

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

***Bacillus vallismortis* DSM11031 KERATİNAZ ENZİMİNİN  
SODYUM ALJİNAT KÜRECİKLERİ İLE ENKAPSÜLE  
EDİLMESİ**

**YASEMİN BAYER BALTÜRK**

**KOCAELİ 2019**

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA**  
**ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bacillus vallismortis DSM11031 KERATİNAZ ENZİMİNİN**  
**SODYUM ALJİNAT KÜRECİKLERİ İLE ENKAPSÜLE**  
**EDİLMESİ**

**YASEMİN BAYER BALTÜRK**

**Doç. Dr. Yonca DUMAN**  
**Danışman, Kocaeli Üniversitesi**  
**Prof. Dr. Nalan TEKİN**  
**Jüri Üyesi, Kocaeli Üniversitesi**  
**Dr. Öğr. Üyesi Huriye ERDOĞAN DAĞDAŞ**  
**Jüri Üyesi, Gebze Teknik Üniversitesi**

  
.....  
  
.....  
  
.....

**Tezin Savunulduğu Tarih: 28.01.2019**

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜRLER

Hayatım boyunca bana verdiklerini unutamayacağım, her yönden desteğini yanımda hissettiğim, umutsuz zamanlarımda beni aydınlatan, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren geleceğe umutla bakmamı sağlayan, danışman hocam Doç. Dr. Yonca DUMAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım ve kişisel hayatım boyunca her zaman yanımda olan değerli dostum Necla CENGİZ ŞEKERLİ'ye, yüksek lisansa beraber başladığım kıymetli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmamı 2016/013 numaralı proje ile destekleyen Kocaeli Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde her türlü maddi ve manevi özveride bulunarak, beni her konuda daima destekleyen babam Muhammet BAYER, ablam Elif SOYDEMİR ve abim Eşref Ali SOYDEMİR'e, tez çalışmamın tamamlanması aşamasında her zaman yanımda ve destekçim olan sevgili eşim Murat BALTÜRK'e minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ocak-2019

Yasemin BAYER BALTÜRK

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜRLER.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
TABLolar DİZİNİ .....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT .....	ix
GİRİŞ .....	1
1. ENZİMLER.....	2
1.1. Enzimlerin Tarihçesi .....	2
1.2. Enzimlerin Çalışma Prensibi.....	3
1.3. Enzimlerin Sınıflandırılması .....	3
1.3.1 Oksidoredüktazlar .....	4
1.3.2. Transferazlar .....	5
1.3.3. Hidrolazlar.....	5
1.3.4. Liyazlar .....	5
1.3.5. İzomerazlar.....	5
1.3.6. Ligazlar .....	5
1.4. Enzim İzolasyon Kaynakları .....	5
1.4.1. Hayvansal enzim kaynakları .....	5
1.4.2. Bitkisel enzim kaynakları.....	6
1.4.3. Mikrobiyal enzim kaynakları .....	7
2. KERATİNLER.....	9
2.1. Keratin Degredasyonu.....	10
2.2. Keratinazlar .....	10
2.2.1. Bakteriyel keratinazlar .....	11
2.2.2. Keratinazların biyokimyası .....	12
2.2.3. Keratinazların üretimi .....	13
2.2.4. Keratin Yönünden Zengin Atıkların Islahı .....	13
2.2.5. Keratinazların potansiyel uygulama alanları.....	15
2.2.5.1 Yem kaynağı olarak keratinaz kullanımı .....	15
2.2.5.2 Deriden kıl/yün uzaklaştırmada keratinaz uygulaması .....	15
2.2.5.3. Keratinazların deterjan uygulamaları.....	16
2.2.5.4. Keratinaz enziminde gümüş geri kazanımı .....	17
2.2.5.5. Keratinazların diğer potansiyel uygulamaları .....	17
2.2.6. <i>Basilus</i> cinsi .....	18
3. İMMOBİLİZASYON .....	19
3.1. İmmobilizasyon Avantajları.....	20
3.2. Destek Materyalleri.....	21
3.2.1. Kollajen.....	22
3.2.2. Kitosan .....	22
3.2.3. Agar-Agaroz.....	22
3.2.4. Poliakrilamid ve polianhidritler .....	22

3.2.5. Vermikulit .....	23
3.2.6. Aljinat.....	23
3.3. İmmobilizasyon Teknikleri .....	25
3.3.1. Taşıyıcıya bağlama metodu.....	25
3.3.1.1. Kovalent bağlama metodu.....	26
3.3.1.2. İyonik bağlanma metodu.....	26
3.3.1.3. Fiziksel adsorpsiyon metodu.....	27
3.3.1.4. Biyospesifik bağlanma metodu .....	28
3.3.2. Çapraz bağlama metodu.....	28
3.3.3. Tutuklama .....	29
4. MALZEME VE YÖNTEM.....	31
4.1. Materyal .....	31
4.1.1. Laboratuvar ekipmanları .....	31
4.1.2. Kullanılan kimyasallar .....	31
4.1.3. Mikroorganizma .....	31
4.1.4. Kullanılan bakteri izolatları ve standart suş .....	32
4.2. Yöntem.....	32
4.2.1. Keratinaz üreticisi izolatların belirlenmesi .....	32
4.2.2. Keratinaz enziminin üretimi.....	32
4.2.2.1. Serbest keratinaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi.....	32
4.2.2.2. Protein miktarının belirlenmesi.....	33
4.2.3. Keratinaz enziminin kısmi saflaştırılması.....	33
4.2.4. Na-aljinat küreciklerinin oluşturulması.....	34
4.2.5. Enkapsüle enzimin aktivitesinin belirlenmesi.....	34
4.2.6. Optimizasyon koşullarının belirlenmesi .....	35
4.2.6.1 En iyi aljinat konsantrasyonunun belirlenmesi .....	35
4.2.6.2 En iyi gluteraldehit konsantrasyonunun belirlenmesi.....	35
4.2.6.3.Aljinat-enzim oranı optimizasyonu.....	35
4.2.6.4.Enzim-aljinat oranı optimizasyonu .....	36
4.2.6.5 Gluteraldehit muamele süresi optimizasyonu .....	36
4.2.6.6 Enzim muamele süresi optimizasyonu .....	36
4.2.6.7. Enkapsüle enzimde tekrar kullanım.....	37
4.2.7. Serbest ve enkapsüle enzimin karakterizasyonu .....	37
4.2.7.1. Serbest enzim ve enkapsüle enzimlerin optimum pH'larının belirlenmesi.....	37
4.2.7.2. Serbest enzim ve enkapsüle enzimin optimum sıcaklıklarının belirlenmesi .....	39
4.2.7.3. Biyotranformasyon.....	39
4.2.7.4. Serbest enzim ve enkapsüle enzimin $K_m$ ve $V_m$ değerlerinin belirlenmesi.....	40
4.2.8. Keratinaz enzimi için elektroforez çalışması .....	40
4.2.8.1 Keratinaz enzimi için gümüş boyama çalışması .....	41
4.2.8.2 Keratinaz enzimi için zimogram çalışması .....	42
4.2.9. Arrhenius aktivasyon enerjisinin hesaplanması.....	42
4.2.10.Keratinaz enzimi ile keratin azurun hidrolizine bağlı termodinamik parametrelerin belirlenmesi .....	44
5. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	45
5.1. Keratinaz Üreticisi Bakteri İzolatlarının Belirlenmesi.....	45
5.2. Enkapsüle Enzimde Optimizasyon Çalışmaları .....	47

5.2.1. Aljinat derişimi optimizasyonu .....	47
5.2.2. Gluteraldehit derişimi optimizasyonu .....	49
5.2.3. Aljinat- enzim ve enzim-aljinat oranı optimizasyonu .....	50
5.2.4. Gluteraldehit süresi optimizasyonu .....	52
5.2.5. Enzim süresi optimizasyonu .....	54
5.2.6. Enkapsüle enzimde tekrar kullanım .....	55
5.2.7. Biyotransformasyon.....	57
5.3. Serbest ve Enkapsüle Enzimde Karakterizasyon Çalışması .....	57
5.3.1. Serbest ve enkapsüle enzimde optimum pH .....	57
5.3.2. Serbest ve enkapsüle enzimde optimum sıcaklık.....	59
5.3.3. Serbest ve enkapsüle enzimde aktivasyon enerjisi.....	61
5.3.4. Serbest ve enkapsüle enzimlerin $K_m$ ve $V_m$ değerleri.....	63
5.3.5. Serbest ve immobilize enzimin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi .....	69
5.3.6. Keratinaz enziminin elektroforez çalışması .....	70
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	72
KAYNAKLAR .....	74
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER .....	84
ÖZGEÇMİŞ .....	85

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Enzim sınıflandırılması şekilsel gösterimi.....	4
Şekil 3.1.	Aljinat polimerinin yapısı. ....	25
Şekil 4.1.	Sığır serum albümin grafiği .....	33
Şekil 4.2.	Keratinaz enziminin keratin azur hidrolizi reaksiyonunda serbest enerji düzey diyagramı .....	44
Şekil 5.1.	Artan aljinat konsantrasyonlarının immobilizasyon verimi üzerine etkisi .....	49
Şekil 5.2.	Artan glutraldehit konsantrasyonlarının enkapsülasyon verimi üzerine etkisi .....	51
Şekil 5.3.	Artan enzim miktarlarının enkapsülasyon verimi üzerine etkisi .....	51
Şekil 5.4.	Artan aljinat miktarlarının enkapsülasyon verimi üzerine etkisi .....	51
Şekil 5.5.	Artan glutraldehit süresinin enkapsülasyon verimine etkisi .....	52
Şekil 5.6.	Artan enzim süresinin enkapsülasyon verimi üzerine etkisi.....	54
Şekil 5.7.	Enkapsüle enzimde tekrar kullanım.....	55
Şekil 5.8.	Keratin azurun keratinaz enzimi ile biotransformasyonu .....	57
Şekil 5.9.	Keratinin farklı pH'larda aktiviteye olan etkisi .....	58
Şekil 5.10.	Keratin azur substratının farklı sıcaklıklarda aktiviteye etkisi .....	60
Şekil 5.11.	Serbest enzim için Arrhenius grafiği .....	62
Şekil 5.12.	Enkapsüle enzim için Arrhenius grafiği .....	62
Şekil 5.13.	V- [S] grafiği.....	63
Şekil 5.14.	Serbest ve enkapsüle enzim için Lineweaver-Burk diyagramı.....	64
Şekil 5.15.	Keratinaz enziminin elektroforez analizi .....	73

## TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması .....	4
Tablo 2.1. Bazı tüy parçalayan bakteri izolatları ve kaynakları.....	11
Tablo 2.2. Keratinazların uygulama alanları .....	15
Tablo 5.1. En iyi aktivite veren bakteri suşunun seçimi .....	46
Tablo 5.2. Isıl çöktürme için en iyi suşun belirlenmesi .....	46
Tablo 5.3. Serbest enzim ve immobilize enzimin kinetik parametreleri.....	67
Tablo 5.4. Serbest ve enkapsüle keratinaz enziminin, keratin azur ile hidrolizi için elde edilen termodinamik parametreler .....	69





## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$E_a$	:Aktivasyon Enerjisi, (kJ/mol)
$\Delta H^\#$	:Entalpi değişimi, (joule)
$\Delta S^\#$	:Entropi değişimi, (joule)
$\Delta G^\#$	:Serbest aktivasyon enerjisi, (kJ/mol)
$K_m$	:Enzimin Michaelis-Menten sabiti, (M)
$V_{max}$	:Maksimum başlangıç hızı, (U/ml/dk)
$k_{cat}$	:Turn-over katsayısı, (dk <sup>-1</sup> )
$\Delta G^\#_{E-T}$	:Tranzisyon (geçiş) hali bağlanma serbest enerjisi
$\Delta G^\#_{ES}$	:Substrat bağlanma enerjisi
$[E]_t$	:Reaksiyon ortamındaki toplam enzim konsantrasyonu, (μmol/mL)
$[S]$	:Konsantrasyon, (mM)
dk	:Dakika
g	:Gram
R	:İdeal gaz sabiti, (J.K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
rpm	:Karıştırma hızı (dakika/devir)
V	:Kazein başlangıç hızı, (M)
kDa	:Kilo dalton
μg	:Mikrogram
μm	:Mikrometre
mg	:Miligram
mL	:Mililitre
mM	:Milimolar
M	:Molar
nm	:Nanometre
h	:Plank sabiti, (J.s)
$k_B$	:Boltzman sabiti, (J.K <sup>-1</sup> )
<sup>0</sup> C	:Santigrat derece
%	:Yüzde

### Kısaltmalar

CLEA	:Cross-Linked Enzyme Aggregate (Çapraz Bağlı Enzim Agregatları)
EDTA	:Etilen Diamin Tetra Asetikasit
SDS	:Sodium Dodecyl Sulphate (Sodyum Dodesil Sülfat)
SDS-PAGE	:Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi)

## ***Bacillus vallismortis* DSM11031 KERATİNAZ ENZİMİNİN SODYUM ALJİNAT KÜRECİKLERİ İLE ENKAPSÜLE EDİLMESİ**

### **ÖZET**

Keratinazlar, keratin substratını katalizleyebilme özelliği gösteren hidrolazlar sınıfına ait enzimlerdir. İzole edildikleri kaynaklar; bitki, hayvan ve mikrobiyal kaynaklardır. Çalışmamızda *Bacillus vallismortis* DSM11031'den elde edilen keratinaz enziminin, Na-Aljinat kürecikleri ile enkapsülasyonu gerçekleştirildi. Keratinaz enzimi kısmi saflaştırma ile saflaştırıldı. Kısmi saflaştırmayı ispatlamak hem de enzimin molekül ağırlığını öğrenmek için SDS-PAGE analizi yapıldı. Enzimin molekül ağırlığı 63kDa olarak bulundu, native-PAGE ve zimogram analizi ile desteklendi. Serbest enzim ve enkapsüle enzim için kinetik ve termodinamik parametreler incelendi. Serbest enzim için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 8 ve 60 °C, immobilize enzim için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 6 ve 60 °C olarak bulundu. Arrhenius aktivasyon enerjileri ( $E_a$ ) serbest enzim ve enkapsüle enzim için sırasıyla 4,042 kJ/mol ve 2,601 kJ/mol olarak hesaplandı. 40 °C'de pH 8'de her iki enzim için Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hızı ( $V_m$ ) serbest enzim için sırasıyla  $2,5 \times 10^{-3}$  M ve 83,33 U/mL/min, immobilize enzim için sırasıyla 0,011 M ve 10,83 U/mL/min olarak bulundu. Enzimlerin turnover sayısı ( $k_{cat}$ ) ve katalitik performansı ( $k_{cat}/K_m$ ) serbest enzim için sırasıyla  $58,8 \text{ dk}^{-1}$  ve  $1,96 \times 10^4 \text{ dk}^{-1}\text{M}^{-1}$ , enkapsüle enzim için sırasıyla  $9,80 \text{ dk}^{-1}$  ve  $8,91 \times 10^2 \text{ dk}^{-1}\text{M}^{-1}$  olarak bulundu. *Bacillus vallismortis* DSM11031 keratinazının termodinamik parametreleri de incelendi. Serbest enzimin termodinamik parametreleri;  $\Delta G^\ddagger$ :  $6,62 \times 10^4$  kJ/mol;  $\Delta G^\ddagger_{E-T}$ :  $-2,57 \times 10^4$  kJ/mol;  $\Delta G^\ddagger_{ES}$ :  $-1,51 \times 10^4$  kJ/mol;  $\Delta H^\ddagger$ :  $-2,60 \times 10^3$  kJ/mol;  $\Delta S^\ddagger$ :  $-2,20 \times 10^2$  kJ/molK ve enkapsüle enzimin termodinamik parametreleri  $\Delta G^\ddagger$ :  $7,08 \times 10^4$  kJ/mol;  $\Delta G^\ddagger_{E-T}$ :  $-1,77 \times 10^4$  kJ/mol;  $\Delta G^\ddagger_{ES}$ :  $-1,17 \times 10^4$  kJ/mol;  $\Delta H^\ddagger$ :  $-2,60 \times 10^3$  kJ/mol;  $\Delta S^\ddagger$ :  $-2,35 \times 10^2$  kJ/molK olarak bulundu.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus vallismortis*, Enkapsülasyon, Keratinaz, Na-aljinat.

## ENCAPSULATION OF *Bacillus vallismortis* DSM11031 KERATINASE ENZYME WITH SODIUM ALGINATE BEADS

### ABSTRACT

Keratinases are enzymes belonging to the class of hydrolases which are capable of catalyzing the keratin substrate. These are isolated from plant, animal and microbial sources. In our study, encapsulation of keratinase enzyme obtained from *Bacillus vallismortis* DSM11031 with Na-Alginate beads was performed. The keratinase enzyme portion was purified by partial purification. SDS-PAGE analysis was performed to prove the partial purification and to determine the molecular weight of the enzyme. The molecular weight of the enzyme was found to be 63kDa, supported by native-PAGE and zymogram analysis. Kinetic and thermodynamic parameters were investigated for free enzyme and encapsulated enzyme. The optimum pH and temperature for the free enzyme were 8 and 60°C, the optimum pH and temperature for the immobilized enzyme were 6 and 60°C respectively. Arrhenius activation energies ( $E_a$ ) were calculated as 4.042 kJ / mol and 2.601 kJ / mol for the free enzyme and the encapsulated enzyme, respectively. The Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) and the maximum rate ( $V_m$ ) for both enzymes at 40°C at pH 8 were  $2.5 \times 10^{-3}$  M and 83.33 U/mL/min for the free enzyme and 0.011 M and 10.83 U/mL/min for the immobilized enzyme were found, respectively. The turnover number ( $k_{cat}$ ) and catalytic performance ( $k_{cat} / K_m$ ) of enzymes were  $58.8 \text{ min}^{-1}$  vs  $1.96 \times 10^4 \text{ min}^{-1} \text{M}^{-1}$  for the free enzyme,  $9.80 \text{ min}^{-1}$  and  $8.91 \times 10^2 \text{ min}^{-1} \text{M}^{-1}$  for the encapsulated enzyme, respectively. Thermodynamic parameters of *Bacillus vallismortis* DSM11031 keratinase were also investigated. Thermodynamic parameters of free enzyme;  $\Delta G^\ddagger$ :  $6.62 \times 10^4$  kJ/mol;  $\Delta G^\ddagger_{E-T}$ :  $-2.57 \times 10^4$  kJ/mol;  $\Delta G^\ddagger_{ES}$ :  $-1.51 \times 10^4$  kJ/mol;  $\Delta H^\ddagger$ :  $-2.60 \times 10^3$  kJ/mol;  $\Delta S^\ddagger$ :  $-2.20 \times 10^2$  kJ/molK and the thermodynamic parameters of the encapsulated enzyme  $\Delta G^\ddagger$ :  $7.08 \times 10^4$  kJ/mol;  $\Delta G^\ddagger_{E-T}$ :  $-1.77 \times 10^4$  kJ/mol;  $\Delta G^\ddagger_{ES}$ :  $-1.17 \times 10^4$  kJ/mol;  $\Delta H^\ddagger$ :  $-2.60 \times 10^3$  kJ/mol;  $\Delta S^\ddagger$ :  $-2.35 \times 10^2$  kJ/molK.

**Keywords:** *Bacillus vallismortis*, Encapsulation, Keratinase, Na-alginate.

## GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmada oluşan tepkimelerin uygun sıcaklık ve pH koşullarında gerçekleşmesini sağlayan ve bu tepkimeleri düzenleyen, protein yapısında, substratına karşı özgül, sentetik ve inorganik katalizörlerden çok daha fazla kataliz gücüne sahip biyolojik katalizörlerdir [1].

Enzimler düşük konsantrasyonlarda katalizör olarak kullanılır ve substrat moleküllerinin ürüne dönüşmesini katalizleyecek moleküller olarak tanımlanırlar [2]. Biyokatalizör enzimler; canlı sistemlerde hayati öneme sahip olmakla birlikte çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir [3].

Gelişen teknolojiye bağlı olarak endüstriyel enzim kullanımına ilgi giderek artmaktadır. Günümüzde kimyasal katalizörler yerine, katalitik olarak daha etkili, ürün özgülüğü çok daha fazla, yan ürün oluşumunu büyük ölçüde azaltan, enerji maliyeti açısından düşük, çevre dostu enzimlerin kullanımı artmıştır [4].

Kimyasal katalizörler ile kıyaslandığında, biyokatalizör olarak enzimlerin üstünlüğü düşünüldüğünde tez çalışmamızın amacı: *Bacillus vallismortis DSM 11031* suşundan elde edilen keratinaz enziminin sodyum aljinat boncukları ile enkapsüle edilmesi incelenmiş ve enkapsüle enzimin endüstriyel kullanım uygunluğu tartışılmıştır.

## 1. ENZİMLER

### 1.1. Enzimlerin Tarihçesi

Biyokimya tarihinin büyük bir bölümü enzim araştırmaları üzerinedir. Biyolojik kataliz etin mide salgılarıyla sindirilmesi üzerine yapılan çalışmalarda fark edilmiş tanımlanması 1700'lü yıllarda yapılmıştır. Araştırmalar 1800'lü yıllarda tükürük ve bitki ekstralarıyla nişastanın şekere dönüştürülmesi çalışmalarıyla devam etmiştir. Sonraki yıllar içerisinde maya tarafından şekerin alkolle fermentasyonun fermentler tarafından katalizlendiği Louis Pasteur tarafından keşfedilmiştir. 1897'de Eduard Buncher maya özütlerinin, şekeri alkole dönüştürdüğünü ve fermentasyonun hücreden uzaklaştırdıklarında dahi işlevine devam eden moleküller tarafından gerçekteğini ispatlamıştır. Frederick W. Kühne, Buncher tarafından keşfedilen bu moleküller enzim olarak adlandırmıştır.

Enzim araştırmalarındaki ilk başarılı çalışma 1926 yılında James Sumner tarafından yapılmıştır. Sumner üreaz enziminin saflaştırılması ve kristallendirilmesi üzerine yürüttüğü çalışmasında üreaz kristallerinin tamamen proteinden oluştuğunu keşfetmiş ve buradan hareketle tüm enzimlerin protein yapılı olduklarını varsaymıştır. 1930'lu yıllarda Northrop ve Moses Kunitz'in pepsin, tripsin ve diğer sindirim enzimlerini kristallendirmeleri ve bu enzimlerin de protein yapısında bulduklarının keşfedilmesinin ardından Sumner'ın düşüncesi kabul görmüştür. Bu süreçte J. B.S. Haldene "Enzimler" adlı bir eser yayımlamıştır. Bu eserde Halden'e göre kataliz olayı gerçekteşirken enzim ile substratı arasında zayıf bağlanma etkileşimleri geçerli olmalıydı. Halden'nin bu anlayışı günümüzde mevcut enzim kataliz anlayışımızın temelini oluşturmaktadır.

Yirminci yüzyılın sonlarına doğru enzimler üzerinde yapılan çalışmalar önemli oranda artış göstermiş olup bu çalışmalar ışığında binlerce enzimin saflaştırılması, yapılarının aydınlatılması ve katalitik mekanizmaları hakkında detaylı bilgi edinilmiştir [1].

## 1.2. Enzimlerin Çalışma Prensipleri

Canlı sistemler için tepkimelerin enzimatik olarak gerçekleşebilmesi hayati öneme sahiptir. Biyolojik moleküller nötr pH 'da ılımlı sıcaklıkta ve hücre içi sulu ortamda kararlı haldedir. Biyolojik şartlar altında katalizlenmeyen tepkimeler yavaş gerçekleşme eğilimindedir. Ayrıca kullanılan kimyasalların çoğu hücrel çevrelere uygun değildir [1].

Katalizörler olarak enzimler, hücrenin ılımlı şartları için gereklidir ve reaksiyon sırasında kendileri tüketilmeden reaksiyonları hızlandırırlar [2].

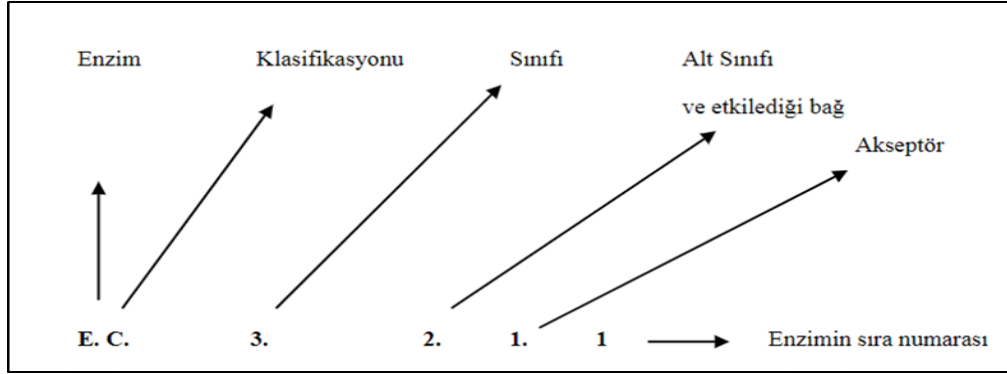
Enzimlerin etki ettiği moleküllere *substrat* denir. Enzimatik reaksiyonlar substratın bağlandığı enzimin aktif bölgesinde gerçekleşir. Substratın enzime bağlanması ile oluşan enzim-substrat kompleksi enzim aktivitesinde önemli bir rol oynar. Oluşan enzim substrat kompleksi enzimatin tepkimenin kinetik davranışlarını açıklayan matematiksel işlemlerin başlangıç noktasını oluşturmaktadır [1,5].

## 1.3. Enzimlerin Sınıflandırılması

Biyolojik katalizör olarak enzimler genel olarak ortak adlandırılmaya sahiptirler. Enzimler adlandırılırken sonuna -ase (az), (oksidaz, dehidrojenaz, vs.), proteolitik enzimlerin ise genellikle -in eki getirilir (tripsin, papain, vs.). Keşfedilen enzim miktarının artmasıyla enzimlerin isimlendirilmesinde karmaşıklık ortaya çıkmıştır. Bu sorunu çözmek için Uluslararası Biyokimya Birliği tarafından, Enzim Komisyonu oluşturulmuş ve enzimlerin adlandırılmasında sistemli bir yaklaşım sağlanmıştır. Bu yaklaşıma göre, tüm enzimler dört bölümden oluşan Enzim Komisyonu (EC) numarası ile tanımlanmıştır. Bu tanımlamada her enzimin kod numarasını 4 rakam temsil etmektedir.

- 1.rakam enzimin grup numarasını,
- 2.rakam enzimin sınıf numarasını,
- 3. rakam enzimin alt sınıf numarasını
- 4. rakam enzim seri numarasını gösterir [2,5].

Örnek olarak  $\alpha$ -amilaz enziminin E.C. sınıflandırması, 3 (hidrolaz), 2(glikoz bileşiklerine etki yapan sınıfı), 1 (glikozit hidrolaz), 1 (alt sınıftaki enzimlerin arasındaki yeri), 3.2.1.1. rakamları ile tarif edilir [4].



Şekil 1.1. Enzim sınıflandırılması şekilsel gösterimi [4]

Enzimler tablo 1.1’de gösterildiği gibi altı sınıfa ayrılır.

Tablo 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması [2]

No	Sınıf	Reaksiyon Tipi
1	Oksidoredüktazlar	Yükseltgenme / İndirgenme
2	Transferazlar	Atom ya da grup transferi
3	Hidrolazlar	Hidroliz
4	Liyazlar	Grup taşınması
5	İzomerazlar	İzomerleşme
6	Ligazlar	Kondenzasyon tepkimeleri

### 1.3.1 Oksidoredüktazlar

Oksidoredüktaz reaksiyonları, hidrojen ve oksijen atomlarının veya elektronların moleküller arasında aktarımının yapıldığı yükseltgenme-indirgenme (redoks) reaksiyonlarını içerir. Bu sınıflandırma kapsamı, dehidrojenazlar (hidrit aktarımı), oksidazlar (moleküler oksijene elektron aktarımı), oksijenazlar (moleküler oksijenden oksijen aktarımı) ve peroksidazları (perokside elektron aktarımı) kapsar [6].

### **1.3.2. Transferazlar**

Bir atomun, molekülün veya iki molekül arasında fonksiyonel grubun transferini sağlar.

### **1.3.3. Hidrolazlar**

Hidrolazlar sınıfına ait enzimler, kimyasal bağları su katılması ile katalizlerler. Günümüzde enzim teknolojisi alanında en yaygın olarak ilgilenilen enzim sınıfıdır ve esterazlar, glikozidazlar, lipazlar ve proteazları içerir.

### **1.3.4. Liyazlar**

Bir molekülün parçalanmasını veya fonksiyonel bir grubun uzaklaştırılmasını sağlayan; yani, C-C, C-O, C-N, C-S, C-X (halojen), P-O bağlarını yıkan ve ürünlerde çift bağ ya da halkasal yapı oluşturan enzim grubudur.

### **1.3.5. İzomerazlar**

İzomerlerin yapısal olarak yeniden düzenlenmesini sağlayan enzimlerdir. İzomerik yapıların oluşumunu molekül içi grupların aktarımı ile sağlarlar [6].

### **1.3.6. Ligazlar**

Aynı zamanda sentetaz olarak da bilinen ligazlar, kondenzasyon tepkimelerinin oluşumuyla C-C, C-S, C-O, C-N bağlarının oluşumunu sağlar [5].

## **1.4. Enzim İzolasyon Kaynakları**

Biyolojik olarak etkin enzimler tüm canlı sistemlerden elde edilebilir. Bu anlamda endüstriyel enzim üretimi için geniş yelpazede kaynak kullanılmaktadır Enzim izolasyonunda kaynak olarak bitki, hayvan ve mikroorganizmadan yararlanılır [6].

### **1.4.1. Hayvansal enzim kaynakları**

Hayvansal kaynaklı enzimlerin izolasyonlarında önemli olan enzimlerin aktivitelerinin sabit kalması için hayvan dokularını yüksek sıcaklık içeren bir ortama maruz bırakmamaktır. Organların içerisindeki yağ, organik çözücüler kullanılarak



yok edilmeli ve bağlantı dokularından arındırılarak dondurulmalıdır. Bu koşullar sağlandıktan sonra dondurulmuş organlar, et endüstrisinde kullanılan makinelerde kıyılır ve enzimler tampon çözeltiler varlığında izole edilir. Fakat hayvan popülasyonunun korunması ve etik konular göz önünde tutulduğunda hayvansal kaynaklı enzim üretimin dezavantajıdır. Ayrıca hayvanların taşınması sırasında hastalıkların da dokular üzerinden ülkeler arası yayılması büyük sorunlara yol açması sebebiyle tercih edilmemektedir [4]. Endüstride önemli olan kısa sürede büyük ölçekli üretim sağlamaktır. Örneğin, süt pıhtılaştırıcı olarak kullanılan rennin üretimi sırasında geleneksel yaklaşım olarak, genç bir ineğin baldırından alınan enzim kullanılmaktadır. Buzağıdan elde edilen ortalama maya miktarı 10 kg'dır ve bir buzağı üretmek için yoğun tarımsal süreç ve maliyet gerekmektedir bununla birlikte 1000 litrelik *Bacillus subtilis* bakterisi 12 saat içinde 20 kg enzim üretebilir. Bu örnek kıyaslamadan da anlaşılacağı gibi, hayvansal kaynaklı enzim üretimi dezavantajlı bir yöntemdir [2].

#### **1.4.2. Bitkisel enzim kaynakları**

Bitkilerin enzim kaynağı olarak kullanılması sırasında bitkinin tüm dokularından yararlanılabilir. Burada önemli olan bitkinin kolay yetişebilir, ortam koşullarına dayanıklı, bol miktarda bulunan bir tür olmasıdır.

Kaynak olarak bitkisel kökenli enzimlerin endüstriyel talebe karşılık verebilmesi, tarımsal yetiştirilme etkinliği, gelişim döngüsü ve iklim gibi birkaç faktöre bağlıdır [7].

Bitkisel kaynaklı enzimler için meyve ve sebzeler ideal bir kaynaktır. Enzim bakımından bir hayli zengin olup işlenmeye gerek kalmadan kolayca tüketilip tüm fonksiyonlarını korurlar [8]. Bitkilerde bulunan dört önemli enzim proteaz, amilaz, lipaz ve selülazdır.

- Proteaz: büyük protein moleküllerinin yapı taşı olan aminoasitlere parçalanmasını sağlar. Örnek olarak et, balık, kümes hayvanları, yumurta, peynirde bulunan proteini parçalar.

- Amilaz: karbonhidrat ve nişastanın emilip yapı taşlarına (laktoz, maltoz, sükroz) dönüşmesini sağlar.
- Lipaz: yağın (triacilgliserol) sindirilmesini sağlayarak yağ asidi ve gliserole parçalar.
- Selülaz: karbonhidratların sindirilmesini sağlar, besin liflerini parçalar.

Bitkisel kaynaklı enzimlerin aktivitesi için substrata ihtiyaç duymasının yanında bitkinin habitatına uygun sıcaklık, nem ve uygun pH gereklidir.

Sıcaklık: Bitkisel kaynaklı enzimler için sıcaklık aralıkları sınırlıdır. Pek çok bitki için bu sıcaklık aralığı 33°C- 40°C arasında belirlenmiştir.

pH: Bitkisel kaynaklı enzimleri için pH aralıkları oldukça geniştir (pH 3-9)

Nem: Bitkisel kaynaklı enzimlerin etkin biçimde kataliz olayını gerçekleştirebilmesi için bitkinin nem içermesi gerekmektedir [9].

Bitkilerin enzim kaynağı olarak kullanılması endüstriyel alanda büyük sıkıntılara neden olabilir. Değişen ortam şartları (iklim), bitkinin nadir bulunan bir tür ya da endemik oluşu, bitkinin yetiştirilme süreci zaman kaybına yol açtığından mikroorganizmalara oranla çok daha az tercih edilen bir kaynaktır [10].

#### **1.4.3. Mikrobiyal enzim kaynakları**

Mikroorganizmalardan enzim üretimi çeşitliliğe sahip olması ve genetik yönlendirmelere elverişli olması sebebiyle enzim kaynağı olarak çok tercih edilmektedir. Enzim üretmek amacıyla izolasyon kaynağı olarak hayvan ve bitki yerine mikroorganizmaların kullanılmasının sebepleri aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Mikroorganizmaların, farklı birçok reaksiyonu gerçekleştirebilme özelliği,
- Birçok farklı çevreye kolay uyum sağlamaları, doğadan alınıp laboratuvarında zengin karbon ve azot kaynaklarıyla kültür edilmeleri,
- Genetik manipülasyon, aktivitenin yüzlerce kata kadar arttırılabilmesi,

- Geniş çeşitlilik; farklı türlerin aynı reaksiyonu katalizleyen benzer enzimleri sentezlemesi ve bunların reaktördeki koşulları kontrol etmek adına esneklik sağlaması,
- Tarama (screening) prosedürlerinin kolaylığı nedeniyle oldukça kısa zamanda denenmek için binlerce suşun saf kültürünün elde edilebilmesidir.

Mikrobiyal enzimler, optimizasyon ve modifikasyon süreçlerindeki kolaylık, uyum ve ekonomik üretimlerden dolayı, bitki ve hayvanlardan elde edilen enzimlerden daha çok tercih edilmektedirler. Bunlar, bitki ve hayvanlardan elde edilen enzimlerden daha stabildir. Ekstrem koşullarda (pH, sıcaklık, tuzluluk vs.) yüksek katalitik aktivite ve stabilite göstermektedir. Ayrıca katalitik aktivitelerde büyük farklılıklar sağlamaktadırlar. Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin büyük bir çoğunluğu mikrobiyal orijinlidir [11].

## 2. KERATİNLER

Keratinler, çözünmeyen ipliksi yapıda, sistin kökleri içeren tüy, yün, tırnak, pençe, gaga, gibi derinin dış kısmında ve saçta bulunan yüksek kararlılığa sahip yapısal proteinlerdir [1,12]. Yapılarında bulunan kovalent ve kovalent olmayan etkileşimleri (hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler) sebebiyle proteolitik yıkıma karşı yüksek kararlılık ve direnç göstermektedirler [13].

Keratin, polipeptid zinciri disülfid bağlarından oluşmuş olup sistein rezidüleri bakımından zengindir. Keratinler içerdikleri sülfür miktarına bağlı olarak sert ve yumuşak olacak şekilde iki gruba ayrılır. Sert keratinler %5 oranında sülfür içerir ve yapısında çok fazla disülfid bağı bulunur. Sert keratinler daha çok deri, saç, toynak ve tırnak benzeri yapılarda bulunurlar. Yumuşak keratinler %1 oranında sülfür içerir ve yapısında eser miktarda disülfid bağı bulunur. Yumuşak keratinler daha çok deri ve kallus (sertleşmiş deri, nasır) benzeri yapılarda bulunurlar. Yapılarında bulunan bağlardan dolayı (yüksek düzeyde disülfid ve hidrojen bağları) keratinler hem kimyasal hem de biyolojik hidroliz ajanlarına karşı dirençlidirler [14]. Bununla birlikte keratinler alfa ( $\alpha$ ) keratin ve beta ( $\beta$ ) keratin olarak da gruplandırılır. Alfa-keratini; daha çok omurgalı hayvanlarda bulunan, alfa helikal ikinci yapı bakımından zengin, molekül ağırlıkları 40-70 kDa arasında değişiklik gösteren yapılar olarak tanımlanır. Beta-keratini ise sürüngenlerin ve kuşların derisinde bulunan, molekül ağırlıkları 10 kDa ile 20 kDa arasında değişiklik gösteren yapılar olarak tanımlanır. Beta-keratin molekülleri beta katlanmaları bakımından daha zengin olduğu için hidrolize daha dirençlidir [15]. Keratin molekülünün mekanik stabilitesi ve mikrobiyal yönlendirmelere karşı dirençliliği, beta ve alfa keratin yapılarındaki protein zincirlerinin sıkı paketlenmesine ve bu yapılardaki sistin köprülerine bağlıdır [16].

Keratinler yapısal dirençliklerine rağmen bazı mikroorganizmalar tarafından parçalanarak geri dönüştürülebilmektedirler [13]. Keratinolitik enzimler, keratin içeren (özellikle tavukçuluk, deri endüstrisi) atıkların biyoteknolojik proseslerinde

önemli yer tutmaktadır [17,18]. Enzimatik proses uygulanan tüyler, gübre, kıvam arttırıcı madde ve yem oluşumunda kullanılır [19]. Tüyler fiziksel ve kimyasal işlemlerden sonra hayvan yemi (feather-meal) formunu almaktadır. Biyolojik proseslerle tüy parçalama işlemi çevre için kirletici olmamasından dolayı son zamanlarda oldukça ilgi çekici hale gelmiştir. Tüy parçalama yeteneklerine göre mikroorganizmalar tanımlanmıştır. [20].

## **2.1. Keratin Degredasyonu**

Keratin içerikli materyallerin degredasyonu medikal ve tarımsal olarak önemlidir.

Keratin degredasyonunun olabilmesi için 2 yaklaşım söz konusudur: Hidrotermal ve biyolojik süreç [21].

Hidrotermal proses; asidik ya da bazik bir ortam varlığında ve sıcaklığın yüksek (80-140 °C) olduğu bir ortamda gerçekleşir. Dünya genelinde, her yıl milyonlarca ton kuştüyü atığı hidrotermal işlemlerle yeme dönüştürülmektedir [17]. Hidrotermal prosesin; maliyetinin ve işlemler sırasında kullanılan enerjinin yüksek olması [22], temel amino asitlerin (lizin, metiyonin ve triptofan) işlemler sırasında kaybı ve besleyici olmayan aminoasitlerin oluşumu sistemin dezavantajıdır [23].

Biyolojik süreç uygulanarak mikrobiyal parçalanma gerçekleştirildiğinde; maliyetin düşük olması, çevresel kirleticilerin olmaması, mikrobiyal keratinazların tüy keratinlerinin aminoasitlerini önemli derecede arttırması gibi sebeplerden ötürü biyolojik sürece ilgi artmaktadır [24,25].

## **2.2. Keratinazlar**

Keratinazlar, keratin substratını katalizleyebilme özelliği gösteren hidrolazlar sınıfına ait enzimlerdir [26]. Keratinolitik enzimler, tavuk ve deri endüstrilerinden gelen keratin içeren atıkların biyoteknolojik dönüşümünde kullanılmaktadır [18,13].

Keratinolitik enzimler keratinler üzerinde etkilidir. Keratinolitik mikroorganizmaların keratini parçalama verimliliği keratinolitik proteazların yanı sıra aynı zamanda bu organizmalar tarafından üretilen disülfid redüktazlar ile birlikte etki göstermesi ile artar. Disülfid bağlarını indirgeyen faktörlerin varlığında keratin

kullanan mikroorganizmalar var olsa da keratin parçalaması ile ilgili olan disülfid bağlarını indirgeyen enzimlerin izolasyonu ve karakterizasyonuna odaklanılmamıştır.

Mikrobiyal keratinolizin mekanizması tam anlaşılmamış olmakla birlikte disülfid köprülerinin redüksiyonu keratin degradasyonu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir [13].

### 2.2.1. Bakteriyel keratinazlar

Proteolitik enzimler, ticari öneme sahip enzim gruplarıdır. Endüstrinin birçok alanında (deri, deterjan, besin vb.) yoğun olarak kullanılmaktadır [26]. Tüy parçalayan bakteriler toprak ve kümes hayvancılığında gelen atıklardan izole edilmiştir. Bu izolatlar çoğunlukla *Streptomyces* ve *Bacillus* suşlarını kapsamasına rağmen, doğada gram pozitif ve gram negatif bakteriler, funguslar farklı keratinazlar üretmektedir [27]. Doğada keratinaz üreten en yaygın mikroorganizma türleri *Bacillus* ve *Streptomyces* cinslerine aittir [26]. Bazı keratinaz üreten mikroorganizmalar ve izole edildikleri yerler Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Bazı tüy parçalayan bakteri izolatları ve kaynakları [26]

<b>Bakteri izolatları (Orijin)</b>
<b>Gram Pozitif Bakteri İzolatları</b>
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptomyces thermoviolaceus</i> Toprak
<i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> ve <i>Bacillus cereus</i> Tavuk işletme atıkları
<i>Bacillus pseudofirmus</i> Alkalin soda gölü
<i>Bacillus macroides</i> , <i>Bacillus cereus</i> Kuru mera toprağı
<i>Streptomyces pactum</i> Koleksiyon kültürü
<i>Streptomyces albidoflavus</i> Tavuk çiftliği toprağı
<i>Fervido bacterium pennavorans</i> Kaplıca
<i>Microbispora aerate</i> Antartik Toprak
<b>Gram-negatif Bakteri İzolatları</b>
<i>Vibrio sp.</i> Tavuk mezbaha toprağı
<i>Lysobacter sp.</i> Koleksiyon kültürü
<i>Chryseo bacterium sp.</i> Dekompozit tüyler

### 2.2.2. Keratinazların biyokimyası

Mikrobiyal keratinazların özellikleri mikroorganizmaya bağlı olarak çeşitlilik gösterir. Mikrobiyal keratinazlar çoğunlukla hücre dışıdır fakat nadir de olsa hücreye bağımlı ve hücre içi enzimler tanımlanmıştır [28]. Mikrobiyal keratinazlar, optimum pH 7,5–9,0 arasında olan alkalen veya nötral proteazlardır. Fakat bazı enzimler bu aralığın dışında extrem alkalifilik veya asidik pH'larda optimum aktivite göstermektedir [29]. Keratinazlar geniş pH aralığında stabildir [28].

Keratinazların aktivite gösterdiği optimum sıcaklık, izolatin habitatına ve ürettiği mikroorganizmaya bağlı olarak çok değişkendir. Mezofilik *Streptomyces pactum* DSM 40530'un optimum aktivitesi 40°C'de, Alkalifilik *Bacillus* sp. B189'un optimum aktivitesi 85 °C'de saptanmıştır [13]. *F. islandicum* AW-1'den elde edilen enzimin optimum aktivitesi 100°C'de gözlenmiştir [30].

Keratinazların molekül ağırlıkları belirlendiğinde molekül ağırlıklarının 18-240 kDa aralığında değişkenlik göstermesine rağmen çoğu keratinaz 50 kDa'dan daha küçüktür. Yüksek molekül ağırlığına sahip keratinazlar genellikle metalloproteaz veya termofilik organizmalardan elde edilen keratinazlardır [13].

Enzimler üzerine metal iyonlarının ve inhibitörlerin etkileri incelendiğinde farklı sonuçlara ulaşılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  gibi divalent metal iyonları varlığı keratinolitik proteaz aktivitesini genellikle uyarıcı etki göstermektedir. Bu etki enzim yapısının korunması ve enzim-substrat kompleksinin stabilizasyonu ile ilgilidir [28,31,33]. Metal iyonları, termal denatürasyona karşı enzimi koruyabilmektedir. Keratinazlarda genellikle kalsiyum termostabiliteyi arttırırken buna karşılık  $Cu^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$ , ve  $Pb^{2+}$  gibi ağır metaller genellikle keratinolitik enzimlerin inhibisyonuna neden olurlar [13].

Organik çözücüler, deterjanlar ve indirgeyici ajanlar keratinazlar üzerinde çeşitli etkilere sahiptir. Fakat araştırmalarda, indirgeyici ajanların keratinolitik aktiviteyi sitümüle ettiği yönündedir. Bu etki enzim üzerine direkt etki yerine keratinöz substratlarının sistin köprülerinin indirgenmesi şeklinde açıklanmaktadır [13].

### **2.2.3. Keratinazların üretimi**

Keratinazların biyoteknolojik uygulamalardaki önemi ve endüstriyel alanda kullanımının artması nedeniyle keratinolitik proteazlara ilgi ve bu enzimlerin üretimine gereksinim giderek artmaktadır. Keratinaz üretimi, keratin ile indüklenmektedir, bu nedenle mikroorganizmanın üretildiği kültür ortamına keratinöz substratları (tavuk tüyü, saç, boynuz unu vb.) eklenir. Tarımsal ve endüstriyel faaliyetler sonucu keratin yönünden zengin materyaller büyük ölçekte üretilir ve atık olarak çevreye atılırlar [13].

Çevre kirliliğinin önlenmesi ve atıklardan biyo-yararlanım amacıyla, mikroorganizmalar aracılığı ile düşük maliyetli substratlardan önemli ürünlerin elde edilmesi biyoteknolojinin en önemli konularını kapsamaktadır. Çevresel atık olarak bilinen biyolojik materyallerin hidrolizi ile çok değerli yeni ürünler insanların kullanımına sunulmaktadır [26,34- 36]. Keratinaz üretimini keratin varlığı indükleyerse de, keratinöz substratı ilavesi keratinaz üretimi için her zaman gerekli değildir. Nonkeratinöz substratların (Soya unu, soya fasulyesi yemi, yağı alınmış süt, karides kabuğu unu, jelatin, kazein ve peynir altı suyu gibi) keratinaz üretimini indükledikleri saptanmıştır [13].

Keratin içeren ortama farklı karbon ve azot kaynaklarının ilavesi keratinaz üretiminde önemli artışa neden olur. Örneğin; glukoz, sukroz, nişasta, melas, küspe gibi karbon kaynaklarının ve üre, pepton, tripton, maya özütü, amonyum klorür ve sodyum nitrat gibi azot kaynaklarının ilavesi enzim verimini arttırmaktadır [13]. Bazen, bu durumun tam tersine, ek substratların ilavesi, represyon metabolizmasını katabolize etmesi nedeniyle, (karbonhidratlar, inorganik ve/veya organik azot kaynakları) bazı mikroorganizmaların enzim üretimine negatif yönde etki eder. [37,- 39]. Keratinaz üretimi üzerine farklı substratların etkileri çok değişkenlik gösterir ve keratinaz üretimi substrata, karbon/azot konsantrasyonuna ve ortama ilave edilecek diğer bileşenlere bağlı olarak değişkenlik gösterir [40,13].

### **2.2.4. Keratin Yönünden Zengin Atıkların Islahı**

Biyolojik arıtımın gelişimi ile büyük miktarlarda ortaya çıkan söz konusu yan ürünlerin değerli ürünlere dönüşümü hakkında ciddi çalışmalar yapılmaktadır. Deri



ve tavukçuluk endüstrilerinde yan ürün olarak üretilen keratinöz ürünlerin geri dönüşümü için, keratinolitik mikroorganizmaların kullanılması önemli bir alternatiftir [26]. Keratinazın substratını hidrolize etme özelliği, keratin atıklarını yem ya da diğer değerli ürünlere biyolojik dönüşümleri için potansiyel oluşturmaktadır. Ticari tavuk işletmeleri tarafından üretilen tüylerin giderek artış göstermesi kirlilik problemi yaratmaktadır [1;37,42]. Keratin, toplam tavuk ağırlığının %10'unu, tüy ağırlığının yaklaşık %90'nını oluşturur. Bu yüzden bu sorunun çözümüne yönelik işlemler gerekmektedir [17].

Günümüzde tüy yemi üretmek için, yüksek enerji kullanımı gerektiren buhar basınçlı pişirme yöntemi kullanılmaktadır. Tüy yemleri, metiyonin, histidin ve triptofan gibi amino asit eksiklikleri nedeniyle hayvan yemlerinde belirli oranlarda kullanılır [22,23].

Keratinaz kullanımı tüy yemlerinin besinsel değerini arttırmaktadır. Keratinaz üretiminde ortamın pH'sı, tüy konsantrasyonu, inokulum miktarı ve yaşı, sıcaklık gibi parametreler enzim verimini etkilemektedir [18,26].

Günümüzde deri endüstrisi organik kirliliğin önemli bir kısmını keratin ihtiva eden proteince zengin atıklardan oluşturmaktadır. Proteince zengin atıkların geri dönüşümü için biyoteknolojik seçenekler aranmakta ve bunları uygulamaya çalışılmaktadır [43].

Deri endüstrisi atıklarını hidroliz etme yeteneklerinden dolayı *Streptomyces* ve *Bacillus* mikroorganizmaları kullanılmaktadır [26].

Hayvan yemciliğinde ucuz ve alternatif protein kaynağı olmasından dolayı tüylerin geri dönüşümü önemli bir alandır. Keratinin, sindirilebilirliği ve tüy proteinlerinin amino asit dengesi mikrobiyal fermentasyonla sağlanabilmektedir [44,25].

## 2.2.5 Keratinazların potansiyel uygulama alanları

Tablo 2.2. Keratinazların uygulama alanları [26]

Keratinazlar	Uygulama Alanları
1	İlaç geliştirme
2	Yem hidrolizatları
3	Gübre
4	Deri
5	Deterjan

### 2.2.5.1 Yem kaynağı olarak keratinaz kullanımı

Nüfus artışıyla birlikte gıda gereksinimleri her geçen gün artmaktadır. Protein içeriği açısından yüksek olan keratin bu taleplerin karşılanması için iyi bir alternatiftir [18].

Keratin hidrolizatları hayvan endüstrisinin yan ürünlerinden elde edilir ve temel tüketim malzemesi olarak ucuz ve alternatif protein kaynağı özelliğine sahip olması nedeniyle keratinöz atıkların yeniden dönüştürülmesi için önemli çalışmalar yapılmaktadır [45].

Keratin atıkların sindirilebilirliği zor olmasına rağmen mikrobiyal fermentasyon ile hidrolizin artırılması ve oluşan karışımın protein kaynağı olarak kullanılması mümkündür [46,47].

Atık tüyler hayvan besini için alternatif bir protein özelliği gösterir [18]. Ancak, yaygın bilinen proteazlar keratini parçalayamazlar. Fakat keratinolitik proteaz salgılayan mikroorganizmalar keratini protein hidrolizatlarına ayrıştırılabilirler [48].

İlk ticari keratinolitik proteaz Shih ve çalışma arkadaşları tarafından BRI (Kuzey Karolina)'da geliştirilen *Versazim Bacillus licheniformis* PWD1'dir ve keratinöz atıkların ekonomik değere dönüştürülmesini sağladığı bildirilmiştir [13].

### 2.2.5.2 Deriden kıl/yün uzaklaştırmada keratinaz uygulaması

Endüstriyel işlemlerin çoğu kimyasal kullanımları nedeniyle çevresel tahribata yol açmaktadır. Deri ve kümes hayvancılığı endüstrisinden atık olarak ortaya çıkan tüylerin giderek artması önemli bir çevre sorunudur. Kirlilik sorununun

giderilmesinde tüyleri hidrolize edilerek protein kaynağı şeklinde kullanılması yönünde görüşler sunulmaktadır [17].

Deri endüstrisi tüylerin giderilmesi için her aşamada çeşitli kimyasallar (derilerdeki saç ve kılların giderilmesi klasik olarak kireç, sodyum sülfid, vb.) kullanır. İşletmelerin kullandıkları kimyasallar sebebiyle oluşan atıklar çevreyi kirletir ve kullanılan bu kimyasallar deri endüstrisinin atıklarının %80-90'ını oluşturur [43]. Bu sebeple deri endüstrisi, kullanılan kimyasalların çevre üzerindeki olumsuz etkisini indirmek için enzim kullanımını tercih etmeye başlamıştır [49]. Deri endüstrisinde saç/kıl giderme işleminde gerekli olan sodyum sülfid yerine *Bacillus subtilis* S14 tarafından üretilen enzim onun yerini alabilecek potansiyeline sahiptir [50].

Deri işletmeleri çevresel tahribatı önlemek için kimyasal yerine mikrobiyal enzim kullanımına yönelmektedirler. Keratinolitik proteazların kollajenolitik ve elastolitik aktiviteleri olmadığı için selektif olarak foliküldeki keratin dokusunu hedef alırlar. Bu nedenle kıl/yün giderme işlemlerinde özellikle tercih edilirler ve derinin elastikiyetinde bozulma olmadan kıl/yün gibi yapıların tamamen temizlenmesini sağlarlar [50].

*B. subtilis* S14 suşunun kollajen üzerinde herhangi bir etkisi olmayan keratinolitik bir proteaz (KerS14) ürettiği ve bu enzimin deriden kıl/yün uzaklaştırma işlemleri için uygun özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir [50].

### **2.2.5.3. Keratinazların deterjan uygulamaları**

İlk kez 1960'lı yıllarda deterjan endüstrisine bakteriyel alkalın proteazlar girdiğinde alkalın proteazların ekonomik önemi bilinmeye başlanmıştır [51]. Gelişen ülkelerde deterjan formülasyonlarında enzimlerin kullanılması oldukça yaygındır. Günümüzde deterjan formülasyonunun yarısından fazlasında enzimler kullanılmaktadır [52].

Deterjan formülasyonunda keratinolitik proteazlarla ilgili literatürlerde fazla bilgi olmasa da keratinolitik proteazların deterjanların formülasyonlarında kullanıldığı doğrulanmıştır [28].

Keratinolitik proteazlar saç benzeri katı substratları hidrolize etme yeteneklerine sahiptirler. [13]. Keratinolitik proteazlar kirli çamaşırlarda gömleklerin yakaları gibi sıklıkla karşılaşılan keratinöz kirliliklerinin giderilmesine yardımcı olurlar [53].

İdeal deterjan proteazı kan, gıda ve diğer vücut salgılarının sebep olduğu lekelerin çoğunu gidermeye yardım edecek geniş substrat spesifitesine sahip, yüksek pH ve sıcaklıklarda aktif ve stabil olması, diğer şelatlayıcı ve okside edici ajanlarla birlikte uyumu, yüksek izoelektrik noktaları (pI) ve yüksek pH aralığına dayanmak gibi parametreler önemli ön koşullar arasındadır [54].

#### **2.2.5.4. Keratinaz enziminde gümüş geri kazanımı**

Gümüş görüntüleme endüstrisinde çokça kullanılan pahalı metallere dendir. X-ray veya fotoğraf filmleri gibi atıklar jelatininde gümüş içermesinden dolayı gümüşün geri kazanılması için çok iyi bir kaynaktır. Dünyadaki gümüş için talebin artmasıyla birlikte kaynak olarak X-ray veya fotoğraf filmleri kullanımını üzerine odaklanılmıştır [55].

Keratinolitik proteazlar proteazların alt sınıfında bulunur. X-ray filmleri üzerindeki protein, çözülmeyen ve bilinen proteazlarla parçalanmayan kollajenin bir türevidir. Fakat keratinolitik proteazlar bilinen pek çok proteazın aksine X-ray filmlerindeki jelatini parçalama yeteneğine sahiptirler, bu yüzden gümüşü geri kazanma işleminde kullanılmaktadırlar. Kullanılmış X-ray/fotoğraf film atıklarından gümüşü geri kazanmak için literatürde birçok araştırma mevcuttur [56].

#### **2.2.5.5. Keratinazların diğer potansiyel uygulamaları**

Keratinazlar; ilaç, biyo-parçalanabilir filmler, yapışkanların üretilmesi, keratin fiberlerden biyopolimerlerin geliştirilmesi, saç bakım ürünleri ve tırnak sertleştirme ürünlerini içeren kozmetik ürünlerinde kullanılmaktadırlar [19,57].

Keratinolitik proteazlar azot gübreleri üretmek için ve endüstriyel atık sulardaki kalsiyum, magnezyum, demir ve manganez gibi bazı kirletici metallere eliminasyonunda kullanılır. Yangın söndürmede kullanılan koloidinin üretiminde keratin kullanılmaktadır. Yangın söndürücüler, boynuz ve toynakların hidrolizinden türetilen organik bir koloidin çözeltisinden hazırlanır. Keratin materyallerinin hidrolizatları beton ve seramik yapımında katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır

[57-59]. Keratinöz materyallerin oksidasyonu ile disülfid bağlarının bazıları kırılır ve okside olur, sonuçta suda çözülebilir peptidler oluşur. Oluşan bu materyal yaraların iyileştirilmesinde kullanılır [60].

Keratinolitik enzimlerle ilişkili diğer umut verici uygulamalar ise bazı dokularda ilaç iletimini geliştirmek için kullanılmasıdır. Tırnak hastalıklarının terapisinin etkinliği tırnak tabakasının ilaca karşı çok düşük geçirgen özelliğe olmasından dolayı sınırlıdır [61].

### **2.2.6. *Bacillus* cinsi**

*Bacillus* cinsi bakteriler çubuk şeklinde düz ya da düze yakın hücrelerdir. Birçoğu kötü şartlara karşı dirençlidir. Aerobik ve fakültatif anaeroblar endospor oluştururlar. Vejetatif hücrelerin çapları 0.5x1.2 µm ile 2.5x10 µm'dir. Genellikle beyaz ve krem renkte kolonilere sahiptir fakat nadir de olsa bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah pigmentli kolonilere de rastlanır.

Ekstrem sıcaklık derecelerinde bile canlı kalabilen *Bacillus* cinsi bakterilerin termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunur. Genellikle pH 7 civarında, 35-37°C arasında üreme gösterirler. Tüm türleri Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besi yeri ortamlarında ürerler. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren, nitrojen kaynağı olarak ise amonyum içeren yapay ortamlarda çok iyi gelişirler. En yaygın habitatları toprak olmasına karşı doğada geniş olarak, süt ve süt ürünlerinden, hava, su ve yiyecek gibi çok çeşitli ortamlardan izole edilir.

*Bacillus* türü bakteriler kolay ve hızlı üretilebilmeleri ve endüstriyel öneme sahip olmaları sebebiyle önemli mikroorganizmalardır.

Biyoteknolojik çalışmalarda *Bacillus*'lar ürettikleri proteinler sebebiyle büyük ticari öneme sahiptirler. Endüstriyel amaçlı ürettiği enzimlerden amilaz ve selülozlar deterjan sanayisinde; nötral enzimler süt sanayisinde, diğer amilaz ve pilunazlar ise bira ve meyve suyu sanayisinde kullanılmaktadır [62].

### 3. İMMOBİLİZASYON

Endüstrinin her alanında elde edilen ürünün yüksek verimde, üretimin ise daha kısa sürede, daha büyük ölçekte ve düşük maliyette gerçekleşmesi en önemli amaçlar arasındadır. Bu sebeple endüstrilerin çoğu yenilikçi olan sistemlere karşı daha ılımlı yaklaşmaktadırlar ve bu alana yatırım yapılmaktadır [62].

İmmobilizasyon kelime anlamı olarak; biyolojik aktif katalizörün bir reaktör veya analitik sistem içinde tutuklanmasını ifade eden bir terimdir. Biyokatalizör canlı hücre, enzim ya da enzim karışımı olabilir fakat ne olursa olsun taşıyıcı materyal üzerine ya da içine tutuklanmıştır. İmmobilizasyon özel bir modül üzerinde çözünür olmayan bir kompleks oluşturarak akışkanın kolayca geçmesini sağlar. Bir başka deyişle, immobilizasyon, heterojen kataliz prensiplerinin biyolojik sistemlere uygulanmasıdır. Son otuz yıldan beri enzimlerin immobilizasyonu, daha yakın yıllardan beri de hücrelerin immobilizasyonu teorik ve pratik önem kazanmıştır. [63].

İmmobilize enzim “enzimin kinetik aktivitesini kaybetmeden belli bir bölgeye fiziksel olarak yerleştirilmesi veya hapsedilmesi” olarak adlandırılır [63]. İmmobilizasyon terimi sadece enzimlere değil hücresel organeller, mikrobiyal hücreler, bitki ve hayvan hücreleri gibi tüm biyokatalizör tipleri için de uygundur [64].

Sadece enzimleri değil hücresel organelleri, mikrobiyal, bitkisel ve hayvansal hücreleri de içeren biyokatalizörler kullanılarak tasarlanan, enerji ve kaynak tasarrufu sağlayan ve düşük kirlilik üreten işlemler, çok az yan ürün çıkışı, düşük sıcaklık ve çevresel basınç koşulları ile avantaj sağlamaktadır. Buna karşılık, biyokatalizörler genel olarak katalitik reaksiyonlar için koşullar uygun olsa bile yüksek sıcaklık, düşük veya yüksek pH ve organik çözümlerin varlığında kolaylıkla inaktive olabilirler. Biyokatalizör serbest halde kullanılıyor ise atık reaksiyon karışımından biyokatalizörün geri kazanımı da bir başka problemdir. İmmobilizasyon bu problemlerin üstesinden gelebilecek tek yoldur. Genel olarak immobilize biyokatalizörler kararlıdır ve kesikli tip reaksiyonlarda tekrarlı olarak ya da akışkan sistemlerde sürekli olarak kullanılabilir [64].

İmmobilize biyokatalizörlerin uygulaması için, biyokatalizörün istenilen aktiviteye ve karakteristiğe sahip olduğunu bilmek çok önemlidir. Ek olarak, uygun taşıyıcının ve immobilizasyon tekniğinin seçimi de önemlidir. Taşıyıcı ve immobilizasyon tekniği immobilize edilecek biyokatalizöre uygun olmalıdır. Bu nedenle, tüm biyokatalizör tiplerine uygun genel ideal bir immobilizasyon metodu yoktur. İdeal bir taşıyıcı, biyokatalizör immobilizasyonu için yeterli fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır. Taşıyıcı ayrıca, mekanik güce, fiziksel, kimyasal ve biyolojik kararlılığa ve düşük toksisiteye sahip olmalıdır. Ek olarak, çeşitli tipteki reaktörlere immobilize biyokatalizörlerin uygulanabilmesi için taşıyıcıya farklı şekiller verilebilmesi gerekebilir. Son olarak, ekonomik uygunluğu göz önünde tutulmalıdır [64].

İmmobilizasyon işlemi, ekonomik açıdan oldukça avantajlı bir sistemdir. Verimin artması, enzim aktivitesinin korunması, sürecin kontrol edilebilmesi ve düşük maliyetli olması sistemin en temel avantajlarıdır [62].

### **3.1. İmmobilizasyon Avantajları**

Pek çok biyolojik işlemin yapılabilmesi için biyokatalizörler kullanılır. Biyokatalizörlerin elde edilmesi yüksek maliyet gerektiren bir işlemdir, dolayısıyla bu moleküllerin geri kazanımı ve kararlılığı oldukça önem kazanmaktadır.

Bu amaçla, biyokatalizörlerin tekrar kullanımı oldukça önemlidir. İmmobilize hücrelerin serbest hücrelere göre avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

İmmobilizasyon işlemi kullanılan biyokatalizörün aktivitesini ve kararlılığını artırır. Kullanılan destek materyali pH, sıcaklık ve çözgen etkilere karşı koruyucu etki gösterir.

- Birim biyoreaktör hacmi başına daha yüksek hücre yoğunlukları, yüksek hacimsel üretkenliğe, daha kısa fermantasyon sürelerine ve üretken olmayan hücre büyüme fazlarının ortadan kaldırılmasına yol açar.
- İmmobilizasyon substrat alımını arttırarak yüksek verimde işlemlerin gerçekleşmesini sağlar.
- İşlemlerin tekrarlanabilmesine olanak sağlar.
- Yüksek substrat konsantrasyonuna ve azaltılmış son ürün inhibisyonuna karşı artan tolerans gösterir.

- İmmobilizasyon düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilip buna rağmen kaliteli ürün alınabilir.
- İmmobilizasyon işleminde ayırma ve filtrasyon işlemlerine gereksinim duyulmadığı için ekipman ve enerji giderleri yoktur bu da maliyetini düşürür.
- Biyokatalizörün kesikli operasyonlarda biyoreaktörden çıkarılmadan uzun periyotlarda kullanılmasını sağlar.
- Fermentasyon aktivitesi ve yüksek hücre yoğunluğundan kaynaklı mikrobiyal kontaminasyon riskinin azalmasını sağlar.
- Basitleştirilmiş işlem düzenlemeleri ile küçük biyoreaktörlerin kullanılabilmesi sonucu düşük maliyet bazı ürünlerin olgunlaşma sürelerinin kısılmasını sağlar [66].

İmmobilizasyon sistemi, süreç kısıtlamalarını aşmayı, biyokatalizörlerin tekrar kullanılmasını, stabilitenin artmasını, istenmeyen ayırma ve saflaştırma adımlarının önlenmesini sağlayarak daha verimli bir şekilde istenen ürünlerin üretilmesine olanak sağlar [62].

### **3.2. Destek Materyalleri**

Başarılı bir immobilizasyon işlemi için uygun biyokatalizörler, uygun destek materyalleri ve tekniğin seçilmesi önemlidir. Bir taşıyıcının hücre immobilizasyonuna uygun olabilmesi için aşağıdaki ön koşulları karşılaması gerekmektedir [66].

1. Taşıyıcı, hücrelerin bağlanacağı fonksiyonel gruplar ile büyük bir yüzeye sahip olmalıdır.
2. Taşıyıcının taşınması ve yeniden üretilmesi kolay olmalıdır.
3. Hareketsizleştirilmiş biyokatalizörün hücre canlılığı ve operasyonel stabilitesi yüksek olmalı ve daha uzun süre tutulmalıdır.
4. Hareketsizleştirilmiş hücrelerin biyolojik aktivitesi, immobilizasyon işleminden olumsuz etkilenmemelidir.
5. Desteğin gözenekliliği, substratlar, ürünler, kofaktörler ve gazların serbest değişimini sağlayan, düzgün ve kontrol edilebilir olmalıdır.



6. Taşıyıcı, mekanik, kimyasal, termal ve biyolojik olarak stabil olmalı, yeniden üretilebilmeli ve enzimler çözücüler, basınç değişimleri ile kolayca ayrılmamalıdır.

7. Taşıyıcı ve immobilizasyon tekniği kolay, uygun maliyetli ve ölçeklendirmeye uygun olmalıdır.

8. Taşıyıcı, gıda kalitesi saflığında olmalı, kalan kalıntılar ile ürün kalitesini etkilememeli ve tüketiciler tarafından kabul edilebilmelidir.

Endüstriyel uygulamalar için çok çeşitli destek materyalleri vardır. Üretime bağlı olarak, destek materyalinde maliyet, ürün özgüllüğü, biyouyumluluğu ve kullanılabilirlik gibi parametreler dikkate alınmalıdır [67].

### **3.2.1. Kollajen**

Kollajenler doğada kemik veya kıkırdak gibi dokulardan temin edilebilen kolay ulaşılabilen ve dokuları birleştirme yetenekleriyle tercih edilen bir materyaldir. Dokuları birleştirebilme özelliği, immünolojik kullanım için önemlidir. [68].

### **3.2.2. Kitosan**

Kitosan, kitinin deasetilasyonu ile elde edilir. Kitosan; mantar, böcek, kabukluların kabukları ve yumuşakçalarda bol miktarda bulunur. İlaç, gıda gibi biyoteknolojik alanda kullanım alanları vardır [68].

### **3.2.3. Agar-Agaroz**

Agarın saflaştırılmasıyla oluşmuş yapı agaroz olarak adlandırılır. Bu jel soğukta katı forma girer. Jelin ani katılaşması için soğuk tampon içerisine damlatma işlemi yapılır [68].

### **3.2.4. Poliakrilamid ve polianhidritler**

Poliakrilamidler; farklı boyut ve şekillerde olan, moleküllerin ayrılması için kullanılan sentetik polimerlerdir [68]. Poliakrilamid, metal iyonlarının geri kazanılması ( $Au^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  gibi) ve bağlanması amacıyla kullanılırlar.

Polianhidritler, yüksek dayanıklılıkları sebebiyle hücre immobilizasyonu için kullanılır [68].

### **3.2.5. Vermikulit**

Vermikulit görünüşte mikaya benzeyen katmanlı yapıya sahip filossilikat grubu bir mineraldir [16]. Hindistan'da bol bulunan vermikulit iyon değiştirme ve absorpsiyon kapasitelerinin yüksek olması, geniş yüzey alanı ve düşük maliyeti sebebiyle enzimin mobilizasyonunda kullanılan inorganik taşıyıcılardan biridir [69].

### **3.2.6. Aljinat**

Aljinatın varlığını ilk olarak 1881 yılında İngiliz kimyager E.C.C. Stanford tanımlamış aynı zamanda aljinatın kahverengi alglerde en fazla bulunan polisakkarit olduğunu bulmuştur. 1964 yılında Linker ve Jones tarafından mikrobiyal aljinat keşfedilmiştir. Medikal kullanımı nedeniyle mikrobiyal aljinata ilgi artmıştır. Bu polimerin farmasotik uygulamalarda hızla gelişmesi ve son yıllarda keşfedilen eşsiz immünolojik özellikleri nedeniyle aljinat optimize üretim yöntemleri endüstriyel biyokimyacılar tarafından geliştirilmesine neden olmuştur [70].

Aljinat; kalınlaştırma, stabilizatör, süspanse edici, film oluşturucu, jel yapıcı ve emülsiyon stabilize edici gibi özellikleri içeren, eşsiz kolloidal özelliklerinden dolayı potansiyel biyopolimer film ve kaplayıcı ajan olarak ilgi çekmektedir [70]. Ilımlı koşullarda jelleşen, toksik olmayan ve kolay elde edilebilen bir jeldir [71]. Aljinat yiyecek ve meşrubat endüstrisinde kalınlaştırıcı ve jelleştirici ajan ve kolloidal stabilizatör olarak kullanılmaktadır. Ayrıca aljinat memeli ve mikrobiyal orijinli hücreleri ve enzimleri içeren çeşitli biyolojik materyallerin tutuklanmasında kullanılır [72].

Aljinatın hücre ve protein tutuklamada veya salınımında matriks olarak kullanım alanı bulabilecek özellikleri vardır;

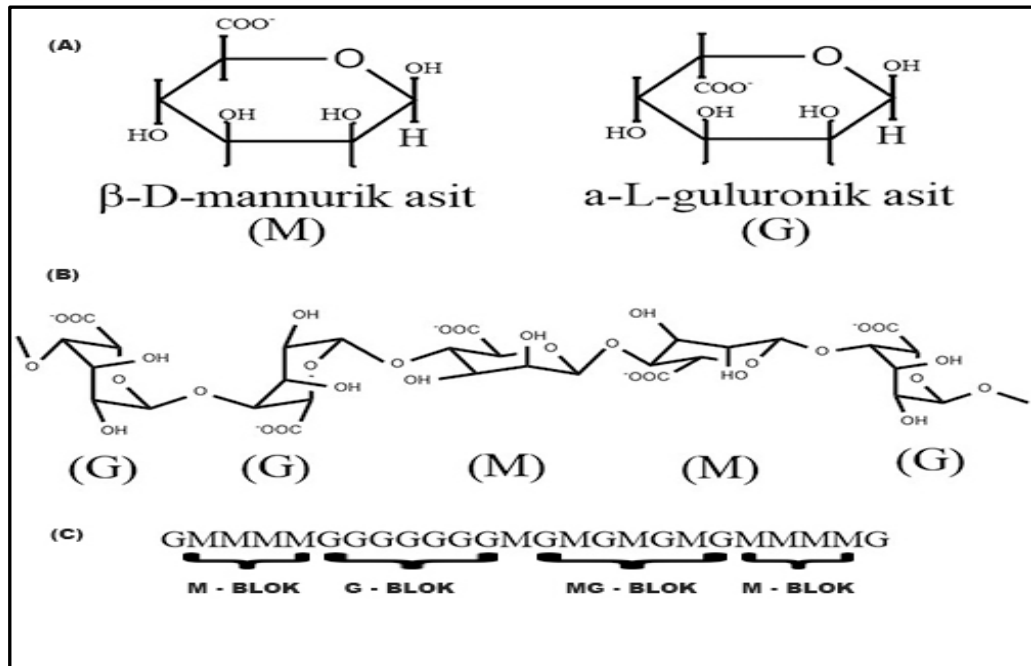
- a) Matriks içerisinde inert sulu ortam,
- b) Organik çözümlerin kullanılmadığı ılımlı şartlarda gerçekleşen enkapsülasyon işlemi,
- c) Makromoleküllerin yüksek hızda difüzyonuna izin veren büyük jel gözenekliliği,

- d) Gözenekliliğin basit kaplama işlemleri ile kontrol edilebilirliği,  
e) Sistemin normal fizyolojik koşullarda kolaylıkla ayrışması ve biyobozunabilmesidir [73].

Aljinat, seyreltik alkali ortamda çeşitli alg türlerinden sentezlenen hidrofilik koloidal bir karbonhidrattır. Kahverengi alglerdeki aljinat mekanik kuvveti ve esnekliği sağlayan yapısal bileşendir. Aljinat deniz suyunda bulunan  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  ve  $Na^+$  gibi katyonların karışım tuzu olarak intraselüler matriste bulunur. Genellikle doğal aljinat kalsiyum ile çapraz bağlı jel oluşturur [73].

Aljinat, değişen miktarda 1,4  $\beta$ -D-mannurik asit (M) ve  $\alpha$ -L-guluronik asit (G) birimlerini içeren dallanma göstermeyen lineer bir polisakkarittir. Polimannurik asit moleküler tekrarı 10,35 Å olan şerit benzeri bir zincirdir. Poliguluronik asit ise moleküler tekrarı 8,7 Å olan çubuk benzeri bir zincirdir [74,75].

MG bloklarının sıklığı, frekansı ve uzunluğu aljinatın izole edildiği doku ve organizmaya bağlı olarak değişir. Aljinat polimer üzerinde tekrar eden birimlere sahip değildir [73].



Şekil 3.1. Aljinat polimerinin yapısı. (A) Aljinat monomerleri (M ve G), (B) Aljinat polimeri, (C) aljinat polimeri zincir dizisi

Aljinat küreler, sodyum aljinat çözeltisinin  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  veya  $Ba^{2+}$  gibi iki değerlikli çapraz bağlacı içerisine damlatılması ile oluşur.  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  gibi iki değerlikli katyonlar da aljinat jellerini çapraz bağlayabilir, fakat katyonların toksik oluşları uygulamada sınırlamalar getirmektedir. Jelleşme ve çapraz bağlama guluronik asit üzerindeki sodyum iyonu ile iki değerlikli katyonun yer değiştirmesi karakteristik yumurta kutusu yapısı oluşturmak üzere guluronik asit gruplarının yığılması suretiyle olur Aljinat jelin kuvveti, zincir arasında meydana gelen çapraz bağ sayısına, çapraz bağlayıcı iyonun türüne ve bağlanan blokların uzunluğuna bağlıdır [76].

### 3.3. İmmobilizasyon Teknikleri

Biyokatalizörlerin immobilizasyonunda en önemli unsur, istenilen aktiviteyi ve karakteristikleri gösterebilmeleridir.

İmmobilizasyon işleminin iyi yapılabilmesi için, enzime uygun bir taşıyıcının ve uygun immobilizasyon yönteminin seçilmesi gereklidir. Seçilen immobilizasyon yöntemleri kendi içinde avantajlara-dezavantajlara sahip oldukları için taşıyıcı ve yöntem seçimi, amaca ile enzimin ve reaksiyonun türüne bakılarak yapılır [62].

Enzimlerin immobilizasyon yöntemleri aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır:

- Taşıyıcıya bağlama metodu
  - a) Kovalent bağlanma metodu
  - b) İyonik bağlanma metodu
  - c) Fiziksel adsorpsiyon metodu
  - d) Biyospesifik bağlanma metodu
- Çapraz bağlama metodu
- Tutuklama metodu

#### 3.3.1. Taşıyıcıya bağlama Metodu

Taşıyıcıya bağlama metodu, biyokatalizörün suda çözünmeyen bir taşıyıcıya kovalent, iyonik, fiziksel veya biyospesifik etkileşimler ile bağlanması temeline dayanan bir metottür. Suda çözünmeyen polisakkaritler (örn. selüloz, aljinat ve agaroz türevleri), proteinler (örn. jelatin ve albumin), sentetik polimerler (örn.

polistiren türevleri, iyon değişim reçineleri ve poliüretan) ve inorganik materyaller (örn. tuğla, kum, cam, seramik ve magnetit) gibi çeşitli çözünmeyen materyaller, doğrudan veya özel modifikasyon veya aktivasyon sonrası destek materyaline taşıyıcı bağlama metodu ile bağlanabilir [64].

### **3.3.1.1. Kovalent bağlama metodu**

Enzim immobilizasyonu için en sık tercih edilen tekniklerden biri kovalent bağlama metodudur, fakat kovalent bağlayıcı ajanların toksik oluşu ve uygun immobilizasyon koşullarının bulunmasının zorluğundan dolayı hücreler için kullanımı sınırlıdır [78].

Kovalent bağlanma metodunda çok sayıda taşıyıcı kullanmak mümkündür. İmmobilizasyon işlemi için uygun taşıyıcı seçilirken kullanılacak enzimin özellikleriyle beraber taşıyıcının sağladığı avantajlar ve dezavantajlar da göz önünde bulundurulmalıdır [79].

Kovalent bağlama yönteminin avantajları;

- Bağlanma işlemi kovalent olarak gerçekleştiği için enzim taşıyıcıdan herhangi bir sızma ya da ayrılma göstermez.
- Enzimin taşıyıcı yüzeyinde olması substrat ile temasını kolaylaştırır.
- Enzim ve taşıyıcı arasındaki etkileşim enzimin kararlılığını da genellikle artırır.

Kovalent bağlama yönteminin dezavantajları;

- Enzimin toksik ajanlara ya da zorlu reaksiyon şartlarına maruz kalmasıyla ürün veriminde düşüşün olması.
- İmmobilizasyon için uygun koşulların zor bulunması.
- Taşıyıcıların genellikle yenilenebilir olmaması [80].

### **3.3.1.2. İyonik bağlanma metodu**

Katalazın iyon değiştirici selüloza bağlanma yeteneğinin bulunmasından itibaren, iyonik bağlama metodu birçok biyokatalizörün immobilizasyonunda kullanılmaktadır [81]. Prosedür çok basit olup, taşıyıcının yenilenmesi ve

biyokatalizörün taşıyıcıdan geri kazanımı çok kolaydır, immobilizasyon koşulları, yumuşaktır. İmmobilize enzimlerin ilk endüstriyel uygulaması L-amino asit üretimi için DEAE-selüloz üzerine aminoasitlerin immobilizasyonu ile gerçekleştirilmiştir [65]. İyonik bağlamada, biyokatalizörün taşıyıcıya bağlanması kullanılan tampon, pH, iyonik şiddet ve sıcaklıktan etkilenir. Taşıyıcının yenilenmesinin ve biyokatalizörün geri kazanımının kolay olmasının yanında biyokatalizör, taşıyıcıdan kolaylıkla ayrılabilir. Geniş çeşitlilikteki iyon değişim reçinelerine ilaveten iyon değişim grubuna sahip polisakkaritler de bu amaç için kullanılabilir.

Bu yöntemde taşıyıcının yenilenebilir olması, enzimin geri kazanımının kolay olması ve taşıyıcıdan kolaylıkla ayrılması en büyük avantajlardır [80].

### **3.3.1.3. Fiziksel adsorpsiyon metodu**

Fiziksel adsorpsiyon metodu enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir [94]. Adsorpsiyonun asıl amacı enzim immobilizasyonu olmayıp enzim saflaştırmaktır. Fakat suda çözünmeyen taşıyıcılarda adsorpsiyon yönteminin enzim immobilizasyonda oldukça sık kullanıldığı görülmektedir [82].

Fiziksel adsorpsiyon metodu taşıyıcı ve biyokatalizör arasındaki hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri gibi ilişkilerin tek tek veya birlikte neden oldukları fiziksel etkileşimlere dayanır.

Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan taşıyıcılar; aktif karbon, gözenekli cam, kalsiyum karbonat, kül, silika jel, bentonit, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfatır [83].

Bu tür adsorpsiyonun avantajları; basit bir immobilizasyon işlemi, farklı taşıyıcıları seçebilme olanağı, aktivasyon basamaklarının az olması, bağlanmanın fiziksel kuvvetlerle gerçekleşmesinden dolayı konformasyonel yapıda büyük değişikliklerin olmaması şeklinde sıralanabilir.

Fiziksel adsorpsiyon yönteminin bazı dezavantajları da vardır; enzimin taşıyıcıya zayıf bağlarla bağlanmasından dolayı sıcaklık, pH ve iyonik şiddetteki değişimler enzimin taşıyıcıdan sızmasına ve ürün kontaminasyonuna sebep olur. Uygun

immobilizasyon şartlarının belirlenmesinin zor olması da bu dezavantajlar arasındadır [84].

#### **3.3.1.4. Biyospesifik bağlanma metodu**

Protein moleküllerinin metal iyonlarıyla kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanmasına dayanan bir yöntemdir. DNA moleküllerinin metal kompleksleriyle etkileşim içinde olması son dönemlerde oldukça dikkat çekmektedir. Bağlanma işlemi, metalin boyutuna ve stereo kimyasal yapısına bağlıdır [85].

#### **3.3.2. Çapraz bağlama metodu**

Bu metot, küçük moleküllü bi- ve multi- fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlar. Çapraz bağlama derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH ve immobilize edilecek enzime doğrudan bağlıdır.

Enzim molekülleri arasında, moleküller arası çapraz bağların meydana gelmesiyle gerçekleşen bu teknikte yaygın kullanılan çapraz bağlama reaktifi gluteraldehittir. Gluteraldehit, ekonomiktir ve büyük miktarlarda kolaylıkla elde edilebilir [86].

En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; gluteraldehit, klorformat, karbonildiimidazol, heterosiklikhalojenürler, bioksiranlar, divinilsülfoler, p-benzokinon, geçiş metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir. Bu metot ile immobilize edilmiş biyokatalizörün aktivitesinde genellikle düşüş gözlenir [83].

Çapraz bağlı immobilize enzimler aşağıdaki gibi tanımlanabilir:

- CLE: Çapraz bağlı çözünmüş enzim
- CLEC: Çapraz bağlı enzim kristali
- CSDE: Çapraz bağlı püskürtülerek kurutulmuş enzim
- CLEA: Çapraz bağlı enzim agregatları olmak üzere dört farklı şekilde hazırlanabilmektedir

CLEA: Enzim immobilizasyonu için çapraz bağlayıcı enzim agregatları, ilgi çekici bir biyokatalizör modelidir. Bu teknikte taşıyıcının bulunmaması ve buna bağlı

olarak taşıyıcı maliyeti ve taşıyıcı dezavantajının da olmaması potansiyel fayda sağlamaktadır. Bunlara ilaveten, CLEA'ların geri kazanımı oldukça kolaydır ve denatürasyona karşı dayanıklıdır.

CLEA'nın avantajları:

- Enzim immobilizasyonunun tek basamakta gerçekleştirilmesi,
- Enzim immobilizasyonu için yeni ve etkili bir yöntem olması,
- Herhangi bir destek kullanılmamasından dolayı enzim aktivitesinde seyrelme olmaması,
- Kararlılığı yüksek ve düşük maliyete sahip olması,
- Endüstriyel uygulamalarda zamandan ve maliyetten kazanç sağlamasıdır.

CLEA'nın dezavantajları:

- Çöken enzimlerin partikül boyutlarının kontrolünün kolay olmaması,
- Yüksek aktivite gösterecek immobilize enzim elde etmek için moleküller arası çapraz bağlama reaksiyonunun kontrol edilmesi zordur [87].

### 3.3.3. Tutuklama

Tutuklama, biyokatalizörü belirlenen yerde durmaya zorlamaktır. Biyokatalizör bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik, biyokatalizörün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır [64].

Polimerizasyon ve çapraz bağlamanın olduğu ortamda biyokatalizöründe bulunması halinde çapraz bağlama sonucu oluşan kafeslerde tutuklanmaktadır. Çapraz bağ yüzdesi öyle iyi ayarlanmalıdır ki, biyokatalizör tutuklanabilmeli fakat substrat moleküllerinin biyokatalizöre ulaşmasına engel olmamalıdır. Bu yöntemle immobilize edilen enzimin asıl özelliklerinde değişim gözlenmez ancak taşıyıcının



tipi ve enzimatik reaksiyonlar bölgesel mikroçevre etkilerinin oluşmasına neden olmaktadır [83].

Mikrokapsül tipi immobilizasyon, biyokatalizörün yarı geçirgen sentetik polimerin mikrokapsülleri içine tutuklanmasını içerir [64]. Mikrokapsüllerin büyüklükleri 1-100 mikron arasındadır. Immobilizasyonda kullanılacak olan yarı geçirgen membranın gözenek çapları, substrat moleküllerinin kapsül içerisine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına izin verecek büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülü ne kadar küçükse, bu yöntem kullanılarak immobilize edilmiş biyokatalizörün verimliliği o denli yüksek olur [83].

Enzim için mikro ortam oluşturmak gerekir ve ideal mikro ortam optimum pH ya da polariteyi içerir. Aljinat, karragenon, kollajen, poliakrilamid, jelatin, silikon, kauçuk, poliüretan ve polivinil alkol polimerleri matris olarak kullanılabilir. Aljinatlar toksisite etkisi olmaması ve hafif jelleşme özelliğinden dolayı en sık kullanılan polimerlerdir.

Yöntemin avantajı; kolay uygulanabilir olması, gerçek bir fiziksel yöntem oluşu, reaksiyonun çok az miktarda biyokatalizörle gerçekleşmesi. Kimyasal bağlanma olmadığından nötral ya da suda çözünmeyen taşıyıcılarında kullanımına olanak sağlar. Sadece tek bir enzim için değil çoklu enzimlerin, hücrel organellerin de immobilize edilebilmesidir [83,64].

Yöntemin dezavantajı: immobilizasyon işlemi esnasında inaktivasyonun deney koşullarına çok sıkı bağlı oluşu ve immobilize biyokatalizörün sadece küçük müküllü substratlara karşı iyi aktivite göstermesidir [83]

## **4. MALZEME ve YÖNTEM**

### **4.1. Materyal**

#### **4.1.1. Laboratuvar ekipmanları**

UV Spektrofotometre: BİO-RAD Model 2110 Fraction collector

Santrifuj: Sigma-4-16K

Çalkalamalı su banyosu: JULABO-SW-22

Çalkalamalı inkubator: New Brunswick Scientific E-24 Series

Hassas tartı: Shimadzu Corporation BL-320H

pH metre: WTW 340i

Manyetik karıştırıcı: Heidolph MR-3001

Etuv: Nüve FN 400

Vorteks karıştırıcı: Heidolph REAX TOP

Elektroforez: Bio-Rad

Otomatik pipetler: Eppendorf

#### **4.1.2. Kullanılan kimyasallar**

Yapılan çalışmada keratin substratı olarak keratin azur kullanılmıştır. Deneysel çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich Ltd. (ABD), Fluka AG (İsviçre), Riedel AG (Almanya) ve Merck AG (Almanya)'dan temin edilmiştir.

#### **4.1.3. Mikroorganizma**

Keratinaz üreticisi bakteri suşu *Bacillus vallismortis* DSM11031 ile sağlanmıştır [88]. Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda stoklanmış durumdadır.

#### **4.1.4. Kullanılan bakteri izolatları ve standart suş**

Yapılan deneysel çalışmada 2 ticari bakteri izolatu incelenmiştir. Bunlar; DSM11031 *Bacillus vallismortis* ve DSM7 *Bacillus amyloliquefaciens*'dir.

#### **4.2. Yöntem**

##### **4.2.1. Keratinaz üreticisi izolatların belirlenmesi**

Stok kültürler içerisinde en iyi keratinaz üreticisi suşun belirlenebilmesi için sıvı besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri otoklavda yüksek basınç ve sıcaklıkta steril edilmiştir. %0,5 (g/g) tavuk tüyü hazırlanıp steril edilerek besiyeri ortamına ilave edilmiştir. Besiyeri pH'sı 50 µM NaOH ile 8'e ayarlanmıştır. İzolatlar 37 °C'de 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda keratinaz aktivitesi analizi ile en yüksek keratinolitik aktiviteye sahip suş olan belirlenmiştir.

##### **4.2.2. Keratinaz enziminin üretimi**

Keratinaz enziminin üretimi için proteince zengin kültür ortamı % 0,5 tavuk tüyü (g/g), %0,5 maya ekstraktı (g/g), % 0,5 pepton (g/g), % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (g/g), % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (g/g) olarak hazırlanmıştır. 50 µM NaOH ile pH 8'e ayarlanmıştır. Keratinli sıvı kültür ortamı 37°C de 200 rpm de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda elde edilen bakteri kültürü 10.000 rpm 'de +4 °C de 20 dakika santrifüj edilerek üst sıvı keratinaz enzim (ham enzim) kaynağı olarak kullanılmıştır.

##### **4.2.2.1. Serbest keratinaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi**

Keratinaz aktivitesi, 50 mM potasyum-fosfat tamponunda hazırlanan 0,005g keratin azur ve 1000 µl enzim ile karıştırılarak 20 dakika 40°C'de inkübe edildikten sonra 10 dakika buz banyosunda soğutularak belirlenmiştir. Süre sonunda karışım süzölmüş ve süzöntünün Biorad Smart Spec 3000 ile 595 nm'deki absorbansı okunarak serbest kalan azo boyası ölçülmüştür. Tüm denemeler 3'lü tekrarlar halinde çift örnek olarak gerçekleştirilmiştir. Denklem (4.1) 'den yararlanılarak aktivite hesaplanmış ve bir ünite keratinaz aktivitesi standart koşullarda 25°C'de 1µmol substratı 1 dakikada ürüne çeviren enzim miktarı olarak tanımlanmıştır [89];

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/mL/min)} = \left( \frac{\text{OD}_{595} \times \text{Seyrelme Faktörü}}{0,01} \right) \times \text{Reaksiyon Hacmi (mL)} \quad (4.1)$$

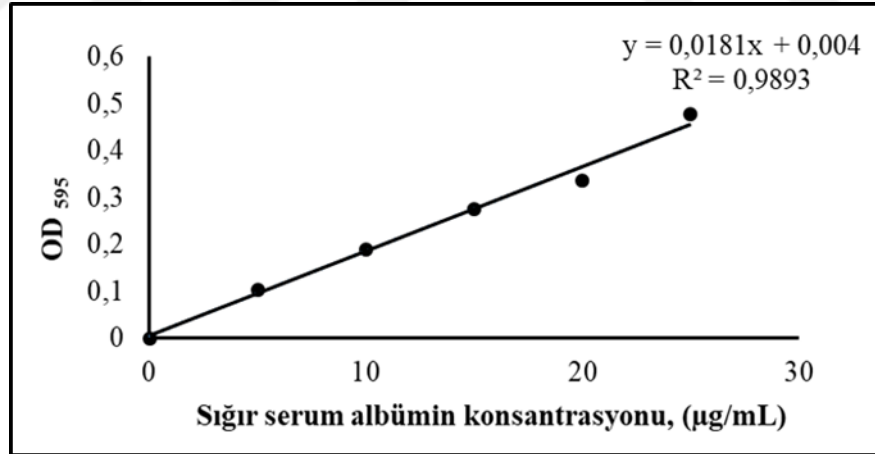
#### 4.2.2.2. Protein miktarının belirlenmesi

Enzim örneklerindeki protein miktarı (BSA) sığır serum albuminin standart protein olarak kullanıldığı, Coomassie Brilliant Blue G-250'nin proteine bağlanmasını içeren protein analiz yöntemi ile belirlenmiştir. [90].

Protein miktarını belirleyebilmek için enzim örneğinin üzerine (1 ml) Coomassie Blue G-250 boyası (1 ml) ilave edilmiştir. Kör deneme için saf su kullanılmıştır. Biorad Smart Spec 3000 ile 595 nm'deki absorbans değerleri okunmuştur. Protein miktarı Denklem (4.2)'den yararlanılarak hesaplanmıştır;

$$\text{Protein Miktarı (mg/mL)} = \frac{\text{OD}_{595}}{\text{Eğim}} \times \text{Seyrelme Faktörü} \quad (4.2)$$

Coomassie Blue G-250 Boyası (600 mg), 1L %2'lik perklorik asit içinde çözünmesi sağlanmıştır. Hazırlanan çözelti, kaba süzgeç kâğıdı ile çözünmeyen parçacıklardan arındırılmıştır ve ışık almayan ortamda, +4 °C'de uzun süre için stabildir.



Şekil 4.1. Sığır serum albümin grafiği

#### 4.2.3. Keratinaz enziminin kısmi saflaştırılması

Proteinin kısmi saflaştırılması için öncelikle amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. 50 mm HCl ile ham enzim çözeltisinin pH 6'ya düşürülmüştür. Artan hacim dikkate alınmadan başlangıç hacmi ölçülüp %80'lik amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Tüm işlemler +4°C'de gerçekleştirilmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi yapılan

enzim 10000 rpm de +4°C’de 20 dk santrifüjlenmiştir. İşlem sonunda sıvı faz atılıp, dibe çöken enzim 50 mm pH 8 fosfat tamponunun minimum hacminde çözülmüştür.

50 mm pH 8 fosfat tamponunda çözülen enzim hacmi ölçülüp, diyaliz işlemi uygulanmıştır. Diyaliz işleminden sonra aktivite ve protein miktarları ölçülmüştür.

Diyaliz ile bir kısım saflaştırılan enzim çöktürme ile kısmi saflaştırılmak için ısıtma işlemine tabi tutulmuştur. Bunun için ham enzim çözeltisi 90°C’deki su banyosunda 5-10-20-30 dakika aralıklarında bekletilmiş ve aktivite tayini yapılmıştır. Aktivitesini en iyi koruduğu sıcaklık seçilmiştir. İşlem, SDS PAGE ile desteklenerek proteinin termal çöktürme yöntemiyle kısmi saflaştırıldığı kanıtlanmıştır [91].

#### **4.2.4. Na-aljinat küreciklerinin oluşturulması**

Enzimin enkapsülasyonunda kullanılacak olan sodyum aljinat hazırlanması için, sodyum aljinat 0,2 M kalsiyum klorür çözeltisi içerisine peristaltik pompa yardımıyla dk’da 0,06 ml akacak şekilde kürecikler oluşturulmuştur. Kürecikler, 0,02 M kalsiyum klorür çözeltisi içerisinde (1:2) oranında gece boyu bekletilip istenilen sertlikle olması sağlanmıştır.

#### **4.2.5 Enkapsüle enzimin aktivitesinin belirlenmesi**

Hazırlanan kürecikler kurutulduktan sonra tartılıp, 50 mM, pH 8 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tampon ile hazırlanan %5’lik gluteraldehit tamponunda 1 saat süre ile orbital karıştırıcıda muamele edildi. Süre sonunda aljinat kürecikleri gluteraldehitten uzaklaştırılana kadar saf su ile yıkandı. Yıkama işlemi OD<sub>245</sub> nm’de sıfır okunana kadar devam ettirildi. Daha sonra kürecik ağırlığı kadar enzim (1:1 oranında) ile 1 saat orbital karıştırıcıda muamele edildi.

Keratinaz aktivitesini ölçmek için; 0,5 g boncuk tartılıp üzerine 0,005 g keratin azur ve 2 ml 50 mM, pH 8 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu ilave edilmiştir. Reaksiyon çözeltisi 20 dakika 40°C’de inkübe edildikten sonra 10 dakika buz banyosunda soğutulmuştur. Süre sonunda karışım süzölmüş ve süzöntünün Biorad Smart Spec 3000 ile 595 nm’deki absorbansı okunarak serbest kalan azo boyası ölçülmüştür. Tüm denemeler 3’lü tekrarlar halinde çift örnek olarak gerçekleştirilmiştir. Verim hesabı Denklem (4.3) de gösterilmiştir;

$$\% \text{ Verim} = \frac{\text{İmmobilize Enzim Aktivitesi}}{\text{Serbest Enzim Aktivitesi}} \times 100 \quad (4.3)$$

#### **4.2.6. Optimizasyon koşullarının belirlenmesi**

##### **4.2.6.1 En iyi aljinat konsantrasyonunun belirlenmesi**

Artan yüzde aljinat konsantrasyonunun immobilizasyon verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda aljinat çözeltileri (%1, %2, %3, %4, %5, %6, %7) kullanılarak enkapsülasyon işlemi, 50 mM, pH 8 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tampon ile hazırlanan %5'lik gluderaldehit tamponunda 1 saat orbital karıştırıcıda muamele edilerek gerçekleştirilmiştir. İşlem sonunda kürecik ağırlığı kadar enzim (1:1 oranında) ilave edilerek ve 1 saat orbital karıştırıcıda karıştırılmış ve verim hesabı yapılmıştır. En iyi enkapsülasyon verimine sahip % aljinat konsantrasyonu grafik üzerinde gösterilmiştir. Deneysel çalışma 5 kez tekrarlanmış ve her denemede çift örnek kullanılmıştır. Sonuçlar standart sapma olarak verilmiştir.

##### **4.2.6.2 En iyi gluderaldehit konsantrasyonunun belirlenmesi**

Artan yüzde gluderaldehit konsantrasyonunun immobilizasyon verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Enkapsülasyon işlemi için, önceki çalışmada belirlenen en iyi %6 aljinat konsantrasyonunda Na-aljinat kürecikleri oluşturulmuş daha sonra oluşturulan kürecikler 50 mM, pH 8 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tampon ile hazırlanan farklı konsantrasyonlarda gluderaldehit çözeltileri (%3,5, %5, %7, %9, %12, %15) ile 1 saat orbital karıştırıcıda muamele edilmiştir. İşlem sonunda kürecik ağırlığı kadar enzim (1:1 oranında) ilave edilerek ve 1 saat orbital karıştırıcıda karıştırılmış ve verim hesabı yapılmıştır. En iyi enkapsülasyon verimine sahip % gluderaldehit konsantrasyonu grafik üzerinde gösterilmiştir. Deneysel çalışma 5 kez tekrarlanmış ve her denemede çift örnek kullanılmıştır. Sonuçlar standart sapma olarak verilmiştir.

##### **4.2.6.3. Aljinat-enzim oranı optimizasyonu**

1 g aljinat boncukları ile artan enzim miktarlarının enkapsülasyon verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Enkapsülasyon işlemi için, önceki çalışmada belirlenen en iyi %6 aljinat konsantrasyonunda Na-aljinat kürecikleri oluşturulmuş ve kürecikler 50 mM, pH 8 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu ile hazırlanan %9'lik gluderaldehit tamponunda 1 saat orbital karıştırıcıda muamele edilmiştir. İşlem sonrasında, aljinat

miktarı sabit tutulup (1 g) enzim miktarı artacak şekilde (1:05; 1:1; 1:1,5; 1:2) ilave edilmiş ve 1 saat orbital karıştırıcıda karıştırılarak verim hesabı yapılmıştır. En iyi enkapsülasyon verimine sahip aljinat- enzim oranı grafik üzerinde gösterilmiştir. Deneysel çalışma 5 kez tekrarlanmış ve her denemede çift örnek kullanılmıştır. Sonuçlar standart sapma olarak verilmiştir.

#### **4.2.6.4.Enzim-aljinat oranı optimizasyonu**

1 ml enzim ile artan aljinat miktarlarının immobilizasyon verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Enkapsülasyon işlemi için, önceki çalışmada belirlenen en iyi %6 aljinat konsantrasyonunda Na-aljinat kürecikleri oluşturulmuş ve kürecikler 50 mM, pH 8 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tampon ile hazırlanan %9'lik gluderaldehit tamponunda 1 saat orbital karıştırıcıda muamele edilmiştir. İşlem sonrasında, enzim oranı sabit tutulup (1 mL) artan aljinat miktarları (1:05; 1:1; 1:1,5; 1:2) ilave edilmiş, 1 saat orbital karıştırıcıda karıştırılarak verim hesabı yapılmıştır. En iyi enkapsülasyon verimine sahip enzim-aljinat oranı grafik üzerinde gösterilmiştir. Deneysel çalışma 5 kez tekrarlanmış ve her denemede çift örnek kullanılmıştır. Sonuçlar standart sapma olarak verilmiştir.

#### **4.2.6.5 Gluteraldehit muamele süresi optimizasyonu**

1 ml enzim ve 1g aljinat boncuklarının %9'lik gluteraldehit ile muamele sürelerinin enkapsülasyon verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Enkapsülasyon işlemi için, %6 aljinat konsantrasyonunda Na-aljinat kürecikleri oluşturulmuş ve kürecikler 50 mM, pH 8 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tampon ile hazırlanan %9'lik gluderaldehit tamponunda 30, 60, 90, 120, 180 dk orbital karıştırıcıda muamele edilmiştir. Daha sonra sabit enzim ve aljinat miktarında (1:1 oranında) 1 saat orbital karıştırıcıda karıştırılarak enkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve verim hesabı yapılmıştır. En iyi enkapsülasyon verimine sahip enzim-aljinat oranı grafik üzerinde gösterilmiştir. Deneysel çalışma 5 kez tekrarlanmış ve her denemede çift örnek kullanılmıştır. Sonuçlar standart sapma olarak verilmiştir.

#### **4.2.6.6 Enzim muamele süresi optimizasyonu**

1 ml enzim ve 1g aljinat boncuklarının muamele sürelerinin immobilizasyon verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Enkapsülasyon işlemi için, %6 aljinat

konsantrasyonunda Na-aljinat kürecikleri oluşturulmuş ve kürecikler 50 mM, pH 8  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  tampon ile hazırlanan %9'lik glüderaldehit tamponunda 30 dakika orbital karıştırıcıda muamele edilmiştir. Daha sonra sabit enzim ve aljinat miktarında (1:1 oranında) 30, 60, 90, 120, 180 dk orbital karıştırıcıda karıştırılarak enkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve verim hesabı yapılmıştır. En iyi enkapsülasyon verimine sahip enzim-aljinat oranı grafik üzerinde gösterilmiştir. Deneysel çalışma 5 kez tekrarlanmış ve her denemede çift örnek kullanılmıştır. Sonuçlar standart sapma olarak verilmiştir.

#### **4.2.6.7. Enkapsüle enzimde tekrar kullanım**

Enkapsüle enzimin tekrar kullanılabilirliğinin belirlenebilmesi için, %6 aljinat konsantrasyonunda Na-aljinat kürecikleri oluşturulmuş, kürecikler 50 mM, pH 8  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  tampon ile hazırlanan %9'lik glüderaldehit tamponunda 30 dk orbital karıştırıcıda muamele edilmiş daha sonra sabit enzim ve aljinat miktarında (1:1 oranında) 90 dk orbital karıştırıcıda karıştırılarak enkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Burada yapılan aktivite analizi küçük değişiklikler ile birlikte Bölüm 4.2.5'de anlatıldığı şekilde uygulanmıştır.

İmmobilize enzimin keratin azur ile inkübasyonu sonrasında Na- aljinat kürecikleri substrattan tamamen uzaklaştırılıp tampon ile yıkandıktan sonra, kürecikler üzerinden aktivite denemelerine devam edilmiştir. Denklem (4.1) yardımıyla da aktivitesi hesaplanmıştır. Bu işlem arka arkaya tekrarlanmış ve enzimin aktivitesini kaçınıcı kullanımdan sonra kaybetmeye başladığı belirlenmiştir. Her tekrardan sonra Denklem (4.3)'ten yararlanılarak immobilizasyon verimi hesaplanmıştır. % bağıl aktivite-tekrar kullanım ilişkisi grafik üzerinde gösterilmiştir.

#### **4.2.7. Serbest ve enkapsüle enzimin karakterizasyonu**

##### **4.2.7.1. Serbest enzim ve enkapsüle enzimlerin optimum pH'larının belirlenmesi**

Serbest ve enkapsüle enzimlerin pH değişiklikleri üzerine etkisini incelemek için, farklı pH'larda tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Kullanılan tampon çözeltiler aşağıdaki verilmiştir.

pH 3, pH 4 ve pH 5 için 50 mM  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  tamponu için, 50 mM'lık  $K_2HPO_4$  ve  $KH_2PO_4$  ayrı ayrı çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler pH-metre



yardımıyla birbirine eklenerek tampon çözeltiler olan pH 3, pH 4 ve pH 5'e ayarlanmıştır.

pH 6 50 mM sitrik asit-Na sitrat tamponu için, 50 mM'lık Sitrik asit ve Na-sitrat çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler pH-metre yardımıyla birbirine eklenerek pH 6 olacak şekilde tampon çözelti hazırlanmıştır.

pH 7, pH 8 ve pH 9 50 mM Tris(hidroksimetilaminoetan)-HCl tamponu için, 50 mM Tris(hidroksimetilaminoetan) ve HCl çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler pH-metre yardımıyla pH 7, pH 8 ve pH 9 olacak şekilde ayarlanmıştır.

pH 10 ve pH 11 50 mM Na bikarbonat-NaOH tamponu için, 50 mM Na bikarbonat ve NaOH çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler pH-metre yardımıyla birbirine eklenerek pH 10 ve pH 11 olacak şekilde ayarlanmıştır.

pH 12 50 mM KCl-NaOH tamponu için, 50 mM KCl ve NaOH çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler pH-metre yardımıyla birbirine eklenerek pH 12 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Farklı pH'lara sahip tampon çözeltilerle aktivite analizleri yapılmıştır. En yüksek aktiviteye sahip pH değerine (% 100) bağlı olarak diğer pH aralığındaki sonuçların bağıl aktiviteleri (%) hesaplanmış ve sonuçlar % bağıl aktivite olarak pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir. Deneysel çalışma 5 kez tekrarlanmış ve standart sapma olarak verilmiştir.

#### **4.2.7.2. Serbest enzim ve enkapsüle enzimin optimum sıcaklıklarının belirlenmesi**

Serbest ve enkapsüle enzim için 50 mM pH 8  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  tamponu ile hazırlanan 0,005g keratin azur substratının katalizi için maksimum enzim aktivitesini gösteren sıcaklığı belirlemek amacıyla farklı sıcaklıklarda (20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C, 100 °C) aktivite tayinleri yapılmıştır. Aktivite tayinleri daha önceki bölümlerde anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. En yüksek aktiviteyi gösteren sıcaklığın değerine (%100) bağlı olarak, diğer sıcaklıkların bağıl aktiviteleri (%) hesaplanmış ve grafik üzerinde gösterilmiştir.

#### 4.2.7.3. Biyotransformasyon

Enkapsüle edilmiş Na-aljinat küreciklerinden 5 gram alınarak 10 katı olacak şekilde %9'luk gluteraldehit çözeltisinde 30 dakika orbital karıştırıcıda karıştırılmıştır. Süre sonunda aljinat kürecikleri gluteraldehitten uzaklaştırılana kadar saf su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi OD 245 nm'de sıfır okunana kadar devam ettirilmiştir. Daha sonra kürecik ağırlığı kadar enzim (1:1 olacak şekilde; 5 ml) enzim ilave edilmiş ve 90 dk orbital karıştırıcıda karıştırılmıştır. Hazırlanan örnekten 1 gram alınarak 50 mM pH 8 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponunda hazırlanan keratin azur çözeltisinin 25 mL'si ile muamele edilmiş, su banyosunda 40 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi 5'er dakika aralıklarla karışımdan 1'er mL örnek alınarak gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak amacıyla; 10 dk buz banyosunda bekletildikten sonra Süre sonunda karışım süzölmüş ve süzöntünün Biorad Smart Spec 3000 ile 595 nm'deki absorbansı okunmuştur. Denklem (4.1)'ten yararlanılarak aktivite hesaplanmıştır.

#### 4.2.7.4. Serbest enzim ve enkapsüle enzimin K<sub>m</sub> ve V<sub>m</sub> değerlerinin belirlenmesi

Serbest ve enkapsüle enzimin K<sub>m</sub> ve V<sub>m</sub> değerleri başlangıç hızı koşullarında Lineweaver-Burk diyagramı yardımıyla saptanmıştır. 50 mM pH 8 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponunda, 0,005-0,007-0,01-0,02-0,04-0,07 mg/mL keratin azur hazırlanmıştır. Bölüm 4.2.5' de anlatıldığı gibi aktivite tayinleri yapılmıştır. Denklem (4.1)'den yararlanılarak aktivite hesaplanmıştır.

Keratinaz enziminin keratin azur hidrolizi için K<sub>m</sub> ve V<sub>m</sub> değerlerinin belirlenmesinde başlangıç hızı koşullarında Michaelis-Menten eşitliği Denklem (4.4) ve resiprokal hali ise Denklem (4.5)' de gösterilmiştir;

$$V_0 = \frac{V_m \times [S]}{K_m + [S]} \quad (4.4)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \times \frac{1}{[S]} \quad (4.5)$$

Formülde yer alan parametreler;

V<sub>0</sub>: 40°C, pH 8'de keratin azurun başlangıç hızı, (U/mL/min),

[S]: 50 mM, pH 8 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponunda hazırlanmış keratin azur konsantrasyonu, (mM),

K<sub>m</sub>: Keratin azur hidrolizi için enzimin Michaelis-Menten sabiti, (mM),

V<sub>m</sub>: Keratin azur hidrolizi ile ulaşılabilecek maksimum başlangıç hızını, (U/ml/dk) göstermektedir.

Elde edilen aktivite değerleri kullanılarak 1/V 'ye karşı 1/[S] Lineweaver-Burk grafiği çizilerek elde edilen doğruların eğiminden K<sub>m</sub>/V<sub>m</sub>, intersepinden 1/V<sub>m</sub> bulunarak; serbest ve immobilize enzimler için kinetik parametreler olan K<sub>m</sub> ve V<sub>m</sub> değerleri hesaplanmıştır.

#### 4.2.7.5. k<sub>cat</sub> ve k<sub>cat</sub>/k<sub>m</sub>

$$V_m = k_{cat} \times [E]_t \quad (4.6)$$

k<sub>cat</sub>: Enzimin substratına doygun olduğu anlarda, bir molekül enzimin birim zamanda ürüne dönüştürülen substrat miktarını ifade eder. Turn-over sayısıdır.

[E]<sub>t</sub>: Reaksiyon ortamındaki toplam enzim konsantrasyonunu ifade eder, (µmol/mL) [92].

Ayrıca serbest enzim ve immobilize enzim için kinetik değerlendirmede, enzimin katalitik performansını ifade eden k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub> oranı serbest enzim ve enkapsüle enzim için hesaplanmıştır.

#### 4.2.8. Keratinaz enzimi için elektroforez çalışması

Keratinaz enziminin molekül ağırlığı sodyumdodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yapılarak belirlenmiştir. Alt jel %12'lik, üst jel %4'lik hazırlanmıştır.

Alt jel için; % 30'luk 4 ml akrilamid-bisakrilamid, 2,5 ml pH 8,8 1,5 M Tris-HCl, 3,3 ml distile su, % 10 SDS 100 µl, % 10'luk 150 µl amonyum persülfat (APS) ve 5 µl N,N,N',N'tetrametiletilediamin(TEMED) karışımı hazırlandıktan sonra jel dökülmüştür. Hemen ardından üzerine izopropil alkol ilave edilip, jel oluştuktan sonra izopropil alkol temizlenmiştir.

Üst jel için; %30'luk 670 µl akrilamid-bisakrilamid, 1,25 ml pH 6,8 0,5 M Tris-HCl, 3 ml distile su, 50 µL %20'luk SDS, 50 µl %10'luk APS ve 5 µL TEMED karışımından alt jel üzerine ilave edilmiş ve taraklar yerleştirilmiştir. Jel oluştuktan sonra taraklar çıkarılıp elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Running buffer hazırlamak için; 3 g tris, 1 g SDS, 14,4 g glisin tartılmış ve 1 litre suya tamamlanmıştır. Taraklarla oluşturulan kuyulara markör proteini ve yükleme boyası ile 95 °C'de 5 dakika bekletilerek denatüre edilmiş enzimden 15 µL yüklenmiştir.

Yükleme boyasının hazırlanması: 480 ml distile su, 1 mL 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,8 mL gliserol, 0,80 mL %20 SDS (suda hazırlanır), 0,40 mL 2-β-merkaptolanol (soğukta bekletilir), 0,20 mL %0,05 bromfenol mavisi (suda hazırlanır). Hazırlanan çözelti minik ependorflara alınarak -20 °C'de muhafaza edilir.

Güç kaynağı, ilk 10 dakika için 100 volt; sonrasında 120 volt olacak şekilde ayarlanarak proteinlerin yürütülmesi başlatılmıştır.

Elektroforezde proteinlerin yürütülme işlemi sona erdikten sonra jeller, gümüş boyama protokolüyle muamele edilmiştir [94].

#### **4.2.8.1 Keratinaz enzimi için gümüş boyama çalışması**

Gümüş boyama işleminin yapılabilmesi için 7 farklı çözelti hazırlanmıştır:

1. çözelti; fixing solution (%50 distile su + %40 etanol + %10 asetik asit)
2. çözelti; %30 etanol
3. çözelti; %0,02 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>
4. çözelti; 100 mM gümüş nitrat + %0,02 formaldehit
5. çözelti; %2 sodyum karbonat + %0,04 formaldehit
6. çözelti; %5 asetik asit
7. çözelti; %1 asetik asit

Jel için hazırlanan 7 solüsyon sırasıyla kullanıldı. İşlem protokolü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

- 30 dakika boyunca 1. çözelti ile muamele edildi.
- 20 dakika boyunca 2. çözelti ile muamele edildi.
- 1 dakika boyunca 3. çözelti ile yıkandı ve 30 saniye su ile yıkandı.

- 20 dakika boyunca 4.çözelti ile muamele edildi.
- 3×15 saniye boyunca su ile yıkandı.
- Bantlar görünene kadar 5. çözelti ile muamele edildi.
- Reaksiyonu durdurmak için 6.çözelti ilave edildi.
- Çözelti ile jel bekletme çözeltisine alındı.

Native-PAGE işleminde, SDS-PAGE’de kullanılan tüm çözeltiler aynı kompozisyonda hazırlanmış olup, farklı olarak bu elektroforez işleminde, çözeltiler SDS içermez iken; saflaştırılan enzim de denatüre edilmeden yüklenmiş ve elektroforez işlemi +4 °C’ de gerçekleştirilmiştir.

#### **4.2.8.2 Keratinaz enzimi için zimogram çalışması**

Zimogram işlemi Native-PAGE koşullarında gerçekleştirilmiştir. Native-PAGE elektroforez işleminden sonra jele sırasıyla aşağıdaki protokol uygulanmıştır:

- 1 dk boyunca saf su ile yıkama.
- 30 dk boyunca 50 mM pH 8 fosfat tamponunda hazırlanan % 2,5’luk Tripton-X ile yıkama.
- 30 dk boyunca 50 mM pH 8 fosfat tamponunda yıkama.
- 50 mM pH 8 fosfat tamponunda % 1’lik casein hazırlama ve bu tampon içerisinde 50 °C’de 1 saat bekletme.
- Oluşan bantlar görünür hale getirilmek için Coomassie Brilliant Blue R-250 ile 2 saat boyunca boyama ve % 10 metanol, % 7 asetik asit ve % 83 distile su içeren boya çıkarmak için hazırlanan solüsyonda 2 gün bekletme.

#### **4.2.9. Arrhenius aktivasyon enerjisinin hesaplanması**

Reaksiyon hızının sıcaklıkla olan ilişkisini, Boltzmann dağılım yasasıyla birleştiren Svante Arrhenius’un elde ettiği Arrhenius eşitliği Denklem (4.7)’ de verilmiştir;

$$k_{cat} = A \times e^{E_a / RT} \quad (4.7)$$

şeklinde ifade edilmiştir. Üstel olmayan yazımının grafik üzerindeki yorumu daha kullanışlı olduğundan eşitliğin her iki tarafının logaritmasının alınmasıyla elde edilen eşitlik denklem (4.8)’de gösterilmiştir;

$$\ln k_{cat} = \ln A \times \frac{E_a}{RT} \quad (4.8)$$

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

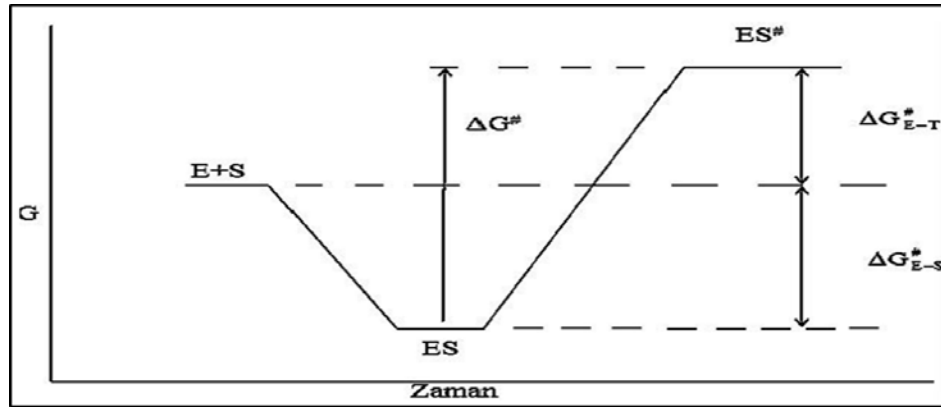
Böylece çizilen  $\ln k - 1/T$  grafiğinin eğimi,  $(-)$   $E_a/R$ 'ye eşit olacaktır. Bundan faydalanarak aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) hesaplanmaktadır [78].

Reaksiyonun başlaması için gerekli olan aktivasyon enerjisinin hesaplanmasında farklı sıcaklıklarda (25 °C, 27 °C, 30 °C, 32 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C) aktivite ölçümleri (50 mM pH 8  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  ile) yapılmıştır.

Arrhenius formülüyle aktivasyon enerjisinin hesaplanması için,  $\ln k - 1/T$  grafiği çizilmiştir.

#### 4.2.10. Keratinaz enzimi ile keratin azur hidrolizine bağlı termodinamik parametrelerin belirlenmesi

*Bacillus vallismortis* DSM11031 mikroorganizmasından elde edilen keratinaz enziminin keratin azur hidrolizi reaksiyonunun termodinamik parametrelerini içeren serbest enerji düzey diyagramı Şekil 4.2. gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Keratinaz enziminin keratin azur hidrolizi reaksiyonunda serbest enerji düzey diyagramı

Termodinamik parametrelerin hesaplanması için gerekli denklemler aşağıda gösterilmiştir;

$$\Delta G^\# = -RT \ln (k_{cat} \cdot h / k_B \cdot T) \quad \text{kJ/mol} \quad (4.9)$$

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

$$\Delta G^\#_{E-T} = -RT \ln (k_{cat} / K_m) \quad \text{kJ/mol} \quad (4.10)$$

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

$$\Delta G^\#_{ES} = -RT \ln (1 / K_m) \quad \text{kJ/mol} \quad (4.11)$$

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

$$\Delta H^\# = E_a - RT \quad \text{kJ/mol} \quad (4.12)$$

$\Delta H^\#$ : Entalpi değişimi,

$$\Delta S^\# = \frac{\Delta H^\# - \Delta G^\#}{T} \quad \text{kJ/mol} \quad (4.13)$$

$\Delta S^\#$ : Entropi değişimi,

Formülleri kullanılarak yapıldı.

$K_B$ , Boltzman sabitini ( $1,38 \times 10^{-23}$ ) ( $J.K^{-1}$ );

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

$R$ , gaz sabitini ( $8,314 J.K^{-1}mol^{-1}$ );

$k_{cat}$ , turn-over katsayısını ifade etmektedir ( $dk^{-1}$ ) [76].

## 5. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 5.1. Keratinaz Üreticisi Bakteri İzolatlarının Belirlenmesi

Proteinin özelliklerini tanımlayabilmek için ilk olarak o proteinin saf halde elde edilmesi gereklidir. Protein saflaştırmada analitik çalışmalarda az miktarda enzim ile yüksek saflık oranı istenirken, endüstriyel çalışmalarda ise kısmi saflaştırma bile yeterli olmaktadır.

Kaynak türüne göre enzim saflaştırmada farklı yöntemler seçilebilir. Çalışmamızda keratinaz enzimi için, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve termal presipitasyon işlemlerinden yararlanarak kısmi saflaştırma gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda ilk olarak amonyum sülfat tuz çöktürmesi gerçekleştirilmiştir. Belirlenen doygunluk derecesine göre eklenen amonyum sülfat tuzu farklı molekül ağırlığındaki enzimlerin çökmesine neden olur. Başarılı bir çöktürme işleminde safsızlık oluşturan proteinler hedef protein molekülünden uzaklaştırılır. Yapılan tuz çöktürmesinden sonra tuzdan uzaklaşmak için diyaliz işlemi yapılır. Protein çözeltisi, diyaliz membranına alınır ve uygun tampon çözelti içerisine bırakılır. Kısmi saflaştırmamızın son basamağında ise ısı çöktürme işlemi uygulanmıştır.

Proteinlerin ısı işlemlere maruz kalarak denatüre olması hız sabitiyle tanımlanabilir. Bu durumda termodinamik olarak hız sabiti  $k_d$ 'nin sıcaklıkla ilişkisi Denklem (5.1)'de verilmiştir;

$$\frac{d \ln k_d}{dT} = \frac{E_{a,d}}{RT^2} \quad (5.1)$$

$E_{a,d}$ , protein denatürasyon aktivasyon enerjisi;  $k_d$ , protein denatürasyon hız sabiti;  $R$ , ideal gaz sabitini ve  $T$  sıcaklığı ifade etmektedir. Formülden anlaşılacağı gibi sıcaklıktaki değişim protein denatürasyon aktivasyon enerjisini ( $E_{a,d}$ ) etkilemekte bu da proteinin denatürasyonuna sebep olmaktadır. Her proteinin kendine özgü  $E_{a,d}$  değeri olduğundan, protein denatürasyon-sıcaklık birimleri de farklı olacaktır.



Aranılan proteinin özellikleri esas alınarak, termotolerant proteinler (yüksek sıcaklıklara dayanıklı olan proteinler) için yapılan 15 dakikalık ısıtma ile birlikte diğer istenmeyen proteinler denatüre edilmiş olacaktır. Ardından yapılan buzlu soğutma ve santrifüj işlemi ile denatüre edilen proteinler çöktürülerek uzaklaştırılmaktadır [91].

Çalışmamızda besiyeri ortamı bölüm 4.2.1' de bahsedildiği gibi hazırlanmış olup, bakteri suşları 37 °C'de 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonları sonucunda alınıp, aktivite tayini yapılmıştır. En iyi aktiviteye sahip bakteri suşu seçilmiş olup, diğer işlemlere tabi tutulmuştur.

Tablo 5.1. En iyi aktivite veren bakteri suşusunun seçimi

Bakteri Suşu	40°C- OD <sub>595</sub>	60°C- OD <sub>595</sub>
<i>Bacillus vallismortis</i> TCA varlığında	0,064	0,068
<i>Bacillus vallismortis</i> TCA'sız	0,228	0,344
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TCA varlığında	0,055	0,044
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TCA'sız	0,105	0,230

En iyi aktivite veren bakteri suşu *Bacillus vallismortis* seçildikten sonra kısmi saflaştırma yapılmıştır. Kısmi saflaştırma için %80 oranında amonyum sülfat tuz çöktürmesi yapılmıştır. Ardından, tuzdan uzaklaşmak için 50 mM pH 8 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponunda diyaliz yapılmıştır. Daha sonra ısı çöktürme ile kısmi saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Isıl çöktürme işlemi için uygun sıcaklık ve dakika seçimi Tablo 5.2.' de verilmiştir. Ardından bölüm 4.2.2.1'de verilen prosedüre göre aktivite tayini yapılmıştır.

Tablo 5.2. Isıl çöktürme için en iyi suşun belirlenmesi

<i>Bacillus vallismortis</i>	5 dak	10 dak	20 dak	30 dak
90 °C	0,183U	0,210 U	0,153 U	0,143 U
100 °C	0,083 U	0,096 U	0,053 U	0,050 U

Yapılan çalışmalar sonucunda en iyi aktivite gösteren izolat pH 8'de 48 saatlik inkübasyon sonucunda *DSM 11031 Bacillus vallismortis* izolatında görülmüştür.

V. P. Zambare ve ark.'nın gerçekleştirdiği çalışmada, *Bacillus cereus*'dan hücre dışı olarak üretilen proteaz enzimi, amonyum sülfat (%60 doygunluk) ile çöktürülmüş ardından membran diyalizi yapılarak kısmı saflaştırması gerçekleştirilmiştir [97]. Başka bir çalışmada P. Tamilmani ark. Hindistan'ın Tamilnadu şehri Namakkal bölgesindeki tavuk çiftliklerinden almış oldukları katı atıklardan izole ettikleri *Bacillus licheniformis* bakterisini tanımlamışlar ve bu mikroorganizmanın ürettiği keratinazın karakterizasyonunu yapmışlardır. Tuzla çöktürme, diyaliz ve kolon kromatografisi ile saflaştırdıkları enzimin *Bacillus licheniformis* bakterisinden üretmiş olduklarını bildirmişlerdir [98].

## **5.2. Enkapsüle Enzimde Optimizasyon Çalışmaları**

### **5.2.1. Aljinat derişimi optimizasyonu**

Enkapsülasyon işlemi katı, sıvı ve gaz haldeki malzemelerin kapsüller içinde tutulması ve belirli koşullarda ve hızda salınımını sağlayan teknolojidir [99].

Enkapsülasyon işleminde damlatma veya iyonik jelasyon metodu pratik ve ekonomik bir yöntemdir fakat çok miktarda ürün üretimine elverişli olmadığı için daha çok laboratuvar uygulamalarında tercih edilmektedir.

Damlatma metodunda, polimer çözeltisi ile aktif madde homojenize edilerek şırınga vasıtasıyla küresel jel partikülleri elde etmek amacıyla  $\text{CaCl}_2$  çözeltisine damlatılır. Damlatma metodu kalsiyum-aljinat taneciklerinin elde edilmesinde kullanılan metot olup, çapraz bağlanma  $\text{CaCl}_2$  molekülündeki kalsiyum ile sodyum aljinat molekülündeki sodyumun bağlanması prensibine dayanır.

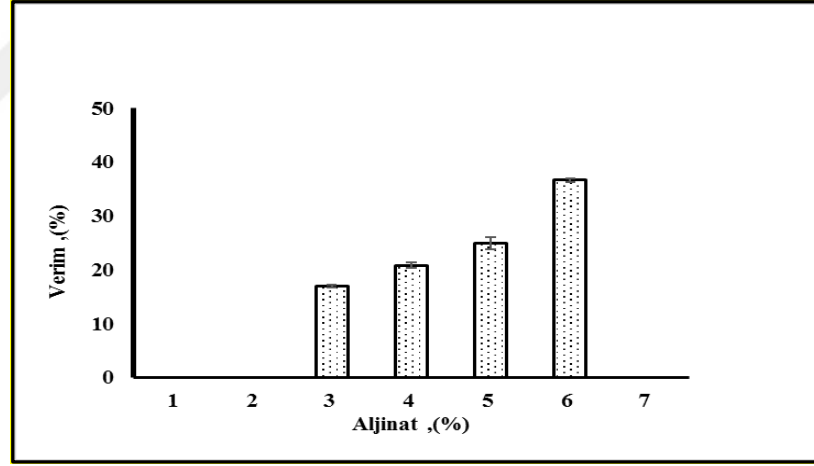
Bu yöntem laboratuvar ölçekte üretiminin çok kolay olması, hidrofilik veya hidrofobik, ısıya duyarlı, akışkan veya viskoz, katı veya sıvı hemen hemen tüm moleküllerin bu metotla enkapsüle edilebilmesi gibi olumlu özelliklerinden dolayı sıklıkla tercih edilmektedir. Bu avantajlarının yanında küçük miktarda kapsül elde edilmesi ne kadar kolay olsa da prosesin büyütülmesi çok zor ve maliyetlidir [100].

Son yıllarda geliştirilen şırınga sistemi, hava jeti, elektriksel, potansiyel ve titreşimli üniteler ile aljinat akışını sağlayan bazı teknolojiler sayesinde yüksek miktarda

aljinat tanecikleri üretilerek enkapsüle aljinat taneciklerin ticarileştirilmesinin mümkün olabileceği belirtilmiştir [100].

Sistemde bulunan kalsiyum miktarına bağlı olarak zincirler (bağlar) arasındaki ilişki kalıcı veya geçici olabilir. Kalsiyum miktarı düşük olduğunda bağlanma geçici olurken yüksek kalsiyum seviyelerinde bağların kalıcı olması nedeniyle jelleşme oluşumu gözlenmektedir [101].

Çalışmamızda Na-aljinat kürecikleri oluşturmak için % 1, % 2, % 3, % 4, % 5, % 6, % 7 konsantrasyonlarında Na-aljinat çözeltileri hazırlanmıştır. Oluşan çözeltilere kürecik formu verebilmek için 0,2 M  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi hazırlanmıştır. Küreciklerin oluşumu için peristaltik pompa dakika da 0,06 ml akacak şekilde ayarlanmış olup, işlem  $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirilmiştir. Belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan Na-aljinat çözeltileri 0,2 M  $\text{CaCl}_2$  çözeltisine damlatılmıştır. Bir gece boyunca 0,02 M  $\text{CaCl}_2$  çözeltisinde bekletilerek istenilen sertlikte olması sağlanmıştır.



Şekil 5.1. Artan aljinat konsantrasyonlarının immobilizasyon verimi üzerine etkisi

Şekil 5.1'de görüldüğü gibi en yüksek verim %6 aljinat varlığında yapılan çalışma sonucunda %40 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda %1 ve %2 Na-aljinat çözeltileri de hazırlanmış, fakat gluteraldehit muamelesi ardından kürecikler çok fazla eriyik olduğundan aktivite tayini yapılamamıştır. Konsantrasyon derişimi %7'nin üzerine çıkarıldığında ise viskozitesi yüksek olduğundan çözelti hazırlanamamış ve çalışma gerçekleştirilememiştir.

Na-aljinat küreciklerinin üretilmesinde küreciklerin büyüklüğü; şırınga çapına, titreşim sistemine, aljinat çözeltisinin viskozitesine ve kalsiyum klorür çözeltisi ile şırınga arasındaki mesafeye bağlıdır [102].

Çalışmalarımızda ilk etapta şırınga ile %6 derişime sahip Na-aljinat çözeltisiyle çalışılmıştır fakat viskozitesin yoğun olması ve manuel olarak tanecik boyutlarındaki eşitsizlikler nedeniyle işlem başarısız olmuştur. Daha sonra peristaltik pompa kullanılarak aynı konsantrasyonda kürecikler oluşturulmuştur. Yüksek derişime sahip Na-aljinat çözeltisi peristaltik pompa kullanılarak kürecikler oluşturulduğunda her bir küreciğin aynı boyutta olması, aynı akış süresinde elde edilmesi, istenilen sertlikte ve en yüksek aktiviteye sahip olması sağlanmıştır.

Na-aljinat derişimi optimizasyon çalışmamızda en iyi aljinat derişimi %6 olarak bulunmuştur.

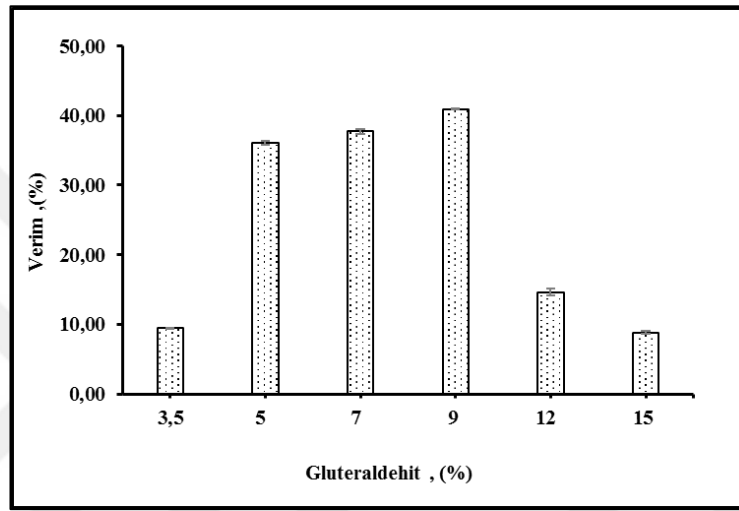
Sawaminee Nualkaekul ve ark.'ın yapmış olduğu nar suyundan elde edilen *Lactobacillus plantarum*'un daha uzun hayatta kalması için kitosan kaplı aljinat tanecikleri ile mikroenkapsüle edildiği ve bunun için en fazla %3'lük Na-aljinat çözeltisi kullanıldığı rapor edilmiştir [102]. Swati Sharma ve ark. yaptığı yaptığı çalışmada ise Cathepsin B'nin enkapsülasyonu için aktivite verimi; en iyi %4 CM-selüloz, %1 CaCl<sub>2</sub> ve %3 aljinat konsantrasyonları varlığında bulunmuştur [107].

### 5.2.2. Gluteraldehit derişimi optimizasyonu

Derişimi %6 olan Na-aljinat küreciklerini %3,5, %5, %7, %9, %12, %15 konsantrasyonlarında hazırlanan gluteraldehit çözeltileri içerisinde bir saat muamele ederek hangi konsantrasyonun kullanılması gerektiği üzerine optimizasyon çalışması yapılmıştır.

Her behere eşit miktarda Na-aljinat kürecikleri koyulmuştur ve kürecik miktarının 10 katı olacak şekilde hazırlanan gluteraldehit çözeltilerinden ilave edilmiştir. Hazırlanan Na-aljinat-gluteraldehit karışımının bir saat boyunca orbital karıştırıcıda homojen olarak karışması sağlanmıştır. Muamele sonunda boncuklar ve OD<sub>245</sub>'de sıfır okunana kadar iyice yıkanmıştır. Hazırlanan örneklerden eşit miktarda alınarak aynı oranda enzimle (1:1 oranında, g/mL) 60 dakika boyunca orbital karıştırıcıda

muamele edilmiştir. Enzimle enkapsülasyon işlemi tamamlanan boncuklardan 0,5 g alınarak 50 mM pH 8  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  tamponunda hazırlanan çözeltisinin 2 ml'si ve 0,005 g keratin azur substratı ile muamele edilmiş, su banyosunda 40 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak amacıyla; buz banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda karışım süzölmüş ve süzöntünün Biorad Smart Spec 3000 ile 595 nm'deki absorbansı okunmuştur. Eşitlik (4.3)'ten yararlanılarak aktivite hesaplanmıştır.



Şekil 5.2. Artan glutaraldehit konsantrasyonlarının enkapsülasyon verimi üzerine etkisi

Elde edilen sonuçlar ile immobilizasyon verimleri Denklem (4.3) yardımıyla hesaplanmış ve glutaraldehit konsantrasyonları grafiğe aktarılmıştır. Şekil 5.2'de immobilizasyon verimlerine ait sonuçlar gösterilmiştir. Grafikte %100 değeri serbest enzimin aktivitesi olarak kabul edilmiştir.

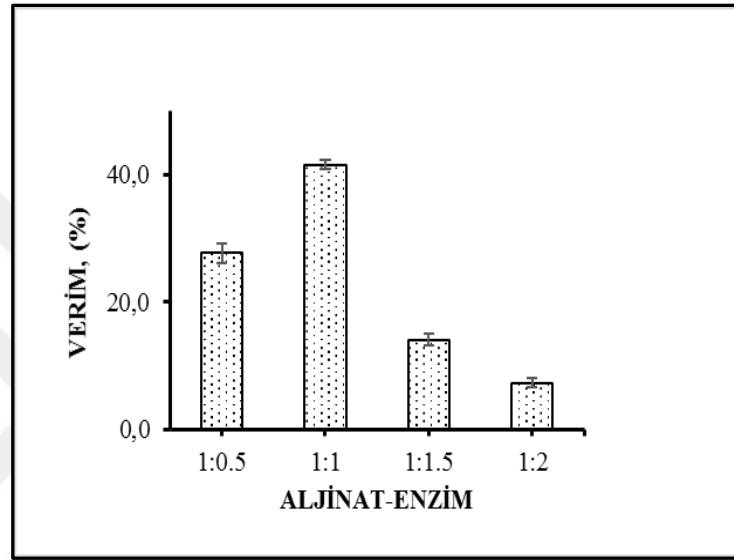
Şekil 5.2'de görüldüğü gibi en iyi verim %40 olarak, %9 glutaraldehit konsantrasyonu varlığında bulunmuştur. Daha yüksek glutaraldehit konsantrasyonları varlığında verimin düşme sebebi, oluşan keratinaz agregatları sebebiyle keratin azurun enzimin aktif bölgesine ulaşmasındaki zorluktan kaynaklandığı düşünülmektedir.

### 5.2.3. Aljinat- enzim ve enzim-aljinat oranı optimizasyonu

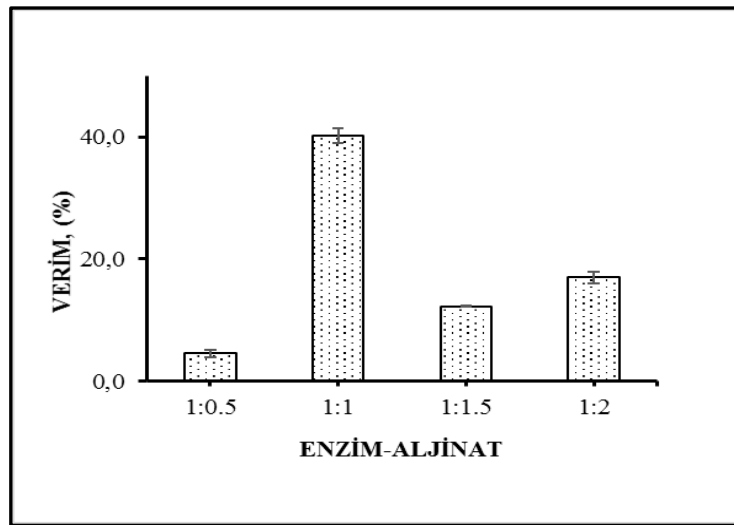
En iyi aljinat ve glutaraldehit konsantrasyonları belirlenen ve bu koşullarda muamele edilerek hazırlanan boncuklar; önce aljinat sabit tutularak (1:05; 1:1; 1:1,5; 1:2; (g

aljinat /ml enzim)) enzim oranları arttırılmıştır ve 60 dk orbital karıştırıcıda enkapsülasyon işlemine bırakılmıştır. Enzimle enkapsülasyon işlemi tamamlanan boncuklardan 0,5 g alınarak bölüm 4.2.2.1’de ifade edildiği gibi aktivite analizi gerçekleştirilmiştir.

Aynı işlemler enzim miktarları sabit tutularak tekrarlanmıştır (1:05; 1:1; 1:1,5; 1:2; (ml enzim /g aljinat )). Grafikler aşağıda verilmiştir.



Şekil 5.3. Artan enzim miktarlarının enkapsülasyon verimi üzerine etkisi



Şekil 5.4. Artan aljinat miktarlarının enkapsülasyon verimi üzerine etkisi

İmmobilizasyon verimleri (4.3) no’lu Denklem yardımıyla hesaplanmış ve en yüksek immobilizasyon verimine sahip olan enzim aljinat - aljinat enzim oranları

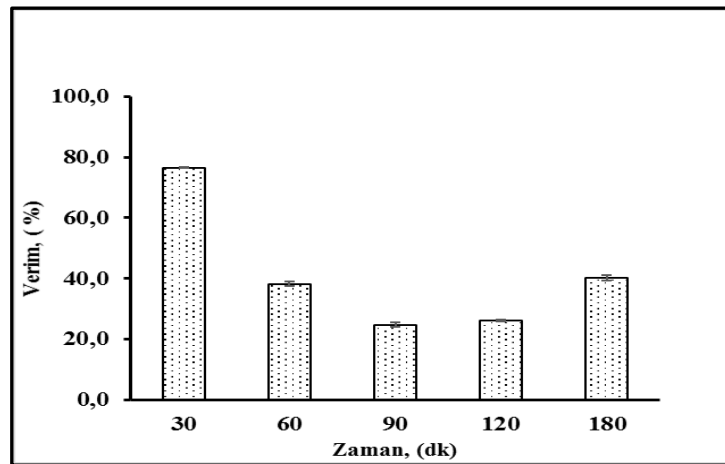
bulunmuştur. Şekil 5.3 ve şekil 5.4’de bu oranlar üzerine yapılmış olan optimizasyona ait grafik gösterilmiştir. Grafikte %100 değeri serbest enzimin aktivitesi olarak kabul edilmiştir.

Şekil 5.3’te, sabit aljinat miktarı artan enzim konsantrasyonu (aljinat: enzim oranı 1:0,5 (g aljinat/ml enzim)) durumunda verim %27 iken artan enzim miktar varlığında (ml) immobilizasyon verimi %41 e çıkmıştır (1:1, g aljinat/ml enzim). Fakat enzim miktarı (ml) arttırıldığında verimde düşmüştür.

Şekil 5.4’te, sabit enzim konsantrasyonu artan aljinat miktarı (enzim: aljinat oranı 1:0,5 (ml enzim/g aljinat)) durumunda verim %5 iken artan aljinat miktar varlığında (ml) immobilizasyon verimi %41 e çıkmıştır (1:1, g aljinat/ml enzim).

#### 5.2.4. Gluteraldehit süresi optimizasyonu

Gluteraldehit süresi optimizasyon basamağında %6’lık derişime sahip Na-aljinat, %9’luk gluteraldehit ile oranı 1:10 olacak şekilde oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda 30, 60, 90, 120 ve 180 dakika muamele edilmiştir. Süre sonunda sodyum aljinat kürecikleri saf su ile gluteraldehit uzaklaşana kadar yıkanmıştır. Hazırlanan Na-aljinat küreciklerinden 2’şer gram alınarak her biri 2 ml keratinaz enzimi ile 1 saat boyunca orbital karıştırıcıda muamele edilmiştir. Süre sonunda örnekler saf su ile yıkanmıştır ve peçete ile kurutulmuştur. Hazırlanan örneklerden 0,5’er gram alınarak bölüm 4.2.2.1’de belirtildiği gibi aktivite analizleri yapılmış, Denklem (4.3)’den yararlanılarak aktivite hesaplanmıştır.



Şekil 5.5. Artan gluteraldehit süresinin enkapsülasyon verimi üzerine etkisi

Keratinazın Na-aljinat küreciklerine enkapsülasyonu için gluteraldehit ile optimum muamele süresi belirlenmiştir ve Şekil 5.5'te çalışmaya ait grafik gösterilmiştir.

Şekil 5.5'de görüldüğü gibi en yüksek immobilizasyon veriminin 30 dakikalık muamele varlığında olduğu bulunmuştur. 30 dakikalık gluteraldehit muamelesi sonucunda elde edilen immobilizasyon verimi % 76,6 olarak saptanmıştır.

Aida M. Ve ark. yaptığı *Aspergillus oryzae*'den keratinazın saflaştırılması, karakterizasyonu ve immobilizasyonu çalışmasında; *Aspergillus oryzae* kültürlerinden elde edilen saflaştırılmış keratinazın immobilizasyonu yaparken; Kitosan (1 g), % 2,5 gluteraldehit (GA) içeren 100 ml 0.1 M HCl'de 30°C'de 2 saat boyunca muamele edilmiştir. Çözünmüş kitosan, 1 ml 1.0 M NaOH ilave edilerek çökeltilmiştir. Çökelti süzülerek ayrılmıştır ve fazla GA'yı uzaklaştırmak için damıtılmış suyla yıkanmıştır. Islak kitosan, 5.0 ml enzim çözeltisi ile karıştırılmış ve 1 saat 30°C'de muamele edilmiştir. Aktivite tayini yapıldığında verim %59,54 olarak bulunmuştur. Kitin (1 g), 10 ml % 2.5 GA ile muamele edilmiştir. Kitin daha sonra süzülerek toplanmış ve fazla GA'yı uzaklaştırmak için damıtılmış suyla yıkanmıştır. Islak kitin, 30°C'de 2 saat boyunca 5.0 ml enzim çözeltisi ile karıştırılmıştır. Aktivite tayini yapıldığında verimin %59,16 bulunduğu rapor edilmiştir [31].

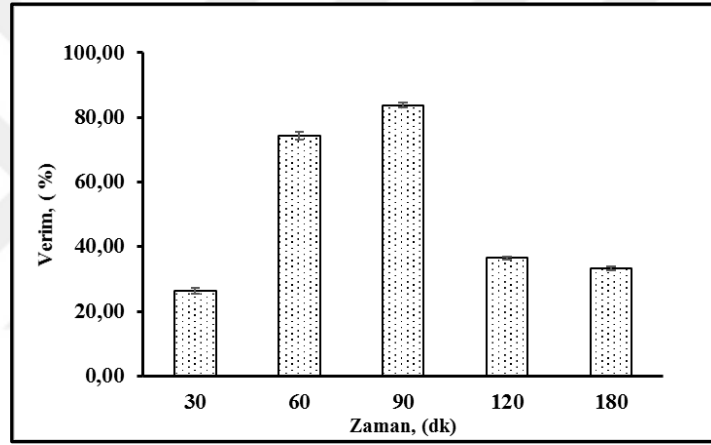
Natividad Ortega ve ark. kovalent bağlanma ile aljinat-gluteraldehit boncuklarında nötraz immobilizasyonu çalışmasında, immobilizasyon destek materyali olarak kullanılan aljinat tanecikleri (derişimi %2 olacak şekilde), peristaltik pompa yardımıyla, 12 saat boyunca sürekli karıştırma altında 100 ml 0.2 M CaCl<sub>2</sub> çözeltisine bırakılmasıyla hazırlanmıştır ve 4°C'de 0.03 M CaCl<sub>2</sub> çözeltisi içinde saklanmıştır. Na-aljinat taneciklerinin aktifleştirilmesi için, farklı pH değerlerinde 20 ml %6.2 gluteraldehit konsantrasyonu (200mM tris-maleik tamponu içinde), 1 g aljinat taneciklerine ilave edilmiştir. Ardından karışım 25°C'de orbital karıştırma (150 rpm) altında 2 saat boyunca gerçekleştirildiği rapor edilmiştir [110].

Bu çalışmalar göz önüne alındığında çalışmamızdaki gluteraldehit ile modifikasyon süresinin daha kısa sürede gerçekleştiği görülmektedir. Ticari uygulamalarda bu durumun avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.



### 5.2.5. Enzim süresi optimizasyonu

Enzim süresi optimizasyon basamağında %6'lık derişime sahip Na-aljinat, %9'luk gluteraldehit ile oranı 1:10 olacak şekilde oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda 30 dakika muamele edilmiştir. Süre sonunda sodyum aljinat boncukları saf su ile gluteraldehit uzaklaşana kadar yıkanmıştır. Hazırlanan Na-aljinat küreciklerinden 2'şer gram alınarak her biri 2 ml keratinaz enzimi ile 30, 60, 90, 120 ve 180 dakika boyunca orbital karıştırıcıda muamele edilmiştir. Süre sonunda örnekler saf su ile yıkanmıştır ve peçete ile kurutulmuştur. Hazırlanan örneklerden 0,5'er gram alınarak bölüm 4.2.2.1'de belirtildiği gibi aktivite analizleri yapılmış, eşitlik (4.3)'den yararlanılarak aktivite hesaplanmıştır.



Şekil 5.6. Artan enzim süresinin enkapsülasyon verimi üzerine etkisi

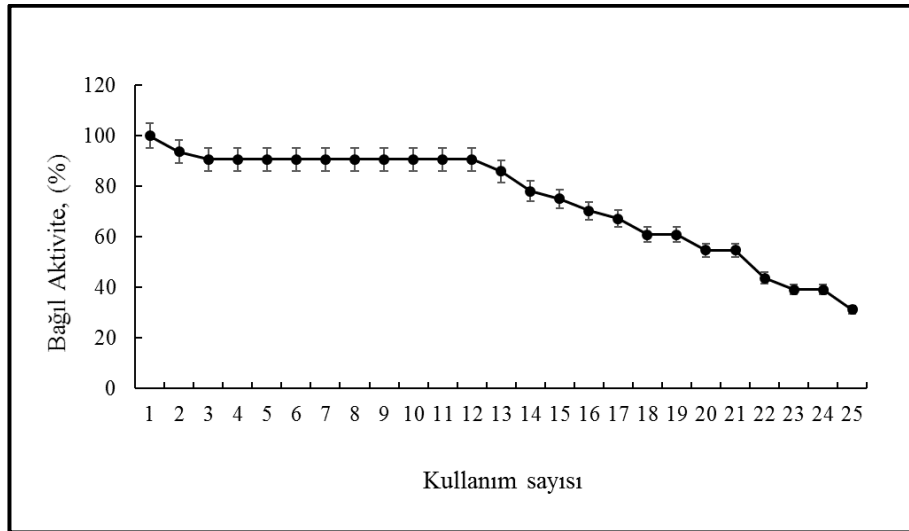
Enzimin Na-aljinat kürecikleri ile muamele süresi optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve Şekil 5.6'da yapılmış olan çalışmaya ait grafik gösterilmiştir.

Şekil 5.6'de görüldüğü gibi en yüksek immobilizasyon veriminin 90 dakikalık muamele varlığında olduğu bulunmuştur. 90 dakikalık enzim muamelesi sonucunda elde edilen immobilizasyon verimi % 83,76 olarak saptanmıştır.

Sonuçlarımız göz önüne alındığında çalışmamızda kullanılan enzim ile modifikasyon süresinin ılımlı olmasının endüstriyel uygulamalarda avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

### 5.2.6 Enkapsüle enzimde tekrar kullanım

Enkapsülasyon işleminin en önemli avantajlarından biri de enzimin destek materyaline hapsedilmesini sağlayarak tekrar kullanılabilir hale getirilmesidir. Tekrar kullanılabilirliğin belirlenebilmesi için %6'lık derişime sahip Na-aljinat, %9'luk gluteraldehit ile oranı 1:10 olacak şekilde oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda 30 dakika muamele edilmiştir. Süre sonunda sodyum aljinat boncukları saf su ile gluteraldehit uzaklaşana kadar yıkanmıştır. Hazırlanan Na-aljinat küreciklerinden 2'şer gram alınarak her biri 2 ml keratinaz enzimi ile 90 dakika boyunca orbital karıştırıcıda muamele edilmiştir. Süre sonunda örnekler saf su ile yıkanmıştır ve kurutulmuştur. Hazırlanan örneklerden 0,5'er gram alınarak 50 mM pH 8 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponunda hazırlanan 0,005 g keratin azur substratının 2 ml'si ile su banyosunda 40 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak amacıyla; reaksiyon 10 dakika buz banyosunda bekletilmiştir. Süre sonunda karışım süzölmüş ve süzöntünün Biorad Smart Spec 3000 ile 595 nm'deki absorbansı okunmuştur. Eşitlik (4.3)'ten yararlanılarak aktivite hesaplanmıştır. 10 dakika buz banyosunda bekletildikten sonra Na-aljinat küreciklerine enkapsüle edilmiş keratinaz enzimi saf su ile yıkanıp tekrar aktivite analizi yapılmıştır. Tekrar kullanımı test etmek amacıyla gerçekleştirilen bu deney bağıl aktivitenin %25,75'i kalana dek sürdürölmüştür.



Şekil 5.7. Enkapsüle enzimde tekrar kullanım

Sonuçlar % bağıl aktivite olarak Şekil 5.7'de gösterilmiştir. Grafikte %100 değeri serbest enzimin aktivitesi olarak kabul edilmiştir. Çalışmamızda, 12 deneme boyunca

enzimin aktivitesini %90 oranında koruduğu görülmüştür. 13. Denemeden itibaren ise kademeli olarak azaldığı 21. Denemeye kadar aktivitesinin %55'ini koruduğu 25. Deneme ise bağıl aktivitenin %31 'e indiği görülmüştür.

Keçi beyninden saflaştırılan bir sistein proteazı katepsin B, içinde sıvı çekirdeğe sahip olan CM-selüloz-Ca-aljinat zarı içinde mikro kapsüllenmiştir. Aktivite verimi, en uygun %4 CM-selüloz, %1 CaCl<sub>2</sub> ve %3 aljinat konsantrasyonlarında immobilizasyon koşulları altında maksimum olmuştur. Kapsüllenmiş enzim formu, beş ardışık seri reaksiyon için tekrar kullanılabilirliği sırasında orijinal etkinliğinin ~%60'ını koruyabildiği rapor edilmiştir [107].

Proteaz-CLEA'nın tekrar kullanım özelliği, substrat (kazein) hidrolizi için art arda on (tekrarlanan) kullanılarak araştırılmıştır. Her döngünün ardından, proteaz-CLEA'lar 4000 g ve 4 ° C'de 20 dakika santrifüjlenerek geri kazanılmıştır. Bu işlem 10 kez sürdürülmüştür. İlk kullanımdaki proteaz-CLEA'ların başlangıçtaki bağıl aktivitesi, %100 olarak belirlenmiştir ve tekrarlanan kullanımla karşılaştırılmıştır. İmmobilize edilmiş biyokatalizörlerin tekrar kullanılabilir olması avantajlıdır ve maliyette etkin rol oynamaktadır. Proteaz-CLEA'lar aktivitesinde (N85) ilk altı döngü için aktivite kaybı çok değildir. 7. ve 8. döngüden sonra, nispi aktivitelerin sırasıyla %81,5 ve %78,2 olduğu rapor edilmiştir. 10. döngünün sonunda, aktivitenin %66,5'e düştüğü bildirilmiştir [108].

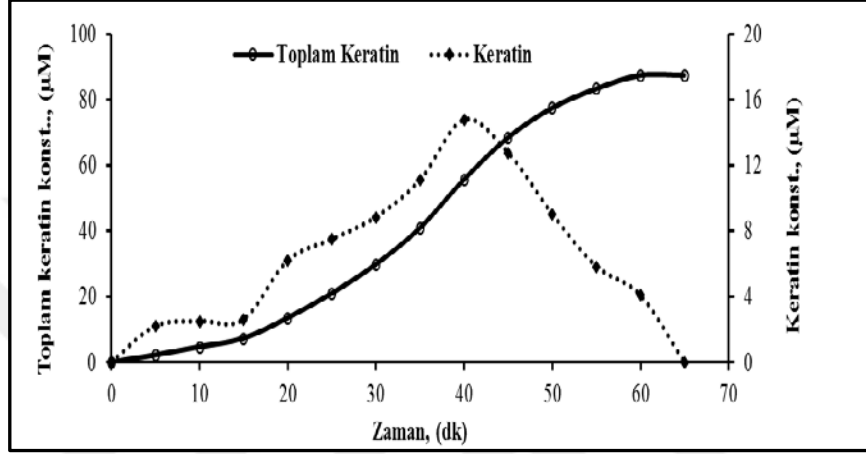
Abida Anwar ve ark. yaptığı çalışmada enkapsüle enzimin tekrar kullanılabilirliğini bulmak için, substrat olarak kazein içeren dört döngü boyunca test edilmiştir. Enzim, ikinci kullanım sırasında %80 aktivite gösterirken, üçüncü kullanımda %35, 4. kullanımda tam kayıp gözlemlenmiştir. Aktivitedeki bu düşüşün nedeninin, her bir döngünün sonunda boncukların yıkanması sırasında enzimlerin boncuklardan sızması olduğu belirtilmiştir [111].

Juliana Silva de Lima ve ark; kalsiyum aljinat taneciklerinde *Aspergillus ficuum* tannazının immobilizasyonu ve boldo (*Peumus boldus*) çayının tedavisinde kullanımı çalışmasında ise immobilize edilmiş enzim aktivitesi ve aktivitesini koruma etkinliği, dokuz tekrar kullanımının ardından değerlendirilmiştir. Bu amaçla, enzim, döngü başına 15 dakika boyunca 40 ° C'de 0.2M pH 5.0 asetat tamponunda, test edilmiştir. İlk kullanım %100 alınarak ikinci kullanımda aktivite %89'a, 5. kullanımda ise

aktivitenin ancak %50'sini koruyabildiği bildirilmiş, 9. kullanımda ise aktivitenin %35'e kadar indiği rapor edilmiştir [109].

Buna bağlı olarak çalışmamız da 20 kullanımdan sonra dahi enzim aktivitesinin %55'ini koruduğu görülmüştür.

### 5.2.7 Biyotransformasyon



Şekil 5.8. Keratin azurun enkapsüle keratinaz enzimi ile biyotransformasyonu

Keratin ve toplam keratin miktarları hesaplanarak keratinin enkapsüle keratinaz enzimi ile biotransformasyonuna ait grafik Şekil 5.8'de gösterilmiştir.

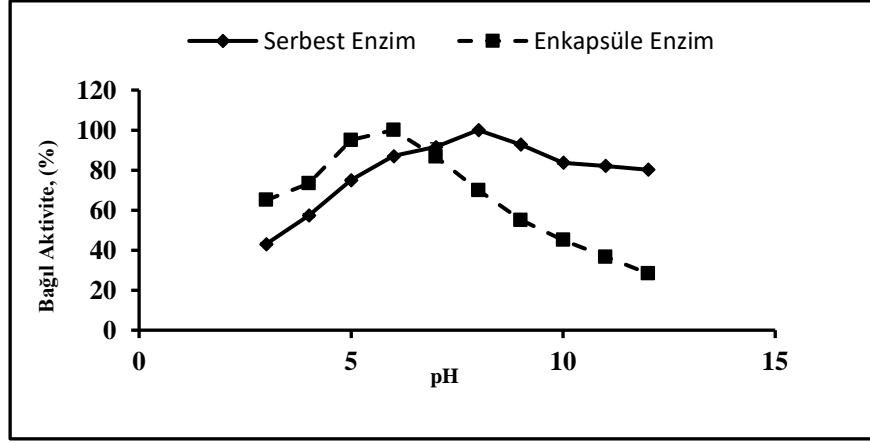
Çalışmamızda başlangıç konsantrasyonu 2g olan keratin biotransformasyonunu 60 dakika da tamamlamıştır.

### 5.3. Serbest ve Enkapsüle Enzimde Karakterizasyon Çalışması

#### 5.3.1 Serbest ve enkapsüle enzimde optimum pH

Serbest ve enkapsüle enzim üzerine pH etkisini belirleyebilmek için; 50 mM pH'sı 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12 olan tampon çözeltiler Bölüm 4.2.7.1.'de anlatıldığı gibi hazırlanıp, bu tamponlar varlığında enzim aktivite tayini yapılmıştır.

En yüksek aktiviteye sahip pH değerine (%100) bağlı olarak diğer pH aralığındaki sonuçların bağıl aktiviteleri (%) hesaplanmış ve sonuçlar % maksimum aktivite olarak pH 'ya karşı Şekil 5.9'de grafiğe geçirilmiştir.



Şekil 5.9. Keratinin farklı pH'larda aktiviteye olan etkisi

Çalışma sonucunda serbest enzim için optimum pH 8, immobilize enzim için optimum pH 6 olarak bulunmuştur.

Enzimatik aktivite enzimin esnek yapısı nedeniyle pH değişimlerinden kolaylıkla etkilenir. Enzim enkapsülasyonunda enzimin mikro ortamının değişmesi nedeniyle immobilizasyon sonrasında optimum pH değişebilir. Bu yüzden enkapsülasyon öncesi ve sonrasında farklı pH'daki aktivitelerin karşılaştırılması yapılmalıdır [111].

Kovalent bağlanma ile aljinat-glutaraldehit boncuklarında nötraz immobilizasyonu çalışmasında; immobilize edilmiş enzimin optimizasyon koşulları ve karakterizasyonu incelenmiştir. Immobilize edilmiş enzimin yüksek aktiviteye sahip olduğu pH aralığının serbest enzime kıyasla önemli ölçüde genişlediğini görülmüştür. Bunun sebebini de immobilize edilmiş enzim moleküllerinin difüzyonel sınırlamalarından kaynaklandığını düşündüklerini bilmişlerdir.

pH, protein yapısındaki amino asitlerin yan gruplarını ve aynı zamanda destek materyalinin de çözelti kimyasını etkileyen önemli faktörlerden biridir. Bu yüzden, proteinin yüzey özellikleri ve protein-destek etkileşimi çözeltinin pH'sı tarafından etkilenir. Çalışmada tampon bileşime bağlı olarak, serbest enzim için pH 8'de çok önemli bir aktivite değişikliği gözlemlendiği fakat immobilize edilmiş enzimin çok daha kararlı olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun sebebini de immobilizasyon işleminin enzime tampon bileşimine karşı bir miktar koruma sağladığı rapor edilmiştir [110].

Başka bir çalışmada, immobilize edilmiş Catepsin B'nin optimum pH değerinin, 6,0'dan pH 6,5'e kaydığı bildirilmiştir. Çalışmada serbest Catepsin B, 4,0-6,5 pH

aralığında kararlı olduğu buna karşın enkapsüle Catepsin B enziminin daha geniş bir pH aralığında (3,5-7,5) kararlı olduğu bildirilmiştir. Bunun nedeninin hareketsiz hale getirilmiş enzimin, ortamdaki pH değişikliklerine karşı daha dirençli olmasından kaynakladığı rapor edilmiştir. Enzim negatif yüklü aljinat matrisine enkapsüle edildiğinde, pozitif iyonları çektiği, bunun da enzimin native formundaki pH'sını değiştirdiği ve optimum pH'da bazik bölgeye kayma ile sonuçlandığı belirtilmiştir [107].

Juliana Silva de Lima ve ark. yaptığı kalsiyum aljinat taneciklerinde *Aspergillus ficuum* tannazın immobilizasyonu çalışmasında ise serbest tannazın, pH'sı 6,0, immobilize edilmiş tannazın pH'sı 5,0 bulunmuştur. Çalışmada immobilizasyonun tannaz enzim aktivitesinde korunduğu rapor edilmiştir [109].

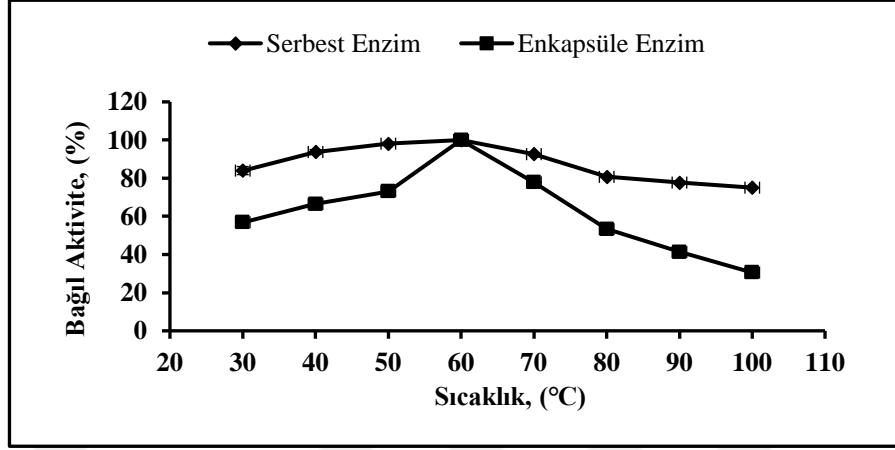
Bu çalışmalar göz önüne alındığında serbest enzim ve immobilize enzim için optimum pH değerinin aynı olmasının yanı sıra farklılıklarda gösterdiği görülmektedir.

Çalışmamızda serbest ve immobilize enzimdeki optimum pH değerlerinin farklı çıkması nedeni yapılan enkapsülasyon işlemi esnasında gluteraldehit çözeltisi kullanılarak yapılan çapraz bağlama işlemidir. Gluteraldehit solüsyonu enzim agregatları oluşmasını sağlamaktadır. Bu agregatların oluşumu esnasında protein molekülü elektrostatik etkileşimle bir araya gelir ve molekül üzerindeki yük değişimlerinden dolayı pH' da kayma olur. Çalışmamızda serbest enzim molekülü için optimum pH değeri 8 iken immobilize enzim için bu değer 6 olarak belirlenmiştir. *Bacillus vallimortis* DSM11031 keratinazı Na-aljinat kürecikleri ile enkapsüle edildiği durumda oluşan elektrostatik etkileşimler çalıştığımız enzimin mikro çevresinde yük değişimlerine neden olmuş ve bu durum da optimum pH değerinde değişikliklere sebep olmuştur.

### **5.3.2 Serbest ve enkapsüle enzimde optimum sıcaklık**

Serbest ve immobilize enzim için 50 mM pH 8 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu ile hazırlanan substratların 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C ve 80 °C, 90 °C ve 100 °C sıcaklıklarda aktivite tayinleri yapılmıştır. En yüksek aktiviteyi gösteren

sıcaklığın değerine (%100) bağlı olarak, diğer sıcaklıkların bağlı aktiviteleri (%) hesaplanmış ve Şekil 5.10'da gösterilmiştir.



Şekil 5.10. Keratin azur substratının farklı sıcaklıklarda aktiviteye olan etkisi

Enkapsülasyon işleminin enzimatik aktiviteyi nasıl etkilediğini bulmak için enkapsüle enzimin sıcaklık parametresi gereklidir [111].

Çalışmamız sonucunda serbest enzim ve enkapsüle enzim için optimum sıcaklık 60 °C olarak bulunmuştur.

Literatürde serbest ve enkapsüle enzim üzerine sıcaklığın etkisini inceleyen çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.

Sıcaklığın serbest ve immobilize edilmiş nötraz aktivitesi üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada 30-80 °C sıcaklık aralığında, serbest enzim için optimum sıcaklık 50 °C, immobilize enzim için bu değer 60 °C olarak bulunmuştur. Optimum sıcaklıktaki artışın immobilizasyonun kovalent bağlanma ile gerçekleşmesi bunun sonucunda da enzim esnekliğinin kaybolmasından ileri geldiğini rapor etmişlerdir [110].

Aida M. Farag ve ark. yapmış olduğu *Aspergillus oryzae* susundan keratinaz üretimi çalışmasında, saflaştırılmış serbest enzim ve immobilize enzim için optimum sıcaklıklar incelenmiştir. Serbest enzim için optimum sıcaklık yaklaşık 50 °C, immobilize enzim için 60 °C olarak bulunmuştur. Bunun sebebi; enzimin immobilizasyonu konformasyonel esnekliğinin azaldığı dolayısıyla enzimin substrata

bağlanması için uygun konformasyonu bulması aktivasyon enerjisini arttırdığı bildirilmiştir [31].

İmmobilize enzimlerde optimum sıcaklığın değişmesi birçok durumda gözlenmiştir, fakat değişimin derecesi destek materyaline ve enzim-destek materyali arasındaki etkileşimin cinsine göre değişir [110]. Bir başka çalışmada ise *Synergistes* sp.'den izole edilen asidik proteaz enziminin aktif karbon parçacıkları üzerine immobilizasyonu incelenmiştir. Çalışmada serbest enzim ve immobilize enzim için optimum sıcaklık değeri 50 °C olarak kaydedilmiştir [112].

Çalışmamızda serbest enzim ve enkapsüle enzim olarak kullanılan *Bacillus vallismortis* DSM11031 keratinazının optimum sıcaklığı değişmemiştir. Optimum sıcaklığın değişmemesini enzimin immobilizasyon sonrasında konformasyonel yapısını korumasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

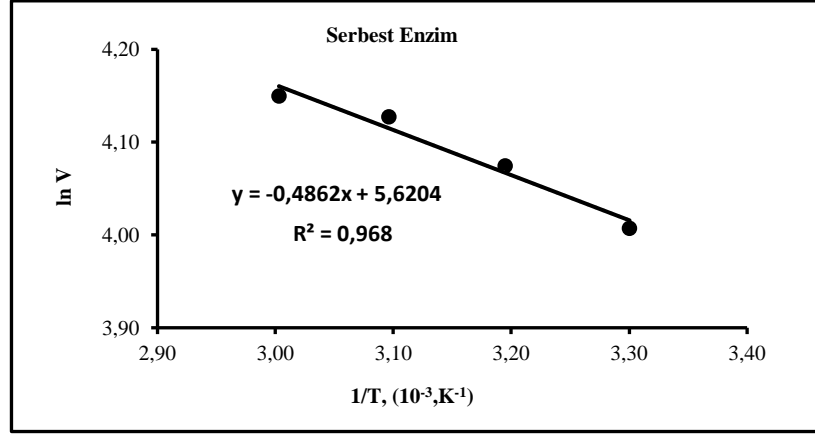
### **5.3.3 Serbest ve enkapsüle enzimde aktivasyon enerjisi**

Kimyasal olarak, bir tepkimenin gerçekleşebilmesi için gereken minimum enerji miktarı aktivasyon enerjisi olarak tanımlanır. Aktivasyon enerjileri, farklı sıcaklıklarda ölçülen deneysel hız sabitlerinden veya difüzyon katsayılarından belirlenir [95].

Reaksiyonun başlaması için gerekli olan aktivasyon enerjisinin belirlenmesi için Şekil 5.11. ve Şekil 5.12.'de gösterilen grafikler çizilmiştir.

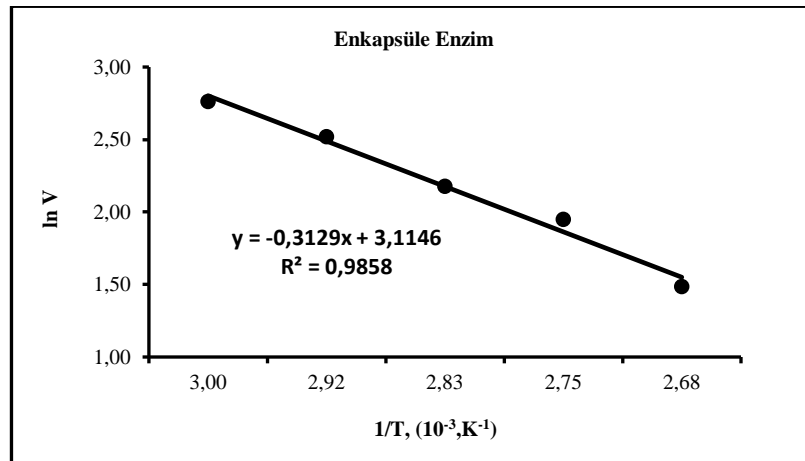
Arrhenius eşitliğinden yararlanılarak çizilen grafikte eğim  $-E_a/RT$  'ye eşit olduğundan aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) serbest enzim ve enkapsüle enzim için sırasıyla 4,042 (kJ/mol) ve 2,0602 (kJ/mol) olarak hesaplanmıştır.





Şekil 5.11. Serbest enzim için Arrhenius grafiği

Kovalent bağlanma ile aljinat-glutaraldehit boncuklarında nötraz immobilizasyonu çalışmasında, serbest enzimin aktivasyon enerjisinin 42.7 (kJ/mol), immobilize enzimin aktivasyon enerjisinin ise 22.0(kJ/mol) olduğunu rapor edilmiştir [110]. Aida M. ve ark. yaptığı çalışmada ise, serbest ve immobilize edilmiş keratinaz için aktivasyon enerjilerinin sırasıyla 12.16 ve 41.86 kcal / mol olduğu kaydedilmiştir. Aktivasyon enerjisindeki artışı, enzim immobilizasyonun konformasyonel esnekliği azaltması, böylece molekülün substrata bağlanmak için uygun konformasyona ulaşması için daha yüksek bir aktivasyon enerjisine ihtiyaç duymasından kaynaklandığı rapor edilmiştir [31].



Şekil 5.12. Enkapsüle enzim için Arrhenius grafiği

Çalışmamızda enkapsüle enzimin aktivasyon enerjisinin serbest enzimin aktivasyon enerjisinden düşük olduğunu görmekteyiz. Bunun iki tür sebebi olabilir;

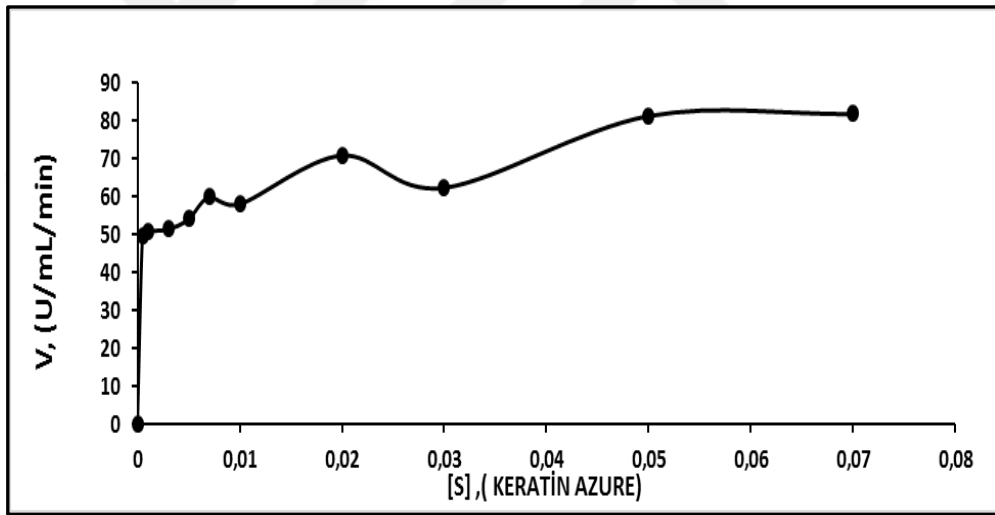
- Enkapsüle enzimin substratını serbest enzime göre daha kolay katalizleyebilmesinden kaynaklanabilir.

- Enzimi çapraz bağlamak için kullanılan gluteraldehit solüsyonu enzim üzerinde agregat oluşmasına neden olur. Agregat oluşumu enzimin kataliz yeteneğini arttırmış olabilir.

### 5.3.4 Serbest ve enkapsüle enzimlerin $K_m$ ve $V_m$ değerleri

Serbest ve immobilize enzimin  $K_m$  ve  $V_m$  değerlerini hesaplamak için Michaelis-Menten eşitliğinden yararlanılarak çizilen grafik Şekil 5.13’de gösterilmiştir.

Grafikten yararlanılarak enzimin  $K_m$  ve  $V_m$  değerlerini belirlemek üzere Lineweaver-Burk diyagramını çizmek için çalışılacak keratin azur konsantrasyon aralığı 0,005 - 0,07 g olarak belirlenmiştir.



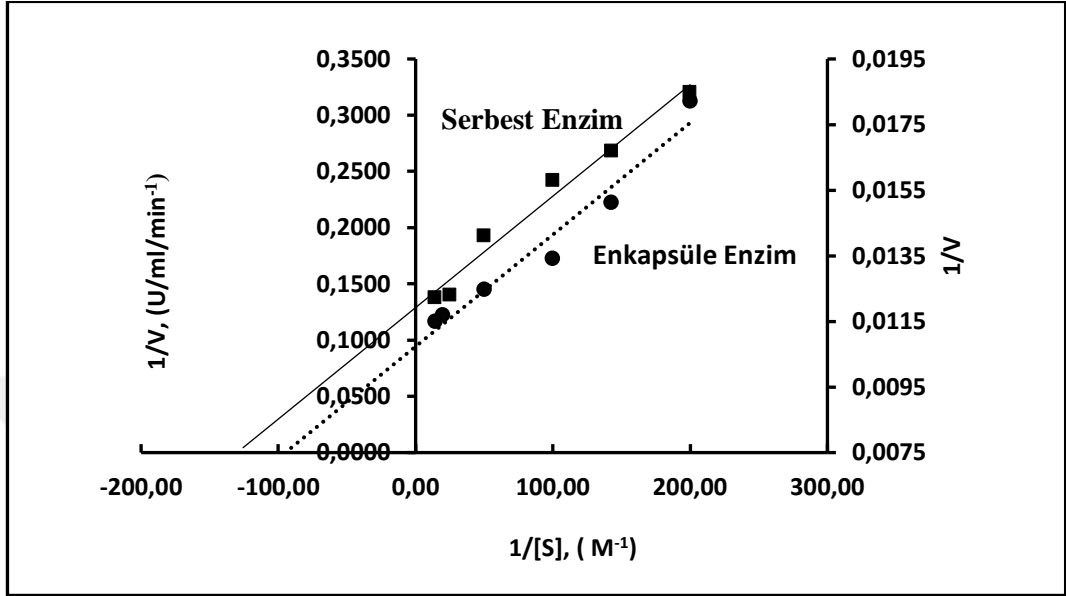
Şekil 5.13. V- [S] grafiği

Bu konsantrasyon aralığında serbest enzim ve enkapsüle enzim için çizilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 5.14’te gösterilmiştir.

Keratin substratı için serbest enzim ve immobilize enzimin Michael Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_m$ ) değerleri Denklem (4.5) ve (4.6)’dan yararlanılarak bulunmuş ve Tablo 5.1 verilmiştir.

İmmobilize enzimin mikro-çevresi enzimin karakteristik davranışının belirlemesinde önem taşımaktadır [111]. Bizim çalışmamızda da sodyum aljinat ile enkapsüle

edilmiş keratinaz enziminin, keratin azur substratını katalizleme esnasında  $K_m$  ve  $V_m$  değerlerinin immobilizasyondan etkilendiği gözlenmiştir. Sonuçlar Tablo 5.1’de verilmiştir.



Şekil 5.14. Serbest ve enkapsüle enzim için Lineweaver-Burk diyagramı

Natividad Ortega ve ark. yaptığı çalışmada serbest ve immobilize edilmiş nötrazın katalitik aktivitesi (sustratı kazein olacak şekilde) gerçekleştirilmiştir. Serbest enzim için  $K_m$  değeri  $2,4 \text{ mg ml}^{-1}$  olurken immobilize enzim için bu değer  $6,4 \text{ mg ml}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Çalışmada immobilize enzimin serbest enzime göre daha büyük  $K_m$  değerine sahip olduğu görülmektedir. Immobilize enzimin  $K_m$  değerindeki artışı, destek materyali tarafından aktif bölge engellendiği ya da substratın bağlanması için gerekli enzim esnekliğinin kaybolduğu, dolayısıyla serbest enzimin substratına olan afinitesinin daha yüksek olduğu şeklinde açıklanmıştır [110] Bir başka çalışmada ise; organo-bentonit ile immobilize edilmiş alkalin proteaz enziminin, kazein substratını katalizleme esnasında  $K_m$  ve  $V_m$  değerlerinin immobilizasyondan etkilendiği gözlenmiş olup  $K_m$  ve  $V_m$ 'in sırasıyla  $6,05 \times 10^{-6}$  ve  $27,3 \times 10^{-6}$  kat arttığı belirlenmiştir. [87]

Swati Sharma ve ark. yapmış olduğu Katepsin B'nin immobilize edilmiş formunda  $K_m$  değeri  $1.52 \text{ mM}$  olarak bulunurken serbest formunda  $K_m$  değeri  $1.02 \text{ mM}$  olarak bulunmuştur. Çalışmada  $K_m$  değerindeki artışın sebebinin kapsül zarının substratların aktif bölgeye ulaşmasında direnç göstermesinden kaynaklandığı bildirilmiştir [107]. Sanaa Tawfik El-Sayed ve ark. tarafından gerçekleştirilen

çalışmada, serbest proteaz enziminin  $V_m$  değeri 24.57 U / mg olarak kaydedilirken, immobilize edilmiş marul proteazının  $V_m$  değeri 142.86 U / mg'ye yükseldiği bildirilmiştir [113].

Ana P.M. Tavares ve ark. karbon nanotüpler üzerinde lakkaz immobilizasyonu gerçekleştirmişlerdir. İmmobilizasyonda elde edilen  $K_m$  ve  $V_m$  değerleri, serbest enzim için sırasıyla 0.0068 ve 1.416 mM / dk, immobilize lakkaz enzimi için ise 0.1920 ve 0.586 mM / dk bulunmuştur. Bu sonuçlar, serbest ve immobilize lakkaz enziminin farklı davranışlara sahip olduğunu göstermektedir. İmmobilize enzim için  $K_m$  değerindeki 28 katlık artışı; substratın, immobilize edilmiş enzimin aktif bölgesinin bir kısmına ulaşamadığından dahili difüzyon kısıtlamaları nedeniyle kütle transferi sınırlamaları olduğu bildirilmiştir İmmobilize lakkazın  $V_m$  oranının, serbest enzime kıyasla yaklaşık 2,4 kat azaldığı rapor edilmiştir.  $V_m$ 'deki bu düşüş, serbest ve immobilize edilmiş enzimleri karşılaştıran literatürde bildirilen sonuçlarla uyum içindedir [114].

Literatürde rapor edilen çalışmalara benzer olarak bizim çalışmamızda immobilize enzimin  $K_m$  değerinin artması enzimin substratına olan afinitesinin azalması ile ilişkilendirilebilir. Bu durumun immobilizasyondan kaynaklanan enzimin mikro-çevresindeki elektrostatik ve muhtemel konformasyonel değişikliklerden kaynaklandığı ve substratın enzimin aktif bölgesine ulaşmada zorlandığını düşünmekteyiz. Maksimum hızın ( $V_m$ ) azalması da beklenen bir sonuçtur.

Enzimin substratına doygun olduğu anlarda, bir molekül enzimin birim zamanda ürüne dönüştürülen substrat miktarını ifade eden  $k_{cat}$  değeri denklem (4.6)'dan yararlanılarak serbest enzim ve enkapsüle enzim için sırasıyla 58,8 dk<sup>-1</sup> ve 9,8 dk<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Enzimin katalitik performansını ifade eden  $k_{cat}/K_m$  değerleri serbest enzim ve enkapsüle enzim için sırasıyla  $1,96 \times 10^4$  (dk<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>) ve  $8,91 \times 10^2$  (dk<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>) olarak hesaplanmıştır. Bu kinetik parametreler Tablo 5.3'de ayrıca gösterilmiştir.

*Bacillus subtilis*'dan elde edilen nötral proteaz enziminin kitosan (CS), karboksimetil kitosan (CMCS) ve N-süksinil kitosan (NSCS) hidrojel boncukları ile immobilizasyon çalışmasında, birim zamanda ürüne dönüştürülen substrat miktarını ifade eden  $k_{cat}$  değeri serbest nötral proteaz enzimi için 0,072 (dk<sup>-1</sup>) olarak rapor

edilmiştir. CS, CMCS ve NSCS hidrojel boncukları ile yapılan immobilizasyonda elde edilen  $k_{cat}$  değerleri sırasıyla 0,054 ( $dk^{-1}$ ), 0,144 ( $dk^{-1}$ ) ve 0,146 ( $dk^{-1}$ ) olarak belirlenmiştir. Farklı immobilizasyon destekleri için elde edilen sonuçlara göre en yüksek katalitik etkinliğe sahip destek materyalinin NSCS olduğu bildirilmiştir [115].

Tez çalışmamızda enkapsüle *Bacillus vallismortis* DSM11031 keratinazının Na-aljinat kürecikleri ile enkapsülasyonu sonucu enkapsüle enzimin  $k_{cat}$  değerinin serbest enzime oranla 6 kat azaldığı görülmüştür. Bunun nedeni immobilizasyon sonucu oluşan elektrostatik değişikliklerin enzimin substratı ile olan etkileşimini azalttığını ve bunun sonucu olarak da katalitik hızın azaldığı düşünülmektedir.

Enzimin katalitik etkinliğinin en iyi açıklaması  $k_{cat}/K_m$  ile ifade edilir. Bu tanım, enzimin katalitik performansını belirler [115].

*Bacillus subtilis*'dan elde edilen nötral proteaz enziminin kitosan (CS), karboksimetil kitosan (CMCS) ve N-süksinil kitosan (NSCS) hidrojel boncukları ile immobilizasyon çalışmasında, enzimin katalitik performansını ifade eden  $k_{cat}/K_m$  değeri serbest nötral proteaz enzimi için 0.157 ( $dk^{-1}$ ) olarak rapor edilmiştir. CS, CMCS ve NSCS hidrojel boncukları ile yapılan immobilizasyonda elde edilen  $k_{cat}$  değerleri sırasıyla 0.140 ( $dk^{-1}$ ), 0.101 ( $dk^{-1}$ ) ve 0.210 ( $dk^{-1}$ ) olarak belirlenmiştir. İmmobilize nötral proteaz enziminin  $k_{cat}/K_m$  değeri CMCS ve NSCS için artış gösterirken CS için azalma gösterdiği rapor edilmiş ve en iyi  $k_{cat}/K_m$  oranına sahip immobilizasyon desteğinin en iyi seçim olacağını bildirmiştir [115].

Mohapatra ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada serbest enzime oranla immobilize enzimde,  $k_{cat}/K_m$  değeri 19,94  $\mu Mh^{-1}$ 'den 39,66  $\mu Mh^{-1}$ 'e artış gösterdiği bildirilmiştir [116].

Sanaa Tawfik El-Sayed ve ark. gerçekleştirdiği *Lactuca sativa* (marul) tohumlarından elde edilen immobilize marul proteazı, kovalent bağ ile aljinat-glutraldehit boncuklar üzerinde immobilize edilmiş ve immobilize edilen enzimin  $k_{cat}/K_m$  değeri 13.963  $dk^{-1} M^{-1}$ , serbest enzimin  $k_{cat}/K_m$  değeri ise 2.143  $dk^{-1} M^{-1}$  olduğu bildirilmiştir.  $V_{max}$ ,  $K_{cat} / K_m$ 'deki artış, aljinatlar içerisinde enkapsüle proteazın konformasyonel yapısının daha verimli olmasından kaynaklanabildiği ifade

edilmiştir. Aljinat boncuklarıyla immobilize edilmiş marul proteazının aktivitesi ve substrata karşı yüksek afinitesi, uygulanan desteğin ve immobilizasyon yaklaşımının etkinliğini gösterdiği ve immobilize enzimin katalitik performansının serbest enzimin katalitik performansından daha yüksek olduğunu rapor edilmiştir [113].

Literatürdeki bulgulara benzer olarak tez çalışmamızda enkapsüle *Bacillus vallismortis* DSM11031 keratinaz enzimimizin  $k_{cat}/K_m$  değerinin serbest *Bacillus vallismortis* DSM11031 keratinaz enzimimizin  $k_{cat}/K_m$  değerinden yaklaşık 22 kat daha düşük çıktığı gözlenmiştir. Bu da enzimimizin immobilize edildikten sonra katalitik performansının azaldığını göstermektedir.

Tablo 5.3. Serbest enzim ve immobilize enzimin kinetik parametreleri

	Serbest Enzim	İmmobilize Enzim
$K_m$ (M)	0,003	0,011
$V_m$ (U/mL/min)	83,33	10,83
$k_{cat}$ (dk <sup>-1</sup> )	58,8	9,8
$k_{cat}/K_m$ (dk <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$1,96 \times 10^4$	$8,91 \times 10^2$

### 5.3.5. Serbest ve immobilize enzimin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi

Tablo 5.4 Serbest ve enkapsüle keratinaz enziminin, 40 °C ve pH 8’de keratin azur ile hidrolizi için elde edilen termodinamik parametreleri

Parametre	Serbest Enzim	İmmobilize Enzim	Birim
	Sonuç	Sonuç	
$\Delta G^{\#}_{E-T}$	$-2,57 \times 10^4$	$-1,77 \times 10^4$	kJ/mol
$\Delta G^{\#}_{ES}$	$-1,51 \times 10^4$	$-1,17 \times 10^4$	kJ/mol
$\Delta H^{\#}$	$-2,60 \times 10^3$	$-2,60 \times 10^3$	kJ/mol
$\Delta G^{\#}$	6,02	7,08	kJ/mol
$\Delta S^{\#}$	-2,20	-2,35	kJ/molK

*Bacillus vallismortis* DSM11031 izolatından elde edilen keratinaz enziminin serbest ve enkapsüle yapısının, keratin azur ile hidrolizi için bulunan termodinamik parametreleri ( $\Delta G^{\#}_{ET}$ ,  $\Delta G^{\#}_{ES}$ ,  $\Delta H^{\#}$ ,  $\Delta G^{\#}$ ,  $\Delta S^{\#}$ ), Eşitlik (4.9-4.13)’ten yararlanılarak hesaplanmış ve Tablo 5.4’de gösterilmiştir.

Bidyut R. Mohapatra ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Arthrobacter* türlerinden FR-3'ten izole edilen doğal ve DEAE-selüloz immobilize sülfür oksidazın immobilizasyonu üzerine 293 °K, 298 °K, 303 °K, 308 °K, 313 °K, 318 °K ve 323 °K'de kinetik ve termodinamik özellikler incelenmiştir. Çalışmada sülfür oksidasyonunun doğal formu için 293 °K, 298 °K, 303 °K, 308 °K, 313 °K, 318 °K ve 323 °K'de geçiş bağlanma serbest enerjisi ( $\Delta G^{\#}_{E-T}$ ) (kJ/mol) değerleri sırasıyla -3,20, -5,95, -7,54, -10,28, -8,28, -5,79, -3,03 iken immobilize form için sırasıyla -4,32, -7,51, -9,27, -12,31, -10,13, -6,62, -4,84 olarak rapor edilmiştir. Tüm sıcaklık denemelerinde sülfür oksidazın immobilize formu için  $\Delta G^{\#}_{E-T}$  değerinde azalma olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada substrat bağlanma enerjisi ( $\Delta G^{\#}_{ES}$ ) değerine de bakılmıştır. Serbest enzim için  $\Delta G^{\#}_{ES}$  (kJ/mol) değeri 293 °K, 298 °K, 303 °K, 308 °K, 313 °K, 318 °K ve 323 °K'de sırasıyla 13,87, 12,91, 12,71, 12,09, 13,03, 13,95, 15,16 iken immobilize enzim için sırasıyla 13,76, 12,87, 12,63, 11,76, 12,97, 13,87, 15,12 olarak rapor edilmiştir. Tüm sıcaklık denemelerinde yapılan çalışmalarda serbest enzimin  $\Delta G^{\#}_{ES}$  değerinin immobilize enzimin  $\Delta G^{\#}_{ES}$  değerinden daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Sülfür oksidazın immobilizasyonun termodinamik analizi sonucuna göre; immobilizasyonun, enzim-substratı aktif hale getirmek için gereken enerjiyi azaltarak sülfür oksidazın kalitesini arttırdığını göstermektedir. Termodinamik veriler ayrıca, immobilize enzimin, geçiş halini oluşturmak için daha az serbest enerjiye ( $\Delta G^{\#}_{E-T}$ ) ihtiyaç duyduğunu gösterirken, doğal enzim tarafından daha fazla enerjinin gerekli olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada serbest enzimin  $\Delta G^{\#}_{ES}$  değerinin immobilize enzimin  $\Delta G^{\#}_{ES}$  değerinden daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Serbest enzim, immobilize edilmiş enzime kıyasla, immobilize edilmiş enzimden farklı sıcaklıklarda daha yüksek  $\Delta G^{\#}_{ES}$  sergilemiştir, bu da sülfür oksidaz kalıntılarının doğal enzimin aktif alanına daha gevşek bir şekilde bağlandığını göstermesinden kaynaklandığı bildirilmiştir [116].

Duman ve ark. tarafından gerçekleştirilen *Bacillus clausi* serin alkalin proteazının su ile karışabilen organik çözücüler varlığında katalitik performansının incelendiği çalışmada; substrat bağlanmasındaki serbest enerjisinin ( $\Delta G^{\#}_{ES}$ ), substrat molekülü üzerindeki bütün bağlama grupları enzimin bağlanma bölgesiyle eşleştğinde (enzim – substrat tamamlayıcılığı) maksimum olduğu bulunmuştur. Fakat enzimin aktif bölgesinin tamamlayıcısı substrat molekülünün geçiş hali formu ( $S^{\#}$ ) olduğu

durumda biyokimyasal reaksiyonunun kendiliğinden gerçekleşme durumu daha olası olduğu ifade edilmiştir. Bu gibi durumlarda, substrat molekülünün konformasyonel değişimi nedeniyle, substrat bağlanması serbest enerjisi artar ve aktivasyonun serbest reaksiyon enerjisi azalır [117].

Tez çalışmamızda immobilize enzimin substrat bağlama serbest enerjisi; serbest *Bacillus vallismortis* DSM11031 keratinaz enziminin substrat bağlama serbest enerjisi ( $\Delta G^{\#}_{ES}$ )'nden daha yüksek bulunmuştur. Bu durum enzimin aktif bölgesinin tamamlayıcısı olarak substrat molekülünün geçiş hali formu olduğunu göstermektedir ki bu tamamlayıcılık çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz biyokimyasal reaksiyon açısından avantaj sağlamaktadır. Çalışmamızda Duman ve ark. [117] ifade ettiği gibi  $\Delta G^{\#}_{ES}$ 'nin arttığı durumlarda gözlenen aktivasyon enerjisi düşüşü de gözlenmiştir, dolayısıyla bu iki bulgu birbirini desteklemektedir. Çalışmamızda gözlemlendiğimiz immobilize enzimin  $\Delta G^{\#}_{E-T}$  değerinin serbest enzimin  $\Delta G^{\#}_{E-T}$  değerinden daha yüksek olması; tranzisyon hali oluşumu için gerekli olan enerjinin de arttığının ifadesidir. Bu sonuç ile immobilize keratinazın, keratin azur substratını katalizlemek üzere oluşturduğu keratinaz-keratin-azur kompleksi için gerekli olan enerji serbest enzimden fazladır.

Mohamed A. Abdel-Naby ve M.H. A. Ibrahim, H.A. El-Refai tarafından yapılan çalışmada Aktive pektin ile konjuge *Bacillus pumilus* DH9 keratinazın katalitik, kinetik ve termodinamik özellikleri üzerine çalışılmıştır. Çalışmada serbest enzimin aktivasyon entalpisi, ( $\Delta H^{\#}$ ), Gibbs serbest enerjisi, ( $\Delta G^{\#}$ ), aktivasyon entropisi, ( $\Delta S^{\#}$ ) sırasıyla 3.278 kJ/mol, 57.42 kJ/mol ve -157 kJ/mol olarak kaydedilmiştir. Aynı parametreler immobilizasyon sonrasında sırasıyla 2.106 kJ/mol, 58.426 kJ/mol ve -164. kJ/mol olarak rapor edilmiştir. Doğal ve konjuge enzimler tarafından keratin hidrolizinin termodinamik verileri incelendiğinde konjuge enzim formunun entalpi aktivasyonu ( $\Delta H^{\#}$ ), serbest enzimin entalpi aktivasyon enerji değerinden düşük bulunmuştur. Çalışmada aktivasyon entropisi ( $\Delta S^{\#}$ ), konjuge enzim formu için daha düşük bulunmuştur. Ayrıca Gibbs serbest enerjisi ( $\Delta G^{\#}$ ), konjuge enzim formunda daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir [117].

Enzim katalizli hidrolitik reaksiyonun sürdürülebilirliği  $\Delta G^{\#}$  parametresinin değeri ile ölçülür. Bu parametre  $ES^{\#}$  tranzisyon hali kompleksinin ürüne dönüşümünü ifade



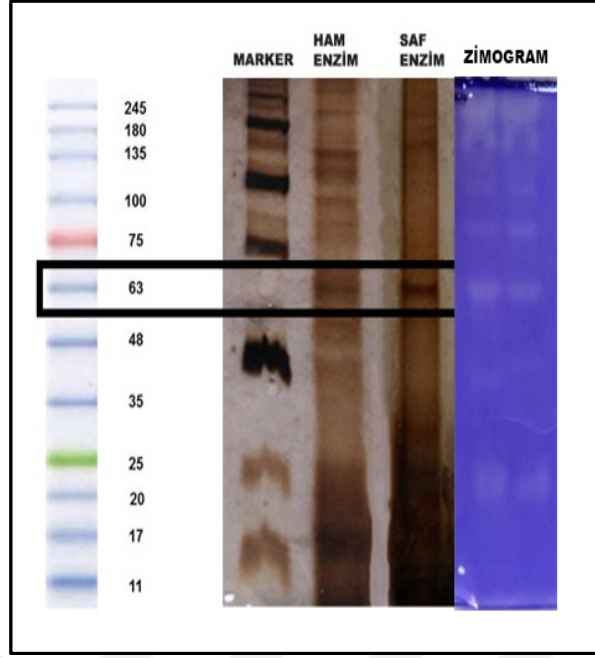
etmektedir. Yüksek  $\Delta G^\#$  ürün oluşumu için gerekli olan enerji miktarını ifade etmektedir ki; tez çalışmamızda Tablo 5.2'de gösterildiği gibi immobilize enzimin  $\Delta G^\#$  değeri artmıştır. Bu sonuç da immobilize enzimin oluşturduğu ES<sup>#</sup> kompleksinin ürün oluşturmak için, serbest enzimden daha fazla enerjiye ihtiyaç duyduğunu göstermektedir. Entalpi değerinin negatif olması reaksiyonun kendiliğinden gerçekleşmesini ifade eder ve reaksiyonun ekzotermik olduğunu gösterir.

$\Delta S^\#$  ise hidroliz reaksiyonunun spontanlığı hakkında bilgi verir. Yüksek  $\Delta S^\#$  değerlerinin kataliz reaksiyonları üzerindeki etkisi negatif yöndedir. Çalışmamızda ES<sup>#</sup> kompleksinden ürün oluşumu için immobilize enzim varlığında gerekli olan enerji serbest enzim varlığında gerekli olan enerjiden daha fazla olmasına rağmen,  $\Delta S^\#$  değerinin immobilize enzim varlığında serbest enzimden daha düşük olması sebebiyle reaksiyonun spontanlığının daha olası olduğunu düşündürmektedir.

Enzimatik reaksiyonların aktivasyon entalpisi  $\Delta H^\#$  ile ifade edilir. Bu parametrenin düşük değerli olması tranzisyon halinde enzim-substrat kompleksinin daha yüksek verim ile oluştuğunun göstergesidir. Çalışmamızda keratinaz enziminin enkapsülasyonundan sonra  $\Delta H^\#$  değeri değişmemiştir. Bu da enkapsülasyon işleminin keratinaz enziminin hidroliz reaksiyonunun aktivasyon entalpisini etkilemediğinin göstergesidir.

### **5.3.6. Keratinaz enziminin elektroforez çalışması**

Şekil 5.13'te alkalin proteaz enziminin elektroforez işlemi sonucundaki görüntüsü verilmiştir. Burada SDS-PAGE analiziyle ham enzim ve saflaştırılan enzimin 63 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu ve bunun da literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür [15]. Bu sonuç, Native-PAGE ve zimogram analizleriyle de desteklenmiştir.



Şekil 5.15. keratinaz enziminin elektroforez analizi, (1:marker, 2:ham enzim, 3: kısmı saflaştırılmış enzim, 4 :zimogram, her kuyucuğa 14 ml enzim yüklenmiştir).

Worapot Suntornsuk keratinazın termostatik bir tüy bozundurucu bakteriden saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmasında *Bacillus licheniformis* den saflaştırdıkları keratinaz enziminin SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarının 35 kDa [33], Philippe Bressollier ve ark. yaptığı bir çalışmada *Streptomyces albidoflavus*'den saflaştırılan keratinolitik serin proteinazının SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarının 20 kDa [16], Suppiah ve ark. *Aspergillus oryzae*.'den izole ettikleri keratinaz enziminin SDS-PAGE analizi sonucunda molekül ağırlığı 60 kDa olarak bulunduğu kaynaklarda rapor edilmiştir [31].

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızda *Bacillus vallismortis* DSM11031 keratinaz enziminin Na-aljinat kürecikleri ile enkapsülasyonu incelendi ve optimizasyon, kinetik ve termodinamik parametreleri çalışıldı.

Çalışmamızda *Bacillus vallismortis* DSM11031 keratinaz enzimi sırasıyla amonyum sülfat tuz çöktürmesi (%80), diyaliz ve termal presipitasyon yöntemleriyle kısmi olarak saflaştırıldı. Çalışmayı desteklemek amacıyla elektroforez ve zimogram işlemleri yapılmış olup kısmi saflaştırmanın gerçekleştirildiği ispatlandı.

Çalışmamızda *Bacillus vallismortis* DSM11031 keratinaz enziminin molekül ağırlığı 63 kDa olarak bulundu.

Na-aljinat kürecikleri içerisine *Bacillus vallismortis* DSM11031 keratinaz enziminin optimizasyon çalışmaları sonucunda en iyi optimizasyon koşulları; %6 aljinat, %9 glutraldehit (1 gr boncuk-10 ml glutraldehit olacak şekilde) 30 dk muamele süresi, 90 dakika enzim muamele süresi (1 g boncuk-1 ml enzim olacak şekilde) şekilde optimize edildi ve verim %83 olarak bulundu.

Enkapsülasyon işlemi sonrasında substratını katalizleme yeteneği açısından aktivasyon enerjisini incelediğimizde, enkapsüle enzimin aktivasyon enerjisinin serbest enziminkinden düşük olduğu bulundu. Bu durum bize enkapsüle enzimin substratını, serbest enzime göre daha kolay katalizlediğini gösterdi. Enkapsülasyon işlemi sırasında glutraldehit kullanarak agregatların oluşmasının enzimin kataliz yeteneğini arttırdığı görüldü. Dolayısıyla kullanılan destek materyalinin elde etmiş olduğumuz sonuçlara göre endüstriyel olarak tercih edilebileceğini düşünmekteyiz.

Serbest enzim için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 8 ve 60 °C, immobilize enzim için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 6 ve 60 °C olarak bulundu.

Arrhenius aktivasyon enerjileri ( $E_a$ ) serbest enzim ve immobilize enzim için sırasıyla 4,042 kJ/mol ve 2,601 kJ/mol olarak hesaplandı.

40 °C’de pH 8’de her iki enzim için Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hızı ( $V_m$ ) serbest enzim için sırasıyla  $2,5 \times 10^{-3}$  M ve 83,33 U/mL/min, immobilize enzim için sırasıyla 0,011 M ve 10,83 U/mL/min olarak bulundu. Enzimlerin turnover sayısı ( $k_{cat}$ ) ve katalitik performansı ( $k_{cat}/K_m$ ) serbest enzim için sırasıyla  $58,8 \text{ dk}^{-1}$  ve  $1,96 \times 10^4 \text{ dk}^{-1}\text{M}^{-1}$ , enkapsüle enzim için sırasıyla  $9,80 \text{ dk}^{-1}$  ve  $8,91 \times 10^2 \text{ dk}^{-1}\text{M}^{-1}$  olarak bulundu.

*Bacillus vallismortis* DSM11031 keratinazının termodinamik parametreleri de incelendi. Serbest enzimin termodinamik parametreleri;  $\Delta G^\ddagger$ :  $6,62 \times 10^4$  kJ/mol;  $\Delta G^\ddagger_{E-T}$ :  $-2,57 \times 10^4$  kJ/mol;  $\Delta G^\ddagger_{ES}$ :  $-1,51 \times 10^4$  kJ/mol;  $\Delta H^\ddagger$ :  $-2,60 \times 10^3$  kJ/mol;  $\Delta S^\ddagger$ :  $-2,20 \times 10^2$  kJ/molK ve enkapsüle enzimin termodinamik parametreleri  $\Delta G^\ddagger$ :  $7,08 \times 10^4$  kJ/mol;  $\Delta G^\ddagger_{E-T}$ :  $-1,77 \times 10^4$  kJ/mol;  $\Delta G^\ddagger_{ES}$ :  $-1,17 \times 10^4$  kJ/mol;  $\Delta H^\ddagger$ :  $-2,60 \times 10^3$  kJ/mol;  $\Delta S^\ddagger$ :  $-2,35 \times 10^2$  kJ/molK olarak bulundu.

Enzim immobilizasyon çalışmalarında en önemli parametrelerden birisi de enzimin tekrar kullanılabilirliğidir. Bu çalışmada 12 deneme boyunca enzimin aktivitesini %90 koruduğu, 20. denemeden itibaren ise kalan aktivitenin %55 olduğu belirlendi.

Aljinat; yüksek verimin elde edilmesi, tekrar kullanılabilir olması ve yüksek katalitik performanstan dolayı endüstriyel uygulamalar için potansiyel güce sahip olan bir destek materyalidir. Aynı zamanda bol miktarda bulunması, kolay ulaşılabilir olması ve maliyetinin düşük olmasından dolayı da enzim immobilizasyon/enkapsülasyon işlemlerinde tercih edilebilir.

## KAYNAKLAR

- [1] Nelson D.L., Cox M.M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed., Worth Publishers, New York, 2004.
- [2] Robinson P.K., *Enzymes: Principles and Biotechnological Applications*, *Biochem.*, DOI: 10.1042/BSE0590001.
- [3] Wiseman A., *Handbook of Enzymes Biotechnology*, 2nd ed., Halsted Press, Germany, 1987.
- [4] Enez B., *Geobacillus Stearothermophilus'tan Ekstraselüler  $\alpha$ -Amilaz Enziminin İzolasyonu, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 2011, 300004.
- [5] Fox J.W., Shannon J. D., Bjarson J.B., *Proteinase and Their Inhibitors in Biotechnology*, *American Chemical Society*, 1991, **460**, 62-79.
- [6] <http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/sources.html>, (Ziyaret Tarihi: 3 Ekim 2018).
- [7] John F.K., *Enzyme Technology*, 7th ed., VCH Publisher, New York, 1987.
- [8] <https://enzymedica.com/blogs/naturaldigestivehealth/sources-of-enzymes-animal-plant-fungal>,(Ziyaret Tarihi: 3 Ekim 2018).
- [9] <https://www.foodenzymeinstitute.com/content/What-do-Plant-Enzymes-do.aspx>,(Ziyaret Tarihi: 3 Ekim 2018).
- [10] Gerhartz W., *Enzymes in Industry*, 2nd ed., VCH Publishers, Germany, 1990.
- [11] Barredo J. L., *Microbial Enzymes and Biotransformations*, 3rd ed., *Humana Pres*, New Jersey, 2005.
- [12] Kublanov I. V., Tsirolnikov K. B., Kaliberda E. N., Rumsh L. D, Haertle E. T., Osmolovskaya E. A., *Keratinase of an anaerobic thermophilic bacterium Thermoanaerobacter sp. Strain 1004-09 isolated form a hot spring in the Baikal Rift Zone*, *Microbiology*, 2009, **78**(1), 67–75.
- [13] Brandelli A., Daroit D. J., Riffel A., *Biochemical Features of Microbial Keratinases and Their Production and Applications*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, **85**, 1735–1750.
- [14] Voet D., Voet J.G., *Three-dimensional Structure of Proteins*, 2nd ed., Wiley, New York, 1995.

- [15] Kublanov I. V., Tsirolnikov K. B., Kaliberda E. N., Rumsh L. D., Haertle E. T., Osmolovskaya E. A., Keratinase of an Anaerobic Thermophilic Bacterium *Thermoanaerobacter* sp. Strain 1004-09 Isolated From a Hot Spring in the Baikal Rift Zone, *Microbiology*, 2009, **78**(1), 80–95.
- [16] Bressollier P., Letourneau F., Urdacı M., Verneuil B., Purification and Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces Albidoflavus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(6), 2570-2576.
- [17] Shih J. C. H., Recent Development in Poultry Waste Digestion and Feather Utilization – A Review, *Poultry Science*, 1993, **72**, 1617-1620.
- [18] Onifade A. A., Al-Sane N. A., Al-Musallam A. A., Al-Zarban S., A Review: Potentials for Biotechnological Applications of Keratin-degrading Microorganisms and Their Enzymes for Nutritional Improvement of Feathers and Other Keratins as Livestock Feed Resources, *Bioresource Technology*, 1998, **66**, 1-11.
- [19] Riffel A., Lucas F., Heeb P., Brandelli A., Characterization of a New Keratinolytic Bacterium that Completely Degrades Native Feather Keratin, *Arch. Microbiol.*, 2003, **179**, 258-265.
- [20] Suntornsk W., Suntornsuk L., Feather Degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in Submerged Cultivation, *Bioresource Technology*, 2003, **86**, 239-243.
- [21] Eggum B.O., Evaluation of Protein Quality of Feather Meal Under Different Treatments, *Acta Agricul Scand*, 1970, **20**, 230-234.
- [22] Papadopoulos M. C., Boushy E. I., Roodbeen A. R., Ketelaars E. H., Effect of Processing Time and Moisture Content on Amino Acid Composition and Nitrogen Characteristics of Feather Meal Anim., *Feed Sci. Technol.*, 1986, **14**, 279-290.
- [23] Wang X., Parsons C. M., Effect of Processing Systems on Protein Quality of Feather Meals and Hog Hair Meals, *Poultry Science*, 1997, **76**(3), 491- 496.
- [24] Odetallah N. H., Wang J. J., Garlich J. D., Shih J. C. H., Keratinase in Starter Diets Improves Growth of Broiler Chicks, *Poultry Sci.*, 2003, **82**, 664-670.
- [25] Grazziotin A., Pimentel F. A., Jong E.V., Brandelli A., Nutritional Improvement of Feather Protein by Treatment with Microbial Keratinase, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2006, **126**, 135-144.
- [26] Brandelli A., Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond, *Food Bioprocess Technol.*, 2008, **1**, 105-116.

- [27] Lucas F. S., Broennimann O., Febraro I., Heeb P., High Diversity Among Feather-Degrading Bacteria from a Dry Meadow Soil, *Microbial Ecology*, 2003, **45**, 282-290.
- [28] Gupta R., Ramnanı P., Microbial Keratinases and Their Prospective Applications: an Overview, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, **70**, 21-33.
- [29] Kobayashi T., Hakamada Y., Adachi S., Hitomi J., Yoshimatsu T., Koike K., Kawa S., Ito S., Purification and Properties of an Alkaline Protease From Alkalophilic Bacillus sp. KSMK16, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, **43**, 473-481.
- [30] Nam G. W., Lee D. W., Lee H. S., Lee N. J., Kim B., Choe E. A., Hwang, J. K., Suhartono M. T., Pyun Y. R., Native-feather Degradation by Fervidobacterium Islandicum AW-1, A Newly Isolated Keratinase-Producing Thermophilic Anaerobe, *Arch. Microbiol.*, 2002, **178**, 538– 547.
- [31] Farag A. M., Hassan M. A., Purification, Characterization and Immobilization of a Keratinase From Aspergillus Oryzae, *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, **34**, 85-93.
- [32] Cao Z. J., Zhang Q., Wei D. K., Chen L., Wang J., Zhang X. Q., Zhou M. H., Characterization of a Novel Stenotrophomonas Isolate with High Keratinase Activity and Purification of the Enzyme, *Microbiol. Biotechnol.*, 2009, **36**, 181-188.
- [33] Suntornsuk W., Tongjun J., Onnim P., Oyama A. H., Ratanakanokchai K., Kusamra T., Oda K., Purification and Characterisation of Keratinase from a Thermotolerant Feather-Degrading Bacterium, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, **21**, 1111–1117.
- [34] Gessesse A., Hattı-Kaul R., Gashe B. A., Mattiasson B., Novel Alkaline Proteases from Alkaliphilic Bacteria Grown on Chicken Feather. *Enzyme Microbial Technology*, 2003, **32**(5), 519-524.
- [35] Tatineni R., Doddapaneni K. K., Potumarthi R. C., Vellankı R. N., Kandathil M. T., Kolli N., Mangamoorı L. N., Purification and Characterization of an Alkaline Keratinase from Streptomyces sp., *Bioresource Technology*, 2008, **99**(6), 1596-1602.
- [36] Daroit D. J., Correa A. P. F., Brandelli A., Keratinolytic Potential of a Novel Bacillus sp. P45 Isolated from the Amazon Basin Fish Piaractus Mesopotamicus, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009, **63**, 358– 363.
- [37] Brandelli A., Riffel A., Production of an Extracellular Keratinase from Chryseobacterium sp. Growing on Raw Feathers, *Electronic Journal of Biotechnology*, 2005, **8**(1), 35-42.

- [38] Mabrouk M. E. M., Feather Degradation by a New Keratinolytic *Streptomyces* sp. MS-2, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, **24**, 2331-2338.
- [39] Son H. J., Park H. C., Kim H. S., Lee C. Y., Nutritional Regulation of Keratinolytic Activity in *Bacillus Pumilis*, *Biotechnology Letters*, 2008, **30**(3), 461-465.
- [40] Cai C., Zheng X., Medium Optimization for Keratinase Production in Hair Substrate by a New *Bacillus Subtilis* KD-N2 Using Response Surface Methodology, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, **36**, 875-883.
- [41] Lin X., Lee C. G., Casale E. S., Shih J. C. H., Purification and Characterization of a Keratinase from a Feather-Degrading *Bacillus licheniformis* Strain, *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, **58**(10), 3271-3275.
- [42] Bockle B., Galunsky B., Muller R., Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces Pactum* DSM 40530, *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**(10), 3705-3710.
- [43] Thanikaivelan P., Rao J. R., Nair B. U., Ramasami T., Progress and Recent Trends in Biotechnological Methods for Leather Processing, *Trends in Biotechnology*, 2004, **22**(4), 181-188.
- [44] Williams C. M., Lee C. G., Garlich J.D., Shih J. C. H., Evaluation of a Bacterial Feather Fermentation Product, Feather-Lysate, *Feed Protein Poultry Science*, 1991,**70**, 85-94.
- [45] Takami H., Akiba A., Horikoshi K., Cloning, Expression, and Characterization of a Minor Alkaline Protease from *Bacillus* sp. no. AH- 101. *Biosci, Biotechnol Biochem*, 1992, **56**, 510-511.
- [46] Williams C. M., Richter C. S., Mackebzie J. M., Shih J.C.H., Isolation, Identification and Characterization of a Feather-Degrading Bacterium, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**, 1509-1515.
- [47] Lee W. J., Son G. M., Choi C., Production and Purification of Alkaline Protease from *Bacillus* sp. CW-1121, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 1991, **20**, 388-94.
- [48] Bernal C., Cairo J., Coello N., Purification and Characterization of a Novel Exocellular Keratinase from *Kocuria Rosea*, *Enzyme Microbial. Technol.*, 2006, **38**, 49-54.
- [49] Sundararajan S., Kannan C.N., Chittibabu S., Alkaline Protease from *Bacillus Cereus* VITSN04: Potential Application as a Dehairing Agent, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, **111**(2), 128-133.



- [50] Macedo A. J., Da Silva W. O. B., Gava R., Driemeier D., Henriques J. A. P., Novel Keratinase from *Bacillus Subtilis* S14 Exhibiting Remarkable Dehairing Capabilities, *Appl. Environ Microbiol.*, 2005, **71**(1), 594-596.
- [51] Kazan D., Denizci A. A., Kerimak Oner M. N., Erarslan A., Purification and Characterization of a Serine Alkaline Protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42. *J. Ind. Microbiol and Biotechno.*, 2005, **32**, 335- 344.
- [52] Kumar A. G., Nagesh N., Prabhakar T. G., Sekaran N. G., Purification of Extracellular Acid Protease and Analysis of Fermentation Metabolites by *Synergistes* sp. Utilizing Proteinaceous Solid Waste from Tanneries, *Bioresource Technology*, 2008, **99**, 2364-2372.
- [53] Gashe G., Novel Alkaline Proteases from Alkaliphilic Bacteria Grown on Chicken Feather, *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, **32**, 555-600.
- [54] Tanksale A. M., Molecular Aspects of a Fungal Alkaline Protease, doctoral thesis, University of Pune, Division of Biochemical Sciences National Chemical Laboratory, 2001, 411008.
- [55] Shankar S., More S. V., Laxman, R. S., Recovery of Silver From Waste X-Ray Film by Alkaline Protease from *Conidiobolus Coronatus*, *Journal Sci.*, 2010, **6**, 60-69.
- [56] Nakibloglu N., Toscali D., Nisli G., Novel Silver Recovery Method from Waste Photographic Films with NaOH Stripping, *Turk J. Chem.*, 2003, **27**, 127-133.
- [57] Karthikeyan R., Balaji S., Sehgal P. K., Industrial Applications of Keratins, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 2007, **66**, 710-715.
- [58] Sayed S.A., Saleh S.M., Hasan E.E., Removal of Some Polluting Metals from Industrial Water Using Chicken Feathers, *Desanlination*, 2005, **181**(1-3), 243-255.
- [59] Datta M. S., Role of Keratin in Fire Fighting, *Technol.*, 1993, **43**, 297-299.
- [60] Dyke M. S., Blanchard C. R., Timmons S. F., Siller-Jackson A. J., Soluble Keratin Peptide, *Keraplast Technologies*, 2001, **6**, 270.
- [61] Mohorcic M., Torkar A., Friedrich J., Krisrl J., Murdan S., An Investigation Into Keratinolytic Enzymes to Enhance Ungual Drug Delivery, *Int. J. Pharm.*, 2007, **332**, 196-201.
- [62] Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V., Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases, *Microbiology and Molecular Biology*, 1998, **62**(3), 597-635.
- [63] Chibata, I., *Immobilized Enzymes*, 2nd ed., Halsted Press, Tokyo, 1978.

- [64] Tanaka, A. and Kawamoto, T., Cell And Enzyme Immobilization, *Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1999, **8**, 1-830.
- [65] Chibata I., Tosa T., Sato T., Mori T., Mauto Y., Preparation and Industrial Application of Immobilized Aminoacylases, *Fermentation Technology*, 1972, **14**, 383-389.
- [66] Kourkoutas Y., Bekatorou A., Banat I. M., Marchant R., Koutinas A. A., Immobilization Technologies And Support Materials Suitable In Alcohol Beverages Production: A Review, *Food Microbiology*, 2004, **21**, 377-397.
- [67] Guisan J.M., *Methods in Bioteknology: Immobilization of Enzymes and Cells*, 2nd ed., Humana Press, New Jersey, 2006.
- [68] Nedovic V., Willaert R., Fundamentals of Cell Immobilization Biotechnology, *Springer*, 2004, **1**(22), 414-419.
- [69] Hellapandian M., Preparation and Characterization of Alkaline Protease Immobilized on Vermiculite, *Process Biochemistry*, 1998, **33**(2), 169-173.
- [70] Rhim J. W., Physical and Mechanical Properties of Water Resistant Sodium Alginate Films. *Lebensm. Wiss., Technol*, 2004, **37**, 323-330.
- [71] Drury J. L., Mooney Y. D. L., Hydrogels for engineering: Scaffold Design Variables and Applications, *Biomaterials*, 2003, **24**, 4337-4351.
- [72] Simpson N. E., Grant S. C., Gustavsson L., Peltonen V. M., Blackband S. J., Constantinidis I., Biochemical Consequences of Alginate Encapsulation: A NMR Study of Insulin-Secreting Cells, *Biomaterials*, 2006, **27**, 2577-2586.
- [73] Gombotz W. R., Wee S. F., Protein Release from Alginate Matrices, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1998, **31**, 267-285.
- [74] Atkins E. D. T., Mackie W., Nieduszynski I. A., Parker K. D. And Smolko E. E., Structural Components of Alginic Acid. Part I. Results of X-ray Diffraction and Polarized Infrared Studies. *Biopolymers*, 1973, **12**, 1865-1878.
- [75] Atkins E. D. T., Mackie W., Nieduszynski I. A., Parker K. D., Smolko E. E., Structural Components of Alginic Acid. Part II. Results of X-ray Diffraction and Polarized Infrared Studies, *Biopolymers*, 1973, **12**, 1879-1887.
- [76] Rees D. A., Polysaccharide Shapes and Their Interactions-Some Recent Advances Pure, *Appl. Chem.*, 1981, **53**, 1-14.
- [77] Gombotz W. R., Wee S. F., Protein Release from Alginate Matrices, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1998, **31**, 277-295.

- [78] Navarro J. M., Durand G., Modification Of Yeast Metabolism By Immobilization Ontoporous Glass, *European Journal Applied Microbiology And Biotechnology*, 1977, **4**, 243-254.
- [79] Bickerstaff G.F., *Immobilization of Enzymes and Cells*, 2nd ed., Humana Press, Totowa, New Jersey,1997.
- [80] Akan S., Keratinolitik *Bacillus* Sp. Suşlarının İzolasyonu Keratinaz Üretimi Ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2010, 232020.
- [81] Mitz M. A., New Insoluble Active Derivative of an Enzyme as a Model for Study of Cellular Metabolism., *Science*, 1956, **123**, 1076-1077.
- [82] Flor P. Q., Hayashida S., Continuous Production of High-Glucose Syrup by Chitin-Immobilized Amylase, *Biotechnol&Bioengineering*, 1983, **25**(8), 1973-1980.
- [83] Telefoncu A., Immobilization of Alpha-glucosidase in Chitosan Coated Polygalacturonic Acid., *Science*, 1997, **57**, 193-248.
- [84] Taşdelen Ç., Proteaz Enziminin Fiziksel Adsorpsiyon, Kovalent ve İyonik Bağlanma Metodları ile İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2006, 222010.
- [85] Vijayalakshmi R., Kanthimathi M., Parthasarathi R., Nair B.U., Interaction of Chromium (III) Complex of Chiral Binaphthyl Tetradentate Ligand with DNA, *Bioorganic&Medicinal Chemistry*, 2006, **14**, 3300-3306.
- [86] Mahat N.A., Onoja E., Relevant Techniques and Mechanisms for Enzyme Immobilization, *Reserch Gate.*, 2016, **2**, 32-52.
- [87] Şekerli N., *Bacillus Pumilus* Y7 Alkalen Proteazının Bentonit ile Non-Kovalent İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2016, 521698.
- [88] Sertel A., İzmit ve Çevresindeki Topraklardan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2016, 455539.
- [89] Ghasemi Y., Shahbazi M., Safari A., Identification and Characterization of Feather-Degrading Bacteria from Keratin-rich Wastes, *Ann Microbial*, 2012, **62**, 737-744.
- [90] Bradford M. M., Rapid A., Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye-Binding, *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248-254.

- [91] Duman Y., Üçlü Faz Ayrımı (ÜFA) ile Geleneksel Enzim Saflaştırma Tekniğinin Karşılaştırılması; ÜFA ile Saflaştırılan  $\beta$ -Galaktosidazın Termodinamik Özellikleri, *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der. / Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech.*, 2016, **6**(3), 107-117.
- [92] Segel J. H., *Enzyme Kinetics*, 1st ed., Willey Classics Library, New York, 1975.
- [93] Laemmli U. K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 1970, **227**, 680-685.
- [94] Blum H., Beier H., Gross H.J., Improver Silver Staining of Plant Protein, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels, *Electrophoresis*, 1987, **8**(2), 93-99.
- [95] [https://chem.libretexts.org/Core/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry/Kinetics/Modeling\\_Reaction\\_Kinetics/Temperature\\_Dependence\\_of\\_Reaction\\_Rates/The\\_Arrhenius\\_Law/Arrhenius\\_Equation](https://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Kinetics/Modeling_Reaction_Kinetics/Temperature_Dependence_of_Reaction_Rates/The_Arrhenius_Law/Arrhenius_Equation), (Ziyaret Tarihi:13Aralık 2018).
- [96] Segel J. H., *Enzyme Kinetics*, 2nd ed., Willey Classics Library, New York, 1985.
- [97] Zambare V.P., Nilegoankar S.S., Kanekar P.P., Production of an Alkaline Protease by *Bacillus Cereus* MCM B-326 and Its Application as a Dehairing Agent, *World J. Microbiol Biotechnol*, 2007, **23**, 1569-1574.
- [98] Tamilmani P., Umamaheswari A., Vinatagam A., Prakash B., Production of an Extracellular Feather Degrading Enzyme by *Bacillus Licheniformis* Isolated from Poultry Farm Soil in Namakkal District (Tamilnadu), *International Journal of Poultry Science*, 2008, **7**(2), 184- 188.
- [99] Wang X., Li X., Chen L., Xie F., Yu L., Li B., Preparation and Characterisation of Octenyl Succinate Starch as a Delivery Carrier for Bioactive Food Components, *Food Chemistry*, 2011, **126**, 1218-1225.
- [100] Gouin, S., Microencapsulation: Industrial Appraisal of Existing Technologies and Trends, *Trends in Food Science & Technology*, 2004, **15**, 330–347.
- [101] George M., Abraham T.E., Polyionic Hydrocolloids for the İntestinal Delivery of Protein Drugs: Alginate and Chitosan- A Review, *Journal of Controlled Release*, 2006, **114**, 1–14.
- [102] Nualkaekul S., Lenton D., Cook M.T., Khutoryanskiy V.V., Charalampopoul D., Chitosan Coated Alginate Beads for the Survival of Microencapsulated *Lactobacillus Plantarum* in Pomegranate Juice, *Carbohydrate Polymers*, 2012, **90**(3), 1281-1287.
- [103] Gün M., Aljinat-Kitosan Nanopartiküllerin Kolşisin Salınımında Kullanılmasının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 2013, 334667.

- [104] Eroğlu H., Alpar R., Öner L., Chitosan in Steroid Delivery: Formulation of Microspheres by Factorial Design and Evaluation of In-Vitro Release Parameters FABAD, *J. Pharm. Sci.*, 2008, **33**, 144–150.
- [105] Saieb F. M., Boaker S. A., El-Komy H. M., Issa A., Production and Estimation of Keratinase by Immobilized and Free *Bacillus licheniformis* (St. 24), *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2015, **3**(5), 119-122.
- [106] El-Borai A. M., Youssef A. S., El-Salam A. E., El-Assar S. A., Optimization of Keratinase Production by *Aspergillus terreus* Thom by Statistical and Immobilization Methods, *Life Science Journal*, 2013, **10**(3), 1833-1839.
- [107] Sharma S., Mittal A., Gupta V. K., Singh H., Improved Stabilization of Microencapsulated Cathepsin B in Harsh Conditions, *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, **40**, 337–342.
- [108] Asgher M., Bashir F., Hafiz M.N., Iqbal Protease-Based Cross-Linked Enzyme Aggregates with Improved Catalytic Stability, Silver Removal And Dehairing Potentials, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, **118**, 1247–1256.
- [109] Lima J. S., Cabrera M. P., Casazza A. A., Silva M. F., Perego P., Carvalho L. B., Converti A., Immobilization of *Aspergillus Ficum* Tannase in Calcium Alginate Beads and its Application in the Treatment of Boldo (*Peumus boldus*)tea, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, **118**, 1989–1994.
- [110] Ortega N., Mateos M. P., Pilar M. C., Busto M D., Immobilization on Alginate-Glutaraldehyde Beads by Covalent Attachment Agric., *Food Chem.*, 2009, **57**, 109–115.
- [111] 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.
- [112] Kumar G., Swarnalathab S., Kamatchia P., Sekaranb G., Immobilization of High Catalytic Acid Protease on Functionalized Mesoporous Activated Carbon Particles, *Biochemical Engineering Journal*, 2009, **43**, 185-190.
- [113] El-Sayed S. T., Al- Azzouny R. A., Ali O. S., Kinetic and Thermodynamic Properties of Immobilized Lettuce Protease and Its Role in Production of Novel Bile Binding and Tyrosinase Inhibitory Peptides from Some Plant Wastes, *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*, DOI:2413-4929.
- [114] Tavares A. P. M., Silva C. G., Drazic G., Silva A. M. T., 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.

- [115] Li J., Cai J., Zhongc L., Du Y., Immobilization of a Protease on Modified Chitosan Beads for the Depolymerization of Chitosan, *Carbohydrate Polymers*, 2012, **87**, 2697–2705.
- [116] Mohapatra B. R., Gould W. D., Dinardo O., Papavinasam S., Koren D. V., Revie R.W., Effect of Immobilization on Kinetic and Thermodynamic Characteristics of Sulfide Oxidase from *Arthrobacter* Species, *Biochem. and Biotechnol*, DOI: 1082-6068.
- [117] Duman Y., Kazan D., Denizci A. A., Erarslan A., Water Miscible Mono Alcohols Effect on the Proteolytic Performance of *Bacillus clausii* Serine Alkaline Protease, *Appl. Biochem. Biotechnol*, DOI:10.1007/s12010-013-0525-3.
- [118] Mohamed A., Abdel-Naby, M.H. A., Ibrahim H.A., El-Refai, Catalytic, Kinetic and Thermodynamic Properties of *Bacillus Pumilus* FH9 Keratinase Conjugated with Activated Peçtin, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, **85**, 238–245.

## KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

- [1] Duman Y., **Baltürk Y.**, '*Bacillus Vallismortis* DSM11031 keratinaz enzimin sodyum aljinat kürecikleri ile enkapsüle edilmesi', 19. Uluslararası biyoteknoloji Kongresi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 1-3 Aralık, 2017
- [2] Duman Y., **Baltürk Y.**, '*Bacillus Vallismortis* DSM11031 keratinaz enzimin sodyum aljinat kürecikleri ile enkapsüle edilmesi', EurasianSciEnTech 2018, Ankara, 22-23 Kasım, 2018
- [3] **Yasemin Bayer Balturk**, Yonca Avcı Duman, Encapsulation of *Bacillus vallismortis* keratinase with Na-alginate beads, International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology (EurasianSciEnTech 2018), November 22-23, 2018 Ankara, Turkey.

## ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Kocaeli İzmit ilçesinde doğdu. Tavşantepe İlköğretim Okulu'nda ilk ve orta öğrenimi tamamladı. 2006 yılında Kartepe Anadolu Teknik Lisesi Kimya Teknolojisi bölümünden birincilikle mezun oldu. 2010 yılında başladığı Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 2015 yılında mezun oldu. 2016 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında lisansüstü eğitimine başladı. Lisansüstü eğitimine devam etmektedir.

