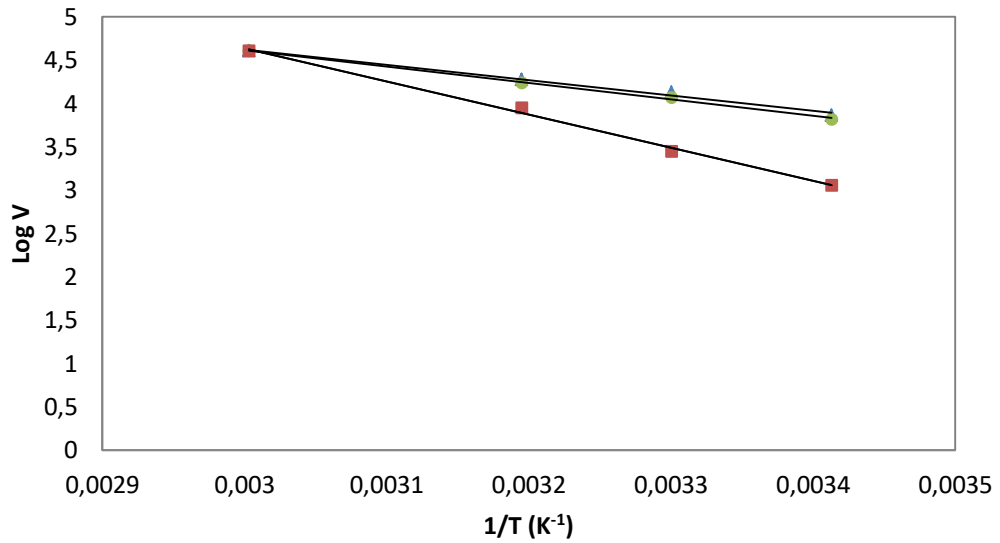
c)

Şekil 4.13c. Serbest(a) ve genipin(b) ve glutaraldehit(c) kullanılarak aktive edilen kitosan kompozit bonucuklar üzerine immobilize edilen selülazın pH stabilite grafikleri

Serbest ve immobilize enzimlerin pH stabilite grafikleri incelendiğinde serbest enzimin pH 5,0' de 60 dk sonunda % 56,14, genipin ve glutaraldehit ile aktive edilen bonucukların ise sırasıyla %84,45 ve %81,57 oranında aktivitesini koruduğu görüldü. pH 8,0 de ise serbest enzimin 60 dk sonunda %24,17 oranında aktivitesinin kaldığı belilendi.

Serbest enzimin sıcaklık stabilite grafiği incelendiğinde; 20°C'de başlangıçtaki aktivitesinin tamamını korurken 50°C'de aktivitesinin % 91,41'inin geri kazanıldığı belirlenmiştir. 90°C'de ise bir saat sonunda % 9,85 aktivitesinin kaldığı tespit edilmiştir. Genipin ile aktive edilen kitosan kompozit bonucuklar üzerine immobilize edilen selülazın sıcaklık stabilite grafiği incelendiğinde 50°C'de aktivitesinin % 92,90'nının geri kazanıldığı belirlenmiştir. 90°C'de ise bir saat sonunda % 37,40 aktivitesinin kaldığı tespit edilmiştir. Glutaraldehit ile aktive edilen kitosan kompozit bonucuklar üzerine immobilize edilen selülazın sıcaklık stabilite grafiği incelendiğinde 50°C'de aktivitesinin % 90,98'inin geri kazanıldığı belirlenmiştir. 90°C' de ise bir saat sonunda % 31,60 aktivitesinin kaldığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, enzim immobilizasyonu önemli ölçüde termostabilite artışı sağlamıştır.

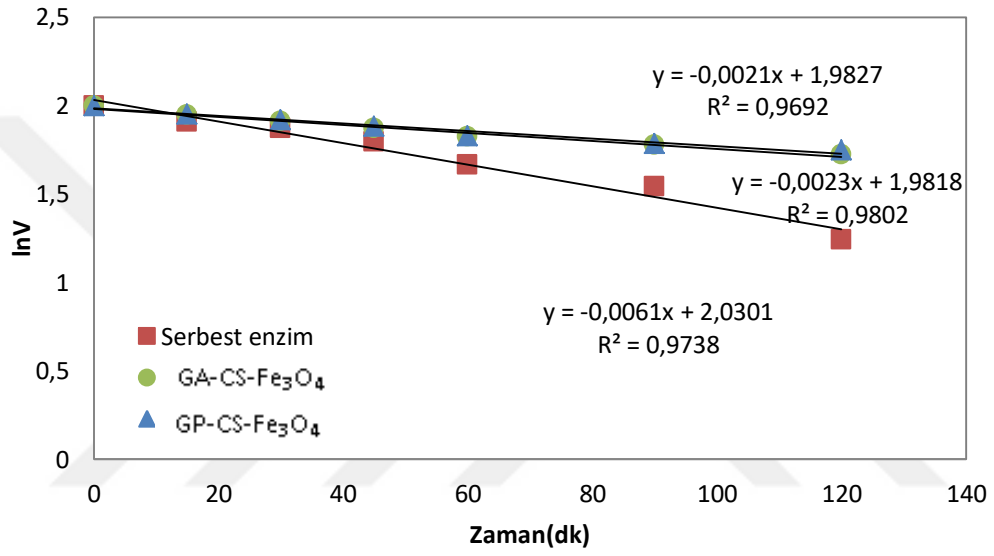
Sıcaklık kararlılığı immobilize enzimlerin uygulamalarında önemli bir kriter olduğundan bu konu üzerinde fazla sayıda çalışmalar bulunmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda serbest enzimler deaktive olurken, immobilize enzimlerde taşıyıcı genellikle enzim açısından yüksek sıcaklığa karşı koruyucu bir durum sergilemektedir. İmmobilizasyon işlemi ile enzimlerin biçimsel esnekliği değişime uğramaktadır. İmmobilizasyon çalışması, enzimin dayanıklılığını artırır ve bu durum genellikle enzimin yükselen sıcaklığa karşı kararlılığın artmasını sağlamaktadır. Chang, M.Y. ve Juang, R.S., (2005) yaptıkları çalışmaların büyük bir kısmında immobilizasyon işlemi sonrası elde edilen sonuçların enzimin sıcaklık kararlılığında gelişme görüldüğünü ortaya koyduğunu rapor etmişlerdir[104]. Jaiswal ve Prakash, (2011) immobilize enzimlerin daha yüksek pH değerlerinde stabilitesi, katı matris üzerindeki kalıntı yüklere ve bağlı enzimin yapısına bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. Yuanyuan Yu ve ark. (2014), Mihaela Ungurean ve ark(2013) ve Lin ve ark.(2017) yaptıkları immobilizasyon çalışmalarında pH ve sıcaklıktaki değişiminde benzer stabilite rapor edilmiştir[105,106].



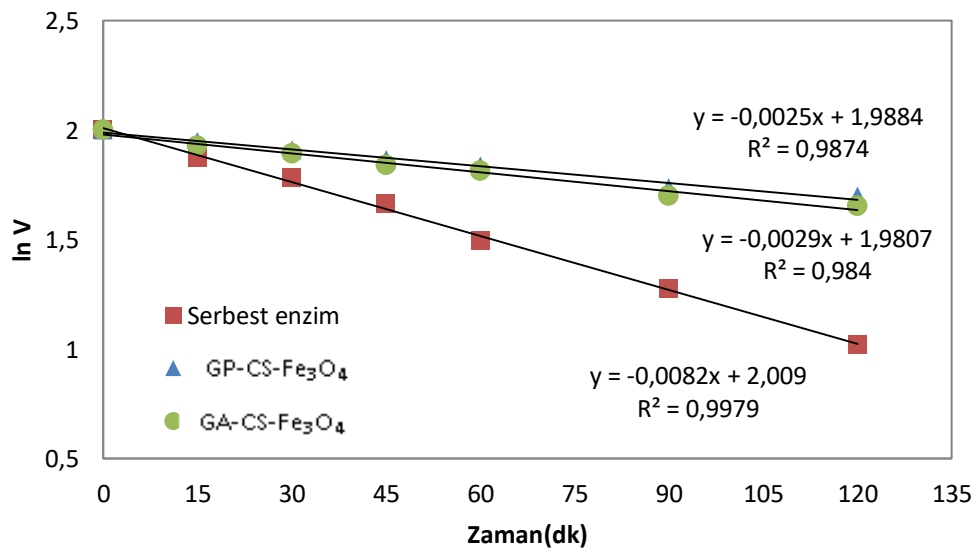
Şekil 4.14. Serbest (■) ve kompozit boncuklar (genipin (▲) ve glutaraldehit (●)) üzerine immobilize edilen selülaz enzimine ait Arrhenius grafiği

Serbest, GP-CS-Fe₃O₄ ve GA-CS-Fe₃O₄ üzerine immobilize edilen selülaza ait aktivasyon enerjileri için Arrhenius grafiği kullanılarak bulunan eşitlikler bulundu(Şekil 4.14.). Bu eşitlikler; serbest selülaz için $y = -1662.1x + 6.9999$, GP-

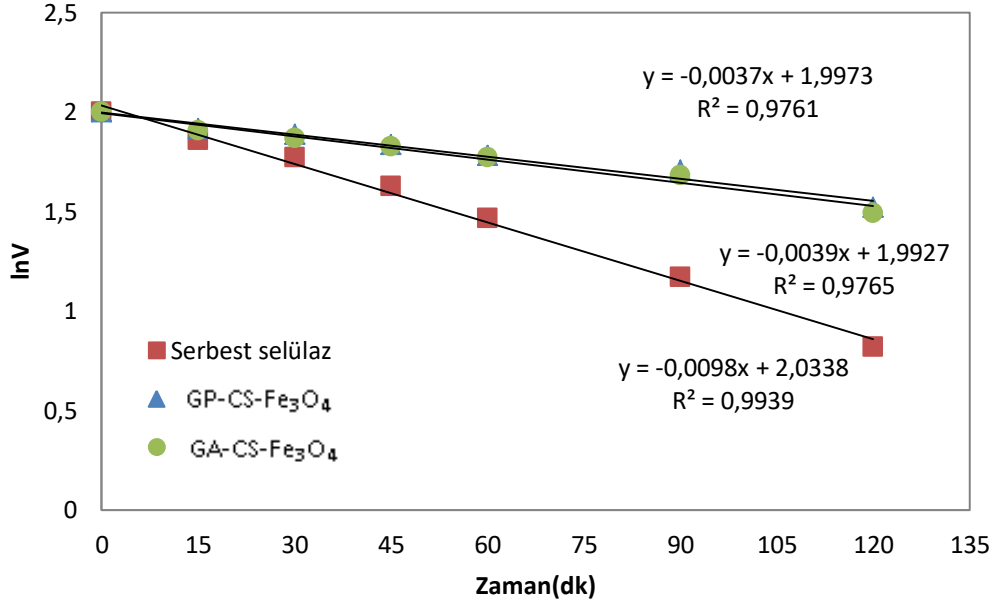
CS-Fe₃O₄ için $y = -821.18x + 4.4674$ GA-CS-Fe₃O₄ için ise $y = -767.04x + 4.3075$ bulunmuştur. Bu eşitliklerden yola çıkılarak yapılan hesaplamalar sonrasında serbest, GP-CS-Fe₃O₄ ve GA-CS-Fe₃O₄ üzerine immobilize edilen selüloz enziminin E_a değeri sırasıyla 31.81 kJ mol⁻¹, 14.68 kJ mol⁻¹ ve 15.71 kJ mol⁻¹ olarak belirlendi. Amara Shafaq ve ark.(2004) selüloz enzimi üzerine yaptıkları kinetik çalışmalar sonucunda E_a değerini 30 kJ K⁻¹ mol⁻¹ olarak rapor etmişlerdir[107]. Ghori ve ark. (2001), Trichoderma reesei'den CMCase için 22.52 kJ mol⁻¹ aktivasyon enerjisini bildirmiştir[108].



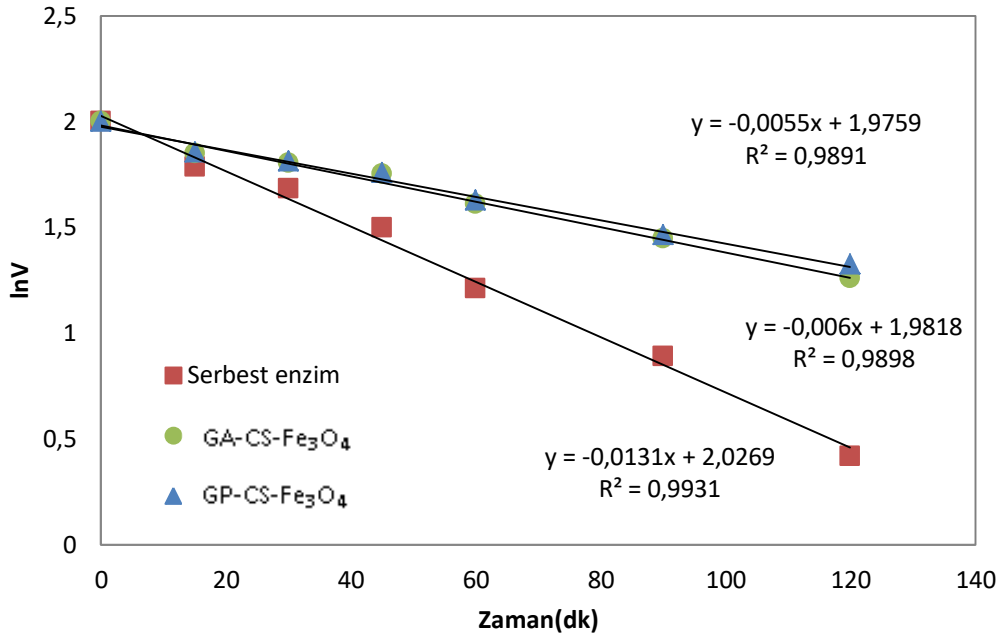
a)



b)



c)



d)

Şekil 4.15. Serbest ve kitosan kompozit boncuklar üzerine immobilize enziminin 40(a), 50(b), 60(c) ve 70(d) °C de zamana karşı aktivite grafiği

Şekil 4.15’de elde edilen bu sonuçlar değerlendirildiğinde selülaz enziminin yarı ömür sürelerinde ve D değerlerinin kovalent immobilizasyon sonrasında tüm

sıcaklıklarda arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar, kompozit taşıyıcılar üzerine immobilize edilen selülozün termal stabilitesinin serbest selülozinkinden daha yüksek olduğunu göstermektedir(**Tablo 4.4.**).

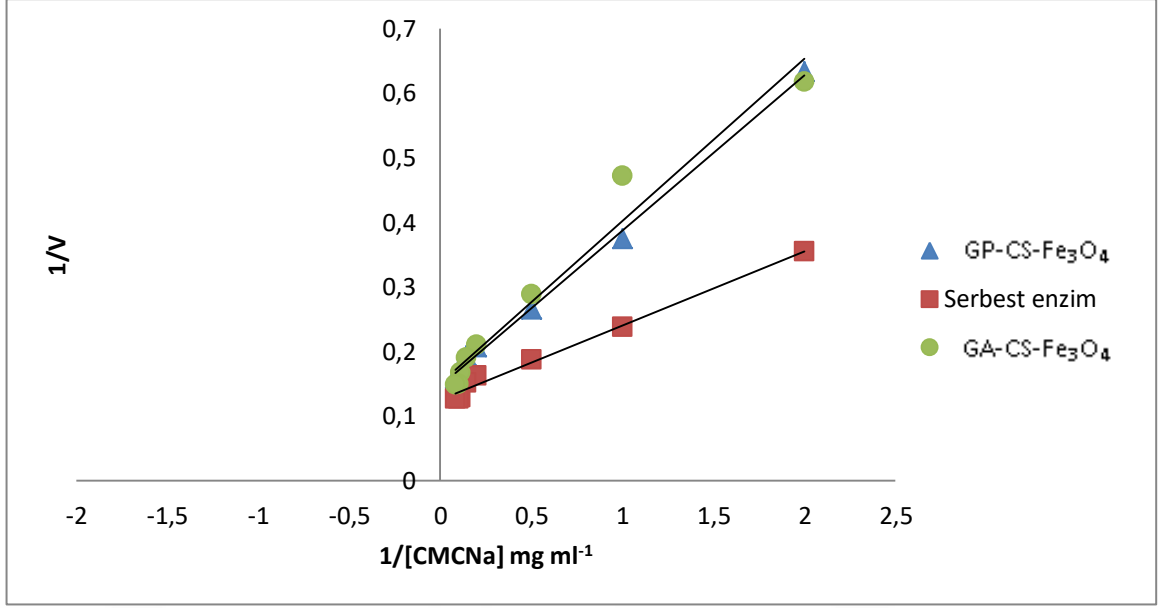
Tablo 4. 4. Serbest ve kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen selülozün termal inaktivasyon parametreleri

Selüloz		40°C	50°C	60°C	70°C
k_D (dk ⁻¹)	Serbest enzim	0,0061	0,0082	0,0098	0,0131
	CS- Fe ₃ O ₄ -GP	0,0021	0,0025	0,0037	0,0055
	CS-Fe ₃ O ₄ -GA	0,0023	0,0029	0,0039	0,0060
t_{1/2} (dk)	Serbest enzim	113,60655	84,530143	70,714285	52,90076
	CS- Fe ₃ O ₄ -GP	330,00000	277,25887	187,29729	126,0000
	CS-Fe ₃ O ₄ -GA	301,30434	239,01626	177,69230	115,5000
D-değeri (dk)	Serbest enzim	377,47296	280,80306	234,9576	175,76985
	CS- Fe ₃ O ₄ -GP	1096,4690	921,03403	622,3202	418,65183
	CS-Fe ₃ O ₄ -GA	1001,1239	793,99485	590,4064	383,76418

Kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen selülozün yarı ömrü, serbest selüloz ile karşılaştırıldığında neredeyse 3 kat artmıştır. Bu yarı ömrünün artması, yapının denatürasyona karşı dayanıklılığını desteklemiş olabilecek polimere kovalent enzim bağlanmasına bağlı olabilir [109,110].

4.3.2. Enzim Kinetiği

Serbest selüloz enzimi, GA-CS-Fe₃O₄ ve GP-CS-Fe₃O₄ üzerine immobilize edilen selüloz için 0,05 M, pH 5,0 asetat tamponu içerisinde hazırlanan farklı substrat derişimleri kullanılarak belirlenen aktivite değerleri ile oluşturulan Lineweaver- Burk grafiği **Şekil 4.16.**'da gösterilmiştir.



Şekil 4. 16. Serbest selüloz enzimi, GA-CS-Fe₃O₄ ve GP-CS-Fe₃O₄ üzerine immobilize edilen selülozün Lineweaver- Burk grafiği

K_M ve V_{max} değerleri serbest ve kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen selüloz için çizilen Lineweaver- Burk grafiği kullanılarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.5’de verildi.

Tablo 4. 5. Serbest selüloz, GA-CS-Fe₃O₄ ve GP-CS-Fe₃O₄ boncuklar üzerine immobilize edilen selülozün kinetik parametreleri

	K_M	V_{max}
Serbest selüloz	0.92 mg ml ⁻¹	7.99 U/ml
İmmobilize selüloz (GP)	1.63 mg ml ⁻¹	6.81 U/g taşıyıcı
İmmobilize selüloz (GA)	1.67 mg ml ⁻¹	6.64 U/g taşıyıcı

Bir enzim için K_M değeri, maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonunu ifade eder. Bunun yanı sıra K_M değeri ne kadar küçükse enzimin substrata ilgisi o kadar yüksek olmaktadır. Yaptığımız çalışmada serbest selüloz için K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,92 mg ml⁻¹, 7,99 U ml⁻¹ olarak bulundu. K_M ve V_{max} değerleri GP-CS-Fe₃O₄ üzerine immobilize edilmiş selüloz için 1,63 mg ml⁻¹, 6,81 U g⁻¹ taşıyıcı, GA-CS-Fe₃O₄ üzerine immobilize edilmiş

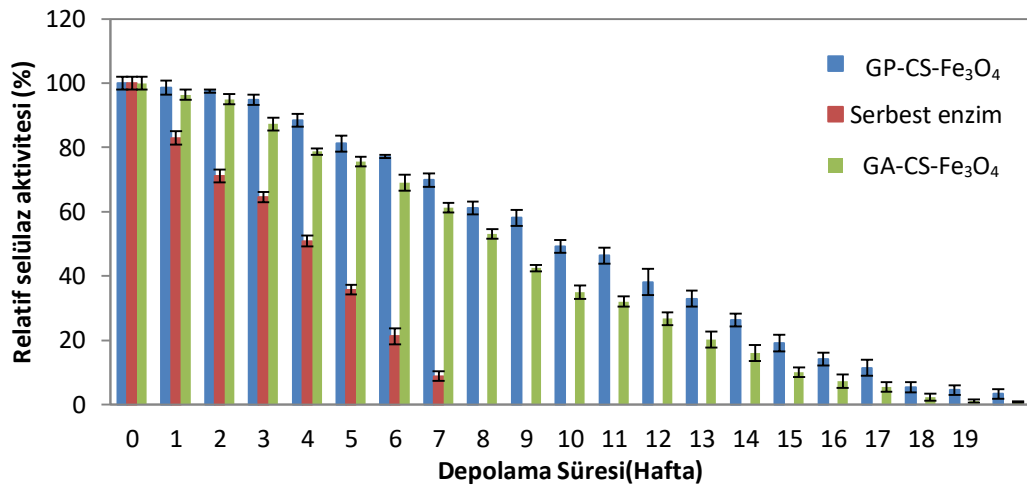
selülaz için ise $1,67 \text{ mg ml}^{-1}$, $6,64 \text{ U g}^{-1}$ taşıyıcı olarak hesaplandı. Alınan sonuçlar değerlendirildiğinde immobilize edilen selülaza ait K_M değerlerinin serbest selülazın K_M değerinden yüksek olması, substrata olan ilgilerinin serbest selülazın ilgisinden daha düşük olduğu anlamına gelmektedir. K_M ve V_{max} değerlerinde meydana gelen bu değişikliklerin nedenleri arasında, enzimin desteğe bağlanması esnasında substrata bağlanması için gerekli olan esnekliğini bir miktar yitirmesi, taşıyıcının enzimin aktif bölgelerinde meydana getirdiği sterik engellemeler ve substrat difüzyonunun sınırlanması sayılabilir.

Bu makalede hesaplanan Michaelis sabitlerinin, önceki çalışmalarda bildirilen birçok değerlerden daha düşük olduğunu da belirtmek gerekir. Imai ve arkadaşları (2004), 3–11 mg/ml arasında değişen K_M değerlerini bildirmişler ve Liu ve arkadaşları (2006), Selüloz ve CMC substratları için sırasıyla K_M değerlerini 14,3-39,5 mg/ml ve 30,2 -30,5 mg/ml olarak bildirmişlerdir[111,112]. Razi Ahmad ve ark.(2018) yaptıkları selülaz immobilizasyon çalışmasında CMC substratı için K_M değerini serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 5,60 ve 2,50 mg/ml olarak bildirmişlerdir[113]. Naser ve arkadaşları(2015) yapmış oldukları selülaz enziminin saflaştırılması ile ilgili çalışmada CMC substratı için V_{max} değerlerini 4.27 ± 0.73 ve $3,53 \pm 0,60 \text{ U/ ml}$ olarak bildirmişlerdir[114]. Ming-qi Liu ve ark. (2015) karbon kaplamalı kitosan nanopartiküller üzerinde immobilize edilmiş ksilanaz çalışmalarında selülaz için K_M ve V_{max} değerlerini sırasıyla $6,13 \text{ mg ml}^{-1}$ ve $17,92 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ partikül olarak bildirmişlerdir[115]. Yuanyuan Yu ve ark(2012) yapmış oldukları selülaz enziminin polimer üzerine kovalent immobilizasyonu çalışmalarında K_M ve V_{max} değerlerini serbest selülaz için $4,78, 9,72 \times 10^{-3} (\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$, immobilize selülaz için $2,89, 4,36 \times 10^{-3} (\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ olarak bildirmişlerdir[116]. Tao Feng ve ark(2005) manyetik kitosan boncuklar üzerine yapmış oldukları immobilizasyon çalışmasında serbest ve immobilize enzim K_M ve V_{max} değerlerini sırasıyla 0.78 mg/mL , $0.48 \text{ mg mL}^{-1} \text{h}^{-1}$ ve 1.28 mg/mL , $0.39 \text{ mg mL}^{-1} \text{h}^{-1}$ olarak rapor etmişlerdir[117].

4.3.3. Depolama Kararlılığı

Bir enzimin depolama stabilitesi, uygulamasının belirli bir reaksiyonda programlanması açısından büyük önem taşımaktadır. Aynı zamanda depolama stabilitesi enzimin saklama koşullarına bağlı olarak değişen bir parametredir. Suda

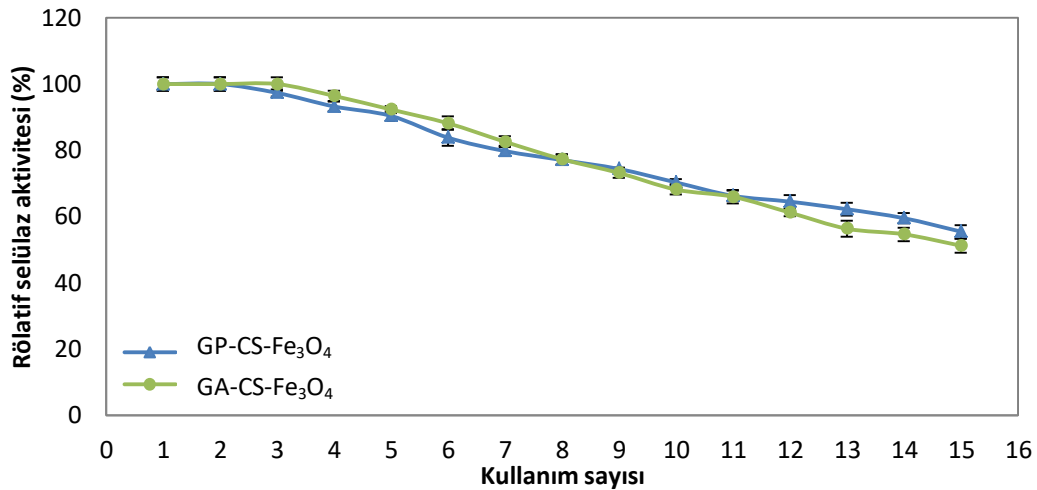
çözünmeyen enzim preparatları genellikle liyofilize edilerek ya da süspansiyon şeklinde 4 °C’ de depo edilebilmektedir. **Şekil 4.17.**’de elde edilen sonuçlar, depolama süresinin bir fonksiyonu olarak enzim aktivitesindeki değişikliklerin, immobilize enzimin kalan aktivitesinin 6 hafta boyunca depolandıktan sonra ilk aktivitesinin GP-CS-Fe₃O₄ için % 77,18’ini, GA-CS-Fe₃O₄ için % 75,64’ünü koruduğunu gösterirken, serbest enzimin başlangıçtaki aktivitesinin % 36,22’sini koruduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, immobilize edilmiş enzimin, serbest enzimden daha iyi bir depolama stabilitesine sahip olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda bu veriler, selülazın çözünmeyen bir taşıyıcının yüzeyine bağlanarak uygun depolama stabilitesine sahip olduğunu göstermektedir. Elde edilen veriler, X. Yang ve arkadaşlarının selülaz immobilizasyonu üzerine yapılan bir çalışmada, serbest enzimin 28 gün içinde aktivitesinin yaklaşık % 79’unu kaybettiğini ve immobilize edilmiş selülazın iyi bir depolama stabilitesi sergilediğini bildiren sonuçları ile uyum sağlamaktadır[118]. Hailei Yin ve ark(2013) yaptıkları çalışmalarında immobilize edilen selülazın aktivitede kademeli bir düşüş gösterdiğini ve sadece 4 hafta sonra başlangıçtaki aktivitesini % 14 kaybettiğini ve serbest selülazın ise aynı zamanda % 23 aktivitesini kaybettiğini belirtmişlerdir[119]. İmmobilize enzimlerin geliştirilmiş depolama stabilitesi, taşıyıcı üzerindeki fiksasyon sonucunda enzimin denatürasyon hızındaki azalmaya bağlanabilir[120,121,122]. Gülay Bayramoğlu ve ark.(2013) yaptıkları immobilizasyon çalışmasında serbest selülazın aktivitesini 30 günün sonunda kaybettiğini bildirmişlerdir[123].



Şekil 4.17. 4°C’de serbest, GA-CS-Fe₃O₄ ve GP-CS-Fe₃O₄ üzerine immobilize edilen selülazın depolama kararlılığı

4.3.4. İmmobilize Selülazın Tekrar Kullanılabilirliği

İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği, seçilen taşıyıcının ya da metodun etkinliğini değerlendirmede oldukça önemli olmaktadır. Bununla birlikte, tekrar kullanılabilirlik ekonomik açıdan ve kararlılığın korunması bakımından immobilize enzimleri serbest enzimlerden daha avantajlı kılmaktadır. Bu çalışmada immobilize selülaz enziminin tekrar kullanılabilirliği ard arda aktivite ölçümleri yapılarak belirlendi, hem aktivite ölçümlerinde kullanılan karboksimetil selüloz substratına karşı hem de lignoselülozik atık hidrolizinde tekrar kullanılabilirliği araştırıldı. Sonuçlar genipin ve glutaraldehit ile immobilize edilen selülaz enziminin CMC substratına karşı alınan ölçümlere göre 10 kullanımdan sonra aktivitesinin sadece yaklaşık % 32'sini kaybettiği gösterdi (Şekil 4.18.).



Şekil 4.18. Kompozit boncuklar üzerine (genipin (▲) ve glutaraldehit (●)) immobilize edilen selülazın CMC-Na substratına karşı tekrar kullanılabilirliği

Tao Feng ve ark (2006) çalışmalarında immobilize selülazın manyetik CS mikrokürelerinde 10 kullanım sonrası aktivitesinin %78'ini koruduğunu bildirmişlerdir[124]. Thilini Alahakoon ve ark(2012), yaptıkları çalışmada Aldehit ile fonksiyonelleştirilmiş nanopartiküller üzerine selülaz enzimini immobilize etmişler ve immobilize enzimin tekrarlanan 10 kullanım sonrası, sadece % 24,3'lük bir aktivite kaybına uğradığını bildirmişlerdir[125]. Siti Noraida Abd Rahim ve ark.(2013), çalışmalarında enzim karışımını (alfa-amilaz, glucoamilaz ve selülaz)

kalsiyum aljinat kil tanecikleri içine immobilize etmiş ve bu çalışma neticesinde yedi kullanımdan sonra, aljinat kil tanelerindeki enzim aktivitesinin % 51,77'sinden fazlasının, yalnızca aljinat tanelerine immobilize edilen enzimlerin ise sadece % 20,37'sinin korunduğunu bildirmişlerdir[126]. Ming-qi Liu ve ark (2015), yaptıkları immobilizasyon çalışması çift fonksiyonlu enzimi (ATXX) kovalent bağlarla desteklerde başarıyla immobilize etmiş ve bu çalışmada immobilize edilmiş ATXX'in geri kazanılan etkinliğini, yedi geri dönüşüm işleminden sonra % 82,6 olarak belirlemişlerdir[127].

4.3.5. Serbest ve İmmobilize Selülaz Aktiviteleri Üzerine Bazı Aktivatör ve İnhibitörlerin Etkisi

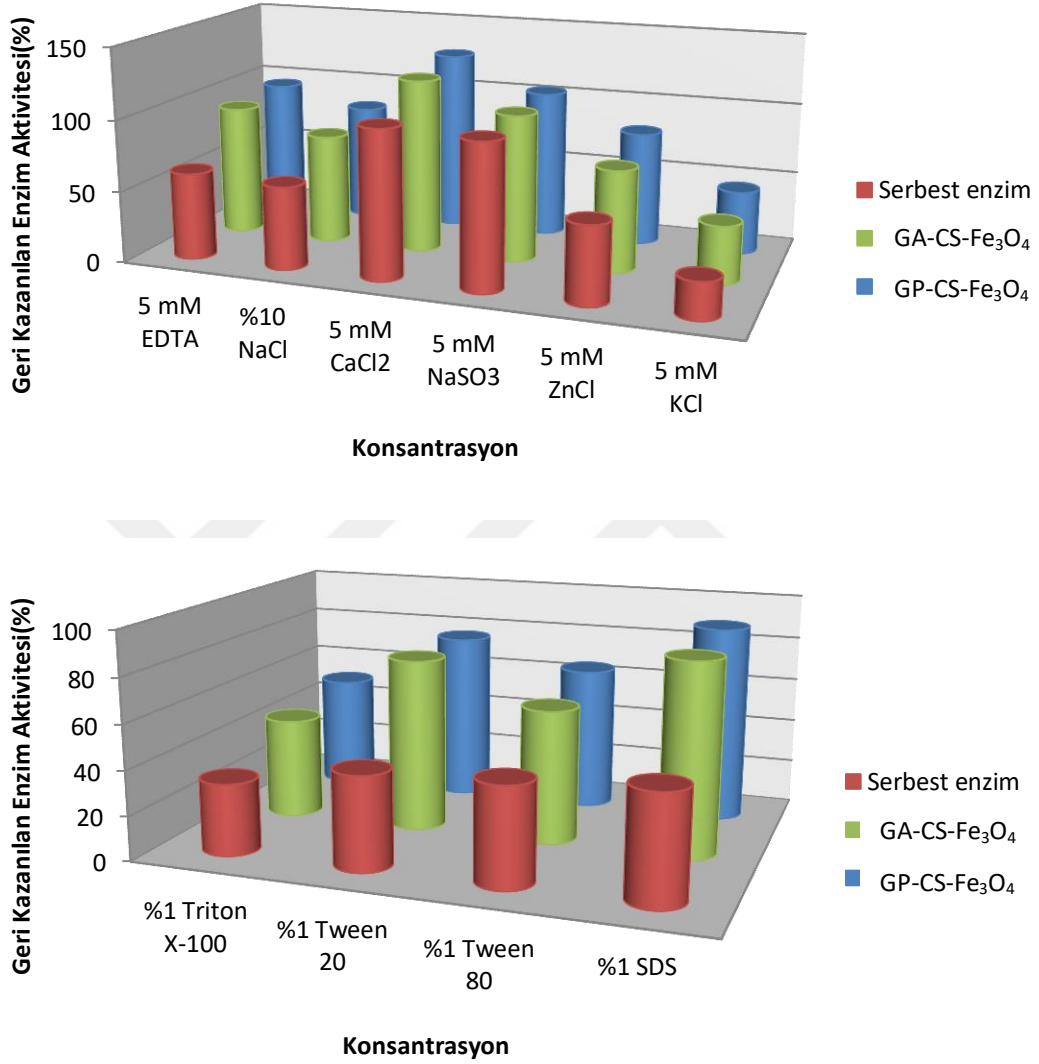
Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} ve Fe^{3+} gibi mono-, di- ve trivalent metal iyonları, selülazların karakterizasyon analizlerinde yaygın olarak incelenmektedir. İyonik yükün yanı sıra iyon yarıçapının boyutu enzimin aktivitesi ve stabilitesi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Daha büyük yarıçapın katalitik amino asitler üzerinde daha az etkiye sahip olduğu, daha küçük yarıçapın ise katalitik bölgedeki hasar ile enzimin genel konformasyonunu değiştiren yüklü amino asitleri daha yoğun olarak çekebildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Çalışmalar, Fe^{2+} ve Cu^{2+} 'nın endoglukanazlar, ekso-katalazlar ve β -glukozidaz aktiviteleri üzerindeki inhibitör etkilerini bildirmiştir. Bununla birlikte, diğer iki değerlikli iyonların selülaz aktiviteleri üzerindeki etkisi, farklı mikroorganizmalar tarafından salgılanan enzimler arasında değişmektedir. İki değerlikli iyonların selülazlar üzerindeki etkisi iyi aydınlatılmamıştır ve muhtemelen amino asitler üzerindeki redoks etkileri, aktivitelerini arttırmak veya azaltmaktır.

Selülazların Hg^{2+} ile inhibe edilmesi, sülfür içeren katalitik amino asit kalıntıları ile etkileşime bağlı olup, disülfür bağlarının oksidasyonuna ve düzensiz oluşumuna yol açar. Fe^{2+} , D/L-lisin ve L-metionin, histidin ile Cu^{2+} ve arginin, glutamin, prolin, serin ve valin ile Ba^{2+} ile kompleks oluşturabilir.

Çalışmamızda % 1 Triton X-100,% 1 Tween 20,% 1 Tween 80,% 1 SDS, 5mM EDTA ve %10 sodyum klorür çözeltisinin serbest ve immobilize selülazın

aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla, immobilize edilen enzim sodyum klorür ya da Triton X-100 çözeltisi içinde bekletildi. Belirtilen süre sonunda, immobilize edilen enzimin göreceli aktivitesi, substrat olan CMC'nin hidroliz reaksiyonuna dayanılarak hesaplandı. (Şekil 4.19.).



Şekil 4.19. Serbest ve immobilize selülaaz üzerine farklı konsantrasyonlardaki aktivatör ve inhibitörlerin etkisi

Yapılan çalışmalar neticesinde EDTA, selülaazın aktivitesi için inhibe edici olmuştur. EDTA bir metal şelatlama maddesidir ve EDTA tarafından enzimlerin inhibisyonu, enzim aktivitelerinin muhtemelen kimyasal aktivitelere bağlı olduğunu ve EDTA ile inaktif kompleksler oluşturan inorganik gruplar içerebileceğini düşündürmektedir. Kumar ve ark. (2010), enzimin üre inhibe edici bileşikte

hidrofobik amino asitlerin varlığını gösterdiğini ve enzimin EDTA tarafından inhibisyonunun enzimin metalo-enzim olduğuna (metale bağlı) kanıt olduğunu göstermiştir[128]. Shafei ve arkadaşları (2010), enzimin metal iyonları tarafından inhibisyonunun, enzimin aktif bölgesine bağlanarak azaltılan metallerin aktivitesinden kaynaklanabileceğini açıklamıştır ve enzimin metal iyonlarla inhibe olması, metallerin enzim aktif bölgesine bağlanarak aktiviteyi düşürmesinden kaynaklanabileceğini açıklamışlardır [129].

Trivedi ve ark (2011a), izole ettikleri selüloz enziminin EDTA ile inkübasyonundan sonra, %32 aktivite kaybettiğini bildirmişler ve enzimin anyonik ve iyonik olmayan deterjanlarla muamele edildiğinde bu deterjanların bir aktivatör olarak davrandıklarını rapor etmişlerdir. Trivedi ve ark (2011b), Bacillus flexus'tan izole ettikleri selüloz enziminin 5mM Ca²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ ve EDTA ile yüksek oranda inhibe olduğunu bildirmişlerdir[130]. Chang ve ark (2012), saflaştırdıkları selüloz enziminin aktivitesi üzerinde metal iyonları, deterjan ve okside edici ajanların etkisini incelemek üzere 50°C'de 1 saat inkübe etmişlerdir. İnkübasyon sonunda enzimin 2mM EDTA, MgCl₂ ve SDS ile inhibe olduğunu, 2mM CaCl₂, MnCl₂ (%150'nin üzerinde), ZnCl₂ ile aktivite kazandığını açıklamışlardır[131].

Çalışmamızda genipin ve glutaraldehit ile aktive edilen kitosan kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen selülozın deterjanlardan %1'lik SDS ile muamelesi sonrası geri kazanılan aktivitenin sırasıyla %89 ve % 86 olması enzimin deterjan endüstrisi içinde kullanılabilirliğini ortaya koymuştur. Murashima ve ark. (2002), Singh ve ark. (2004), ve Saha (2004) yapmış oldukları çalışmalarda selülozlardaki inhibisyon ve aktivasyon özelliklerinin birçok çalışmada olduğu gibi farklılıklar gösterebileceğini bildirmişlerdir[132,133,134].

4.4.Kompozit Boncuklar Üzerine İmmobilize Edilen Selüloz ile Lignoselülozik Atıkların Sakkarifikasyonu

Lignoselülozik atıkların indirgen şekere dönüşüm aşamaları; fiziksel parçalama, eleme, ön-muamele ve hidroliz olarak **Şekil 4.20.** 'de görüldüğü gibi basamaklandırılabilir.



LİGNOSELÜLOZİK BİYOKÜTLE



FİZİKSEL PARÇALAMA



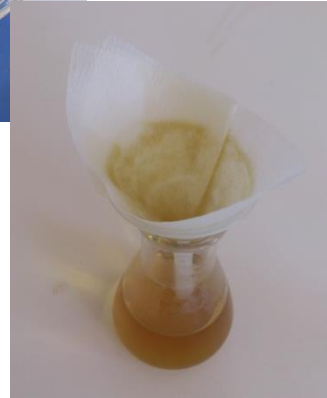
ELEME



ÖN MUAMELE



HİDROLİZ



Şekil 4.20. İşlem akışı

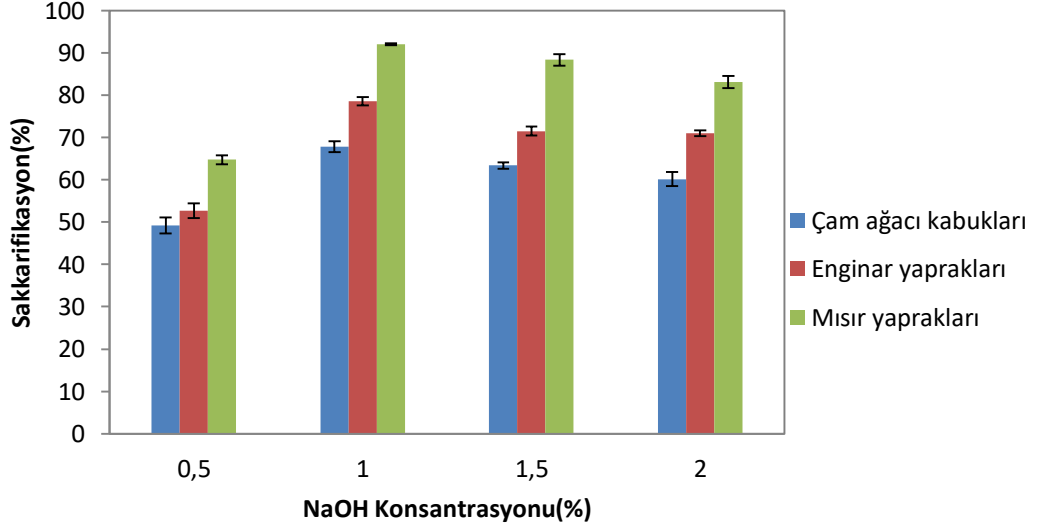
Genipin ve glutaraldehit ile aktive edilen kitosan kompozit boncuklar üzerine selüloz enziminin immobilizasyon işleminin gerçekleştirilmesi ve koşulların optimizasyonu sonrasında çalışmanın ikinci aşamasında, bu immobilize enzimlerin endüstriyel amaçlı uygulaması olarak lignoselülozik atıkların sakkarifikasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Çalışmada farklı endüstriyel ve evsel lignoselülozik atıklar tercih edildi. Atıklar üzerinde yapılan ön muamele işlemleri sonucunda asit ve alkali muamelenin birbirine yakın sonuçlar vermesi nedeni ile sakkarifikasyon çalışması daha avantajlı ve uygun olduğu belirlenen alkali muamele ile devam ettirildi. Lignoselülozik atıkların ön işlem sonrası lignin, selüloz+hemiselüloz miktarları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 4. 6. Lignoselülozik atıkların ön işlem sonrası lignin, selüloz+hemiselüloz miktarları

		Lignin (%)	Selüloz+Hemiselüloz (%)
Asit hidrolizi	Mısır yaprakları	15,7	78,6
	Enginar yaprakları	21,2	72,2
	Çam ağacı kabukları(<i>Pinus cembroides</i>)	32,4	61,2
Alkali hidroliz	Mısır yaprakları	16,3	80,5
	Enginar yaprakları	21,4	73,4
	Çam ağacı kabukları(<i>Pinus cembroides</i>)	34,6	60,2

4.4.1. Sakkarifikasyon Üzerine NaOH Konsantrasyonunun Etkisi

Sakkarifikasyon çalışmasında GP-CS-Fe₃O₄ boncuklar üzerine immobilize edilen selüloz tarafından belirli zaman dilimlerinde alınan UV-Vis spektrum sonuçları üzerine NaOH konsantrasyonunun etkisi **Şekil 4.21.**'de gösterilmektedir.



Şekil 4.21. NaOH konsantrasyonunun sakkarifikasyon üzerindeki etkisi

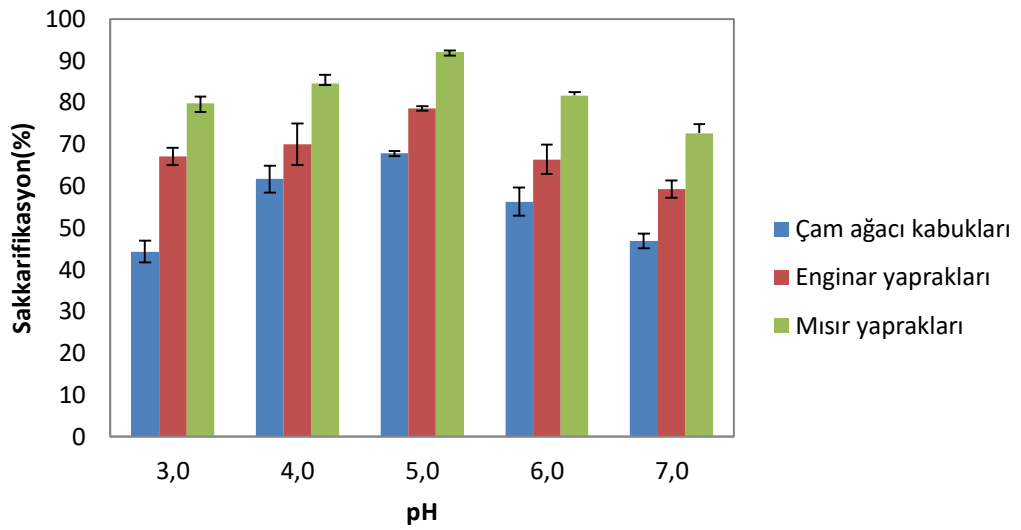
Yapılan çalışmalar sonucunda %0,5 oranında kullanılan NaOH oranının sakkarifikasyon verimi için istenen düzeyde olmadığı görülmüştür. %1'in üzerindeki NaOH konsantrasyonlarında ise bariz bir verim farkı oluşmadığı aksine verimde bir miktar kaybın gerçekleştiği sonucu ortaya çıkmıştır. Bu nedenle sakkarifikasyon işlemi için %1'lik NaOH konsantrasyonu uygun görülerek çalışma bu yönde devam ettirildi.

Lignoselülozik atıkların alkali kullanılarak gerçekleştirilen ön hazırlık işlemlerinde genellikle NaOH, KOH, Ca(OH)₂ ve NH₄OH kullanılmaktadır. Ön hazırlık işlemleri sayesinde lignin yapısı bozulur, ham maddenin gözenekliliği artar. Böylece enzimlerin ulaşabileceği yüzey alanı genişletilmiş olur. Sonraki aşama olan enzim hidrolizi için hammadde daha uygun hale gelmektedir [135]. NaOH'ın kullanıldığı alkali ön hazırlık işlemlerinde, düşük sıcaklık, uzun bekleme süresinde sakkarifikasyon veriminin arttığı rapor edilmiştir[136]. Abraham Kusi Obeng ve ark.(2018) yapmış oldukları otlardan şeker dönüşümü ile ilgili çalışmada %1-4 arası NaOH konsantrasyonu ile çalışmışlar ve 120 °C'de %4'lük NaOH oranı olarak belirlemişlerdir[137]. Kingsley L. ve ark.(2013), lignoselülozik biyokütlelerin kimyasal bileşimi üzerine NaOH etkisi ile ilgili araştırmalarında %1'lik NaOH oranı uygun bulmuşlardır[138]. Ziyu Wang ve ark.(2010) bermuda otlarını hidroliz ettikleri çalışmada %0,5 ile %3 arasında NaOH konsantrasyonlarını çalışmışlar %0,5 oranının lignin giderimi için uygun olmadığı %1 ün üzerinde ise yüksek verim

alındığını bildirmişlerdir. Aynı zamanda çalışmalarında %2-3 NaOH oranları arasında belirgin bir farklılığın olmadığını açıklamışlardır[139].

4.4.2. Sakkarifikasyon Üzerine pH Etkisi

Sakkarifikasyon çalışmasında GP-CS-Fe₃O₄ boncuklar üzerine immobilize edilen selüloz tarafından belirli zaman dilimlerinde alınan UV-Vis spektrum sonuçları üzerine pH'nin etkisi **Şekil 4.22.**'de gösterilmektedir.

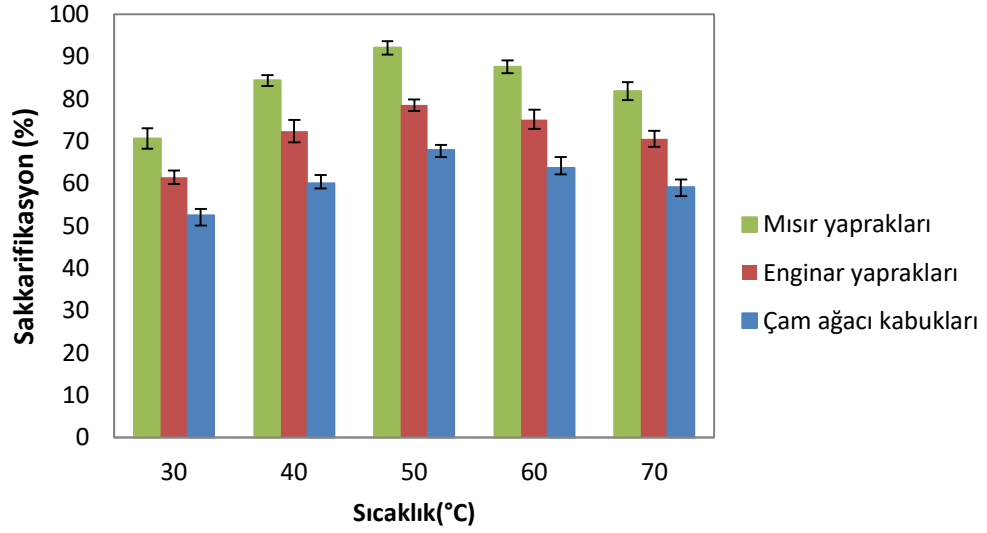


Şekil 4.22. pH değerinin sakkarifikasyon üzerine etkisi

Çalışmamızda sakkarifikasyon veriminin en yüksek olduğu pH değeri 5,0 olarak bulundu. Bu pH değeri aynı zamanda selüloz enziminin optimum pH'ı ile aynıdır. Tanara Sartori ve ark(2015) yaptıkları çalışmada iki farklı selüloz enzimini kullanarak lignoselülozik atıkların enzimatik sakrifikasyonunu gerçekleştirmişler ve enzim aktivitesinin en yüksek olduğu pH değerini iki enzim için pH 4,8 ve 5,2 olduğunu bildirmişlerdir[140]. Sulaiman A. Alrumman(2016) selülozik hurma atıklarının glikoz ve laktik aside enzimatik sakrifikasyon ve fermentasyonu çalışmasında optimum pH değerini 5,0 olarak rapor etmiştir[141].

4.4.3. Sakkarifikasyon Üzerine Sıcaklık Etkisi

Sakkarifikasyon çalışmasında GP-CS-Fe₃O₄ boncuklar üzerine immobilize edilen selüloz tarafından belirli zaman dilimlerinde alınan UV-Vis spektrum sonuçları üzerine sıcaklığın etkisi Şekil 4.23’da gösterilmektedir.



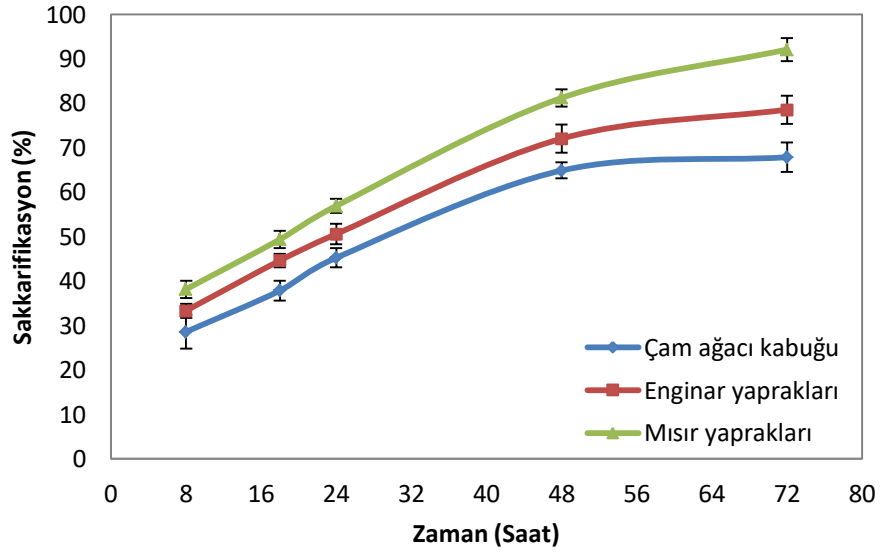
Şekil 4.23. Sıcaklık değerinin sakkarifikasyon üzerine etkisi

Çalışmamızda sakkarifikasyon veriminin en yüksek olduğu sıcaklık değeri 50°C olarak bulundu. Jordan ve ark.(2011) yapmış oldukları çalışma neticesinde serbest selüloz ve magnetit nanoparçacıklar üzerine immobilize ettikleri selülazın mikrokristalli selülozun hidrolizi için optimum sıcaklığı 50 °C olduğunu bildirmişlerdir[142]. Bu sonuçlar yapmış olduğumuz çalışmamızı destekler niteliktedir. Tanara Sartori ve ark(2015) yaptıkları çalışmada iki farklı selüloz enzimini kullanarak lignoselülozik atıkların enzimatik sakkarifikasyonunu gerçekleştirmişler ve enzim aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık değerini iki enzim için 40°C ve 50 °C olduğunu bildirmişlerdir[143].

4.4.4. Sakkarifikasyon Üzerine Reaksiyon Süresinin Etkisi

GP-CS-Fe₃O₄ boncuklar üzerine immobilize edilen selüloz tarafından 8, 18, 24, 48 ve 72 saat zaman dilimlerinde alınan UV-Vis spektrum sonuçları etkili bir

sakkarifikasyonun gerçekleştiğini göstermektedir(Şekil 4.24.). 72 saatlik sakkarifikasyon işlemi sonucunda boncukların iyi şekilli ve düzenli yapı gösterdiği ve aynı zamanda tekrarlanan seri reaksiyonlar için uygun oldukları görüldü. Sakkarifikasyon işlemi sonrası yapılan hesaplamalar neticesinde mısır yapraklarının, enginar yapraklarının ve çam ağacı kabuklarının sakkarifikasyon oranının sırasıyla % 92, % 79, % 68 olduğu belirlendi. Glikozun geri kazanımında meydana gelen bu farklılık lignoselülozik ürünlerin içeriğindeki lignin ve selüloz miktarındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.24. Kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen selüloz ile zamana karşı sakkarifikasyon grafiği (İmmobilize enzim miktarı: 300 mg pH: 5.0 Reaksiyon süresi: 72 saat, Karıştırma hızı: 120 rpm, Sıcaklık: 50°C)

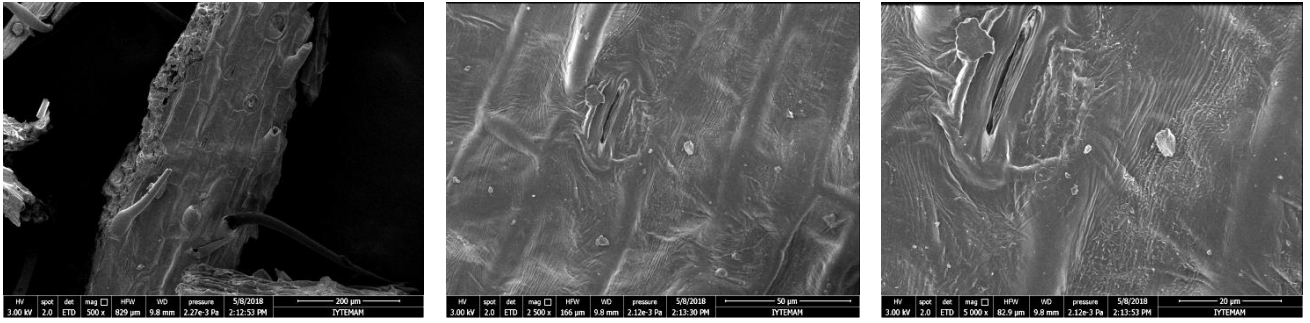
Belirli bir zaman diliminden sonra sakkarifikasyon yüzdesinin artmayıp belirli bir düzeyde kaldığı görüldü. Roberto Valenzuela ve ark.(2012) yapmış oldukları sakkarifikasyon çalışmasında glikozun en yüksek verimine 72 saatte ulaşıldığını ve I-G ile takviye edilmiş selüloz için elde edilen pulp bazında ortalama hidroliz verimlerinin WS-SE, EG-H ve EG-HA için sırasıyla % 76,1, % 83,6 ve % 75,6 olduğunu bildirmişlerdir[144]. Wang ve ark. (2011) ham Trichoderma kullanılarak alkali ön işleme tabi tutulan şeker kamışı küspesinin 50 ° C'de en yüksek % 37,29 hidroliz oranına sahip olabileceğini bildirmişlerdir[145]. Sulaiman A. Alrumman(2016) selülozik hurma atıklarının glikoz ve laktik aside enzimatik sakkarifikasyon ve fermentasyonu çalışmasında sakkarifikasyon yüzdesini % 71,03 olarak rapor etmiştir[146]. Reinu E Abraham ve ark(2014), ön işlemden geçirilmiş

kenevir biyokütlesinin enzimatik sakrifikasyonunu arttırmak için manyetik nanoparçacık immobilize selülozların uygunluğunu araştırdıkları çalışmada kenevir biyokütlesinin (HHB) serbest ve immobilize enzimler için sırasıyla % 89 ve % 93 oranında 48 saatte maksimum hidrolize uğradığını bildirmişlerdir[147].

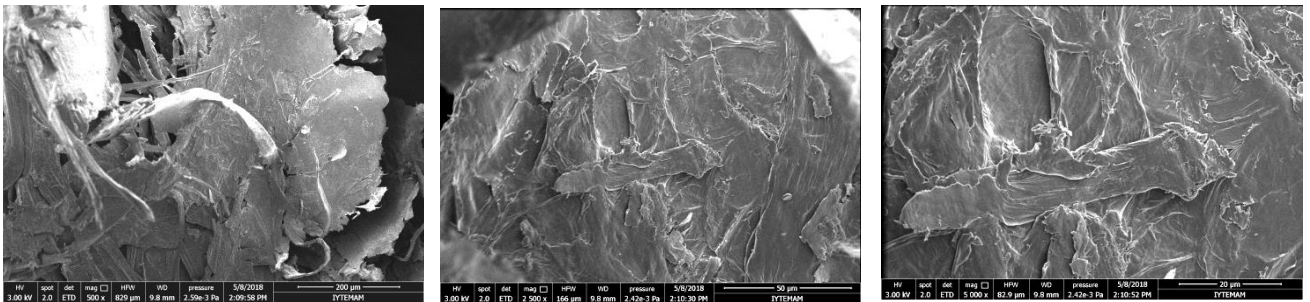
Jason Jordan(2009),manyetik nanopatiküller üzerine yaptığı selüloz enzimi immobilizasyonu ile ilgili çalışmada bu durumu glikoz ve sellobiyoz birikiminin, enzim kompleksi içerisinde endoglukanların performansını inhibe ettiği bu nedenle, 24 saat sonra reaksiyonu durdurmanın ve daha sonra enzim bağlı nanoparçacıkların geri dönüşümünün sağlanmasının daha iyi bir yaklaşım olabileceğini bildirmiştir[148].

4.4.5. Lignoselülozik Atıkların ve Lignoselülozik Atıkların Sakrifikasyonu Sonrası Meydana Gelen Ürünlerin Karakterizasyonu

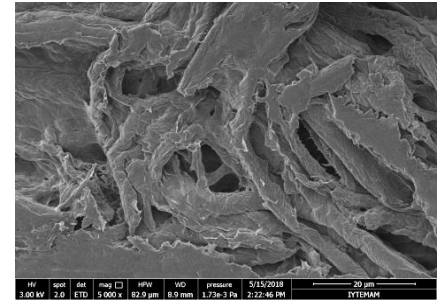
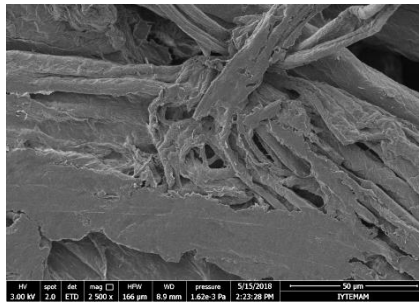
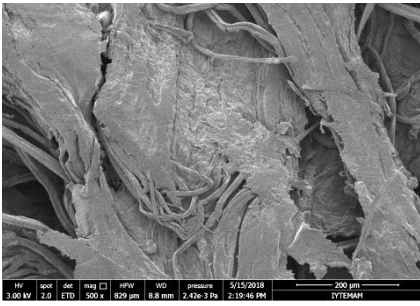
İşlem görmemiş, alkali ön işlem görmüş ve genipin ve glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen selüloz enzimi ile hidrolize edilmiş lignoselülozik atıkların SEM görüntüleri Şekil 4.25. 'de gösterildi.



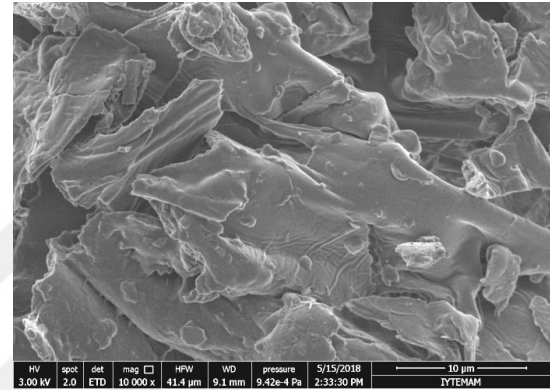
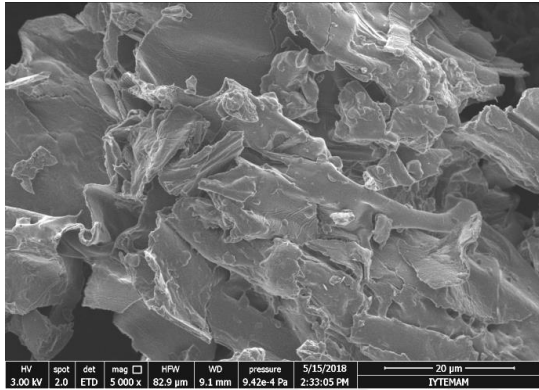
a)



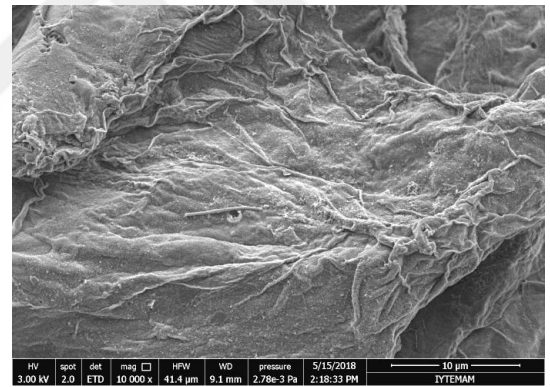
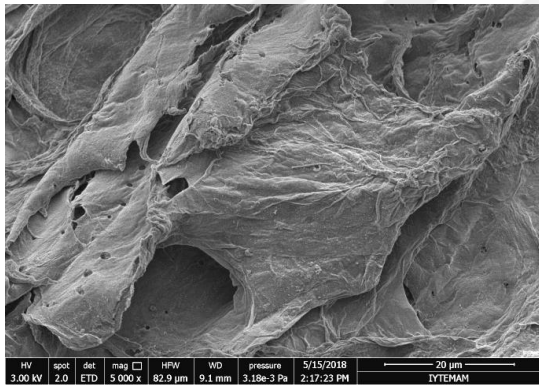
b)



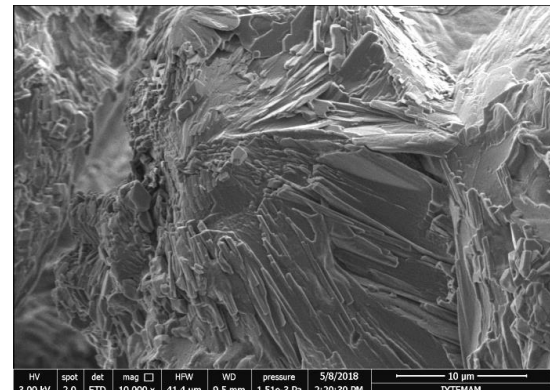
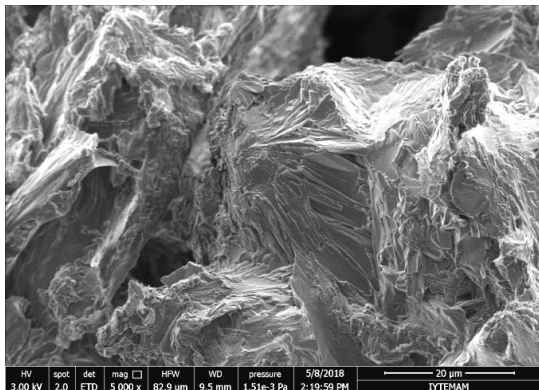
c)



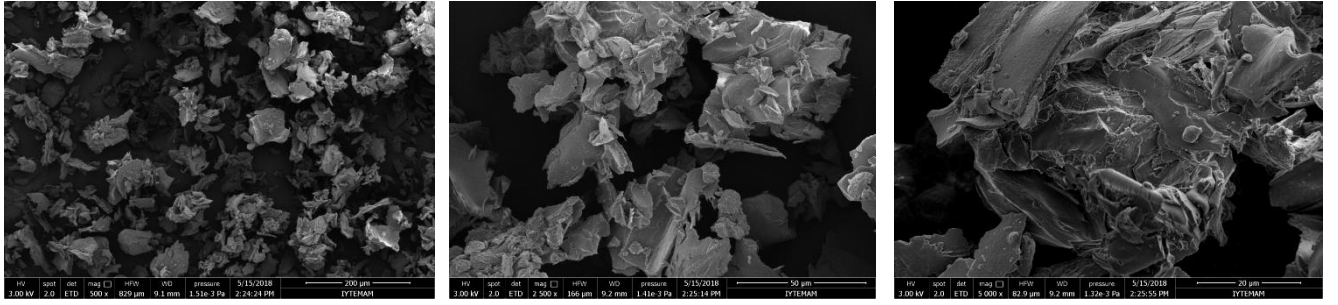
d)



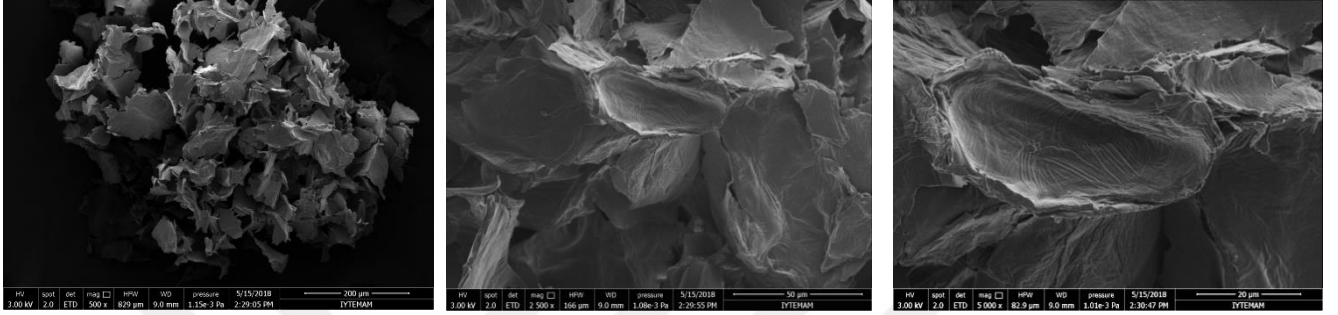
e)



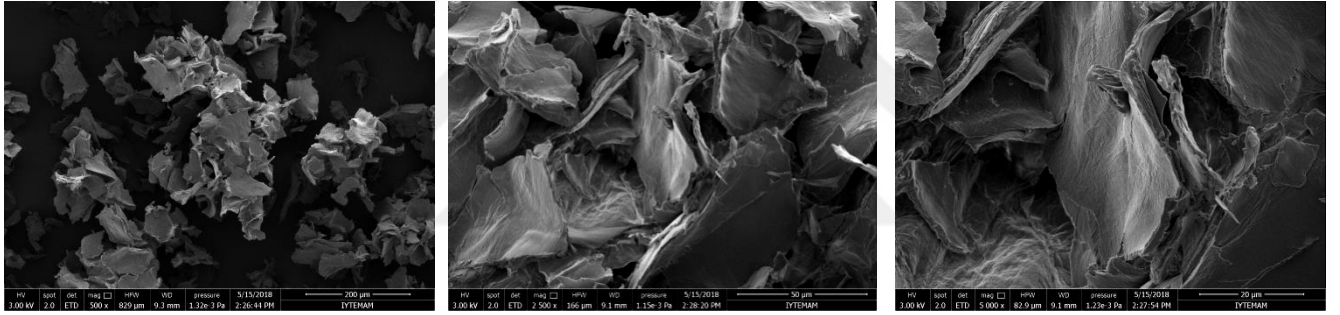
f)



g)



h)



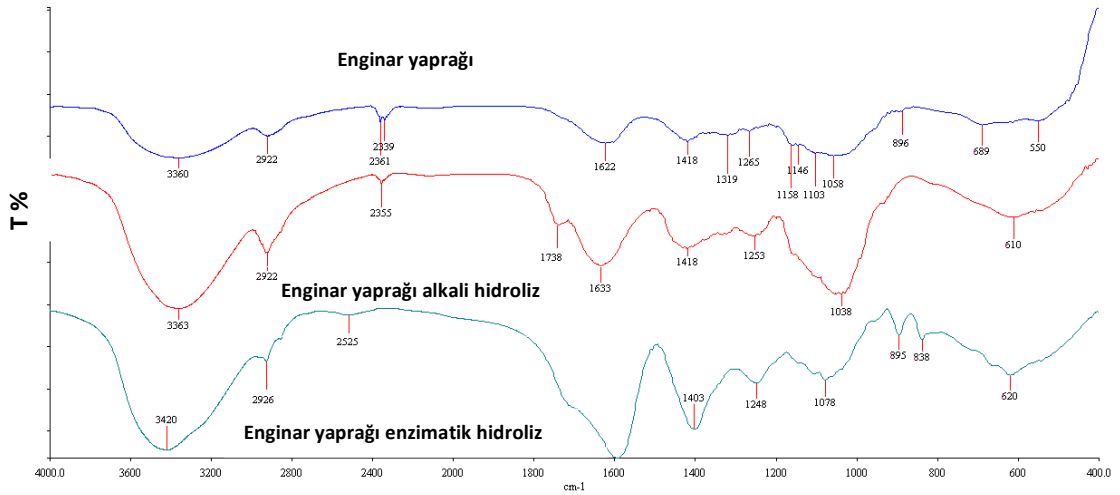
i)

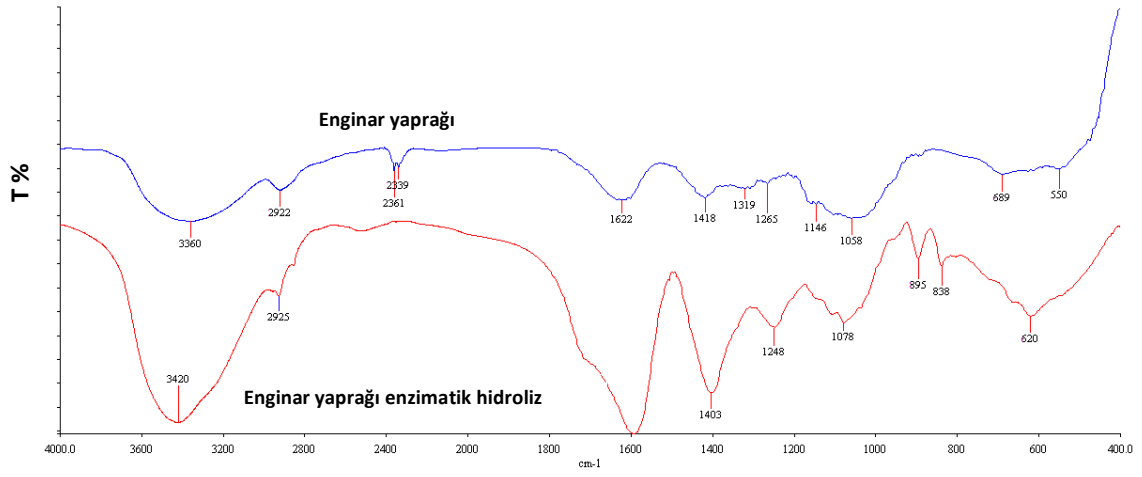
Şekil 4. 25. SEM görüntüleri Mısır yaprağı (işlem görmemiş)(a: 500×,2500×,5000×), Alkali işlem görmüş mısır yaprağı(b: 500×, 2500×, 5000×),Sakkarifikasyon sonrası mısır yaprağı(c: 500×, 2500×, 5000×). Enginar yaprağı (işlem görmemiş)(d: 5000×, 10 000×), Alkali işlem görmüş enginar yaprağı(e: 5000×, 10 000×), Sakkarifikasyon sonrası enginar yaprağı(f: 5000×, 10 000×), Çam ağacı kabuğu(işlem görmemiş)(g: 500×,2500×,5000×), Alkali işlem görmüş çam ağacı kabuğu(h: 500×, 2500×, 5000×),Sakkarifikasyon sonrası çam ağacı kabuğu (ı: 500×, 2500×, 5000×).

Elde edilen SEM görüntülerinde işlem görmemiş biyokütle yapılarının kompakt ve sert olduğu, ancak ön işlemden sonra bu yapıların kırıldığı ve açığa çıktığı ve lignoselülozik yapıların NaOH ile ön muamelesi sonrası selüloz enziminin kolay erişebildiği bir formda değişikliğe uğradığı görüldü. Enzim hidrolizinden sonra

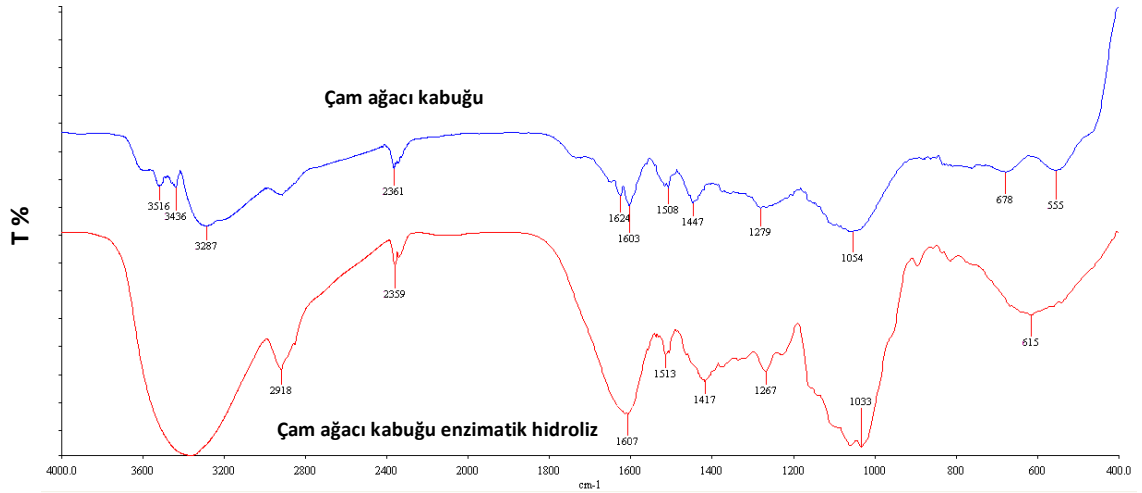
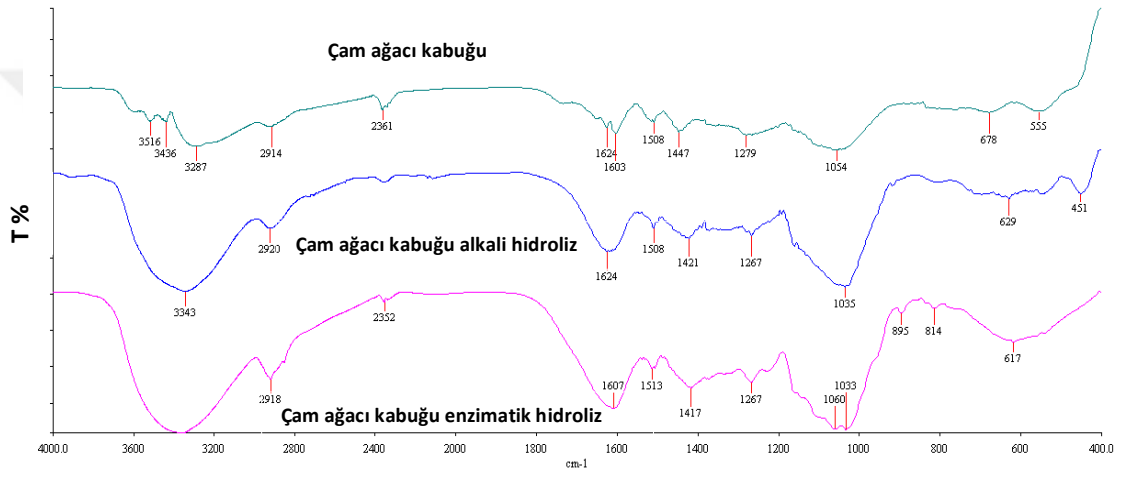
ise, biyokütle rijit yapısının bozulduğu ve ön işlemden sonra elde edilen belirgin özelliklerin aşınmasına işaret ederek küçük parçalara ayrıldığı gözlemlendi. Hidrolizin yüksek oranda gerçekleşmediği örneklerde ise daha çok yüzeysel aşınmaların gerçekleştiği SEM görüntüleri ile ortaya çıktı.

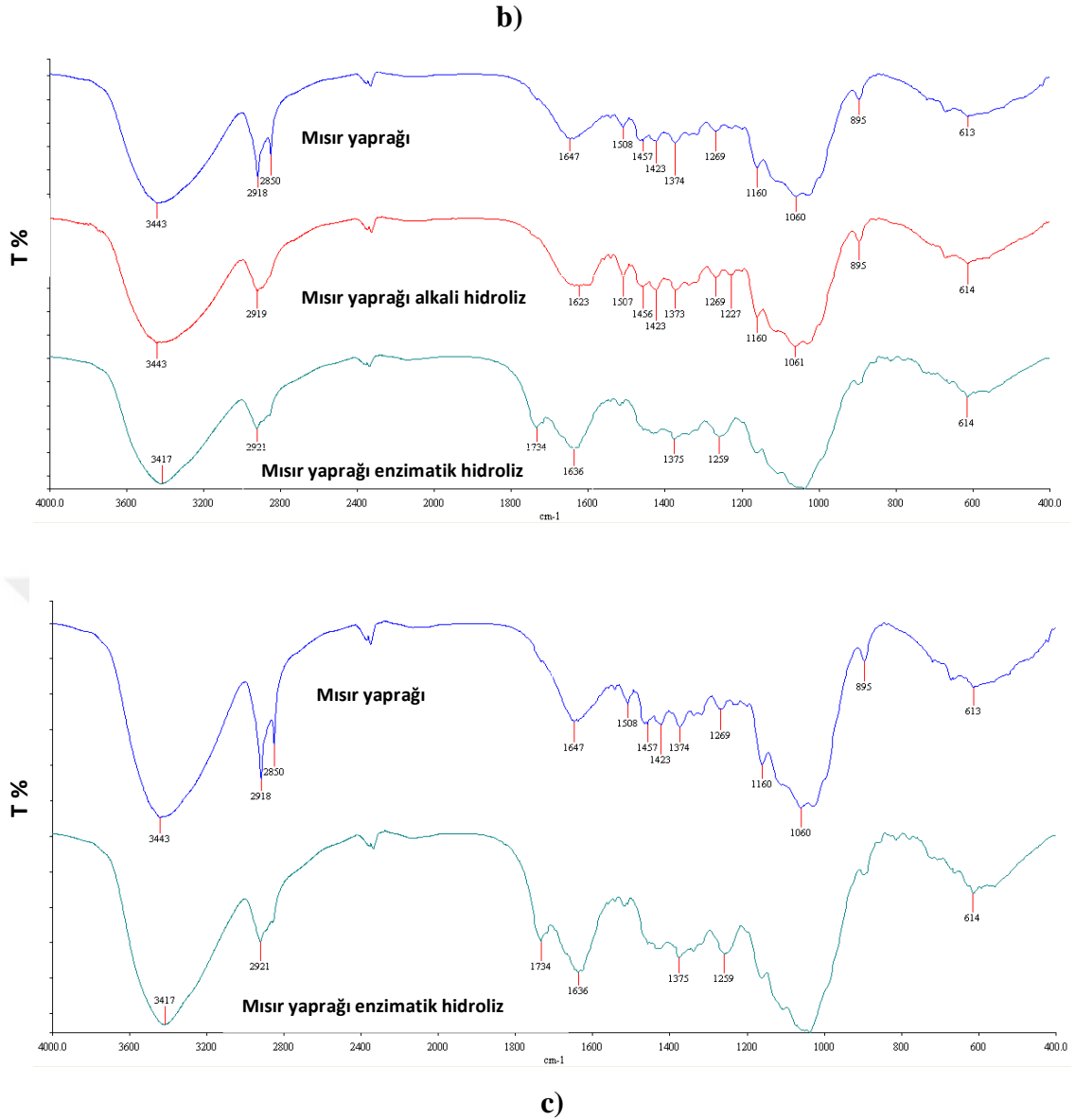
Yuanyuan Yu ve ark.(2014), yaptıkları çalışma ile enzimle muamele edilmemiş numunede birçok çukıntı ve pürüzlü bir yapı görülürken selüloz ile muamele işlemlerinden sonra kumaş yüzeylerinin daha pürüzsüz hale geldiğini, pamuk liflerinin bozulmasının oldukça ciddi olduğunu ve liflerde birçok çatlak belirlediğini bildirmişlerdir[149]. Reinu E Abraham ve ark.(2016), yaptıkları çalışmanın sonuçları çalışmamızda elde edilenlere benzer bulunmuştur[150]. Shivani Sharma ve ark(2016) buğday samanının alkali yöntemle hidrolizi ile ilgili çalışmalarında ön muameleden sonra, lignoselülozik biyokütlenin hücre çeperi yapısının bozulduğunu bildirmişlerdir[151]. B.Bharathiraja ve ark(2017) lignoselülozik atıkların hidrolizi ile ilgili çalışmada ön muamele sırasında meydana gelen morfolojik değişiklikleri gözlediklerini, lignoselülozik atıklarda çatlak gelişimi ve gözeneklilikteki artışın gerçekleştiğini ve enzimatik ön işlemin, şeker üretiminin arttırdığını rapor etmişlerdir[152].





a)





Şekil 4. 26. Hidrolizde kullanılan enginar yaprakları(a), çam ağacı kabuğu(b) ve mısır yapraklarına(c) ait IR Spektrumlarının karşılaştırılması

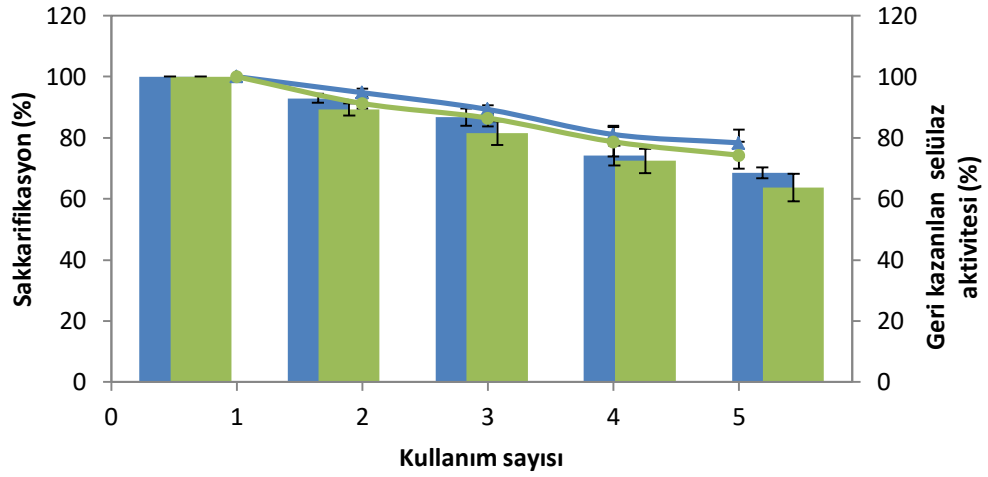
Spektrumlarda görüldüğü gibi(Şekil 4.26.) $3347-3374\text{ cm}^{-1}$ arasında gözlenen geniş ve şiddetli band O-H titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Bu band selüloz matrisinde tekrarlayan birimler arasında hidrojen bağlarıyla bir arada bulunan O-H gruplarına aittir. $2890-2915\text{ cm}^{-1}$ arasındaki band C-H; $1000-1160\text{ cm}^{-1}$ arasındaki band ise C-O titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 895 cm^{-1} 'de gözlenen band ise selülozdaki β -glikozidik bağlardan kaynaklanır[153]. $1370-1375\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen band selülozdaki C-H gerilmelerinden ileri gelmektedir[154]. 1640 cm^{-1} deki band C=O fonksiyonel grubuna ait banttir. 1700 cm^{-1} 'lerde gözükken bantın hemiselülozik

yapıya ait C=O fonksiyonel grubuna ait bant olarak düşünülebilir [155]. Atık hidrolizinde kullanılan biyokütlelerde lignin dönüşümü sonucunda katı fazı oluşturan bileşikler meydana gelmekte ve parçalanmadan kalan bir kısım lignin de yine katı faz içerisinde yer almaktadır. Orijinal lignine ait FTIR spektrumunda karakteristik olarak 2800–3000 cm^{-1} piki gözlenmektedir[156]. Bu çalışmada elde edilen örneklerin Şekil 4.23.'de verilen FTIR spektrumlarına bakıldığında 2800–3000 cm^{-1} aralığında sıcaklık artmasıyla bant şiddetlerinde azalma meydana geldiği görülmektedir. Bu sonuç yakın kritik sıcaklıkta örneklerin yapısında bulunan ligninde parçalanmanın gerçekleştiğini göstermektedir. Lignoselülozik atıkların FTIR spektrumlarında gözlenen bazı farklılıklar bu lignoselülozik materyallerden elde edilen lignin fraksiyonlarının farklı yapılarda olduğunu göstermektedir.

Şekilde 3400 cm^{-1} 'de tepe noktası olan geniş O-H gerilme, 2928 cm^{-1} 'de alifatik C-H gerilmeleri, 1627 cm^{-1} 'de adsorbe olan suya ait H-O-H deformasyon, 1200- 920 cm^{-1} 'lerde çeşitli C-O, C-C gerilme veya C-O-H eğilme bantları hemiselülozlarda tipik olarak görülen bantlardır [157]. 1508 cm^{-1} 'deki düşük şiddetli bant ksilana bağlı düşük miktardaki ligninin varlığını göstermektedir. 1075 cm^{-1} 'deki bant C-O-H eğilmesidir ve dallanma derecesi tarafından oldukça kuvvetli şekilde etkilenir. 898 cm^{-1} 'deki keskin bant β glikosidik bağları göstermektedir [158].

4.4.6. Sakkarifikasyonda Kullanılan İmmobilize Selülazın Tekrar Kullanılabilirliği

Sakkarifikasyon açısından değerlendirildiğinde mısır yaprakları için genipin ile aktive edilen kitosan boncuklardaki aktivite 5 kullanım sonunda %78 oranında korurken, glutaraldehit ile aktive edilen boncuklardaki aktivitenin 5 kullanım sonunda % 74 oranında korunduğu görüldü. Bu çalışma genipin ile aktive edilmiş kitosan boncukların tekrar kullanılabilirliğinin glutaraldehite göre daha iyi olduğu sonucunu ortaya koymaktadır(Şekil 4.27.). Sakkarifikasyon çalışmasında genipin ve glutaraldehit ile aktive edilen immobilize boncukların 3 kullanım sonrası sakkarifikasyon oranının düştüğü görüldü.



Şekil 4.27. Sakkarifikasyon reaksiyonunda GA-CS-Fe₃O₄(●) ve GP-CS-Fe₃O₄(▲) boncukların tekrar kullanılabilirliği (Lignoselülozik atık: Mısır yaprakları, İmmobilize enzim miktarı: 300 mg pH: 5.0 Reaksiyon süresi:72 saat, Karıştırma hızı:120 rpm, Sıcaklık: 50°C)

Sakkarifikasyon çalışmasında genipin ve glutaraldehit ile aktive edilen boncukların 5 kullanımdan sonra sonunda taşıyıcı morfolojisi değişmemiştir ve boncuklar hala iyi şekilli ve düzenli yapı göstermiştir. Aynı zamanda tekrarlanan seri reaksiyonlar için uygun oldukları görüldü. Bu sonuç, kovalent yöntemine göre immobilizasyon yapıldığında selüloz ile polimer arasında etkileşimler kuvvetli olduğundan tekrar kullanılabilirlik özelliğinin iyi sonuçlar vereceğine işaret etmektedir. İmmobilize enzimlerin aktivitelerinde önemli bir azalma olmadan gösterdikleri bu tekrar kullanılabilirlik özelliği, endüstriyel uygulamaların ekonomisi açısından oldukça önemlidir.

Chengzhou Li ve ark(2007), immobilize edilmiş lipozom bağlı selülazın ile yapılan sakkarifikasyon çalışmasında verimin ilk çalışmada % 85 olduğu beş kullanım sonrası verimin % 50'sinde sürekli bir düşüş gözlemlendiğini bildirmişlerdir[159].

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada manyetik partiküller kullanılarak kitosan kompozit boncuklar sentezlendi. Sentezlenen kitosan kompozit boncuklarının karakterizasyonu yapıldı.

Çalışmanın hem sentez aşamasında hemde katalitik aktivite araştırmaları sırasında katalizörümüzün manyetikliğinden faydalanılarak bir mknatıs yardımı ile katalizör reaksiyon ortamından kolayca ayrıldı.

Hazırlanan kitosan ve kitosan kompozit boncuklar üzerine *Trichoderma reesei* ATCC 26921 selüloz enzimi farklı 2 kovalent bağlama ajanı(genipin ve glutaraldehit) kullanılarak başarıyla immobilize edildi. Enzimin immobilizasyon verimi, genipin ve glutaraldehit aktive edilmiş manyetik kitosan boncukları için sırasıyla % 84 ve % 77 olarak bulundu. Enzimin geri kazanılan aktivitesi ise genipin ve glutaraldehit aktive edilmiş manyetik kitosan boncukları için sırasıyla % 82 ve % 76 olarak belirlendi. Bu sistemlerin aktivite geri kazanımlarının karşılaştırılması, genipinin, selülozun immobilizasyonunda etkin bir şekilde kullanılabildiğini gösterdi, bu çapraz bağlanma ajanının daha az toksik olması nedeniyle glutaraldehite alternatif olabileceği sonucuna varıldı.

Serbest ve immobilize selülozun optimum koşulları belirlenerek ve kararlılık deneyleri yapıldı. Serbest ve immobilize enzimin optimal pH ve sıcaklık koşulları sırasıyla pH 5.0 ve 50 °C bulundu. Serbet ve immobilize selüloz için optimum pH ve sıcaklığın değişmediği görüldü.

Bu çalışmalarda çeşitli aktivatör ve inhibitör maddelerin selüloz enzim aktivitesine etkisine bakıldığında CaCl_2 'nin aktivatör etki yaptığı görüldü sürfaktanların ise genel olarak selüloz aktivitesini inhibe ettiği belilendi. Genipin ve glutaraldehit ile aktive edilen kitosan kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen selülozun deterjanlardan %1'lik SDS ile muamelesi sonrası geri kazanılan aktivitenin sırasıyla %89 ve % 86 olması enzimin deterjan endüstrisi içinde kullanılabilirliğini ortaya koymuştur.

Çalışmanın son aşamasında ise genipin ve glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen selüloz enzimi lignoselülozik atıkların sakkarifikasyonunda kullanıldı. Atıklar üzerinde yapılan lignin miktarı hesaplamaları sonucunda çam ağacı kabukları, enginar yaprakları ve mısır yaprakları için lignin miktarı sırasıyla %35, %21 ve %16 olarak hesaplandı. Sakkarifikasyon işlemi sonrası yapılan hesaplamalar neticesinde mısır yapraklarının %92, enginar yapraklarının %79, çam ağacı kabuklarının ise % 68 sakkarifikasyon oranı saptandı. Atıkların sakkarifikasyonu sırasında kullanılabilen ön-muamele ve hidroliz yöntemleri oldukça çeşitlilik göstermektedir. Bunun temelinde hammadde kaynağı olarak oldukça farklı yapı ve içeriğe sahip lignoselülozik biyokütlelerin kullanılması yatmaktadır. Bundan dolayı farklı ön-muamele ve hidroliz koşulları, kullanılacak hammadde çeşiti göz önüne alınarak proses basamakları ve gerekleri deneysel yöntemlerle tespit edilmelidir.

Çalışmamızda bu nedenle ön muamele için farklı konsantrasyonlarda NaOH ve farklı sıcaklıklarda çalışmalar yürüldü. Yapılan çalışmalar neticesinde sakkarifikasyon işlemi için en uygun NaOH konsantrasyonunun %1 ve en uygun sıcaklığın 100°C olduğu belirlendi.

Sakkarifikasyon çalışmaları için optimum sıcaklık ve pH değerlerinin enzimin optimum sıcaklık ve pH değerleri ile uyumlu olduğu görüldü. Sakkarifikasyon açısından değerlendirildiğinde genipin ile aktive edilen kitosan boncuklardaki aktivite 5 döngü sonunda %78 oranında korurken, glutaraldehit ile aktive edilen boncuklardaki aktivitenin 5 döngü sonunda % 74 oranında korunduğu görüldü. Bu çalışma genipin ile aktive edilmiş kitosan boncukların tekrar kullanılabilirliğinin glutaraldehite göre daha iyi olduğu sonucunu ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Xie, T., Wang, A. M., Huang, L. F., Li, H. F., Chen, Z. M., Wang, Q. Y., et al. Recent advance in the support and technology used in enzyme immobilization. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8, 4724–4733.
- [2] Farag M. Saieb, Salama A. Boaker, Hasham M. El-komy, Ahmed Issa. Production and Estimation of Keratinase by Immobilized and Free *Bacillus licheniformis* (St. 24). *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2015; 3(5):119-122.
- [3] Cell and enzyme immobilization; A. Tanaka, T. Kawamoto, *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2nd Edition, American Society for Microbiology (A. L. Demain & J. E. Davies, eds.) 1999pp. 94-102.
- [4] Abraham et al. *Biotechnology for Biofuels*; Suitability of magnetic nanoparticle immobilised cellulases in enhancing enzymatic saccharification of pretreated hemp biomass, 2014, 7:90.
- [5] Ju, H. Y., Kuo, C. H., Too, J. R., Huang, H. Y., Twu, Y. K., Chang, C. M. J., et al. Optimal covalent immobilization of α -chymotrypsin on Fe_3O_4 -chitosan nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2012, 78, 9–15.
- [6] Hassan Mohamed E, Tamer Tamer M, Omer Ahmed M *Methods of Enzyme Immobilization International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*;2016,7(6); 385-392
- [7] A. Telefoncu, Ed. *İmmobilize enzimler*, Enzimoloji İzmir, 1997, S.193-248.
- [8] Mitz Ma. New insoluble active derivative of an enzyme as a model for study of cellular metabolism. *Science*. 1956 Jun 15;123(3207):1076–1077. Ghose TK: Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem* 1987,59:257–268.
- [9] M. Nelson and Edward G. Griffin *Journal of the American Chemical Society*, 1916, 38 (5), 1109-1115.
- [10] Flor PQ, Hayashida S. Production and Characteristics of Raw Starch-Digesting Glucoamylase O from a Protease-Negative, Glycosidase-Negative *Aspergillus awamori* var. kawachi Mutant *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, 45(3):905-12.
- [11] Dolapchiev LB, Sulkowski E, Laskowski M Sr. Purification of exonuclease (phosphodiesterase) from the venom of *Crotalus adamanteus*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1974, Nov 6;61(1):273-81.
- [12] Christina Rother, Bernd Nidetzky, *Enzyme Immobilization by Microencapsulation: Methods, Materials, and Technological Applications*, 2014.
- [13] Kathrin Castiglione and Dirk Weuster-Botz, *Enzymatische Prozesse Bioprozesstechnik*, 2018, 403-447.
- [14] Lee, C. H. et al. “ Mesoporous Materials for Encapsulating Enzymes.” *Nanotoday*, 2009, 4: 165-179.
- [15] Sumitra Datta, L. Rene Christena, and Yamuna Rani Sriramulu Rajaram *Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials 3 Biotech*, 2013 Feb; 3(1): 1–9.
- [16] Kenneth B. Guiseley *Chemical and physical properties of algal polysaccharides used for cell immobilization Enzyme and Microbial Technology Volume 11, Issue 11, November 1989, Pages 706-716.*
- [17] Guo Bao Lin and Peter X. MA *Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review Sci China Chem*, 2014 Apr 1; 57(4): 490–500.

- [18]George Hasegawa, Kazuyoshi Kanamori, Kazuki Nakanishi and Teiichi Hanada. A New Route to Monolithic Macroporous SiC/C Composites from Biphenylene-bridged Polysilsesquioxane Gels. *Chemistry of Materials* 2010, 22 (8), 2541-2547.
- [19]Kilinç A, Teke M, Onal S, Telefoncu A. Immobilization of pancreatic lipase on chitin and chitosan. *Prep Biochem Biotechnol*, 2006;36(2):153-63.
- [20]S. Islam, M. A. Rahman Bhuiyan, M. N. Islam Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering *Journal of Polymers and the Environment* September 2017, Volume 25, Issue 3, pp 854–866.
- [21]Jordan J, Kumar CSSR, Theegala C: Preparation and characterization of cellulase-bound magnetite nanoparticles. *J Mol Catal B Enzym*, 2011, 68:139–146.
- [22]Khoshnevisan K, Bordbar A-K, Zare D, Davoodi D, Noruzi M, Barkhi M, Tabatabaei M: Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability, *Chem Eng J* 2011, 171:669–673.
- [23]RosanaGoldbecka, Mayla M.Ramos, Gonçalo A.G.Pereir, FranciscoMaugeri-Filho Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates *Bioresource Technology* Volume 128, January 2013, Pages 797-803.
- [24]Hideno, A., Inoue, H., Tsukahara, K., Fujimoto, S., Minowa, T., Inoue, S., Endo, T., Sawayama, S., Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Bioresour. Technol.*, 2009, 100, 2706–2711.
- [25]Abraham RE, Barrow CJ, Puri M: Relationship to reducing sugar production and scanning electron microscope structure to pretreated hemp hurd biomass (*Cannabis sativa*). *Biomass Bioenergy* 2013, 58:180–187.
- [26]Pandit NP, Maheshwari SK Optimization of Cellulase Enzyme Production from Sugarcane Pressmud Using Oyster Mushroom - *Pleurotus Sajor- Caju* by Solid State Fermentation. *J Bioremed Biodegrad*, 2012, 3:140.
- [27]Nema, N., Alamir, L. and Mohammad, M. Production of cellulase from *Bacillus cereus* by submerged fermentation using corn husks as substrates, *International Food Research Journal*, 2015, 22(5): 1831-1836.
- [28]H. Ariffin, N. Abdullah, M.S. Umi Kalsom, Y. Shirai and M.A. Hassan Production and characterisation of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *International Journal of Engineering and Technology*, Vol. 3, No. 1, 2006, pp. 47-53.
- [29]Serkan H. Burhan A. Isolation of Thermophilic Amylase and Cellulase (Multienzymes) Producing *Bacillus* Sp. Strains, *Enzyme Production, Characterization And Investigation of Biotechnological Applications Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi* Yıl:2012 Cilt:28-3
- [30]Thilini Alahakoon, Jun Wei Koh, Xiang Wen Cindy Chong & Wallace Tse Loong Lim Immobilization of cellulases on amine and aldehyde functionalized Fe₂O₃ Magnetic Nanoparticles, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 42:3, 234-248.
- [31]R. Sharada, G. Venkateswarlu, S. Venkateshwar and M. Anand Rao Production of cellulase- A review *international journal of pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences IJPCBS*, 2013, 3(4), 1070-1090.
- [32]Fernanda Miranda Zoppas, Álvaro Meneguzzi, Francine Tramontina Alternatives for Cellulase Production in Submerged Fermentation with Agroindustrial Wastes *International Journal of Modern Engineering Research (IJMER)* Vol. 3, Issue. 4, Jul. -Aug. 2013 pp-2374-2381.

- [33]Zhang Y.H.P., Lynd L.R., "Toward An Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems", *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, 88, 797–824.
- [34]Karlsson J, Saloheimo M, Siika-Aho M, Tenkanen M, Penttilä M, Tjerneld F. Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*. *Eur J Biochem.* 2001 Dec;268(24):6498-507.
- [35]K. E. Eriksson and T. M. Wood, in "Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components" (T. Higuchi, ed.), Academic Press, New York, 1985, p. 469.
- [36]Atalla, R.H., and VanderHart, D.L. Studies on the structure of cellulose using raman spectroscopy and solid state ¹³NMR. In *Cellulose and Wood: Chemistry and Technology*, C. Schuerch, ed (New York: Wiley Interscience), 1989, pp. 169-188.
- [37]Mosier NS, et al. Industrial scale-up of pH-controlled liquid hot water pretreatment of corn fiber for fuel ethanol production. *Appl Biochem Biotechnol*, 2005, 125(2):77-97.
- [38]Riin Kont, Mihhail Kurašin, Hele Teugjas, and Priit Väljamäe Strong cellulase inhibitors from the hydrothermal pretreatment of wheat straw. *Biotechnol Biofuels.* 2013; 6: 135.
- [39]Jakub Zdarta, Artur Jedrzak, Łukasz Klapiszewski and Teofil Jesionowski. Immobilization of Cellulase on a Functional Inorganic–Organic Hybrid Support: Stability and Kinetic Study. *Catalysts* 2017, 7, 374.
- [40]Hegedüs I, Hancsók J, Nagy E: Stabilization of the cellulase enzyme complex as enzyme nanoparticle. *Appl Biochem Biotechnol* 2012, 168:1372–1383.
- [41]Kuhad RC, Gupta R, Singh A Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Res* 2011:1–10.
- [42]Rajeev K Sukumaran, Reeta Rani Singhania and Ashok Pandey Microbial cellulases Production, applications and challenges *Journal of Scientific Endustrial Research* Vol. 64, November 2005, pp. 832-844.
- [43]Haki GD1, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol.* 2003 Aug;89(1):17-34.
- [44]M.M.C.N. Soares, R. Da Silva, E.C. Carmona and E. Gomes Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2001,17: 79-82.
- [45]M.K. Bhat Cellulases and related enzymes in biotechnology *Biotechnology Advances* 18, 2000, 355–383.
- [46]Gübitz GM, Paulo AC. New substrates for reliable enzymes: enzymatic modification of polymers. *Curr Opin Biotechnol.* 2003 Dec;14(6):577-82.
- [47]Shirai T, Ishida H, Noda J, Yamane T, Ozaki K, Hakamada Y, Ito S Crystal structure of alkaline cellulase K: insight into the alkaline adaptation of an industrial enzyme. *J Mol Biol*, 2001, 310:1079–1108.
- [48]Bhat MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol Adv.* 2000 Aug;18(5):355-83.
- [49]Ramesh Chander Kuhad, Rishi Gupta, Ajay Singh Microbial Cellulases and Their Industrial Applications *Enzyme Res.* 2011; 2011: 280696.
- [50]Kim, S. J., Kim, J. K., Lee, D. U., Kwak, J. H., & Lee, S. M. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 635, 188–193.
- [51]Muzzarelli, R. A. A. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 77, 1–9.
- [52]Limayem, A. and Ricke, S.C. Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production: Current Perspectives, Potential Issues and Future Prospects. *Progress in Energy & Combustion Science*, 2012, 38, 449-467.

- [53]Hendriks, A.T. and Zeeman, G. Pretreatments to Enhance the Digestibility of Lignocellulosic Biomass. *Bioresource Technology*, 2009, 100, 10-18.
- [54]Kubicek CP: Systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*. *J Biotechnol* 2013, 163:133–142.
- [55]Marimuthu Jeya, Ye-Wang Zhang, In-Won Kim, Jung-Kul Lee Enhanced saccharification of alkali-treated rice straw by cellulase from *Trametes hirsuta* and statistical optimization of hydrolysis conditions by RSM *Bioresource Technology* 100 2009, 5155–5161.
- [56]Mosier NS, Ladisch CM, Ladisch MR. Characterization of acid catalytic domains for cellulose hydrolysis and glucose degradation. *Biotechnol Bioeng*. 2002 Sep 20;79(6):610-8.
- [57]Howard RL, Abotsi E, Rensburg JVEL, and Howard S, Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production, *African Journal of Biotechnology*, 2003, 2(12): 602-619.
- [58]Zhang YH1, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng*. 2004 Dec 30;88(7):797-824.
- [59]Sun Y, Cheng J Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol*. 2002 May;83(1):1-11.
- [60]Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 1959, 31, 426-428.
- [61]Ryousuke T., Yoshio T., Kenichiro I., IKuo K., Masahiko Y., Takeshi I., Tetsuro S., Toshio Y., Hiroyuki I. Studies on the Blue Pigments Produced from Genipin and Methylamine. I. Structures of the Brownish-Red Pigments, Intermediates Leading to the Blue Pigments *Chem. Pharm. Bull.* 1994 Volume 42 Issue 3 Pages 668-673
- [62]Butler, M. F., Ng, Y.-F., & Pudney, P. D. A. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2003, 41(24), 3941–3953.
- [63]Reddy, N., Reddy, R., & Jiang, Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(6), 362–369.
- [64]Bi, L. et al. Effects of different crosslinking conditions on the properties of genipin crosslinked chitosan/collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2011, 22, 51–62.
- [65]A. Srinatha, J. K. Pandit, and S. Singh Ionic Cross-linked Chitosan Beads for Extended Release of Ciprofloxacin: In vitro Characterization. *Indian J Pharm Sci.* 2008 Jan-Feb; 70(1): 16–21.
- [66]Muhamad, I.I., L.S. Fen, N.H. Hui and N.A. Mustapha, Genipin-cross-linked kappa-carrageenan/carboxymethyl cellulose beads and effects on beta-carotene release. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83: 1207-1212.
- [67]Long, J.; Jiao, A.; Wei, B.; Wu, Z.; Zhang, Y.; Xu, X.; Jin, Z. A novel method for pullulanase immobilized onto magnetic chitosan/Fe₃O₄ composite nanoparticles by in situ preparation and evaluation of the enzyme stability. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2014, 109, 53–61.
- [68] Bin Li , Chang-Lin Shan , Qing Zhou , Yuan Fang , Yang-Li Wang , Fei Xu , Li-Rong Han , Muhammad Ibrahim , Long-Biao Guo , Guan-Lin Xie and Guo-Chang Sun , Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Cross-Linked Chitosan-Glutaraldehyde *Mar. Drugs* 2013, 11, 1534-1552.
- [69] Rangel-Rodríguez, Adriana Marisol, Conxita, Solans, Susana, Vilchez, Flores-Gallardo, Sergio Gabriel, Contreras-Esquivel, Juan Carlos, Licea-Jiménez, Liliana

Immobilization of Pectinesterase in Genipin-Crosslinked Chitosan Membrane for Low Methoxyl Pectin Production Applied biochemistry and biotechnology 2014 v.174 no.8 pp. 2941-2950.

[70] Bellé, A. S., Hackenhaar, C. R., Spolidoro, L. S., Rodrigues, E., Klein, M. P., & Hertz, P. F. Efficient enzyme-assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana* L.) and its application as a crosslinker for chitosan gels. *Food Chemistry*, 2018, 246, 266–274.

[71] Yanqing Wang, Anaís Pitto-Barry, Abraha Habtemariam, Isolda Romero-Canelon, Peter J. Sadler and Nicolas P. E. Barry Nanoparticles of chitosan conjugated to organo-ruthenium complexes *Inorg. Chem. Front.*, 2016, 3, 1058-1064.

[72] Li X, Min M, Du N, Gu Y, Hode T, Naylor M, Chen D, Nordquist RE, Chen WR. Chitin, chitosan, and glycated chitosan regulate immune responses: the novel adjuvants for cancer vaccine. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:387023.

[73] Zang, L., Qiu, J., Wu, X., Zhang, W., Sakai, E., & Wei, Y. Preparation of Magnetic Chitosan Nanoparticles As Support for Cellulase Immobilization. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2014, 53(9), 3448–3454.

[74] Qikun Zhang, Junqing Kang, Bing Yang, Leizhen Zhao, Zhaosheng Hou, Bo Tang Immobilized cellulase on Fe₃O₄ nanoparticles as a magnetically recoverable biocatalyst for the decomposition of corncob *Chinese Journal of Catalysis* 37, 2016, 389–397.

[75] Finisic MR, Josué A, Fávere VT, Laranjeira MCM. Synthesis of calcium-phosphate and chitosan bioceramics for bone regeneration. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 73: Rio de Janeiro Dec, 2001.

[76] Flores-Hernández CG, Colín-Cruz A, Velasco-Santos C, Castaño VM, Rivera-Armenta JL, Almendarez-Camarillo A, et al. All green composites from fully renewable biopolymers: chitosan-starch reinforced with keratin from feathers. *Polymers*. 2014, 6:686–705.

[77] Huang, J.; Zhao, R.; Wang, H.; Zhao, W.; Ding, L. Immobilization of glucose oxidase on Fe₃O₄/SiO₂ magnetic nanoparticles. *Biotechnol. Lett*. 2010, 32, 817–821.

[78] Esam A. EL-HEFIAN, Elham S. ELGANNUDI, Azizah MAINAL, Abdul Haamid YAHAYA Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies *Turk J Chem* 34, 2010, 47 – 56.

[79] N. Arsalani, H. Fattahi, M. Nazarpour Synthesis and characterization of PVP-functionalized superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles as an MRI contrast agent *eXPRESS Polymer Letters* Vol.4, No.6, 2010, 329–338.

[80] Mohammadi-Samani S, Miri R, Salmanpour M, Khalighian N, Sotoudeh S, Erfani N. Preparation and assessment of chitosan-coated superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for controlled delivery of methotrexate. *Res Pharm Sci*. 2013 Jan;8(1):25-33.

[81] Ali Nemati, Waseem Haider, S. Ghanbarnezhad, Zia Ur Rahman, Syed Nabeel Ahmed Synthesis and Characterization of Nanocomposite of Functionalized Graphene Oxide with Multi Core-Shell Fe₃O₄-ZnO-TiO₂. *Nanoparticles Proceedings of the International Conference of Theoretical and Applied Nanoscience and Nanotechnology (TANN'17) Toronto, Canada – August 23 – 25, 2017 Paper No. 111*

[82] Mohammad Ali Ghasemzadeh, Mina Azimi-Nasrabad, Javad Safaei-Ghomi. Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles: An efficient, green and magnetically reusable catalyst for the one-pot synthesis of 14-aryl-14H-dibenzo[a,i]xanthene-8,13-dione derivatives *Iranian Journal of Catalysis* 2016, 6(2).

[83] Retno Rahmawatia, Mohammad Gilang Permana, Bill Harisona, Nugrahaa, Brian Yulianto, Suyatmana, Deddy Kurniadia. Optimization of Frequency and

Stirring Rate for Synthesis of Magnetite (Fe_3O_4) Nanoparticles by Using Coprecipitation- Ultrasonic Irradiation Methods *Procedia Engineering* 170, 2017, 55 – 59.

[84]Valenzuela, R., Fuentes, M. C., Parra, C., Baeza, J., Duran, N., Sharma, S. K., Freer, J. Influence of stirring velocity on the synthesis of magnetite nanoparticles (Fe_3O_4) by the co-precipitation method. *Journal of Alloys and Compounds*, 2009, 488(1), 227–231.

[85]Xu, C., Lu, X., & Dai, H. The Synthesis of Size-Adjustable Superparamagnetism Fe_3O_4 Hollow Microspheres. *Nanoscale Research Letters*, 2017, 12(1).

[86]Xu, J.-K., Zhang, F.-F., Sun, J.-J., Sheng, J., Wang, F., & Sun, M. Bio and Nanomaterials Based on Fe_3O_4 . *Molecules*, 2014, 19(12), 21506–21528.

[87]Qikun Zhang, Junqing Kang, Bing Yang, Leizhen Zhao, Zhaosheng Hou, Bo Tang. Immobilized cellulase on Fe_3O_4 nanoparticles as a magnetically recoverable biocatalyst for the decomposition of corncob *Chinese Journal of Catalysis* 37, 2016, 389–397.

[88]Saifuddin, N., & Yasumira, A. A. N. Microwave Enhanced Synthesis of Chitosan-graftMolecularly Imprinted Polymer (MIP) for Selective Extraction of Antioxidants. *E-Journal of Chemistry*, 2010, 7(4), 1362–1374.

[89]Mi, F.L.; Tan, Y.C.; Liang, H.C.; Huang, R.N.; Sung, H.W. In vitro evaluation of a chitosan membrane cross-linked with genipin. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2001, 12, 835–850.

[90]Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., & Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2004, 57(1), 19–34.

[91]Zhang, Q., Kang, J., Yang, B., Zhao, L., Hou, Z., & Tang, B. Immobilized cellulase on Fe_3O_4 nanoparticles as a magnetically recoverable biocatalyst for the decomposition of corncob. *Chinese Journal of Catalysis*, 2016, 37(3), 389–397.

[92]Cui, C., Chen, H., Chen, B., & Tan, T. Genipin Cross-Linked Glucose Oxidase and Catalase Multi-enzyme for Gluconic Acid Synthesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 181(2), 526–535.

[93]Nam, N. X., Nghia, H. T. T., Vy, L. T. T., Oanh, H. N., & Hien, P. P. Immobilization of invertase on chitosan and its application to honey treatment. 2017.

[94]Muzzarelli, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 77(1), 1–9.

[95]O. Barbosa, C. Ortiz, A. BerenguerMurcia, R. Torres, R.C. Rodrigues, R. Fernandez-LafuenteGlutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization *RSC Advances*, 4 (4), 2014, pp. 1583-1600.

[96]Chiou, S., Hung, T., Giridhar, R., & Wu, W. Immobilization of Lipase to Chitosan Beads using a Natural Cross-Linker. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2007, 37(3), 265–275.

[97]Gunda, Naga Siva Kumar; Singh, Minashree; Norman, Lana; Kaur, Kamaljit; Mitra, Sushanta K.Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker *Applied Surface Science*, Volume 305, 2014, p. 522-530.

[98]D.L. Falkoski, V.M. Guimaraes, M.N.deAlmeida, A.C. Alfenas, J.L.Colodette,T. de Rezende *Chrysoporthe cubensis*: a new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes *Bioresour. Technol.*, 130, 2013, pp. 296-305.

- [99]Liu, D., Zhang, R., Yang, X., Wu, H., Xu, D., Tang, Z., & Shen, Q. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65(5), 717–725.
- [100] Saini, R., Saini, J. K., Adsul, M., Patel, A. K., Mathur, A., Tuli, D., & Singhania, R. R. Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application. *Bioresource Technology*, 2015, 188, 240–246.
- [101]T. Alahakoon, J.W. Koh, X.W.C. Chong, W.T.L. Lim, Immobilization of cellulases on amine and aldehyde functionalized Fe₂O₃ magnetic nanoparticles, *Prep.Biochem. Biotechnol.* 42, 2012, 234–248.
- [102]A.A. Gokhale, I. Lee, Cellulase immobilized nanostructured supports for efficient saccharification of cellulosic substrates, *Top. Catal.* 16, 2012, 1231–1246.
- [103]A.A. Gokhale, J. Lu, I. Lee, Immobilization of cellulase on magneto responsive graphene nano-supports, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 90, 2013, 76–86.
- [104]Chang MY, Juang RS Activities, stabilities, and reaction kinetics of three free and chitosan-clay composite immobilized enzymes. *Enzyme Microb Tech*, 2005, 36: 75-82.
- [105]Yuanyuan Yu, Jiugang Yuan, Qiang Wang, Xuerong Fan, Ping Wang, Li Cui Noncovalent immobilization of cellulases using the reversibly soluble polymers for biopolishing of cotton fabric *Biotechnol Appl Biochem.* 2015 Jul-Aug;62(4):494-501.
- [106]Ungurean M, Paul C, Peter F. Cellulase immobilized by sol-gel entrapment for efficient hydrolysis of cellulose. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2013 Oct;36(10):1327-38.
- [107]Amara Shafaq, M. Aslam Malana, Naheed Ikram, M. Ishfaq Ghori, Kashif Younus Butt and Sibtain Ahmed Kinetic Study of Carboxymethylcellulase from *Trichoderma reesei* Pak. *J. life soc. sci.* 2004, 2(1): 1-4.
- [108]Ghori, M.I. and Malana, M.A. Production and kinetic study of cellulases from agricultural wastes. Ph.D. Thesis, Bahauddin Zakariya University, Multan. 2001.
- [109]Lin, Y., Liu, X., Xing, Z., Geng, Y., Wilson, J., Wu, D., & Kong, H. Preparation and characterization of magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles for cellulase immobilization. *Cellulose*, 2017, 24(12), 5541–5550.
- [110] Sánchez-Ramírez, J., Martínez-Hernández, J. L., Segura-Ceniceros, P., López, G., Saade, H., Medina-Morales, M. A., Ilyina, A. Cellulases immobilization on chitosan-coated magnetic nanoparticles: application for *Agave Atrovirens* lignocellulosic biomass hydrolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2016, 40(1), 9–22.
- [111]Imai, M., Ikari, K., & Suzuki, I. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 17(2), 79–83.
- [112]Liu, J., & Xia, W. Purification and characterization of a bifunctional enzyme with chitinase and cellulase activity from commercial cellulase. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 30(1), 82–87.
- [113]Ahmad, R., & Khare, S. K. Immobilization of *Aspergillus niger* cellulase on multiwall carbon nanotubes for cellulose hydrolysis. *Bioresource Technology*, 2018, 252, 72–75.
- [114]Naser, Sohair A., M. S. Sharaf, Khadiga A. Abou –Taleb, W. A. Mashhoor Partial Purification and Characterization of Cellulases by *Bacillus alcalophilus* S39 and *B. amyloliquefaciens* C2₃ *Middle East Journal of Agriculture* Volume : 4 Issue : 01 Jan-Mar. 2015, Pages: 49-59.

- [115]Liu, M., Huo, W., Xu, X., & Jin, D. An immobilized bifunctional xylanase on carbon-coated chitosan nanoparticles with a potential application in xylan-rich biomass bioconversion. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015, 120, 119–126.
- [116]Yu, Y., Yuan, J., Wang, Q., Fan, X., & Wang, P. Covalent Immobilization of Cellulases onto a Water-Soluble–Insoluble Reversible Polymer. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166(6), 1433–1441.
- [117]Feng, T., Du, Y., Yang, J., Li, J., & Shi, X. Immobilization of a nonspecific chitosan hydrolytic enzyme for application in preparation of water-soluble low-molecular-weight chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 2006, 101(3), 1334–1339.
- [118]Yuan, B., Yang, X., Xue, L., Feng, Y., & Jiang, J. A novel recycling system for nano-magnetic molecular imprinting immobilised cellulases: Synergistic recovery of anthocyanin from fruit and vegetable waste. *Bioresource Technology*, 2016, 222, 14–23.
- [119]Hailei, Y., Zhong liang, S., Hongbo, S., Jinfang, C., Xiaofei, W., & Haixia, Y. Immobilization of cellulase on modified mesoporous silica shows improved thermal stability and reusability. *African Journal of Microbiology Research*, 2013, 7(25), 3248–3253.
- [120]Sanjay, G., & Sugunan, S. Acid activated montmorillonite: an efficient immobilization support for improving reusability, storage stability and operational stability of enzymes. *Journal of Porous Materials*, 2007, 15(3), 359–367.
- [121]Bayramoglu, G., Altınok, H., Bulut, A., Preparation and application of spacer-arm attached poly(hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) films for urease immobilization. *Reactive & Functional Polymers*, 2003, 56:111-121.
- [122]Cirpan, A., Alkan, S., Toppare, L., Hepuzer, Y., & Yagci, Y. Immobilization of invertase in conducting copolymers of 3-methylthienyl methacrylate. *Bioelectrochemistry*, 2003, 59(1-2), 29–33.
- [123]Bayramoglu, G., Senkal, B. F., & Arica, M. Y. Preparation of clay–poly(glycidyl methacrylate) composite support for immobilization of cellulase. *Applied Clay Science*, 2013, 85, 88–95.
- [124]Feng, T., Du, Y., Yang, J., Li, J., & Shi, X. Immobilization of a nonspecific chitosan hydrolytic enzyme for application in preparation of water-soluble low-molecular-weight chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 2006, 101(3), 1334–1339.
- [125]Alahakoon, T., Koh, J. W., Chong, X. W. C., & Lim, W. T. L. Immobilization of cellulases on amine and aldehyde functionalized Fe₂O₃ magnetic nanoparticles. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 42(3), 234–248.
- [126]Rahim, S. N. A., Sulaiman, A., Hamzah, F., Hamid, K. H. K., Rodhi, M. N. M., Musa, M., & Edama, N. A. Enzymes Encapsulation within Calcium Alginate-clay Beads: Characterization and Application for Cassava Slurry Saccharification. *Procedia Engineering*, 2013, 68, 411–417.
- [127]Liu, M., Huo, W., Xu, X., & Jin, D. An immobilized bifunctional xylanase on carbon-coated chitosan nanoparticles with a potential application in xylan-rich biomass bioconversion. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015, 120, 119–126.
- [128]Kumar, A.; Lingadurai, S.; Jain, A.; Barman, N. R., *Erythrina variegata* Linn: A review on morphology, phytochemistry, and pharmacological aspects. *Pharmacognosy Review*, 2010, 4 (8): 147-152.

- [129] Ibrahim, N. A., Gouda, M., El-shafei, A. M., & Abdel-Fatah, O. M. Antimicrobial activity of cotton fabrics containing immobilized enzymes. *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, 104(3), 1754–1761.
- [130] Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., C.R.K.Reddy, & Jha, B. An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83(2), 891–897.
- [131] Chang, Y.-N., Zhang, M., Xia, L., Zhang, J., & Xing, G. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. *Materials*, 2012, 5(12), 2850–2871.
- [132] Murashima, K., Nishimura, T., Nakamura, Y., Koga J., Moriya, T., Sumida, N., Yaguchi, T., Kono, T. Purification and characterization of new endo-1, 4-D- glucanses from *Rhizopus oryzae*, *Enzyme Microbial Technology*, 2002, 30: 319-326.
- [133] Sudarshan Singh Rathore, Mannivannan A., R. T. Narendhirakannan Screening of cellulase producing microorganisms from lake area containing water hyacinth for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Journal of Advanced Scientific Research Narendhirakannan et al, J Adv Sci Res*, 2014, 5(3): 23-30.
- [134] Saha, B. C. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides* *Proc Biochem*, 2004, 39: 1871-6.
- [135] Heggset E.B., Syverud K., Øyaas K., Novel pretreatment pathways for dissolution of lignocellulosic biomass based on ionic liquid and lowtemperature alkaline treatment, *Biomass Bioenergy*, 2016, 93, 194–200.
- [136] Aita G.A., Salvi D.A., Walker M.S., Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of dilute ammonia pretreated energy cane, *Bioresource Technology*, 2011, 102(6), 4444-4448.
- [137] Obeng, A., Premjet, D., & Premjet, S. Combining Autoclaving with Mild Alkaline Solution as a Pretreatment Technique to Enhance Glucose Recovery from the Invasive Weed *Chloris barbata*. *Biomolecules*, 2019, 9(4), 120.
- [138] Iroba, K. L., Tabil, L. G., Dumonceaux, T., & Baik, O.-D. Effect of alkaline pretreatment on chemical composition of lignocellulosic biomass using radio frequency heating. *Biosystems Engineering*, 2013, 116(4), 385–398.
- [139] Redding, A. P., Wang, Z., Keshwani, D. R., & Cheng, J. J. High temperature dilute acid pretreatment of coastal Bermuda grass for enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2), 1415–1424.
- [140] Sartori, T., Tibolla, H., Prigol, E., Colla, L. M., Costa, J. A. V., & Bertolin, T. E. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Residues by Cellulases Obtained from Solid State Fermentation Using *Trichoderma viride*. *BioMed Research International*, 2015, 1–9.
- [141] Alrumman, S. A. Enzymatic saccharification and fermentation of cellulosic date palm wastes to glucose and lactic acid. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2016, 47(1), 110–119.
- [142] Jordan, J., Kumar, C. S. S. R., & Theegala, C. Preparation and characterization of cellulase-bound magnetite nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011, 68(2), 139–146.
- [143] Sartori, T., Tibolla, H., Prigol, E., Colla, L. M., Costa, J. A. V., & Bertolin, T. E. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Residues by Cellulases Obtained from Solid State Fermentation Using *Trichoderma viride*. *BioMed Research International*, 2015, 1–9.
- [144] Roberto Valenzuela, Jean Franco Castro, Carolina Parra, Jaime Baeza, Nelson Durán & Juanita Freer β -Glucosidase immobilisation on synthetic superparamagnetic magnetite nanoparticles and their application in saccharification of wheat straw and

Eucalyptus globulus pulps, *Journal of Experimental Nanoscience*, 2014, 9:2, 177-185.

[145]Wang W, Kang L, Wei H, et al. Study on the decreased sugar yield in enzymatic hydrolysis of cellulosic substrate at high solid loading. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011, 164: 1139-1149.

[146]Alrumman, S. A. Enzymatic saccharification and fermentation of cellulosic date palm wastes to glucose and lactic acid. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2016, 47(1), 110–119.

[147]Reinu E Abraham, Madan L Verma, Colin J Barrow and Munish Puri Suitability of magnetic nanoparticle immobilised cellulases in enhancing enzymatic saccharification of pretreated hemp biomass Abraham et al. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7:90.

[148]Jordan, Jason, "Efficiency of Cellulase Enzyme Immobilized on Magnetic Nanoparticles" , 2009, LSU Master's Theses. 2910.

[149]Du, J., Li, Y., Zhang, H., Zheng, H., & Huang, H. Factors to decrease the cellulose conversion of enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high solid concentrations. *Cellulose*, 2014, 21(4), 2409–2417.

[150]Abraham, R., Wong, C., & Puri, M. Enrichment of Cellulosic Waste Hemp (*Cannabis sativa*) Hurd into Non-Toxic Microfibres. *Materials*, 2016, 9(7), 562.

[151]Sharma, S., Sharma, V., & Kuila, A. Cellulase production using natural medium and its application on enzymatic hydrolysis of thermo chemically pretreated biomass. *3 Biotech*, 2016, 6(2).

[152]S. Sivarathnakumar, G. Baskar, R. Praveenkumar, B. Bharathiraja Simultaneous saccharification and fermentation of woody stem *Prosopis juliflora* by *Zymomonas mobilis* for the production of cellulosic ethanol 236 *Int. J. Materials and Product Technology*, 2017, Vol. 55, Nos. 1/2/3.

[153]Sun, R., Lawther, J.M., Banks, W.B., Fractional and structural characterization of wheat straw hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 1999, 49, 415-423.

[154]Corredor, D.Y., Pretreatment and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. National University of Colombia, 2000 MS. Kansas State University, 2005. 2008.

[155]Wissel, H., Mayr, C., & Lücke, A. A new approach for the isolation of cellulose from aquatic plant tissue and freshwater sediments for stable isotope analysis. *Organic Geochemistry*, 2008, 39(11), 1545–1561.

[156] Fang, Z., Sato, T., Smith Jr., R.L., Inomata, H., Arai, K., Kozinski, A.J.,. Reaction chemistry and phase behavior of lignin in high-temperature and supercritical water. *Bioresour. Technol*. 2008, 99, 3424–3430.

[157]Kacuráková, M. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 2000, 43(2), 195–203.

[158]Xiao, B., Sun, X. F. ve Sun, R.-C., Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. *Polymer Degradation and Stability*. 2001, 74, 307–319.

[159]Chengzhou Li, Makoto Yoshimoto, Kimitoshi Fukunaga, Katsumi Nakao Characterization and immobilization of liposome-bound cellulase for hydrolysis of insoluble cellulose *Bioresour. Technol* 98, 2007, 1366–1372.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Duygu BAKIR
Doğum Yeri ve Yılı : Altındağ, 1992
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : duygu9235@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Namık Kemal Lisesi, 2010
Lisans : Dokuz Eylül Üniversitesi, Biyoloji Öğretmenliği Bölümü, 2015
Yüksek Lisans : Celal Bayar Üniversitesi, Biyokimya Bölümü, 2019

Mesleki Deneyim

Renkli Kalemler Etüt Merkezi	2015-2016
Dinamik Eğitim ve Danışmanlık	2016-2018
Çözüm Kişisel Gelişim Kursu	2018-..... (halen)