

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

***Bacillus Pumilus* Y7 ALKALEN PROTEAZININ  
BENTONİT İLE NON-KOVALENT İMMOBİLİZASYONU**

**NECLA CENGİZ ŞEKERLİ**

**KOCAELİ 2018**

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

**KİMYA**  
**ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bacillus Pumilus Y7 ALKALEN PROTEAZININ BENTONİT**  
**İLE NON-KOVALENT İMMOBİLİZASYONU**

**NECLA CENGİZ ŞEKERLİ**

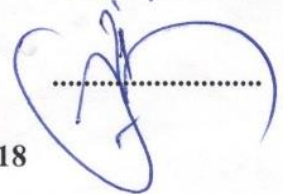
**Dr. Öğr. Üyesi Yonca DUMAN**  
**Danışman, Kocaeli Üniv.**

**Doç. Dr. Olcay MERT**  
**Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.**

**Doç. Dr. Barış BİNAY**  
**Jüri Üyesi, Gebze Teknik Üniv.**







**Tezin Savunulduğu Tarih: 21.05.2018**

## **ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR**

Tez çalışmam sırasında engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, sabrını hiç eksik etmeyen, bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın danışman hocam Doç. Dr. Yonca DUMAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

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

Eğitim hayatım ve kişisel hayatım boyunca her zaman yanımda olan değerli dostum Yasemin BAYER BALTÜRK'e, yüksek lisansa beraber başladığım kıymetli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

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

Çalışmamda ham bentonit tedarikini sağlayan ECZACIBAŞI/ESAN Tuzla İstanbul firmasına teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde her türlü maddi ve manevi özveride bulunarak, beni her konuda daima destekleyen annem Fatma CENGİZ, babam İbrahim CENGİZ ve değerli aileme, tez çalışmamın tamamlanması aşamasında her zaman destekçim olan sevgili eşim Emre ŞEKERLİ'ye minnet ve şükranlarımı sunarım.

Mayıs-2018

Necla CENGİZ ŞEKERLİ

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....	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 Sınıflandırılması .....	2
1.2.1. Oksidoredüktazlar .....	3
1.2.2. Transferazlar .....	3
1.2.3. Hidrolazlar .....	3
1.2.4. Liyazlar .....	3
1.2.5. İzomerazlar .....	3
1.2.6. Liğazlar .....	3
1.3. Enzim İzolasyon Kaynakları .....	3
1.3.1. Hayvansal kaynaklar .....	3
1.3.2. Bitki malzemeleri .....	4
1.3.3. Mikroorganizmalar .....	5
2. PROTEAZLAR.....	6
2.1. Proteazların Sınıflandırılması.....	7
2.1.1. Kaynağına göre proteazlar.....	7
2.1.1.1. Bitkisel proteazlar .....	7
2.1.1.2. Hayvansal proteazlar .....	8
2.1.1.3. Mikrobiyal proteazlar.....	8
2.2. Alkalen Proteazlar .....	9
2.3. <i>Bacillus</i> Cinsi .....	10
3. İMMOBİLİZASYON .....	11
3.1. İmmobilizasyonun Tarihçesi .....	12
3.2. İmmobilizasyon Parametreleri .....	13
3.3. İmmobilizasyonda Kullanılan Bazı Destek Materyalleri .....	13
3.3.1. Aljinat .....	14
3.3.2. Kollajen .....	15
3.3.3. Kitosan.....	15
3.3.4. Agar-Agaroz .....	15
3.3.5. Poliakrilamid ve polianhidritler.....	15
3.4. İmmobilizasyon Teknikleri .....	15
3.4.1. Taşıyıcıya bağlama .....	16
3.4.1.1. Kovalent bağlanma yöntemi .....	17
3.4.1.2. İyonik bağlanma yöntemi.....	17
3.4.1.3. Fiziksel adsorpsiyon yöntemi.....	18

3.4.1.4. Biyospesifik bağlanma yöntemi.....	19
3.4.2. Çapraz Bağlama.....	19
3.4.3. Tutuklama.....	20
4. KİLLER VE ÖZELLİKLERİ .....	22
4.1. Killerin Kullanım Alanları .....	24
4.2. Bentonit Kili .....	25
4.2.1. Bentonit kullanım alanları .....	26
4.3. XRD (X-Işını Kırınım Yöntemi).....	28
5. ELEKTROFOREZ.....	30
5.1. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) .....	30
6. MALZEME VE YÖNTEM.....	31
6.1. Mikroorganizma .....	31
6.2. Kimyasallar .....	31
6.3. Kullanılan Bakteri İzolatları ve Standart Suş .....	31
6.4. Alkalen Proteaz Üreticisi İzolatların Belirlenmesi.....	32
6.5. Alkalen Proteaz Enziminin Üretimi .....	32
6.5.1. Serbest enziminin aktivitesinin belirlenmesi.....	33
6.5.2. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması .....	33
6.5.3. Alkalen proteaz enziminde protein miktarının belirlenmesi .....	34
6.5.4. Protein standart grafiğinin hazırlanması.....	34
6.6. İmmobilize Enzimin Hazırlanması.....	35
6.6.1. İmmobilize enziminin aktivitesinin belirlenmesi .....	35
6.6.2. İmmobilize enzimde HDMAB muamele süresi optimizasyonu.....	36
6.6.3. İmmobilize enzimde enzim miktarı optimizasyonu .....	36
6.6.4. İmmobilize enzimde bentonit miktarı optimizasyonu .....	36
6.6.5. İmmobilize enzimde tekrar kullanım.....	37
6.7. Serbest Enzim ve İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu.....	37
6.7.1. Serbest Enzim ve immobilize enzimlerin optimum pH'larının belirlenmesi .....	37
6.7.2. Serbest enzim ve immobilize enzimin optimum sıcaklıklarının belirlenmesi .....	38
6.7.3. Kazeinin immobilize proteaz enzimi ile biotransformasyonu.....	38
6.7.4. Serbest enzim ve immobilize enzimin $K_m$ ve $V_m$ değerlerinin belirlenmesi .....	39
6.7.5. Serbest ve immobilize enzimlerin $k_{cat}$ ve $k_{cat}/K_m$ değerlerinin belirlenmesi .....	40
6.8. Alkalen Proteaz Enzimi İçin Elektroforez Çalışması.....	40
6.8.1. Gümüş boyama protokolü .....	41
6.8.2. Zimogramın hazırlanması ve uygulanması işlemi.....	42
6.9. Arrhenius Aktivasyon Enerjisinin Hesaplanması.....	42
6.10. Alkalen Proteaz Enzimi ile Kazein Hidrolizine Bağlı Termodinamik Parametrelerin Belirlenmesi .....	43
7. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	45
7.1. Alkalen Proteaz Üreticisi İzolatların Belirlenmesi.....	45
7.2. Bentonit Kilinin XRD (X-Işını Kırınım Yöntemi) Analizi .....	46
7.3. İmmobilize Enzimde Optimizasyon Çalışmaları .....	47
7.3.1. HDMAB muamele süresi optimizasyonu.....	47
7.3.2. Enzim miktarı optimizasyonu.....	50
7.3.3. Bentonit miktarı optimizasyonu .....	51

7.3.4. Kazeinin immobilize proteaz enzimi ile biotransformasyonu .....	52
7.3.5. İmmobilize enzimde tekrar kullanım.....	53
7.4. Serbest ve İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu .....	54
7.4.1. Serbest ve immobilize enzimlerin optimum pH'larının belirlenmesi .....	54
7.4.2. Serbest ve immobilize enzimlerin optimum sıcaklıklarının belirlenmesi .....	56
7.4.3. Serbest ve immobilize enzimin aktivasyon enerjilerinin belirlenmesin .....	58
7.4.4. Serbest ve immobilize enzimlerin $K_m$ ve $V_m$ değerlerinin belirlenmesi .....	59
7.4.5. Serbest ve immobilize enzimin termodinamik parametrelerinin belirlenmesi .....	65
7.4.6. Alkalen proteaz enziminin elektroforez çalışması .....	67
8.SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	69
KAYNAKLAR .....	71
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER .....	79
ÖZGEÇMİŞ .....	80

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1.	Bir tetrahedron ve silika tabakası.....	22
Şekil 4.2.	Bir oktahedron ve alümina tabakası.....	23
Şekil 4.3.	Montmorillonit mineralinin kristal yapısı.....	23
Şekil 4.4.	Bentonit yapısı .....	25
Şekil 6.1.	Tirozin standart grafiği .....	33
Şekil 6.2.	Sığır serum albümin standart grafiği .....	34
Şekil 6.3.	Alkalen proteaz ile kazein hidrolizi reaksiyonunda serbest enerji düzey diyagramı .....	43
Şekil 7.1.	<i>Bacillus Pumilus</i> Y7 izolatına ait zon çapları.....	46
Şekil 7.2.	XRD analizi .....	46
Şekil 7.3.	5 gram organo-bentonit ile 4 mL alkalen proteaz enziminin farklı HDMAB muamele süreleri üzerine etkisi .....	49
Şekil 7.4.	5 gram organo-bentonit ile artan enzim konsantrasyonlarının immobilizasyon verimi üzerine etkisi .....	50
Şekil 7.5.	5 ml enzim ile artan bentonit miktarlarının immobilizasyon verimi üzerine etkisi .....	52
Şekil 7.6.	Kazeinin immobilize proteaz enzimi ile biotransformasyonu .....	52
Şekil 7.7.	İmmobilize enzimde tekrar kullanım .....	53
Şekil 7.8.	Kazeinin farklı pH'larda aktiviteye olan etkisi .....	54
Şekil 7.9.	Kazeinin farklı sıcaklıklarda aktiviteye olan etkisi.....	57
Şekil 7.10.	Serbest enzim için Arrhenius grafiği .....	58
Şekil 7.11.	İmmobilize enzim için Arrhenius grafiği.....	59
Şekil 7.12.	V-[S] grafiği.....	60
Şekil 7.13.	Serbest ve immobilize enzim için Lineweaver-Burk diyagramı .....	60
Şekil 7.14.	Alkalen proteaz enziminin elektroforetik analizi.....	68

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1.	Enzimlerin sınıflandırılması .....	2
Tablo 1.2.	Hayvansal kaynaklı bazı endüstriyel enzimler .....	4
Tablo 2.1.	Proteolitik enzimlerin bazı endüstriyel kullanımları .....	6
Tablo 2.2.	Proteaz aktivitesine sahip mikroorganizmalar .....	8
Tablo 4.1.	Bentonitin kimyasal bileşenleri .....	26
Tablo 6.1.	Kullanılan bakteri izolatları .....	31
Tablo 7.1.	Proteolitik zon oluşumu .....	45
Tablo 7.2.	Serbest enzim ve immobilize enzimin kinetik parametreleri.....	64
Tablo 7.3.	Alkale proteaz enziminin serbest ve immobilize formlarının 30°C ve pH 8’de kazein hidrolizi için elde edilen termodinamik parametreleri .....	65



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

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

### Kısaltmalar

CLEA	:Cross-Linked Enzyme Aggregate (Çapraz Bağlı Enzim Agregatları)
DEAE	:Dietyl Amino Etil
EDTA	:Etilen Diamin Tetra Asetikasit
SDS	:Sodium Dodecyl Sulphate (Sodyum Dodesil Sülfat)
SDS-PAGE	:Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi)
XRD	:X-Ray Diffraction (X-Işını Kırınımı)

## ***Bacillus Pumilus* Y7 ALKALEN PROTEAZININ BENTONİT İLE NON-KOVALENT İMMOBİLİZASYONU**

### **ÖZET**

Proteazlar, proteinlerde bulunan peptit bağlarını katalizleyen enzimlerdir. Doğada yaygın olarak bulunurlar. Bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan izole edilirler. Bu çalışmamızda *Bacillus pumilus* Y7'den elde edilen alkalen proteaz enziminin, bentonit ile non-kovalent immobilizasyonu gerçekleştirildi. Serbest enzim ve immobilize enzimin kinetik ve termodinamik parametreleri incelendi. SDS-PAGE analizi ile enzimin molekül ağırlığı 15 kDa olarak bulundu, native-PAGE ve zimogram analizi ile de desteklendi. Serbest enzim için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 10 ve 35 °C, immobilize enzim için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 6 ve 32 °C olarak bulundu. Arrhenius aktivasyon enerjileri ( $E_a$ ) serbest enzim ve immobilize enzim için sırasıyla 15,28 kJ/mol ve 102,4 kJ/mol olarak hesaplandı. 30 °C'de pH 8'de her iki enzim için Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hızı ( $V_m$ ) serbest enzim için sırasıyla  $6,05 \times 10^{-6}$  M ve 20,16 U/mL/min, immobilize enzim için sırasıyla  $27,3 \times 10^{-6}$  M ve 34,13 U/mL/min olarak bulundu. Enzimlerin turnover sayısı ( $k_{cat}$ ) ve katalitik performansı ( $k_{cat}/K_m$ ) serbest enzim için sırasıyla  $24,39 \text{ dk}^{-1}$  ve  $4 \times 10^6 \text{ dk}^{-1}\text{M}^{-1}$ , immobilize enzim için sırasıyla  $180,4 \text{ dk}^{-1}$  ve  $6,6 \times 10^6 \text{ dk}^{-1}\text{M}^{-1}$  olarak bulundu. Serbest enzimin termodinamik parametreleri;  $\Delta G^\ddagger$ : 66,21 kJ/mol;  $\Delta G^\ddagger_{E-T}$ : -38,31 kJ/mol;  $\Delta G^\ddagger_{ES}$ : -30,27 kJ/mol;  $\Delta H^\ddagger$ : 13,3 kJ/mol;  $\Delta S^\ddagger$ : -0,17 kJ/molK ve immobilize enzimin termodinamik parametreleri  $\Delta G^\ddagger$ : 61,15 kJ/mol;  $\Delta G^\ddagger_{E-T}$ : -56,22 kJ/mol;  $\Delta G^\ddagger_{ES}$ : 26,45 kJ/mol;  $\Delta H^\ddagger$ : 99,52 kJ/mol;  $\Delta S^\ddagger$ : 0,12 kJ/molK olarak hesaplandı.

**Anahtar Kelimeler:** Alkalen Proteaz, *Bacillus Pumilus*, Bentonit, Immobilizasyon.

## NON-COVALENT IMMOBILIZATION OF *Bacillus Pumilus* Y7 ALKALINE PROTEASE WITH BENTONITE

### ABSTRACT

Proteases are enzymes that catalyse the peptide bonds in proteins. They are widely found in nature. They are isolated from plant, animal and microbial sources. In this study, non-covalent immobilization of alkaline protease enzyme from *Bacillus pumilus* Y7 with bentonite was performed. Kinetic and thermodynamic parameters of free enzyme and immobilized enzyme have been studied. The molecular weight of the enzyme was found 15 kDa by SDS-PAGE analysis and was also supported by native-PAGE and zymogram analysis. Optimum pH for free enzyme and immobilized enzyme were 10.0 and 6.0, respectively and optimum temperature were determined for free enzyme and immobilized enzyme 35 °C and 32 °C, respectively. The Arrhenius activation energies ( $E_a$ ) were calculated as 15.28 kJ/mole and 102.4 kJ/mole for the free enzyme and the immobilized enzyme, respectively. The Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) and the maximum velocity ( $V_m$ ) at pH 8, 30 °C for the free enzyme were  $6.05 \times 10^{-6}$  M and 20.16 U/mL/min respectively, and for the immobilized enzyme  $27.3 \times 10^{-6}$  M and 34.13 U/mL/min, respectively. The turnover number ( $k_{cat}$ ) and catalytic performance ( $k_{cat} / K_m$ ) of the enzymes were found to be  $24.39 \text{ min}^{-1}$  and  $4 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$  for the free enzyme,  $180.4 \text{ min}^{-1}$  and  $6.6 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$  for the immobilized enzyme in order. Thermodynamic parameters of free enzyme were calculated as;  $\Delta G^\ddagger$ : 66.21 kJ/mole;  $\Delta G^\ddagger_{E-T}$ : -38.31 kJ/mole;  $\Delta G^\ddagger_{ES}$ : -30.27 kJ/mole;  $\Delta H^\ddagger$  : 13.3 kJ/mole;  $\Delta S^\ddagger$ : -0.17 kJ/moleK and the thermodynamic parameters of immobilized enzyme were calculated as  $\Delta G^\ddagger$ : 61.15 kJ/mole;  $\Delta G^\ddagger_{E-T}$ : -56.22 kJ/mole;  $\Delta G^\ddagger_{ES}$ : -26.45 kJ/mole;  $\Delta H^\ddagger$ : 99.52 kJ/mole;  $\Delta S^\ddagger$ : 0.12 kJ/moleK.

**Keywords:** Alkaline Protease, *Bacillus Pumilus*, Bentonite, Immobilization.

## GİRİŞ

Canlı sistemlerde, biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran biyolojik katalizörler; enzim olarak adlandırılır. Enzimler, aynı zamanda ticari öneme sahip işlemlerin uygulamalarında katalizör olarak ekstrakte edilirler [1].

Biyokimya alanında yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu enzim araştırmalarına dayanmaktadır. 1700'li yıllarda başlayan çalışmalar günümüze kadar varlığını sürdürmektedir [1,2].

Yirminci yüzyılın sonlarına doğru enzimlerle ilgili çalışmalar büyük oranda artış göstermiştir. Çalışmalar, enzimler hakkında birçok yeni bilgiye ulaşılmasını sağlamıştır [2].

Tez çalışmamızın amacı: *Bacillus pumilus* Y7 alkaleen proteaz enziminin, montmorillonit grubu olan bentonit kili ile non-kovalent immobilizasyonunu sağlamak ve endüstriye kazandırmaktır.

## 1. ENZİMLER

### 1.1. Enzimlerin Tarihçesi

Biyolojik kataliz; ilk kez etin mide salgılarıyla sindirilmesi üzerine 1700'lü yıllarda yapılmış olan çalışmalar sırasında tespit edilmiş, 1800'lerde tükürük ve farklı bitki ekstraktlarıyla nişastanın şekere dönüştürülmesi üzerine çalışmalar devam ettirilmiştir. Aynı yıl içerisinde maya ile şekerin alkolle fermentasyonu Louis Pasteur tarafından keşfedilmiştir. Eduard Buncher 1897'de maya ekstraktlarının şekeri alkole dönüştürdüğünü bulmuş ve hücreden fermentasyonun uzaklaştırılmasıyla dahi işlevine devam eden moleküllerin olduğunu fark etmiştir. Buncher tarafından keşfedilen bu molekülleri Frederick W. Kühne enzim olarak adlandırmıştır.

Enzim üzerine ilk başarılı çalışma 1926'da James Summer tarafından gerçekleştirilmiştir. J. Summer üreaz enziminin saflaştırılması ve kristallendirilmesini gerçekleştirerek, üreazın protein yapısından oluştuğunu fark etmiş, bütün enzimlerin de protein yapılı olduğunu söylemiştir. Moses Kunitz ve John Northrop pepsin, tripsin ve diğer enzimleri kristallendirerek protein yapısında olduğunu keşfetmişlerdir.

Yirminci yüzyılın sonlarına doğru enzimlerle ilgili çalışmalar büyük oranda artış göstermiştir. Çalışmalar, enzimler hakkında birçok yeni bilgiye ulaşılmasını sağlamıştır [2].

### 1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Tablo 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması [1]

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

Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu, enzimleri kataliz ettikleri reaksiyonlara göre altı sınıfa ayırmıştır (Tablo 1.1) [1].

### **1.2.1. Oksidoredüktazlar**

Yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzim gurubudurlar.

### **1.2.2. Transferazlar**

Fonksiyonel grupların bir molekülden diğerine transferini katalizlerler.

### **1.2.3. Hidrolazlar**

Su katılması sonucu bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen gruptur.

### **1.2.4. Liyazlar**

Oksidasyon veya hidrolizden başka yollarla C-C, C-S ve bazı C-N bağlarının kırılmasını katalizlerler.

### **1.2.5. İzomerazlar**

İzomerik yapıları oluşturmak üzere molekül içerisinde grup transferi tepkimelerini gerçekleştirirler.

### **1.2.6. Ligazlar**

Yüksek enerjili bir bağın hidrolizi ile iki molekülün birbirine bağlanmasını katalizlerler [3].

## **1.3. Enzim İzolasyon Kaynakları**

Enzimlerin izolasyonunda, bitki, hayvan ve mikroorganizma hücrelerinden yararlanılır.

### **1.3.1. Hayvansal kaynaklar**

Hayvansal kaynaklı enzimlerin aktivitelerinin korunması için hayvan organlarının düşük ısılı bir ortamda muhafaza edilmesi gerekmektedir. Organlar dondurulmadan

önce, yağdan ve bağlantı dokularından arındırılmış olmalıdır. Donmuş organlar, et sanayinde kullanılan makineler kullanılarak kıyılabilir ve enzimler bir tampon çözelti ile çıkarılabilir veya mekanik öğütme ya da enzim sindirimi de kullanılabilir. Organlara bağlı olan yağ, organik çözücüler yardımıyla da ortadan kaldırılabilir. Fakat birçok ülkede yerli ticari hayvan popülasyonlarının korunması, hayvanların ve hayvansal dokuların ülkeler arası taşınmasında katı kısıtlanmaların uygulanmasına sebep olmaktadır. Diğer taraftan hastalıkların (özellikle viral hastalıkların) hayvanlar ve hayvansal dokular vasıtasıyla bir ülkeden diğerine yayılması büyük endişelere sebep olmaktadır. Bütün bu sebepler hayvan ve hayvansal ürün ticaretini oldukça kısıtlamaktadır. Bu da hayvansal kaynaklar açısından dezavantaj oluşturmaktadır [4].

Hayvansal kaynaklı bazı önemli enzimler ve kaynakları Tablo 1.2’de verilmiştir.

Tablo 1.2. Hayvansal kaynaklı bazı endüstriyel enzimler [5]

Enzim	Kaynağı	Endüstride Kullanım Alanı
Katalaz	Karaciğer	Gıda
Kimotripsin	Pankreas	Deri
Lipaz	Pankreas	Gıda
Peynir mayası (Rennet)	Kırkbayır	Peynir
Tripsin	Pankreas	Deri

### 1.3.2. Bitki malzemeleri

Bitkilerin enzim üretiminde kullanılması sırasında bitkinin kök, yaprak, dal, gövde gibi her türlü dokusundan yararlanılır. Önemli olan bitkinin kolay ulaşılabilir olmasıdır.

Bitkisel kaynaklı enzimlerin artan talebe karşılık verebilmesi toprağın işlenmesi, gelişim döngüsü ve iklim gibi birçok faktöre bağlıdır [6].

Bitkisel kaynaklı enzim grupları 4 çeşittir;

- Proteazlar: Uzun zincirli proteinleri daha küçük yapıları olan amino asitlere dönüştürür.
- Amilaz: Polisakkaritleri disakkaritlere indirger. (Laktoz, maltoz ve sükroz)
- Lipaz: Trigiseritleri yağ asidi ve gliserole parçalar.
- Selülaz: Karbohidratların sindirimini sağlar.

Enzimlerin çalışması için substratın gerekli olmasının yanı sıra uygun pH, sıcaklık ve neme de ihtiyaç vardır.

Sıcaklık: Bitkisel kaynaklı enzimlerin çoğu için gerekli olan uygun sıcaklık 33-40 °C aralığındadır.

pH: Bitkisel kaynaklı enzimler pH 3-9 gibi çok geniş aralıklarda çalışırlar.

Nem: Bitkisel kaynaklı enzim gruplarının sindirimsel bir fonksiyonu yerine getirebilmesi nem içermesine bağlıdır. Sindirimin en basit hali su eklenmesi yoluyla moleküllerin parçalanması sürecidir [7].

Bitkilerin enzim üretiminde kullanılması sırasında meydana gelebilecek bazı durumlar dezavantaja sebep olabilir. Örneğin; değişen iklim koşulları, bitkinin endemik olması gibi. Bunun yanı sıra bitki üretiminin zaman alıcı bir süreç olmasından dolayı mikroorganizmalara göre çok daha az tercih edilmektedirler [8].

### **1.3.3. Mikroorganizmalar**

Mikroorganizmalar, kolay ve kısa sürede üretilebilirliği, üretimin istendiği zaman durdurulabildiği ve üretimden sonra fazla atık çıkarmaması sebebiyle enzimlerin önemli bir kaynağıdır. Genetik ve protein mühendisliği alanında geliştirilmiş yeni yöntemlerin, enzim sanayisine büyük katkısı vardır. Bir gen, ilgili organizmanın, onun üretmediği bir proteini üretmesini sağlamak üzere, bir mikroorganizmaya transfer edilebilir veya bir mikroorganizma geninin modifikasyonu proteinlerin daha kolay izole edilebileceği ya da saflaştırılabileceği şekilde proteinlerin özelliklerini değiştirebilir [8]. Bu kolaylıklar enzim üretim konusunda araştırmacıların mikroorganizmalara yönelmesini sağlamıştır.

Mikrobiyal kaynaklı enzimler bitki ve hayvanlara kıyasla daha fazla tercih edilmektedirler [5].



## 2. PROTEAZLAR

Proteolitik enzimler (proteazlar), proteinlerde bulunan peptit bağlarının katalizleyen enzimlerdir [9]. Proteazlar, hücre büyümesi ve farklılaşması için gerekli olup tüm canlı hücrelerde yer alırlar [10]. Endüstriyel enzimlerin en önemli sınıfını oluşturan bu enzimler sektörde enzim üretiminin yaklaşık dörtte birini oluştururlar. Deterjan, protein, bira, et, deri ve süt endüstrilerinde kullanılan proteazlar ticari olarak üretilen önemli enzim gruplarıdır [11]. Proteolitik enzimlerin endüstrideki birkaç kullanım alanı Tablo 2.1’de verilmiştir [12,13].

Tablo 2. 1. Proteolitik enzimlerin bazı endüstriyel kullanımları [12,13]

Endüstri Dalı	Kullanımı
Meşrubat	Protein tanelerinin çözünmesi
Deterjan	Proteinlerden meydana gelen kirliliğin giderilmesi
Ekmek/Pasta	Gluten elastikliğinin değişime uğraması
Peynir üretimi	Kazeinin parçalanması, lor oluşumu
Deri	Tüylerin yüzeyden uzaklaştırılması, derinin yumuşatılması
Et	Etin yumuşatılması

Proteazlar, enzim sınıflandırılmasında hidrolaz grubunda yer alırlar. Proteinlerin peptit bağlarını uygun koşullar altında özel olarak hidrolize eden enzimlerdir. Proteazlar hidroliz işlemini, polipeptid zincirlerinde bulunan amid bağlarını hidrolizleyerek gerçekleştirirler. Peptit bağlarını hidrolize ederek diğer proteinleri parçalamak ya da indirgemekle birlikte aynı zamanda bazı tepkimelerde de peptit bağlarının sentezini sağlayan enzimlerdir [14,15].

Proteazların farklı tipleri, hidrolitik amaçların büyük bir çeşitliliği için vücudun her yerinde üretilmektedir. Kan sıvılaştırma akışlarını ayarlama ve bağışıklık sisteminin işlevsel hale getirilmesinde kullanılırlar. Tüm canlılar proteaz enzimine ihtiyaç duyarlar bu sebeple proteaz enzimi bakteri, maya ve bitkiler tarafından da üretilmektedir [16].

Proteazlar da diğer enzimler gibi protein yapıdırlar. Tđm proteazlar pH, sıcaklık, iyon gereklilikleri, spesiflik, aktivite ve kararlılık yđnđnden karakteristik özelliklere sahiptirler. Bu  zellikler hidroliz edilecek olan peptit bağında bulunan aminoasitlere bağlıdır. Bu biyokimyasal parametreler, bir proteazın uygulanma alanını belirler [8].

## **2.1. Proteazların Sınıflandırılması**

Proteazlar; kaynaklarına, katalitik aktivitelere ve proteinleri hidrolizleme biğimlerine gđre sınıflandırılırlar.

- Kaynağına gđre proteazlar
  - a) Bitkisel proteazlar
  - b) Hayvansal proteazlar
  - c) Mikrobiyal proteazlar
- Katalitik aktivitelere gđre proteazlar
  - a) Endopeptidazlar
  - b) Egzopeptidazlar
- Proteinleri hidrolizleme biğimlerine gđre proteazlar
  - a) Serin proteazlar
  - b) Sistein proteazlar
  - c) Aspartil proteazlar
  - d) Metalo proteazlar

### **2.1.1. Kaynağına gđre proteazlar**

#### **2.1.1.1. Bitkisel proteazlar**

Gıda ve ilaç endđstrisinde yaygın olarak kullanılan bitkisel kaynakların başında bromelain, ficin ve papain gelir. Bitkisel kaynaklı proteazlar, etin yumuşatılması, sđtđn pıhtılaştırılması, sindirim ve kanser tedavisi, gibi değişik uygulamalarda tercih edilir. Keratinazlar da bitkisel kaynaklı yaygın proteaz grubudurlar. Keratinazlar, esansiyel aminoasit üretmek ve atık su sistemlerinin tıkanmasını engellemek amacıyla kullanılırlar. Bitki proteazlarının kaynaklarından üretilmeleri oldukça

zaman alıcı bir işlemdir. Ancak son zamanlarda daha fazla ilgi görmektedirler [17,18].

### 2.1.1.2. Hayvansal proteazlar

Hayvansal kaynaklı en yaygın proteazlar pankreatik tripsin, kimotripsin, pepsin ve rennin'dir. Tripsin, bağırsak sindirim enzimidir. Gıdasal proteinlerin hidrolizinde görevli enzimdir. Kimotripsin ve rennin ayrışan süt proteinlerinin alerjik etki yaratmaması ve kaymak oluşumunda kullanılır. Aynı zamanda rennin süt endüstrisinde lor üretiminde kullanılır. Pepsin omurgalıların birçoğunun midesinde bulunan asidik bir enzimdir [17,18].

### 2.1.1.3. Mikrobiyal proteazlar

Doğada var olan mikroskobik topluluk, çabuk büyümenin yanı sıra istenilen özelliklere de sahip yeni rekombinant enzimlerin üretiminde kullanımı sebebiyle hayvansal ve bitkisel kaynaklara göre daha fazla tercih edilmektedir. Fermentasyon teknikleri yardımıyla çok kısa sürede kültürel tekniklerle büyük miktarda elde edilerek istenilen ürünün bol miktarda ve istenilen uygunlukta temin edilmesini sağlayan mikrobiyal proteinlerin uzun raf ömürleri vardır ve aktivite kaybı olmaksızın uzun zaman ideal koşullarda saklanabilirler [17,18].

Tablo 2.2. Proteaz aktivitesine sahip mikroorganizmalar [19]

Bakteri	<i>Bacillus clausii</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. sterothermophilus</i> , <i>B. mojavensis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. brevis</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. marmarensis</i> , <i>B. firmus</i> , <i>B. stratosphericus</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>B. Lentus</i> , <i>B. alcalophilus</i> , <i>B. amyloliquifaciens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B.intermedius</i> , <i>B. thermoruber</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>B. cohnii</i> , <i>B. fastidiosus</i> , <i>B. pseudofirmus</i> , <i>B. pantotheneticus</i> , <i>B. aquimaris</i> , <i>B. proteolyticus</i> , <i>B. laterosporus</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. amovivorus</i> , <i>B. flexus</i> , <i>B. horikoshii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> , <i>Aromonas hydrophila</i>
Mantar	<i>Aspergillus awamori</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigates</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. ustus</i> , <i>Beauveria bassiana</i> , <i>B. feline</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Clonostachys rosea</i> , <i>Conidiobolus coronatus</i> , <i>Cordyceps militaris</i> , <i>C. sinensis</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Graphium putredinis</i> , <i>Mucor circinelloides</i> , <i>Penicillium camemberti</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. restrictum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Rhizomucor sp.</i> , <i>Rhizopus SMC</i> , <i>R. oryzae</i> , <i>Thermoascus aurantiacus</i> .

Mikroorganizmalardan yararlanarak elde edilen enzimler endüstrinin en büyük enzim grubunu oluşturmakla beraber küresel enzim satışlarının %60'ından fazlasını kapsar [19].

Aynı türe sahip olan mikroorganizma üreticilerinin özelliklerine bağlı olarak çeşitli proteazlar üretilmektedir: Asit, nötr ve alkali proteazlar. Nötr ve alkali proteazlar, deterjan ve deri endüstrisinde büyük öneme sahiptirler. Tablo 2.2'de asidik, nötr ve alkali proteazların kaynağı olan bakteri ve mantar türleri belirtilmiştir [19].

## 2.2. Alkalen Proteazlar

Optimum pH'ları 8-11 arasında değişir. Ayrıca pH 11,5, 11-12, 12,3 ve 12-13 aralığına sahip alkalen proteazlar da rapor edilmiştir. Yüksek izoelektrik noktalarına sahiptirler ve pH 6-12 aralığında kararlıdır. Optimum sıcaklıkları 50-70 °C arasında değişmektedir. Ayrıca 85 °C sıcaklıkta kararlı olan alkalofilik *Bacillus* sp. B18' rapor edilmiştir. *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. ve *Thermus* sp.'den izole edilen alkalen proteaz enzimleri yüksek sıcaklıklarda stabil olmakla beraber Ca<sup>2+</sup> iyonu ısıl kararlılıklarını arttırmaktadır.

Alkalen proteazların molekül ağırlıkları 15-30 kDa arasında değişmektedir. Ayrıca 31,6, 33, 36 ve 45 kDa molekül ağırlığına sahip alkalen proteazlar da vardır.

Maksimum aktivite için Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> ve Mn<sup>2+</sup> katyonlarına ihtiyaç duyar. Bu katyonlar ayrıca *Bacillus* cinsi alkalen proteazların termal stabilitesinde arttırarak termal denatürasyona karşı da enzimi korumaktadır.

Bazı alkalen proteazlar EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) gibi metallere olan duyarlılıkları dolayısıyla metal iyonlarına bağımlı oldukları rapor edilmiştir.

Alkalen proteazlar, sentetik substratlara ve proteine karşı aktiftirler. Ancak reaksiyon hızları farklı olabilmektedir. Alkalen proteazlar ve/veya subtilisinler kazeine karşı hemoglobin veya sığır serum albümininden daha aktiftir.

Alkalen proteazlar deterjan, dericilik, gümüşün geri kazanımı, tıbbi amaçlar, gıda ve kimya gibi endüstrinin birçok dalında kullanılmaktadırlar. Deterjanlara eklenen alkalen proteaz enzimleri çamaşırlarda var olan proteinli içerikli kirlerin

giderilmesini sağlarlar. Deterjanların yapısında kullanılan proteazlar ve diğer enzimler geniş bir pH ve sıcaklık aralığında, yüksek kararlılık göstermeli, düşük miktarlarda kullanılmak suretiyle (% 0,4-0,8 g) uzun raf ömrüne sahip olmalıdır [19].

### **2.3. *Bacillus* Cinsi**

*Bacillus* cinsi bakteriler ekstrem koşullara karşı dirençli, çubuk şeklinde düz veya düze yakın hücrelerdir. Aerobik ve fakültatif anaerob olan bu cinsler endospor oluştururlar ve vejetatiflerdir.  $0,5 \times 1,2 \mu\text{m}$  ve  $2,55 \times 10 \mu\text{m}$  çapındadırlar. Türlerin bazıları sarı, pembe ve siyah kolonilere sahip olsa da geneli beyaz ve krem renkli kolonidir.

Çok yüksek sıcaklıklarda bile canlı kalabilen *Bacillus* cinslerinin termofilik, mezofilik ve psikrofilik cinsleri vardır. Genellikle pH 7 de ve 35-37 °C de üreme gösterirler. *Bacillus* türünün tamamı Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar besiyerlerinde ürerler. Karbon ve nitrojen kaynağı bulunduran sentetik ortamlarda iyi gelişme gösterirler.

En bilindik yaşam alanları toprak olmasına rağmen süt ve süt ürünlerinden, hava, su ya da yiyecek gibi birçok ortamdan da temini sağlanır.

*Bacillus* türü bakteriler antibiyotik, enzim ve toksin üretimi sağlarlar. Kolay ve hızlı üretilibilmeleri ve endüstriyel öneme sahip olmaları dolayısıyla büyük öneme sahip mikroorganizmalardırlar.

*Bacillus*'lar ürettikleri proteinler sebebiyle biyoteknolojik çalışmalarda büyük ticari öneme sahiptirler. Endüstriyel amaçlı üretmiş oldukları enzimlerden amilaz ve selülozlar deterjan sanayisinde; nötral enzimler süt sanayisinde; diğer amilaz ve pilunazlar ise bira ve meyve suyu sanayisinde kullanılmaktadır [20].

### 3. İMMOBİLİZASYON

Endüstrinin her alanında elde edilen ürünün yüksek verimde olması oldukça önemli bir parametredir. Üretimin daha kısa sürede, daha büyük ölçekte ve düşük maliyette gerçekleşmesi en birinci amaçlar arasındadır. Bu sebeple endüstrilerin çoğu yüksek verimli üretim için gelecek vaat eden ve yenilikçi olan sistemlere karşı daha ılımlı yaklaşmaktadırlar ve bu alana yatırım yapmaktadırlar.

Biyolojik işlemlerin birçoğu biyokatalizörler yardımıyla gerçekleşir. Biyokatalizörlerin eldesi yüksek maliyetlidir, dolayısıyla bu molekülerin geri kazanımı ve kararlılığı oldukça önem kazanmaktadır. Bu amaçla, biyokatalizörlerin tekrar kullanımına olanak veren, yüksek ürün verimine daha uygun şartlarda ulaşabilmek için immobilizasyon, yakın zamanda ortaya çıkan ve iyi sonuç veren bir sistem haline gelmiştir. Immobilizasyon sistemi, süreç kısıtlamalarını aşmayı, biyokatalizörlerin tekrar kullanılmasını, stabilitenin artmasını, istenmeyen ayırma ve saflaştırma adımlarının önlenmesini sağlayarak daha verimli bir şekilde istenen ürünleri üretmemize olanak sağlar.

İmmobilizasyon, endüstrinin hemen hemen her alanında yaygın olarak kullanılan bir sistemdir.

Endüstride kullanılan enzimlerin bazıları oldukça maliyetlidir. Bu sebeple enzimatik süreç yeniden kullanılabiliriyorsa etkilidir ve uygulanabilir. Enzimlerin immobilizasyonu, bir enzimin çözünmeyen matris içinde ya da matris üzerinde çözünmesini içeren gelişmiş bir tekniktir. Immobilizasyon sistemleri, avantaj sağlayarak tüm süreci kolaylaştırmasının yanı sıra endüstride her enzim için uygulanacak bir teknik olmadığından, süreci yavaşlatarak zorluğa da sebebiyet verebilir. Enzim immobilizasyonunun önemi; aynı enzimin tekrar tekrar kullanılmasını sağlamasıdır.

İmmobilizasyon işlemlerinde enzim-substrat oranı çok yüksek olduğundan, substratın fazla kullanımı önlenemez. Yapılan her işlem sonunda enzim reaksiyon

ortamından kolaylıkla alınır ve kirliliğin meydana getireceği biyolojik işlemler için tehditleri ortadan kaldırır.

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

İmmobilizasyon işlemleri için kullanılacak olan materyaller doğru ve uygun bir şekilde seçilmelidir. Örneğin; kullanılacak olan yöntemin sertliğine bağlı olarak enzimin konformasyonunda değişiklikler ve katalitik aktivite kaybı meydana gelebilir [22].

### **3.1. İmmobilizasyonun Tarihçesi**

1916 yılında odun kömürü üzerinde maya invertaz enziminin adsorbe edilerek, sukrozun hidrolizinin katalizlendiği Nelsen ve Griffin tarafından gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın ardından aktif proteinlerin kovalent bağlanma ile çeşitli taşıyıcılar üzerinde immobilizasyonu hakkında çok sayıda çalışma rapor edilmiştir. 1953 yılında Grubhofer ve Schleith'in karboksipeptidaz, ribonükleaz, diastaz ve pepsin türü enzimleri kovalent bağlanma yöntemiyle bir reçine üzerinde immobilize etmeleriyle immobilizasyon pratik olarak kullanılmaya başlanmıştır. 1956 yılında katalaz enzimin DEAE-selüloz üzerinde iyonik olarak bağlanması, 1963 yılında tripsin, papain, amilaz ve ribonükleazın poliakrilamid jel içine tutuklanması, 1964 yılında karboksipeptidaz-A enziminin glüteraldehit ile çapraz bağlanması ve karbonik anhidraz enziminin mikro enkapsülasyonu ve 1971 yılında amiloglukozidaz içeren lipozomların hazırlanması immobilizasyon çalışmalarına büyük katkı sağlamıştır.

1969 yılında Chibata ve arkadaşlarının fungal amino açilaz enzimini DEAE-Sephadex üzerine iyonik bağların oluşumu ile immobilize etmesi, immobilizasyon yönteminin endüstrideki ilk başarılı çalışmasıdır. 1971 yılında ise mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonunun endüstrideki ilk uygulamalarını gerçekleştirmişlerdir [22].

### **3.2. İmmobilizasyon Parametreleri**

İmmobilizasyon yönteminde hız ve verim özellikle taşıyıcının cinsine, immobilizasyonun yöntemine, konsantrasyon ve pH ya, sıcaklığa ve reaksiyon süresine bağlıdır.

Laboratuvar çalışmaları ve endüstriyel uygulamalar için standart yöntem, çözünmez gözenekli taşıyıcılar üzerine enzim bağlanma yöntemidir. Kimyasal bağlanmada enzimin taşıyıcı ile muamele olduğu yüzey ve taşıyıcının fonksiyonel gruplarının özellikleri önemli rol oynar. Adsorpsiyon, yüzeyin hidrofobik ve hidrofilik olma özelliğine bağlıdır.

Enzim ile taşıyıcısı arasındaki iyonik, hidrofilik ya da hidrofobik ve hidrojen bağlarıyla meydana gelen güçlü etkileşimler enzimin kararlılığını etkiler. Güçlü etkileşimlerin fazla olması taşıyıcı üzerinde istenmeyen tersinmez adsorpsiyona ve enzimin aktivite kaybetmesine sebep olur. Aynı zamanda proteinin üçüncül yapısında konformasyonel değişikliklere de neden olabilir. Bu etkiler özellikle, katı taşıyıcı yüzeylerinde çoklu etkileşimlerde görülebilir.

Bazı durumlarda enzimin korunup inaktivasyonunun engellenmesi amacıyla, kimyasallar kullanılabilir. Bunun için taşıyıcıyı immobilizasyona uygun bir hale getirmek gerekir. Enzimin aktivitesini ve konformasyonel yapısını etkilemeyecek şekilde, enzime pahalı olmayan bir proteinin adsorbe edilmesi enzim immobilizasyonunda ön koruyucu bir aşama olur. Örneğin; SiO<sub>2</sub>, alüminasilika, agaroz türevi polisakkaritler, akrilamit türevleri ve polistrien gibi taşıyıcılar bu amaçla kullanılabilirler [23].

### **3.3. İmmobilizasyonda Kullanılan Bazı Destek Materyalleri**

Başarılı bir immobilizasyon işlemi için uygun biyokatalizörler, uygun destek materyalleri ve tekniğin seçilmesi önemlidir. Destek materyali, matris yüzeyinde meydana gelebilecek hasarları önlemek için mekanik ve kimyasal stabiliteye sahip olmalıdır. Uygun olan destek materyali, taşıyıcı ve hücrelerin ortamdaki kolaylıkla ayrılmasını, immobilize edilmiş hücrenin tutulmasını ve enzimin inaktive olmamasını sağlamalıdır [24].



Endüstriyel uygulamalar için çok çeşitli destek materyalleri vardır. Üretime bağlı olarak, destek materyalinde maliyet, ürün özgülüğü, biyouyumluluk ve kullanılabilirlik gibi parametreler dikkate alınmalıdır [25].

### 3.3.1. Aljinat

Ilıman iklimlerde yaşayan kahverengi yosunlardan (Phaeophyceae) elde edilen doğal polisakkaritlerdir. Aljinat,  $\beta$ -D-mannuronik asit ve  $\alpha$ -L-guluronik asidin heteropolimeridir.

1930'lu yıllarda ticari olarak ilk kez kullanılmaya başlanmıştır [25]. Aljinatlar, deniz yosunlarından ekstrakte edilerek işlenir ve suda çözünerek sodyum tuzları halinde bulunurlar. Yapısında bulunan iki asidin oranlarına bağlı olarak aljinat boncuklarının gözenek yapısı şekillenir [26]. Aljinat, hücre immobilizasyonunda kalsiyum iyonları ile basit bir jelleşme gerçekleştirdiği için yaygın olarak kullanılmaktadır. Protein adsorpsiyonu için sınırlı kullanımları olduğundan dolayı hücrelerin yapışmalarını kontrol edebilmek için lektin ile beraber kullanılacak şekilde modifiye edilmişlerdir [27].

Aljinatlar, iki değerlikli katyon içeren jeller oluştururlar. İyonik karakterli aljinat jellerinin sertliği kullanılan iyonların afinitesiyle artış gösterirken bu iyonların bir kısmı aktif olan hücrelerin immobilizasyonunda kullanılamazlar. Sertlik sıralaması aşağıda gösterildiği biçimde artar.

Mn>Co>Zn>Cd>Ni> Cu> Pb> Ca>Sr>Ba

Ca<sup>2+</sup> iyonu çok fazla toksik etki yaratmadığı için bu amaçla en sık kullanılan iyondur. Aljinatın jel oluşturma yeteneği, yapısında bulunan guluronik asit sayesinde gerçekleşir. Oluşan jellerin moleküler boyutu ve bileşimleri jelin kuvvetliliğini belirler. Aljinatın yapısı, viskozitesi, pH, sıcaklık, çapraz bağlanmasını sağlayacak olan maddelerin varlığı, kaynağı ve kalsiyum iyonlarının konsantrasyonu ve mikrokapsülleme yöntemi aljinat boncukları hazırlanırken dikkat edilmesi gereken önemli değişkenlerdir [25].

### **3.3.2. Kollajen**

Tendon, deri, kemik ve kıkırdak tarzı dokulardan temin edilebilen kollajenler doğada kolay bulunabilmesi ve hücreleri bağlama yetenekleri nedeniyle tercih edilen bir materyaldir. Hücreleri bağlayabilme özelliği, immünolojik kullanım için önemlidir. Yüksek basınçla temizlenmesi destek materyali olarak tercih edilmesinin ana zorluğudur [27].

### **3.3.3. Kitosan**

Mantarlar, böcekler, kabukluların kabukları ve yumuşakçalarda bol miktarda bulunan kitosan, kitinin deasetilasyonu ile elde edilir. En çok ilaç, gıda ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılır [27].

### **3.3.4. Agar-Agaroz**

Agaroz, agarın saflaştırılmasıyla oluşmuş bir yapıdır. Agar- agaroz jel soğukta katı forma girer. Boncukların ani katılaşması için soğuk tampon içerisine damlatma işlemi yapılır [27].

### **3.3.5. Poliakrilamid ve polianhidritler**

Farklı boyut ve şekillerde olan poliakrilamidler, moleküllerin ayrılması için çoğunlukla kullanılan sentetik polimerlerdir [21].

Poliakrilamid,  $Au^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  gibi metal iyonlarını geri kazanılması ve bağlanması amacıyla kullanılırlar.

Polianhidritler, diğer destek malzemelerine göre yüksek dayanıklılıkları sebebiyle hücre immobilizasyonu için kullanılır [27].

## **3.4. İmmobilizasyon Teknikleri**

Biyomoleküllerin aktivitelerinin korunması amacıyla uygulanan immobilizasyon yöntemleri, biyoreaktör ve biyosensörlerin iyileştirilmesine yönelik yapılan çalışmalara dayanır. Bir immobilizasyon tekniğinden beklenenler:

- Dengeli biyohibrit sağlamalı,
- Biyomoleküllerin denatüre olmamaları için gerekli koşullar sağlanmalı,

- Enzim-substrat temasının sağlanmasına yeterli miktarda izin verilmeli,
- Yapılacak işlem için gerekli olacak miktarda biyomoleküllerin hareketsiz olması sağlanmalı [28].

Enzimlerin immobilizasyon işleminden sonra istenilen aktivite ve karakteristikleri gösterebilmeleri biyokatalizörlerin immobilizasyonunun en önemli konusudur [22].

Uygulanacak olan immobilizasyon tekniği ürüne göre değişiklik gösterir. Bu yüzden, doğru immobilizasyon tekniğini seçmek ürünün verimi için önem arz eder. Üretimde endüstriyel uygulamalar hedef olduğu için, doğru tekniği seçmiş olmak sanayiye zaman ve para açısından kazanç sağlar [21].

Enzimlerin immobilize edilmesinde kullanılan pek çok immobilizasyon tekniği vardır. Yapılacak olan çalışma göz önünde bulundurularak en uygun teknik seçilmelidir. İmmobilizasyon işleminde kullanılan başlıca teknikler aşağıdaki gibi sıralanabilir [22];

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

#### **3.4.1. Taşıyıcıya bağlama**

Taşıyıcıya bağlama tekniği; enzimlerin suda çözünmeyen taşıyıcıya; kovalent ve/veya iyonik bağ ile fiziksel adsorpsiyon ve biyospesifik etkileşimlerle bağlanmasına dayanan bir tekniktir. Bu teknikte enzimin taşıyıcıya bağlanıp immobilizasyon işleminin gerçekleşmesinden sonra enzimin sahip olduğu aktivite taşıyıcının özelliklerine bağlı olarak değişebilir. Taşıyıcı seçimi, enzimin özelliklerinin yanı sıra taşıyıcının da partikül boyutu, yüzey alanı, hidrofilik ve hidrofobik grupların oranları, kimyasal bileşim gibi özellikleride göz önünde bulundurularak yapılır [29].

### 3.4.1.1. Kovalent bağlanma yöntemi

Enzim immobilizasyonlarında en sık kullanılan kovalent bağlama yöntemi enzimlerin suda çözünmeyen taşıyıcılara kovalent olarak bağlanmasıdır. Enzimleri taşıyıcı desteklere kovalent olarak bağlamak, arjinin, aspartik asit, histidin gibi aminoasitler ve imidazol, indol ve fenolik hidroksil gibi farklı grupların reaksiyonlarıyla gerçekleşir [30].

Kovalent bağlanma metodunda çok sayıda taşıyıcı kullanmak mümkündür. Taşıyıcı seçilirken immobilize edilecek enzimin özellikleriyle beraber taşıyıcının sağladığı avantajlar ve dezavantajlar da göz önünde bulundurulmalıdır [31].

Avantajlar;

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

Dezavantajlar;

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

Dezavantajlarına rağmen kovalent bağlanma metodu analitik amaçlı yapılan immobilize enzim uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır [32].

### 3.4.1.2. İyonik bağlanma yöntemi

Katalaz enziminin iyon değiştirici olan selüloza bağlanabilirliğinin keşfedilmesiyle birlikte iyonik bağlanma metodu enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmaya başlanmıştır [32].

Enzimin, suda çözünmeyen taşıyıcıya iyonik olarak bağlanmasıyla gerçekleşir. Bu bağlanma işlemi oldukça kolaydır. Kovalent bağlanmayla karşılaştırıldığında daha ılımlı bir yöntem olmasından dolayı enzimin konformasyonel yapısında çok fazla

değişikliğe sebebiyet vermez. Bu sebeple immobilizasyona uğramış enzimin aktivitesi genellikle yüksektir. Bunun yanı sıra bağlanma kovalent yönteme göre daha zayıftır. Bu da yüksek iyonik şiddet ve pH değişimlerinde enzimin taşıyıcıdan sızmasına sebep olur [29].

L-amino asit üretimi için DEAE-selüloz üzerine amiloaçilzaların immobilize edilmesi immobilize enzimlerin ilk endüstriyel uygulamasıdır [32].

İyonik bağlama yönteminde; enzim ile taşıyıcı arasındaki bağlanmayı sağlayan tampon pH, iyonik şiddet ve de sıcaklıktan etkilenir. Bu yöntemde taşıyıcının yenilenebilir olması, enzimin geri kazanımının kolay olması ve taşıyıcıdan kolaylıkla ayrılması en büyük avantajlardır [32]

#### **3.4.1.3. Fiziksel adsorpsiyon yöntemi**

Fiziksel adsorpsiyon yöntemi, yüksek katalitik aktiviteye sahip, sık kullanılan, basit ve ucuz bir yöntemdir [29,32,30].

Fiziksel adsorpsiyon; dipol-dipol etkileşimler, hidrofob etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri ya da hidrojen bağlanması etkileşimleriyle gerçekleşir [30].

Fiziksel adsorpsiyon yönteminde çok farklı taşıyıcılar kullanılmaktadır. Aktif karbon, gözenekli cam, kalsiyum karbonat, kül, silika jel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfat kullanılan bazı taşıyıcılarıdır [32].

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 [29,32].

#### 3.4.1.4. Biyospesifik bağlanma yöntemi

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 stereokimyasal yapısına bağlıdır [33].

#### 3.4.2. Çapraz Bağlama

Çapraz bağlama tekniği, enzim immobilizasyonunun geri dönüşümünün olmadığı bir yöntemdir. Taşıyıcıya ihtiyaç duyulmaz, enzim kendi taşıyıcısı olarak görev yapar. Bu sebeple taşıyıcı avantajı ya da dezavantajı söz konusu değildir.

Enzim molekülleri arasında, moleküller arası çapraz bağların meydana gelmesiyle gerçekleşen bu teknikte yaygın kullanılan çapraz bağlama reaktifi gluteraldehittir. Gluteraldehit, ekonomiktir ve büyük miktarda kolaylıkla elde edilebilir [34].

Kullanılan diğer yaygın çapraz bağlayıcılar: kloroformat, karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, p-benzokinon, geçiş metal iyonları ve epiklorohidrinlerdir. Bu yöntemde immobilize enzimin aktivitesinde genellikle azalma görülür [32].

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 [35].

CLEA: Çapraz bağlayıcı enzim agregatları, enzim immobilizasyonu için ilgi çekici bir biyokatalizör modelidir. Bu teknikte taşıyıcının olmaması ve buna bağlı olarak taşıyıcı masrafı ve taşıyıcı dezavantajının da olmaması potansiyel fayda sağlamaktadır [36]. Bunlara ilaveten, CLEA'ların geri kazanımı oldukça kolaydır. Isı, otoproteoliz, organik çözücüler ve sulu ortam içerisinde sızıntıya bağlı olarak denatürasyona karşı dayanıklıdır [37].

CLEA'nın avantajları:

- Enzim immobilizasyonunun tek bir işlemde gerçekleştirilmesi,
- Enzim immobilizasyonu için yeni, çok yönlü ve etkili bir teknik olması,
- Herhangi bir destek kullanılmamasından dolayı enzim aktivitesinde seyrelme olmaması,
- Yüksek kararlılık ve düşük üretim maliyetine 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 sırasındaki zorluk [35].

### **3.4.3. Tutuklama**

Tutuklama yöntemi, substrat ve ürünlerin geçişini serbest kılan, enzimi ise polimer bir yapı içerisinde hapsedmeye dayanan yöntemdir. Bu yöntemde enzim herhangi bir matris ya da zara bağlı olarak bulunmaz. Enzimin tutuklanmasında jel, elyaf ya da mikro kapsülleme gibi farklı durumlar söz konusudur [25].

Tutuklama yönteminde enzim kısmen fiziksel olarak sınırlandırılmaktadır. Bu sınırlandırma vasıtasıyla enzimde sızma en aza indirgenir ve mekanik stabilitede artış görülür. Enzim polimer ve kimyasal olarak etkileşime girmediğinden dolayı olası bir denatürasyon engellenmiş olur.

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 dezavantajı; eğer kullanılan matrisin gözenekleri çok büyük olursa, immobilizasyon işlemi esnasında deaktivasyon, düşük yükleme kapasitesi ve enzim sızıntısı görülebilir [34].

Enzimlerin immobilizasyon işleminin sonucunda hiçbir değişikliğe uğramaması yöntemin en önemli avantajları arasındadır [29].

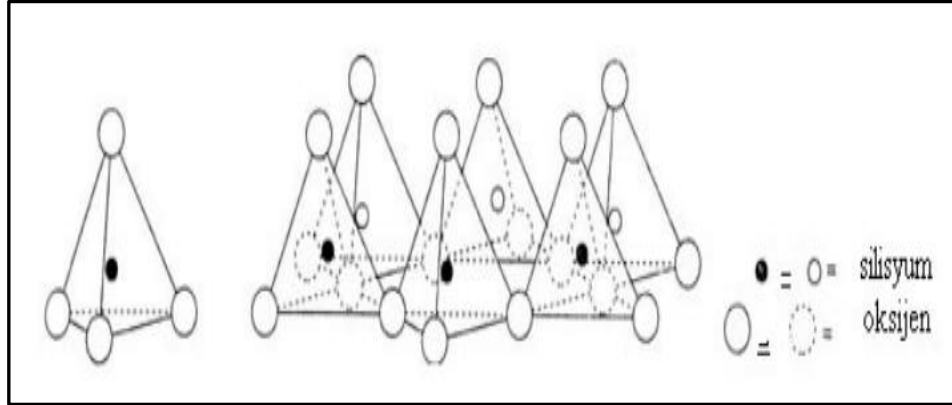




#### 4. KİLLER VE ÖZELLİKLERİ

Killer, güçlü hava akımlarının etkisi altında kaya parçalarının aşınması sonucu, ya oluştukları yerlerde ya da rüzgâr ve su ile başka yerlere taşınarak büyük yataklar halinde depolanması sonucu oluşan minerallerdir [38].  $2\mu$  ve daha da küçük boyutlara sahip tanecikli kayaç parçalarıdır. Killerin fiziksel ve kimyasal aktiflikleri, yüzey alanlarının büyüklüğüne ve taşıdıkları negatif yüklere göre belirlenir. Kil parçacığının büyüklüğü arttıkça, yüzey alanında azalma görülür [39].

Görüntü itibariyle sert gibi duran killer aslında kesilebilecek kadar yumuşak, su ile muamele olduklarında kolayca şekillenebilen, ısıtıldıklarında da sertleşebilen hidratlaşmış silikatlardır [40,41]. Killer içerisinde kaolinit, simektit, illit, klorit, sepiolit gibi killere birlikte kuars, kalsit, feldspat, zeolit ve pirit gibi kil dışı mineralleride bulundurlar. Killer içerdikleri minerallere ve minerallerin yapılarına göre beyaz, pembe, gri, yeşil, sarı, mavi ve kahverengi renk tonlarında bulunurlar [42,43].

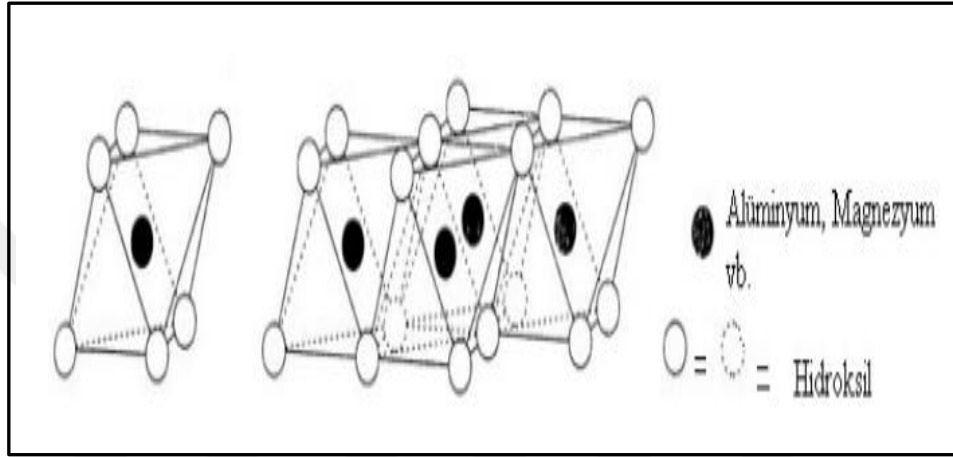


Şekil 4.1. Bir tetrahedron ve silika tabakası

Kil mineralleri temel olarak Si, Al, Mg ve Fe iyonlarıyla birlikte oksijen atomları ve hidroksil gruplarından oluşmaktadır. İklimsel değişimlere bağlı olarak kayaçların aşınması ve parçalanması sonucunda yapısal olarak iki ana üniteden meydana gelirler. Bunlar Si-tetrahedronu ve Al-oktahedronudur. Si-tetrahedron tabakası merkezde bir Si atomu ve etrafına dizilmiş dört oksijen atomundan oluşur ve

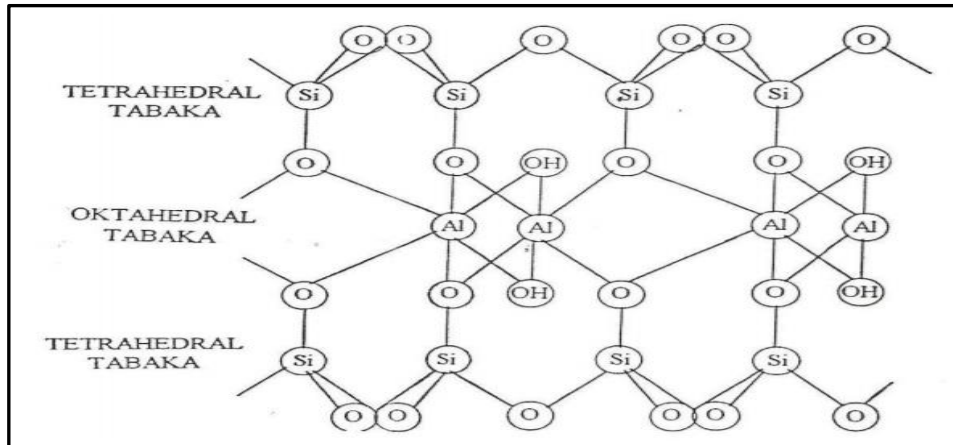
kimyasal olarak  $\text{SiO}_4^{-4}$  şeklinde ifade edilir. Silika tabakası olarak bilinir. Tetrahedron yapı ve silikat tabakası Şekil 4.1’de verilmiştir [39].

Al-oktahedron tabakası ise merkezde yer alan bir Al atomunun etrafına dizilmiş olan altı hidroksil iyonu ve/veya oksijen atomundan oluşur ve kimyasal olarak  $\text{AlO}_6^{-6}$  şeklinde ifade edilir. Alümina ya da gibsit tabakası olarak bilinir. Oktahedron yapı ve alümina tabakası Şekil 4.2’de verilmiştir [39].



Şekil 4.2. Bir oktahedron ve alümina tabakası

Kil mineralleri genellikle alüminyum ve silikat tabakalarının üst üste gelmesiyle oluşan yapılardır [39].



Şekil 4.3. Montmorillonit mineralinin kristal yapısı

Smektit grubu killerden olan montmorillonitler 2:1 tabakalı yapıdadırlar İki tetrahedral yapı arasına bir oktahedral yapının gelmesiyle oluşan katmanın üst üste istiflenmesiyle montmorillonit partikülü oluşur. Bu partiküllerin belli bir yapı

olmadan bir araya gelmesiyle de mineralin kendisi oluşur. Şekil 4.3'te montmorillonit yapısı verilmiştir [44,45].

Mineral içerisinde bulunan  $\text{Si}^{4+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  gibi katyonların kendi aralarında yer değiştirmesi sonucunda yapı içerisinde negatif bir yük oluşumu görülür. Bu negatif yük katmanlar arasına giren katyonlar tarafından  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  ve  $\text{Mg}^{2+}$  gibi iyonlara, inorganik ve organik tüm iyonlarla yer değiştirebilir. Bu yer değiştiren katyonlara değişebilen katyonlar denir. Katmanlar arasındaki su içerisinde yer alan değişebilen katyonlar kil mineralinin şişmesine sebep olurlar.  $\text{Na}^+$  iyonu katmanlar arasına çok fazla su girişine sebep olarak kil mineralinin fazla şişmesine yol açarken,  $\text{K}^+$  iyonu daha az miktarda suyun girmesini sağlayarak mineralin daha az şişmesine sebep olur [44,45].

Doğal Na-montmorillonit ve Ca-montmorillonitin X-ışınları difraksiyonu denilen yöntemle belirlenen katman kalınlıkları sırasıyla  $d_{(001)}=1,2$  nm ve 1,5 nm civarındadır. Katmanlar arasına büyük organik veya inorganik iyonların girmesiyle katmanlar arası mesafe 2,8 nm'ye kadar çıkabilir [46].

#### **4.1. Killerin Kullanım Alanları**

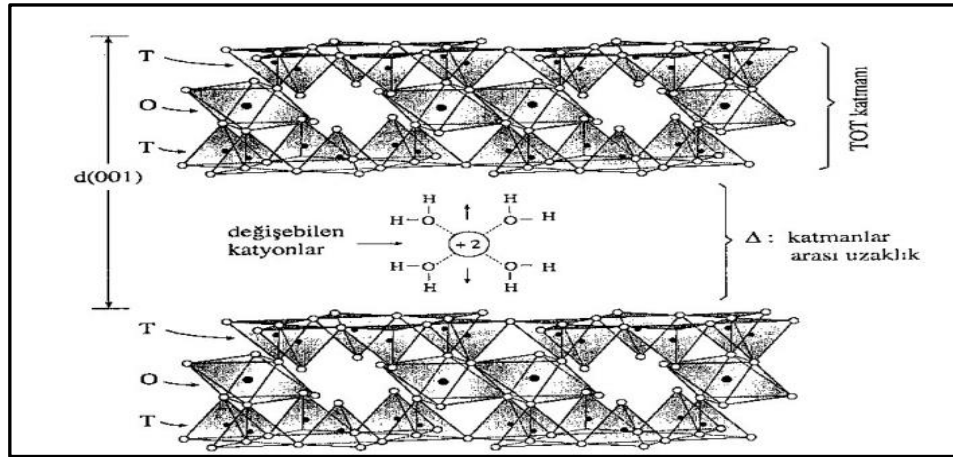
Kil minerallerinin doğadaki zenginlikleri ve sınırsız potansiyelleri uzun yıllardır fark edilip kullanılmaktadır. İyileştirici ve koruyucu amaçlı kullanımı çok eskilere dayanan killer romatizma, kemik-kas ağrılarını gidermek amacıyla termal çamur uygulaması olarak da tercih edilmektedir. Killer; kan temizleme, enfeksiyon azaltma, ülser iyileştirme ve bazı alerjileri vücuttan atabilme özelliğine de sahiptirler [47].

Kil, geniş bir kullanım yelpazesi için endüstriyel öneme sahip yaygın, bol bir mineral kaynaktır [44]. Gözenekli yapısından da dolayı endüstride ki kullanım alanları genellikle; İnşaat endüstrisi, kâğıt endüstrisi, petrokimya endüstrisi, seramik endüstrisi, çimento üretimi, mineral yağların, boyaların, kozmetik ürünlerin ve farmasötik ürünlerin temizlenmesi, radyoaktif atıkların ve atık suların temizlenmesi, diyafram, elektrot, deterjan, ilaç, sabun, katalizör, lastik ve plastik üretimi şeklinde sıralanabilir [49,50].

Son yıllarda kil mineralleri, özellikle smektitler enzimlerin immobilizasyonlarında destek materyali olarak kullanılmaktadırlar [51-53]. Kil minerallerinin bu amaçla kullanılmasının başlıca sebepleri; ucuz olmaları, toksik etki yapmamaları, korozif olmamaları, yeniden kullanılabilir olmaları, yüksek seçicilikleri, basit işlemlere tâbi olmaları, yüksek termal kararlılıkları, yüksek yüzey/hacim oranına bağlı olarak mekanik stabilite ve kimyasal inertliktir [51,54].

#### 4.2. Bentonit Kili

Volkanik küllerin, tüflerin ve lavların ayrışması sonucu oluşan, yapısında bol miktarda alüminyum ve magnezyum atomlarını bulduran, ana minerali montmorillonit olan smektit grubu killere bentonit adı verilmiştir. Genel kimyasal formülü  $Al_4Si_8O_{20}(OH)_4.nH_2O$  şeklindedir. Bentonit ticari olarak; suyla temas ettiğinde şişebilen, asitle aktifleştirilmiş, sondaj çamurlarını koyulaştıran ve geniş bir yüzey alanına sahip kil minerali olarak tanımlanır [55,56]. Bentonit doğada beyaz, açık krem, mavi, yeşil, sarı, kırmızı ve kahverenginin tonlarında bulunurlar. Ayrıca bentonit yerine sabun kil, ağartma kili, ağartma toprağı, volkanik kil, adsorplayıcı kil gibi isimler de kullanılmaktadır [57]. 2:1 tabakalıdır. İki tetrahedral tabaka arasında bir oktahedral tabakanın bulunduğu bir yapıya sahiptir [56].



Şekil 4.4. Bentonit yapısı

Bentonit yapısında doğal katkı maddesi olan kaolin ve illit kil minerallerinin yanında kil dışı olan jips, kuars, rutil, dolomit, kalsit ve volkanik kül gibi mineralleride bulundurur [58].

Bentonitler su ile etkileşime girdiklerinde şişme gösterirler. Şişmeye bağlı olarak gösterdikleri etkileşimlere göre bentonitler üç gruba ayrılırlar. Fazla şişen bentonit (Na-bentonit, Na-B), çok az şişen bentonit (Ca-bentonit, Ca-B) ve orta derecede şişen bentonit (hem Na hem de Ca bentonit). Su ile çok şişen Na-B'ler uzun ömürlü süspansiyonlar oluştururken su ile az şişen Ca-B'lerin süspansiyonları daha kısa ömürlü olmaktadır [59]. Ham bentonit su ile yaklaşık beş katı kadar şişebiliyorsa ticari olarak iyi bir bentonit olduğu kabul edilir. Toz haline getirilen bentonit yoğunluğu 1,6-1,8 g/cm<sup>3</sup> olmaktadır. Bentonitlerin kimyasal bileşimi ile kesin olarak hangi tip olduğu söylenememekle birlikte tahmin yürütülmektedir. Tablo 4.1'de bentonit gruplarına ait kimyasal bileşimler gösterilmiştir [60,61].

Tablo 4.1. Bentonitin kimyasal bileşenleri [60,61]

Bileşen (%)	Na Bentonit	Ca Bentonit	Na-Ca Bentonit
SiO <sub>2</sub>	64,0	59,0	62,0
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	21,0	19,7	15,9
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3,5	5,9	2,6
MgO	2,3	5,5	2,6
CaO	0,5	1,7	4,5
Na <sub>2</sub> O	2,6	0,2	2,0
K <sub>2</sub> O	0,4	0,2	1,0

Tablo 4.1'e bakıldığında (Na<sub>2</sub>O+K<sub>2</sub>O)/(CaO+MgO) oranı 1 ve 1'den büyük olanlar Na-B; 1'den küçük ve 1/3'e yakın olanlar ara bentonit; 1/3'ten küçük olanlar ise Ca-B olarak kabul edilir [58]

Bentonitler H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e karşı gösterdikleri tepkimelere göre dört sınıfa ayrılırlar:

- Alkali bentonitler: Asitle reaksiyona girdiğinde özelliklerini koruyan ve kolaylıkla yer değiştirebilen alkali bazları içeren bentonitlerdir.
- Alkali yarı bentonitler: Yer değiştirebilen alkali bazları içeren bu grup, asitle girdiği reaksiyonlarda özelliklerini yitirirler.
- Toprak alkali bentonitler: Yer değiştiren alkali bazları içerirler ve alkali tuzlarla girdikleri reaksiyonda özelliklerini yitirirler.
- Toprak alkali yarı bentonitler: Yer değiştirebilen alkali grupları içerirler ve asitle reaksiyona girdiklerinde alkali bentonit özelliğini yitirirler [59,62].

#### 4.2.1. Bentonit kullanım alanları

Bentonit, tabakalı yapıya sahip olması, doğal ve biyoyumlu mineral olması, geniş yüzey alanı ve kuvvetli mekanik dayanıma sahip olması, adsorpsiyon kapasitesi ve

termal kararlılığının yüksek olması, gibi birçok sebepten dolayı endüstride büyük öneme sahiptir [63].

Bentonitlerin en yaygın kullanıldıkları alanlar şöyledir:

- Döküm endüstrisi: Bentonitler kolloidal ve yüksek plastisite özelliğinden dolayı kuma bağlayıcı özellik kazandırır (1600 °C ye kadar dayanmaktadır).
- Petrol endüstrisi: Sondaj çamuru, alkilleme ve izomerizasyon gibi reaksiyonlarda katalizör ve ağartıcı adsorban olarak kullanılmaktadır.
- Gıda endüstrisi: Şarap, likör, bira, meyve suları ve sirkeye bulanıklık veren bazı yabancı maddelerin giderimini sağlamak amacıyla kullanılır. Yağ endüstrisinde kullanılan ağartma toprakları da aktive edilmiş bentonitlerdir. Ayrıca şeker kamışı şerbetinin renginin gideriminde, saflaştırılmasında ve berraklaştırılmasında da kullanılır.
- Seramik endüstrisi: Bentonit, seramik çamurunun homojen karışmasını sağlayarak, kuruma çatlaklarını ve seramiğin piştikten sonraki kırılabilirliğini azaltmaktadır.
- Çimento üretimi: Bentonit, çimento ve beton harçlarının homojen olmasını sağlayarak hava ve su geçirme özelliğini ve donma zamanını azaltarak betonun dayanımını arttırmaktadır.
- Boya ve mürekkep üretimi: Bentonitler inert dolgu maddesi olarak hem yağ- esaslı hem de su-esaslı boyalarda kullanılmaktadır. Bu amaçla bentonitin süspansiyon, koyulaştırıcı ve emülsiyon yapıcı etkisinden yararlanılmaktadır.
- Kâğıt endüstrisi: %1 oranında kâğıt hamuruna katılan bentonit, zift, katran, yağlar ve reçineli maddelerin toplanması önleyici etki yapmaktadır. Ayrıca eski gazete kâğıtlarının mürekkeplerinin giderilmesinde, adsorban olarak kullanılmaktadır.
- İlaç ve kozmetik endüstrisi: Morfin, kokain ve nikotin toksitesinde bentonitler antidotal etki göstermektedir. Bazı antibiyotiklerin kararlılığının artırılmasında, saflaştırmada, vitamin derişimlerinin hazırlanmasında, krem ve diş macunu üretiminde kullanılmaktadır.
- Temizlik malzemeleri ürünleri: Bentonitler, karbon partiküllerine olan ilgileri, emülsiyon ve dispersiyon yapıcı olmaları ve deterjan etkileri nedeniyle sabunlarda kullanılmaktadır.
- Yangın söndürücü olarak: Özellikle orman yangınlarında bentonitin su tutma özelliğinden yararlanılmaktadır.

- Yapıştırıcı üretimi: Bu alanda bentonitin yüksek dispersiyon ve süspansiyon yapıcı özelliklerinden yararlanılmaktadır.
- Su arıtımında: Bentonitlerden dispersiyon ve sorpsiyon özellikleri nedeniyle endüstriyel atık suların arıtımında yararlanılmaktadır.
- Tarım ve hayvancılık: Bu alanda bentonitlerin adsorplama, su tutma, bağlayıcı ve süspansiyon yapıcı özelliklerinden yararlanılmaktadır.
- Radyoaktif atıkların arıtımı: Yüksek kation değişim kapasitesinden dolayı bentonitik killer  $^{137}\text{Cs}$  ve  $^{90}\text{Sr}$  izotoplarının sulardan uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır [64,65].

Ayrıca son dönemlerde bentonit enzimlerin immobilizasyonu için iyi bir matris olarak kullanılmaktadır. Enzimlerin stabilitesinin artmasını sağlamaktadır [65, 66].

### **4.3. XRD (X-Işını Kırınım Yöntemi)**

XRD yöntemi, inorganik katıların ve kristal yapıdaki maddelerin incelenmesine dayalı aygıtsal bir yöntemdir. Yöntem, süper iletkenler, seramikler, metaller, alaşımlar, katı çözeltiler, heterojen katı karışımlar, korozif maddeler, toprak analizlerinde, bazı adli konularda, bazı boyar maddelerde, pigmentlerde, çimentolarda, doğal veya yapay minerallerde, herhangi bir malzemenin içerdiği bileşik veya elementlerin tayininde, inorganik polimerler gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

Örnek madde analitik kırınım çalışması için ince toz haline getirilir. Böylelikle kristal taneciklerinin analizi daha rahat ve daha sağlıklı olur. Örnekler ince duvarlı cam ya da selofan kapiler tüpler içinde analiz edilir.

Kırınım desenleri, genellikle cihazlarda otomatik olarak gerçekleşir. Toz halinde bulunan örnek, uygun filtrelere sahip X-ışını tüpüne yerleştirilir. Otomatik tarama yapılarak kırınım desenleri elde edilir. Bu tür cihazlar yüksek kesinlik vermeleri ve otomatik veri ayıklayıp rapor sunmaları dolayısıyla avantajlıdır [67].

XRD yöntem, kil minerallerinin kantitatif analizi için de kullanılmaktadır [68]. Herhangi bir kil mineralinin analizinin ilk adımıdır. Kil minerallerinin

tanımlanmasında kesin sonuçlar alınmasında XRD yöntemi ilk basamak olarak bilinir [69].





## 5. ELEKTROFOREZ

Proteinlerin molekül ağırlıkları ve miktarlarının belirlenmesi amacıyla kullanılan analitik bir metottür. Elektriksel bir ortam içerisinde çözülmüş moleküllerin elektrik yüklerine göre hareket etmelerine dayanır. Küçük moleküller jel üzerinde büyük moleküllere göre daha hızlı hareket ederler. Göç hızı molekülün büyüklüğüne, yapısına, ortam konsantrasyonuna, iyonik kuvvete ve uygulanan akıma bağlı olarak değişkenlik gösterir [70].

### 5.1. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez)

SDS-PAGE moleküler biyolojideki araştırmalar için en yaygın olarak kullanılan protein elektrofrez tekniğidir. Anyonik bir deterjan olan SDS, geniş bir pH aralığında moleküllerin net bir negatif yüke sahip olduğunu gösterir. Bu deterjan, proteinleri denatüre ederek onlara negatif yük kazandırır.

Poliakrilamid jellerle yapılan elektrofrez, moleküler ve elektrofretik hareketlere dayandığından dolayı protein örneğindeki bileşenlerin daha iyi ayrışmasını sağlar. Bu jeller akrilamid ve çapraz bağlayıcı olan N,N'metilen-bis akrilamidin serbest radikal polimerizasyonu ile oluşturulur. Başlatıcı katalizör görevi gören amonyum persülfat-TEMED (N,N,N',N'tetrametiletildiamin) yardımıyla kimyasal polimerizasyon sağlanır [71].

SDS varlığında yapılan elektrofrezde ayrışma tamamen molekül ağırlıklarına göre gerçekleşir. Elektrofrez sonunda, jeli boyamayan sadece proteinleri boyayan Coomassie Blue, gümüş nitrat gibi boyalarla görüntülenir. SDS'de eğer protein iki ya da daha fazla alt birim barındırıyorsa, her bir alt birim için bir bant gözlenecektir [2].

## 6. MALZEME VE YÖNTEM

### 6.1. Mikroorganizma

Çalışmada kullanılan alkalin proteaz enzimi; Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda grubumuz tarafından topraktan izole edilen *Bacillus pumilus* Y7 suşundan izole edilmiştir [72].

### 6.2. Kimyasallar

Deneysel sırasında kullanılan ham bentonit Eczacıbaşı/Esan-Tuzla-İstanbul Firması'ndan temin edilmiştir. Organo bentonit hazırlamak için kullanılan heksadesiltrimetilamonyum bromür (HDMAB) Eastman Chemical Ltd. (ABD) firmasından alınmıştır. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma Chemical Ltd. (ABD), Fluka AG (İsviçre), Riedel AG (Almanya) ve Merck AG (Almanya)'dan temin edilmiştir.

### 6.3. Kullanılan Bakteri İzolatları ve Standart Suş

Bu çalışmada toplam 12 bakteri izolatu incelenmiştir. Bu izolatların 3'ü ticari suştur ve referans olarak kullanılmışlardır. Çalışmada kullanılan bakteri izolatları Tablo 6.1'de verilmiştir.

Tablo 6.1. Kullanılan bakteri izolatları

Kod Adı	Bakteri izolatları
Y1	<i>Bacillus cereus</i>
Y7	<i>Bacillus pumilus</i>
Y12	<i>Bacillus megaterium</i>
Y13	<i>Bacillus methylotrophicus</i>
Y15	<i>Bacillus subtilis</i>
Y35	<i>Bacillus licheniformis</i>
Y37	<i>Bacillus methylotrophicus</i>
Y38	<i>Bacillus sonnerensis</i>

Tablo 6.1.(Devam) Kullanılan bakteri izolatları

Y47	<i>Bacillus sonerensis</i>
DSM11031	<i>Bacillus vallismortis</i>
DSM7	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
DSM28326	<i>Bacillus methylotrophicus</i>

İzolatlar Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarı kültür stoklarından temin edilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda en iyi alkalen proteaz üreticisi bakteri suşu *Bacillus pumilus* Y7 olarak belirlenmiştir.

#### 6.4. Alkalen Proteaz Üreticisi İzolatların Belirlenmesi

Stok kültürler içerisinde en iyi alkalen proteaz üretici türün belirlenmesi için Eraslan vd. (2004) uyguladığı Skim milk (yağsız süt tozu) katı agar besiyeri modifiye edilerek kullanılmıştır. (% 0,1 glukoz, % 0,2 pepton, % 0,5 maya ekstraktı, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, % 5 Skim Milk, % 3 agar). Hazırlanan besiyeri otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edilmiştir. Yağsız süt tozu ayrı hazırlanıp steril edilerek besiyerine ilave edilmiştir. Besiyeri pH’sını ayarlamak için % 10’luk Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> kullanılmıştır. % 10’luk Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile besiyeri pH’sı 7, 8, 9 ve 10’a ayarlanmış ve katı agarda proteolitik zon oluşumlarına bakılmıştır. İzolatlar 37 °C’de 24, 48 ve 72 saat inkübe edilip inkübasyon sonunda proteaz aktivitesine sahip izolatlar yağsız süt tozunun hidrolizi sonucunda koloni çevresinde oluşturdukları proteolitik zonun varlığına bağlı olarak belirlenmiştir.

#### 6.5. Alkalen Proteaz Enziminin Üretimi

Alkalen proteaz enziminin üretimi için proteince zengin kültür ortamı % 1 kazein, % 0,5 maya ekstraktı, % 0,5 pepton, % 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, % 0,02 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O olarak hazırlanmıştır. % 10 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile pH 8’e ayarlanmıştır. Kazeinli sıvı kültür ortamı 30 °C de 160 rpm de 72 saat boyunca (New Brunswick Scientific-Excella E24 Incubator Shaker Series) geliştirilmiştir. Süre sonunda elde edilen bakteri kültürü 10.000 rpm ’de +4 °C de 20 dakika santrifüj edilerek üst sıvı alkalen proteaz enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

### 6.5.1. Serbest enziminin aktivitesinin belirlenmesi

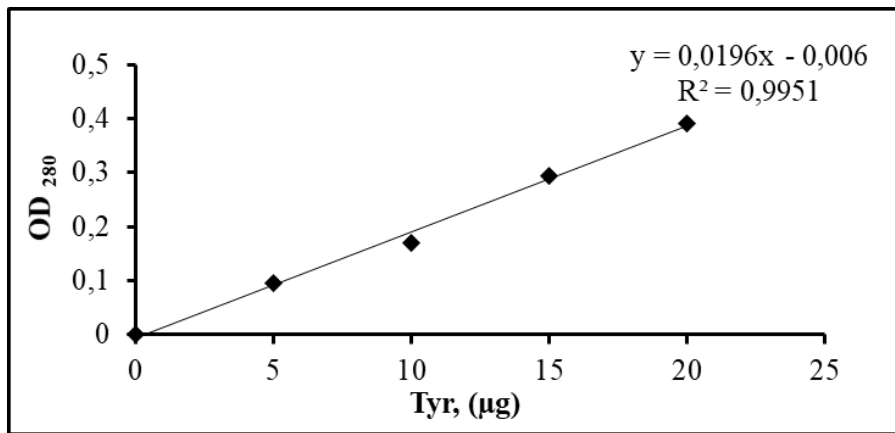
Alkalin proteaz aktivitesi belirlenirken 0,5 mL enzim 50 mM, pH 8 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponunda hazırlanan % 0,6'lık kazein çözeltisinin 2,5 mL'si ile muamele edilmiş, su banyosunda 30 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak amacıyla; reaksiyon ortamına 2,5 mL trikloroasetik asit çözeltisi (TCA) (0,11 M trikloroasetik asit, 0,22 M sodyum asetat, 0,33 M asetik asit) ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda karışım süzölmüş ve süzöntünün Biorad Smart Spec 3000 ile 280 nm'deki absorbansı okunmuştur. Eşitlik (6.1) 'den yararlanılarak aktivite hesaplanmıştır [73,74];

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/mL/min)} = \left( \frac{\text{OD}_{280} \times \text{Seyrelme Faktörü} \times \text{Reaksiyon Hacmi (mL)}}{\text{Eğim} \times \text{Enzim Hacmi (mL)} \times \text{İnkübasyon Süresi (dak)}} \right) \quad (6.1)$$

Formülde kullanılan eğim tirozin standart grafiğinden (Şekil 6.1'den) elde edilmiştir.

### 6.5.2. Tirozin standart grafiğinin hazırlanması

50 mM pH 8 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponunun 100 mL'sinde 50 mg tirozin çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 50 mM pH 8 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponunda 0, 5, 10, 15, 20, 25 µg/mL tirozin içerecek şekilde seyreltilmiştir. Hazırlanan örneklerin Biorad Smart Spec 3000 ile 280 nm'deki absorbans değerleri ölçölmüştür. Tirozin miktarına karşı okunan absorbans değerlerinin grafiğinden elde edilen eğimden yararlanılarak aktivite hesaplanmıştır.



Şekil 6.1. Tirozin standart grafiği

1 mg/mL içerecek şekilde saf su ile 10 mL bovine serum albümin (BSA, sığır serum albümin) çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiden 1 mL alıp üzerine 9 mL su ilavesi ile 10 kat seyreltilmiştir. 2 mL'lik toplam çözelti içinde hazır; 0- 0,1- 0,2- 0,3- 0,4- 0,5- 0,6 mL seyreltilmiş BSA çözeltisi olacak şekilde hazırlanan çözeltilerin üzerine hazırlanan boya çözeltisinden 2 ml ilave edilmiştir. Hazırlanan örneklerin (Biorad Smart Spec 3000) OD<sub>595</sub>'deki absorbanslarına karşı µg/mL BSA işaretlenip elde edilen doğrunun eğiminden yararlanılarak protein miktarı tayin edilmiştir.

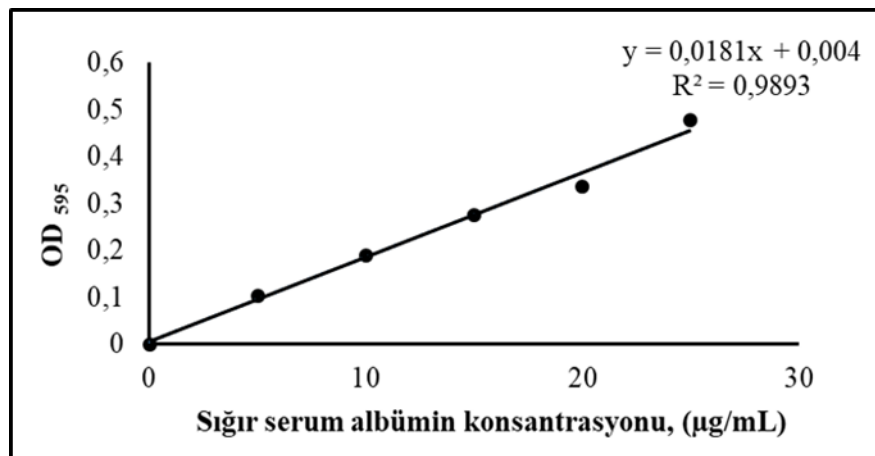
### 6.5.3. Alkale proteaz enziminde protein miktarının belirlenmesi

Enzim örneklerindeki protein miktarı (BSA) sığır serum albuminin standart protein olarak kullanıldığı, Coomassie Blue G-250 boyası bağlama yöntemi kullanılmıştır [75].

Bu yöntemde 1 mL enzim örneğinin üzerine 1 mL Coomassie Blue G-250 boyası çözeltisi ilave edilmiştir. Kör deneme için saf su kullanılmıştır. Biorad Smart Spec 3000 ile 595 nm'deki absorbans değerleri okunmuştur. Protein miktarı Eşitlik (6.2)'den yararlanılarak hesaplanmıştır;

$$\text{Protein Miktarı (mg/mL)} = \frac{\text{OD}_{595}}{\text{Eğim}} \times \text{Seyrelme Faktörü} \quad (6.2)$$

### 6.5.4. Protein standart grafiğinin hazırlanması



Şekil 6.2. Sığır serum albümin standart grafiği

600 mg Coomassie Blue G-250 Boyası 1L % 2'lik perklorik asit içinde çözülmüştür. Çözünmeyen taneciklerin giderilmesi için hazırlanan çözelti, kaba süzgeç kâğıdı ile

süzülmüştür. Hazırlanan boya çözeltisi, ışık almayan ortamda, +4 °C’de uzun süre için stabildir.

## **6.6. İmmobilize Enzimin Hazırlanması**

İmmobilize enzim hazırlanırken yapılan tüm aşamalarda amaç bentonitin şişirilip, tabakalar arasında boşluk oluşumunun sağlanmasıdır.

Bu amaçla immobilize enzimin hazırlanması aşamasında izlenen yol sırasıyla şu şekildedir:

a) Ham bentonit 30 dakikalık aralıklarla bir gün boyunca saf su ile yıkanarak bentonit içerisinde yer alan feldspat, kuars, MgO, SiO gibi yapıların uzaklaştırılması sağlanmıştır.

b) Saf su ile yıkanmış olan bentonit, 1M NaCl ile gece boyu 200 rpm’de karıştırılmıştır. Ertesi gün 9000 rpm’de santrifüj edilmiş ve üst sıvı atılmıştır. Kalan pellet saf su ile birkaç kez yıkanıp bentonit içerisinde yer alan Cl iyonlarının ortamdaki uzaklaşması sağlanmıştır (Merck Cl<sub>2</sub>-1 klor belirteci). Cl testi sonucunda negatif cevap veren Na-bentonit etüvde kurumaya bırakılmıştır.

c) Kuruyan Na-bentonit, % 20’lik HDMAB süspansiyonuyla (HDMAB;  $5 \times 10^{-3}$  M konsantrasyonda, % 20’lik etanol-su’da hazırlanmıştır.) 2 saat oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Süre sonunda süspansiyon 9000 rpm’de santrifüj edilerek pellet kısmı alınmıştır. Pellet; etanol uzaklaşana kadar saf su ile yıkanmış ve kuruması için etüvde bırakılmıştır. Bu muamele sonucu oluşan bentonite organo-bentonit denilmiştir.

d) Elde edilen organo-bentonitin 5 gramı 5 mL alkalin proteaz enzimi ile 2 saat boyunca +4 °C’de muameleye bırakılmıştır.

e) Muamele sonrasında enzim saf su ile bolca yıkanarak bağlanmayan proteinler uzaklaştırılmıştır.

f) Son olarak elde edilen immobilize enzimde aktivite ve protein analizleri yapılmıştır.

### **6.6.1. İmmobilize enziminin aktivitesinin belirlenmesi**

İmmobilize enzimin aktivitesi belirlenirken 0,1 g immobilize enzim 50 mM pH 8 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponunda hazırlanan % 0,6’lık kazein çözeltisinin 2,5 mL’si ile muamele edilmiş, su banyosunda 30 °C’de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon

sonunda reaksiyonu durdurmak amacıyla; reaksiyon ortamına 2,5 mL trikloroasetik asit çözeltisi (TCA) (0,11 M trikloroasetik asit, 0,22 M sodyum asetat, 0,33 M asetik asit) ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda karışım süzölmüş ve süzöntünün Biorad Smart Spec 3000 ile 280 nm'deki absorbansı okunmuştur. Eşitlik (6.3)'ten yararlanılarak aktivite hesaplanmıştır;

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/0,1g)} = \frac{\frac{\text{OD}_{280}}{\text{Eğim}} \times \text{Seyrelme Faktörü} \times 2,5}{0,1(\text{g}) \times \text{İnkübasyon Süresi(dak)}} \quad (6.3)$$

Eşitlik (6.4) ile verim hesabı yapılmıştır;

$$\text{Verim} = \frac{\text{İmmobilize Enzim Aktivitesi}}{\text{Serbest Enzim Aktivitesi}} \times 100 \quad (6.4)$$

### 6.6.2. İmmobilize enzimde HDMAB muamele süresi optimizasyonu

Na-bentonit HDMAB ile 1/2, 1, 2, 3, 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Belirlenen sürelerde muamele edilmiş organo-bentonitlerin her birinden 5 gram alınmış ve 4 mL alkalin proteaz enzimi ile +4 °C'de 2 saat immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon verimleri hesaplanarak sonuçlar grafik üzerinde gösterilmiştir. Deneysel çalışma 5 kez tekrarlanmış ve her denemede çift örnek kullanılmıştır. Sonuçlar standart sapma olarak verilmiştir.

### 6.6.3. İmmobilize enzimde enzim miktarı optimizasyonu

İmmobilizasyon verimi üzerine enzim miktarının etkisi incelenmiştir. 5 gram bentonit üzerinden farklı miktarlarda enzimler (4, 5, 6, 7, 8 ve 9 mL) kullanılarak, immobilizasyon işlemi +4 °C'de 2 saat boyunca gerçekleştirilmiş ve verim hesabı yapılmıştır. En iyi immobilizasyon verimine sahip enzim miktarı grafik üzerinde gösterilmiştir. Deneysel çalışma 5 kez tekrarlanmış ve her denemede çift örnek kullanılmıştır. Sonuçlar standart sapma olarak verilmiştir.

### 6.6.4. İmmobilize enzimde bentonit miktarı optimizasyonu

En yüksek verimi sağlayan 5 ml enzim ile artan bentonit miktarlarının (0,5- 1,0- 2,0- 3,0- 4,0 ve 5,0 gram) immobilizasyon verimi üzerine etkisi incelenmiştir. En iyi immobilizasyon verimine sahip bentonit miktarı grafik üzerinde gösterilmiştir.

Deneysel çalışma 5 kez tekrarlanmış ve her denemede çift örnek kullanılmıştır. Sonuçlar standart sapma olarak verilmiştir.

### **6.6.5. İmmobilize enzimde tekrar kullanım**

Tekrar kullanılabilirliğin belirlenebilmesi için immobilize enzimin 50 mM pH 8  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  tamponunda hazırlanmış % 0,6'lık kazein çözeltisi ile 30 °C'de reaksiyona sokulmuştur. Burada yapılan aktivite analizi küçük değişiklikler ile birlikte Bölüm 6.6.1'de anlatıldığı şekilde uygulanmıştır. İnkübasyon sonrasında reaksiyon çözeltisi TCA ile muamele edilmeden süzülüş, süzüntü üzerinden aktivite denemelerine devam edilmiştir. Eşitlik (6.3) yardımıyla da aktivitesi hesaplanmıştır. Bu işlem arka arkaya tekrarlanmış ve enzimin aktivitesini kaçınıcı kullanımdan sonra kaybetmeye başladığı belirlenmiştir. Her tekrardan sonra Eşitlik (6.4)'ten yararlanılarak immobilizasyon verimi hesaplanmıştır. % bağlı aktivite-tekrar kullanım ilişkisi grafik üzerinde gösterilmiştir.

### **6.7. Serbest Enzim ve İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu**

#### **6.7.1. Serbest Enzim ve immobilize enzimlerin optimum pH'larının belirlenmesi**

Serbest ve immobilize enzimler üzerine pH etkisini incelemek için, 50 mM kazein substratı; farklı pH'lara (pH: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12) sahip tampon çözeltiler içerisinde hazırlanmıştır. Kullanılan tampon çözeltiler aşağıdaki gibidir:

pH 3, pH 4 ve pH 5 için 50 mM  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  tamponu:  $K_2HPO_4$  ve  $KH_2PO_4$  için ayrı ayrı 50 mM'lık çözeltiler hazırlandıktan sonra pH-metre yardımıyla çözeltiler birbirine eklenerek tampon çözeltiler pH 3, pH 4 ve pH 5'e ayarlanmıştır.

pH 6 için 50 mM sitrik asit-Na sitrat tamponu: Sitrik asit ve Na-sitrat için 50 mM'lık çözeltiler hazırlanarak iki çözelti birbirine karıştırılmış ve pH 6 olacak şekilde tampon çözelti hazırlanmıştır.

pH 7, pH 8 ve pH 9 50 mM Tris(hidroksimetilaminoetan)-HCl tamponu: 50 mM Tris(hidroksimetilaminoetan) ve HCl çözeltileri hazırlanarak pH-metre yardımıyla çözeltiler pH 7, pH 8 ve pH 9 olacak şekilde tampon çözeltiler hazırlanmıştır.



pH 10 ve pH 11 50 mM Na bikarbont-NaOH tamponu: Na bikarbont ve NaOH 50 mM olacak şekilde hazırlanmış ve birbirine eklenerek pH 10 ve pH 11 olacak şekilde tampon çözeltiler hazırlanmıştır.

pH 12 50 mM KCl-NaOH tamponu: KCl ve NaOH çözeltilerinden 50 mM olacak şekilde hazırlanarak birbirine karıştırılmış ve pH'sı 12 olan tampon çözelti hazırlanmıştır.

Farklı pH'lara sahip tampon çözeltilerde hazırlanan substratlar ile 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 her denemede iki örnek kullanılmıştır. Sonuçlar standart sapma olarak verilmiştir.

### **6.7.2. Serbest enzim ve immobilize enzimin optimum sıcaklıklarının belirlenmesi**

Serbest ve immobilize enzim için 50 mM pH 8  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  tamponu ile hazırlanan % 0,6'lık kazein'nin katalizi için maksimum enzim aktivitesini gösteren sıcaklığı belirlemek amacıyla farklı sıcaklıklarda (25 °C, 27 °C, 30 °C, 32 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C) aktivite tayinleri yapılmıştır. Aktivite tayinleri daha önceki bölümlerde anlatıldığı gibi yapılmıştır. En yüksek aktiviteyi gösteren sıcaklığın değerine (% 100) bağlı olarak, diğer sıcaklıkların bağıl aktiviteleri (%) hesaplanmış ve grafik üzerinde gösterilmiştir.

### **6.7.3. Kazeinin immobilize proteaz enzimi ile biotransformasyonu**

Modifiye edilmiş olan bentonitten 5 gram alınarak 5 mL alkalin proteaz enzimi ile 2 saat boyunca +4 °C'de muamele edilmiştir. Süre sonunda örnek 9000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek bağlanmamış enzim aktivite ve protein analizi yapılarak uzaklaştırılmıştır. Kalan pellet saf su ile bolca yıkanmıştır. Hazırlanan örnekten 1 gram alınarak 50 mM pH 8  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  tamponunda hazırlanan % 0,6'lık kazein çözeltisinin 25 mL'si ile muamele edilmiş, su banyosunda 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi 5'er dakika aralıklarla karışımdan 1'er mL örnek alınarak gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak amacıyla; reaksiyon ortamına 1 mL trikloroasetik asit çözeltisi (TCA) ilave

edildikten sonra oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda karışım süzölmüş ve süzöntünün Biorad Smart Spec 3000 ile 280 nm'deki absorbanı okunmuştur. Eşitlik (6.3)'ten yararlanılarak aktivite hesaplanmıştır.

#### 6.7.4. Serbest enzim ve immobilize enzimin $K_m$ ve $V_m$ değerlerinin belirlenmesi

Serbest ve immobilize enzimin  $K_m$  ve  $V_m$  değerleri başlangıç hızı koşullarında Lineweaver-Burk diyagramı yardımıyla saptanmıştır. 50 mM pH 8  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  tamponunda,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-4}$ ,  $3 \times 10^{-4}$ ,  $4 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$  ve  $1 \times 10^{-3}$  mg/mL kazein hazırlanmıştır. Bölüm 5.5.1 ve 5.6.1' de anlatıldığı gibi aktivite tayinleri yapılmıştır. Eşitlik (6.1) ve (6.3)'den yararlanılarak aktivite hesaplanmıştır.

Alkalin proteaz enziminin kazein hidrolizi için  $K_m$  ve  $V_m$  değerlerinin belirlenmesinde başlangıç hız koşullarında yatışkın hal yaklaşımına göre Michaelis-Menten denklemi ve resiprokal hali kullanılmıştır;

$$V_0 = \frac{V_m \times [S]}{K_m + [S]} \quad (6.5)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \times \frac{1}{[S]} \quad (6.6)$$

Formülde yer alan parametreler;

V: 30 °C, pH 8'de kazeinin başlangıç hızı, (U/mL/min),

[S]: 50 mM, pH 8  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  tamponunda hazırlanmış kazein konsantrasyonu, (mM),

$K_m$ : Kazein hidrolizi için belirlenen koşullarda enzimin Michaelis-Menten sabiti, (mM),

$V_m$ : Kazein 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  $K_m/V_m$ , intersepinden  $1/V_m$

bulunarak; serbest ve immobilize enzimler için kinetik parametreler olan  $K_m$  ve  $V_m$  değerleri hesaplanmıştır.

#### **6.7.5. Serbest ve immobilize enzimlerin $k_{cat}$ ve $k_{cat}/K_m$ değerlerinin belirlenmesi**

$$V_m = k_{cat} \times [E]_t \quad (6.7)$$

$k_{cat}$  : turn-over sayısıdır. Enzimin substratına doygun olduğu anlarda, bir molekül enzimin birim zamanda ürüne dönüştürülen substrat miktarını ifade eder.

$[E]_t$ : Reaksiyon ortamındaki toplam enzim konsantrasyonunu ifade eder, ( $\mu\text{mol/mL}$ ) [76].

Ayrıca serbest enzim ve immobilize enzim için kinetik değerlendirmede, enzimin katalitik performansını ifade eden  $k_{cat}/K_m$  oranı serbest enzim ve immobilize enzim için hesaplanmıştır.

#### **6.8. Alkalen Proteaz Enzimi İçin Elektroforez Çalışması**

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

Alt jel için; 3,3 ml distile su, 4 ml akrilamid-bisakrilamid (% 30'luk), 2,5 ml % 0,4 SDS içeren pH 8,8, 1,5 M Tris-HCl, 100  $\mu\text{l}$  % 10'luk amonyum persülfat (APS) ve 5  $\mu\text{l}$  N,N,N',N'tetrametiletilediamin (TEMED) karışımı hazırlandıktan sonra jel dökülmüştür. Kurumasına izin vermeden üzerine izopropil alkol ilave edilip, jel oluştuktan sonra izopropil alkol temizlenmiştir.

Üst jel için; 3 ml distile su, 670  $\mu\text{l}$  akrilamid-bisakrilamid (% 30'luk), 1,25 ml % 0,4 SDS içeren pH 6,8 0,5 M Tris-HCl, 50  $\mu\text{l}$  % 10'luk APS ve 5  $\mu\text{l}$  TEMED karışımından alt jel üzerine ilave edilmiş ve taraklar yerleştirilmiştir. Jel oluştuktan sonra taraklar çıkarılıp SDS içeren elektroforez running buffer bulunduğu elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Running buffer hazırlamak için; 3 g tris, 1 g SDS, 14,4 g glisin tartılmış ve 1 ml suya tamamlanmıştır. Taraklarla oluşturulan kuyulara marker proteini ve yükleme boyası ile 95 °C'de 5 dakika bekletilerek denatüre edilmiş enzimden 15  $\mu\text{l}$  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-merkaptoetanol (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 [77].

### **6.8.1. Gümüş boyama protokolü**

Gümüş boyama işlemi için 7 farklı solüsyon hazırlanmıştır:

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

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

- 30 dakika boyunca solüsyon 1 ile muamele edildi.
- 20 dakika boyunca solüsyon 2 ile muamele edildi.
- 1 dakika boyunca solüsyon 3 ile yıkandı ve 30 saniye su ile yıkandı.
- 20 dakika boyunca solüsyon 4 ile muamele edildi.
- 3×15 saniye boyunca su ile yıkandı.
- Bantlar görünene kadar solüsyon 5 ile muamele edildi.
- Reaksiyonu durdurmak için solüsyon 6 ilave edildi.
- Solüsyon 7 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.

### 6.8.2. Zimogramın hazırlanması ve uygulanması işlemi

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.

### 6.9. Arrhenius Aktivasyon Enerjisinin Hesaplanması

Reaksiyon hızının sıcaklıkla olan ilişkisini, Boltzmann dağılım yasasıyla birleştiren Svante Arrhenius’un elde ettiği Arrhenius denklemi;

$$k_{cat} = A \times e^{E_a / RT} \quad (6.8)$$

şeklinde ifade edilmiştir. Üstel olmayan yazımının grafik üzerindeki yorumu daha kullanışlı olduğundan eşitliğin her iki tarafının logaritmasının alınmasıyla elde edilen eşitlik;

$$\ln k_{cat} = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (6.9)$$

şeklindedir.

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

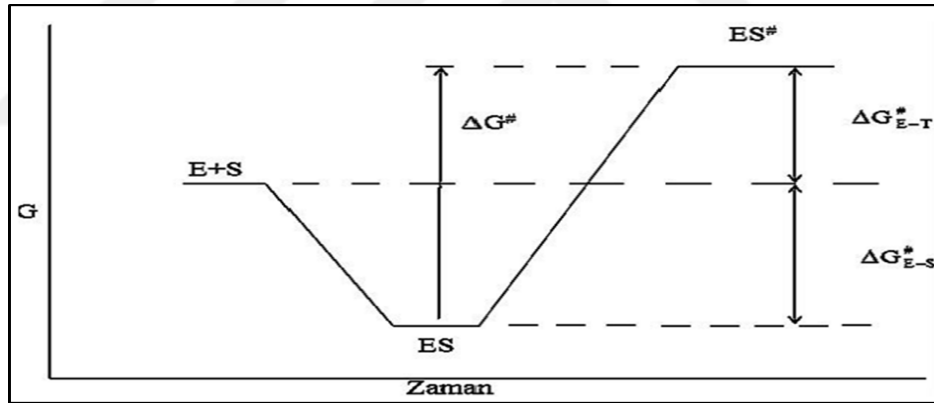
Böylece çizilen  $\ln k-1/T$  grafiğinin eğimi,  $(-)$   $E_a/R$ 'ye eşit olacaktır. Bundan faydalanarak aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) hesaplanmaktadır [78].

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.

### 6.10. Alkalin Proteaz Enzimi ile Kazein Hidrolizine Bağlı Termodinamik Parametrelerin Belirlenmesi

*Bacillus pumilus* Y7 mikroorganizmasından elde edilen alkalin proteaz ile katalizlenen kazein hidrolizi reaksiyonunun termodinamik parametrelerini içeren serbest enerji düzey diyagramı Şekil 6.3'te gösterilmiştir.



Şekil 6.3. Alkalin proteaz ile kazein hidrolizi reaksiyonunda serbest enerji düzey diyagramı

Termodinamik parametrelerin hesaplanması;

$$\Delta G^\# = -RT \ln(k_{cat} \cdot h / k_B \cdot T) \quad (\text{kJ/mol}) \quad (6.10)$$

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

$$\Delta G^\#_{E-T} = -RT \ln(k_{cat} / K_m) \quad (\text{kJ/mol}) \quad (6.11)$$

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

$$\Delta G_{ES}^{\#} = -RT \ln (1/K_m) \quad (\text{kJ/mol}) \quad (6.12)$$

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

$$\Delta H^{\#} = E_a - RT \quad (\text{kJ/mol}) \quad (6.13)$$

$\Delta H^{\#}$ : Entalpi değişimi,

$$\Delta S^{\#} = \frac{\Delta H^{\#} - \Delta G^{\#}}{T} \quad (\text{kJ/mol}) \quad (6.14)$$

$\Delta S^{\#}$ : 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].

## 7. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 7.1. Alkalen Proteaz Üreticisi İzolatların Belirlenmesi

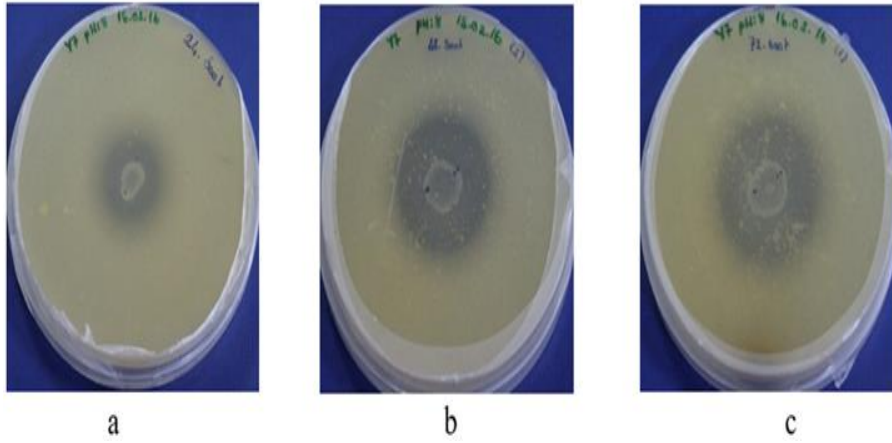
Besiyeri pH'sı 7, 8, 9 ve 10'a ayarlanmış olan izolatların 37 °C' de 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonları sonucunda Bölüm 6.4'te verilen prosedüre göre katı agarda meydana getirdikleri proteolitik zonlara ait sonuçlar Tablo 7.1'de verilmiştir.

Tablo 7.1. Proteolitik zon oluşumu

Mikroorganizma	Zon Çapı (mm)								
	pH:7			pH:8			pH:9		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat	24 Saat	48 Saat	72 Saat	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Y1 ( <i>B.Cereus</i> )	0,7	0,9	1,0	0,5	1,1	1,1	-	0,4	0,8
Y7 ( <i>B.Pumilus</i> )	-	0,4	0,7	0,8	1,3	1,6	0,2	0,6	0,9
Y12( <i>B.Megaterium</i> )	0,7	0,8	0,8	0,2	0,3	0,5	-	0,3	0,6
Y13 ( <i>B.Methylotrophicus</i> )	0,7	1,0	1,1	0,5	0,8	1,0	-	0,2	0,7
Y15 ( <i>B.Subtilis</i> )	-	0,6	0,6	0,6	0,7	0,9	0,4	0,6	0,6
Y35 ( <i>B.Licheniformis</i> )	0,1	0,7	1,1	-	0,7	1,2	-	0,7	0,9
Y37 ( <i>B.Methylotrophicus</i> )	0,8	1,0	1,0	-	1,0	1,2	0,1	0,4	0,6
Y38 ( <i>B.Sonerensis</i> )	0,4	1,2	1,2	0,1	0,4	0,4	-	0,4	0,5
Y47 ( <i>B.Sonerensis</i> )	0,6	0,8	0,9	-	0,4	0,6	-	0,4	0,5
DSM11031( <i>B. Vallismortis</i> )	-	-	0,4	0,6	0,8	0,8	-	0,3	0,7
DSM7( <i>B. Amyloliquefaciens</i> )	0,7	0,8	1,0	0,7	1,0	1,0	0,6	0,6	0,8
DSM28326( <i>B.Methylotrophicus</i> )	0,6	0,6	0,8	0,7	0,9	1,0	0,4	0,4	0,8

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda pH 10'da hiçbir izolata ait proteolitik zon oluşumu görülmemiştir. En iyi zon oluşumu pH 8'de 72 saatlik inkübasyon sonucunda *Bacillus pumilus* Y7 izolatında görülmüştür. Şekil 7.1'de *Bacillus pumilus* Y7 izolatına ait zon oluşumları verilmiştir.

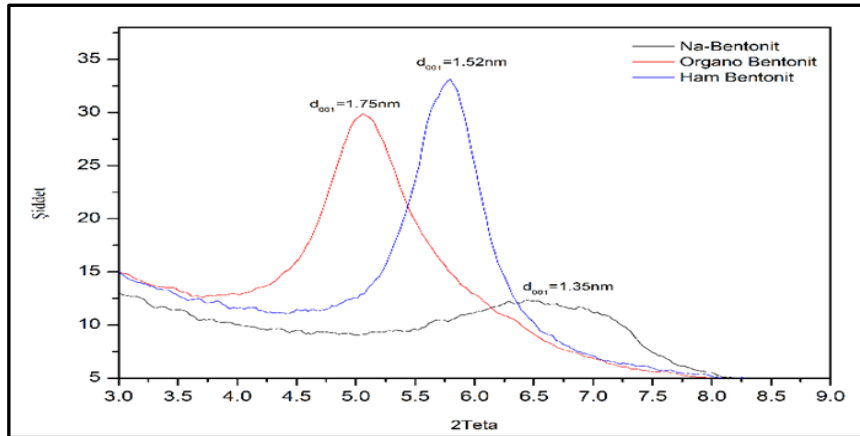




Şekil 7.1. *Bacillus Pumilus* Y7 izolatına ait zon çapları (a:24 Saat, b:48 Saat, c:72 Saat)

## 7.2. Bentonit Kilinin XRD (X-Işını Kırınım Yöntemi) Analizi

Çalışmamızın ilk aşamasında *Bacillus pumilus* Y7 alkalin proteaz enzimi Bölüm 6.6'da belirtilen şekilde yıkanmış olan ham bentonit ile immobilize edildi. İmmobilizasyon sonucunda yapılan aktivite analizinde aktivite gözlenmemiştir ve bu durumun hedef enzimimizin bentonitin tabakalar arası boşluğa girememesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Hedef enzimimizin bentonitin tabakaları arası boşluğuna yerleşebilmesi için; bentonit, önce sodyum klorür ardından hegzadesiltrimetilamonyum bromür (HDMAB) ile muamele edilmiş ve tabakalar arası boşluk genişletilmiştir (Şekil 7.2). Ham bentonit, Na-bentonit ve organo-bentonit için yapılan XRD analizinde 3-9 dereceler arasında ölçüm alınmıştır ve analiz  $d=0,001$  düzleminde gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucu elde edilen grafik Şekil 7.2'de verilmiştir.



Şekil 7.2. XRD analizi

Şekilde görüldüğü gibi ham bentonit, Na-bentonit ve organo-bentonit için elde edilen 2Teta değerleri sırasıyla 1,52 nm, 1,35 nm ve 1,75 nm olarak bulunmuştur. XRD analizi sonucuna göre organo-bentonitte katmanlar arası mesafenin açıldığı ve *Bacillus pumilus* Y7 alkalen proteaz enziminin katmanlar arasına girişine izin verildiği görülmüştür.

Doğal Na-montmorillonitlerin X-ışınları difraksiyonu yöntemiyle belirlenen katman kalınlığı  $d_{(0,001)} = 1,2$  nm civarında olduğu ve katmanlar arasına büyük organik veya inorganik iyonların girmesiyle katmanlar arası mesafenin 2,8 nm'ye kadar çıkabileceği bildirilmiştir [46].

Literatürde CTMAB ile modifiye edilmiş bentonitin, farklı molekül ağırlıklarına sahip enzimlerle immobilize edildiği bildirilmiş ve bentonit-immobilize enzimlerin XRD analizleri rapor edilmiş. Analiz  $d=0,001$  düzleminde gerçekleştirilmiş ve 2Teta değerleri verilmiş [46,79,80]. *Candida rugosa*'dan izole edilen lipaz enziminin XRD analiz sonucunda Na-bentonit (BMS-bentonit monolayer) için 1,38 nm ve immobilize bentonit 1,34 nm [79],  $\alpha$ -amilaz enzimi için Na-bentonit (BMS-bentonit monolayer) için 1,38 nm ve immobilize bentonit 1,41 nm [51], alkalen fosfataz enzimi için Na-bentonit (BMS-bentonit monolayer) için 1,38 nm ve immobilize bentonit 1,32 nm olarak rapor edilmiştir [80]. Alkalen fosfataz enziminin sepiyolit ile immobilizasyonu üzerine yapılan bir başka çalışmada, sepiyolit CTMAB ile modifiye edilmiş ve XRD analizi gerçekleştirilmiş. Analiz sonucuna göre; Na-sepiyolit (SMS-sepiyolit monolayer) için 1,176 nm, immobilize sepiyolit için 1,156 nm olarak rapor edilmiştir [81]. Literatür sonuçlarına göre; enzimlerin molekül ağırlıkları ve kullanılan destek materyaline göre katmanlar arasında oluşan açılmanın değişkenlik gösterdiği söylenebilir.

### **7.3. İmmobilize Enzimde Optimizasyon Çalışmaları**

#### **7.3.1. HDMAB muamele süresi optimizasyonu**

İmmobilize proteaz enzimlerine, endüstrinin birçok alanında rastlanmaktadır. Gıda ve deterjan endüstrileri başta olmak üzere, farmasötik, çevre ve biyosensör alanlarında da uygulama alanlarına sahiptirler. Gıda endüstrisinde biranın soğutulması, sütün bozulmasını ve sürekli pıhtılaşmasını engellemek amacıyla

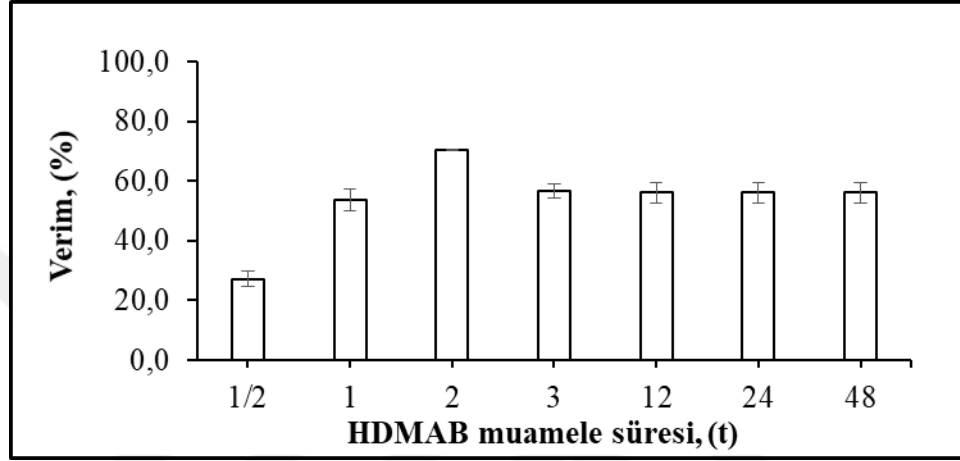
kullanılır. Kimyasal çözücüler, pH, sıcaklık ve yüksek substrat konsantrasyonları gibi farklı koşullara olan dayanıklılığından dolayı deterjan endüstrilerinde tercih edilir [82,83].

*Bacillus pumilus* alkalen proteazının organo-bentonit üzerine kovalent olmayan etkileşimlerle immobilize edilmesi çalışmalarına literatürde rastlanmamıştır. Bu amaçla çalışmamızda hedef enzimimiz modifiye organo-bentonit üzerine immobilize edilmiştir.

İmmobilizasyon için bentonit seçilmesinin sebebi sadece ucuz bir destek olmasının ötesinde yüzey özelliklerinin (hidrofilikliği ya da hidrofobikliği) katyon değişimi ile çeşitlendirilebilmesidir. Katyonik sürfaktan olan HDMAB'nin kritik misel konsantrasyonu (CMC)  $1 \times 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup> olarak rapor edilmiştir [84]. Katyonik sürfaktanın CMC'den düşük konsantrasyonlarda kullanılması sürfaktan monomerlerinin iyon değişimi ile tutulmasını sağlar ve en nihayetinde tek tabaka oluşur (BMS, bentonit monolayer). Sürfaktan konsantrasyonunun arttırılması ise sürfaktanın hidrokarbon kuyrukları arasında etkileşime sebep olur ki bu da çift tabakanın ya da düzensiz çift tabakanın oluşumunu sağlar (BBS, bentonit bilayer) [85]. Bu yüzden çalışmamızda HDMAB'nin CMC'nin alt ve üst konsantrasyonları olan  $5 \times 10^{-4}$  ve  $5 \times 10^{-3}$  M derişimleri denenmiştir. Ancak BBS konsantrasyonları enzimin tekrar kullanımına mücade etmediği için bundan sonraki denemeler HDMAB'nin tek tabaka oluşturacağı BMS konsantrasyonlarında devam etmiştir.

Çalışmanın ilk optimizasyon basamağında Na-bentonit, HDMAB ile oda sıcaklığında 1/2, 1, 2, 3, 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Süre sonunda organo-bentonitler saf su ile etanol uzaklaşana kadar yıkanmış ve kurumaları için 100 °C'de ki etüvde 5 saat bekletilmişlerdir. Hazırlanan organo-bentonitlerden 5'er gram alınarak her biri 4 mL alkalen proteaz enzimi ile 2 saat boyunca +4 °C'de muamele edilmiştir. Süre sonunda örnekler 9000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek bağlanmamış enzimler daha sonra aktivite ve protein analizleri yapılmak üzere uzaklaştırılmıştır. Kalan pellet saf su ile bolca yıkanarak proteinler uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan örneklerden 0,1'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 % 0,6'lık kazein çözeltisinin 2,5 mL'si ile su banyosunda 30 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak amacıyla; reaksiyon ortamına

2,5 mL trikloroasetik asit çözeltisi (TCA) (0,11 M trikloroasetik asit, 0,22 M sodyum asetat, 0,33 M asetik asit) ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda karışım süzölmüş ve süzöntünün Biorad Smart Spec 3000 ile 280 nm'deki absorbansı okunmuştur. Eşitlik (6.3)'ten yararlanılarak aktivite hesaplanmıştır. Grafikte % 100 değeri serbest enzimin aktivitesi olarak kabul edilmiştir.



Şekil 7.3. 5 gram organo-bentonit ile 4 mL alkalin proteaz enziminin farklı HDMAB muamele süreleri üzerine etkisi (Spesifik Aktivite: 123,02 U/mg)

Aktivite hesaplamalarından sonra elde edilen değerler yardımıyla immobilizasyon verimleri Eşitlik (6.4) yardımıyla bulunarak sonuçlar grafik üzerinde gösterilmiştir. HDMAB'nin Na-bentonit ile muamelesinde en yüksek immobilizasyon verimine sahip olan süre saptanmıştır. Şekil 7.3'te HDMAB muamelesi üzerine yapılmış olan çalışmaya ait grafik gösterilmiştir.

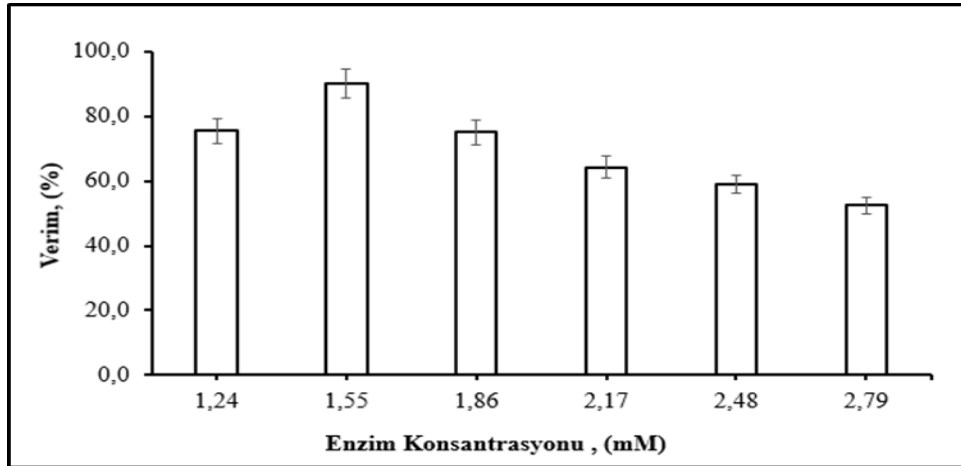
Şekil 7.3'te görüldüğü gibi en yüksek immobilizasyon veriminin 2 saatlik muamele sonucunda olduğu bulunmuştur. 2 saat HDMAB muamelesi sonucunda elde edilen immobilizasyon verimi % 70,4 olarak saptanmıştır.

İnvertaz enziminin bentonit ile kovalent olmayan etkileşimlerle immobilize edildiği çalışmada [53], kullanılan bentonitin HDMAB ile muamele süresi oda sıcaklığında 24 saat sürerken; lipaz enziminin bentonit ile immobilizasyonunun gerçekleştirildiği bir başka çalışmada sürfaktan olarak kullanılan setiltrimetiamonyum bromür (CTMAB) bentonit ile 60 °C'de 15 saat muamele edilmiştir [86]. Bu çalışmalar göz önüne alındığında çalışmamızda kullanılan

bentonitin sürfaktan ile modifikasyon süresinin daha ılımlı olması katyon değişiminin daha kısa sürede gerçekleştiğinin göstergesi olabilmektedir. Ticari uygulamalarda bu durumun avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

### 7.3.2. Enzim miktarı optimizasyonu

5 gram organo-bentonit ile 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 mL alkale proteaz enzimi varlığında optimizasyon çalışması yapılmıştır. Deney tüpleri belirlenen oranlardaki organo-bentonit ve enzimleri içerecek şekilde hazırlanmış ve +4 °C'de 2 saatlik muamele başlatılmıştır. Süre sonunda örnekler 9000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek bağlanmamış enzimler aktivite ve protein analizleri yapılarak uzaklaştırılmıştır. Kalan pellet saf su ile bolca yıkanmıştır. Hazırlanan örneklerden 0,1'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 % 0,6'lık kazein çözeltilisinin 2,5 mL'si ile muamele edilmiş, su banyosunda 30 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak amacıyla; reaksiyon ortamına 2,5 mL TCA ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda karışım süzölmüş ve süzöntünün Biorad Smart Spec 3000 ile 280 nm'deki absorbansı okunmuştur. Eşitlik (6.3)'ten yararlanılarak aktivite hesaplanmıştır.



Şekil 7.4. 5 gram organo-bentonit ile artan enzim konsantrasyonlarının immobilizasyon verimi üzerine etkisi (Aktivite sırasıyla: 94,7 U- 118,5U- 142,2 U- 166,0 U- 189,7U- 213,4 U , Spesifik Aktivite: 123,02 U/mg)

Elde edilen sonuçlar ile immobilizasyon verimleri Eşitlik (6.4) yardımıyla hesaplanmış ve enzim miktarları konsantrasyon cinsinden alınarak grafiğe aktarılmıştır. Şekil 7.4'te immobilizasyon verimlerine ait sonuçlar gösterilmiştir. Grafikte % 100 değeri serbest enzimin aktivitesi olarak kabul edilmiştir.

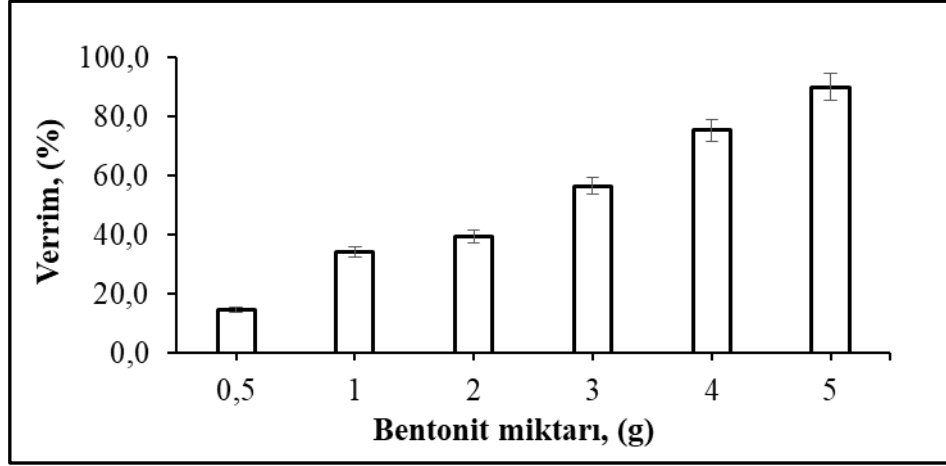
Şekil 7.4'te görüldüğü gibi en yüksek immobilizasyon verimi 5 gram modifiye bentonit ile 5 mL alkalin proteaz enzimi varlığında yapılan çalışma sonucunda % 90 olarak elde edilmiştir. 4 mL'nin altındaki hacimlerde organo-bentonit yeterince ıslanamadığından dolayı azalan enzim miktarlarında daha fazla deneme yapılmamıştır.

Enzim miktarı arttırıldığı zaman immobilize olan enzim miktarı da artmaktadır. Doygun alkalin proteaz konsantrasyonunun 118,5 ünite enzim olduğu belirlenmiştir. Enzim miktarı arttıkça immobilizasyon veriminin düşmesinin sebebi enzim molekülünün bentonit yüzeyinde agregatlar oluşturduğu ve bu durumda substratın enzim molekülünün aktif bölgesine erişiminde enerji bariyerini yükselttiği düşünülmektedir [85].

### **7.3.3. Bentonit miktarı optimizasyonu**

Modifiye edilmiş olan bentonitten 0,5- 1,0- 2,0- 3,0- 4,0 ve 5,0 gram deney tüplerine alınmış, 5 mL alkalin proteaz enzimi ile 2 saat boyunca +4 °C'de muamele edilmiştir. Süre sonunda örnekler 9000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek bağlanmamış enzimler aktivite ve protein analizleri yapılarak uzaklaştırılmıştır. Kalan pellet saf su ile bolca yıkanmıştır. Hazırlanan örneklerden 0,1'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 % 0,6'lık kazein çözeltisinin 2,5 mL'si ile muamele edilmiş, su banyosunda 30 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak amacıyla; reaksiyon ortamına 2,5 mL trikloroasetik asit çözeltisi TCA ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda karışım süzölmüş ve süzütünün Biorad Smart Spec 3000 ile 280 nm'deki absorbansı okunmuştur. Eşitlik (6.3)'ten yararlanılarak aktivite hesaplanmıştır.

İmmobilizasyon verimleri (6.4) no'lu eşitlik yardımıyla hesaplanmış ve en yüksek immobilizasyon verimine sahip olan bentonit miktarı bulunmuştur. Şekil 7.5'te bentonit miktarı üzerine yapılmış olan optimizasyona ait grafik gösterilmiştir. Grafikte % 100 değeri serbest enzimin aktivitesi olarak kabul edilmiştir.

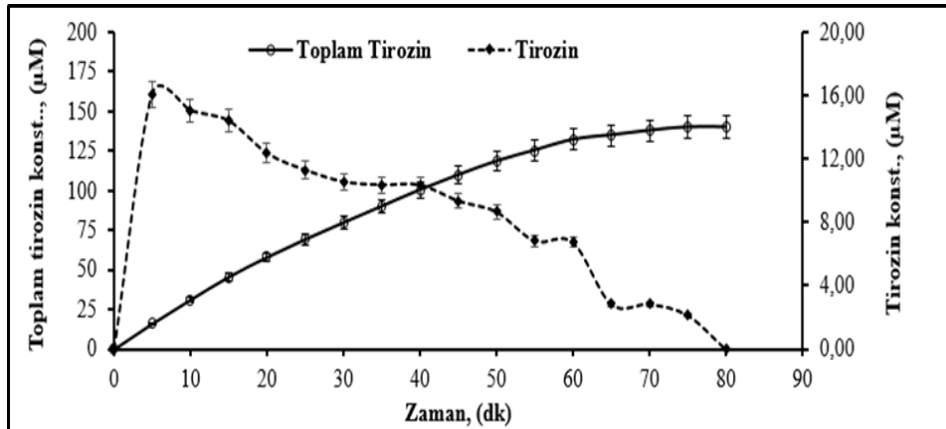


Şekil 7.5.5 ml enzim ile artan bentonit miktarlarının immobilizasyon verimi üzerine etkisi (Spesifik Aktivite:123,02 U/mg)

Şekil 7.5'te de görüldüğü gibi en yüksek immobilizasyon verimi 5 gram modifiye bentonit ile 5 mL alkalin proteaz enzimi varlığında yapılan çalışma sonucunda % 90 olarak elde edilmiştir.

0,5 gram ile başlanılan çalışmada % 14,6 verim elde edilirken, organo-bentonit miktarının artırılmasıyla immobilizasyon verimi de Şekil 7.5'te gösterildiği gibi kademeli olarak artmıştır. Bölüm 7.3.2'de belirlenen optimal 5 mL alkalin proteaz enzimi 5 gramdan fazla olan organo-bentoniti tam olarak ıslatamadığından dolayı bu miktarın üzerine çıkılmamıştır. 5 gramın altındaki organo-bentonitlerle yapılan denemelerde bağlanmamış enzim miktarı fazla olduğundan immobilizasyon verimleri düşük çıkmıştır.

#### 7.3.4. Kazeinin immobilize proteaz enzimi ile biotransformasyonu



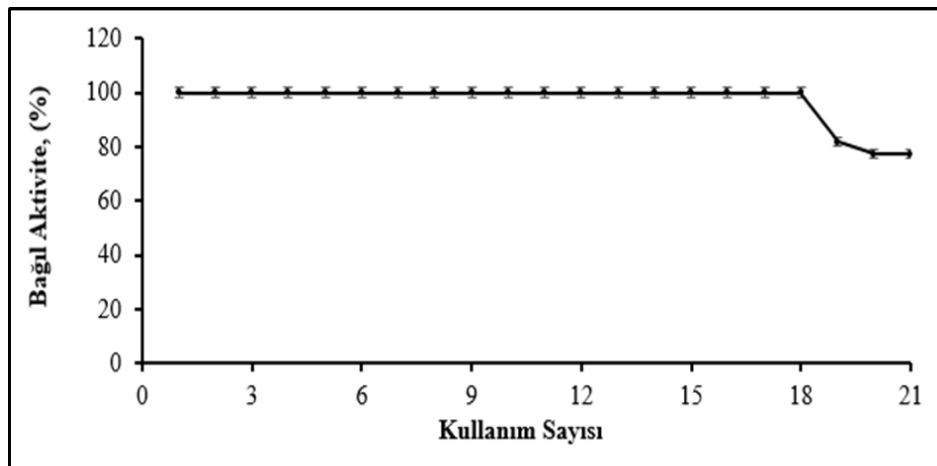
Şekil 7.6. Kazeinin immobilize proteaz enzimi ile biotransformasyonu

Kazein ve toplam kazein miktarları hesaplanarak kazeinin immobilize proteaz enzimi ile biotransformasyonuna ait grafik Şekil 7.6'da gösterilmiştir.

Çalışmamızda başlangıç konsantrasyonu 16,1 µM olan kazein biotransformasyonunu 80 dakika da tamamlamıştır.

### 7.3.5. İmmobilize enzimde tekrar kullanım

İmmobilizasyon işleminin en önemli avantajlarından biri de enzimin bir desteğe tutturulmasını sağlayarak enzimin tekrar kullanılabilir bir hale getirilmesidir. Tekrar kullanılabilirliğin belirlenebilmesi için 5 gram organo-bentonit, 5 mL alkalin proteaz enzimi ile 2 saat +4 °C'de muamele edilmiştir. İmmobilize enzimden deney tüpüne 0,1 gram alınarak 50 mM pH 8 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponunda hazırlanan % 0,6'lık kazein çözeltisinin 2,5 mL'si ile muamele edilerek, su banyosunda 30 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örnekler 10.000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı başka bir deney tüpüne alınarak üzerine 2,5 mL trikloroasetik asit çözeltisi (TCA) ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Deney tüpünde kalan immobilize enzim üzerine tekrar 2,5 mL % 0,6'lık kazein substratı eklenmiş ve 30 °C'de 20 dakika inkübe edilerek bir önceki işlem tekrarlanmıştır. Tekrar kullanımı test etmek amacıyla gerçekleştirilen bu deney bağıl aktivitenin % 70'i kalana dek sürdürülmüştür. 30 dakika sonunda karışım süzölmüş ve süzöntünün Biorad Smart Spec 3000 ile 280 nm'deki absorbansı okunmuştur.



Şekil 7.7. İmmobilize enzimde tekrar kullanım



Eşitlik (6.3)'ten yararlanılarak aktivite hesaplanmıştır. Sonuçlar % bağıl aktivite olarak Şekil 7.7'de gösterilmiştir. Grafikte % 100 değeri serbest enzimin aktivitesi olarak kabul edilmiştir.

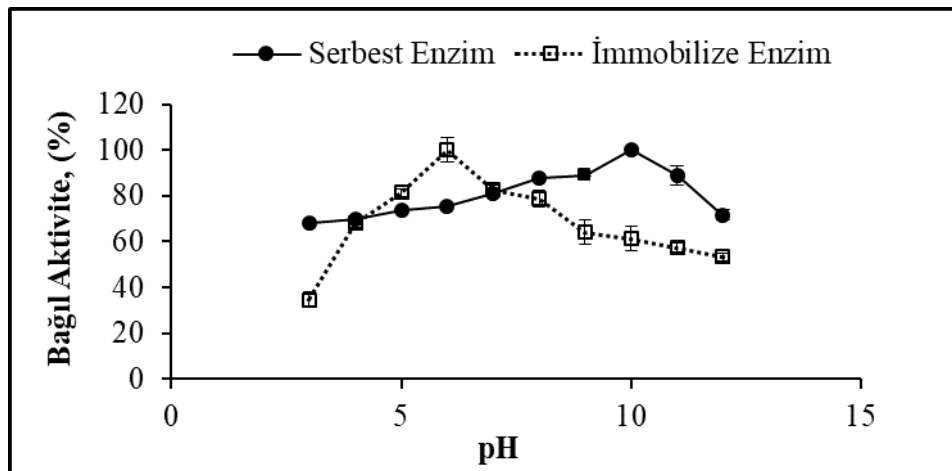
18 deneme boyunca enzimin aktivitesini koruduğu görülmüştür. 19. denemeden itibaren aktivite % 77,3 olarak belirlenmiştir.

Proteaz enziminin gözenekli aktif karbon parçacıkları üzerine yapılan immobilizasyon çalışmasında enzimin aktivitesini ilk 10 tekrarda % 100 koruduğu 25'inci kullanımdan itibaren ise yarıya kadar düştüğü saptanmıştır. [87]. Bir başka çalışmada lipaz enziminin organo-bentonit üzerine immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada 6 tekrar kullanım bakılmıştır. İlk 3 tekrar kullanımda enzimin aktivitesini % 100 koruduğu 6'ncı tekrarda ise enzimin bağıl aktivitesi % 80'lere kadar düşmüştür [66].

Proteaz enzimi üzerine yapılan immobilizasyon çalışmalarında 20 kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin % 60'ından fazlasının korunması değerini iyi olduğunu belirtmektedir [87]. Buna bağlı olarak çalışmamız 20 kullanımdan sonra % 77,3 bağıl aktivite gösterdiği için elde ettiğimiz sonuç yaptığımız çalışmayı desteklemektedir.

#### 7.4. Serbest ve İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu

##### 7.4.1. Serbest ve immobilize enzimlerin optimum pH'larının belirlenmesi



Şekil 7.8. Kazeinin farklı pH'larda aktiviteye olan etkisi

Serbest ve immobilize enzimler üzerine pH etkisini incelemek için; 50 mM pH'sı 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12 olan tampon çözeltiler Bölüm 6.7.1'de belirtildiği gibi oluşturulup, % 0,6'lık kazein substratı bu tampon çözeltiler içinde hazırlanmıştır.

Farklı pH'lara sahip tampon çözeltilerde hazırlanan substratlar ile aktivite analizleri yapılmıştır. En yüksek aktiviteye sahip pH değerine (% 100) bağlı olarak diğer pH aralığındaki sonuçların bağlı aktiviteleri (%) hesaplanmış ve sonuçlar % maksimum aktivite olarak pH 'ya karşı Şekil 7.8'de grafiğe geçirilmiştir.

Çalışma sonucunda serbest enzim için optimum pH 10, immobilize enzim için optimum pH 6 olarak bulunmuştur.

Bentonit gibi toprak kil sistemlerinin pH'ya bağlı olarak iyon değiştirme özelliğine sahip olduğu bildirilmiştir. Bentonitin yapısında izomorf katyon varlığından dolayı kalıcı yük negatiftir. pH'ya bağlı değişiklikler, doğrudan ya da dolaylı olarak bentonitin yapısında bulunan SiO<sub>2</sub> ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gibi amorf kolloidlerin varlığına bağlı olarak değişkenlik gösterir [65].

Genel olarak, enzimatik aktivite, enzimin esnekliği nedeniyle reaksiyon ortamının pH değişimlerinden kolayca etkilenir. Enzim immobilizasyonu, pH stabilitesini arttırmaya yardımcı olabilirken, enzimi çevreleyen mikro ortamın değişmesi nedeniyle immobilizasyon sonrasında enzim için optimum pH değişebilir. Bu nedenle, immobilizasyon öncesi ve sonrasında farklı pH'daki aktivitelerin karşılaştırılması yapılmalıdır [66].

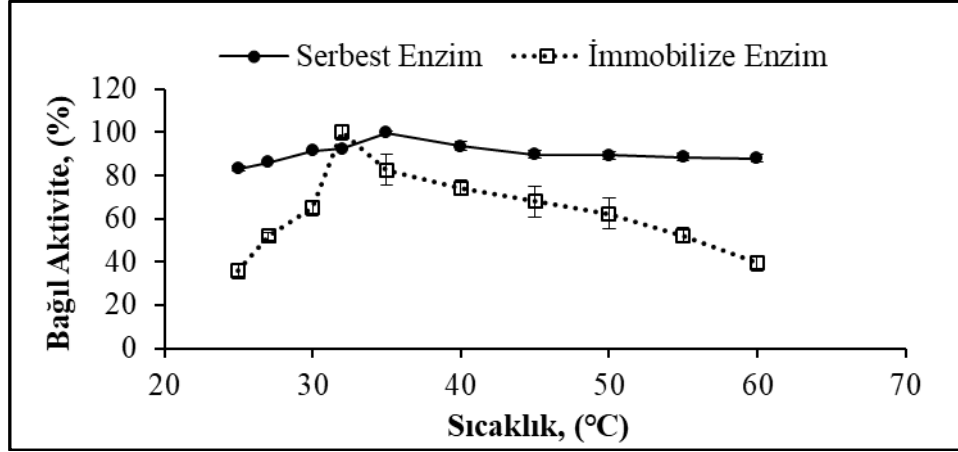
*Synergistes* sp.'den izole edilen asidik proteaz enziminin aktif karbon parçacıkları üzerine immobilizasyon çalışmasında serbest enzim için optimum pH 6,5 iken immobilize enzim için 6 olarak bulunmuştur. Bu durumun nedeni karbon parçacıkları üzerine immobilize edilmiş enzimin mikro çevresinin, tamponlanmış olabileceğinden dolayı tampon çözeltinin asiditesinden daha az etkilenmiş olabileceğinden kaynaklandığı belirtilmiştir [87]. Ticari lipaz enziminin, organo-bentonit ve asit ile aktive edilmiş organo-bentonit ile immobilizasyonu üzerine yapılan çalışmada serbest enzimin pH değeri ile organo-bentonit immobilize enzimin pH değerinin aynı olduğu (6), fakat asit muameleli organo-bentonitin pH değerinin 7,5 çıktığı rapor edilmiştir. Asit muameleli organo-bentonit durumunda pH değerinin yükselmesi;

yüzeydeki fazlalaşan hidrojen iyonlarının -daha yüksek pH'da nötralize edilmesi gereken- katalizörün mikro çevresindeki pH değerinin düşmesine sebep olduğu şeklinde kaydedilmiştir [86]. Lipaz enzimiyle ilgili bir başka çalışmada organo-bentonit ile immobilizasyon gerçekleştirilmiş ve her iki enzim türü için de optimum pH'nın değişmediği ve 6 olarak belirlendiği kaydedilmiştir [66]. Katalaz enziminin bentonit ile immobilizasyonu çalışmasında optimum pH serbest katalaz için 7 immobilize katalaz için 8 olarak bulunmuş ve bu değişikliğin enzimin pozitif yüklerinin kilin yüzeyi ile bağ yapmasından kaynaklandığı rapor edilmiştir [88]. Bu çalışmalar göz önüne alındığında serbest enzim ve immobilize enzim için optimum pH değerinin aynı olmasının yanı sıra farklılıklarda gösterdiği görülmektedir.

Serbest ve immobilize enzimdeki optimum pH değerlerinin farklı çıkması enzim-destek materyali arasındaki etkileşime bağlıdır [89] Şu durum ifade edilmelidir ki; immobilizasyon için kullanılan destek materyalinin yüzeyindeki yükler ile immobilize edilmek üzere kullanılan enzim arasında gerçekleşen elektrostatik etkileşimler, protein molekülü olan enzimin mikro çevresinde yük değişimine sebep olur. Bu durum da neticede enzim molekülünde pH kaymalarına sebep olur [89]. Bizim çalışmamızda da serbest enzim molekülü için optimum pH değeri 10 iken immobilize enzim için bu değer 6 olarak belirlenmiştir. *Bacillus pumilus* Y7 alkalin proteazı, organo bentonit ile immobilize edildiği durumda gerçekleşen elektrostatik etkileşimler çalıştığımız enzimin mikro çevresinde yük değişimlerine neden olmuş ve bu durum da optimum pH değerinde anlamlı değişikliklere sebep olmuştur.

#### **7.4.2. Serbest ve immobilize enzimlerin optimum sıcaklıklarının belirlenmesi**

Serbest ve immobilize enzim için 50 mM pH 8  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  tamponu ile hazırlanan substratların 25 °C, 27 °C, 30 °C, 32 °C 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C sıcaklıklarda aktivite tayinleri yapılmıştır. En yüksek aktiviteyi gösteren sıcaklığın değerine (% 100) bağlı olarak, diğer sıcaklıkların bağıl aktiviteleri (%) hesaplanmış ve Şekil 7.9'da gösterilmiştir.



Şekil 7.9. Kazeinin farklı sıcaklıklarda aktiviteye olan etkisi

Deney sonucunda serbest enzim için optimum sıcaklık 35 °C, immobilize enzim için optimum sıcaklık 32 °C olarak bulunmuştur.

İmmobilize enzimin sıcaklık parametresi, immobilizasyon işleminin enzimatik aktiviteyi nasıl etkilediğini belirlemek için gereklidir [66].

Enzimatik reaksiyonların hızı, genelde reaksiyon sıcaklığının artmasıyla artar daha yüksek sıcaklıklar proteinin denatürasyonuna neden olabilir [87].

Literatürde serbest ve immobilize enzim üzerine sıcaklığın etkisini inceleyen çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. *Synergistes* sp.'den izole edilen asidik proteaz enziminin aktif karbon parçacıkları üzerine immobilizasyon çalışmasında serbest enzim ve immobilize enzim için kaydedilen optimum sıcaklık değeri 50 °C [87], lipaz enziminin bentonit ile kovalent olmayan etkileşimlerle immobilize edildiği çalışmalarda her iki enzim türü için optimum sıcaklık 30 °C [66,86], pektinesteraz enziminin bentonit ile immobilizasyonu üzerine yapılan çalışmada serbest enzim için optimum sıcaklık 60 °C iken immobilize enzim için 50 °C olarak kaydedilmiştir [65].

Çalışmamızda serbest enzim olarak kullanılan *Bacillus pumilus* Y7 alkalin proteazının optimum sıcaklığı 35 °C olarak belirlenirken immobilize enzimin optimum sıcaklık değeri 32 °C olarak bulunmuştur. Optimum sıcaklıktaki bu küçük değişiklik enzimimizin organo-bentonit ile immobilize olması durumunda meydana gelen elektrostatik değişikliğin, enzimin konformasyonel bütünlüğünde meydana getirdiği değişiklikten kaynaklandığı düşünülmektedir. Optimum sıcaklık değerinin azalması enzimin katalitik özelliğinin azalması şeklinde yorumlansa da çalışmamızda

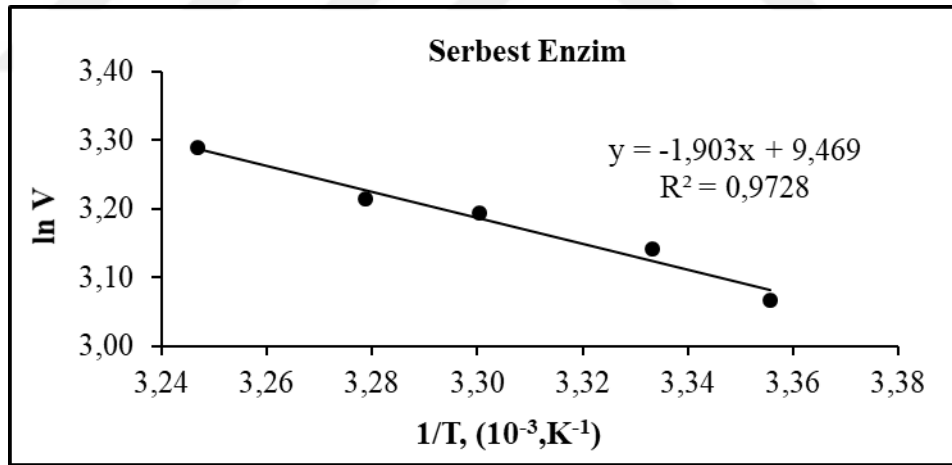
optimum sıcaklığın ihmal edilebilecek düzeyde olması (3 °C); sıcaklığın, immobilize *Bacillus pumilus* Y7 alkalin proteazının katalitik özelliklerini dramatik olarak değiştirmedeğini göstermiştir.

#### 7.4.3. Serbest ve immobilize enzimin aktivasyon enerjilerinin belirlenmesi

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 [90].

Reaksiyonun başlaması için gerekli olan aktivasyon enerjisinin belirlenmesi için Şekil 7.10 ve Şekil 7.11’de gösterilen grafikler çizilmiştir.

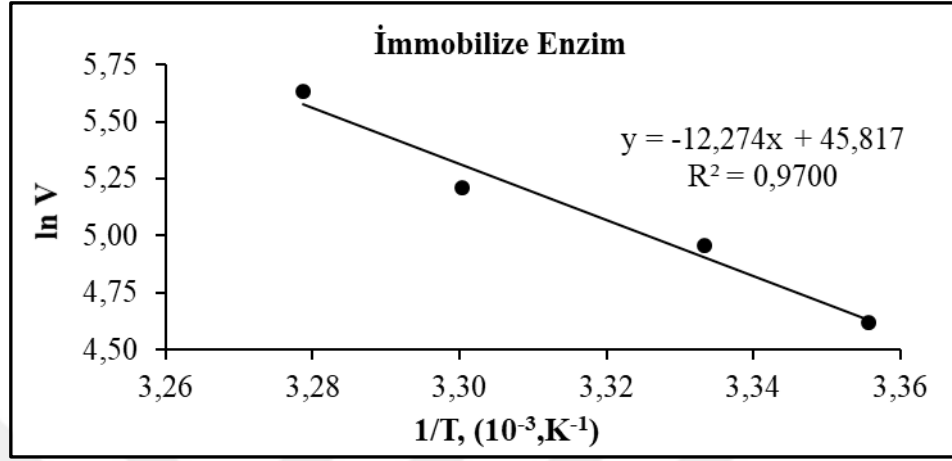
Arrhenius eşitliğinden yararlanılarak çizilen  $\ln V-1/T$  grafiğinde eğim  $-E_a/RT$ ’ye eşit olduğundan aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) serbest enzim ve immobilize enzim için sırasıyla 15,82 (kJ/mol) ve 102,0 (kJ/mol) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 7.10. Serbest enzim için Arrhenius grafiği

George ve Sugunan tarafından *Aspergillus niger* glukoamilazın nişasta hidrolizi için farklı mezoporlara sahip silika üzerine kovalent immobilizasyonunda, serbest enzim için aktivasyon enerjisi 20,43 kJ/mol olarak rapor edilmiştir. Çalışmada kullanılan farklı mezoporlara sahip silikalar için elde edilen aktivasyon enerji değerlerinin serbest enzime göre artış gösterdiği bildirilmiştir [91].

Bir başka çalışmada lipaz enziminin organo-bentonit ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve burada ise immobilize enzimin aktivasyon enerjisinin serbest enzimin aktivasyon enerjisinden daha düşük bulunduğu rapor edilmiştir [66].



Şekil 7.11. İmmobilize enzim için Arrhenius grafiği

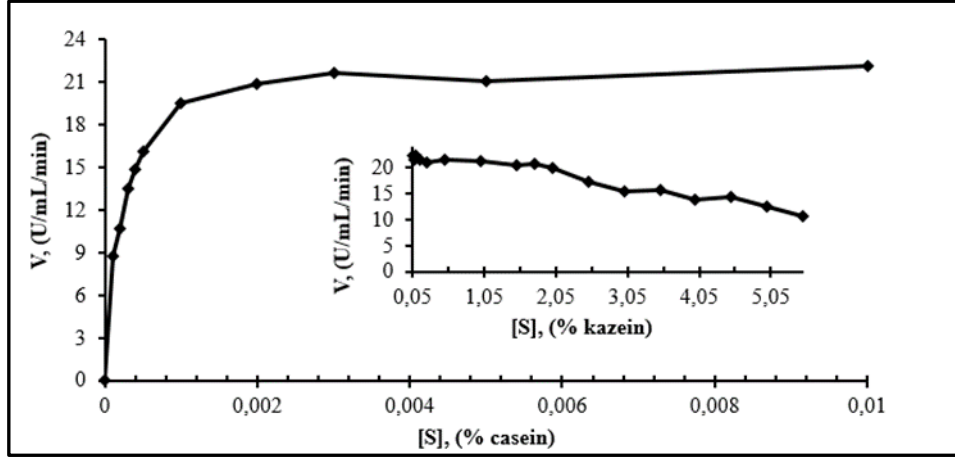
Çalışmamızda immobilize enzimin aktivasyon enerji değerinin serbest enzimin aktivasyon enerji değerine göre ~7 kat arttığını görmekteyiz. Bunun iki tür sebebi olabilir;

- Enzim katı bir matrise bağlandığı için esnekliği azalır. Enzimin esnekliğinin azalması kataliz yeteneğinin azalmasına da sebep olur. Bu durum aktivasyon enerjisinde artışa neden olabilir.
- Enzimin katı bir desteğe bağlanması sırasında meydana gelen bağlanma substratın, enzimin aktif bölgesine ulaşmasına engel çıkarabilir ve bu da aktivasyon enerjisinin artmasına sebep olabilir.

#### 7.4.4. Serbest ve immobilize enzimlerin $K_m$ ve $V_m$ değerlerinin belirlenmesi

Serbest ve immobilize enzimin  $K_m$  ve  $V_m$  değerlerini hesaplamak için Michaelis-Menten eşitliğinden yararlanılarak çizilen grafik Şekil 7.12'de gösterilmiştir.

Grafikten yararlanılarak enzimin  $K_m$  ve  $V_m$  değerlerini belirlemek üzere Lineweaver-Burk diyagramını çizmek için çalışılacak kazein konsantrasyon aralığı  $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$  mM olarak belirlenmiştir.

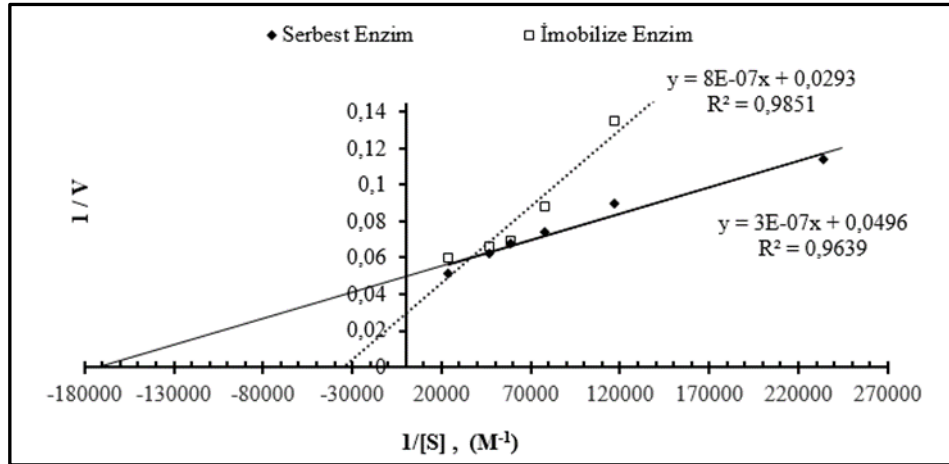


Şekil 7.12. V-[S] grafiği

Bu konsantrasyon aralığında serbest enzim ve immobilize enzim için çizilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 7.13'te gösterilmiştir.

Kazein substratı için serbest enzim ve immobilize enzimin Michael Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_m$ ) değerleri Denklem (5.5) ve (5.6)'dan yararlanılarak bulunmuş ve Tablo 6.2'de verilmiştir.

İmmobilize enzim moleküllerinin mikro-çevresi enzimin karakteristik davranışının belirlenmesinde önem taşımaktadır [92]. Bizim çalışmamızda da 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 4,51 ve 1,7 kat arttığı belirlenmiştir (Tablo 7.2).



Şekil 7.13. Serbest ve immobilize enzim için Lineweaver-Burk diyagramı

Kumari ve ark. tarafından; patlıcan yaprağından elde edilen alkalin proteaz enziminin, amorf mezo-gözenekli silika ve kristal mezo-gözenekli zeolit üzerine immobilizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Serbest alkalin proteaz enziminin  $K_m$  değeri 1,66 mg/mL, destek materyali olarak kullanılan silika ve zeolit ile immobilize edilen alkalin proteaz enziminin  $K_m$  değerleri sırasıyla 6,66 mg/mL ve 3,33 mg/mL olarak rapor edilmiştir.  $K_m$  değerindeki artışın enzimin dördüncül yapısında meydana gelen değişikliklerden olabileceği gibi, immobilizasyon işleminin; enzimin substratı olan kazeinin enzimin aktif bölgesine ulaşmasına engel olabileceği ve bu durumun da; immobilize olan enzimin serbest enzime göre  $K_m$  değerinde artışa sebep olduğu bildirilmiştir [89].

Li ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada *Bacillus subtilis*'dan elde edilen nötral proteaz enziminin kitosan (CS), karboksimetil kitosan (CMCS) ve N-süksinil kitosan (NSCS) hidrojel boncukları üzerine immobilizasyonu rapor edilmiştir. Üç farklı destek üzerine immobilize edilen enzimin  $K_m$  değerinin serbest nötral proteaz enziminin  $K_m$  değerinden daha yüksek olduğu ve bu durumun da immobilize enzimlerin substratına olan afinitesinin serbest enzime oranla azaldığı bildirilmiştir. Bunun birkaç sebebi olabilir: birincisi, immobilizasyon enzim molekülü üzerinde bir takım konformasyonel değişikliklere neden olabilmektedir. İkincisi, serbest enzimin bulunduğu mikro-çevre ile immobilize enzimin bulunduğu mikro-çevre farklıdır ki, bu durum enzimin kinetik özelliklerinin anlamlı derecede değişmesine sebep olur. Son olarak, substrat destek materyali ile etkileşimde bulunup, enzimin mikro-çevresindeki substrat konsantrasyonunun değişmesine sebep olabilir [92].

Li ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada, serbest nötral proteaz enziminin  $V_m$  değeri 0,36 mg mL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> olarak kaydedilirken, CS hidrojel boncukları ile yapılan immobilizasyonda  $V_m$  değeri 0,27 mg mL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, CMCS ve NSCS hidrojel boncukları ile yapılan immobilizasyonda  $V_m$  değerleri sırasıyla 0,72 mg mL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> ve 0,73 mg mL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> olarak bildirilmiştir. CS hidrojel boncuklar ile gerçekleştirilen immobilizasyonda enzimin  $V_m$  değeri azalırken CMCS ve NSCS hidrojel boncuklar ile gerçekleştirilen immobilizasyonlarda immobilize enzimlerin  $V_m$  değerleri serbest enzimin  $V_m$  değerlerinden yüksek olduğu rapor edilmiştir [92]. Bu sonuçlar temelde immobilizasyon metoduna bağlı olmakla birlikte enzim üzerinde meydana gelen



konformasyonel değişiklikler ile açıklanabilir. Genelde  $V_m$  azalışı ile birlikte  $K_m$  artışı gözlenirse de; immobilize nötral proteazlar söz konusu olduğunda bu tür bir genellenenin yapılamadığı rapor edilmiştir [92].

Roy ve ark. tarafından Eudragit L-100 üzerine yapılan ksilanaz immobilizasyonu çalışmasında serbest enzim için  $V_m$  değeri  $90,9 \mu\text{mol ml}^{-1} \text{min}^{-1}$ , immobilize enzim için  $V_m$  değeri  $111,1 \mu\text{mol ml}^{-1} \text{dak}^{-1}$  olarak rapor edilmiştir. Genellikle immobilizasyonda  $V_m$  artışı gözlenmemekle birlikte burada marjinal artış olmuştur.  $V_m$  değerindeki bu marjinal artış polar ürün olan ksilan fragmanlarının Eudragit L-100'ün hidrofobik doğasından dolayı mikro-çevreden itilmesinden kaynaklandığı rapor edilmiştir [93].

Ai ve ark. tarafından ksilanaz enziminin Eudragit S-100 üzerine immobilizasyonunda da immobilize ksilanazın  $V_m$  değerinin serbest ksilanazın  $V_m$  değerinden yüksek olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada  $V_m$  değerindeki marjinal artışın sebebi; destek materyalinin hidrofobik doğasından kaynaklandığı bildirilmiştir [94]. Bu çalışmada da literatürde rapor edilen çalışmalara benzer olarak immobilize enzimin  $K_m$  değerinin artması enzimin substratına olan afinitesinin artması ile ilişkilendirilebilir. Bu durumun immobilizasyondan kaynaklanan enzimin mikro-çevresindeki elektrostatik ve muhtemel konformasyonel değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

İmmobilizasyon sonucu  $V_m$  değerinin artması literatürde genel olarak rastlanan bir durum olmamakla birlikte bizim çalışmamız sonucunda da gözleendiği gibi enzimin bu parametresinin arttığını rapor eden bazı çalışmalara rastlanmıştır [92-94]. Çalışmamızda *Bacillus pumilus* Y7 alkalen proteaz enziminin organo-bentonit ile immobilizasyonu sonucu  $V_m$  değerinin artışı ile nötral proteazlarda olduğu gibi [92] alkalen proteazlarda da 'immobilizasyon sonucu enzimin  $V_m$  değeri azalır' genellemesinin yapılamayacağını göstermektedir.

Enzimin substratına doygun olduğu anlarda, bir molekül enzimin birim zamanda ürüne dönüştürülen substrat miktarını ifade eden  $k_{cat}$  değeri Denklem (6.8)'den yararlanılarak serbest enzim ve immobilize enzim için sırasıyla  $24,39 \text{ dk}^{-1}$  ve  $180,4 \text{ dk}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Enzimin katalitik performansını ifade eden  $k_{cat}/K_m$  değerleri serbest enzim ve immobilize enzim için sırasıyla  $4 \times 10^6 \text{ (dk}^{-1} \text{ M}^{-1})$  ve

$6,6 \times 10^6$  ( $\text{dk}^{-1} \text{M}^{-1}$ ) olarak hesaplanmıştır. Bu kinetik parametreler Tablo 7.2’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  $k_{\text{cat}}$  değeri serbest nötral proteaz enzimi için  $0,072$  ( $\text{dk}^{-1}$ ) olarak rapor edilmiştir. CS, CMCS ve NSCS hidrojel boncukları ile yapılan immobilizasyonda elde edilen  $k_{\text{cat}}$  değerleri sırasıyla  $0,054$  ( $\text{dk}^{-1}$ ),  $0,144$  ( $\text{dk}^{-1}$ ) ve  $0,146$  ( $\text{dk}^{-1}$ ) olarak belirlenmiştir. Farklı immobilizasyon destekleri için elde edilen sonuçlara göre en yüksek katalitik etkinliğe sahip destek materyali NSCS olarak bildirilmiştir [92].

Saleem ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Arachniotus citrinus*’tan izole edilen endoglukanazın CMC hidrolizi için poliakrilamid jel ile immobilizasyonu sonucunda serbest enzim için elde edilen  $k_{\text{cat}}$  değeri  $80 \text{ dk}^{-1}$  iken immobilize enzim için bulunan  $k_{\text{cat}}$  değeri  $240 \text{ dk}^{-1}$  olarak rapor edilmiştir. İmmobilizasyon sonucu gerçekleşen elektrostatik değişimler enzimin substratı olan CMC’ ye afinitesini arttırdığı için reaksiyon hızının da arttığı bildirilmiştir. Bunun şundan kaynaklandığı ifade edilmiştir: İmmobilizasyon sonucu oluşan elektrostatik değişimler sonucunda, substrat molekülü olan CMC’nin aktif bölgeye geçiş hali formundan daha güçlü bağlandığı için enzimin reaksiyon hızının arttığı bildirilmiştir. Bu durum enzim-substrat kompleksinin bağlanma enerjisinin enzim- geçiş hali enerjisinden daha büyük olduğu ile ilgilidir ki bu da  $k_{\text{cat}}$  ve  $K_m$ ’ in düşüşüyle sonlanır [95].

Mohapatra ve ark. tarafından *Arthrobacter* türlerinden izole edilen sülfid oksidazın dietilaminoetil (DEAE)-selüloz ile immobilizasyon çalışmasında serbest sülfid oksidaz enzimi için  $k_{\text{cat}}$  değeri  $3095,89 \text{ h}^{-1}$ , immobilize sülfid oksidaz enzimi için  $5975,65 \text{ h}^{-1}$  olarak rapor edilmiştir. Çalışmada serbest enzime oranla immobilize enzimin  $k_{\text{cat}}$  değerinin  $1,9$  kat arttığı görülmüş ve enzimin immobilize edilmesi ile substratına olan afinitesinin arttığı bildirilmiştir [96].

Tez çalışmamızda immobilize *Bacillus pumilus* Y7 alkalen proteaz enzimimizin organo-bentonit ile immobilizasyonu sonucu immobilize enzimin  $k_{\text{cat}}$  değerinin serbest enzime oranla  $7,4$  kat arttığı görülmüştür. Bunun nedeni immobilizasyon

sonucu oluşan elektrostatik değişikliklerin enzimin substratı ile olan etkileşimini arttırdığı ve bunun sonucu olarak da katalitik hızın arttığı düşünülmektedir.

Belirli bir substrata enzimin katalitik etkinliğinin en iyi açıklaması  $k_{cat}/K_m$  ile ifade edilir. Bu tanım, enzimin katalitik performansını belirler [92].

Li ve ark. gerçekleştirdiği çalışmada serbest nötral proteaz enziminin  $k_{cat}/K_m$  değerine oranla immobilize 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 [92].

Saleem ve ark. gerçekleştirdiği *Arachniotus citrinus*'tan elde edilen endoglukanaz enzimi poliakrilamid jeli ile immobilize edilmiş ve immobilize edilen enzimin  $k_{cat}/K_m$  değerinin serbest enzimin  $k_{cat}/K_m$  değerinden 1,47 kat yüksek olduğu bildirilmiş ve immobilize enzimin katalitik performansının serbest enzimin katalitik performansından daha yüksek olduğu rapor edilmiştir [95].

Mohapatra ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada serbest enzime oranla immobilize enzimde,  $k_{cat}/K_m$  değeri  $19,94 \mu\text{Mh}^{-1}$ 'den  $39,66 \mu\text{Mh}^{-1}$ 'e artış gösterdiği bildirilmiştir [96].

Literatürdeki bulgulara benzer olarak tez çalışmamızda immobilize *Bacillus pumilus* Y7 alkalen proteaz enzimimizin  $k_{cat}/K_m$  değerinin serbest *Bacillus pumilus* Y7 alkalen proteaz enzimimizin  $k_{cat}/K_m$  değerinden 1,65 kat daha yüksek çıktığı gözlenmiştir. Bu da enzimimizin immobilize edildikten sonra katalitik performansının arttığını göstermektedir.

Tablo 7.2. Serbest enzim ve immobilize enzimin kinetik parametreleri

	Serbest Enzim	İmmobilize Enzim
$K_m$ (M)	$6,05 \times 10^{-6}$	$27,3 \times 10^{-6}$
$V_m$ (U/mL/min)	20,16	34,13
$k_{cat}$ ( $\text{dk}^{-1}$ )	24,39	180,4
$k_{cat}/K_m$ ( $\text{dk}^{-1} \text{M}^{-1}$ )	$4 \times 10^6$	$6,6 \times 10^6$

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

Tablo 7.3 Serbest ve immobilize alkalen proteaz enziminin, 30 °C ve pH 8’de kazein hidrolizi için elde edilen termodinamik parametreleri

Parametre	Serbest Enzim	İmmobilize Enzim	Birim
	Sonuç	Sonuç	
$\Delta G^{\#}_{E-T}$	-38,31	-56,22	kJ/mol
$\Delta G^{\#}_{ES}$	-30,27	-26,45	kJ/mol
$\Delta H^{\#}$	13,3	99,52	kJ/mol
$\Delta G^{\#}$	66,21	61,15	kJ/mol
$\Delta S^{\#}$	-0,17	0,12	kJ/molK

*Bacillus pumilus* Y7 izolatından elde edilen alkalen proteaz enziminin serbest ve immobilize formlarının, kazein ile hidrolizi için bulunan termodinamik parametreleri ( $\Delta G^{\#}$ ,  $\Delta H^{\#}$ ,  $\Delta S^{\#}$ ,  $\Delta G^{\#}_{ES}$ ,  $\Delta G^{\#}_{ET}$ ), Eşitlik (6.10-6.14)’ten yararlanılarak hesaplanmış ve Tablo 7.3’de gösterilmiştir.

Saleem ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Arachniotus citrinus*'tan izole edilen endoglukanazın CMC hidrolizi için poliakrilamid jel ile immobilizasyonu üzerine 50 °C, 70 °C ve 90 °C’lerde kinetik ve termodinamik özellikler incelenmiştir. Çalışmada endoglukanazın serbest formu için 50 °C, 70 °C ve 90 °C’de geçiş bağlanma serbest enerjisi ( $\Delta G^{\#}_{E-T}$ ) (kJ/mol) değerleri sırasıyla -24,1 , -25,3 ve -23,5 iken immobilize form için sırasıyla -24,0 , -26,0 ve -27,1 olarak rapor edilmiştir. 50 °C’de endoglukanaz enziminin immobilize formu için  $\Delta G^{\#}_{E-T}$  değeri ihmal edilecek düzeyde artış gösterirken 70 °C ve 90 °C’de  $\Delta G^{\#}_{E-T}$  değerinin immobilize formlarında azalma olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada substrat bağlanma enerjisi ( $\Delta G^{\#}_{ES}$ ) değerine de bakılmıştır. Serbest enzim için  $\Delta G^{\#}_{ES}$  (kJ/mol) değeri 50 °C, 70 °C ve 90 °C’de sırasıyla 2,9, 1,98 ve 2,1 iken immobilize enzim için sırasıyla 2,86, 1,83 ve 1,77 olarak rapor edilmiştir. 50 °C ve 70 °C’lerde yapılan çalışmalarda substrat bağlanma enerji değerleri ihmal edilecek miktarda değişim göstermiştir, öte yandan 90 °C’de immobilize enzimde serbest enzime göre azalma olduğu bildirilmiştir. CMC hidrolizinin termodinamik analizi sonucuna göre; immobilize enzimin tranzisyon hali oluşumu için ( $\Delta G^{\#}_{E-T}$ ) serbest enzime göre daha az enerjiye ihtiyacı olduğu bildirilmiştir. İmmobilize enzimin yüksek katalitik etkisinin

tranzisyon hali stabilizasyonundan, serbest enzimin daha düşük katalitik etkisinin sebebinin ise tranzisyon hali destabilizasyonundan kaynaklandığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada serbest enzimin  $\Delta G^{\#}_{ES}$  değerinin immobilize enzimin  $\Delta G^{\#}_{ES}$  değerinden daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Bu durumda serbest enzimin aktif bölge mimarisinin CMC bağlamak üzere daha elverişli olduğu ve bu sebepten dolayı enzim-substrat destabilizasyon enerjisinin ( $\Delta G^{\#}_{ES}$ ) immobilize enzimin enzim-substrat destabilizasyon enerjisinden daha yüksek olduğu ifade edilmiştir. Bu durum substrat molekülünün temel haldeki konformasyonunun serbest enzim ile immobilize enzime oranla daha sıkı bağlanma gerçekleştirdiği rapor edilmiştir [95].

Duman ve ark. tarafından gerçekleştirilen *Bacillus clausi* serin alkalen proteazının su ile karışabilen organik çözücüler varlığında katalitik performansının incelendiği çalışmada; substrat bağlama enerjisinin, substrat molekülü ile enzimin aktif bölgesi birebir örtüştüğünde maksimum olacağı bildirilmiştir. Fakat enzimin aktif bölgesinin tamamlayıcısı substrat molekülünün geçiş hali formu ( $S^{\#}$ ) olduğu durumda biyokimyasal reaksiyonunun kendiliğinden gerçekleşme durumu daha olası olduğu ifade edilmiştir. Bu durumda substrat molekülünün konformasyonel değişikliğinden dolayı substrat bağlama serbest enerjisi yükselirken aktivasyon serbest enerjisinin düşeceği bildirilmiştir [97].

Tez çalışmamızda immobilize enzimin substrat bağlama serbest enerjisi; serbest *Bacillus pumilus* Y7 alkalen proteaz 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. Ancak çalışmamızda Duman ve ark. [97] ifade ettiği gibi  $\Delta G^{\#}_{ES}$ 'nin arttığı durumlarda gözlenen aktivasyon enerjisi düşüşü gözlenmemiştir. Bunun sebebinin, çalıştığımız enzimimizin immobilizasyon ile katı bir desteğe bağlanması sonucu hareketliliğini kısmen kaybetmesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çalışmamızda gözlemlediğimiz immobilize enzimin  $\Delta G^{\#}_{E-T}$  değerinin serbest enzimin  $\Delta G^{\#}_{E-T}$  değerinden daha düşük olması; immobilize enzimin tranzisyon hali stabilizasyonundan kaynaklandığı ve bu durumun da enzimin kataliz yeteneğini arttırdığı düşündürmektedir.

George ve Sugunan tarafından yapılan çalışmada *Aspergillus niger* glukoamilazın nişasta hidrolizi için farklı mezopora sahip silika üzerine kovalent immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmada serbest enzimin aktivasyon entalpisi, ( $\Delta H^\ddagger$ ), Gibbs serbest enerjisi, ( $\Delta G^\ddagger$ ), aktivasyon entropisi, ( $\Delta S^\ddagger$ ) sırasıyla 17,95 kJ/mol, -2,94 kJ/mol ve 0,0700 kJ/mol olarak kaydedilmiştir. Aynı parametreler immobilizasyon sonrasında sırasıyla 44,81 kJ/mol, -4,97 kJ/mol ve 0,1671 kJ/mol olarak rapor edilmiştir [91]. Daha düşük entalpi değeri tranzisyon halinde enzim-substrat kompleksinin daha yüksek verim ile oluştuğunun göstergesidir. Benzer şekilde düşük  $\Delta G^\ddagger$  değeri tranzisyon halinde oluşan kompleksinin ürüne dönüşüm kolaylığının ifadesidir. Entalpi değerinin pozitif olması reaksiyonun kendiliğinden gerçekleşmesinin ifadesi olmamakla birlikte, endotermik olduğunun göstergesidir.  $\Delta S^\ddagger$  ise hidroliz reaksiyonunun spontanlığı hakkında bilgi verir [98]. Yüksek  $\Delta S^\ddagger$  değerlerinin kataliz reaksiyonları üzerindeki etkisi negatif yöndedir [99].

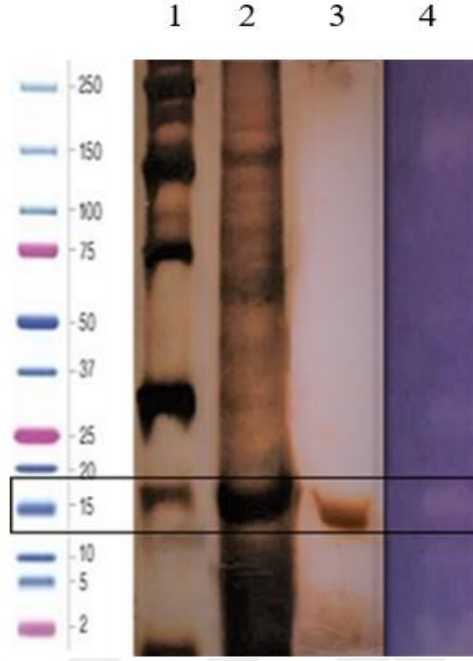
Tez çalışmamızda George ve Sugunan'ın [91] sonuçlarına benzer şekilde Tablo 7.3'te gösterildiği gibi immobilize enzimin  $\Delta H^\ddagger$  ve  $\Delta S^\ddagger$  parametreleri artarken  $\Delta G^\ddagger$  değerinde azalma gözlenmiştir. Sonuçlarımıza göre,  $\Delta H^\ddagger$  parametresinin immobilizasyon ile artması sonucu enzim-substrat kompleksi oluşum verimini düşürmesine rağmen Gibbs serbest enerjisinin düşmesiyle, ( $\Delta G^\ddagger$ ) immobilizasyon ile enzim-substrat kompleksinin ürüne dönüşümünün daha kolay olduğunu düşünmekteyiz. Sonuçlarımıza göre  $\Delta S^\ddagger$  değerinin artması immobilizasyonun, *Bacillus pumilus* Y7 alkalin proteaz enziminin immobilizasyondan kaynaklanan konformasyonel değişikliklerden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

#### **7.4.6. Alkalin proteaz enziminin elektroforez çalışması**

Alkalin proteazların molekül ağırlıkları 15-30 kDa arasında değişmektedir. Ayrıca 31,6, 33, 36 ve 45 kDa molekül ağırlığına sahip alkalin proteazların varlığı da literatürde rapor edilmiştir [11-13].

Şekil 7.14'te alkalin proteaz enziminin elektroforez işlemi sonucundaki görüntüsü verilmiştir. Burada SDS-PAGE analiziyle ham enzim ve saflaştırılan enzimin 15 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu görülmüştür. Bu sonuç, Native-PAGE ve zimogram analizleriyle de desteklenmiştir.

Elektroforez işlemleri için 14 µl enzim kullanılmıştır.



Şekil 7.14. Alkalen proteaz enziminin elektroforetik analizi, (1:marker, 2:ham enzim, 3:saflaştırılmış enzim, 4 :zimogram)

Literatürde Haddar ve arkadaşlarının, *Bacillus mojavensis*'ten saflaştırdıkları alkalen serin proteaz (BM1 ve BM2) enzimlerinin SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarının sırasıyla yaklaşık 29 kDa ve 15,5 kDa [100], Kazan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; *Bacillus clausii* GMBAE 42'den saflaştırılan serin alkalen proteaz enziminin SDS-PAGE analizi sonucu molekül ağırlığı 26,50 kDa [101], Suppiah ve arkadaşlarının *Lysinibacillus fusiformis*'den izole ettikleri alkalen proteaz enziminin SDS-PAGE analizi sonucu molekül ağırlığı 29,0 kDa [102], Kumar tarafından yapılan çalışmada ise *Bacillus pumilus*'tan elde edilen termostabil alkalen proteaz enziminin SDS-PAGE analizi sonucu molekül ağırlığı yaklaşık olarak 28,0 kDa olarak rapor edilmiştir [14].

## 8.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *Bacillus pumilus* Y7 alkalen proteaz enziminin bentonit ile immobilizasyonu incelendi ve immobilizasyon sonucunda aktivasyon enerjisinin artmasının yanı sıra; katalitik performansında arttığı görüldü. Dolayısıyla kullanılan destek materyalinin elde etmiş olduğumuz sonuçlara göre endüstriyel olarak tercih edilebileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda *Bacillus pumilus* Y7 alkalen proteaz enziminin molekül ağırlığı 15 kDa olarak bulundu.

Serbest enzim için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 10 ve 35 °C, immobilize enzim için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 6 ve 32 °C olarak bulundu.

Arrhenius aktivasyon enerjileri ( $E_a$ ) serbest enzim ve immobilize enzim için sırasıyla 15,28 kJ/mol ve 102,4 kJ/mol olarak hesaplandı.

30 °C'de pH 8'de her iki enzim için Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hızı ( $V_m$ ) serbest enzim için sırasıyla  $6,05 \times 10^{-6}$  M ve 20,16 U/mL/min, immobilize enzim için sırasıyla  $27,3 \times 10^{-6}$  M ve 34,13 U/mL/min olarak bulundu. Enzimlerin turnover sayısı ( $k_{cat}$ ) ve katalitik performansı ( $k_{cat}/K_m$ ) serbest enzim için sırasıyla  $24,39 \text{ dk}^{-1}$  ve  $4 \times 10^6 \text{ dk}^{-1}\text{M}^{-1}$ , immobilize enzim için sırasıyla  $180,4 \text{ dk}^{-1}$  ve  $6,6 \times 10^6 \text{ dk}^{-1}\text{M}^{-1}$  olarak bulundu.

*Bacillus pumilus* Y7 alkalen proteazının termodinamik parametreleri de incelendi. Serbest enzimin termodinamik parametreleri;  $\Delta G^\ddagger$ : 66,21 kJ/mol;  $\Delta G^\ddagger_{E-T}$ : -38,31 kJ/mol;  $\Delta G^\ddagger_{ES}$ : -30,27 kJ/mol;  $\Delta H^\ddagger$ : 13,3 kJ/mol;  $\Delta S^\ddagger$ : -0,17 kJ/molK ve immobilize enzimin termodinamik parametreleri  $\Delta G^\ddagger$ : 61,15 kJ/mol;  $\Delta G^\ddagger_{E-T}$ : -56,22 kJ/mol;  $\Delta G^\ddagger_{ES}$ : -26,45 kJ/mol;  $\Delta H^\ddagger$ : 99,52 kJ/mol;  $\Delta S^\ddagger$ : 0,12 kJ/molK olarak bulundu.

Enzim immobilizasyon çalışmalarında en önemli parametrelerden birisi de enzimin tekrar kullanılabilirliğidir. Bu çalışmada 18 deneme boyunca enzimin aktivitesini



%100 koruduğu, 19. denemeden itibaren ise kalan aktivite % 77,3 olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda 5 g organo-bentonitin 5 mL enzim ile 2 saatlik immobilizasyonu sonucunda elde edilen verim % 90,0'dır.

Bentonit, 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 tercih edilebilir.



## KAYNAKLAR

- [1] Robinson P.K., *Enzymes: Principles and Biotechnological Applications*, *Biochem.*, DOI: 10.1042/BSE0590001.
- [2] Nelson D.L., Cox M.M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth Edition, Worth Publishers, New York , 2004.
- [3] Yazar H., *Enzimlerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması*, SAÜ, <http://www.content.lms.sabis.sakarya.edu.tr/Uploads/75501/33918/enz.pdf>, (Ziyaret Tarihi: 10 Kasım 2017).
- [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] <http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/sources.html>, (Ziyaret Tarihi: 15 Kasım 2017).
- [6] John F.K., *Enzyme Technology*, Seventh Edition, VCH Publisher, New York, 1987.
- [7] <http://www.foodenzymeinstitute.com/articles/what-do-plant-enzymes-doasp.,list=bydat>, (Ziyaret Tarihi: 20 Kasım 2017).
- [8] Gerhartz W., *Enzymes in Industry*, Second Edition, VCH Publishers, Weinheim, Germany, 1990.
- [9] Ibrahim A.S.S., El-Shayeb N.M.A., Mabrouk S.S., Isolation and Identification of Alkaline Protease Producing Alkaliphilic Bacteria from an Egyptian Soda Lake, *Journal of Applied Sciences Research*, 2007, **3**(11),1363-1368.
- [10] Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P., Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, **59**,15–32.
- [11] Anwar A., Saleemuddin M., Alkaline Proteases: A Review, *Bioresource Technology*, 1998, **64**, 175-183.
- [12] Duman Y. A., *Bacillus Clausii* Alkalen Proteazının Su ile Karışabilen Organik Çözücüler Varlığında Kinetik ve Termodinamik Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2008, 233247.
- [13] Walsh G., *Proteins Biochemistry and Biotechnology*, Second Edition, Wiley Publisher, England, 2002.

- [14] Kumar C.G., Purification and Characterization of a Thermostable Alkaline Protease from Alkalophilic *Bacillus Pumilus*, *Applied Microbiology*, 2002, **34**, 13-17.
- [15] Colleary S., The Use of Chemically Stabilised Proteolytic Enzymes in Peptide Synthesis, Master's Thesis, Dublin City University, Science and Health Institute, İrlanda, 2003.
- [16] Bugg T., *An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*, Second Edition, Blackwell Publishing, Oxford, U.K, 1996.
- [17] Singh R., Mittal A., Kumar M., Mehta P.K., Microbial Proteases in Commercial Applications: Review, *Journal of Pharmaceutical*, 2016, **4**(3), 365-374.
- [18] Jisha V.N., Smitha R.B., Pradeep S., Sreedevi S., Unni K.N., Sajith S., Priji P., Josh M.S., Benjamin S., Versatility of Microbial Proteases, *Enzyme Research*, 2013, **1**(3), 39-51.
- [19] Kumar C.G., Takagi H., Microbial Alkaline Proteases: From a Bioindustrial Viewpoint, *Biotechnology Advances*, 1999, **17**, 561-594.
- [20] Ediz N., Beyatlı Y., *Bacillus* Cinsi Bakteriler Tarafından Biyoplastik Üretim, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2005, **03**(05),1-22.
- [21] Eş İ., Vieira J.D.G., Amaral A.C., Principles, Techniques and Applications of Biocatalyst Immobilization for Industrial Application: Mini-Review, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, **99**,2065–2082,
- [22] 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.
- [23] Worsfold P.J., Classification and Chemical Characteristics of Immobilized Enzymes, *Pure & Appl. Chem.*, 1995, **67**(4), 597-600.
- [24] Aguilera J.M., Barbosa-Canovas G.V., Simpson R., Welti-Chanes J., Bermudez-Aguirre D., Food Engineering Interfaces, *Springer*, 2011, **2**, 694.
- [25] Guisan J.M., *Methods in Bioteknology: Immobilization of Enzymes and Cells*, Second Edition, Humana Press, New Jersey, 2006.
- [26] Tampion J., Tampion M.D., Immobilized Cells:Principles and Applications, *Chemical Technology and Biotechnology*, 1987, **45**(1), 77.
- [27] Nedovic V., Willaert R., Fundamentals of Cell Immobilization Biotechnology, *Springer*, 2004, **1**(22), 414–419.

- [28] Vitola G., Büning D., Schumacher J., Mazzei R., Giorno L., Ulbricht M., Development of a Novel Immobilization Method by Using Microgels to Keep Enzyme in Hydrated Microenvironment in Porous Hydrophobic Membranes, *Macromolecular Journals*, DOI: 10.1002/mabi.20160038.
- [29] Taşdelen Ç., Proteaz Enziminin Fiziksel Adsorpsiyon, Kovalent ve İyonik Bağlanma Metodları ile İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Haziran, 2006, 222010.
- [30] Datta S., Christena L.R., Rajaram Y.R.S., Enzyme Immobilization: An Overview on Techniques and Support Materials, *Biotech.*, 2013, **3**, 1-9.
- [31] Bickerstaff G.F., Immobilization of Enzymes and Cells, Second Edition, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1997.
- [32] [http://adudspace.adu.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11607/329/muratuygun\\_tez.pdf](http://adudspace.adu.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11607/329/muratuygun_tez.pdf), (Ziyaret Tarihi: 30 Kasım 2017)
- [33] 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.
- [34] Mahat N.A., Onoja E., Relevant Techniques and Mechanisms for Enzyme Immobilization, *Reserch Gate*, 2016, **2**, 32-52.
- [35] Hürrem F., Katalazın Çapraz Bağlı Enzim Agregatlarını (CLEA) Oluşturma Yöntemiyle İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2010, 266200.
- [36] Wang S., Zheng D., Yin L., Wang F., Preparation, Activity and Structure of Cross-linked Enzyme Aggregates (CLEAs) with Nanoparticle, *Enzyme and Microbial Technology*, 2017, **107**, 22-31.
- [37] Voberkova S., Solcany V., Vrsanska M., Adam V., Immobilization of Ligninolytic Enzymes from White-rot Fungi in Crosslinked Aggregates, *Chemosphere*, 2018, **202**, 694-707.
- [38] Loughnan F.C., Chemical Weathering of The Silicate Minerals., *Apply Clay*, 1969, **4**, 154.
- [39] İdiz N., Montmorillonit Kilinin Değişik Metaller ile Desteklenmesi ve Oluşan Katalizörün Kullanım Alanlarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 2008, 177381.
- [40] Grim R.E., Applied Clay Mineralogy, *Science*, 1962, **136**, 422.
- [41] Kingery W.D., Bowen H.K., Uhlmann D.R., Editors: John Wiley and Sons, *Introduction to Ceramics*, Second Edition, Wiley-Interscience, New York, 1032-1035, 1976.

- [42] Tahberer S., Adana Arkeoloji Müzesi'ndeki Helenistik ve Roma Dönemleri Terracotta Figürinlerin Yapım Tekniklerinin Araştırılması ve Uygulanması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Adana, 2006, 205504.
- [43] Norton P., Clay Mineralogy and Solutions to Clay Problems in Norway, *Journal of Petroleum Technology*, 1974, **26**(1), 25-32.
- [44] Adams J.M., Evans S., Determination of the Cation-Exchange Capacity (Layer Charge) of Small Quantities of Clay Minerals by Nephelometry, *Clays and Clay Minerals*, 1979, **27**(2), 137-139.
- [45] Norrish K., The Swelling of Montmorillonite, *Discussions of the Faraday Society*, 1954, **18**, 120.
- [46] Berger G., The Structure of Montmorillonite. Preliminary Communication on The Ability of Clays and Clay Minerals to be Methyated, *Chem.*, 1941, **38**, 42-43.
- [47] Choy J., Choi S., Oh J., Park T., Clay Minerals and Layered Double Hydroxides for Novel Biological Applications, *Applied Clay*, 2007, **36**, 122-132.
- [48] Safaeikatouli M., Jafariahngari Y., Baharlouei A., Effects of Dietary Inclusion of Sodium Bentonite on Biochemical Characteristics of Blood Serum in Broiler Chickens, *International Journal of Agriculture & Biology*, 2010, **12**, 877-880.
- [49] Öztürk N., Tabak A., Akgöl S., Denizli A., Reversible Immobilization of Catalase by Using a Novel Bentonite-Cysteine (Bent-Cys) Microcomposite Affinity Sorbents, *Science Direct*, 2008, **322**, 148-154.
- [50] Murray H.H., Overview-Clay Mineral Applications, *Applied Clay Science*, 1991, **5**, 379- 395.
- [51] Sedaghat M.E., Ghiaci M., Aghaei H., Soleimani-Zad S., Immobilization of  $\alpha$ -Amylase on Na-Bentonite and Modified Bentonite, *Applied Clay Science*, 2009, **46**, 125-130.
- [52] Baysal Z., Bulut Y., Yavuz M., Aytakin Ç., Immobilization of  $\alpha$ -Amylase Via Adsorption Onto Bentonite/Chitosan Composite: Determination of Equilibrium, Kinetics and Thermodynamic Parameters, *Starch/Starke Journal*, 2014, **66**, 484-490.
- [53] Andjelkovic U., Nikolic A.M., Jovic N.J., Bankovic P., Bajt T., Mojovic Z., Vujcic Z., Jovanovic D., Efficient Stabilization of *Saccharomyces Cerevisiae* External Invertase by Immobilisation on Modified Beidellite Nanoclays, *Food Chemistry*, 2015, **168**, 262-269.

- [54] Yadav J.S., Reddy BV.S., Sunitha V., Reddy K.S., Ramakrishna K.V.S., Montmorillonite KSF-Catalyzed One-pot Synthesis of Hexahydro-1H-pyrrolo[3,2-c]quinoline Derivatives, *Tetrahedron Letters*, 2004, **45**, 7947-7950.
- [55] Grim R.E., The History of the Development of Clay Mineralogy, *Clays and Clay Minerals*, 1988, **36**, 97-101.
- [56] Alemdar A., Bentonit ve Montmorillonit Dispersiyonlarının Reolojik, Viskoelastik, Koloidal Özellikleri Üzerine Organik ve İnorganik Katkıların Etkisi, Doktora Tezi, İ.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2001, 104267.
- [57] Clarke G., Industrial Clays: A Special Review, *Industrial Minerals*, 1989, **4**, 73-74.
- [58] Grim R.E., Güven N., Bentonites-Geology, Mineralogy, Properties and Uses, *Elsevier*, 1978, **24**, 256.
- [59] Hancıoğlu Ç., Kaolin ve Bentonit Türü Killerde Bulunan Silikatların Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2015, 416757.
- [60] Yüce E., Bentonit Envanteri, Yurt Madenciliğini Geliştirme Vakfı, İstanbul Maden İhracatçıları Birliği, İstanbul, 1999.
- [61] Yaylalı G., Değirmenci S., Şirin, B., Akarlar N., Türkiye’de Döküm Bentonitlerinin 2000’lerde İyileştirilmesi, *T.M.M.O.B. Metalurji Mühendisleri Odası Dergisi*, 2001, **126**, 12-19.
- [62] Toprakezer F., Nanokompozit Sentezinde Kullanılacak Na-Bentonit Kilinin Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2009, 244256.
- [63] Cao J., Li Y., Tua N., Lva Y., Chenb Q., Donga H., Novel Enzyme/Exfoliated Bentonite Nanohybrids as Highly Efficient and Recyclable Biocatalysts in Hydrolytic Reaction, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, **132**, 41–46.
- [64] Albayrak F., Killerde Ağır Metal Adsorpsiyonlarının İncelenmesi ve Çözültiden Adsorpsiyon Yöntemiyle Yüzey Alanı Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 1990, 13335.
- [65] Karakuş E., Özler A., Pekyardımcı Ş., Noncovalent Immobilization of Pectinesterase (*Prunus Armeniaca L.*) Onto Bentonite, *Biotechnology*, 2008, **36**, 535-550.
- [66] 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.

- [67] Bulun G., 3d-Geçiş Metali Ni Katkılı  $Zn_{1-x}Ni_xO$  ve 4f-Lantanit Gd Katkılı  $Zn_{1-x}Gd_xO$  Bileşiklerinin Yapısal ve Manyetik Özellikleri, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen ilimleri Enstitüsü, Adana, 2010, 256531.
- [68] Nayak P.S., Singh B.K., Instrumental Characterization of Clay by XRF, XRD and FTIR, *Bull. Mater. Sci.*, 2007, **30**(3), 235–238.
- [69] <http://www.claysandminerals.com/methods/xrd> , (Ziyaret Tarihi: 5 Aralık 2017).
- [70] Laemmli U. K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 1970, **227**, 680-685.
- [71] <http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/sunu/elektroforez.pdf>, (Ziyaret Tarihi: 27 Kasım 2017).
- [72] 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.
- [73] Takami H., Akiba T., Horikoshi K., Production of Extremely Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus* sp. No.AH-101, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1989, **30**, 120-124.
- [74] A. Alam, A Model for Formulation of Protein Assay, *Analytical Biochemistry*, 1991, **203**, 121-126.
- [75] Bradford M. M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye-Binding, *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248-254.
- [76] Segel J. H., *Enzyme Kinetics*, First Edition, Willey Classics Library, New York, 1975.
- [77] 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.
- [78] [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:8 Aralık 2017).
- [79] Rezakhani N., Rad A.M., Parivar K. , Khayati M., Etemadzade S., Immobilization of Protease in Biopolymers (Mixture of Alginate-Chitosan), *Journal of Paramedical Sciences*, 2014, **5**(4), 4978-2008.
- [80] Homaei A., Enzyme Immobilization and its Application in The Food Industry, *Research Gate*, 2015, **9**, 145-164.

- [81] Ghiaci M., Kalbasi R.J., Khani H., Abbaspur A., Shariatmadari H., Free-Energy of Adsorption of a Cationic of Adsorption Layer by X-Ray Spectroscopy, *J. Chem. Thermodynamics*, 2004, **36**, 707-713.
- [82] Ghiaci M., Aghaei H., Soleimanian S., Sedaghat M.E., Enzyme Immobilization Part-1 Modified Bentonite as A New and Efficient Support for Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase, *Applied Clay Science*, 2009, **43**, 289–295.
- [83] Ghiaci M., Aghaei H., Soleimanian S., Sedaghat M.E., Enzyme Immobilization Part-2 Immobilization of Alkaline Phosphatase on Na-Bentonite and Modified Bentonite, *Applied Clay Science*, 2009, **43**, 300–316.
- [84] Ghiaci M., Aghaei H., Soleimanian S., Sedaghat M.E., Enzyme Immobilization Part-4 . Immobilization of Alkaline Phosphatase on Na-Sepiolite and Modified Sepiolite, *Applied Clay Science*, 2009, **46**, 131–135.
- [85] Ghiaci M., Aghaei H., Soleimanian S., Sedaghat M.E., Enzyme Immobilization: Part 2 Immobilization of Alkaline Phosphatase on Na-Bentonite and Modified Bentonite, *Applied Clay Science*, 2009, **43**, 308–316.
- [86] Dong H., Li Y., Sheng G., Hu L., The Study on Effective Immobilization of Lipase on Functionalized Bentonites and Their Properties, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2013, **95**, 9–15.
- [87] Kumar A.G., Swarnalatha S., Kamatchi P., Sekaran G., Immobilization of High Catalytic Acid Protease on Functionalized Mesoporous Activated Carbon Particles, *Biochemical Engineering Journal*, 2009, **43**, 185–190.
- [88] Alkan S., Ceylan H., Arslan O., Bentonite-Supported Catalase, *J. Serb. Chem. Soc.*, 2005, **70**(5), 721–726.
- [89] Kumari A., Kaur B., Srivastava R., Sangwan R.S., Isolation and Immobilization of Alkaline Protease on Mesoporous Silica and Mesoporous ZSM-5 Zeolite Materials for Improved Catalytic Properties, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2015, **2**, 108–114.
- [90] <https://www.britannica.com/science/activation-energy>, (Ziyaret Tarihi: 20 Aralık 2017).
- [91] George R., Sugunan S., Kinetic and Thermodynamic Parameters of Immobilized Glucoamylase on Different Mesoporous Silica for Starch Hydrolysis: A Comparative Study, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2014, **106**, 81–89.
- [92] 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.



- [93] Roy I., Gupta A., Khare S.K., Bisaria V.S., Gupta M.N., Immobilization of Xylan-Degrading Enzymes from *Melanocarpus Albomyces* IIS 68 on the Smart Polymer Eudragit L-100, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **61**, 309–313.
- [94] Ai Z., Jiang Z., Li L., Deng W., Kusakabe I., Li H., Immobilization of *Streptomyces Olivaceoviridis* E-86 Xylanase on Eudragit S-100 for Xylo-Oligosaccharide Production, *Process Biochemistry*, 2005, **40**, 2707–2714.
- [95] Saleem M., Rashid M.H., Jabbar A., Perveen R., Khalid A.M., Rajoka M.I., Kinetic and Thermodynamic Properties of An Immobilized Endoglucanase from *Arachniotus Citrinus*, *Process Biochemistry*, 2005, **40**, 849–855.
- [96] Mohapatra B.R., Gould W.D., Dinardo O., Papavinasam S., Koren D.W., Revie R.W., Effect of Immobilization on Kinetic and Thermodynamic Characteristics of Sulfide Oxidase from *Arthrobacter* Species, *Biochemistry & Biotechnology*, 2008, **38**, 61–73.
- [97] Duman Y.A., Kazan D., Denizci A.A., Erarslan A., Water Miscible Mono Alcohols' Effect on the Proteolytic Performance of *Bacillus Clausii* Serine Alkaline Protease, *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, **172**, 469–486.
- [98] Öztürk D.C., Kazan K., Erarslan A., Stabilization and Functional Properties of *Escherichia Coli* Penicillin-G Acylase by Covalent Conjugation of Anionic Polysaccharide Carboxymethylcellulose, *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2002, **18**, 881–888.
- [99] Pal A., Lobo M., Khanum F., Extraction, Purification and Thermodynamic Characterization of Almond (*Amygdalus communis*)  $\beta$ -galactosidase for the Preparation of Delactosed Milk, *Food Technol. Biotechnol.*, 2013, **51**, 53-61.
- [100] Haddar A., Agrebi R., Bougatef A., Hmidet N., Sellami-Kamoun A., Nasri M., Two Detergent Stable Alkaline Serine-Proteases from *Bacillus Mojavensis* A21: Purification, Characterization and Potential Application as a Laundry Detergent Additive, *Bioresource Technology*, 2009, **100**, 3366–3373.
- [101] Kazan D., Denizci A.A., Kerimak Öner M.N., Erarslan A., Purification and Characterization of A Serine Alkaline Protease from *Bacillus Clausii* GMBAE 42, *Microbiol Biotechnol*, 2005, **32**, 335–344.
- [102] Suppiah S., Sendeshkannan K., Prabakaran P., Rajkumar G., Yasothkumar N., Purification and Characterization of Alkaline Protease from *Lysinibacillus Fusiformis*, *Biochem. Tech.*, 2012, **4**(1), 561-564.

## KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

- [1] Duman Y., **Cengiz N.**, ‘Alkalen Proteaz Enziminin Bentonit ile İmmobilizasyonu’, 29. Ulusal Kimya Kongresi, ODTÜ, Ankara, 10-14 Eylül, 2017.



## ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Kocaeli’nde doğdu. Tavşantepe İlköğretim Okulu’nda birinci sınıfi tamamladıktan sonra ilk ve orta öğrenimine Gündoğdu İlköğretim Okulu’nda devam etti. 2006 yılında İzmit Mimar Sinan Lisesi’nde lise öğrenimine başladı ve 2010 yılında başladığı Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 2014 yılında mezun oldu. 2015 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında lisansüstü eğitime başladı. Lisansüstü eğitime devam etmektedir.

