

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Bacillus methyilotrophicus* Y37 SELÜLAZININ VERMİKÜLİT
ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU**

GAMZE TUFAN

KOCAELİ 2019

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA
ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bacillus methylothrophicus Y37 SELÜLAZİNİN VERMİKÜLİT
ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU

GAMZE TUFAN

Doç. Dr. Yonca DUMAN
Danışman, Kocaeli Üni.

Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Uğur KAYA
Jüri Üyesi, Kocaeli Üni.

Dr. Öğr. Üyesi Zehra ÖLÇER
Jüri Üyesi, Gebze Teknik Üni.



Tezin Savunulduğu Tarih: 10.07.2019

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmasında, *Bacillus methyilotrophicus* 37 selüloz enziminin katı bir destek materyali olan vermikülit üzerine immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. İmmobilize enzimin optimizasyon, kinetik ve termodinamik çalışmaları incelenmiştir.

Tez çalışmam boyunca bana büyük emeği geçen, engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, sabrını ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Yonca DUMAN'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

XRD ve SEM analiz çalışmalarına yardımcı olan sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Uğur Kaya'ya (Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü Öğretim Üyesi) teşekkür ederim.

Tez çalışmamı 2018/077 numaralı proje ile destekleyen Kocaeli Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederim.

Tez çalışmam sürecinde 116Z455 numaralı proje ile yüksek lisans bursiyeri olarak destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Tez yazım sürecinde desteklerini esirgemeyen arkadaşım Sümeyye YALDUZ'a ve yanımda olan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca ve kişisel hayatımda her zaman yanımda olup beni cesaretlendiren, en büyük destekçilerimden biri olan Çağkan Zeki KURT'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her türlü kararında bana koşulsuz destek olan ve güç veren, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan bu günlere gelmemi sağlayan hayattaki en büyük şansım olan annem Çiğdem TUFAN'a, babam Bülent TUFAN'a ve kardeşim Sude TUFAN'a, bana büyük emek veren babaannem Nermin TUFAN'a, eğitim hayatım boyunca beni hep desteklemiş olan ve tez çalışmam sırasında kaybettiğim rahmetli dedem Ali TUFAN'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2019

Gamze TUFAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ	v
SİMGELEr VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
GİRİŞ	1
1.GENEL BİLGİLER	2
1.1. Enzimlerin Genel Özellikleri.....	2
1.2. Selüloz.....	3
1.3. Selülazlar.....	5
1.3.1. Selülazların sınıflandırılması	7
1.3.2. Selülazların kullanım alanları	8
1.3.2.1. Gıda endüstrisi	8
1.3.2.2. Hayvan yemi endüstrisi	9
1.3.2.3. Deterjan endüstrisi	9
1.3.2.4. Bira ve şarap endüstrisi.....	9
1.3.2.5. Tekstil endüstrisi.....	10
1.3.2.6. Biyoyakıt endüstrisi	10
1.3.2.7. Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi	11
1.4. <i>Bacillus</i> Cinsinin Özellikleri	11
1.5. İmmobilizasyon	12
1.5.1. İmmobilizasyonun avantajları.....	14
1.5.2. İmmobilizasyon yöntemleri	14
1.5.2.1. Kovalent bağlanma.....	16
1.5.2.2. Tutuklama ve enkapsülasyon	16
1.5.2.3. Çapraz bağlama	17
1.5.2.4. Adsorpsiyon	18
1.5.2.5. İyonik bağlanma.....	18
1.5.2.6. Afinite bağlanma	19
1.5.2.7. Metal bağlanma	19
1.5.2.8. Disülfür bağları ile bağlanma	19
1.6. Enzim İmmobilizasyonunda Killerin Kullanımı	20
1.6.1. Killer üzerine enzimlerin bağlanması	22
1.6.2. Vermikülit.....	23
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	26
2.1. Mikroorganizma	26
2.2. Kimyasallar	26
2.3. Selülaz Enziminin Üretimi	26
2.3.1. Serbest selülaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi.....	26
2.3.2. Glukoz standart grafiğinin hazırlanması.....	27

2.3.3. Protein miktarının belirlenmesi	28
2.4. İmmobilizasyon Desteği Olan Vermikülitin Hazırlanması	29
2.5. İmmobilize Enzimin Hazırlanması ve Aktivitesinin Belirlenmesi.....	29
2.6. Destek Materyelinin Yapısal Karakterizasyonu	30
2.6.1. XRD (X ışını kırınım) yöntemi.....	30
2.6.2. SEM (taramalı elektron mikroskobu) analizi.....	30
2.7. İmmobilize Enzimin Optimizasyon Çalışmaları	30
2.7.1. İmmobilize enzim miktarı optimizasyonu	30
2.7.2. Gluteraldehit yüzdesi optimizasyonu.....	30
2.7.3. Gluteraldehit muamele süresi optimizasyonu.....	31
2.7.4. Enzim muamele süresi optimizasyonu	31
2.7.5. İmmobilize enzimde tekrar kullanım	31
2.7.6. İmmobilize enzimin operasyonel stabilitesi	32
2.8. İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu	32
2.8.1. İmmobilize enzim üzerine pH etkisi	32
2.8.2. İmmobilize enzim üzerine sıcaklık etkisi	33
2.8.3. İmmobilize enzimin kinetik parametrelerinin (K_m , V_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m) belirlenmesi	33
2.8.4. Arrhenius aktivasyon enerjisinin hesaplanması.....	34
2.8.5. Serbest ve immobilize enzimin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi.....	35
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
3.1. Destek Materyelinin karakterizasyonu.....	37
3.1.1. XRD (X Işını Kırınım) Analizi	37
3.1.2. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Analizi	38
3.2. İmmobilize Enzimin Optimizasyonu.....	41
3.2.1. İmmobilize enzim miktarı optimizasyonu	41
3.2.2. Gluteraldehit yüzdesi optimizasyonu.....	42
3.2.3. Gluteraldehit muamele süresi optimizasyonu.....	43
3.2.4. Enzim muamele süresi optimizasyonu	44
3.3. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanımı	45
3.4. İmmobilize Enzimin Operasyonel Stabilitesi	47
3.5. İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu	49
3.5.1. İmmobilize enzim üzerine pH etkisi	49
3.5.2. İmmobilize enzim üzerine sıcaklık etkisi	51
3.5.3. Serbest ve immobilize enzimin kinetik (K_m - V_m) parametrelerinin belirlenmesi	52
3.5.4. Serbest ve immobilize enzimin arhenius aktivasyon enerjilerinin belirlenmesi.....	56
3.5.5. Serbest ve immobilize enzimin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi.....	58
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	63
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	74
ÖZGEÇMİŞ	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Selülozda moleküler arası hidrojen bağları.....	3
Şekil 1.2.	Selüloz ve sellobiyoz yapısı.....	3
Şekil 1.3.	Lignoselülozik kütlelerin mekanik parçalanması.	4
Şekil 1.4.	Selüloz ve glukozun yapısı	6
Şekil 1.5.	Kompleks selülaz enziminin etki şekli	7
Şekil 1.6.	Geri dönüşümsüz immobilizasyon yöntemleri	15
Şekil 1.7.	Geri dönüşümlü immobilizasyon yöntemleri.....	15
Şekil 1.8.	Killerin yapısı	21
Şekil 1.9.	Vermikülitin tetrahedral ve oktahedral tabakalı yapısı.....	24
Şekil 1.10.	Vermikülitin yapısı	25
Şekil 2.1.	Glukoz standart grafiği	27
Şekil 2.2.	Sığır serum albümin standart grafiği	28
Şekil 2.3	Selülaz ile CMC hidroliz reaksiyonunda serbest enerji düzeyi diyagramı.....	36
Şekil 3.1.	Ham vermikülit, sodyum vermikülit ve immobilizevermikülitin X ışını difraksiyonu (1-60°)	37
Şekil 3.2.	Ham vermikülit, sodyum vermikülit ve immobilize vermikülitin X ışını difraksiyonu (1-11°).	38
Şekil 3.3.	Ham Vermikülit SEM görüntüsü (x1000 büyütme)	40
Şekil 3.4.	Na-vermikülit SEM görüntüsü (x1000 büyütme).....	40
Şekil 3.5	Protein muameleli Na-vermikülit SEM görüntüsü (x1000 büyütme)	41
Şekil 3.6.	İmmobilize edilen selülaz enzim miktarının enzimatik aktivite üzerine etkisi	42
Şekil 3.7.	Farklı glüteraldehit yüzdelilerinin immobilize enzim üzerine etkisi	43
Şekil 3.8.	Glüteraldehit muamele süresinin immobilize enzim üzerine etkisi	44
Şekil 3.9.	Enzim muamele süresinin immobilize enzim üzerine etkisi	45
Şekil 3.10.	İmmobilize enzimde tekrar kullanım	46
Şekil 3.11.	İmmobilize enzimin operasyonel stabilitesi.....	48
Şekil 3.12.	İmmobiliz enzim operasyonel döngüsü	48
Şekil 3.13.	CMC'nin farklı pH değerlerinde aktivite üzerine etkisi	50
Şekil 3.14.	CMC'nin farklı sıcaklık değerlerinde aktiviteye etkisi.....	51
Şekil 3.15.	Serbest ve immobilize enzim için Lineweaver-Burk diyagramı.....	53
Şekil 3.16.	Serbest enzim için Arrhenius grafiği.....	57
Şekil 3.17.	İmmobilize enzim için Arrhenius grafiği	57

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması	2
Tablo 3.1. Serbest ve immobilize enzimin kinetik parametreleri	53
Tablo 3.1. Serbest ve immobilize enzimin 50°C'deki termodinamik parametreleri	58



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

dk	: Dakika
E_a	: Aktivasyon Enerjisi, (kJ/mol)
$[E]_t$: Reaksiyon ortamındaki toplam enzim konsantrasyonu, ($\mu\text{mol/mL}$)
g	: Gram
h	: Plank sabiti, (J.s)
k_b	: Boltzman sabiti, ($J.K^{-1}$)
k_{cat}	: Turn-over katsayısı, (dk^{-1})
K_m	: CMC hidrolizi için belirlenen koşullarda enzimin Michaelis-Menten sabiti, (M)
kV	: Kilovolt
M	: Molar
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
R	: Gaz sabiti ($J.K^{-1}mol^{-1}$)
rpm	: Karıştırma hızı (dakika/devir)
[S]	: CMC konsantrasyonu, (mM)
V_m	: CMC hidrolizi ile ulaşılabilecek maksimum başlangıç hızı (U/ml/dk)
V	: CMC başlangıç hızı
$\Delta G^\#$: CMC hidrolizine ilişkin aktivasyon serbest enerjisi, (kJ/mol)
$\Delta G^\#_{ES}$: Substrat bağlanma enerjisi (kJ/mol)
$\Delta G^\#_{E-T}$: Tranzisyon (geçiş) hali bağlanma serbest enerjisi, (kJ/mol)
$\Delta H^\#$: Entalpi değişimi, (kJ/mol)
$\Delta S^\#$: Entropi değişimi, (kJ/mol K)
μg	: Mikrogram
μm	: Mikrometre
$^\circ\text{C}$: Santigrat
%	: Yüzde

Kısaltmalar

BSA	: Bovine Serum Albumin (Sığır Serum Albümin)
CLEA	: Cross-Linked Enzyme Aggregate (Çapraz Bağlı Enzim Agregatı)
CMC	: Karboksimetilselüloz
DEAE	: Dietilaminoetil
DNS	: Dinitrosalisilik asit
DTT	: Ditiyotritol
SEM	: Scanning Electron Microscopy (Taramalı Elektron Mikroskobu)
XRD	: X-Ray Diffraction (X-Işını Kırınımı)

***Bacillus methyilotrophicus* Y37 SELÜLAZININ VERMİKÜLİT ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU**

ÖZET

Bu çalışmada *Bacillus methyilotrophicus* Y37 suşundan elde edilen selülaz enziminin ucuz bir destek materyali olan vermikülit üzerine immobilizasyonu gerçekleştirildi. Vermikülit miktarı, enzim ve gluteraldehit muamele süresi, gluteraldehit miktarı optimize edilerek immobilizasyon verimi incelendi. En iyi verimin 0,1 g immobilize enzim ile 2 saat enzim muamelesi ve 1 saat gluteraldehit muamelesi, %3 gluteraldehit varlığında %34,8 olduğu görüldü. Serbest ve immobilize enzim için optimum pH 5,0 ve 7,0 olarak belirlendi. Immobilizasyonun optimum sıcaklık değerini değiştirmediği gözlemlendi. Serbest ve immobilize enzim için optimum sıcaklık 45 °C olarak belirlendi. Immobilize selülazın 15 kullanımda aktivitesinin %61'ini koruduğu görüldü. Bununla birlikte operasyonel stabilitesine bakıldığında 8. Döngüde başlangıç aktivitesinin %54'ünü kaybettiği gözlemlendi. Immobilize ve serbest enzim için kinetik ve termodinamik parametreleri incelendi. Serbest ve immobilize enzim için K_m değerleri sırasıyla, 0,19 mg mL⁻¹ ve 0,028 mg mL⁻¹; V_m değerleri sırasıyla, 7,42 U mL⁻¹ ve 12,15 U mL⁻¹ olarak belirlendi. k_{cat}/K_m değeri serbest enzim için $4,78 \times 10^4$, immobilize enzim için $5,42 \times 10^5$ olarak bulundu. Serbest ve immobilize enzim için E_a değerleri, 9,973 kJ/mol ve 8,729 kJ/mol; ΔG^\ddagger değerleri, 65,782 kJ/mol ve 64,457 kJ/mol olarak belirlendi. ΔG^\ddagger_{E-T} ve ΔG^\ddagger_{E-S} değerleri serbest ve immobilize enzim için sırasıyla, 28,935 kJ/mol ve -35,456 kJ/mol, -4,404 kJ/mol ve -9,602 kJ/mol olarak bulundu. Sonuç olarak, immobilize selülazın katalitik performansının arttığı görüldü. Bu sonuçlar, immobilizasyonun, termodinamik olarak CMC hidrolizinde daha etkili olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Immobilizasyon, Kinetik, Selülaz, Termodinamik, Vermikülit.

IMMOBILIZATION OF *Bacillus methyilotrophicus* Y37 CELLULASE ON VERMICULITE

ABSTRACT

In this study, immobilization of cellulase enzyme on vermiculite was studied. The amount of vermiculite, enzyme and glutaraldehyde treatment time, the amount of glutaraldehyde was optimized. It was found that the best yield was 34.8% with the 0.1 g immobilized enzyme for 2 hours enzyme treatment and one hour glutaraldehyde treatment in the presence of 3% glutaraldehyde. The optimum pH for free and immobilized enzyme were determined as 5.0 and 7.0. It was observed that immobilization did not change the optimum temperature value. The optimum temperature for the free and immobilized enzyme was determined as 45 ° C. It was observed that immobilized cellulase retained 61% of its activity in 15 use. On the other hand, when the operating cycle was analyzed, it showed 54% of the initial activity was lost in the 8th cycle. Kinetic and thermodynamic parameters were investigated for immobilized and free enzyme. K_m and V_m values for the free and immobilized enzyme were found as 0.19 mg mL⁻¹, 0.028 mg mL⁻¹, and 7.42 U mL⁻¹, 12.15 U mL⁻¹, respectively. The k_{cat}/K_m was found to be 4.78×10^4 for the free enzyme, 5.21×10^5 for the immobilized enzyme. The E_a and ΔG^\ddagger values for the free and immobilized enzyme were found 9.973 kJ/mol, 8.729 kJ/mol and 65.782 kJ/mol, 64.457 kJ/mol, respectively. The other thermodynamic parameters ΔG^\ddagger_{E-T} and ΔG^\ddagger_{E-S} values for the free and immobilized enzyme were found to be 28.935 kJ/mol and -35.456 kJ/mol; -4.404 kJ/mol and -9.602 kJ/mol, respectively. These results show that immobilization is more effective thermodynamically in CMC hydrolysis.

Keywords: Immobilization, Kinetic, Cellulase, Thermodynamic, Vermiculite.

GİRİŞ

Enzimler katalitik reaksiyonların düzenlenmesinde görev alan biyolojik katalizörlerdir [1]. Bu reaksiyonlar tüm canlı organizmaların metabolizmasının temelini oluşturmakla birlikte, endüstrinin verimli ve ekonomik biyokatalitik dönüşümler yapması için olanaklar sağlar [2]. Giderek gelişen enzim teknolojisi sayesinde günümüzde enzimler yaygın olarak birçok endüstriyel uygulamada kullanılmaktadır. Endüstriyel enzimlerin yaklaşık olarak %75'ini hidrolitik enzimler oluşturmaktadır [3, 4]. Hidrolazlar sınıfına ait olan selülaz enzimi ile ilgili araştırmalara, 1950'lerin başlarında, dünyadaki en bol ve yenilenebilir enerji kaynağı olan lignoselülozu çözünebilir şekerlere ve glikoza dönüştürebilme potansiyeli sebebiyle başlandı. Bununla birlikte, selülazlar ve hemiselülazlar üzerine devam eden araştırmalar, gıda, bira ve şarap, hayvan yemi, tekstil ve deterjan, kağıt hamuru ve kâğıt, tarım endüstrisi gibi çeşitli alanlarda selülazların biyoteknolojik potansiyellerini ortaya koydu [4].

Endüstride kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni; mikroorganizma kaynaklı enzimlerin üretim aşamasındaki kolaylıkları, bitkisel veya hayvan kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajlara sahip olmalarıdır [5].

Endüstriyel uygulamalarda geniş bir alana sahip olan enzimlerin katalitik aktivitesinin düşüklüğü ve düşük stabilitesi büyük ölçekli uygulamaların geliştirilmesi için engel olarak düşünülür. Fakat, enzimin immobilize edilerek kullanılmasıyla bu sorunların üstesinden gelinebilir [6].

Tez çalışmamızda *Bacillus Methyilotrophicus* Y37 selülaz enziminin vermikülit üzerine immobilizasyonunu gerçekleştirmek ve endüstriyel alanda kullanımına katkı sağlamak amaçlandı.

1.GENEL BİLGİLER

1.1. Enzimlerin Genel Özellikleri

Biyokimyasal katalizör olan protein yapılı enzimler tüm canlı hücrelerde bulunur. Enzimlerin katalitik etkisi, enzim reaksiyonunun enerjetik olarak uygun olduğu ortamlarda gerçekleşir. Enzim reaksiyonunun enerjetik olarak daha elverişli olduğu bölgeye aktif bölge denir. Enzimatik tepkimeler substratın bağlandığı enzimin aktif bölgesinde gerçekleşir. Aktif bölgeye bağlanarak enzimlerle reaksiyon veren moleküllere substrat denir. Enzimler substratın bağlanabilmesi için uygun spesifik bağlanma bölgeleri içerir. Oluşan enzim-substrat kompleksi enzim aktivitesinde önemli bir role sahiptir. Enzimler, tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürerek tepkime hızlarını 10^5 - 10^{17} kat artırırlar [7-9]. Enzim reaksiyonları; tepkenlerin konsantrasyonu, pH, sıcaklık, enzim ve substrat konsantrasyonu gibi faktörlerden etkilenirler [10].

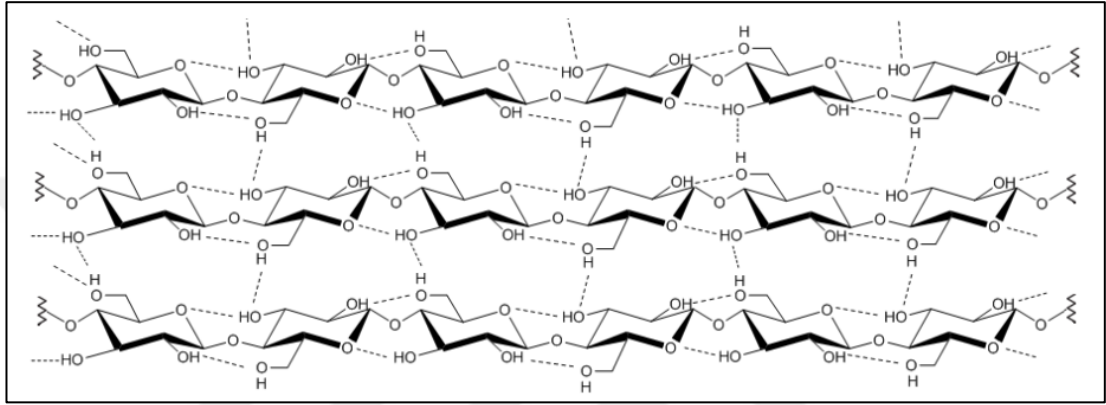
Enzimler katalizledikleri tepkimelere göre altı temel sınıfta toplanırlar (Tablo 1.1) [9].

Tablo 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması [9]

No.	Sınıf	Katalizlenen tepkimenin türü
1	Oksidoredüktazlar	Elektron transfer tepkimeleri (hidrit iyonları ya da H atomları)
2	Transferazlar	Atom ya da grup transfer tepkimeleri
3	Hidrolazlar	Hidroliz tepkimeleri (fonksiyonel grupların suya aktarımı)
4	Liyazlar	Çift bağlara grupların katılması veya grupların çıkarılmasıyla çift bağların oluşum tepkimeleri
5	İzomerazlar	İzomerik yapıların oluşumu için molekül içi grupların transfer tepkimeleri
6	Ligazlar	C-C, C-S, C-O, C-N bağlarının oluşumu için ATP'ye bağlı gerçekleşen kondenzasyon tepkimeleri

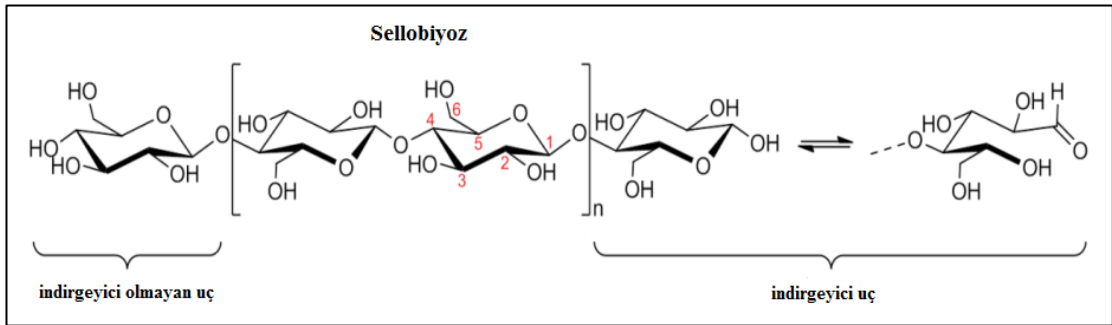
1.2. Selüloz

Bitki hücre duvarlarının ana bileşeni olan selüloz, dünyada en bol bulunan ve yenilenebilir bir biyopolimerdir. Selüloz, β -1,4 glikozidik bağlarla bağlanmış glikoz birimlerinden oluşan stabil bir homopolimerdir. [11, 12]. Selüloz molekülleri, β -1,4 glikozidik bağlarla bağlanırken selüloz zincirleri sert, çözünmeyen mikro-iplikçiklerin oluşumunu sağlayan çok sayıda molekül içi hidrojen bağları ile bağlanırlar (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. Selülozda moleküler arası hidrojen bağları [14].

Tek başına hidrojen bağı oldukça zayıftır fakat toplu bir şekilde güçlü bir birleştirici kuvvet haline gelir. Bu güçlü hidrojen bağları selülozun çözünürlük, ısıl kararlılık, reaktivite ve mekanik gibi özelliklerini etkilemektedir. Selüloz polimerinin tekrar eden birimi sellobiyoz olarak adlandırılır (Şekil 1.2.).

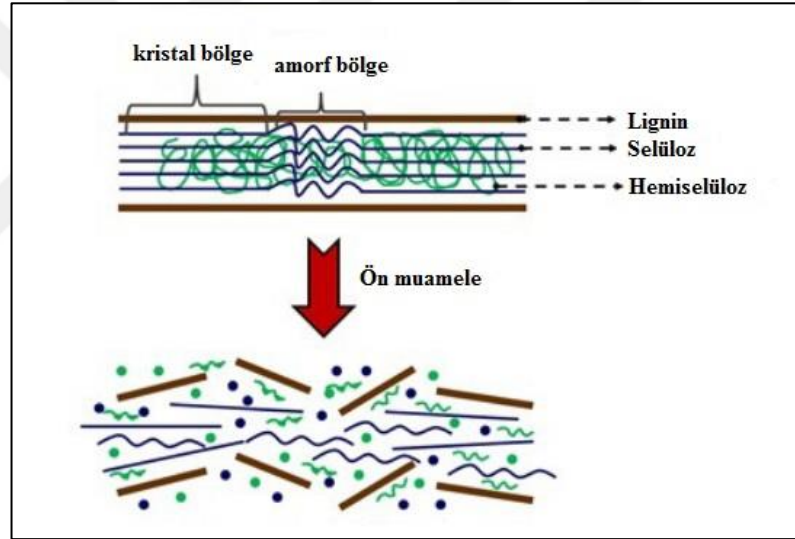


Şekil 1.2. Selüloz ve sellobiyoz yapısı [14].

Selüloz, etanol ve organik asitler gibi kimyasalların üretiminde kullanılan glikozun eldesi için en önemli karbon kaynağıdır. Aynı zamanda yüksek enerjili hayvan yemi üretimi için de kullanılmaktadır. Kristal bir yapı oluşturabilen selüloz, suda

çözünmediği gibi kimyasal ve biyolojik bozunmaya karşı doğal bir direnç sağlar [11, 13-16].

Mekanik bir ön işlem lignoselülozun parçalanmasında ilk adımdır (Şekil 1.3.). Daha sonra selülozu kimyasal veya enzimatik ile parçalamak mümkündür. H_2SO_4 ve HCl ile kimyasal hidroliz ile selüloz sellobiyozla indirgenebilir. Sellobiyozun parçalanması ise fenton reaksiyonu ile gerçekleştirilebilir. Fenton reaksiyonu ileri bir oksidasyon prosesi olup, asidik koşullar altında Fe^{+2} iyonunun hidrojen peroksit ile reaksiyonuna dayanmaktadır. Ancak bütün bunlar zararlı kimyasallar ve zaman gerektiren proseslerdir. Oysa ki, enzimatik hidroliz ile selüloz doğrudan glikoza dönüştürülebilir [17, 18]. Çok çeşitli mantar ve bakteri, selülozları hidrolitik enzimler kullanarak parçalayabilir [19].



Şekil 1.3. Lignoselülozik kütlenin mekanik parçalanması [20].

Lignoselülozik kütlenin ana bileşeni olan selülozun glikoza kadar hidrolizi selüloz enzimleriyle gerçekleştirilebilir. Selülozik biyokütle meyve ve sebze atıkları, tarımsal kalıntılar, odunlar, kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinden elde edilen atıklar ve kentsel katı atıklar gibi çeşitli malzemeler içermektedir.

Selülozik malzemenin yıkımı, alternatif yakıtlara ve kimyasal ham maddelere dönüşüm potansiyeli nedeniyle önem taşımaktadır. Özellikle, biyoyakıt üretimi için başlangıç malzemesi olarak kullanılabilmesinden dolayı büyük ilgi çekmektedir [21].

Son yıllarda çevre dostu, biyoyumlu ürünlerin ve yakıtların geliştirilmesi için doğal polimerlere ilgi artmıştır. Bu nedenle, selüloz düşük maliyet, biyoyumluluğu, biyobozunurluluğu ve yenilenebilirliği gibi özellikleriyle ilgi görmektedir [22]. Selülozun çevresel şartlarda parçalanması zor olduğu için, selülozik atıklar birikerek çevreye zarar verir. Atık sular, tarım ve orman atıklarından elde edilen lignoselülozik biyokütlenin kullanılması atıkların azaltılmasının yanı sıra yakıt ve diğer ürünlerin üretiminde tasarruf sağlayabilir [7].

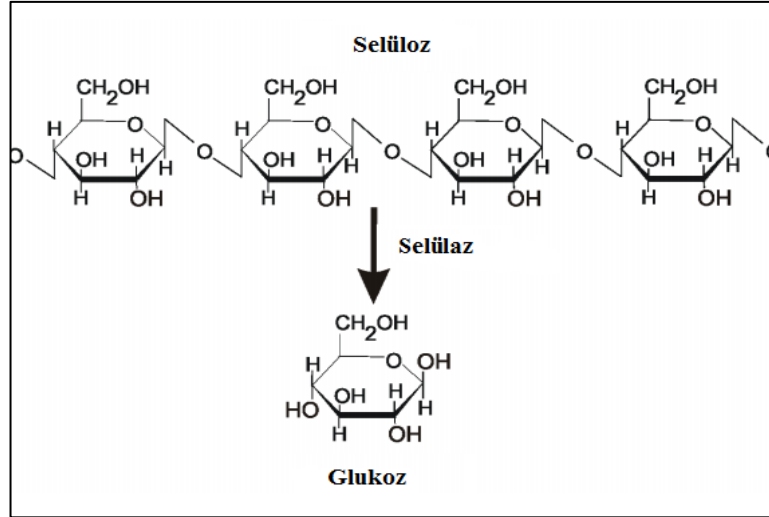
Selüloz kristal bir yapı oluşturmaya rağmen, doğadaki selüloz liflerinin hepsi kristal yapıda değildir. Kristal bölgelerin yanı sıra selüloz lifleri mikro iplikçiklerin bükülmeleri ya da mikro gözeneklerdeki büyük çukurlar ve kılcal damarlar gibi boşluklar sebebiyle düzensizlikler içerir. Hidroliz çalışmaları için kullanılan saf halde bulunan selülozlar yapısal özelliklerde ciddi değişiklikler gösterir ve bu tür çalışmalar için substrat seçimi önemlidir. Saf selülozun değişken yapısal karmaşıklığından ve çözünmeyen substratlarla çalışma zorluğundan dolayı substrat olarak karboksimetil selülaz (CMC) kullanımı yaygınlaşmıştır [23].

1.3. Selülazlar

Selülotik mikroorganizmalar selülozu parçalayabilmek için selülaz adı verilen kompleks bir enzim üretir [7].

Hidrolazlar grubuna ait sinerjik bir enzim olan selülaz, selülozun β -1,4 glikozidik bağların hidrolizini gerçekleştirerek glikoz veya diğer oligosakkarit bileşiklerine parçalanmasını sağlar (Şekil 1.3) [19, 24, 25].

Selülaz, selülozu glikoza kadar parçalamasından dolayı biyosferde önemli bir karbon kaynağıdır. Bununla birlikte, etanol ve yenilenebilir selülozik malzemelerden elde edilen diğer kimyasalların ekonomik üretiminde en önemli kriterdir [26].



Şekil 1.4. Selüloz ve glukozun yapısı [25]

Selülazlar dünya endüstriyel talebin %8'ini oluştururlar [27]. Tekstil endüstrisi, gıda endüstrisi, deterjan endüstrisi, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi, tarım endüstrisi, lignoselülozik atıkların alkole dönüştürülmesi ve katkı maddesi olarak hayvansal yem üretimi gibi birçok endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Endüstride selülazın geniş bir alana sahip olmasıyla enzim üretim maliyeti önem kazanmaktadır. Bu nedenle de, araştırmacılar, yüksek miktar selülaz üretebilen suşların izolasyonuna ve enzim üretim maliyetini azaltmayı amaçlayan protokollerin geliştirilmesine odaklanmaktadır.

Selülazın ticari önemi göz önüne alındığında selülaz aktivitesini arttırmak için etkili bir yöntem bulmak önemlidir. Mantar, bakteri ve selülozu hidrolize edebilen protozoa gibi mikroorganizmalar selülaz enzimi üretiminde kullanılır. Bakteriler, mantarlardan daha fazla büyüme oranına sahiptir. Selülotik aktiviteleri için bildirilen çeşitli bakteriyel cinsler arasında *Bacillus*, *Clostridium*, *cellulomonas*, *Rumminococcus*, *Alteromonas*, *Acetivibrio* gibi bakteriler bulunmaktadır [26 ,28, 29].

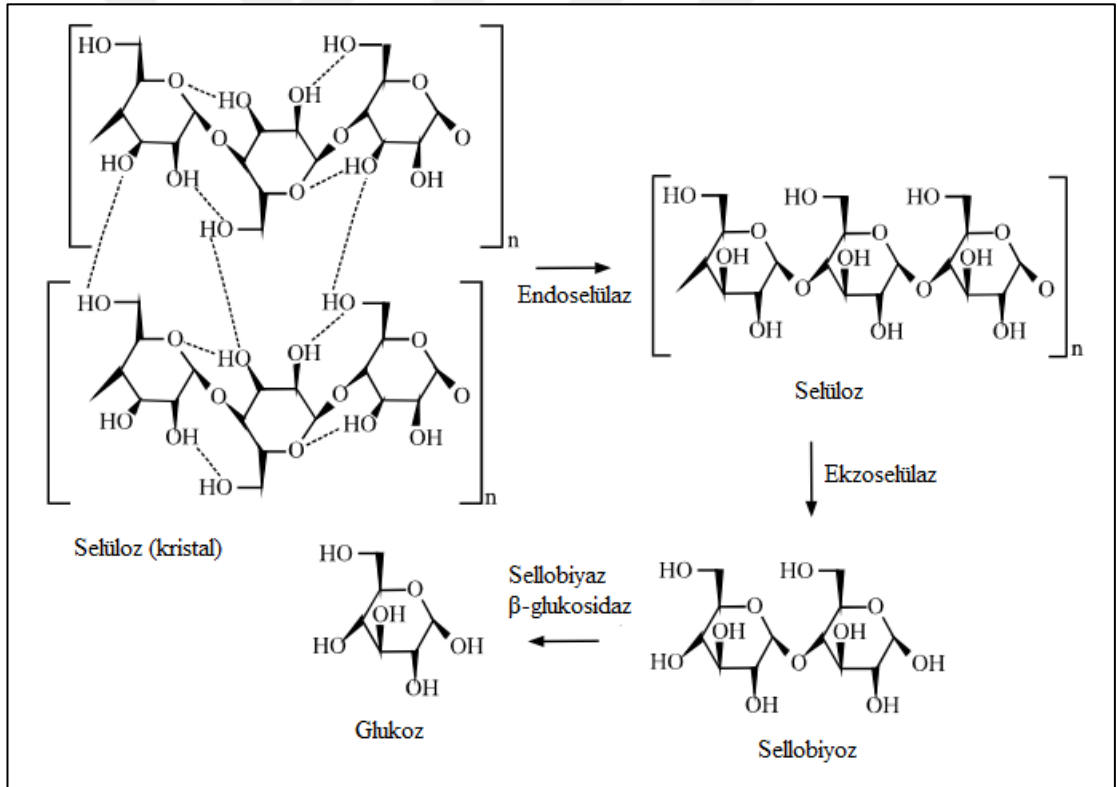
Selülazlar ayrıca, bitki izolasyonu, bitki virüs araştırmaları, genetik ve metabolik modifikasyon çalışmaları için faydalı bir enzimdir [30].

Selülazlar kimyasal olarak tek bir bağ türünü hidrolizleseler bile, selülazın moleküller arası geniş bağlanma modeli etkileyici bir kristalimsi substrat üretir. Bu substrat özellikle mikrobiyal bozunmalara karşı dirençlidir.

Selülozu etkin bir şekilde indirgemek için çoklu enzim sistemleri gerekir. Selülazlar da selülozu parçalayabilen çoklu enzim sistemine sahiptirler [24].

1.3.1. Selülazların sınıflandırılması

Selülazlar üç enzimatik enzim içermektedirler. Endoglukanaz (endo- β -1,4 glukanaazlar, β -1,4-D-glukan-4-glukanohidrolaz), ekzoglukanaz (ekzo- β -1,4-glukanaz, sellobiyohidrolaz, β -1,4-D-glukan sellobiyohidrolazlar) ve β -glukosidaz (sellobiyaz, β -D-glukozid glukohidrolaz) bileşenlerinden oluşan selülaz sistemi, kristal selülozu glikoza dönüştürmek için sinerjistik olarak etki eder. Endoglukanazlar ve ekzoglukanazlar birlikte hareket ederek selülozu oligosakkaritlere hidrolize ederler. Daha sonra β -glukosidazlar bu oligosakkaritleri glikoza hidrolize ederler [31]. Şekil 1.5.'te selülaz enziminin sinerjistik etkisi şematik olarak gösterilmiştir [32].



Şekil 1.5. Kompleks selülaz enziminin etki şekli [32]

Endoselülazlar: Endoselülazlar, endo- β -1,4 glukanaaz ve karboksi metilselülaz olarak da bilinirler. Selülozun β -1,4 glikozidik bağlarının rastgele hidrolizini katalizler ve çeşitli uzunlukta oligosakkaritler oluşmasını sağlarlar. Dolayısıyla yeni zincir uçları meydana gelir. Selülozun amorf bölgelerinde hareket ederler ve selüloz zinciri uzunluğu kısaldıkça etkinlikleri azalır.

Ekzoselülazlar: Selüloz zincirlerinin indirgen ve indirgen olmayan uçlarına etki ederek glukozu veya sellobiyozu serbest bırakırlar. Ayrıca mikrokristalli selüloza da etki edebilirler ve böylece polisakkarit zincirini kısaltırlar [7, 19, 31].

β -glikosidazlar: Sellobiyazlar ve β -D-glukozid hidrolazlar olarak da adlandırılırlar. Kısa zincirli oligosakkaritleri ve sellobiyozu glikoza hidrolize ederler. Selüloz zincirinin uzunluğu arttıkça aktivitesini kaybederler [7].

1.3.2. Selülazların kullanım alanları

Selülazların endüstride kullanılmaları 1980'lerin başlarında başlamış olup ilk uygulama hayvan yemine gerçekleştirilmiştir. Günümüzde selülazlar endüstride çok geniş bir uygulama alanına sahiptirler [4].

1.3.2.1. Gıda endüstrisi

Enzimler gıdaların doku ve lezzet gibi özelliklerini değiştirebilme potansiyeline sahiptirler. Meyve ve sebze sularının üretimi ticari açıdan ve insan sağlığı açısından önemlidir. Kolay bozulabilen meyvelerin kullanımında meyvelerin üretimi ve saklanması hem tüketiciler hem de üreticiler bakımından önem taşımaktadır [4].

Selülazlar, meyve sularının filtrasyonunda ve arıtılmasında önemli rol oynarlar. Genellikle, hemiselülazlar ve pektinlerle birlikte yağlı tohumların ekstraksiyonunda kullanılırlar. Yiyecek ve içecek endüstrisinde alternatif tatlandırıcı olarak kullanılan glikoz şurubu üretiminde büyük önem taşımaktadırlar [7].

Selülazlar, soya fasulyesi ve hindistan cevizi proteinlerinin izole edilmesinde kullanıldığı gibi, nişastanın patates ve mısırdan izole edilmesi için de kullanılırlar. Ayrıca, sindirilebilirliği arttırmak için deniz yosunlarının jelatinleştirilmesinde, fermente gıdaların besleyici kalitesinin geliştirilmesinde, kurutulmuş sebze ve

çorbaların dayanıklılığının artırılmasında, tahıllarda su emiliminin artırılmasında kullanılırlar [12].

1.3.2.2. Hayvan yemi endüstrisi

Hayvan yemi endüstrisi yıllık 50 milyar doların üzerinde bir pazar payına sahiptir. Üretilen yemin en büyük payı kümes hayvanları, geviş getirenler ve domuzlara (%90'a kadar) aitken, evcil hayvan gıdaları ve balık yetiştiriciliği %10'luk kısmını içermektedir.

Selülozlar, yem bitkilerinin sindirimini arttırmaya ve böylece yemin kalitesinin ve sindirilebilirliğinin artmasını sağlarlar. Yüksek kaliteli yemlerin üretimine ve korunmasına katkı sağlamasının yanı sıra, geviş getiren hayvanların yem ihtiyacını karşılayan, yüksek nem içeren silajın işlenmesinde kullanılır. Bunlara ek olarak, transgenik hayvanlar üretmek için selüloz genleri klonlanabilir [4, 7, 12].

1.3.2.3. Deterjan endüstrisi

Selülozlar, deterjan endüstrisinde kullanılan üçüncü büyük enzim gruplarıdır. Selüloz fibrillerinin yapılarını değiştirebilmelerinden dolayı deterjan endüstrisinde oldukça önemli bir yere sahiptirler. Mikro fibrilleri kumaş yüzeyinden uzaklaştırarak giysilerin renklerinin parlaklığının artmasını sağlarlar. Renk kaybının azaltılması amacıyla selülozlar yıkama tozlarına ve çamaşır deterjanlarına eklenmektedirler. Ayrıca pamuklu giysilerden kirlerin çıkarılmasında kullanılırlar. Pamuklu giysiler yıkandıkça yüzeyindeki kısmen ayrılmış olan mikro lifler yüzünden kabarılaşmaktadır. Selüloz tarafından mikro fibrillerin parçalanması giysiye yumuşaklar sağlar ve mikro fibrilde tutunan kir parçacıklarını uzaklaştırır. Aynı zamanda kumaştaki pürüzlerin meydana getirdiği eskimiş görüntü selülozlar sayesinde iyileştirilerek kumaşın yeni görüntüsünü korumasını sağlarlar [4, 31].

1.3.2.4. Bira ve şarap endüstrisi

Bira ve şarap yapımı çok eski tarihlere dayanmaktadır. Basitçe; bira, arpanın malt edilerek mayalanmasıyla, şarap ise üzümlerden elde edilen meyve suyunun fermentasyonu ile elde edilir. Bu iki işlemde de enzim teknolojisi önemli bir rol oynamaktadır.

Şarap aromasını arttırdıkları için selülozlar şarap endüstrisinde büyük ilgi görmektedirler. Şarap ve biranın filtrasyonunda kullanılan selülozlar, şarabın berraklığının ve kalitesinin artmasını sağlarlar. Düşük kaliteli arpadan yüksek kaliteli bira üretimi sağlarlar ve böylece sadece bira ve şarap kalitelerini değil üretim verimlerini de arttırlar [4, 12].

1.3.2.5. Tekstil endüstrisi

Tekstil endüstrisinde yüksek enerji, fazla su tüketimi ve çevre kirliliği nedeniyle enzimatik aktivite çok büyük önem taşımaktadır. Pamuğun işlenmesinde yıkama aşamasında çok yüksek enerji ve su tüketimi olmaktadır. Bu aşamada, yüksek sıcaklık ve güçlü alkali koşullarda selüloz elyafları üzerinde kalan çeşitli hücre duvarı bileşenleri çıkarılmaktadır. Enzim kullanılarak bu işlem çok düşük sıcaklıklarda ve daha az su kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Böylelikle hem çevreye hem de tekstil endüstrisine yarar sağlanır [33].

Selülozlar, biyotaşlama işleminde, pamuklu kumaşlara yapışan mikrofibrillerin çıkarılmasında, kumaşların yumuşaklığının ve parlaklığının geri kazanılmasında kullanılırlar [12]. En önemlisi, kot kumaşlarında fazla boyaların çıkarılmasında biyotaş denilen yıkama işleminde kullanılmasıdır. Selüloz lifi üzerine etki ederek kumaşın renklendirilmesinde kullanılan boyayı serbest bırakırlar ve kotların taşlanmış görünmesini sağlarlar [31].

1.3.2.6. Biyoyakıt endüstrisi

Lignoselülozik atıklar dünyada en bol bulunan ve yenilenebilir bir kaynaktır. Son yıllarda çevre kirliliği ve yüksek ham petrol fiyatları nedeniyle biyo-etanol fosil yakıtlardan daha çok tercih edilir hale gelmiştir. Böylece, biyokütleyi alkole dönüştürebilen selüloz enzimi önem kazanmıştır. Biyoyakıt endüstrisinde selülozlar, etanolün üretimi için selülozik biyokütleyi glikoza ve diğer fermente edilebilir şekerlere dönüştürmek için kullanılırlar [31, 33].

1.3.2.7. Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi enzim kullanımı için en büyük pazarlardan birini oluşturmaktadır. Kağıdın geri kazanımı, daha az işlem uygulanabilmesi, yüksek sıcaklık ve zararlı asitlere gerek duyulmadığından çevre dostu olması, lif özelliklerini ve hamurun kalitesini arttırması gibi avantajları bakımından kağıt endüstrisinde selüloz enzimi kullanımı oldukça önem taşımaktadır [34].

Kağıt endüstrisinde odunsu hammaddenin rafine edilmesi ve öğütülmesi gibi mekanik hamurlaştırma işlemleri sonucunda yüksek miktarda sertlik içeren hamurlar oluşmaktadır. Bu lifler kağıt üretimi için faydalı olsa bile yüksek enerji tüketimi dezavantajdır. Selüloz enzimleri kullanılarak yapılan biyo mekanik hamurlama işlemi ile büyük ölçüde enerji tasarrufu sağlanır [4].

Kağıt hamuru üretiminde selüloz enzimi sayesinde hamurun kalitesine zarar veren odunsu malzemeler uzaklaştırılır. Bu işlemde selülozların kullanımı %20 ile %40 arasında bir enerji tasarrufu sağlar. Selüloz kullanımıyla liflerin modifikasyonu gerçekleştirilir ve kağıt üretimi hızı artar [7].

Selülozlar kullanılmış kağıttan mürekkeplerin giderilmesinde kullanılır. Böylece atık kağıtların geri dönüşümünde önemli bir rol oynarlar. Ayrıca biyolojik olarak parçalanabilen kartonları hazırlamak için de kullanılmaktadırlar [31].

Selülozlar bu yaygın kullanım alanlarının dışında, protoplast üretimi için araştırmalarda, antibakteriyel kitoooligosakkaritlerin üretiminde, endüstriyel çamurun uzaklaştırılmasında ve fitobezonların tedavisinde de kullanılmaktadır [30, 31].

1.4. *Bacillus* Cinsinin Özellikleri

Bacillus cinsi, iyi bir spor üretme kabiliyetlerine sahiptir ve çubuk şekilli gram pozitif bakteri grubunu oluşturur. Bazı *Bacillus* türlerinde hareket etmelerini sağlayan esnekliği az, ince, uzun ve sarmal yapıda flagellum organeli bulunur. *Bacillus*'lar mezofilik, termofilik ve psikrofillik cinslerde olabilirler. Çok yüksek sıcaklıklarda canlı kalabilme özelliğine sahiptirler ve genellikle 30-40°C aralığında ürerler.

Güvenli mikroorganizmalar olarak kabul edilen bu bakteri türü tarımsal ve endüstriyel amaçlı kullanılan enzimlerin üretiminde kullanıldıkları için önemlidirler. Aynı zamanda kolay üretilibildikleri için de dikkat çeken mikroorganizmalardır. *Bacillus* bakterileri tarafından üretilen enzimler deterjan, eczacılık, ilaç ve gıda gibi endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Ayrıca bulaşıcı hastalıkların tedavisi için kullanılan antibiyotiklerin üretiminde de *Bacillus* 'lardan yararlanılır.

Bacillus 'ların çoğu toprakta yaşayan bakterilerdir ve bitkileri patojen saldırılarına karşı koruyabilirler. Spor oluşturabildikleri için topraktan izole edilmeleri dışında, gıda, deniz, balık ve su ürünleri, inek gübresi, bazı canlıların bağırsak sistemleri ve bazı böceklerin larvalarından da izole edilebilmektedirler.

Bacillus sp.'lerden üretilen enzimler çeşitli karbonatları, lipitleri ve proteinleri parçalamada oldukça etkilidir. *Bacillus* türleri düşük maliyetli azot ve karbon kaynaklı besiyerlerinde verimli bir şekilde büyüme gösterir. Üremeleri sıvı ve katı besiyerlerinin üst kısımlarında olur. Katı besiyerlerinde koloniler meydana getirirler [35-37].

1.5. İmmobilizasyon

Enzimler, birçok biyokimyasal ve kimyasal reaksiyonu kataliz ederler. Biyokatalizör olarak bilinen enzimler, üretim kolaylığı, substrat özgüllüğü ve çevre dostu olması gibi özellikleriyle endüstride çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Fırıncılık, süt ve süt ürünleri, yiyecek ve içecek, tekstil, ilaç, kağıt, biyoyakıt, atık su arıtımı ve sağlık gibi çok çeşitli endüstrilerde uygulama alanına sahiptirler [38]. Endüstriyel uygulamada enzimin düşük stabilitesi, düşük katalitik aktivitesi, operasyonel stabilitesinin düşüklüğü, işlem koşullarına olan hassasiyeti, geri kazanım ve tekrar kullanılabilirlik eksikliği büyük ölçekli operasyonların geliştirilmesi için engel olarak görülür. Kataliz sistemlerinde çoğu enzim suda erimiş halde çalıştığından ürünü kirletir ve yeniden kullanım için reaksiyon karışımından geri kazanılamaz. Enzimin immobilize edilerek kullanılmasıyla bu problemler aşılabılır [6, 38-40].

İmmobilize enzim 1916 yılında Nelson ve Griffin'in invertaz enziminin odun kömürüne adsorbe edildiğinde, sakrozu hidrolize edebildiğini gözlemlemeleri sonucunda keşfedilmiştir. Daha sonra Grubhofer ve Schelth enzim

immobilizasyonunun, enzimin tekrar kullanımı ve stabilitesi için olanak sağladığını bildirmişler [38, 39].

İmmobilizasyon, çözünmeyen bir destek üzerine enzimin kovalent olarak bağlanması veya adsorbe edilmesi olarak tanımlanır [6].

İmmobilize enzimlerin kullanımı işlem verimliliğinin artması ile sonuçlanabilir. Çeşitli immobilizasyon yöntemleri üretim maliyetlerini düşürerek endüstri teknolojisinin geliştirilmesini sağlar [41]. Günümüzde immobilize enzimler oldukça verimli oldukları için ticari uygulamaları geliştirilmiştir [38]. Çünkü, enzim immobilizasyonu ile enzimlerin pH, sıcaklık, termal stabilite gibi özellikleri ve çevresel değişimlere karşı direnci büyük ölçüde gelişir [38, 42]. Enzimin immobilize edilmesiyle yüksek sıcaklıklarda ve organik çözücüler varlığında operasyonel stabilitesinde oldukça gelişme görülür [43].

Enzim immobilizasyonunda temel amaç, düşük sentez maliyeti ve uygun yüksek bağlama kapasitesi içeren destek kullanılarak enzimin katalizini mümkün olan maksimum seviyeye ulaştırmaktır [38].

Şu anda kullanılmakta olan birçok fiziksel ve kimyasal immobilizasyon yöntemi vardır [41]. Fiziksel yöntemlerde destek ve enzim arasında zayıf etkileşimler oluşurken, kimyasal yöntemlerde destek ve enzim arasında kovalent bağlanma gerçekleşir [38]. İmmobilizasyon çeşitlerinden enzim adsorpsiyonu, basit olması, düşük maliyeti ve enzim üzerinde en az tahrip edici etkilerinden dolayı en yaygın kullanılan yöntemdir [44].

Serbest enzimin stabilitesi kendi yapısal durumuna bağlı olmakla birlikte; immobilize edilmiş olan enzimin stabilitesi, taşıyıcı ile enzimin etkileşimi, bağlanma konumu ve konformasyonel değişimi gibi faktörlere bağlıdır [38]. Genel olarak, immobilizasyon işlemi ile protein yapısı değişebilir ve böylece enzimin özellikleri değişir. Bu değişimin derecesi, immobilizasyon yöntemine, destek ve bağlayıcı ajanın özelliğine ve reaktif gruplara bağlıdır. Dolayısıyla immobilizasyon enzim aktivitesini bir dereceye kadar etkiler [45]. İmmobilize enzimin bulunduğu mikro-ortam, taşıyıcının fiziksel ve kimyasal yapısı, enzimi taşıyıcıya bağlayan ajanın özellikleri ve enzimin

immobilize edildiği koşullar enzimin aktivite ve stabilitesinde azalma ya da artmaya yol açabilmektedir [38].

Enzim immobilizasyonu ile enzimin özellikleri geliştirilebilir ancak uygun olmayan immobilizasyon ile bu özellikler azalabilmektedir [42]. Seçilen destek malzemesinin, dşuk maliyette olması ve enzimatik reaksiyonlar için ürünün ve substratın geçişinde minimum difüzyon sınırlamasıyla birlikte yeterli büyük yüzey alanı sağlaması önemlidir [6].

Sonuç olarak, enzim için immobilizasyon koşulları, deneysel olarak, enzimin aktivitesinin mümkün olan en yüksek düzeyde olmasını, operasyonel stabilitesini ve dayanıklılığını sağlayacak şekilde deneysel olarak bulunur [40].

1.5.1. İmmobilizasyonun avantajları

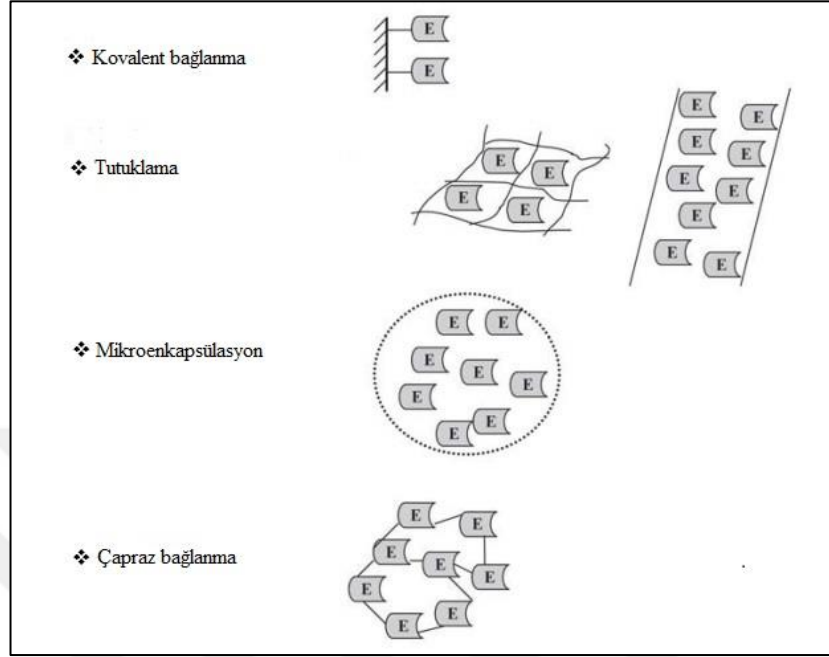
Enzim immobilizasyonu, spesifik bir substrata karşı enzim aktivitesinde iyileştirmeler meydana getirebilir ve dahası, enzim konformasyonundaki iyileştirilmiş stabilitesi enzim spesifikliği ve seçiciliğini arttırabilir [46].

İmmobilizasyon, rn ve substratın neden olduğu enzim inhibisyonunu azaltır, enzimi diğer kirleticilerden arındırır ve ürün kontaminasyonunu engeller [47]. Enzim immobilizasyonu, enzimin üründen kolay ayrılmasını ve kontrollü ürün oluşumunu sağlar. Böylece enzim uygulamalarını basitleştirerek güvenilir ve verimli reaksiyon teknolojisine olanak tanır [44, 48]. İmmobilizasyonun sağladığı en önemli avantajlardan birisi enzimin tekrar kullanılabilmesidir. Endüstriyel uygulamalarda enzimin yeniden kullanılması ve stabilitesindeki gelişmeler ekonomik açıdan oldukça önem taşır [49, 50]. Enzimin kolay geri kazanımı, tekrar kullanımı, ürün oluşumunun kontrol edilebilmesi, enzim stabilitesinin geliştirilmesi, dolayısıyla daha yüksek biyokatalizör üretkenliği ve çeşitli tepkimelerin uygulanabilmesi için olanak sağlar [44].

1.5.2. İmmobilizasyon yöntemleri

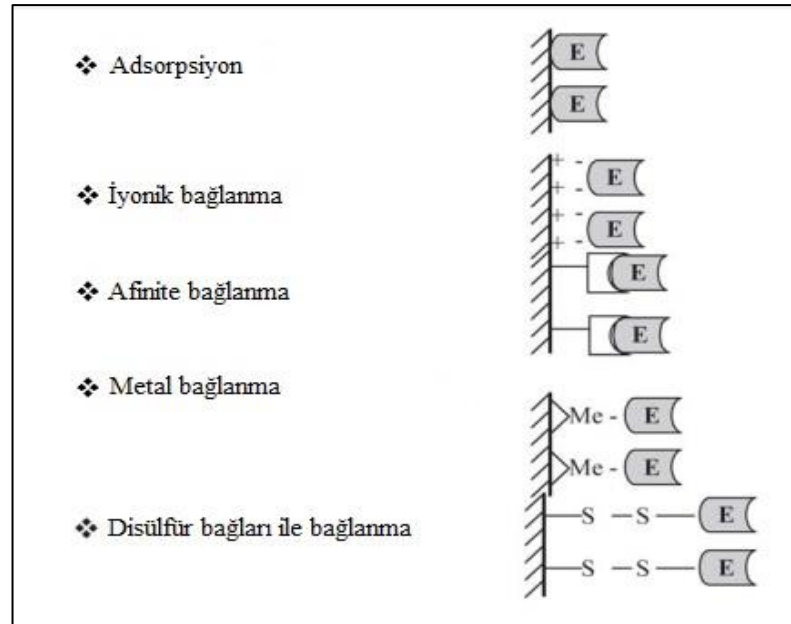
Enim immobilizasyonu, geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz immobilizasyon yöntemleri olarak sınıflandırılmıştır.

Geri dönüşümsüz enzim immobilizasyonu, kovalent bağlanma, tutuklama, mikroenkapsülasyon ve çapraz bağlama yöntemlerini içerir (Şekil 1.6.) [39, 43].



Şekil 1.6. Geri dönüşümsüz immobilizasyon yöntemleri [43]

Geri dönüşümlü enzim immobilizasyonu, adsorpsiyon, iyonik bağlanma, afinite bağlanma, metal bağlanma ve disülfür bağlanma yöntemlerini içerir (Şekil 1.7.) [39, 43].



Şekil 1.7. Geri dönüşümlü immobilizasyon yöntemleri [43]

1.5.2.1. Kovalent bağlanma

Kovalent immobilizasyonda enzim ve destek materyali arasında kovalent bağlar oluşur. Kovalent bağlanma yöntemi güçlü ve stabildir. Enzim ve matrisin arasında oluşan güçlü bağlar sayesinde enzim çözeltiye sızmaz. Dolayısıyla, üründe enzimin olmaması gereken proseslerde bu yöntem kullanılır.

Enzimlerin desteğe kovalent olarak bağlanması lizin (amino grubu), sistein (tiyol grubu), glutamik asit ve aspartik asit (karboksilik grubu) gibi amino asitler sayesinde gerçekleşir. Bu yöntemde destek malzemesi olarak poliakrilamid, agaroz, gözenekli cam ve silika kullanılır.

Destek materyaline enzimin bağlanması ya doğrudan gerçekleştirilir ya da aralayıcı kol adı verilen farklı uzunluklarda birleştirilmiş bir bağlantı aracılığıyla gerçekleştirilebilir. Aralayıcı kol kullanılarak gerçekleştirilen kovalent bağlanmada ilk olarak destek malzemesindeki fonksiyonel gruplar bazı reaktifler tarafından aktifleştirilir ve daha sonra enzim destek malzemesine kovalent olarak bağlanır. Bu işlem için en çok kullanılan reaktif glüteraldehittir. Aralayıcı kol kullanılarak gerçekleştirilen kovalent bağlanma enzimler için daha fazla esneklik sağlar ve dolayısıyla doğrudan kovalent bağlanma yöntemiyle karşılaştırıldığında enzimlerin etkinliğini arttırabilir [38, 39, 43].

1.5.2.2. Tutuklama ve enkapsülasyon

Tutuklama yönteminde enzimler, substrat ve ürünün geçişine izin veren polimerik bir yapı içeresine hapsedilir. Tutuklama, jel, lif ve mikrokapsülleme ile elde edilebilir. Bu yöntemde agar, agaroz, jelatin, aljinat ve polivinilalkol ve poliakrilamid gibi polimerler matris olarak kullanılmaktadır. Diğer yöntemlerden farklı olarak enzim matris veya membrana bağlı bulunmaz.

Tutuklama işlemi fiziksel bir kafes olabilir ya da kovalent bağlanma içerebilir. Enzimlerin jel ya da liflere tutulması düşük molekül ağırlıklı substratlar ve ürünler içeren prosesler için uygundur. Büyük molekül ağırlıklı substratların enzimlerin aktif bölgesine ulaşması zor olur dolayısıyla yüksek molekül ağırlıklı substratlara sahip olan enzimler için pek uygun bir yöntem değildir.

Tutuklama yöntemiyle enzim immobilizasyonu reaksiyon için gereken hızlı, ucuz ve ılımlı koşulları sağlaması bakımından avantajlıdır [38, 39, 43]. Dezavantajı ise, enzim sızıntısı ihtimali, immobilizasyon esnasında enzim deaktivasyonu, düşük yükleme kapasitesine sahip olması ve kullanım sırasında destek malzemesinin aşınmasıdır [51].

Mikro kapsülleme yöntemi, enzim moleküllerinin, küresel yarı geçirgen membranlar içinde seçici bir kontrollü geçirgenliğe sahip olarak kapsüllemesine dayanır. Bu yöntem polimerik malzeme ve enzim arasında geniş yüzey alanını sağlar. Bu yöntemin dezavantajı, kapsülleme sırasında enzimin inaktive olmasıdır [39].

1.5.2.3. Çapraz bağlama

Çapraz bağlama yöntemi, iki veya daha fazla reaktiflerle ya da ligandlarla enzimlerin birbirine bağlanmasına dayanır. Dolayısıyla çok yüksek molekül ağırlıklı agregatlar oluşur. Herhangi bir destek materyaline ihtiyaç duyulmaz.

Çapraz bağlama yöntemi kovalent bir bağlanma içerdiğinden bu yöntemle immobilize edilen enzimde aktivite kaybının yanı sıra konformasyonel değişiklik meydana gelir. Fakat, adsorpsiyonla immobilize edilmiş enzimlerin sızmasını en aza indirmek için destek bağımlı immobilizasyon teknikleriyle birlikte iyi bir kullanım alanı bulunmaktadır. Adsorpsiyon yoluyla edilmiş enzimlerin çapraz bağlayıcı ile muamele edilmesi enzim stabilitesini arttırmak için popüler bir yoldur. En çok kullanılan yöntem enzimlerin adsorbe edildikten sonra gluteraldehit ile muamelesidir.

Düşük maliyeti, yüksek etkinliği ve stabilitesi bakımından çapraz bağlama için en yaygın kullanılan bağlama ajanı gluteraldehittir. Gluteraldehitin iki ucundaki aldehit grupları bir baz reaksiyonu yoluyla serbest enzimin amino grupları ile reaksiyon verirler. Gluteraldehit agregat oluşturmak için enzimin lizin (Lys) gruplarını kullanır.

Çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA'lar), enzimin protein moleküllerinin fiziksel olarak oluşturduğu agregatlardır ve bu fiziksel agregatlar proteinin üçüncül yapılarını bozmadan non-kovalent bağlarla bir arada tutulur. Bu agregatlar enzimin katalitik aktivitelerini korur ve enzimleri çözünmez hale getirir. Bu tür bir immobilize enzimler ucuz ve etkili bir yöntemle üretilibilmelerinden dolayı çok etkili biyokatalizörlerdir.

CLEA'lar kolayca yeniden kullanılabilirler ve uygulamalarda tatmin edici bir performans gösterirler [38, 46].

1.5.2.4. Adsorpsiyon

Enzimlerin çözünmeyen desteklere immobilize edilmesi, diğer immobilizasyon tekniklerine göre geniş uygulama alanına sahip çok eski ve basit bir yöntemdir. Enzimler, uygun pH ve iyonik kuvvet koşullarında, uygun bir destek materyali ile muamele edilerek immobilize edilebilir. Bu yöntem ucuz, kolay ve genellikle enzimin katalitik aktivitesinin korunmasını sağlayan bir yöntemdir. Adsorpsiyon genellikle proteinin mikroçevresinde büyük değişikliklere yol açar.

Adsorpsiyon için kullanılan materyaller aktif kömür, alümina ve iyon değiştirme reçineleridir. Adsorpsiyon işlemi enzim ile matris arasında Van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler, iyonik ve hidrojen bağları gibi etkileşimlerle meydana gelir. Bu yöntem ucuz, kolay ve genellikle enzimin katalitik aktivitesinin korunmasını sağlayan bir yöntemdir. Adsorpsiyon yöntemi ekonomik olarak caziptir fakat zayıf etkileşimler olduğundan dolayı matristen enzim sızıntısı gibi sorunlarla karşılaşılabilir. Enzim sızıntısının en aza indirgenmesi adsorban seçimine bağlıdır. Kimyasal modifikasyonu ve enzimin zarar görmesini engellemek için enzimlerin ve desteğin yüzey özellikleri göz önünde bulundurulmalıdır [38, 39, 43].

1.5.2.5. İyonik bağlanma

İyonik bağlanma yöntemi kromatografide kullanılan protein-ligand etkileşimlerine dayanmaktadır. Enzimlerin geri dönüşümlü immobilizasyonunda ilk kromatografik prensip uygulamalarından biri iyon değiştiricilerin kullanılmasıydı. Immobilizasyon desteği olarak dekstran, agaroz ve kitosan gibi polisakkarit biyopolimerler kullanılabilir. Bu polimerler amonyum, dietilaminoetil ve karboksimetil türevleri dahil olmak üzere iyonik etkileşimi sağlamak için çeşitli kimyasal gruplarla işlevselleştirilebilir.

Bu yöntem basit ve geri dönüşümlüdür fakat genel olarak enzimin hem güçlü bir şekilde bağlanacağı hem de tamamen aktif olacağı koşulları bulmak zordur. İyonik bağlama yöntemi ile immobilize edilmiş enzimlerin optimum pH veya pH stabilitesi

gibi özellikleri değişebilir. Bu durum problem teşkil etmesine rağmen, bazen belirli bir enzim için optimal koşullarının alkali veya asidik pH'ya kayması faydalı olabilir [39, 43, 50].

1.5.2.6. Afinite bağlanma

Afinite yöntemi ile immobilizasyonda enzim belirli etkileşimlerle matrise bağlanır. Genellikle pahalı bir afinite ligandının (antikor veya lektinin gibi) matrise kovalent olarak bağlanmasına dayanan bir yöntemdir. Afinite ile enzim immobilizasyonu iki yöntem içerir. Birinci yöntem, afinite ligandını içeren destek materyalinin aktivasyonudur ve böylece enzim eklenir. Enzimin sert koşullara maruz kalmaması bu yöntemin avantajıdır. İkinci yöntem ise, enzimin bir matrise bağlanma yeteneğine sahip olan başka bir moleküle modifiye edilmesidir [39, 43].

1.5.2.7. Metal bağlanma

Metal bağlanma yönteminde organik taşıyıcıların yüzeyinde biriken geçiş metal tuzları veya hidroksitleri matris üzerinde bulunan nükleofilik gruplarla koordinasyon yoluyla bağlanır. Bu yöntem genel olarak titanyum ve zirkonyum tuzları kullanımıyla gerçekleşir ve metal bağlantı immobilizasyonu olarak da bilinir. Metal tuzlar destek materyali üzerinde ısıtma veya nötrleştirme yoluyla çökeltilir. Selüloz, kitin, aljinik asit ve silika bazlı taşıyıcılar destek materyali olarak kullanılmaktadır.

Bu yöntem oldukça basittir ve bu yöntemle elde edilen immobilize enzimlerin spesifik aktiviteleri yüksektir. Taşıyıcı ve enzim pH'nın düşürülmesiyle ayrılabilirdiğinden dolayı geri dönüşümlü bir immobilizasyon yöntemidir. Dezavantajı, bu yöntemle elde edilen immobilize enzimlerin operasyonel stabiliteilerinin oldukça değişken olup, tekrar kullanım için elverişli olmamasıdır. Bu durum, muhtemelen destekten önemli bir metal sızıntısı olmasıyla ilgilidir [39, 43].

1.5.2.8. Disülfür bağları ile bağlanma

Bu yöntem, tiyol-sülfid değişim reaksiyonlarına dayanan, disülfid (S-S) tipinde stabil bir bağ oluşturan ve geri dönüşümlü bir yöntemdir. Matris ve enzim arasında stabil bir kovalent bağ oluşmasına rağmen, ılımlı koşullar altında ditiyotreitol (DTT) gibi uygun bir madde ile reaksiyonu sokularak bu bağın kırılabilmesinden dolayı eşsiz bir

immobilizasyon tekniğidir. Açığa çıkmamış tiyol (SH) grupları taşıyan enzimler, ılımlı koşullar altında (oda sıcaklığında pH 7-9 ve düşük iyonik kuvvetli tampon) tiyol reaktif destek materyalleri üzerine immobilize edilebilir.

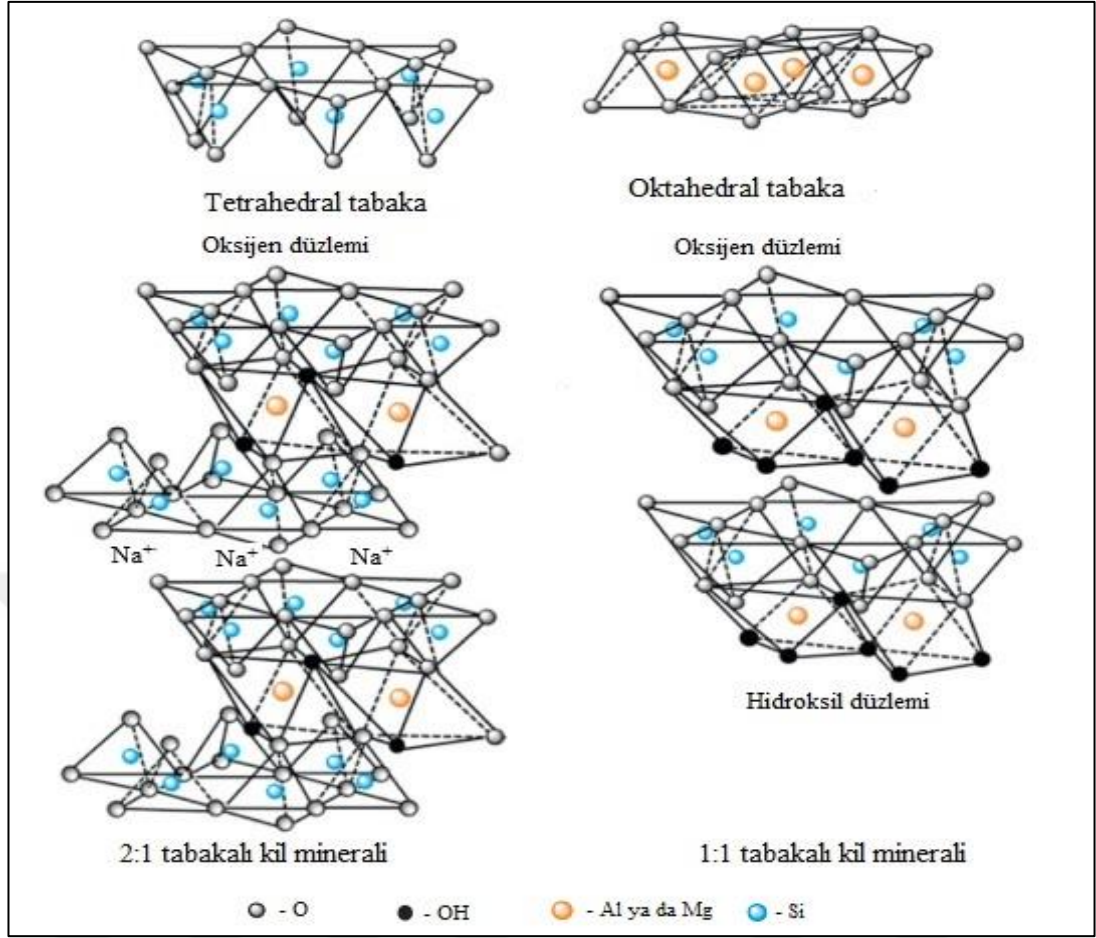
Tiyol gruplarının reaktivitesi pH değişikliği ile değişebilir. Dolayısıyla, yüksek spesifikliğe sahip uygun bir tiyol reaktifinin adsorban olarak kullanılmasıyla disülfid bağ oluşumunu içeren metotların aktivite verimi genellikle yüksek olur [43, 52].

1.6. Enzim İmmobilizasyonunda Killerin Kullanımı

Enzim immobilizasyonu için çeşitli organik ya da inorganik maddeler kullanılmaktadır. Enzimlerle organik destek malzemelerinin üzerine yapılan immobilizasyon çalışmalarında enzimlerin yüksek bir aktivite sergilediği görülmüştür. Fakat organik malzemelerle immobilizasyonda yetersiz termal ve kimyasal stabilite olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bazı organik maddeler enzimler için oldukça yüksek toksiteye sahiptir. Bu sebeplerden dolayı iki boyutlu katmanlı kil mineralleri inorganik katı destek materyalleri organik malzemelere kıyasla avantaja sahiptir. Ayrıca kil mineralleri enzimleri denatürasyona karşı koruyabilir ve aktivilerini muhafaza etmelerini sağlar [53, 54]. Son yıllarda enzim immobilizasyonu için inorganik katı maddeler alanında kil mineralleri dikkat çekmektedir. Kil mineralleri çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir.

Kil mineralleri, doğada bol bulunan sulu alüminyum veya magnezyum filosilikat grubudur ve katmanlı bir yapıya sahiptir [53]. Killerin katmanlı yapıları bir SiO_4 tetrahedral tabakasından ve bir AlO_6 oktahedral tabakasından (1:1 tabakalı) veya bir Al-oktahedral tabaka iki Si-tetrahedral tabakadan (2:1 tabakalı) oluşmaktadır (Şekil 1.8). Katmanların yük eksikliği ara tabakaya bağlanan değiştirilebilir katyonlarla dengelenir [53, 55].

Genellikle, tetrahedral tabakalarda Si^{+4} , oktahedral tabakalarda Al^{+3} ya da Mg^{+2} iyonları bulunur. Demir gibi diğer katyonlar da ya tetrahedral ya da oktahedral tabakalarda bulunabilirler [56].



Şekil 1.8. Killerin yapısı [53]

Kil minerallerinin büyük yüzeyi -Si-O-Si-, -Si-O-OH ve Al (M)-OH gibi fonksiyonel gruplar sağlar. Tetrahedral silikat (Si-O) tabakalarındaki hidrofobik -Si-O-Si- grupları enzim molekülleri ve kil mineralleri arasında hidrofobik etkileşimleri sağlayabilir. Ayrıca, kil minerallerindeki tetrahedral ve oktahedral tabakaların kenarlarındaki hidroksil grupları sayesinde enzim molekülleri ile hidrojen bağı oluşturulabilir.

Kil mineralleri geniş yüzey alanı, şişme ve iyon değişimi gibi özelliklere sahiptir. Kil minerallerinin ara tabakalarına yerleştirilen değiştirilebilir katyonlar enzim molekülleri ile değiştirilebilir. Bu özelliği sayesinde kil mineralleri enzim immobilizasyonunda mükemmel bir destek görevi görür [53]. Yüksek katyon değişim kapasiteleri ve yüksek spesifik yüzey alanları nedeniyle killer kirletici maddelerin sulu çözeltilerden uzaklaştırılmasını sağlayabilir [57].

Tabakalı kil mineralleri, organik, polimerik ya da biyolojik moleküller tarafından kil minerallerinde çeşitli modifikasyonlara izin verir. Böylelikle modifiye edilmiş kil mineralleri fonksiyonel gruplara, artmış hidrofobik yapıya, azaltılmış sterik engele sahip olur. Dolayısıyla kil mineralleri, pH dayanıklılığı, ısıl kararlılık ve immobilize edilen enzimlerin biyoyumluluğu gibi özelliklere sahiptir. Ayrıca tabakalı kil mineralleri enzimlerin mikrobiyal kontaminasyonlardan korunmasını sağlar [53].

Kil mineralleri düşük veya sıfır toksite, iyi biyoyumluluk ve kontrollü salınım gibi özelliklere sahiptir. Bu özellikleri sayesinde farmasötik, kozmetik, tarım ve ilaç gibi çeşitli alanlarda kullanılabilmelerinden dolayı ilgi görmektedirler [58].

1.6.1. Killer üzerine enzimlerin bağlanması

Enzimlerin kil mineralleri üzerine immobilizasyonu, kovalent ve kovalent olmayan (non-kovalent) immobilizasyon olmak üzere iki kategoriye ayrılabilir. Kovalent immobilizasyon, enzimlerin kil minerallerine çok sağlam bir şekilde bağlanmasına yol açabilir, non-kovalent immobilizasyon ise enzimlerin konformasyonel yapısının iyi korunmasına izin verir.

Enzim immobilizasyonunda yaygın olarak 2:1 tabakalı killer kullanılmaktadır. Tabakalar üzerindeki elektriksel yükler, kil ve enzim arasında elektrostatik çekimde büyük bir rol oynar. Ayrıca, kil minerallerinin yüzeyindeki hidroksil gruplarının protonlarının ayrılmaları kil minerallerinin kenarlarında Si-O-Al-O^- gibi değişken negatif yüklü bölgelerin oluşmasına sebep olur. Pozitif enzimler bu bölgelere elektrostatik etkileşimler sayesinde kolayca adsorbe edilebilir. Bazı araştırmacılar iyonik bağlanmanın enzimler ve kil mineralleri arasında oluştuğunu ifade etmektedir.

1:1 tabakalı kil minerallerinde ara tabaka iç alanında değiştirilebilir katyonlar bulunmamaktadır. Ayrıca, bitişik katmanlarının H ve OH grupları arasında hidrojen bağları içermektedir. Sonuç olarak, enzim moleküllerinin ara katman boşluklarına sokmak zordur. Fakat, bu tür killere enzimleri immobilize etmek mümkündür. Çünkü, enzimlerin adsorpsiyonu killerin kenarlarında ve yüzeylerinde meydana gelebilir. Elektrostatik etkileşimlerinin yanı sıra hidrofobik etkileşimler de enzimlerin kil minerallerinin yüzeylerine adsorpsiyonuna yol açabilir. Her bir tetrahedral kil tabakasının dış Si-O-Si düzlemi büyük bir hidrofobik yüzey sağlar. Bu nedenle

hidrofobik etkileşimler yoluyla enzimlerin kil mineralleri üzerine adsorpsiyonu killerin başlıca özelliklerindedir. Bu tür yüzey immobilizasyonu enzimin konfigürasyonunun korunması için uygundur ve böylece enzimler biyolojik aktivitelerini korur.

Elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlere ek olarak hidrojen bağları ve tuz köprülerinin oluşumu ile de enzimler kil minerallerine bağlanabilir. Ayrıca enzimler Van der Waals kuvvetleri ile de kil minerallerinin yüzeylerine iyi bir şekilde bağlanabilir.

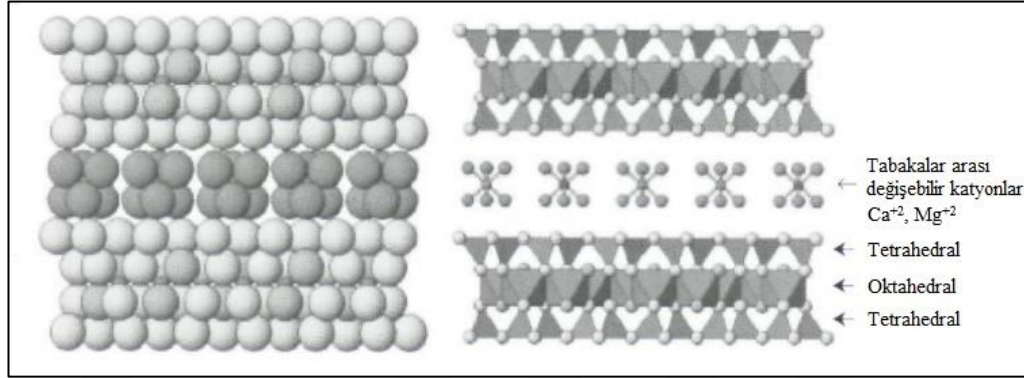
Non-kovalent adsorpsiyon ile enzimlerin killer üzerine immobilizasyonu basit ve çevreci bir yöntem olmasına rağmen; elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimler kovalent bağlara kıyasla zayıf etkileşimlerdir. Non-kovalent enzim immobilizasyonu enzimler kil minerallerinden ayrışabilir. Enzimlerin kil yüzeyinden sızması immobilize enzimlerin aktivitesinde kayıp meydana getirir.

Kil mineralleri ve enzimler arasında güçlü bir etkileşim gerektiğinde kovalent bağlanma ile enzim immobilizasyonu tercih edilen bir seçimdir. Enzimlerin kil mineralleri üzerine kovalent immobilizasyonu, kil minerallerinin yüzeyi üzerindeki fonksiyonel gruplar ile enzim molekülleri üzerindeki fonksiyonel gruplar arasında kovalent bağların oluşturulmasıyla gerçekleşebilir. Kovalent bağlar ayrıca kil minerallerine başka moleküllerin bağlanmasıyla oluşturulabilir. Kil minerallerinin yüzeyi spesifik konformasyonel gruplarla etkinleştirildiğinde, bu gruplar kil mineralleri ile enzimler arasında kovalent bağ oluşturarak enzimleri bağlayabilir. Bu proses için gluteraldehit, kitosan ve 1-etil-3-karbodiimid hidroklorür (EDC) gibi fonksiyonel ajanların etkili olduğu belirlenmiştir [53].

1.6.2. Vermikülit

Vermikülit kristalli silika içeren, mikayı andıran ucuz ve çevre dostu bir kildir [59]. 2:1 tabakalı kristal bir yapıya sahip olan vermikülitin kristal yapısı ilk olarak 1934 yılında çalışılmış ve mika tabakaları arasında su moleküllerinin varlığı ortaya konmuştur. Daha sonra 1938 yılında vermikülitin kristal yapısının tabakalar arası iyonları sayesinde nötr olduğu belirlenmiştir.

1980'li yıllarda vermikülit; 2:1 tabakaları arasında Mg, Fe veya Al içeren, yüksek yükte sahip ve genişleyen fillosilikat mineral olarak tanımlanmıştır [60]. Kimyasal formülü $Mg_{0.3}(MgFe)_3(Al,Si)_4O_{10}(OH)_4 \cdot 8H_2O$ şeklindedir [61].



Şekil 1.9. Vermikülitin tetrahedral ve oktahedral tabakalı yapısı [62]

Vermikülit iki tetrahedral ve bir oktahedral tabakadan oluşmaktadır (Şekil 1.9) [61]. Tetrahedral tabakalarda Si^{+4} ve Al^{+3} , oktahedral tabakalarda Mg^{+2} , Fe^{+2} veya Al^{+3} iyonları bulunur [59, 60]. Tetrahedral tabakadaki silisyum yerine alüminyum geçtiğinde yük dengesizliği ortaya çıkar. Oluşan bu yük dengesizliği genellikle Mg^{+2} kationları ile dengelenir [61]. Bu iyonlar sayesinde çok yüksek kation değişim kapasitesine sahiptir. Ayrıca, tetrahedral tabakadaki yüksek yükleri nedeniyle yüksek elastikiyet ve plastiteye sahiptir [57].

Dünyadaki önemli vermikülit yatakları Güney Afrika, Amerika Birleşik Devletleri, Rusya ve Avustralya'dadır [63]. Vermikülitlerin ülkemizde bilinen yatakları ise, Sivas-Yıldızeli, Eskişehir-Sarıcakaya, Elazığ-Harput ve Malatya bölgelerindedir [62, 63].

Ticari vermikülitlerin çoğu ara katmandaki suyu uçurmak ve genişletilmiş (pullu) bir yapı elde etmek için ısıtılma işlemi görür. Şekil 1.10'da vermikülitin pullu yapısı gösterilmiştir [64].

Çok hızlı bir şekilde yüksek sıcaklığa ısıtıldığında, tabakalar arasındaki su buharlaşır ve böylelikle genişleme meydana gelir.



Şekil 1.10. Vermikülitin yapısı [64]

Genleşmiş vermikülit, düşük yoğunluk, inertlik, düşük ısı iletkenliği, iyi iyon değişimi, yüksek gözeneklilik ve yüksek su tutma kapasitesi gibi özelliklere sahip olduğundan endüstriyel uygulamalar için ilgi uyandırmaktadır [62, 65]

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Mikroorganizma

Yapılan çalışmada bakteri izolatı Kocaeli ili ve çevresinden ve Umuttepe Kampüsünden izole edilip, Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında stoklanan kültürlerden temin edildi. Bir selüloz üreticisi bakteri suşu *Bacillus methyilotrophicus* Y37 'den sağlandı [66].

2.2. Kimyasallar

Deneysel çalışmada kullanılan vermikülit Fluka'dan temin edildi. Diğer kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma Chemical Ltd. (ABD), Fluka AG (İsviçre), Riedel AG (Almanya) ve Merck AG (Almanya)'dan temin edildi.

2.3. Selüloz Enziminin Üretimi

Selüloz enziminin üretimi için uygun besiyeri 500 mL için; 0,5g pepton, 2,5g yeast ekstrakt, 0,5g K₂HPO₄, 0,1g MgSO₄.7H₂O, 2,5g NaCl ve 5g CMC olarak hazırlandı. Hazırlanan bu CMC'li kültür ortamı çalkalamalı inkübatörde boyunca (New Brunswick Scientific-Excella E24 Incubator Shaker Series) 37°C 160 rpm'de 18 saat boyunca geliştirildi. 18 saatin sonunda elde edilen bakteri kültürü +4°C'de 100000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi ve sıvı kısmı selüloz enzimi olarak kullanıldı [66].

2.3.1. Serbest selüloz enziminin aktivitesinin belirlenmesi

Selüloz enziminin aktivitesini belirlemek için, 200 µl enzim 50mM pH 7 tris-HCl tamponunda hazırlanan %1'lik CMC substratının 800 µl'si ile su banyosunda 50 °C'de 3 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda reaksiyon ortamına 1 mL dinitrosalisilik asit (DNS) ilave edilerek 5 dakika kaynatıldı. Kaynatma işleminden sonra soğuması için 10 dakika buz banyosunda bekletildi. Süre sonunda UV-spektrofotometrede 540 nm'de absorbansı okundu [66];

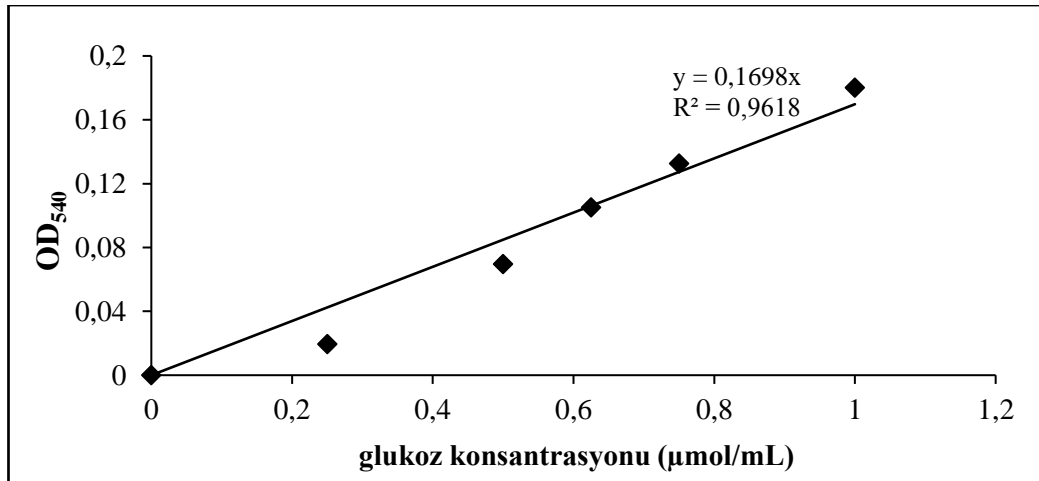
$$\text{Enzim Aktivitesi (U/mL/dk)} = \frac{\frac{\text{OD}_{540}}{\text{Eğim}} \times \text{Reaksiyon hacmi (mL)}}{\text{Enzim hacmi (mL)} \times \text{Reaksiyon süresi (dk)}} \quad (2.1)$$

formülü ile enzimin aktivitesi hesaplandı. Bir ünite enzim, belirlenen koşullarda 1 µM ürün oluşumunu sağlayan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir. Formülde kullanılan eğim, Şekil 2.1’de gösterilen glukoz standart grafiğinden elde edilen eğimdir.

2.3.2. Glukoz standart grafiğinin hazırlanması

1 g 3,5 dinitro salisilik asit (DNS) 20 mL 2 N sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisinde çözüldü ve 50 mL saf su ilave edildi. Hazırlanan çözeltinin üzerine 30 g sodyum potasyum tartarat tetrahidrat (KNaC₄H₄O₆ 4H₂O) ilave edilerek çözüldükten sonra saf su ile 100 mL’ye tamamlandı.

0,09 g glukoz 100 mL suda çözüldü ve 0,25, 0,5, 0,625, 0,75 ve 1 µmol/mL’ye seyreltildi. Hazırlanan bu glukoz çözeltisinin 1 mL’sine 3mL DNS çözeltisi eklenerek 5 dakika kaynatıldı ve 10 dakika buz banyosunda bekletilerek soğuması sağlandı. Hazırlanan örneklerin spektrofotometre cihazı ile 540 nm’deki absorbansları ölçüldü. Denemeler çift örnek olarak çalışıldı ve hesaplamalarda ortalamaları kullanıldı. Glukoz miktarına karşı okunan absorbans değerlerinin grafiğinden elde edilen eğimden yararlanılarak aktivite hesaplandı.



Şekil 2.1. Glukoz standart grafiği

2.3.3. Protein miktarının belirlenmesi

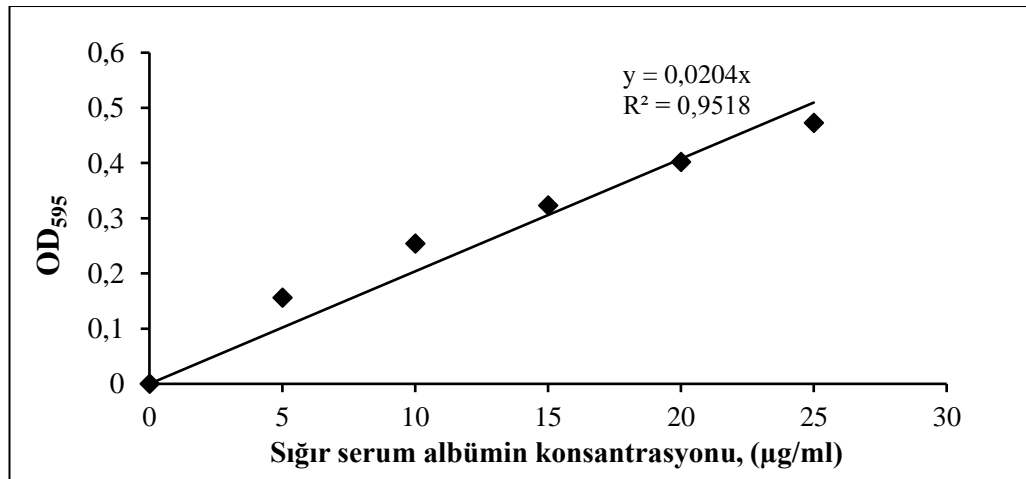
Enzimin protein miktarı, standart olarak sığır serum albümin (BSA) ve reaktif olarak Coomassie Blue G-250 boyası kullanılan Bradford metodu [67] ile 25°C’de 595 nm’de absorbans ölçümü yapılarak belirlendi. Bu yöntemle protein miktarı belirlemek için, 1 mL enzim üzerine 1 mL Coomassie Blue G-250 çözeltisi ilave edilerek 595 nm’de spektrofotometrik olarak ölçümü yapıldı;

$$\text{Protein Miktarı (mg/ml)} = \left(\frac{\text{OD}_{595}}{\text{Eğim}} \right) \times \text{seyreltme faktörü} \quad (2.2)$$

formülü kullanılarak protein miktarı belirlendi.

Boyama çözeltisi, 1 L %2’lik perklorik asit içerisinde 0,6 g Coomassie Brilliant Blue G-250 çözünerek hazırlandı. Çözünmeyen taneciklerin giderilmesi için çözelti kaba süzgeç kağıdı ile süzülerek karanlık şişede muhafaza edildi.

Formülde yer alan eğimin elde edilmesi için farklı konsantrasyonlarda BSA hazırlanarak 595 nm’deki absorbansı ölçüldü ve Şekil 2.2’deki standart grafiği oluşturuldu.



Şekil 2.2. Sığır serum albümin standart grafiği

2.4. İmmobilizasyon Desteği Olan Vermikülitin Hazırlanması

Ticari vermikülit ilk olarak 1 M pH 5 sodyum asetat-asetik asit tamponu ile oda sıcaklığında 200 rpm'de karıştırılarak gece boyu muamele edildi ve fazla tampon 3 defa saf su ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Tampon ile muamele olmuş vermikülit organik maddeleri uzaklaştırmak için %30'luk H₂O₂ ile oda sıcaklığında 200rpm'de 15 dk karıştırılarak muamele edildi ve 3 defa saf su ile yıkandı. Daha sonra serbest amorf silika ve alüminyum uzaklaştırmak için %2'lik Na₂CO₃ ile 3 dakika kaynatıldı. İşlenmiş vermikülit 3 defa saf su ile yıkandı. Hazırlanan vermikülit oda sıcaklığında gece boyu 200 rpm'de karıştırılarak 1 M sodyum klorür ile işlendi ve katyonik vermikülit elde edildi. Süpernatant serbest klorür içermeyene kadar fazla klorür saf su ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Cl testi (Merck Cl₂-1 klor belirteci) sonucunda negatif cevap veren Na-vermikülit etüvde kurumaya bırakıldı. Her yıkamadan sonra vermikülit dekantasyon yöntemi ile ayrıldı ve her muamelenin ardından etüvde kurutuldu.

2.5. İmmobilize Enzimin Hazırlanması ve Aktivitesinin Belirlenmesi

Hazırlanan Na-vermikülitin 1 g'ı 5 mL enzim çözeltisi ile +4°C'de 2 saat boyunca 100 rpm'de muamele edildi. Bağlanmayan proteinleri uzaklaştırmak için 3 defa saf su ile yıkandı ve vakumda süzüldü. Oluşturulan vermikülit-enzim karışımı 5 mL %3'lük gluteraldehit ile +4°C'de 100 rpm'de karıştırmalı olarak 1 saat muameleye bırakıldı. Son olarak fazla gluteraldehiti uzaklaştırmak için immobilize enzim saf su ile yıkanarak vakumda süzüldü.

İmmobilize enzimin aktivitesi belirlenirken, 0,1 g immobilize enzim 50 mM pH 7 tris-HCl tamponunda hazırlanan %1'lik CMC substratının 800 µl'si ile muamele edildi ve su banyosunda 50 °C'de 3 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda reaksiyon ortamına 1 mL DNS ilave edildi ve karışım 5 dakika kaynatıldı. Daha sonra soğuması için 10 dakika buz banyosunda bekletildi. Süre sonunda karışım santrifüj yoluyla ayrıldı ve UV spektrofotometre cihazıyla süpernatantın 540 nm'deki absorbansı okundu;

$$\text{Enzim Aktivitesi(U/g)} = \frac{\frac{\text{OD}_{540}}{\text{Eğim}} \times \text{Reaksiyon hacmi(mL)}}{\text{İmmobilize enzim miktarı(g)} \times \text{Reaksiyon süresi(dk)}} \quad (2.3)$$

formülü ile immobilize enzimin aktivitesi hesaplandı.

İmmobilize enzimin verimi ise;

$$\text{Verim} = \frac{\text{İmmobilize enzim aktivitesi}}{\text{Serbest enzim aktivitesi}} \times 100 \quad (2.4)$$

formülü kullanılarak belirlendi.

2.6. Destek Materyelinin Yapısal Karakterizasyonu

2.6.1. XRD (X ışını kırınım) yöntemi

Ham vermikülit, Na-vermikülit ve protein ile muamele edilmiş Na-vermikülitin XRD analizleri gerçekleştirildi. Her bir örneğin XRD analizi 2θ tarama ekseninde ve 1°/dk tarama hızında, 2-60° aralığında filtrelenmiş Cu radyasyonu kullanılarak 40 kV'de gerçekleştirildi.

2.6.2. SEM (taramalı elektron mikroskobu) analizi

Vermikülit kilinin yüzey morfolojisi 15 kV'de çalışan taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edildi. Her bir örnek x1000 büyütme boyutunda incelendi.

2.7. İmmobilize Enzimin Optimizasyon Çalışmaları

2.7.1. İmmobilize enzim miktarı optimizasyonu

En iyi immobilize enzim miktarının belirlenmesi için, bölüm 2.5'te belirtildiği gibi hazırlanan immobilize enzimden 0,1g, 0,2g, 0,3g, 0,5g, 0,7g, 0,9g ve 1 g alındı. Belirlenen miktarlardaki immobilize enzim ile bölüm 2.4'te belirtildiği gibi aktivite tayini yapılarak verimi hesaplandı. Deneysel çalışma 5 kez tekrarlandı ve her denemede çift örnek kullanıldı. Sonuçlar standart sapmalar ile birlikte grafik üzerinde gösterildi.

2.7.2. Gluteraldehit yüzdesi optimizasyonu

Bölüm 2.5'te belirtildiği gibi immobilize enzim hazırlandı. İmmobilizasyon işlemi için en iyi gluteraldehit yüzdesini belirlemek için oluşturulan vermikülit-enzim karışımı farklı konsantrasyonlarda (%0,5-1-3-5-7-9-10) gluteraldehit ile +4°C'de 1 saat

muamele edildi ve (2.3) ile (2.4) no'lu denklemlerden yararlanılarak verim hesabı yapıldı. Denemeler çift örnek olarak gerçekleştirildi ve her bir deneme 5 kez tekrarlanarak hesaplanan ortalama değerler kullanıldı. Standart sapmaları hesaplanarak sonuçlar grafik üzerinde gösterildi.

2.7.3. Gluteraldehit muamele süresi optimizasyonu

Gluteraldehitin muamele süresinin immobilizasyon üzerine etkisini incelemek için enzimin adsorbe edildiği vermikülit, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 1440 dakika sürelerle, en yüksek verimi sağlayan %3'lük gluteraldehit konsantrasyonu ile +4°C'de muamele edildi. Muamele sonunda (2.3) ile (2.4) no'lu denklemlerden yararlanılarak aktivite ve verim hesaplandı. Deneysel çalışma 5 kez tekrarlandı ve her denemede çift örnek kullanıldı. Sonuçlar standart sapmalar ile birlikte grafik üzerinde gösterildi.

2.7.4. Enzim muamele süresi optimizasyonu

İmmobilizasyon verimi için en iyi enzim muamele süresini belirlerken, 1/2, 1, 2, 4, 6, 8 ve 24 saat süre ile Na-vermikülit selülaz enzimi ile +4°C'de muamele edildi. Daha sonra belirlenen en iyi gluteraldehit konsantrasyonu ve süresi ile muamele edilip (2.4) no'lu denklemden yararlanılarak verim hesaplandı. Denemeler çift örnek olarak gerçekleştirildi ve her bir deneme 5 kez tekrarlanarak hesaplanan ortalama değerler kullanıldı. Standart sapmaları hesaplanarak sonuçlar grafik üzerinde gösterildi.

2.7.5. İmmobilize enzimde tekrar kullanım

İmmobilize selülazın tekrar kullanılabilirliği belirlenirken bölüm 2.5'te anlatılan aktivite tayini uygulandı. Bölüm 2.5'te belirtilen aktivite tayininden farklı olarak, inkübasyon işleminden sonra reaksiyon çözeltisinden immobilize selülaz santrifüj ile ayrıldı ve süpernatant ile aktivite tayinine devam edildi. Yapılan bu işlem arka arkaya tekrarlandı. Her tekrardan sonra immobilize enzim 50mM pH 7 Tris-HCl tamponu ile yıkandı ve bir sonraki döngüde tekrar kullanıldı. Her bir kullanımdan sonra (2.3) no'lu denklem ile immobilize enzimin aktivitesi hesaplandı ve (2.4) no'lu denklem ile verimi belirlendi. İmmobilize enzimin kalan aktivitesi, başlangıç enzim aktivitesi %100 olarak kabul edilerek hesaplandı ve grafik üzerinde gösterildi.

2.7.6. İmmobilize enzimin operasyonel stabilitesi

İmmobilize enzimin biyotransformasyonu için bölüm 2.5'te anlatıldığı gibi immobilize enzim hazırlandı. Hazırlanan immobilize enzimin tamamı 20 mL %1'lik CMC (50 mM pH 7 Tris-HCl tamponunda) ile 50°C'de reaksiyona sokuldu. 10'ar dakika aralıklarla bölüm 2.5'te belirtildiği gibi aktivite tayini yapıldı. İmmobilize enzimin aktivitesi sıfırlanana kadar bu işleme devam edildi. İşlem sonunda immobilize selüloz tampon ve saf su ile yıkanarak operasyonel stabilite için saklandı.

İmmobilize enzimin operasyonel stabilitesi, 50 mM pH 7 Tris-HCl tamponunda hazırlanan %1'lik CMC ile 100 dk boyunca 50°C'de reaksiyona sokuldu. Süre sonunda aktivite tayini yapıldı. İmmobilize enzim tampon ve saf su ile yıkanarak tekrar CMC ile reaksiyona sokuldu. Aktivitesi sıfırlanana kadar bu işlemler tekrarlandı. Sonuçlar grafik üzerinde gösterildi.

2.8. İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu

2.8.1. İmmobilize enzim üzerine pH etkisi

İmmobilize enzim üzerine pH etkisini belirlemek için, farklı pH'lara sahip 50 mM tampon çözeltiler içerisinde %1'lik CMC substratı hazırlandı. Kullanılan tampon çözeltiler aşağıdaki gibidir:

pH 3 için 50 mM glisin-HCl tamponu: 50 mM'lık glisin ve HCl çözeltileri hazırlandıktan sonra, çözeltiler birbirine eklenerek pH metre yardımı ile tampon çözeltisinin pH'sı 3'e ayarlandı.

pH 4, pH 5 ve pH 6 için 50 mM asetat tamponu: 50mM sodyum asetat ve asetik asit çözeltileri hazırlandıktan sonra, çözeltiler birbirlerine eklenerek pH'sı 4, 5 ve 6 olan tampon çözeltiler hazırlandı.

pH 7 ve pH 8 için 50 mM Tris-HCl tamponu: 50 mM Tris ve HCl hazırlandıktan sonra, bu çözeltiler birbirlerine karıştırılarak pH 7 ve pH 8 tampon çözeltileri hazırlandı.

pH 9 ve 10 için 50 mM tris-NaOH tamponu: 50 mM Tris ve NaOH çözeltileri hazırlandıktan sonra bu iki çözelti birbirlerine karıştırılarak belirtilen pH'larda tampon çözeltiler hazırlandı.

Farklı pH'lardaki tampon çözeltilerde hazırlanan CMC substratı ile aktivite tayini yapıldı ve sonuçlar bağıl aktivite (%) olarak grafik üzerinde gösterildi.

2.8.2. İmmobilize enzim üzerine sıcaklık etkisi

En yüksek enzim aktivitesini gösteren sıcaklığı belirlemek için, 50mM pH 7 Tris-HCl tamponun hazırlanan %1'lik CMC substratı ile farklı sıcaklıklarda (25°C,30°C, 35°C, 40°C,45°C, 50°C, 55°C, 65°C ve 75°C) daha önceki bölümlerde belirtildiği gibi aktivite tayinleri yapıldı. Sonuçlar bağıl aktivite (%) olarak hesaplandı ve grafik üzerinde gösterildi. Maksimum aktivite gösteren sıcaklık değeri %100 olarak kabul edildi.

2.8.3. İmmobilize enzimin kinetik parametrelerinin (K_m , V_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m) belirlenmesi

Serbest ve immobilize selülaz enziminin kinetiği, 50 mM pH 7 Tris-HCl tamponunda farklı konsantrasyonlarda hazırlanan (%0,01 ile %5 arasında) CMC substratı ile bölüm 2.3.1 ve 2.5'te belirtildiği gibi aktivite tayini yapılarak çalışıldı.

Serbest ve immobilize selülaz enziminin CMC hidrolizi için K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesi için başlangıç hızı koşullarında yatışkın hal yaklaşımına göre Michaelis-Menten denklemi ve resiprokal formu kullanıldı;

$$V_0 = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} \quad (2.5)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \times \frac{1}{[S]} \quad (2.6)$$

Formüllerdeki parametreler;

V , 50°C'de pH 7'de CMC hidrolizinin başlangıç hızını (U/mL/dk),

$[S]$, 50 mM pH 7 Tris-HCl tamponunda hazırlanmış CMC konsantrasyonunu (mM),

K_m , CMC hidrolizi için belirlenen koşullarda enzimin Michaelis-Menten sabitini (mM),

V_m , CMC hidrolizi ile ulaşılabilecek maksimum başlangıç hızını (U/mL/dk) ifade etmektedir.

Michaelis-Menten model parametreleri Lineweaver-Burk diyagramı kullanılarak belirlendi. Denklem (2.6) yardımıyla $1/V-1/[S]$ grafiği çizilerek elde edilen doğrunun eğiminden K_m/V_m ve interseptinde (y eksenini kestiği noktadan) $1/V_m$ değerleri bulunarak, serbest ve immobilize enzimin kinetik parametreleri hesaplandı [68].

Enzim konsantrasyonu ile V_m ilişkisi;

$$V_m = k_{cat} [E]_t \quad (2.7)$$

formülü ile ifade edilir. Burada;

k_{cat} , turnover katsayısıdır ve enzimin substratına doğgun olduğu zaman, birim zamanda bir molekül enzimin ürüne dönüştürülen substrat moleküllerini ifade eder.

$[E]_t$, toplam enzim konsantrasyonudur ($\mu\text{mol/ml}$) [69, 70]. Bunlara ek olarak bir de enzimin katalitik performansını gösteren k_{cat}/K_m değeri hesaplandı.

2.8.4. Arrhenius aktivasyon enerjisinin hesaplanması

Sıcaklık ile reaksiyon hızı ilişkisini ifade eden Arrhenius denklemi;

$$k = A.e^{-E_a/RT} \quad (2.8)$$

şeklinindedir. Burada; A frekans faktörü veya Arrhenius faktörü, E_a aktivasyon enerjisi (J/mol), T mutlak sıcaklık ve R evrensel gaz sabitidir (8,314 (J/mol K)).

Denklemin her iki tarafının logaritması alınarak;

$$\ln k_{cat} = \ln A - \left(\frac{E_a}{RT} \right) \quad (2.9)$$

formülü elde edilmiştir.

$V = k_{cat} [E]_t$ olduğundan, $k_{cat} = V / [E]_t$ olur. $[E]_t$ deney boyunca sabit olduğu için, $\ln k_{cat} \cong \ln V$ alınabilir.

Böylece çizilen $\ln V'$ 'ye karşı $1/T$ grafiğinin (aynı zamanda Arrhenius grafiği olarak da bilinir) eğimi, $-E_a/R$ 'ye eşittir. Böylelikle, aktivasyon enerjisi (E_a) hesaplanır [71].

Serbest ve immobilize selülazın aktivasyon enerjilerinin belirlenmesi için farklı sıcaklıklarda (25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 65°C, 75°C) aktivite ölçümleri (50mM Tris-HCl pH 7 tamponunda %1'lik CMC ile) yapıldı. $\ln k-1/T$ grafiği çizilerek Arrhenius formülü ile aktivasyon enerjileri hesaplandı.

2.8.5. Serbest ve immobilize enzimin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

Serbest ve immobilize enzimin termodinamik parametreleri;

$$\Delta G^\# = -RT \ln(k_{cat}h/k_b T) \quad (\text{kJ/mol}) \quad (2.10)$$

$\Delta G^\#$: CMC hidrolizine ilişkin serbest aktivasyon enerjisi,

$$\Delta G^\#_{E-T} = -RT \ln(k_{cat}/K_m) \quad (\text{kJ/mol}) \quad (2.11)$$

$\Delta G^\#_{E-T}$: Geçiş (tranzisyon) hali bağlanma serbest enerjisi,

$$\Delta G^\#_{ES} = -RT \ln(1/K_m) \quad (\text{kJ/mol}) \quad (2.12)$$

$\Delta G^\#_{ES}$: Substrat bağlanma enerjisi,

$$\Delta H^\# = E_a - RT \quad (\text{kJ/mol}) \quad (2.13)$$

$\Delta H^\#$: Entalpi değişimi,

$$\Delta S^\# = (\Delta H^\# - \Delta G^\#)/T \quad (\text{kJ/mol.K}) \quad (2.14)$$

$\Delta S^\#$: Entropi değişimi,

formülleri kullanılarak hesaplandı. Formüllerde,

R, gaz sabitini (8,314 J K⁻¹mol⁻¹)

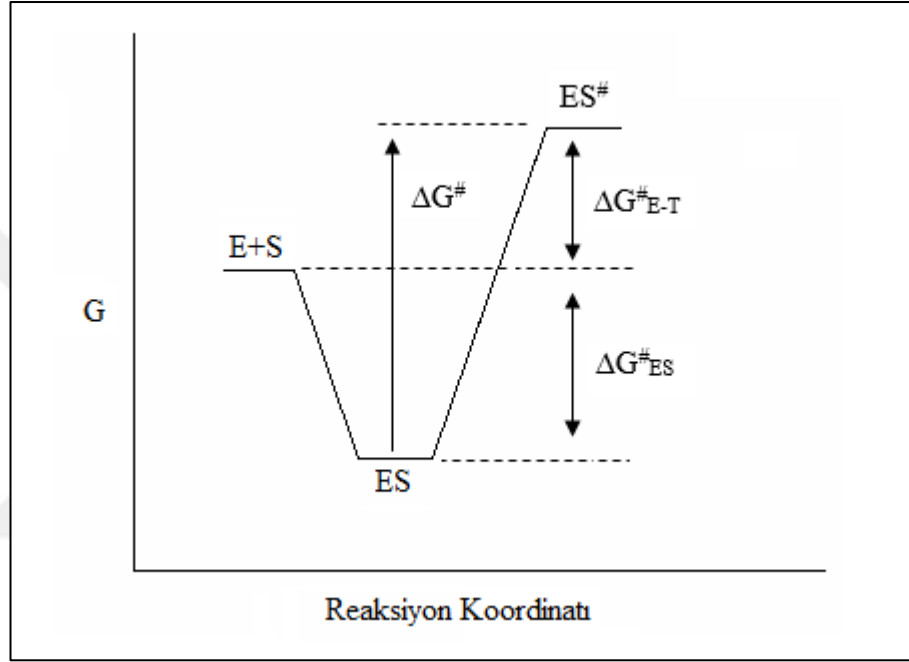
T, mutlak sıcaklığı (K),

h , Plank sabitini ($6,63 \times 10^{-34}$ J s),

k_b , Boltzman sabitini ($1,38 \times 10^{-23}$ J K⁻¹),

k_{cat} , turnover katsayısını (dk⁻¹) ifade etmektedir [70, 72].

Selülaz enzimi ile katalizlenen CMC hidrolizi reaksiyonunun termodinamik parametrelerini içeren serbest enerji düzeyi diyagramı Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



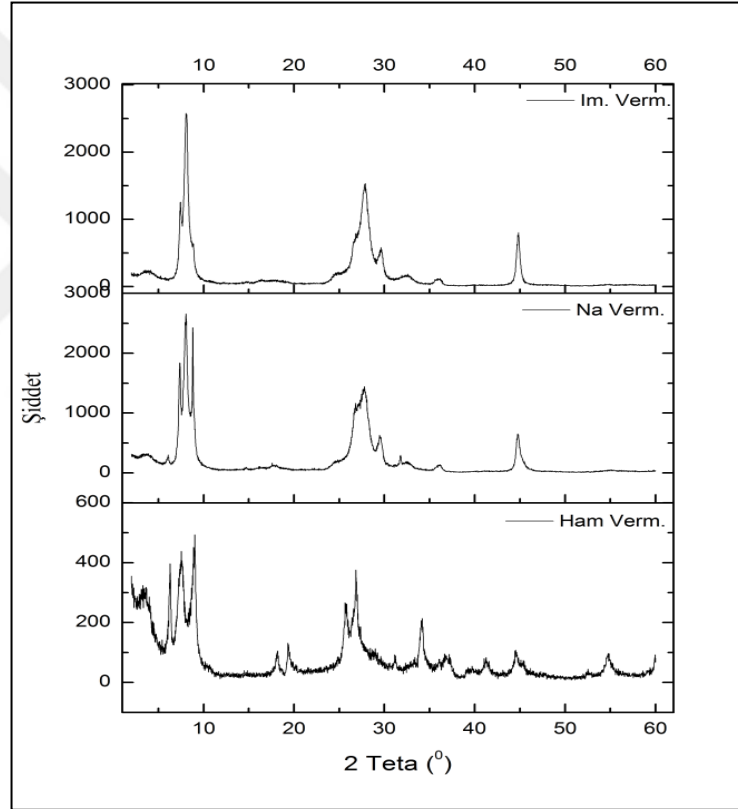
Şekil 2.3. Selülaz ile CMC hidroliz reaksiyonunda serbest enerji düzeyi diyagramı [72]

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Destek Materyelinin karakterizasyonu

3.1.1. XRD (X Işını Kırınım) Analizi

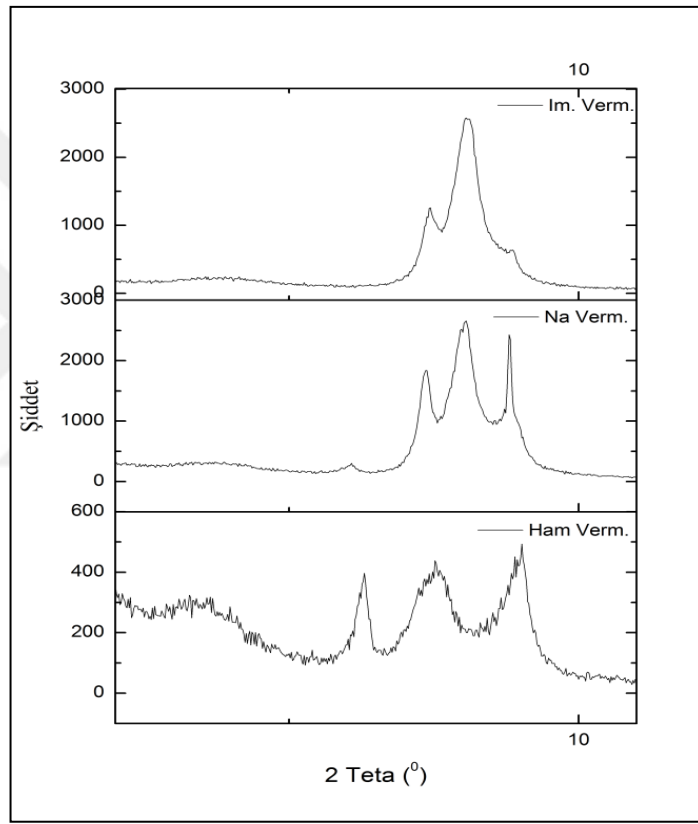
Şekil 3.1’de ham vermikülit, sodyum vermikülit ve immobilize vermikülit XRD sonuçları verilmiştir (2-60°, 0,02° arama aralığı).



Şekil 3.1. Ham vermikülit, sodyum vermikülit ve immobilize vermikülitin X ışını difraksiyonu (1-60°)

3,40° gözlenen yayvan pik, (001) düzlemini temsil eder ve bu düzlem için d_{001} aralığı 2,6 nm olarak hesaplanır. Bu pikin yayvanlığı, yapıda biotit, talk ve klorit gibi safsızlıkların varlığını destekler [73, 74]. Safsızlıkların varlığı için, 54,8°’de gözlenen (060) düzleminde kırılmalar önemlidir. Bu pik vermikülitin, trioktoedral yapıda olduğunu gösterir [75].

Böylece kilde biotit varlığını bu düzlem tescil eder ($d_{060}=0,16\text{nm}$). Aynı zamanda, kilin toprak vermikülit ya da hidroksil ara tabakalı vermikülit olup olmadığını belirlemek için kilin magnezyum vermikülit veya potasyum vermikülit olup olmadığını belirlenmelidir. Bunun için $9,03^\circ$ 'de gözlenen pik vermikülitin hidroksil ara tabakalı vermikülit yani potasyum vermikülit olduğunu gösterir [76]. (006), (008) ve (0010) düzlemini temsil eden pikler, tipik vermikülit pikleridir [77]. $6,3^\circ$ 'de gözlenen pik ($1,40\text{ nm}$), tek başına vermikülit temsil etmez. Bu pik yapıdaki biotit varlığının diğer bir delilidir [78, 79].



Şekil 3.2. Ham vermikülit, sodyum vermikülit ve immobilize vermikülitin X ışını difraksiyonu (1-11°).

Sodyum vermikülit elde için gerçekleştirilen saflaştırma, sodyum asetat-asetik asit muamelesi ve daha sonra serbest amorf silika ve alüminyum uzaklaştırmak için %2'lik Na_2CO_3 ile kaynatma işlemleriyle, $3,40^\circ$ de gözlenen safsızlık piki ile $6,3^\circ$ 'de gözlenen biotit pik şiddetlerini oldukça azaldığı gözlenmiştir. Kilin sodyum zenginleştirme işlemi sonucunda sodyum iyonlarının katkısı ile uzay yük değişimi neticesinde, piklerin yüksek açı değerlerine kaydığı ve düzlemler arası mesafelerin

düştüğü gözlenmiştir (Şekil 3.2). Ayrıca 3,40°'de gözlenen (001) düzleminin zayıflaması, vermikülitin delaminasyona uğradığı ve parçacık boyutunun da oldukça düştüğü söylenebilir [76].

İmmobilize vermikülitte enzimin sodyum vermikülit ile etkileşmesi sonucunda baskın (002) düzleminin hakimiyeti söz konusudur. Diğer pikler oldukça varlığını yitirmiştir. Bu da enzimin sodyum vermikülitte tüm düzlemlerde etkileşimini gösterir.

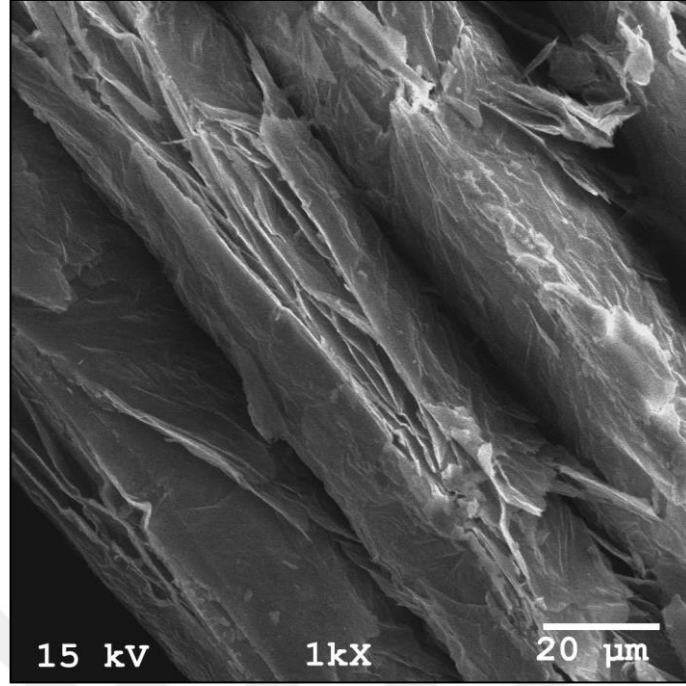
3.1.2. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Analizi

Destek materyali olan vermikülitin yüzey morfolojisi SEM analizi ile incelenmiştir. Ham vermikülitin SEM görüntüleri Şekil 3.3'te, Na-vermikülitin SEM görüntüleri Şekil 3.4'te ve protein yüklü Na-vermikülitin SEM görüntüleri Şekil 3.5'te gösterilmiştir.

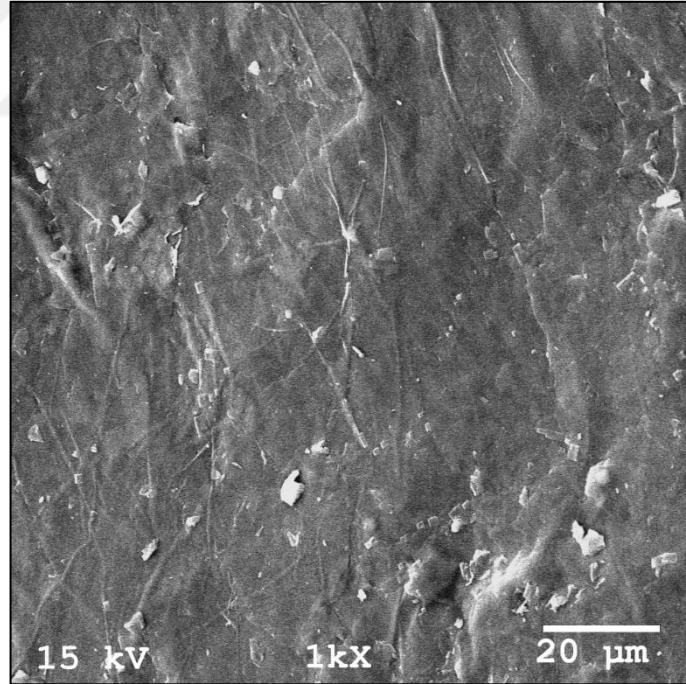
Vermikülit partikülleri, filosilikatların karakteristik özelliği olan üst üste istiflenmiş tabakalar gibi iyi tanımlanmış bir yapı sergilerler [80]. Şekil 3.3'te görüldüğü gibi ham vermikülitte genişlikleri yaklaşık 20µm civarında uzun sütunsal çokgen tabakalar görülmektedir. Tabakaların pullanması sütunlar üzerinde görülmektedir

Na zenginleştirme işlemiyle vermikülit yüzeyinde pullanmanın azaldığı ve yüzeyin pürüzsüzleştiği görülmektedir (Şekil 3.4)

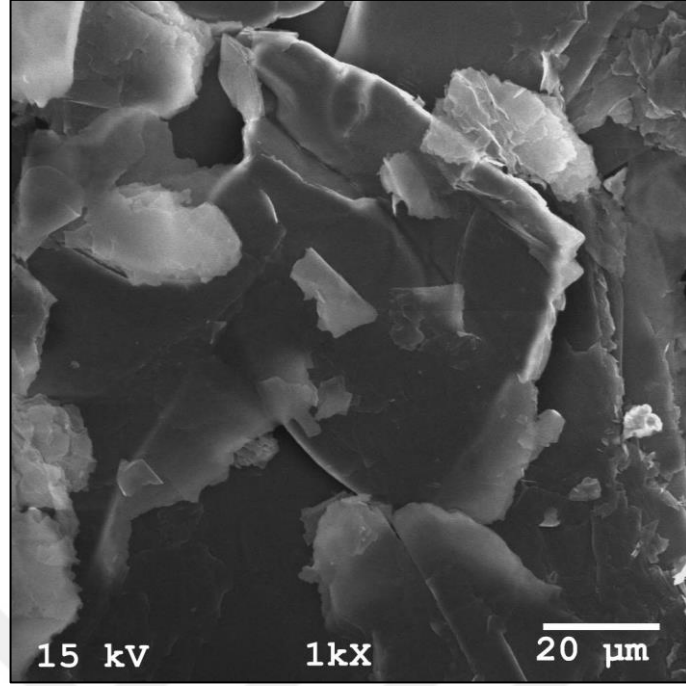
Şekil 3.5'te Na-vermikülit üzerine enzim immobilizasyonu ile vermikülit yüzeyinde morfoloji değişmiştir. Açık tonlarda görülen topaklanmalar immobilizasyon sonucu enzimlerin kil yüzeyinde adsorpsiyonunu teyit eder. Benzer kil üzerine enzim immobilizasyonu çalışmalarında da enzim adsorpsiyonu vurgulanmıştır. Enzim polimerik bir madde olduğundan dolayı, enzimin katı bir matris üzerine immobilize edilmesi matrisin morfolojisini değiştirebilir. Enzim immobilizasyonundan sonra, gözeneklilikte çok fazla değişiklik gözlemlenmez. Kil mineral tabakalarında pullu bir yapı görülür ve aynı zamanda enzimin varlığı da görülmektedir. Kaya parçalarına benzer yapıların ortaya çıkması enzimlerin adsorpsiyonunun bir sonucu olabilir. [81]. Böylece, bu çalışmada da topaklanan enzimlerin kil yüzeyinde varlığı gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Ham vermikülit SEM görüntüsü (x1000 büyütme)



Şekil 3.4. Na-vermikülit SEM görüntüsü (x1000 büyütme)



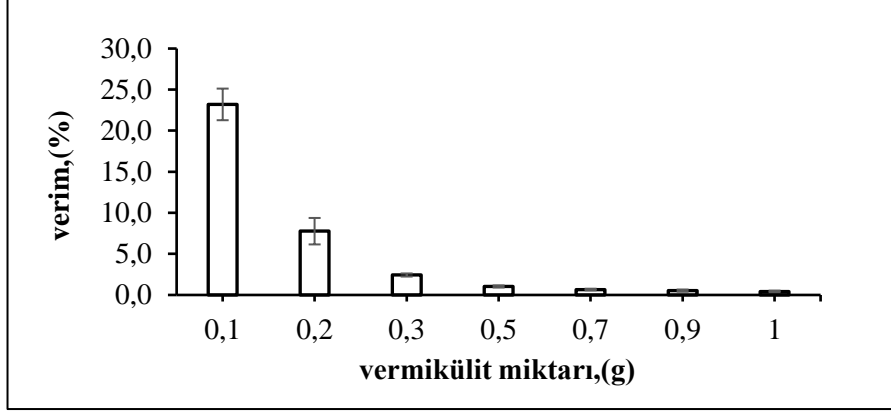
Şekil 3.5. Protein muameleli Na-vermikülit SEM görüntüsü (x1000 büyütme)

3.2. İmmobilize Enzimin Optimizasyonu

Enzim immobilizasyonunda optimum koşulları belirlemek için, immobilize enzim miktarı, gluteraldehit konsantrasyonu ve muamele süresi, enzim muamele süresi çalışmaları gerçekleştirildi.

3.2.1. İmmobilize enzim miktarı optimizasyonu

Enzimatik aktivite tayininde en iyi immobilize enzim miktarı belirlenmiştir. Na-vermikülit ile +4°C'de 2 saat muamele edilen enzim 3 kere saf su ile yıkanarak vakumda süzüldü. Daha sonra +4°C'de 1 saat gluteraldehit ile muamele edilip 3 defa saf su ile yıkanıp vakumda süzüldü. Elde edilen immobilize enzimden, 0,1-0,2-0,3-0,5-0,7-0,9 ve 1 g alınarak (2.3) no'lu eşitlik yardımıyla aktivite, (2.4) no'lu eşitlik ile immobilize enzimin verim hesapları yapıldı. Serbest enzim aktivitesi %100 kabul edilerek hesaplanan immobilize enzimin verimine ait sonuçlar Şekil 3.6'da gösterilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi en iyi verim 0,1 g immobilize enzim kullanıldığında %23 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.6.İmmobilize edilen selüloz enzim miktarının enzimatik aktivite üzerine etkisi

Şekil 3.6’da görüldüğü gibi aktivite tayini yaparken kullanılan immobilize enzim miktarı arttıkça verimde azalma olmuştur.

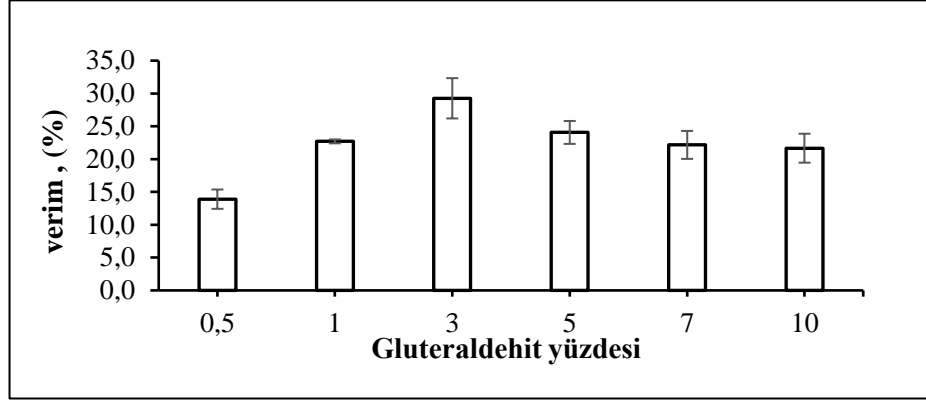
3.2.2. Gluteraldehit yüzdesi optimizasyonu

Adsorbe edilmiş enzimlerin çapraz bağlayıcılarla muamele edilmesi, immobilize enzimlerin stabilitesini arttırmanın popüler bir yoludur. En çok kullanılan örneği, desteklere adsorbe edilen enzimlerin gluteraldehit ile muamele edilmesidir. Standart bir protokol enzim ve desteğin aktivasyonunu içerir ve aynı zamanda moleküller arası çapraz bağlanma meydana gelebilir. Gluteraldehit kullanmadaki ana hedef, enzim molekülünün bağlanmasını sağlayarak destekten enzimin desorpsiyonunu zorlaştırmaktır [46].

Enzim agregatları oluşturmak için kullanılan gluteraldehit konsantrasyonu immobilize enzimin verimi için önemli bir etkindir. İmmobilizasyon işleminde eğer gereğinden az gluteraldehit kullanılırsa enzim molekülü hala çok esnek olabilir. Bununla birlikte eğer gereğinden çok fazla gluteraldehit kullanılırsa enzim aktivitesi için gereken minimum esneklik kaybına neden olabilir. Bu nedenle enzim immobilizasyonunda kullanılan gluteraldehit ajanının konsantrasyonu optimize edilmelidir [82].

Gluteraldehit miktarı optimizasyonu için; Na-vermikülit ile 2saat +4°C’de muamele edilen immobilize enzim, %0,5, 1, 3, 5, 7 ve 10’luk gluteraldehit miktarları ile +4°C’de 1 saat muamele edilmiş ve immobilizasyon verimi (2.4) no’lu eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır. En iyi verim %3’lük gluteraldehit varlığında %29 olarak bulunmuştur

ve sonuçlar Şekil 3.7’de gösterilmiştir. Serbest enzim aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3.7. Farklı glutaraldehyt yüzdelерinin immobilize enzim üzerine etkisi

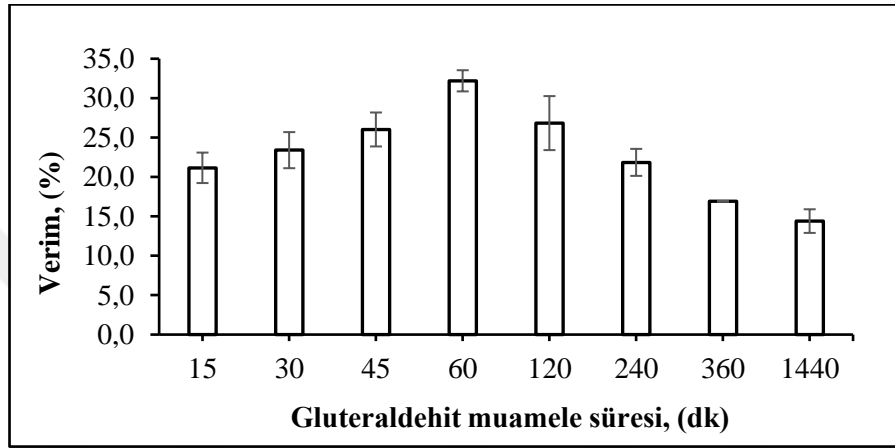
Şekil 3.7’de görüldüğü gibi immobilize enzim veriminin %3’lük glutaraldehyt konsantrasyonuna kadar arttığı ve bu konsantrasyondan sonra verimin azalmaya başladığı gözlenmiştir.

%3’lük glutaraldehyt aldehit konsantrasyonun altındaki daha az aktivitenin sebebi, çapraz bağlama sırasında yetersiz glutaraldehyt mevcudiyetinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yüksek glutaraldehyt konsantrasyonunda azalan enzim verimi, enzim aktivitesi için gerekli olan enzim esnekliğinin kaybına neden olan aşırı çapraz bağlanma nedeniyle oluşan enzim moleküllerinin sertleşmesinden kaynaklanıyor olabilir [83]. İmmobilizasyon işleminde kullanılan glutaraldehyt çapraz bağlanma sırasında Schiff bazları oluşmasını sağlar ve böylece enzim agregatları meydana gelir [84, 85]. Oluşan bu enzim agregatları artan glutaraldehyt konsantrasyonu ile daha güçlü ve büyük bir hale gelip enzimin esnekliğinin azalmasına sebep olabilmektedir. Yumak haline gelmiş bu büyük enzim agregatları substratın enzimin aktif bölgesine ulaşmasını zorlaştırabilir. Dolayısıyla enzimin kataliz yeteneğinin azalmasına sebep olabilir. Sonuç olarak artan glutaraldehyt konsantrasyonları, enzim aktivitesini olumsuz etkileyen sertliğin artmasına neden olabilmektedir.

3.2.3. Glutaraldehyt muamele süresi optimizasyonu

İmmobilize işleminde kullanılan glutaraldehyt ajanının muamele süresi immobilize enzimin aktivitesi için bir başka önemli faktördür [83].

Gluteraldehit muamele süresi optimizasyonunda, enzim ile Na-vermikülit +4°C'de 2 saat muamele edildikten sonra %3'lük gluteraldehit ile artan zaman aralıklarında +4°C'de muamele edildi. Enzimatik aktivite tayini yapılarak (2.4) no'lu eşitlik yardımıyla verim hesaplandı. En iyi immobilizasyon verimi, 1saatlik gluteraldehit muamele süresi ile %32,2 olarak bulunmuştur. Gluteraldehit muamele süresine ait immobilize enzim verim sonuçları Şekil 3.8'de gösterilmiştir. Serbest enzim aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3.8. Gluteraldehit muamele süresinin immobilize enzim üzerine etkisi

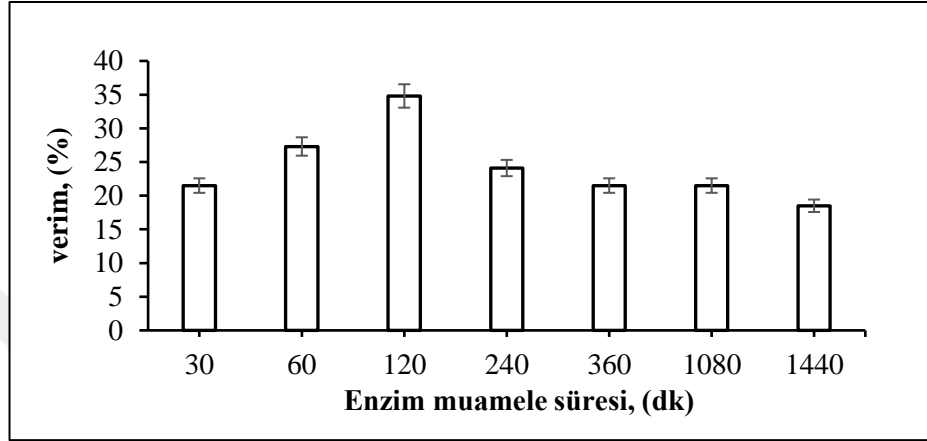
Şekil 3.8'de görüldüğü gibi, 60 dk'dan az gluteraldehit muamele süresinde daha az verim gözlemlenmiştir. Gluteraldehitin 60 dakikadan daha fazla muamele sürelerinde immobilize enzimin veriminde azalma olduğu görülmektedir. Enzim agregatları oluşturmak için kullanılan gluteraldehitin daha fazla muamele süresinde daha yoğun çapraz bağlanma oluşması sebebiyle enzim aktivitesini azaltan enzim sertleşmesi meydana gelebilmektedir. Enzim aktivitesi için gerekli olan enzim esnekliğinin kısıtlanmasından dolayı immobilize enzimin veriminde azalma meydana gelmiştir [83].

3.2.4. Enzim muamele süresi optimizasyonu

İmmobilize enzimin verimini arttırmak amacı ile son optimizasyon basamağı olarak enzim muamele süresi incelenmiştir. Bu optimizasyon basamağında Na-vermikülit ile enzim +4°C'de farklı sürelerle (1/2, 1, 2, 4, 6, 8, 24 saat) muamele edilmiştir. Daha

sonra +4°C’de 1 saat %3’lük gluteraldehit ile muamele edilerek aktivite tayini yapılmış ve (2.4) no’lu eşitlik yardımıyla verim hesaplanmıştır.

Enzim muamele süresi optimizasyonunda, en iyi verim 2 saat enzim muamelesi sonucunda %34,8 olarak bulunmuştur. Enzim muamele süresine ait sonuçlar Şekil 3.9’da gösterilmiştir. Serbest enzim aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3.9. Enzim muamele süresinin immobilize enzim üzerine etkisi

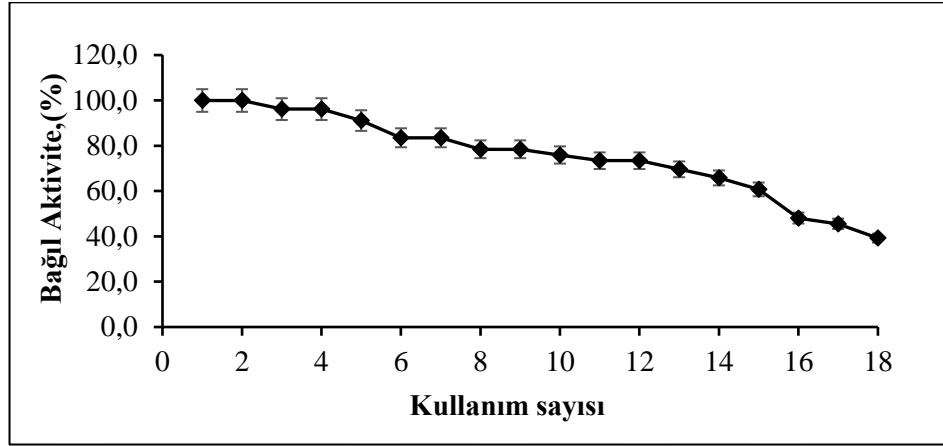
Şekil 3.9’da görüldüğü gibi 30dk ile 2 saat arasında enzim muamele süresinde verim artmıştır. 2 saatlik muamele süresinden sonra ise verimde düşüş gözlenmekle birlikte bu sürelerde hemen hemen aynı verim sonuçları elde edilmiştir. Selülaz enziminin bir başka immobilizasyon çalışmasında Fe_3O_4 nanopartikülü ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve enzim ile muamele süresi 4 saat olarak bulunmuştur [86]. Çalışmamızda en iyi verimin daha kısa enzim muamele süresinde elde edilmiş olması zaman bakımından avantaj sağlayabilmektedir.

3.3. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanımı

Endüstriyel alanda maliyeti azaltmak için enzimlerin tekrar kullanılabilmesi önemli bir rol oynamaktadır. Enzim immobilizasyonunun faydalarından biri, enzimin kolaylıkla geri kazanılabilmesi veya reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılabilmesi nedeniyle enzimlerin tekrar kullanılabilir hale getirilmesidir [6].

Bu çalışmada immobilize selülazın 18 döngüde tekrar kullanılabilirliği incelendi. İmmobilize enzime ait tekrar kullanım sonuçları Şekil 3.10’da bağıl aktivite olarak

grafik üzerinde gösterilmiştir. İmmobilize enzimin başlangıç aktivitesi %100 kabul edilerek enzimin kalan aktivitesi hesaplanmıştır.



Şekil 3.10. İmmobilize enzimde tekrar kullanım

Şekil 3.10’da görüldüğü gibi immobilize enzim 15. kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin %61’ini korumuştur. Tekrar kullanım arttıkça enzimin bağlı aktivitesinin kademeli olarak azalmasına rağmen, 5 tekrar kullanım sonunda immobilize selüloz aktivitesinin hala %91’ini korumuştur. Bu sonuç, immobilize edilmiş selülazın iyi bir tekrar kullanılabilirliğini açıkça göstermektedir.

Qi ve ark., çekirdek kabuk yapıları metal organik kompozitler üzerine immobilize edilen selüloz enziminin tekrar kullanımını incelemişler. Bu çalışmada 5 tekrar kullanıma bakılmış ve 5 tekrar kullanım döngüsünden sonra enzimin aktivitesinin %70’inden fazlasını koruduğunu bildirmişlerdir. Enzimin bağlı aktivitesinin kademeli olarak azalmasının, her ayrılma ve yıkama sırasında protein denatürasyonunun yanı sıra immobilize selülazın marjinal kaybına bağlı olabileceği belirtilmiştir [87].

Başka bir çalışmada kitosan üzerine selüloz enzimi immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve 6 tekrar kullanım sonucunda enzim aktivitesinin %70’inin korunduğu bulunmuştur [88]. Bir başka çalışmada selüloz enziminin MnO₂ nanoparçacıkları üzerine immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve bu çalışmada immobilize enzimin 5 döngü tekrar kullanımına bakılmıştır. Beşinci döngüden sonra immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin yaklaşık %60’ını koruduğu bildirilmiştir. Enzim aktivitesindeki bu azalmaya; protein denatürasyonu, selüloz kompleksinden bir veya daha fazla bileşenin

kaybı veya enzimin yapısal modifikasyonu gibi etkenlerin neden olabileceğini belirtmişlerdir [89].

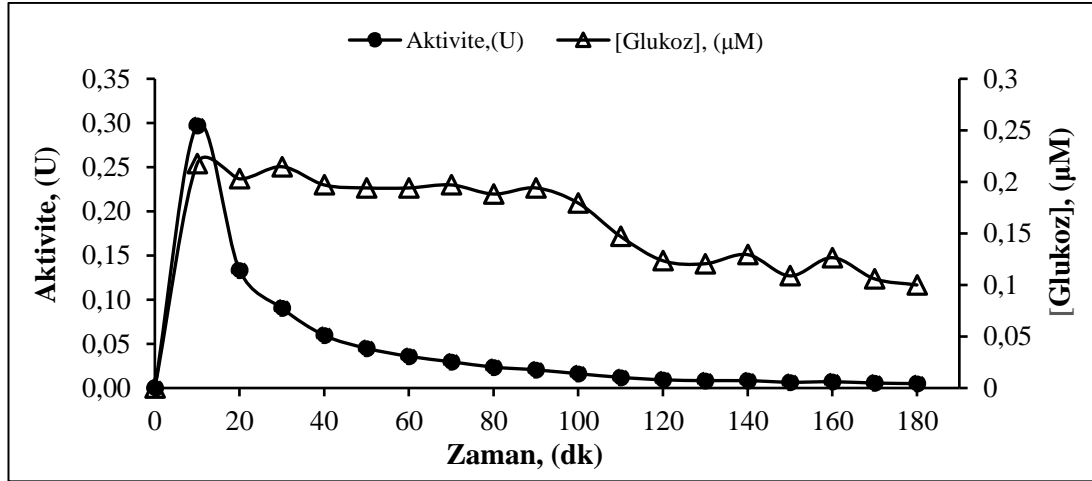
Wu ve ark. tarafından yapılan çalışmada, glucoamilazın bakteriyal selüloz topakları ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve 14 tekrar kullanım sonucunda enzimin aktivitesinin %60'ını koruduğu rapor edilmiştir [90]. Selülaz enziminin zeolitik imidazolat yapısı (ZIF-8)/poliviniliden florür hibrit membranları üzerine gerçekleştirilen enzim immobilizasyonu çalışmasında, 7 tekrar kullanım sonucunda enzim aktivitesinin %42,8 olduğu gözlenmiştir [91].

Mubarak ve ark., selülaz enzimini fonksiyonel çok duvarlı karbon nanotüpleri üzerine immobilize etmişler ve 8. kullanımdan sonra aktivitesinin %26'sının kaldığını belirtmişlerdir. Enzim moleküllerinin fonksiyonel çok duvarlı karbon nanotüplerinin duvarına etkin bir şekilde bağlanmadığını ve bu zayıf bağlanmış enzim moleküllerinin aktivite ölçümü sırasında kaybedildiği için tekrar kullanımda ki düşüşe neden olduğunu bildirmişler [6]. Bizim çalışmamızda ise 7 tekrar kullanımdan sonra enzim aktivitesinin hala %80'in üzerinde, 14 kullanımdan sonra ise %65,8 olduğu bulunmuştur. Daha önce bildirilen tekrar kullanım bulgularına kıyasla bu çalışmada elde edilen sonuçlar, tekrar kullanımda immobilize enzimin başlangıç aktivitesini koruma oranının daha yüksek olduğunu göstermektedir.

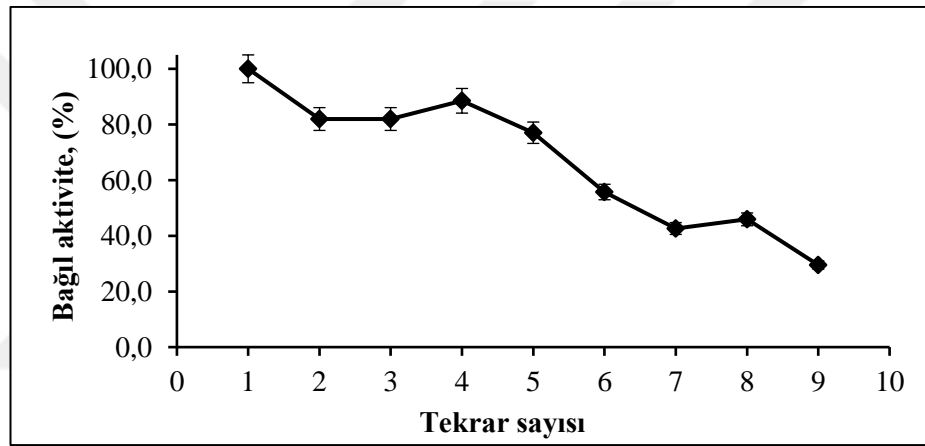
3.4. İmmobilize Enzimin Operasyonel Stabilitesi

Operasyonel stabilite, işlem maliyetlerini azaltmak için endüstriyel uygulamalarda önemli bir prosestir [92]. Bu nedenle, immobilize enzimin operasyonel stabilitesi incelendi. İmmobilize enzimin biyotransformasyon çalışmasına ait sonuçlar Şekil 3.11'de gösterilmiştir. Sonuçlar, immobilize enzimin aktivitesi ve ürün olarak oluşan glukoz konsantrasyonu olarak verilmiştir.

İmmobilize selülaz biyotransformasyon çalışması 180 dakika boyunca incelendi. 100. dakikadan sonra immobilize selülazın aktivitesi önemli ölçüde aktivite kaybı gösterdi ve neredeyse sıfıra yakın bir değere ulaştı. Bu nedenle, operasyonel stabilitedeki her bir döngü 100 dakikada gerçekleştirildi. Operasyonel stabilite 9 döngü boyunca incelendi. Sonuçlar Şekil 3.12'de gösterilmiştir.



Şekil 3.11. İmmobilize enzimin operasyonel stabilitesi



Şekil 3.12. İmmobilize enzimin operasyonel döngüsü

Şekil 3.12'de de görüldüğü gibi operasyonel stabilitenin 3. döngüsünde immobilize enzimin aktivitesinin %82'sini ve 6. döngü sonrası ise aktivitesinin hala %56'sını koruduğu görülmektedir.

Li ve ark. tarafından yapılan kitosan üzerine selüloz enzimi immobilizasyonu çalışmasında operasyonel stabilitenin 5. döngüsünde enzimin aktivitesinin %50'sini koruduğu rapor edilmiştir [88]. Wen ve ark. lakkaz enziminin bentonit kaynaklı küçük gözenekli madde üzerine immobilizasyonunu gerçekleştirmişler ve operasyonel stabilitesi incelendiğinde 5. döngüde aktivitesinin %36'sını koruduğu bildirilmiştir. Fiziksel adsorpsiyondaki zayıf etkileşimlerin yıkama sırasında enzim sızmasına neden olduğunu ve aktivite kaybının bu enzim sızmalarından kaynaklanmış olabileceğini belirtmişlerdir [93]. Başka bir çalışmada magnetik kitosan üzerine selüloz enziminin immobilizasyonunda 5. döngüden sonra enzimin aktivitesinin %50'nin üzerinde

olduğunu gözlemlemişler. Elde edilen bu aktivite kaybına, kompleks selüloz enzimi bileşenlerinin kaybı, son ürün inhibisyonu ve protein denatürasyonu gibi faktörlerin neden olabileceğini rapor etmişlerdir [94].

Bu çalışmalara kıyasla, bizim çalışmamızda immobilize enzimin operasyonel stabilitesinde 5. döngüden sonra aktivitesinin hala %70'in üzerinde olduğu belirlenmiştir. Endüstriyel anlamda bu stabilitesinin fayda sağlayabileceği düşünölmektedir.

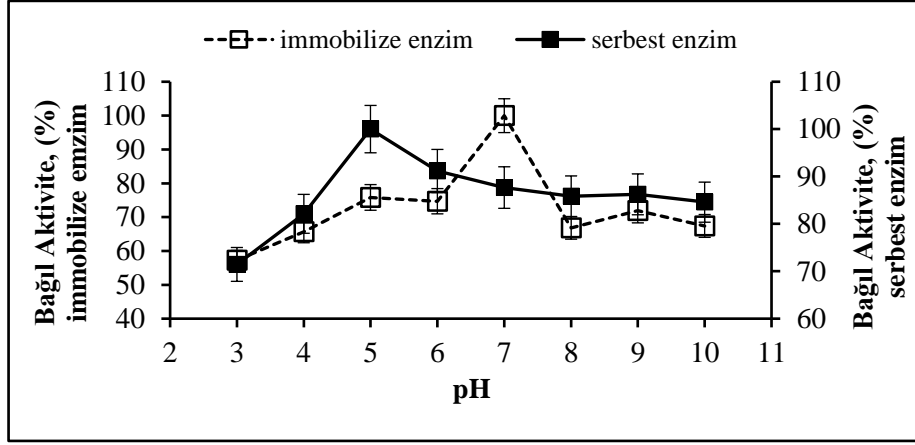
3.5. İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu

3.5.1.İmmobilize enzim üzerine pH etkisi

Amino asitlerin bir enzimdeki iyonlaşma durumu, enzimin konformasyonel yapısının korunması için önemlidir. Bu nedenle, pH, enzimin katalitik aktivitesi ile ilişkili anahtar bir faktördür [95]. pH, reaksiyondaki enzim aktivitelerini değiştirebilen ana parametrelerden biridir. İmmobilizasyon, genellikle enzimlerde konformasyonel değişikliklerden dolayı optimum pH değişimi ile sonuçlanmaktadır [96]. Enzim immobilizasyonu ile enzimin mikro çevresinin değişmesi nedeniyle meydana gelen bu pH değişimini belirlemek için immobilizasyon öncesinde ve sonrasında farklı pH değerlerinde enzimin aktivitesinin karşılaştırılması yapılmalıdır [97].

Farklı pH'lara sahip tamponlarda hazırlanan CMC substratı ile yapılan aktivite tayinlerinin sonuçları bağıl aktivite (%) olarak hesaplanmıştır. En yüksek aktiviteye sahip pH değerı %100 olarak kabul edilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.13.'de gösterilmiştir.

İmmobilize enzim üzerine pH etkisinin incelenmesi sonucunda, serbest enzim için optimum pH 5 iken immobilize enzim için optimum pH 7 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.13. CMC'nin farklı pH değerlerinde aktivite üzerine etkisi

Monier ve ark., kitosan üzerine peroksidaz immobilizasyonunda serbest enzimin optimum pH'sının 9, immobilize enzimin optimum pH'sının ise 10 olduğunu gözlemlemişlerdir. İmmobilize edilmiş enzimin mikro ortamının katyonik olarak değiştirilmiş kitosan matrisi ile elektrostatik etkileşimlerinden dolayı H^+ ve OH^- iyonları konsantrasyonlarının eşit olmadığından dolayı pH kaymasının meydana gelebileceğini belirtmişler [98]. Alemzadeh ve ark. pH'daki bu değişime immobilize enzimin mikro-ortamındaki katyonik çevrenin sebep olabileceğini belirtmişlerdir [99].

İnvertaz enziminin montmorillonit üzerine immobilizasyon çalışmasında serbest enzimin için optimum pH 5, immobilize enzim için optimum pH 6 olarak bulunmuştur. Kil matrisinin yük etkileri sonucunda adsorbe edilmiş invertazın optimum pH'sında artış görüldüğünü ve negatif yüklü desteklerin yük etkileşimleri sayesinde optimum pH'nın arttığını rapor etmişlerdir [100]. Benzer sonuçlar Kumari ve ark. tarafından da bildirilmiştir. Katı matris üzerindeki yüklerin ve matrise bağlı enzimin yapısının, enzim molekülünün mikro çevresinde değişime yol açabileceğini ve bunun sonucunda enzim proteininin yapısının değişmesinden dolayı pH kaymasına neden olabileceğini belirtmişlerdir [101]. Aytar ve Bakir immobilize enzimin optimum pH'sındaki kaymanın, çapraz bağlanma sırasında bazik enzim kalıntıları ve glutraldehit arasında oluşan etkileşimlerden kaynaklı aktif bölge etrafındaki mikro-ortamda bulunan asidik ve bazik amino asit yan zincir iyonlaşmasındaki değişikliklerden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir [102].

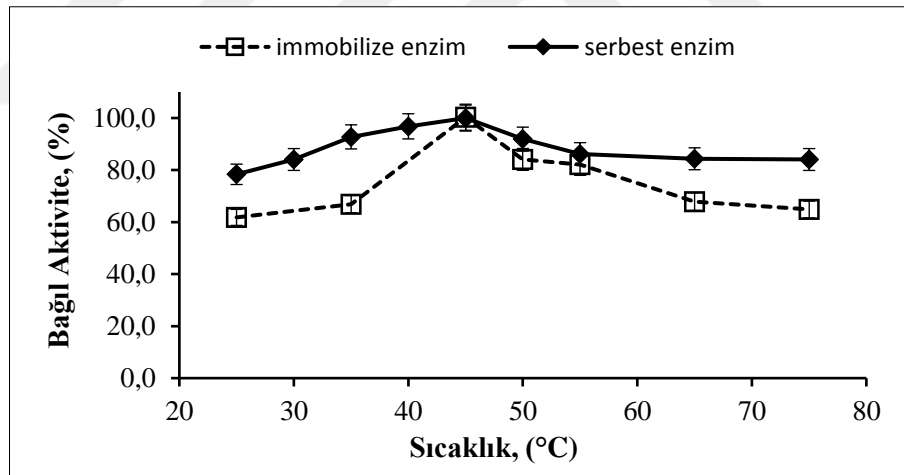
Enzim immobilizasyonunda optimum pH'daki değişim enzim veya matrisin yüküne bağlıdır. İmmobilizasyon işleminde glutraldehitin kullanılmasıyla, enzimin

yüzeyindeki tüm amino grupları birbirine bağlanabilmektedir. Dolayısıyla enzim yüzeyindeki tüm asidik gruplar enzim proteinine negatif bir yük vererek optimum pH'nın alkali değere doğru kaymasına sebep olabilmektedir [103]. Bu nedenle, çalışmamızda gözlemlenen pH kaymasının immobilizasyon sırasında oluşan elektrostatik etkileşimlerden ve glutraldehitten kaynaklandığı düşünülmektedir.

3.5.2. İmmobilize enzim üzerine sıcaklık etkisi

İmmobilize selülaz üzerine sıcaklık etkisi 50mM pH 7 Tris-HCl tamponunda 25°C ile 75°C arasındaki sıcaklıklarda incelenmiştir. En yüksek aktiviteyi gösteren sıcaklık değeri %100 olarak kabul edilerek diğer sıcaklık değerleri % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır. İmmobilize ve serbest enzime ait optimum sıcaklık değerleri Şekil 3.14'te gösterilmiştir.

Serbest ve immobilize enzim için optimum sıcaklık değerleri 45°C olarak bulunmuştur.



Şekil 3.14. CMC'nin farklı sıcaklık değerlerinde aktiviteye etkisi

Genel olarak sıcaklıktaki artışla birlikte, enzim aktivitesi maksimum seviyeye çıkar ve daha sonra sıcaklığın protein denatürasyonuna neden olmasıyla aktivitede düşüş gözlenir [45, 104]. Selülaz enziminin aktivitesi 45°C'ye kadar artış göstermiş ve bu değerden sonra aktivitesinde azalma olmuştur.

Yapılan başka çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir [45, 92, 95, 104, 105]. Vermikülit üzerine alkalın proteaz immobilizasyonunda serbest ve immobilize enzim

için optimum sıcaklık değeri 60°C olarak bulunmuştur [45]. Cengiz ve ark. tarafından yapılan bentonit ve sepiyolit üzerine katalaz enzimi immobilizasyonu çalışmasında serbest ve immobilize enzim için aynı optimum sıcaklık değeri (35°C) gözlemlenmiştir [105]. Selülaz enziminin stiren/maleik anhidrid kopolimer nanopartikülleri üzerine immobilizasyon çalışmasında serbest ve immobilize enzim için optimum sıcaklık değerleri 50°C olarak belirlenmiştir [95]. Lakkazın manyetik küçük gözenekli karbonda immobilizasyonunda immobilize serbest enzim için optimum sıcaklık değeri 45°C olarak [92], işlevselleştirilmiş aktif karbon parçacıkları üzerine asit proteaz immobilizasyonunda da her iki enzim için optimum sıcaklık değeri 50°C olarak bulunmuştur [104].

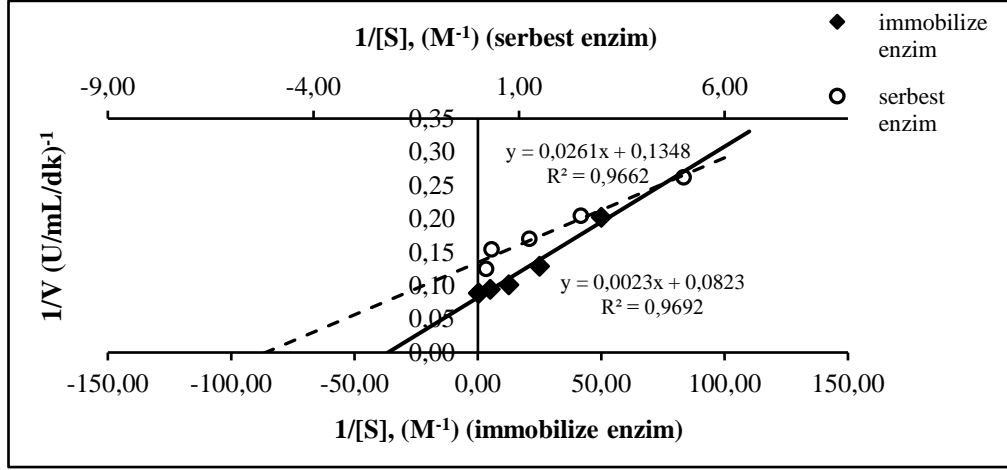
Çalışmamızda serbest ve immobilize enzim için aynı optimum sıcaklık değeri bulunmuştur. Sıcaklığın immobilize enzimin aktivitesi üzerinde bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. Dolayısıyla sıcaklık etkisi ile enzimin aktivitesini etkileyecek şekilde konformasyonel değişikliğin olmadığı düşünülmektedir.

3.5.3. Serbest ve immobilize enzimin kinetik (K_m - V_m) parametrelerinin belirlenmesi

Serbest ve immobilize selülazın reaksiyon kinetiği farklı CMC substratı konsantrasyonları kullanılarak incelenmiştir. Lineweaver-Burk grafiği çizilerek Michealis sabiti (K_m) ve maksimum reaksiyon hızı (V_m) hesaplanmıştır. Lineweaver-Burk diyagramı Şekil 3.15'te gösterilmiştir.

İmmobilize edilmiş enzimlerin kinetik davranışı, birçok açıdan serbest enzimin kinetik davranışından farklılık gösterir. Bu farklılıklar, substratın enzimatik hidrolizi ile üretilen çeşitli mikro ortamlarla ilişkilidir [106].

Çalışmamızda serbest enzim ile immobilize enzimin kinetik parametreleri önemli ölçüde değişiklik göstermiştir. İmmobilize enzimin K_m değeri serbest enzimin K_m değerinden daha düşük bulunmuş olup, bu değerler sırasıyla, 0,028 mg mL⁻¹ ve 0,19 mg mL⁻¹'dir.



Şekil 3.15. Serbest ve immobilize enzim için Lineweaver-Burk diyagramı

İmmobilizasyon sonrasında enzimin V_m değerinde ise artış gözlemlenmiştir. Serbest enzimin V_m değeri 7,42 U/mL/dk iken, immobilize enzimin V_m değeri 12,15 U/mL/dk olarak bulunmuştur. Enzimin kataliz yeteneğini gösteren k_{cat} değeri serbest ve immobilize enzim için sırasıyla, 9275 dk^{-1} , 15187,5 dk^{-1} olarak, enzimin katalitik performansını gösteren k_{cat}/K_m değerleri ise $4,78 \times 10^4$ ve $5,42 \times 10^5$ olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzime ait kinetik parametreleri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Serbest ve immobilize enzimin kinetik parametreleri

Kinetik parametreleri	Serbest Enzim	İmmobilize Enzim
K_m (M)	0,194	0,028
V_m (U/mL/dk)	7,42	12,15
k_{cat} (dk^{-1})	9275	15187,5
k_{cat}/K_m ($dk^{-1} M^{-1}$)	$4,78 \times 10^4$	$5,42 \times 10^5$

Genellikle, katı destekler üzerine immobilize edilmiş enzimlerin Michealis-Menten sabiti (K_m) substrat için düşük afinite nedeniyle artar. Bununla birlikte, bu duruma karşı literatürde bazı istisnalar kanıtlanmıştır. Çeşitli killerle α -amilaz, proteaz, alkalın fosfataz ve üreaz immobilizasyonunda serbest enzimlerle karşılaştırıldığında daha düşük K_m değeri belirlenmiştir [107].

Hossesini ve ark. tarafından yapılan manyetik poli (iyonik sıvı) desteği ile selülazın immobilizasyonu çalışmasından immobilize enzimin K_m değeri serbest enzimin K_m değerinden düşük bulunmuştur. İmmobilize edilmiş enzimin daha düşük K_m değerine sahip olduğundan dolayı immobilize selülazın daha yüksek substrat afinitesi sergilediğini belirtmişlerdir. Düşük K_m değeri sonucunun desteğin iyonik yüzeyinin CMC afinitesinde bir artışa yol açtığını rapor etmişlerdir [108].

Başka bir çalışmada alfa amilazın manyetik çapraz bağlı enzim agregatları oluşturularak immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada manyetik CLEA'nın K_m değeri serbest alfa amilaz enziminin K_m değerinden daha düşük olduğu bulunmuştur. İmmobilize enzimin K_m değerindeki bu düşüşün substratı için daha fazla enzim afinitesini işaret ettiğini belirterek, immobilizasyona bağlı konformasyonel değişikliklerin enzimin aktif bölgesini substrata doğru yönlendirmesine yardımcı olduğunu ifade etmişlerdir [109]. Modifiye bentonit üzerine gerçekleştiren alkalin fosfataz immobilizasyonu çalışmasında da benzer şekilde immobilize enzimde serbest enzimininkine göre daha düşük K_m değeri gözlemlenmiştir. K_m değerindeki düşüşün, K_m 'in destek materyalinin elektrostatik alanından etkilenmesinden kaynaklandığını rapor etmişlerdir [110].

K_m değeri substrat için enzim afinitesi hakkında bilgi verir. Çalışmamızda serbest enzimin K_m değeri $0,19 \text{ mg mL}^{-1}$ iken, immobilizasyondan sonra K_m değerinin $0,028 \text{ mg mL}^{-1}$ 'e düşmesi enzim ve substrat arasındaki ilişkinin arttığının göstergesidir. Bu sonuç, selülazın vermikülit üzerine immobilizasyonunun azaltılmış sterik engel veya substrat difüzyon direnci açısından olumlu etkisi ile açıklanabilir [47]. Buna ek olarak, enzimin immobilize edilmesinden sonra K_m değerindeki düşüş, aktif bölgenin sterik olarak düzenlenmesinden veya substrat bağlanması için gerekli olan enzim esnekliği regülasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir [105].

Çalışmamızda immobilize enzimin V_m değeri serbest enzimin V_m değerine göre 1,6 kat artmıştır. V_m değerinin yüksek olması, daha iyi bir reaksiyon hızını ve katalizör verimini göstermektedir [111]. İmmobilize enzimin substrat için daha yüksek afinite göstermiş olmasından dolayı V_m 'deki bu artışın olağan olabileceği düşünülmektedir.

Ramirez ve ark. yaptığı çalışmada kitosan kaplı manyetik nanopartiküller üzerine selüloz immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, immobilize edilmiş enzimin V_m değerinin serbest enzimin V_m değerinden 1,5 kat fazla olduğu ve immobilize enzimin daha yüksek reaksiyon hızı gösterdiği rapor edilmiştir [111]. Ladole ve ark. tarafından manyetik nanopartiküller üzerine gerçekleştirilen selüloz enzimi immobilizasyonunda, immobilize enzimin sonikasyondan önce ve sonraki V_m değerinin serbest enziminkinden yüksek olduğu rapor edilmiştir. Immobilize selülazın sonikasyondan sonraki V_m artışının, immobilizasyondan sonra enzimin aktif bölgesinin daha kolay ulaşılabilir bir forma dönüşebildiğinden kaynaklandığını rapor etmişlerdir [83].

Yapılan başka bir çalışmada ksilinaz enziminin Eudragit L-100 üzerine immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve immobilize enzimin V_m değerinin 1,2 kat arttığı gözlemlenmiştir. Immobilize enzimin V_m değerindeki bu artışın Eudragit L-100'ün hidrofobik yapısından dolayı polar ürün olan ksilan fragmanlarının mikro çevreden itilmesinden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir [112]. Selülazın amin modifiyeli manyetik ve silika nanopartiküller üzerine gerçekleştirilen immobilizasyon çalışmasında da benzer sonuçlar bulunmuştur. Bu çalışmada immobilize selülazın V_m değerinin 1,4 kat arttığı rapor edilmiştir [113].

İmmobilizasyon çalışmamızda, enzimin kataliz yeteneğini gösteren k_{cat} değeri ve katalitik performansını ifade eden k_{cat}/K_m değeri serbest enzime kıyasla önemli ölçüde artmıştır (Tablo 3.1). Enzimin immobilize edildikten sonraki k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin sırasıyla, 1,6 ve 11,3 kat arttığı gözlemlenmiştir.

Saleem ve ark. tarafından gerçekleştirilen enzim immobilizasyonu çalışmasında benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada poliakrilamid jel üzerine endoglukanazın immobilizasyonu gerçekleştirilerek kinetik özellikleri incelenmiştir. Immobilize endoglukanazın k_{cat} değerinin serbest endoglukanaza göre daha yüksek bulunmasının, aktif bölge çevresindeki karboksil gruplarının yükü tersine çevirmesiyle CMC'nin enzim ile afinitesini arttırmış olmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir. Ayrıca bu durumun nedeninin substratın aktif bölgeye, substratın geçiş durumundan daha güçlü bir şekilde bağlanabileceğinden kaynaklandığını rapor etmişlerdir. Bu durumun, enzim-substrat kompleksinin bağlanma enerjisinin, tranzisyon durumundan

daha büyük olduğu sonucuna tekabül ettiğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda immobilize enzimin k_{cat}/K_m değerinin serbest enzimin k_{cat}/K_m değerine göre 1,5 kat artmış olduğunu ve dolayısıyla immobilize enzimin katalitik etkinliğinin serbest enziminkine göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir [114].

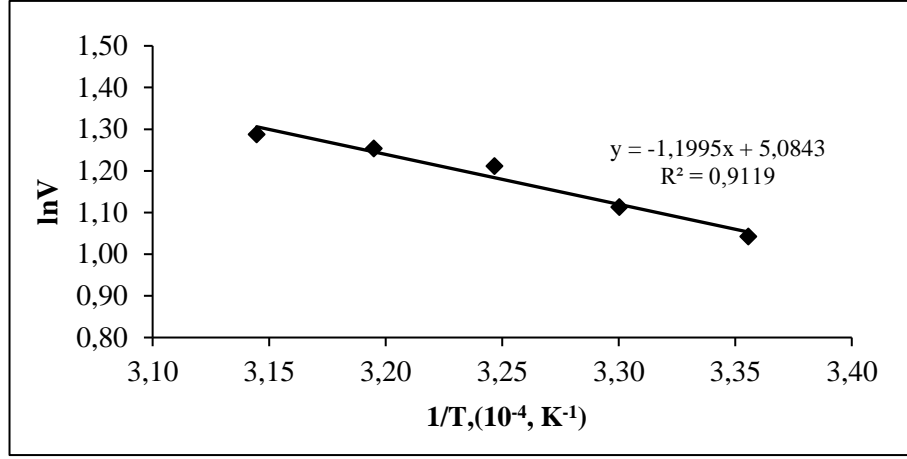
Pal ve Khanum tarafından gerçekleştirilen aljinat boncuklarına ksilanaz enzimi immobilizasyonunda serbest enzimin k_{cat} değeri $8,06 \times 10^4 \text{ dk}^{-1}$, immobilize enzimin k_{cat} değeri $9,09 \times 10^4$ olarak bulunmuştur. Enzim immobilize edilmesiyle k_{cat} değerinin 1,12 kat arttığı gözlemlenmiş ve immobilize ksilanazın daha iyi enzimatik aktiviteye sahip olduğu rapor etmişlerdir [115]. Yaban turpu peroksidazın polianilin üzerine immobilizasyonu çalışmasında serbest ve immobilize enzimin k_{cat} değerleri sırasıyla, $6,5 \times 10^3 \text{ dk}^{-1}$ ve $7,37 \times 10^4 \text{ dk}^{-1}$; k_{cat}/K_m değerleri ise $6,74 \times 10^2 \text{ mmol}^{-1} \text{ dk}^{-1}$ ve $1,42 \times 10^4 \text{ mmol}^{-1} \text{ dk}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Bu değerler dikkate alındığında immobilize enzimin daha yüksek bir performans sergilediğini belirtmişlerdir [116].

Lipaz enziminin polipropilen üzerine immobilize edildiği başka bir çalışmada benzer bulgular elde edilmiştir. Bu çalışmada, immobilize enzimin k_{cat} değerinin 3 kat, k_{cat}/K_m değerinin ise 1,2 kat arttığı gözlemlenmiştir. Immobilizasyon işleminden sonra k_{cat} değerindeki bu artışın, immobilize enzimin katalitik verimini arttıracak yönde yapısal konformasyonel değişiminden meydana gelebileceğini bildirmişlerdir [117].

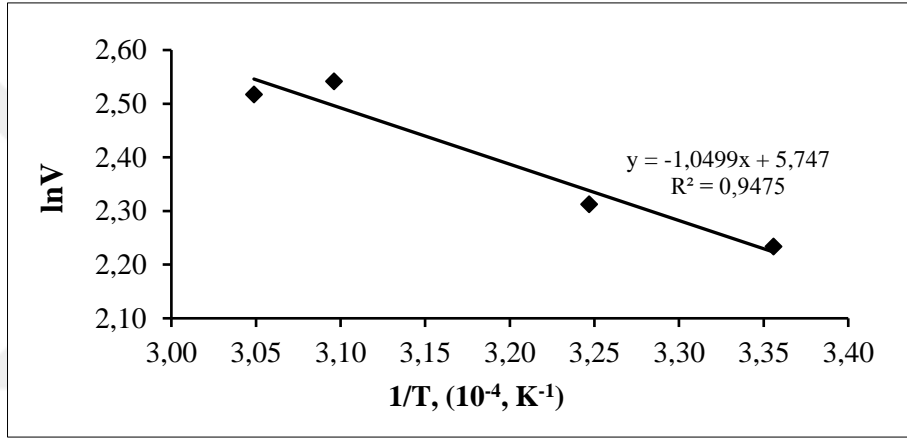
Literatürdeki çalışmalarda elde edilen bulgulara benzer olarak, çalışmamızda *Bacillus methylotrophicus* Y37 selülozünün immobilize edilmesinden sonra k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerlerinin artması, immobilize enzimin substrat afinitesinin ve katalitik etkinliğinin serbest enzime göre daha yüksek olduğunun göstergesidir.

3.5.4. Serbest ve immobilize enzimin arrhenius aktivasyon enerjilerinin belirlenmesi

Aktivasyon enerjisi (E_a), ürün oluşumunda bir enerji engeli ve sıcaklığa karşı enzim duyarlılığını göstermektedir [118]. Serbest ve immobilize enzimin, reaksiyonun başlaması için gerekli olan aktivasyon enerjileri (E_a) $\ln V$ 'ye karşı $1/T$ grafiği çizilerek belirlenmiştir. Serbest ve immobilize enzimin Arrhenius grafikleri ($\ln V-1/T$) Şekil 3.16 ve Şekil 3.17 de verilmiştir. Serbest enzim için aktivasyon enerjisi $9,973 \text{ kJ/mol}$, immobilize enzim için $8,729 \text{ kJ/mol}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 3.16. Serbest enzim için Arrhenius grafiği



Şekil 3.17. İmmobilize enzim için Arrhenius grafiği

Dong ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen organobentonit üzerine lipaz enzimi immobilizasyonunda, serbest lipazın aktivasyon enerjisi 29,25 kJ/mol, immobilize lipazın aktivasyon enerjisi 16,31 kJ/mol olarak belirlenmiştir. Enzimin immobilize edilmesinden sonra aktivasyon enerjisindeki bu düşüşün, substratın çözültiden biyokatalizör yüzeyine kütle transferine bağlı olduğunu bildirmişlerdir [97]. Başka bir çalışmada proteaz enziminin poliakrilamid, aljinat, kitosan ve nitroselüloz membran destekleri üzerine immobilizasyonunda immobilize edilmiş proteazların aktivasyon enerjilerinin serbest proteazın aktivasyon enerjisinden daha düşük olduğu bulunmuştur. İmmobilize edilmiş proteazların serbest enzime kıyasla daha düşük aktivasyon enerjilerine sahip olmalarının kütle transfer sınırlamalarına bağlanabileceğini rapor etmişlerdir [118].

Arrhenius aktivasyon enerjisi, difüzyon kontrollüdür. İki farklı difüzyon sınırlamasından bahsedilebilir: harici ve dahili sınırlamalar. Harici sınırlama, reaksiyon çözeltisindeki substratın taşıyıcının yüzeyini aşarak enzimin aktif bölgesine ulaşmasıdır. Dahili sınırlama, gözenek içerisinde bulunan substratın yine gözenek içerisinde bulunan enzimin aktif bölgesine ulaşmasıdır. İmmobilize enzim söz konusu olduğunda dahili ve harici difüzyon bariyerleri enzimin kinetik parametreleri değişiminde önem arz etmektedir. Serbest enzimde immobilize enzime kıyasla daha fazla serbest alanlar-boşluklar bulunmaktadır. İmmobilize enzimde ise substrat ve ürünün sınırlı miktardaki serbest alan-bölge varlığından dolayı enzim ile teması sınırlıdır. Bu yüzden, reaksiyon karışımında daha fazla enerji sağlanmasına rağmen aktivasyon enerjisi yükselmez [117, 119]. İmmobilize enzimin aktivasyon enerjisindeki bu azalış, kinetik parametrelerle uyumlu bir sonuçtur. İmmobilize enzimin katalitik yeteneğinin artmış olmasıyla aktivasyon enerjisinin de azalmış olması olağan bir durumdur.

3.5.5. Serbest ve immobilize enzimin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

Termodinamik parametreler, enzimin reaktivitesini anlamak için önemlidir [118]. Serbest ve immobilize selülaz enziminin termodinamik parametreleri (2.10-2.14) no'lu eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır ve sonuçlar Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Serbest ve immobilize enzimin 50°C'deki termodinamik parametreleri

Termodinamik parametreleri	Serbest Enzim	İmmobilize Enzim
$\Delta G^\#$ (kJ/mol)	65,782	64,457
$\Delta H^\#$ (kJ/mol)	7,284	6,043
$\Delta S^\#$ (kJ/mol K)	-0,181	-0,181
$\Delta G^\#_{E-T}$ (kJ/mol)	28,935	-35,456
$\Delta G^\#_{ES}$ (kJ/mol)	-4,404	-9,602

Mohapatra ve ark. tarafından gerçekleştirilen sülfat oksidazın dietilaminoetil (DEAE)-selüloz matrisine immobilizasyon çalışmasında termodinamik özellikler incelenmiştir. Bu çalışmada 50°C'deki $\Delta G^\#$, $\Delta H^\#$ ve $\Delta S^\#$ değerleri serbest enzim için sırasıyla, 83,12 kJ/mol, 84,80 kJ/mol ve 5,20 J/K/mol; immobilize enzim için sırasıyla, 81,31 kJ/mol, 82,02 kJ/mol ve 2,07 J/K/mol olarak bulunmuştur. Immobilizasyon işleminden sonra $\Delta G^\#$, $\Delta H^\#$ ve $\Delta S^\#$ değerlerinde düşüş görülmüştür. Bu sonuçların, immobilizasyonun, enzim-substratı aktif hale getirebilmek için gereken enerjiyi azaltarak sülfür oksidazın kalitesini iyileştirdiği anlamına geldiğini ifade etmişlerdir. Diğer bir termodinamik parametre olan $\Delta G^\#_{E-T}$, $\Delta G^\#_{ES}$ değerleri serbest ve immobilize enzim için 50°C'de sırasıyla, -3,03 kJ/mol, 15,16 kJ/mol ve -4,84 kJ/mol, 15,12 kJ/mol olarak belirlenmiştir. Enzimin immobilize edildikten sonra $\Delta G^\#_{E-T}$ değerinin düşmesiyle geçiş halini oluşturmak için daha az serbest enerjiye ihtiyaç duyulduğunu oysa serbest enzim tarafından daha fazla enerji gerekli olduğunu rapor etmişlerdir. Serbest enzimin $\Delta G^\#_{ES}$ değerinin daha yüksek olmasıyla, sülfid kalıntılarının, serbest enzimin aktif alanına daha gevşek bir şekilde tutturulduğunun göstergesi olduğunu bildirmişlerdir [120].

Benzer şekilde bizim çalışmamızda da immobilize enzimin $\Delta G^\#$ ve $\Delta H^\#$ değerleri serbest enziminkinden daha düşük bulunmuştur (Tablo 3.1). $\Delta G^\#$ geçiş halinde ürün oluşumunun kolaylığının göstergesidir ve immobilize enzimin $\Delta G^\#$ değerinin serbest enzimle kıyaslandığında düşük çıkması, ürün oluşumu için daha az enerji gerektiğinin termodinamik olarak ifadesidir. Bu durum immobilize enzimin k_{cat} değerinin artması ve aktivasyon enerjisinin düşmesi ile de uyumlu bir sonuçtur. $\Delta H^\#$ parametresinin immobilizasyon ile azalması enzim-substrat kompleksi oluşum veriminin arttığı anlamına gelmektedir. Bu veriler, Mohapatra ve ark. belirttiği gibi, immobilizasyonun, enzim-substrat kompleksini aktif hale getirmek için gereken enerjiyi azaltarak selüloz kalitesini iyileştirdiğini göstermektedir [120]. Geçiş hali bağlanma serbest enerjisi olan $\Delta G^\#_{E-T}$ değeri ve substrat bağlanma enerjisi olan $\Delta G^\#_{ES}$ değerinde enzim immobilizasyonundan sonra azalma gözlemlenmiştir (Tablo 3.1.). $\Delta G^\#_{E-T}$ değerinin azalması, immobilize enzimin geçiş halinde daha düşük enerji ile bağlanma gerçekleştiğini gösterir. Bu durumda, immobilize enzimin yüksek katalitik verimliliğinin, immobilize edilmiş enzimin daha yüksek geçiş durumu stabilizasyonuna bağlandığı anlamına gelir [120]. Benzer şekilde substrat bağlanma enerjisini ifade eden $\Delta G^\#_{ES}$ değerinin azalmasıyla substrat daha düşük enerji ile

bağlanır ve immobilize edilmiş enzimin yüksek katalitik verimliliğinin geçiş durumu stabilizasyonundan kaynaklandığını gösterir. Bu durum, immobilize enzimin aktif bölgesi konformasyonunun geçiş durumunda substratı daha etkili bir şekilde bağlayacağını göstergesi olabilir [120].

Amilaz enziminin sodyum aljinat boncuklarına immobilizasyonu çalışmasında termodinamik parametreler incelenmiştir. Immobilize edilmiş enzimin ΔH^\ddagger değerinde serbest enzime göre artış gözlemlenirken, ΔS^\ddagger değerinde azalma gözlemlenmiştir. Çalışma 50°C, 60°C, 70°C ve 80°C'deki sıcaklıklarda gerçekleştirilmiş ve her bir sıcaklık değerinde aynı sonuçlar rapor edilmiştir. Immobilize enzimin ΔH^\ddagger değerinde gözlemlenen artışın, immobilize enzimin denatürasyon için daha fazla enerjiye ihtiyaç duyduğundan kaynaklandığını bildirmişlerdir. Bu durumun, immobilizasyon işleminin konformasyonel değişime yol açtığını, dolayısıyla immobilize enzimin serbest enzime göre daha sert ve kararlı hale gelmiş olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada, serbest enzimin 50°C'deki ΔS^\ddagger değeri -249,7 kJ/mol, immobilize enzimin ΔS^\ddagger değeri -253,7 olarak bulunmuştur. Hem serbest enzim hem immobilize amilazların negatif entropiye sahip olduklarını gözlemlemişlerdir. Immobilize edilmiş amilaz enziminin serbest formuna kıyasla daha düzenli olduğunu bildirmişlerdir [121]. Tavares ve ark. tarafından gerçekleştirilen karbon nanotüpler üzerine lakkaz enzimi immobilizasyonunda termodinamik parametreler incelenmiştir. Bu çalışmada, 50°C'de serbest enzimin ΔS^\ddagger değeri 210 J/mol, immobilize enzimin ΔS^\ddagger değeri 63 J/mol olarak belirlenmiştir. Immobilizasyon işleminin, reaksiyonun düzensizliğini azalttığını belirterek immobilize lakkazın ΔS^\ddagger değerinde belirgin bir azalma gözlemlendiğini ifade etmişlerdir [122]. Bizim çalışmamızda immobilizasyondan sonra enzimin ΔS^\ddagger değerinde bir değişiklik gözlemlenmemiştir. ΔS^\ddagger değeri düzensizlik hakkında bilgi verir. Immobilizasyon işleminden sonra enzimin ΔS^\ddagger değeri değişmediğinden dolayı immobilize enzimin düzensizliğinin arttığını ya da azaldığını söyleyememekteyiz.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *Bacillus methyilotrophicus* Y37 selüloz enziminin vermikülit üzerine immobilizasyonu gerçekleştirildi. İmmobilize enzimin optimizasyon, karakterizasyon, kinetik ve termodinamik çalışmaları gerçekleştirildi.

İmmobilizasyon işleminin optimizasyon çalışmalarında en iyi verim, 0,1 g immobilize enzim miktarı, 2 saat enzim ve 1 saat %3'lük gluteraldehit varlığında %34,8 olarak bulundu.

Serbest enzim için optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 5,0 ve 45 °C iken, immobilize enzim için optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 7,0 ve 45 °C olarak belirlendi. İmmobilize enzimin optimum pH'sı daha yüksek bir değere kaydı fakat optimum sıcaklık değerinde bir değişiklik gözlemlenmedi.

İmmobilize selülazın 15 kullanımda aktivitesinin %61'ini koruduğu gözlemlendi. Bununla birlikte operasyonel stabilitesi incelendiğinde 8. döngüde %46 aktivite gösterdiği bulundu. İmmobilize enzimde tekrar kullanılabilirlik ve operasyonel stabilite endüstriyel uygulamalar için oldukça önem taşımaktadır.

Serbest ve immobilize enzim için K_m değerleri sırasıyla, 0,19 mg mL⁻¹ ve 0,028 mg mL⁻¹; V_m değerleri sırasıyla, 7,42 U mL⁻¹ ve 12,15 U mL⁻¹ olarak belirlendi. Serbest enzim için k_{cat} ve k_{cat}/K_m değeri sırasıyla, 9275 dk⁻¹ ve 4,78×10⁴ dk⁻¹ M⁻¹, immobilize enzim için k_{cat} ve k_{cat}/K_m değeri sırasıyla, 15187,5 dk⁻¹ ve 5,42×10⁵ dk⁻¹ M⁻¹ olarak bulundu. İmmobilize enzimin düşük K_m değeri substratına karşı afinitesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Serbest enzimin termodinamik parametreleri; $\Delta G^\#$:65,782 kJ/mol, $\Delta H^\#$:7,284 kJ/mol, $\Delta S^\#$: -0,181 kJ/mol K, $\Delta G^\#_{E-T}$: -28,935 kJ/mol, $\Delta G^\#_{ES}$: -4,404 kJ/mol ve immobilize enzimin termodinamik parametreleri $\Delta G^\#$:64,457 kJ/mol, $\Delta H^\#$:6,043 kJ/mol, $\Delta S^\#$:-0,181 kJ/mol.K, $\Delta G^\#_{E-T}$: -35,456 kJ/mol, $\Delta G^\#_{ES}$: -9,602 kJ/mol olarak bulundu.

Elde edilen termodinamik ve kinetik sonuçlar immobilize enzimin katalitik özelliklerinin serbest enzime kıyasla daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular ile immobilize enzimde olumlu yönde konformasyonel değişiklikler olduğu düşünülebilir. İmmobilize selüloz yüksek katalitik özelliği, tekrar kullanılabilirliği ve maliyeti azaltması açısından endüstriyel proseslerde tercih edilebilir. Sonuç olarak, immobilize selülazın tekrar kullanım olanağı, operasyonel stabilitesi, daha iyi katalitik aktivite değerleri serbest selülaza göre daha üstün olduğunu göstermektedir. Destek materyali olarak kullanılan vermikülit, ucuz olması, kolay elde edilebilirliği, yüksek gözeneklilik ve iyi iyon değişimi gibi özellikleriyle tercih edilebilir. Fakat immobilizasyon veriminin artırılması üzerine çalışmalar geliştirilebilir.

TÜBİTAK 116Z455 no'lu proje kapsamında; diaçil piperazinler ve alkil-açil piperazinlerin antibakteriyel aktivite çalışmaları yapılmıştır. Fakat bu moleküller yeterli derecede aktivite göstermemişlerdir.

KAYNAKLAR

- [1] Harisha S., *Biotechnology Procedures and Experiments Handbook*, 1st ed., Infinity Science Presss, Canada, 2007
- [2] Van Beilen J. B., Li, Z., Enzyme Technology: an Overview, *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, **13**(4), 338-344.
- [3] Gözükarar F., Termofil *Bacillus* sp. Bakterisinden Lichenaz (B-1,3Ve 1,4 Glucanase) Enzimi Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Kullanılabilirliği, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2009, 244327.
- [4] Bhat M.K., Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology, *Biotechnology Advances*, 2000, **18**(5), 355-383.
- [5] Güven R. G., Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açından Önemli Bazı Enzimleri, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 2011, **09**(1), 1-10.
- [6] Mubarak N. M., Wong J. R., Tan K. W., Sahu J. N., Abdullah E. C., Jayakumar N. S., Ganesan P., Immobilization of Cellulase Enzyme on Functionalized Multiwall Carbon Nanotubes, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2014, **107**, 124-131.
- [7] Zoppas F. M., Meneguzzi A., Tramontina F., Alternatives for Cellulase Production in Submerged Fermentation with Agroindustrial Wastes, *International Journal of Modern Engineering Research*, 2013, **3**(4), 2374-2381.
- [8] Lerner K. L., Lerner B. W., *World of Microbiology and Immunology*, Gale Group, Farmington Hills, 2003.
- [9] Nelson D.L., Cox M.M., 'Lehninger Principles of Biochemistry', 4th ed., Worth Publishers, New York, 191-202, 2004.
- [10] Pallardy, S. G., *Physiology of Woody Plants*, 3rd ed., Academic Press, Columbia, 2008.
- [11] Bayer E., A.; Lamed R., The Cellulose Paradox: Pollutant Par Excellence and/or a Reclaimable Natural Resource?, *Biodegradation*, 1992, **3**(2-3), 171-188.
- [12] Bhat M. K.; Bhat S. Cellulose Degrading Enzymes and Their Potential Industrial Applications, *Biotechnology Advances*, 1997, **15**(3-4), 583-62.

- [13] Béguin P., Aubert, J. P., The Biological Degradation of Cellulose, *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, **13**(1), 25-58.
- [14] Neto W. P. F., Morphological Investigation of Cellulose Nanocrystals and Nanocomposite Applications, Phd Dissertation, Federal University of Uberlandia, 2017.
- [15] Yang D., Weng H., Wang M., Xu W., Li, Y., Yang H., Cloning and Expression of a Novel Thermostable Cellulase from Newly Isolated Bacillus Subtilis Strain I15, *Molecular Biology Reports*, 2010, **37**(4), 1923-1929.
- [16] Kim B. K., Lee B. H., Lee Y. J., Jin I. H., Chung C. H., Lee J. W., Purification and Characterization of Carboxymethylcellulase Isolated from a Marine Bacterium, Bacillus Subtilis Subsp. Subtilis A-53, *Enzyme and Microbial Technology*, 2009, **44**(6-7), 411-416.
- [17] Mackulak T., Prousek J., Olejnikova P., Bodik I., The Using of Enzymes for Degradation of Cellulose Substrate for The Production of Biogas, *Proceedings of The 37th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, Tatranské Matliare, Slovakia, 1407-1412, Mayıs 2010.
- [18] Gürtekin E., Şekerdağ N., Bir İleri Oksidasyon Prosesi: Fenton Proses, *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 2008, **14**(3), 229-236.
- [19] Acharya P. B., Acharya D. K.; Modi H. A., Optimization for Cellulase Production by Aspergillus Niger Using Saw Dust as Substrate, *African Journal of Biotechnology*, 2008, **7**(22), 4147-4152.
- [20] <https://syifarobbani.wordpress.com/2015/09/19/karakteristik-lignoselulosa/>, (Ziyaret tarihi: 15 Nisan 2019).
- [21] Jeya M., Zhang Y. W., Kim I. W., Lee J. K., Enhanced Saccharification of Alkali-Treated Rice Straw by Cellulase from Trametes Hirsuta and Statistical Optimization of Hydrolysis Conditions by RSM, *Bioresource Technology*, 2009, **100**(21), 5155-5161.
- [22] Wang S., Lu A., Zhang L., Recent Advances in Regenerated Cellulose Materials, *Progress in Polymer Science*, 2016, **53**, 169-206.
- [23] Lynd L. R., Weimer P. J., Van Zyl W. H., Pretorius I. S., Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology, *Microbiology and. Molecular Biology Reviews*, 2002, **66**(3), 506-577.
- [24] Bayer E. A., Chanzy H., Lamed R., Shoham Y., Cellulose, Cellulases and Cellulosomes, *Current Opinion in Structural Biology*, 1998, **8**(5), 548-557.
- [25] Held P., Enzymatic Digestion of Polysaccharides, Part II: Optimization of Polymer Digestion and Glucose Production in Microplates, *BioTek Instruments*, AN022712_06, 1-5, 2012.

- [26] Tamboli A. S., Waghmare P. R., Khandare R. V., Govindwar S. P., Comparative Analyses of Enzymatic Activity, Structural Study and Docking of Fungal Cellulases, *Gene Reports*, 2017, **9**, 54-60.
- [27] Sadhu S., Maiti T. K., Cellulase Production by Bacteria: a Review, *British Microbiology Research Journal*, 2013, **3**(3), 235.
- [28] Gaur R., Tiwari S., Isolation, Production, Purification and Characterization of an Organic-Solvent-Thermostable Alkalophilic Cellulase from *Bacillus Vallismortis* RG-07, *BMC Biotechnology*, 2015, **15**(1),19.
- [29] Subhedar P. B., Gogate P. R., Enhancing The Activity of Cellulase Enzyme Using Ultrasonic Irradiations, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2014, **101**, 108-114.
- [30] Ijaz A., Anwar Z., Zafar Y., Hussai I., Muhammad A., Irshad M., Mehmood S., Optimization of Cellulase Enzyme Production from Corn Cobs Using *Alternaria Alternata* by Solid State Fermentation, *Journal of Cell and Molecular Biology*, 2011, **9**(2), 51.
- [31] Sukumaran R. K., Singhania R. R., Pandey A., Microbial Cellulases-Production, Applications and Challenges, *Journal of Scientific & Industrial Research*, 2005, **64**, 832-844.
- [32] Karmakar M., Ray R. R., Current Trends in Research and Application of Microbial Cellulases, *Research Journal of Microbiology*, 2011, **6**(1), 41-53.
- [33] Kirk O., Borchert T. V., Fuglsang C. C., Industrial Enzyme Applications, *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, **13**(4), 345-351.
- [34] Karademir A., Akgül M., Tutuş A., Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin Modifikasyonu, Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2002, **5**(1), 61-71.
- [35] Ochoa-Solano J. L., Olmos-Soto J., The Functional Property of *Bacillus* for Shrimp Feeds, *Food Microbiology*, 2006, **23**(6), 519-525.
- [36] Mehta P., Walia A., Kakkar N., Shirkot C. K., Tricalcium Phosphate Solubilisation by New Endophyte *Bacillus Methylophilus* CKAM Isolated from Apple Root Endosphere and Its Plant Growth-Promoting Activities, *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, **36**(8), 2033-2045.
- [37] Kaynar P., Beyatlı Y., Balıklardan İzole Edilen *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi, Plazmid DNA ve Protein Profillerinin İncelenmesi, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2006, **04**(03), 1-30.

- [38] Ahmad R., Sardar M., Enzyme Immobilization: an Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix, *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 2015, **4**(2), 1.
- [39] Nisha S., Karthick S. A., Gobi N., a Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme, *Chemical Science Review and Letters*, 2012, **1**(3), 148-155.
- [40] Krajewska B., Application of Chitin-And Chitosan-Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review, *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, **35**(2-3), 126-139.
- [41] Zdarta J., Jędrzak A., Kłapiszewski Ł., Jesionowski T., Immobilization of Cellulase on a Functional Inorganic–Organic Hybrid Support: Stability and Kinetic Study, *Catalysts*, 2017, **7**(12), 374.
- [42] Li X., Yu Z., Bian Z., Xu J., Zhang L., Qiao M., Physiochemical Characterization of α -Amylase as Crosslinked Enzyme Aggregates, *Catalysts*, 2018, **8**(8), 299.
- [43] Brena B., González-Pombo P., Batista-Viera F., Immobilization of Enzymes: A Literature Survey, Editor: Guisan J.M., *Immobilization of Enzymes and Cells*, 2nd ed., Humana Press, New Jersey, 15-31, 2013.
- [44] Tanasković S. J., Jokić B., Grbavčić S., Drvenica I., Prlainović N., Luković N., Knežević-Jugović Z., Immobilization of *Candida Antarctica* Lipase B on Kaolin and Its Application in Synthesis of Lipophilic Antioxidants, *Applied Clay Science*, 2017, **135**, 103-111.
- [45] Chellapandian M., Preparation and Characterization of Alkaline Protease Immobilized on Vermiculite, *Process Biochemistry*, 1998, **33**(2), 169-173.
- [46] Rueda N., Dos Santos J. C., Ortiz C., Torres R., Barbos, O., Rodrigues R. C., Fernandez-Lafuente R., Chemical Modification in The Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities, *The Chemical Record*, 2016, **16**(3), 1436-1455.
- [47] Ali M., Husain Q., Sultana S., Ahmad M., Immobilization of Peroxidase on Polypyrrole-Cellulose-Graphene Oxide Nanocomposite Via Non-Covalent Interactions for The Degradation of Reactive Blue 4 Dye, *Chemosphere*, 2018, **202**, 198-207.
- [48] Tischer W., Kasche V., Immobilized Enzymes: Crystals or Carriers?, *Trends in Biotechnology*, 1999, **17**(8), 326-335.
- [49] Khoshnevisan K., Vakhshiteh F., Barkhi M., Baharifar H., Poor-Akbar E., Zari N., Bordbar A. K., Immobilization of Cellulase Enzyme onto Magnetic Nanoparticles: Applications and Recent Advances, *Molecular Catalysis*, 2017, **442**, 66-73.

- [50] Brady D., Jordaan J., Advances in Enzyme Immobilization, *Biotechnology Letters*, 2009, **31**(11), 1639.
- [51] Mohamad N. R., Marzuki N. H. C., Buang N. A., Huyop F., Wahab R. A., An Overview of Technologies for Immobilization of Enzymes and Surface Analysis Techniques for Immobilized Enzymes, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2015, **29**(2), 205-220.
- [52] Batista-Viera F., Ovsejevi K., Mant, C., Reversible Covalent Immobilization of Enzymes Via Their Thiol Groups, Editor: Guisan J.M, *Immobilization of Enzymes and Cells*, 2nd ed., Humana Press, New Jersey, 185-204, 2006.
- [53] An N., Zhou C. H., Zhuang X. Y., Tong D. S., Yu W. H., Immobilization of Enzymes on Clay Minerals for Biocatalysts and Biosensors, *Applied Clay Science*, 2015, **114**, 283-296.
- [54] Kelleher B. P., Oppenheimer S. F., Han F. X., Willeford K. O., Simpson M. J., Simpson A. J., Kingery W. L., Dynamical Systems and Phase Plane Analysis of Protease–Clay Interactions, *Langmuir*, 2003, **19**(22), 9411-9417.
- [55] Navrátilová Z., Kula P., Clay Modified Electrodes: Present Applications and Prospects, *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 2003, **15**(10), 837-846.
- [56] Mousty C., Biosensing Applications of Clay-Modified Electrodes: A Review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, **396**(1), 315-325.
- [57] Malandrino M., Abollino O., Giacomino A., Aceto M., Mentasti E., Adsorption of Heavy Metals on Vermiculite: Influence of pH and Organic Ligands, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006, **299**(2), 537-546.
- [58] Choy J. H., Choi S. J., Oh J. M., Park T., Clay Minerals and Layered Double Hydroxides for Novel Biological Applications, *Applied Clay Science*, 2007, **36**(1-3), 122-132.
- [59] Fuks L., Herdzik-Koniecko I., Vermiculite as A Potential Component of The Engineered Barriers in Low-And Medium-Level Radioactive Waste Repositories, *Applied Clay Science*, 2018, **161**, 139-150.
- [60] Chambi-Peralta M. M., Coelho A. C. V., De Souza Carvalho F. M., Toffoli S. M., Effects of Exchanged Cation, Acid Treatment and High Shear Mechanical Treatment on The Swelling and The Particle Size Distribution of Vermiculite, *Applied Clay Science*, 2018, **155**, 1-7.
- [61] Ciullo P. A., *Industrial Minerals and Their Uses*, 1st ed., William Andrew, Connecticut, 1996.
- [62] Ehsani İ., Bir Vermikülitin Fiziksel, Kimyasal ve Isıl Özellikleri Üzerine Sülfürik Asit Liçinin Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2015, 387367.

- [63] Toksoy F., Vermikülit: Mineraloji, Jeolojik Oluşum, Endüstriyel Kullanım ve Türkiye'deki Durumu, *2.Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu*, İzmir, Türkiye, 16-17 Ekim 1997.
- [64] <http://www.msmadencilik.com.tr/Large-Islenmis-Vermikulit>, (Ziyaret tarihi: 27 Nisan 2019)
- [65] Eom J. H., Kim Y. W., Lee S. S., Jeong D. H., Processing of Vermiculite-Silica Composites with Prefer-Oriented Rod-Like Pores, *Journal of The Korean Ceramic Society*, 2012, **49**(4), 347-351.
- [66] Duman Y., Karakuş Y. Y., Sertel A., Polat F., Production, Purification, and Characterization of A Thermo-Alkali Stable and Metal-Tolerant Carboxymethylcellulase from Newly Isolated Bacillus Methylophilus Y37, *Turkish Journal of Chemistry*, 2016, **40**(5), 802-815.
- [67] Bradford M. M., A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**(1-2), 248-254.
- [68] Segel I. H., *Enzyme Kinetics*, 1st ed., John Wiley and Sons, New York, 1975.
- [69] Marangoni A. G., *Enzyme Kinetics: a Modern Approach*, 1st ed., John Wiley and Sons, New Jersey, 2003.
- [70] Duman Y. A., Kazan D., Denizci A. A., Erarslan A., Water Miscible Mono Alcohols' Effect on The Proteolytic Performance of Bacillus Clausii Serine Alkaline Protease, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, **172**(1), 469-486.
- [71] [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Kinetics/Modeling_Reaction_Kinetics/Temperature_Dependence_of_Reaction_Rates/The_Arrhenius_Law/The_Arrhenius_Law%3A_Activation_Energies](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/Modeling_Reaction_Kinetics/Temperature_Dependence_of_Reaction_Rates/The_Arrhenius_Law/The_Arrhenius_Law%3A_Activation_Energies) (Ziyaret tarihi: 6 Mayıs 2019)
- [72] Duman Y. A., *Bacillus Clausii* Alkalen Proteazının Su ile Karışabilen Organik Çözücüler Varlığında Kinetik ve Termodinamik Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2008, 233247.
- [73] Gordeeva L. G., Moro, E. N., Rudina N. A., Aristov Y. I., Formation of Porous Vermiculite Structure in The Course of Swelling, *Russian Journal of Applied Chemistry*, 2002, **75**(3), 357-361.
- [74] Campos A., Moreno S., Molina R., Characterization of Vermiculite by XRD and Spectroscopic Techniques, *Earth Sciences Research Journal*, 2009, **13**(2), 108-118.

- [75] Dixon J. B., Weed S.B., *Minerals in soil environments*, 2nd ed., Soil Science Society of America, Wisconsin, 1989.
- [76] Ali F., Reinert L., Lévêque J. M., Duclaux L., Muller F., Saeed S., Shah S. S., Effect of Sonication Conditions: Solvent, Time, Temperature and Reactor Type on The Preparation of Micron Sized Vermiculite Particles, *Ultrasonics Sonochemistry*, 2014, **21**(3), 1002-1009.
- [77] Wiewióra A., Pérez-Rodríguez J. L., Perez-Maqueda L. A., Drapała J., Particle Size Distribution in Sonicated High-and Low-Charge Vermiculites, *Applied Clay Science*, 2003, **24**(1-2), 51-58.
- [78] Banfield J. F., Eggleton R. A., Transmission Electron Microscope Study of Biotite Weathering, *Clays and Clay Minerals*, 1988, **36**(1), 47-60.
- [79] Guthrie G. D., Veblen D. R., Interpreting One-Dimensional High-Resolution Transmission Electron Micrographs of Sheet Silicates by Computer Simulation, *American Mineralogist*, 1990, **75**(3-4), 276-288.
- [80] Padilla-Ortega E., Leyva-Ramos R., Mendoza-Barron J., Role of Electrostatic Interactions in The Adsorption of Cadmium (II) from Aqueous Solution onto Vermiculite, *Applied Clay Science*, 2014, **88**, 10-17.
- [81] Gopinath S., Sugunan S., Enzymes Immobilized on Montmorillonite K 10: Effect of Adsorption and Grafting on The Surface Properties and The Enzyme Activity, *Applied Clay Science*, 2007, **35**(1-2), 67-75.
- [82] Talekar S., Pandharbale A., Ladole M., Nadar S., Mulla M., Japhalekar K., Arage D., Carrier Free Co-Immobilization of Alpha Amylase, Glucoamylase and Pullulanase as Combined Cross-Linked Enzyme Aggregates (Combi-Cleas): a Tri-Enzyme Biocatalyst with One Pot Starch Hydrolytic Activity, *Bioresource Technology*, 2013, **147**, 269-275.
- [83] Ladole M. R., Mevada J. S., Pandit A. B., Ultrasonic Hyperactivation of Cellulase Immobilized on Magnetic Nanoparticles, *Bioresource Technology*, 2017, **239**, 117-126.
- [84] Martino A., Pifferi P. G., Spagna G., Immobilization of β -Glucosidase from a Commercial Preparation. Part 2 Optimization of The Immobilization Process on Chitosan, *Process Biochemistry*, 1996, **31**(3), 287-293.
- [85] Jiang D. S., Long S. Y., Huang J., Xiao H. Y., Zhou J. Y., Immobilization of *Pycnoporus Sanguineus* Laccase on Magnetic Chitosan Microspheres, *Biochemical Engineering Journal*, 2005, **25**(1), 15-23
- [86] Zhang Q., Kang J., Yang B., Zhao L., Hou Z., Tang B., Immobilized Cellulase on Fe₃O₄ Nanoparticles as A Magnetically Recoverable Biocatalyst for The Decomposition of Corncob, *Chinese Journal of Catalysis*, 2016, **37**(3), 389-397.

- [87] Qi B., Luo J., Wan Y., Immobilization of Cellulase on a Core-Shell Structured Metal-Organic Framework Composites: Better Inhibitors Tolerance and Easier Recycling, *Bioresource Technology*, 2018, **268**, 577-582.
- [88] Li C., Yoshimoto M., Fukunaga K., Nakao K., Characterization and Immobilization of Liposome-Bound Cellulase for Hydrolysis of Insoluble Cellulose, *Bioresource Technology*, 2007, **98**(7), 1366-1372.
- [89] Cherian E., Dharmendirakumar M., Baskar G., Immobilization of Cellulase onto MnO₂ Nanoparticles for Bioethanol Production by Enhanced Hydrolysis of Agricultural Waste, *Chinese Journal of Catalysis*, 2015, **36**(8), 1223-1229.
- [90] Wu S. C., Lia Y. K., Application of Bacterial Cellulose Pellets in Enzyme Immobilization, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2008, **54**(3-4), 103-108.
- [91] Xu W., Sun Z., Meng H., Han Y., Wu J., Xu J., Zhang X., Immobilization of Cellulase Proteins on Zeolitic Imidazolate Framework (ZIF-8)/Polyvinylidene Fluoride Hybrid Membranes, *New Journal of Chemistry*, 2018, **42**(21), 17429-17438.
- [92] Liu Y., Zeng Z., Zeng G., Tang L., Pang Y., Li, Z., Liu Z., Immobilization of Laccase on Magnetic Bimodal Mesoporous Carbon and The Application in The Removal of Phenolic Compounds, *Bioresource Technology*, 2012, **115**, 21-26.
- [93] Wen X., Zeng Z., Du C., Huang D., Zeng G., Xiao R., Hu, L., Immobilized Laccase on Bentonite-Derived Mesoporous Materials for Removal of Tetracycline, *Chemosphere*, 2019, **222**, 865-871.
- [94] 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.
- [95] Wang Y., Chen D., Wang G., Zhao C., Ma Y., Yang W., Immobilization of Cellulase on Styrene/Maleic Anhydride Copolymer Nanoparticles with Improved Stability Against pH Changes, *Chemical Engineering Journal*, 2018, **336**, 152-159.
- [96] Talekar S., Waingade S., Gaikwad V., Patil S., Nagavekar N., Preparation and Characterization of Cross Linked Enzyme Aggregates (Cleas) of *Bacillus Amyloliquefaciens* Alpha Amylase, *Journal of Biochemical Technology*, 2012, **3**(4), 349-353.
- [97] Dong H., Li J., Li Y., Hu L., Luo D., Improvement of Catalytic Activity and Stability of Lipase by Immobilization on Organobentonite, *Chemical Engineering Journal*, 2012, **181**, 590-596.

- [98] Monier M., Ayad D. M., Wei Y., Sarhan A. A., Immobilization of Horseradish Peroxidase on Modified Chitosan Beads, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, **46**(3), 324-330
- [99] Kim H. J., Suma Y., Lee S. H., Kim J. A., Kim H. S., Immobilization of Horseradish Peroxidase onto Clay Minerals Using Soil Organic Matter for Phenol Removal, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012, **83**, 8-15.
- [100] Sanjay G., Sugunan S., Enhanced pH and Thermal Stabilities of Invertase Immobilized on Montmorillonite K-10, *Food Chemistry*, 2006, **94**(4), 573-579.
- [101] Kumari A., Kaur B., Srivastava R., Sangwan R. S., Isolation and Immobilization of Alkaline Protease on Mesoporous Silica and Mesoporous ZSM-5 Zeolite Materials for Improved Catalytic Properties, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2015, **2**, 108-114.
- [102] Aytar B. S., Bakir U., Preparation of Cross-Linked Tyrosinase Aggregates, *Process Biochemistry*, 2008, **43**(2), 125-131.
- [103] Sangeetha K., Abraham T. E., Preparation and Characterization of Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEA) of Subtilisin for Controlled Release Applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2008, **43**(3), 314-319.
- [104] Kumar A. G., Swarnalatha S., Kamatchi, P., Sekaran G., Immobilization of High Catalytic Acid Protease on Functionalized Mesoporous Activated Carbon Particles, *Biochemical Engineering Journal*, 2009, **43**(2), 185-190.
- [105] Cengiz S., Çavaş L., Yurdakoç K. Bentonite and Sepiolite as Supporting Media: Immobilization of Catalase, *Applied Clay Science*, 2012, **65**, 114-120.
- [106] Migneault I., Dartiguenave C., Bertrand M. J., Waldron K. C., Glutaraldehyde: Behavior in Aqueous Solution, Reaction with Proteins, and Application to Enzyme Crosslinking, *Biotechniques*, 2004, **37**(5), 790-802.
- [107] Rao M. A., Violante A., Gianfreda L., Interaction of Acid Phosphatase with Clays, Organic Molecules and Organo-Mineral Complexes: Kinetics and Stability, *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, **32**(7), 1007-1014.
- [108] Hosseini S. H., Hosseini S. A., Zohreh N., Yaghoubi M., Pourjavadi A., Covalent Immobilization of Cellulase Using Magnetic Poly (Ionic Liquid) Support: Improvement of The Enzyme Activity and Stability, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, **66**(4), 789-798.
- [109] Talekar S., Ghodake V., Ghotage T., Rathod P., Deshmukh P., Nadar S., Ladole M., Novel Magnetic Cross-Linked Enzyme Aggregates (Magnetic Cleas) of Alpha Amylase, *Bioresource Technology*, 2012, **123**, 542-547.

- [110] Ghiaci M., Aghaei H., Soleimanian S., Sedaghat M. E., Enzyme Immobilization: Part 2: Immobilization of Alkaline Phosphatase on Na-Bentonite and Modified Bentonite, *Applied Clay Science*, 2009, **43**(3-4), 308-316.
- [111] 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*, 2017, **40**(1), 9-22.
- [112] Roy I., Gupta A., Khare S. K., Bisaria V. S., Gupta M. N., Immobilization of Xylan-Degrading Enzymes from *Melanocarpus Albomyces* IIS 68 on The Smart Polymer Eudragit L-100, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, **61**(4), 309-313.
- [113] Grewal J., Ahmad, R., Khare S. K., Development of Cellulase-Nanoconjugates with Enhanced Ionic Liquid and Thermal Stability for in Situ Lignocellulose Saccharification, *Bioresource Technology*, 2017, **242**, 236-243.
- [114] Saleem M., Rashid M. H., Jabbar A., Perveen R., Khalid A. M., Rajoka M. I., Kinetic and Thermodynamic Properties of an Immobilized Endoglucanase from *Arachniotus Citrinus*, *Process Biochemistry*, 2005, **40**(2), 849-855.
- [115] Pal A., Khanum F., Covalent Immobilization of Xylanase on The Surface of Alginateglutaraldehyde Beads Decreases The 'Catalytic Efficiency' but Provides 'Low Temperature Stabilization' Effect, *Journal of Biochemical Technology*, 2012, **3**(4), 409-413.
- [116] Fernandes K. F., Lima C. S., Lopes F. M., Collins C. H., Properties of Horseradish Peroxidase Immobilized onto Polyaniline, *Process Biochemistry*, 2004, **39**(8), 957-962.
- [117] Pencreac'h G., Leullier M., Baratti J. C., Properties of Free and Immobilized Lipase from *Pseudomonas Cepacia*, *Biotechnology and Bioengineering*, 1997, **56**(2), 181-189.
- [118] Wang Z. Q., Li Y. B., Tan X. P., He W. X., Xie W., Megharaj M., Wei, G. H., Effect of Arsenate Contamination on Free, Immobilized and Soil Alkaline Phosphatases: Activity, Kinetics and Thermodynamics, *European Journal of Soil Science*, 2017, **68**(1), 126-135.
- [119] Thakrar F. J., Singh S. P., Catalytic, Thermodynamic and Structural Properties of an Immobilized and Highly Thermostable Alkaline Protease from a Haloalkaliphilic Actinobacteria, *Nocardiosis Alba* TATA-5, *Bioresource Technology*, 2019, **278**, 150-158.
- [120] Mohapatra B. R., Douglas Gould W., Dinardo O., Papavinasam S., Koren D. W., Winston Revie R., Effect of Immobilization on Kinetic and

Thermodynamic Characteristics of Sulfide Oxidase from *Arthrobacter* Species, *Preparative Biochemistry And Biotechnology*, 2007, **38**(1), 61-73.

- [121] Karam E. A., Wahab W. A. A., Saleh S. A., Hassan M. E., Kansoh A. L., Esawy M. A., Production, Immobilization and Thermodynamic Studies of Free and Immobilized *Aspergillus Awamori* Amylase, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, **102**, 694-703.
- [122] Tavares A. P., Silva C. G., Dražić G., Silva A. M., Loureiro J. M., Faria J. L., Laccase Immobilization Over Multi-Walled Carbon Nanotubes: Kinetic, Thermodynamic and Stability Studies, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2015, **454**, 52-60.



KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

- [1] Duman Y., **Gamze T.**, Immobilization of *Bacillus methyilotrophicus* Y37 Cellulase on a Solid Support, *International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology (EurasianSciEnTech 2018)*, Ankara, Turkey, 22-23 Kasım 2018.



ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2011 yılında girdiği Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 2016 yılında mezun oldu. 2017 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında lisansüstü eğitimine başladı.

