



**EBİŞKE (*Clitocybe geotropa*) MANTARINDAN
SAFLAŞTIRILIP KARAKTERİZE EDİLEN
ENDO-BETA 1,4-MANNANAZ ENZİMİNİN,
MAGNETİK KİTOSAN NANOPARTİKÜLLER
ÜZERİNE İMMOBİLİZE EDİLMESİ VE MEYVE
SULARININ DURULTMA İŞLEMİNDE KULLANILMASI**

Zeynep SÖNMEZ

Yüksek Lisans Tezi

Nanobilim ve Nano Mühendislik Anabilim Dalı

Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı

Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

2016

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**EBİŞKE (*Clitocybe geotropa*) MANTARINDAN SAFLAŞTIRILIP
KARAKTERİZE EDİLEN ENDO-BETA 1,4-MANNANAZ
ENZİMİNİN, MAGNETİK KİTOSAN NANOPARTİKÜLLER
ÜZERİNE İMMOBİLİZE EDİLMESİ VE MEYVE SULARININ
DURULTMA İŞLEMİNDE KULLANILMASI**

Zeynep SÖNMEZ

NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2016

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

**EBİŞKE (*Clitocybe geotropa*) MANTARINDAN SAFLAŞTIRILIP KARAKTERİZE EDİLEN
ENDO-BETA 1,4-MANNANAZ ENZİMİNİN, MAGNETİK KİTOSANNANOPARTİKÜLLER
ÜZERİNE İMMOBİLİZE EDİLMESİ ve MEYVE SULARININ
DURULTMA İŞLEMİNDE KULLANILMASI**

Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU danışmanlığında, Zeynep SÖNMEZ tarafından hazırlanan bu çalışma, 15/01/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Nanobilim ve Nano Mühendislik Anabilim Dalı-Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

İmza :

Üye : Doç.Dr. Azize ALAYLI GÜNGÖR

İmza :

Üye : Prof.Dr. Nazan DEMİR

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **28.01/2016** tarih ve ...**5**.../...**25**..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

EBİŞKE (*Clitocybe geotropa*) MANTARINDAN SAFLAŞTIRILIP KARAKTERİZE EDİLEN ENDO-BETA-1,4-MANNANAZ ENZİMİNİN, MAGNETİK KİTOSAN NANOPARTİKÜLLER ÜZERİNE İMMOBİLİZE EDİLMESİ VE MEYVE SULARININ DURULTMA İŞLEMİNDE KULLANILMASI

Zeynep SÖNMEZ

Atatürk Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Nanobilim ve Nano Mühendislik Anabilim Dalı

Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

Mannanaz (1,4- β -D-mannan mannohidrolaz, EC 3.2.1.78) enzimi çeşitli, bakteri, mantar, bitki ve hayvan türlerinden üretilen, ligninin ve hücre duvarının yapısında bulunan hemiselülozun linear ya da dallı heteropolisakkarit türevi ve doğada yaygın bulunan manno-oligosakkaridleri hidroliz etmektedir. Mannanaz enzimi gıda endüstrisinde lezzet artırma, kâğıt ve selüloz sanayinde odun selülozunu beyazlatma, hayvan beslenmesinde katkı maddesi olarak, deterjan amaçlı kullanıma ve meyve suyu durultmak üzere pek çok endüstri alanında geniş bir kullanım alanına sahiptir. Mannanaz enzimi yüksek bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalar ve funguslar tarafından üretilmektedir. Çalışmamızda kullanılan *Tricholomataceae* familyasına ait *Clitocybe geotropa* türü fungus toksik değildir, halk arasında Ebişke mantarı olarak bilinir ve yiyecek olarak tüketilmektedir.

Bu çalışmanın birinci aşamasında; mannanaz enzimi *Clitocybe geotropa* mantarından amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi ve Sepharkryl S 200 jel filtrasyon kromatografisi teknikleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminin ilk basamağında % 60-80 aralıklarda amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisine tatbik edilmiş ve son adımda Sepharkryl S 200 jel filtrasyon kolonundan elde edilen mannanaz enzimi %21.3 verimle 176.4 kat saflaştırılmıştır. SDS-PAGE jel elektroforez analizi sonucunda β -mannanaz enziminin tek alt birimden oluştuğu ve jel filtrasyon kromatografisi sonucunda molekül ağırlığının 39.5 kDa olduğu belirlenmiştir. *Clitocybe geotropa* mantarından saflaştırılan β -mannanaz enzimi Fe_3O_4 nanopartiküller ile modifiye edilen kitosan partiküllerine L-glutaraldehit kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize β -mannanaz'ın optimum pH değerleri 5.0, optimum sıcaklık değeri 60°C olarak belirlenmiştir. Serbest enzimin 25-60°C aralığında immobilize enzimin ise 20-60°C'lerde çok daha stabil olduğu tespit edilmiştir. Serbest ve bağlı enzimin substrat spesifikliğini belirlemek amacıyla keçi boynuzu gamı, ksilen, nişasta, selüloz ve jelatin substratları ile ayrı ayrı aktivite ölçümleri yapılmış ve Lineweaver burk grafikleri çizilerek V_{max} ve K_m değerleri belirlenmiştir. Enzim en yüksek V_{max} değerini çalışmada substrat olarak kullanılan locust bean gum substratında göstermiş ve serbest-immobilize β -mannanaz enzimlerinin V_{max} değerleri sırasıyla 10.2 EU/mg ve 14.35 EU/mg olarak bulunmuştur. K_m değerleri ise sırasıyla 0.588 mg/mL ve 0.122 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Serbest ve bağlı enzimin 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarında hazırlanan $CuCl_2$, $HgCl_2$, $FeCl_2$, $MgCl_2$, $ZnCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $CdCl_2$ ve $CoCl_2$ gibi bazı metal iyonlarının etkileri *in vitro* olarak araştırılmıştır. 5 mM konsantrasyonda Mg^{2+} iyonunun serbest enzimi %10 oranında inhibe ettiği, her iki konsantrasyonda ki Zn^{2+} iyonunun serbest ve immobilize haldeki enzim üzerinde %10 oranında inhibisyon etkisi olduğu anlaşılmıştır. Immobilize mannanaz enziminin Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonlu ortamda tamamen inhibe olduğu diğer metal iyonlarının genel olarak serbest ve immobilize enzimin aktivitesini artırdığı ortaya konmuştur. Çalışmanın son aşamasında ise; serbest ve immobilize β -mannanaz enziminin meyve suyunda verim artırma ve durultma işlemlerinde kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, özellikle kuşburnu suyu üretimi üzerinde serbest ve immobilize mannanaz enziminin sırasıyla %146,2 ve %223,1 oranında verimi artırdığı tespit edilmiştir.

2016, 143 sayfa

Anahtar Kelimeler: Mannanaz, *Clitocybe geotropa*, Saflaştırma, İmmobilizasyon Magnetik kitosan nanopartikül (MG-CTS NPs)

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION OF AN ENDO-BETA-1,4-MANNANASE FROM (*Clitocybe geotropa*) AND IMMOBILIZATION ONTO MAGNETITE CHITOSAN NANOPARTICLES AND USING THE CLARIFICATION OF FRUIT JUICES

Zeynep SÖNMEZ

Atatürk University
Natural Sciences Institute
Department of Nanobiotechnology
Department of Nanobiotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

Mannanase (1,4-β-D-manno manno hydrolase, EC 3.2.1.78) enzyme is hydrolyzed manno-oligosaccharides which are produced from various bacteria, fungi plant and animal species, and It is commonly found in the structure of lignin and cell wall hemicellulose linear or branched heteropolysaccharide derivative and in nature. Mannanase enzyme has a wide range of applications in many industries such as enhancing flavor in the food industry, bleaching the wood pulp in paper and cellulose industry, additives in animal nutrition, detergent and clarification of fruit juice. Mannanase enzyme is produced by higher plants, animals, micro-organisms and fungi. Used *Clitocybe geotrop* mushroom species in our study are belong to the family Tricholomatacea and they are not toxic fungi. They were popularly known as Ebiske mushrooms and consumed as food.

In the first step of this study; mannanase enzyme was purified from *Clitocybe geotrop* using ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephadex ion exchange chromatography and Sephacryl S 200 gel filtration chromatography techniques. In the first step of purification, it was done ammonium sulfate precipitate in the range of 60-80% then applied to DEAE-Sephadex ion exchange chromatography and in the final step; obtained mannanase enzyme was purified as 176.4 fold and with a yield of 21.3% from Sephacryl S 200 gel filtration column. SDS-PAGE gel electrophoresis analysis was indicated that β-mannanase formed from a single subunit enzyme and the molecular weight was determined to be 39.5 kDa by gel filtration chromatography. Purified β-mannanase enzyme from *Clitocybe geotrop* fungus was immobilized covalently to chitosan particles which modified with Fe₃O₄ NPs through L-glutaraldehyde. Then, the characterization of free and immobilized enzymes was completed. Optimum pH and optimum temperature value of free and immobilized β-mannanase was determined as 5.0 and 60°C, respectively. It has been found that free mannanase enzyme was mostly stable between 25 to 60°C and the immobilized enzyme was also stable in the range of 20 and 60°C.

In order to determine the substrate specificity of free and bound enzyme, activity measurements were done using xylene, starch, cellulose, and locust bean gum and gelatin substrates separately and V_{max} and K_m values were calculated using Lineweaver Burk plots. Enzyme highest V_{max} value was obtained against the locust bean gum substrate and V_{max} values of free and immobilized β-mannanase enzymes were 10.2 EU / mg and 14.35 EU / mg, respectively. The K_m values were calculated as 0.588 mg/mL and 0.122 mg/mL. The effects of CuCl₂, HgCl₂, FeCl₂, MgCl₂, CaCl₂, ZnCl₂, MnCl₂, CdCl₂ and CoCl₂ metal ions at 1 mM and 5 mM concentrations as *in vitro*. The free enzyme was inhibited at 10% rate by Mg²⁺ ions at 5 mM concentration, Zn ion also inhibited at 10% rate both free and immobilized mannanane enzyme at 5 mM concentration. Immobilized mannanase enzyme was inhibited in the medium of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions but other metal ions activated to them. In the last phase of the study; it was investigated whether free and immobilized β-mannanase could be used in the clarification of fruit juice and increasing of juice yield or not. According to the obtained results, it was found that both free and immobilized mannanase enzyme was increased fruit juice production. Especially, production of rosehip juice was produced by free and immobilized mannanase with the yield of 146.2% 223.1%, respectively.

2016, 143 pages

Key Words: Mannanase, *Clitocybe geotropa*, purification, immobilization, magnetite chitosan nanoparticles (MG-CTS NPs)

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı hazırlama sürecinde bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, iyi bir çalışma ortamı sağlayan ve desteğini her an hissettiren çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na teşekkürlerimi arz ederim.

Nanobilim ve Nanomühendislik Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL'a teşekkür ederim.

Çalışmamın deney aşamasında laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan Erzurum Meslek Yüksekokulu Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmamdaki SEM ve FT-IR görüntülerinin alınmasında yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Ümit DEMİR ve çalışma grubuna teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamdaki XRD görüntülerinin alınmasında yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Yaşar TOTİK ve çalışma grubuna teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın deney aşamasında yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli çalışma arkadaşım Hicran ÖNEM ve grup arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Zeynep SÖNMEZ

Ocak, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Nanopartiküller.....	1
1.1.1. Manyetik nanopartiküller.....	1
1.2. Enzimler.....	2
1.2.1. Enzimlerin tarihçesi.....	4
1.2.2. Enzimlerin sınıflandırılması.....	5
1.2.3. Enzimlerin etki mekanizması.....	8
1.2.4. Enzimatik bir reaksiyonun hızını etkileyen faktörler.....	9
1.2.4.a. Enzim konsantrasyonu.....	9
1.2.4.b. Substrat konsantrasyonu.....	10
1.2.4.c. pH.....	12
1.2.4.d. Isı veya sıcaklık.....	12
1.2.4.e. Zamanın enzimatik reaksiyonların hızı üzerine etkisi.....	13
1.2.4.f. İyonların enzimatik reaksiyonların hızı üzerine etkisi.....	13
1.2.5. Enzim inhibisyonu.....	14
1.2.5.a. İrreversibl (dönüşümsüz) enzim inhibisyonları.....	14
1.2.5.b. Reversibl (dönüşümlü) enzim inhibisyonları.....	15
1.2.6. Enzim immobilizasyonu.....	18
1.2.6.a. Enzim immobilizasyonunun tarihçesi.....	20
1.2.6.b. İmmobilizasyon yöntemleri.....	21
1.3. Endüstriyel Enzimler.....	33
1.4. Türkiye’de Meyve Suyu Üretimi.....	34
1.5. Mannan ve Mannanaz Enzimi.....	36

1.5.1. Mannan sindiren enzimler	40
1.5.1.a. Mannanaz enzimi.....	42
1.5.1.b. Mannanaz enzim kaynakları.....	45
1.5.1.c. β -mannanaz enziminin uygulama alanları.....	46
1.6. Ebişke Mantarı	53
2. KAYNAK ÖZETLERİ	55
3. MATERYAL ve METOD.....	74
3.1. Materyal.....	74
3.1.1. Araştırmada kullanılan cihazlar.....	74
3.1.2. Araştırmada kullanılan kimyasallar.....	74
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	75
3.1.3.a. DNS çözeltilisinin hazırlanması	75
3.1.3.b. Sodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) tamponu hazırlama	75
3.1.3.c. Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	75
3.1.3.d. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin çözüldüğü tampon çözelti	75
3.1.3.e. β -mannanaz enzim substrat çözeltisi	76
3.1.3.f. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponunun hazırlanışı....	76
3.1.3.g. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tampon	76
3.1.3.h. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi	76
3.1.3.i. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi.....	76
3.1.3.j. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları	77
3.1.3.j. Amonyum sülfat çöktürmesi	77
3.1.3.k. Optimum pH tayini için kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanışları	78
3.1.3.l. Bazı metal iyonlarının, kimyasalların saflaştırılan mannanaz enzimi üzerine etkisinin incelenmesi	79
3.2. Metod.....	80
3.2.1. Mannanaz enziminin <i>Clitocybe geotropa</i> mantarından saflaştırılması	80
3.2.1.a. Mannanaz enziminin amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yöntemi ile kısmi saflaştırılması	81
3.2.1.b. β -mannanaz enzimin DEAE-Sefadex iyon-değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılması	81

3.2.1.c. Mannanaz enziminin Sephakril S200 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılması	82
3.2.1.d. SDS-PAGE elektroforezi	83
3.2.1.e. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini	84
3.2.1.f. Sefadeks G 100 jel filtrasyon yöntemi ile molekül ağırlığı tayini	84
3.2.1.g. Protein miktarı tayini	85
3.2.1.h. β -mannanaz enzimi aktivite tayini	85
3.2.1.i. Saflaştırılan enzimin destek materyaline İmmobilizasyonu.....	86
3.2.1.j. Nano magenetik özellik kazandırılmış kitosan moleküllerine saflaştırılan mannanaz enziminin immobilize edilmesi için optimum koşulların belirlenmesi	91
3.2.1.k. <i>Clitocybe geotropa</i> mantarından saflaştırılan β -mannanaz enzimi üzerine kinetik çalışmalar	92
3.2.1.l. Meyve suyu durultma işlemi	94
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	95
4.1. Bulgular	95
4.1.1. Kantitatif protein tayin standart eğrisinin çizimi.....	95
4.1.2. Enzimin saflaştırılması	96
4.1.2.a. Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları.....	96
4.1.2.b. Ebişke mantarından (<i>Clitocybe geotropa</i>) saflaştırılmış β -mannanaz enziminin DEAE-Sephadeks iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılma sonuçları	96
4.1.2.c. Ebişke mantarından (<i>Clitocybe geotropa</i>) saflaştırılmış serbest ve immobilize β -mannanaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez sonucu	99
4.1.2.d. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini sonuçları	100
4.1.2.e. β -mannanaz enziminin magnetik kitosan molekülüne glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent bağlanması için immobilizasyon koşullarının optimizasyonu	101
4.1.2.f. İmmobilize β -mannanaz'ın tekrar kullanılabilirliği	103
4.1.2.g. Serbest ve immobilize β -mannanaz enziminin kinetik parametreleri	104
4.1.3. Kitosan destek materyalinin yapısal morfoloji analizi	113

4.1.4. X-Ray difraksiyon (XRD) analizi sonuçları.....	113
4.2. FTIR Spektroskopisi Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy FTIR): Analizi Sonuçları	115
4.3. Meyve Suyu Durultma İşlemi	117
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	120
KAYNAKLAR	128
ÖZGEÇMİŞ	144



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat derece
A.	Aspergillus
Å	Angström
Bis	N,N'-metilen-bis-akrilamid
CBB	Coomassie Brilliant Blue
Da	Dalton
EC	Enzim Komisyonu
EDTA	Etilendiaminotetra-asetik asit
ES	Enzim – substrat
Ins	İnositol
IUBMB	Uluslar arası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
IUPAC-IUBMB	The International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry and Molecular Biology
Kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis sabiti
L	Litre
MEGEP	Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Geliştirilmesi Projesi
mM	Milimolar
MRS	Man, Ragosa and Sharpe
mU/ml	Mililitredeki mili ünite
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
nm	Nanometre
nmol/s	Nanomol/saniye
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
rpm	Dakikada devir sayısı
s	saat
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamin
Tris	2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
U/mg	Unite/miligram
U/mL	Mililitredeki unite
UV	Ultraviyole
v/v	Hacim/Hacim (volume/volume)
Vmax	Maksimum hız
w/v	Ağırlık/Hacim (weight/volume)
%	Yüzde
α	Alfa
β	Beta
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Holoenzim yapısı	3
Şekil 1.2. Enzim konsantrasyonunun enzim hızına etkisi.....	10
Şekil 1.3. Substrat konsantrasyonunun enzim hızına etkisi.....	10
Şekil 1.4. Lineweaver-Burk denklemi ve grafiği.....	11
Şekil 1.5. Enzim kataliz reaksiyonları üzerine pH etkisi	12
Şekil 1.6. Sıcaklık değişiminin enzimler üzerinde ki etkisi.....	13
Şekil 1.7. Kompetitif enzim inhibisyonunda enzim-substrat ilişkisi	15
Şekil 1.8. Kompetitif enzim inhibisyonunun Lineweaver-Burk ve Michaelis-Menten grafiği	16
Şekil 1.9. Nonkompetitif enzim inhibisyonunda enzim-substrat ilişkisi	16
Şekil 1.10. Nonkompetitif enzim inhibisyonunun Lineweaver-Burk ve Michaelis-Menten grafiği	17
Şekil 1.11. Unkompetitif enzim inhibisyonunda enzim-substrat ilişkisi	18
Şekil 1.12. Unkompetitif enzim inhibisyonunun Lineweaver-Burk ve Michaelis-Menten grafiği	18
Şekil 1.13. İnorganik taşıyıcıya enzim adsorbsiyonu	26
Şekil 1.14. Kovalent bağlanmada sıklıkla kullanılan fonksiyonel grupların şematik gösterimi.....	29
Şekil 1.15. Lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu	32
Şekil 1.16. Türkiye’deki meyve suyu üretiminin dağılımı	35
Şekil 1.17. Yumuşak dokulu odunlarda Galaktoglukomannan yapısı.....	37
Şekil 1.18. Farklı formlarda ki mannan yapılarının ve bunları hidrolizleyen enzimler	38
Şekil 1.19. Linear mannan yapısı.....	39
Şekil 1.20. Mannan sindiren enzimler ve yapıları	42
Şekil 1.21. <i>Trichoderma reesei</i> baktersisten izole edilmiş β -mannanaz enziminin üç boyutlu yapısı	43
Şekil 1.22. β -mannanaz enziminin mannan polisakkaritini β -1,4 bağlantı bölgesinden hidrolizleme mekanizması	44

Şekil 1.23. Ebişke (<i>Clitocybe geotropa</i>) mantar resmi	54
Şekil 3.1. Kitosan molekülünün Fe ₃ O ₄ nanopartikülleri ile kaplanması reaksiyonu	87
Şekil 3.2. Magnetik kitosan molekülünün glutaraldehit ile bağlanma reaksiyonu	88
Şekil 3.3. Magnetik kitosan nano partiküllerinin glutaraldehit ara kolu üzerinden β-mannanaz enzimi ile Schiff bazı oluşturarak kovalent immobilizasyon reaksiyonu.....	90
Şekil 4.1. Standart çözeltilerdeki µg proteine karşılık gelen absorbans değerleri	95
Şekil 4.2. DEAE-selüloz iyon değişim kromatografi kolonu kullanılarak β-mannanaz enziminin gradient elüsyon sonucu;.....	97
Şekil 4.3. <i>Clitocybe geotropa</i> mantarından saflaştırılan β-mannanaz enziminin Sephakril S200 jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile saflaştırılması sonucu elde edilen elüsyon grafiği:	98
Şekil 4.4. β-mannanaz enziminin SDS-PAGE jel görüntüsü.....	100
Şekil 4.5. <i>Clitocybe geotropa</i> mantarından izole edilmiş β-mannanaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği	101
Şekil 4.6. İmmobilizasyon A.pH'sına ve sıcaklığına bağlı olarak glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonu esnasında <i>Clitocybe geotropa</i> mantarından izole edilmiş β-mannanaz enziminin bağlı aktivite (-▲-) ve bağlanan β-mannanaz (-●-) derişimleri	102
Şekil 4.7. immobilize β-mannanaz enziminin tekrar kullanılabilirlik oranı	103
Şekil 4.8. Ebişke mantarından (<i>Clitocybe geotropa</i>) saflaştırılmış serbest ve immobilize β-mannanaz enziminin optimum pH grafiği	105
Şekil 4.9. Ebişke mantarından (<i>Clitocybe geotropa</i>) saflaştırılmış serbest ve immobilize β-mannanaz enziminin optimum sıcaklık değer grafiği	105
Şekil 4.10. Ebişke mantarından (<i>Clitocybe geotropa</i>) saflaştırılmış serbest ve immobilize β-mannanaz enziminin stabil pH karşılaştırılması.....	106
Şekil 4.11. Serbest ve immobilize β-mannanaz enziminin termal stabilizasyon bağlı sıcaklık değerlerinin karşılaştırılması.....	107
Şekil 4.12. Ebişke mantarından (<i>Clitocybe geotropa</i>) saflaştırılan β-mannanaz enzimi için A. Na-fitat, B. Pektin, C. Kazein, D. Nişasta, E. Jelatin ve F. Ksilen substratları ile elde edilen Lineweaver-Burk grafikleri	110

Şekil 4.13. Kitosan (I), magnetik kitosan nanopartikül (II) ve β -mannanaz enzimi immobilize edilmiş magnetik kitosan nanopartiküllerin (III) SEM görüntüleri	113
Şekil 4.14. Kitosan, magnetik kitosan nanopartikül ve β -mannanaz enzimi immobilize magnetik kitosan nanopartiküllere ait XRD toz kırınım desenleri.	114
Şekil 4.15. FT-IR spectrum of doğal kitosan (a), nano magnetit kitosan (b), mannanaz immobilize edilmiş nanomagnetit kitosan (c)	116
Şekil 4.16. Meyve verimi artış oranları ve durultma yüzdeleri	117



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması	7
Çizelge 1.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması	33
Çizelge 1.3. Mannanaz enzim kaynakları	46
Çizelge 3.1. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışım miktarları ve oranları	77
Çizelge 4.1. <i>Clitocybe geotropa</i> mantarını saflaştırmak için belirlenen (NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürme aralığı ve β-mannanaz enziminin aktivite değerleri.....	99
Çizelge 4.2. Serbest halde ve nanomagnetik kitosan molekülleri üzerine immobilize edilmiş β-mannanaz enzimi için V _{max} ve K _m değerleri	111
Çizelge 4.3. Bazı metal iyonlarının serbest ve immobilize β-mannanaz enzimi üzerine etkileri	112
Çizelge 4.4. <i>Clitocybe geotropa</i> mantarından saflaştırılmış serbest ve immobilize endo-β-1,4 mannanaz enziminin pulp haline getirilmiş farklı meyve sularında verim oranı üzerine etkisi.....	118
Çizelge 4.5. <i>Clitocybe geotropa</i> mantarından saflaştırılmış serbest ve immobilize endo-β-1,4 mannanaz enziminin pulp haline getirilmiş farklı meyve sularında kuru madde ağırlığında azalış oranı ve yüzdesi	119

1. GİRİŞ

1.1. Nanopartiküller

Nanopartikül kavramı boyut olarak 1-100 nm arasındaki büyüklüğe sahip olan partikülleri kapsayan bir kavram olarak kullanılmaktadır. Belirli bir materyalin atom boyutundaki özellikleri, partikül olarak belirtilen boyut aralığında fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin değişmesine sebep olmaktadır (Pearce 2012).

Nanopartiküller yapıları farklı kimyasal özelliğe sahip olan metal oksitler, metaller, organik karbon materyaller, silikatlar ve biyomoleküller yapıda materyallerden oluşabilmektedir. Morfolojik özellik olarak nanopartiküller küre, silindir ve tüp şeklinde olabilmektedirler. Nanopartiküller kolaylıkla spesifik uygulamalara uygun yüzey modifikasyonlarının sağlanmasını gerçekleştirebilecek şekilde dizayn edilebilirler. Nanopartiküllerin kimyasal yönden kararlı olmaları, daha geniş yüzey alanlarına sahip olmaları, farklı fonksiyonlara sahip olmaları, hedeflenen bölgeye herhangi bir taşıyıcıya gerek kalmadan enjeksiyon yoluyla ulaşabilmeleri, şekil ve morfolojik özelliklerinin farklılık arz etmesi nedenleriyle teknolojiye geniş uygulama alanı bulmaktadırlar (Nagarajan *et al.* 2008; Abhilash 2010; Pekdemir 2011).

1.1.1. Manyetik nanopartiküller

Bir sıvı içerisinde süperparamanyetik dispersiyonlar oluşturabilen manyetik nanopartiküller metal ve metal oksitlerden oluşmaktadır. Bunlar genellikle Ni, Co, Fe, Fe₃O₄ ve Fe₂O₃ metal ve metal oksitler oluşmaktadır. Manyetik Fe₃O₄ bileşiği kübik yapıya sahiptir (Kahraman 2008). Oda sıcaklığında Fe²⁺ ve Fe³⁺ iyonları arasında elektronlar geçiş özelliği gösterdiklerinden dolayı manyetik yarı metalik malzemeler grubunda yer alır (Chen 2002; Tartaj 2005; Ban *et al.* 2005; Gupta 2005; Maity 2007; Kahraman 2008).

1.2. Enzimler

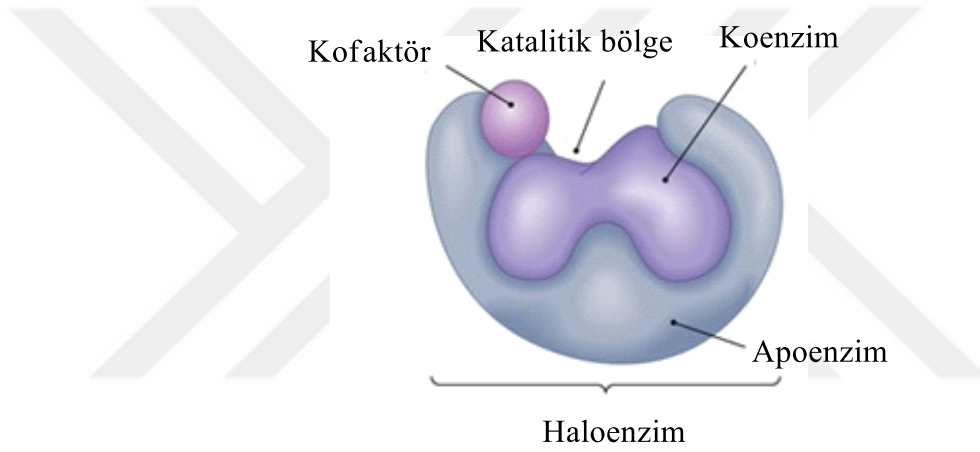
Enzimler; tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürerek tepkime hızını arttıran biyokimyasal katalizörler olarak tanımlanmaktadır. Canlı organizmalardaki tepkimelerin birçoğu katalizör olmadan gerçekleşmez. Enzimler, biyolojik sistemlerdeki son derece kompleks reaksiyonların bünyesinde bulunduğu canlıya zarar vermeyecek şekilde ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlar, yan ürün oluşumuna izin vermez ve çoğunlukla protein yapısında (katalitik etki gösteren bazı RNA grupları hariç) olan spesifik biyokatalizörlerdir (Nelson and Cox 2004; Yener 2007; Wolfson *et al.* 2008; Madigan and Martinko 2010).

Enzimler kimyasal katalizörlere göre; yüksek oranda substrat spesifikliğine sahiptirler, artık ürünlerin oluşumuna engel olurlar ve uygun *in vitro* koşulların sağlanması halinde etkilerini gösterirler. Enzim katalizöründe gerçekleşen reaksiyonlar %100 verimle gerçekleşmektedir. Enzimler optimum koşullarda yüksek aktivite gösterdiklerinden dolayı reaksiyon maliyetini düşürürler ve çevresel kirlilik gibi problemlere yol açmazlar. Enzimlerin optimum koşullar altında etkilerini *in-vitro* ortamlar da gösterebiliyor olmaları, enzimlerin endüstriyel alanlarda ve biyoteknolojide farklı amaçlarla kullanılma imkanı vermektedir (Polaina and MacCabe 2007; Yıldırım 2010).

Enzimlerin protein kısmı peptid bağlarıyla bağlı 20 aminoasitten oluşur. Enzimler post translasyonel modifikasyonlar sonucu protein zincirinde yer alan değişken -R- gruplarında meydana gelen kimyasal farklılıklarla çeşitlenmektedir. Post translasyonel değişimler sonucu protein zincirine karbohidrat, lipid, çeşitli organik moleküller veya metal iyonları bağlanabilmektedir (Nelson and Cox 2004; Pandey and Ramachandran 2006).

Enzimlerin bir kısmı basit proteinlerden bir kısmı ise karbohidratları, lipidleri, metalleri, fosfatları ve diğer bazı organik grupları (prostetik grupları) içeren ve protein tabiatında olmayan gruplarla sıkıca bağlanmış konjuge proteinlerden oluşurlar.

Enzimin protein kısmına “Apoenzim”, protein olmayan kısmına “kofaktör” denilmektedir. Apoenzim ve kofaktörün birleşmesiyle ortaya çıkan aktif yapı holoenzim olarak adlandırılmaktadır. Enzimatik reaksiyonda dönüşüme uğratılan maddeye substrat denir (Messing 1975; Champe and Harvey1997; Geçkil 2012). Koenzimler ortamda serbest halde bulunurlar ve yalnız reaksiyon esnasında enzimin protein kısmı ile temas ederler. Koenzimler substrattan ayrılan bir grup veya atomu tutma vazifesi görür (Champe and Harvey1997; Kaplan and Gross 2000; Polaina and MacCabe 2007; Geçkil 2012).



Şekil 1.1. Holoenzim yapısı

Enzimler genellikle bir tek substratı ürüne dönüştürürler. Enzim molekülleri substrata uyumlu üç-boyutlu bir yüzey oluşturan aminoasit yan zincirleri içeren aktif merkez olarak adlandırılan ve substratı bağlayarak bir enzim–substrat (ES) kompleksi oluşturan özel bağlanma bölgeleri taşırlar. (Whitehurst and Law 2002).

Bir enzimin aktivitesi, enzimin katalizlediği enzimatik reaksiyon hızının, optimum şartlarda sabit bir sürede ürüne dönüşen substrat miktarının ifadesi olarak tanımlanmaktadır (Arslan 2004; Buchholz *et al.* 2005; Geçkil 2012).

1.2.1. Enzimlerin tarihçesi

Mikroorganizmalar ve canlı halde bulunma nedenlerinden gerçekleştiği sanılmakta olan sütün ekşimesi, şekerin fermantasyon ile alkole dönüştürülmesi, şarap, sirke ve peynirin yapılması, ekmeğin mayalanması gibi enzimatik reaksiyonların uygulamaları M.Ö'ye dayanmaktadır. Enzimlerin keşfedilmesinde Payen ve Persoz adlı iki bilim insanının 1833 yılında malt ekstraktından alkol ile nişastayı sindiren enzimi izole etmesi ve olaya diastaz adını vermeleridir. Ardından 1838 yılında farklı bölgelerde bulunan Gagnrard ve Schav adlı bilim insanlarının fermantasyonu incelemek amacıyla yaptıkları çalışmalar sonucu bu olayların maya adı verilen bazı makro organizmalar aracılığıyla meydana geldiğini açıklamaları ilk basamakları sayılmaktadır. Aynı tarihlerde Beaumont mide suyunun sindirici etkisinin kimyasal bir maddeye bağlı olduğunu bulmuş ve 1836'da Bchvrann bu maddeyi izole ederek pepsin adını vermiştir (Buxbaum 2007).

1850'lerde Louis Pasteur şekerlerin, maya aracılığıyla alkole dönüşmesinin "fermentler" aracılığıyla gerçekleştiği ve bu fermentlerin, maya hücrelerinin parçaları olduğunu kabul etmiştir. Fakat Büchner'in fermantasyon yapan maya hücrelerini kumla ezerek hücreleri parçalaması ve bu karışımı yüksek tazyik altında süzerek elde ettiği hücre içermeyen sıvının glukozu fermantasyona uğrattığını göstermesinden sonra fermantasyon gibi enzimatik reaksiyonlarda Pasteur'ün fikrinin aksine canlı hücrelerin şart olmadığı, böylece maya hücrelerinin bu reaksiyonları katalize eden enzim karışımını içerdiği sonucuna varmıştır (Aehle 2007).

Bu çalışmaların devamında 1874 yılında Hansen adlı bilim insanı, enzim preparatının (rennet) ticari olarak üretildiği ilk firma olan C. Hansen Laboratuvarını kurmuştur. Frederick W. Kühne 1878'de maya manasına gelen fermenter maddeleri "enzim" olarak tanımlamış böylece enzim kavramı ortaya çıkmıştır (Buxbaum 2007; Whitehurst van Oort 2010).

1885 yılında Blumenthal, peynir yapımında kullanılmak üzere, ilk kez rennin enziminin özütünü üretmişlerdir. 1926 yılında James B. Summer, ilk defa üreaz enzim kristallerini elde ederek, enzimlerin proteinlerden oluştuğunu göstermiştir (Buxbaum 2007). 1930'larda Moses Kunitz ve John Northrop kimotripsin, pepsin, tripsin ve karboksipeptinaz enzimlerini kristalize ederek bu enzimlerin proteinlerden oluştuğunu kanıtlamaları ile Summer tarafından ortaya konmuş enzimin proteinlerden oluştuğu teorisi büyük oranda kabul edilmiştir. Enzimlerin kimyası ve yapısı alanındaki ilk çalışmalar 1900'lü yıllarda Svedberg tarafından geliştirilmiş ultrasantrifüj tekniği kullanılarak molekül kütlelerine enzimlerin ayrılması, 1960'larda ribonükleazın aminoasit dizi sırasının ve lizozim enziminin üç boyutlu yapısının X-ışınları kristalografisi ile belirlenmesi (1965) çalışmaları ile başlamaktadır (Beilen and Li 2002).

1958 yılında Koshland tarafından önerilmiş, indüklenmiş uyum (induced-fit) modeli ile enzimlerin yapısal esneklikleri çözülerek bu moleküllerin katalitik gücü ve spesifikliği açıklanmaya çalışılmıştır. Merrifield *et al.* (1969) tarafından, ribonükleaz enziminin aminoasitlerden kimyasal olarak sentezlendiğinin belirlenmesinden sonra X-ışını kristalografisi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) teknikleri ile enzimlerin yapıları incelenmiştir. (Buchholz and Poulson 2000; Whitehurst and van Oort 2010).

Thomas R. Cech ve Sidney Altman adlı bilim insanları 1980'lerde, protein yapısında olmayan ancak enzim işlevi gören ribozimleri keşfederek enzimlerin tümünün protein yapısında olduğu fikrini çürütmüşlerdir. Bu bilim adamları yapmış oldukları "RNA katalitik özelliklerinin keşfi" buluşlarıyla 1989 yılında, kimya alanında Nobel ödülünü almışlardır. (Buchholz and Poulson 2000; Polaina and MacCabe 2007; Peçe 2014).

1.2.2. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler keşif edilip kullanılmaya başlandıktan sonra salgılanıp faaliyet gösterdikleri yere göre sınıflandırılmışlardır. Hücre içinde salınıp aktive olan enzimlere "hücre içi"(endojen) ve salgılandıkları bölgeden farklı yerde aktive olan enzimler ise "hücre

dışı”(eksojen) enzimler olarak adlandırılır. Enzimler inaktif halde substratının sonuna “-jen” veya “pro-” eki getirilerek aktif olduğu durumda etkiledikleri substratın sonuna “ase=az” eki getirilerek ve katalizledikleri reaksiyon türüne göre tanımlanır. Ayrıca; enzimler reaksiyona girdikleri substratın isminin sonuna -litik eki getirilerek te isimlendirilir (Champe and Harvey 1997; Ası 1999; Beilen and Li 2002; Nelson and Cox 2004).

1961 yılında Uluslararası Biyokimya Birliğinin enzim komisyonu almış olduğu karara göre enzimler belirlenmiş kurallara göre adlandırmakta ve sınıflandırılmaktadır. Bu kurallar;

- Enzimler ilk bölümü substratın adını ikinci bölümü ise katalizlediği reaksiyon çeşidini açıklayan ve -az son eki ile biten iki kısımdan oluşur. Fakat uluslararası enzim komisyonunun kararıyla -az son ekinin eklenmesi kuralı kaldırılmıştır.
- Enzimi tanımlayacak ek bilgi var ise enzim isimlendirildikten sonra parantez içerisinde yazılır.
- Enzimler temel olarak 6 sınıfa, her sınıf alt sınıflara ve alt sınıflar da gruplara ayrılacak şekilde gruplandırılmıştır.
- Her enzim birbirinden ayrılmış 4 sayıdan oluşan sistematik kod numaralarına göre tanımlanmıştır. Bu sayılardan birincisi enzimin temel sınıfını, ikincisi alt sınıfını, üçüncüsü grubunu, dördüncü sayı ise enzimin o gruptaki kendine özgü olan sıra numarasıdır.

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması

ENZİMLERİN SINIFLANDIRILMASI		
1-Oksidoredüktazlar; Biyolojik oksidasyonla ilgili redüksiyon-oksidasyon reaksiyonlarını katalize ederler.	A. Elektron donörünün $-CH-OH$ grubu olduğu reaksiyonları katalizleyenler	A.1.Dehidrojenazlar (redüktazlar): Elektron alıcısı olarak NAD(P)+ kullanırlar. A.2.Oksidazlar: Elektron alıcısı olarak moleküler oksijen kullanırlar.
	B. Elektron donörünün aldehit veya keton grubu olduğu reaksiyonları katalizleyenler C. Elektron donörünün $-CH-CH-$ grubu olduğu reaksiyonları katalizleyenler D. Elektron donörünün $-CH-NH_2$ grubu olduğu reaksiyonları katalizleyenler E. Elektron donörünün $-CH-NH-$ grubu olduğu reaksiyonları katalizleyenler F. Elektron donörünün NAD(P)H olduğu reaksiyonları katalizleyenler G. Elektron donörünün sülfür grubu olduğu reaksiyonları katalizleyenler H. Elektron donörünün hem grubu olduğu reaksiyonları katalizleyenler İ. Elektron donörünün difenol olduğu reaksiyonları katalizleyenler J. Peroksidazlar: Elektron akseptörünün bir peroksit olduğu reaksiyonları katalizleyenler K. Oksijenazlar: Moleküler oksijenin elektron donörü ile birleştirildiği reaksiyonları katalizleyenler	B.1.Dehidrojenazlar: Elektron akseptörü olarak NAD(P)+ kullananlar. B.2.Elektron alıcısı olarak disülfid kullananlar. B.3.Elektron akseptörü olarak Fe/S protein kullananlar. K.1. Dioksijenazlar: Moleküler oksijenin her iki atomunun da elektron donörü ile birleştirildiği reaksiyonları katalize ederler K.2. Monooksijenazlar (hidroksilazlar): Moleküler oksijenin her bir atomunun iki ayrı elektron vericisi ile birleştirildiği reaksiyonları katalize ederler
2-Transferazlar, fonksiyonel grupların bir molekülden diğerine transferini katalize ederler.	A. Bir karbonlu grupları transfer edenler B. Bir açıl grubu transfer edenler C. Bir glukozil grubu transfer edenler; Heksoz kalıntısı transfer edenler, Pentoz kalıntısı transfer edenler D. Kinazlar: Fosfat içeren grup transfer ederler.	A.1.Metil grubu transfer edenler A.2.Formil grubu transfer edenler A.3.Karbamoil grubu transfer edenler A.4.Bir aldehit veya keton kalıntısı transfer edenler B.1.Açıl grubu donörünün açıl-CoA olduğu reaksiyonları katalize edenler B.2. Bir aminoaçıl grubunun transfer edildiği reaksiyonları katalize edenler

Çizelge 1.1. (devamı)

3-Hidrolazlar, su moleküllerinin eklenmesi ile bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalizlerler.	1.Esterazlar: Ester bağı hidroliz ederler. 2. Glukozidazlar: Glukozidik bağları hidrolize ederler. 3. Peptidazlar: Peptit bağlarını hidrolize ederler. 4. Amidazlar: Peptit bağından başka bir amit bağı hidrolize ederler.
4-Liyazlar, oksidasyon veya hidrolizden farklı olarak moleküller arasında ki bağları yıkan veya oluşturan enzim grubudur.	1.Bir C-C bağı oluşturan veya yıkanlar; Karboksi-liyazlar (karboksilazlar, dekarboksilazlar), Aldehit veya ketonlar üzerine etkili olanlar 2. Bir C-O bağı oluşturan veya yıkanlar; Hidroliyazlar (hidratazlar, dehidratazlar) 3. Bir C-N bağı oluşturan veya yıkanlar; Amonyak liyazlar, Amidin liyazlar
5-İzomerazlar, molekül içi değişiklikleri katalizlerler	1.Epimerazlar: Rasemizasyon veya epimerizasyon reaksiyonlarını katalize ederler. 2. Cis-trans izomerizasyon reaksiyonlarını katalize edenler 3. Bir intramoleküler elektron transferi reaksiyonunu katalize edenler 4. Mutazlar: İnamoleküler grup transferi reaksiyonlarını katalize ederler.
6-Ligazlar, enerjice zengin bir bağı hidrolizi ile iki molekülün birbirine bağlanmasını katalizlerler	1.Bir C-O bağı; C-S bağı; C-N bağı; C-C bağı; P-O bağı kuranlar

1.2.3. Enzimlerin etki mekanizması

Enzimatik reaksiyon hızlarının deneysel parametrelerdeki değişimlerden etkilenme oranlarının ve değişim miktarının incelenmesi olayı enzim kinetiği olarak adlandırılır. Biyokimyasal enzim mekanizması Michaelis-Menten teorisi ile açıklanmaktadır. Bu teoriye göre enzimin aktif bölgesi substrat ile bir ara ürün vermek üzere enzim substrat kompleksi oluşturur ve bu etkileşim sonucu substratta bazı bağlar parçalanır. Substrat enzimin etkisiyle reaksiyon ürünlerini oluşturacak parçalanmış dayanıksız bir kompleks haline dönüşür (Geçkil 2012).

Bir enzimin aktivitesi, o enzim tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyonun hızının, enzim etkisiyle optimal koşullarda belirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir. Reaksiyonun hızını belirleyen en önemli faktör aktivasyon enerjisi (E) olarak adlandırılmış enerji ihtiyacının büyüklüğüdür. Enerji engeli ne kadar yüksek olursa birim zaman içerisinde bu engeli aşan moleküllerin sayısı da o oranda az

olacaktır. Reaksiyon hızını artırabilmek için sisteme kimyasal veya biyolojik bir katalizör ilave edilebilir. Bu durumda katalizör substrat ile (ES) kompleksi yaparak aktivasyon enerjisini aşağılara çekebilir (Chaplin and Bucke 1990; Ası 1999).

Bir enzimatik reaksiyonun hızı, enzim etkisiyle belirli zaman biriminde birim başına açığa çıkan ürünün veya ürüne dönüşen substratın miktarına göre belirlenir. Belirli bir enzimin *in-vivo* veya *in-vitro* ortamında bulunma miktarı, enzimin bulunduğu yerde ki reaksiyonu katalizlediği tepkimenin hızı ölçülerek belirlenir ve ölçülen hız, var olan aktif enzimin miktarıyla doğru orantılı olarak değişir (Buchholz *et al.* 2005). Enzimlerin miktarları yerine genellikle aktivite üniteleri kullanılır ve çeşitli enzimatik reaksiyonların hızlarındaki farklılık ilgili enzimlerin aktivitelerinin veya etkinliklerinin değişkenlik göstermesinden kaynaklanmaktadır (Buxbaum 2007; Ahle 2007).

Optimum pH ve sıcaklıkta doymuş substrat konsantrasyonunda tek bir enzim molekülü tarafından birim zamanda ürüne dönüşen substrat molekülü sayısına, enzime ait dönüşüm kat sayısı denilir ve kcat sembolü ile gösterilir. Enzim aktivite birimi, ünite (U) olarak adlandırılır ve IU'ile gösterilir. 1 IU enzim aktivitesi, optimal şartlarda, 16,67 nmol substratı 1 saniyede ürüne dönüştürülmesine denk gelen; 1 dakikada 1µmol substratı ürüne dönüştüren enzimin etkinlik derecesinin ölçüsüdür. Protein veya enzimlerle karışık halde bulunan bir enzimin konsantrasyonu ünite/mL cinsinden ifade edilir. Bir enzimin spesifik aktivitesi=ünite/mg protein veya µmol P /mg birimleriyle gösterilir. Optimal koşullarda, 1 saniyede 1 mol substratı sindiren enzim etkinliğinin ölçüsüne ise katal denilmekte ve 6×10^7 IU enzim aktivitesine karşılık gelmektedir (Chaplin and Bucke 1990; Ası 1999; Buchholz *et al.* 2005; Geçkil 2012).

1.2.4. Enzimatik bir reaksiyonun hızını etkileyen faktörler

1.2.4.a. Enzim konsantrasyonu

Biyokatalizörlerle gerçekleştirilen reaksiyonlarda hız enzimin substrata doymuş olduğu koşullarda enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Optimal

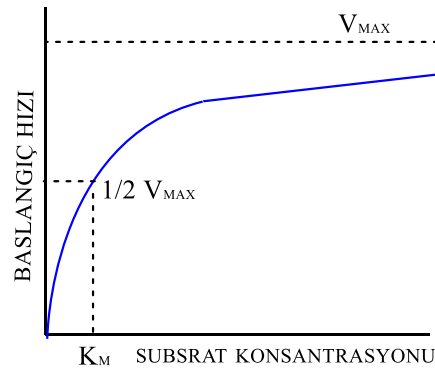
koşulların sağlandığı ve yeterli substrat ortamında enzimatik reaksiyonun ölçülen ilk hızı (V_o), enzim konsantrasyonu $[E]$ ile doğru orantılı olarak değişir (Chaplin and Bucke 1990; Sayın 2009; Geçkil 2012).



Şekil 1.2. Enzim konsantrasyonunun enzim hızına etkisi

1.2.4.b. Substrat konsantrasyonu

Enzim konsantrasyonu ve optimum koşulların sağlandığı reaksiyon ortamında substrat miktarı küçük olsa dahi enzim molekülleri serbest kalır ve küçük miktarda enzim-substrat kompleksi oluşur ve ürüne dönüşen substrat miktarı azaldıkça reaksiyon hızı azalır. Ortamda bulunan tüm enzim moleküllerinin ES kompleksi oluşturduğu noktada reaksiyon maksimum hıza ulaşır. V_{max} noktasında ortama substrat eklenmesi reaksiyon hızını etkilemez (Buchholz *et al.* 2005; Pandey 2006; Aehle 2007; Buxbaum 2007).

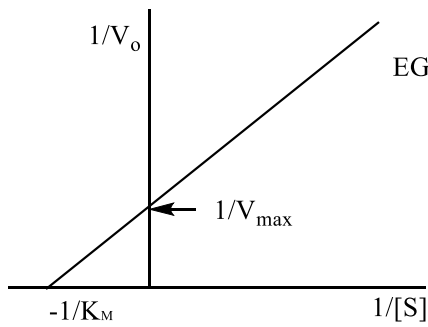


Şekil 1.3. Substrat konsantrasyonunun enzim hızına etkisi

Katalitik reaksiyonlarda enzim moleküllerinin yarısının substrata doydugu ve yarı maksimal hızın gözleendiği noktadaki substrat konsantrasyonuna “Michaelis-Menten sabiti” denir ve K_m ile gösterilir. Bir enzim için K_m (Michaelis-Menten sabiti), enzim-substrat etkileşimlerini tanımlayan sabit bir sayıdır; maksimum hızın yarıya ulaştığı noktada ki substrat konsantrasyonunun değerini gösterir ve enzim konsantrasyonundan bağımsız bir değerdir. K_m değeri, reaksiyonun başlangıç hızını (V_o) substrat konsantrasyonunun ($[S]$) bir fonksiyonu kabul ederek hiperbolik grafik çizimiyle deneysel olarak ölçülebilir:

$$V_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

1. K_m substrat için enzim afinitesi hakkında bilgi verir. Bir enzimin K_m değeri düşük ise substrat için yüksek afiniteye sahiptir.
2. K_m değeri enzimler için karakteristiktir fakat farklı enzimler aynı K_m değerine sahip olabilmektedir.
3. K_m enzime etki eden inhibitörün etki şekli hakkında bilgi verir. Hiperbolik eğri denklemleri olan Michaelis-Menten denkleminde karakteristik noktaları belirlemek güç olduğu için genellikle bu eğri yerine doğrusal eğri grafikleri kullanılmaktadır. Doğrusal eğri grafiklerinden Michaelis-Menten denkleminin ters çevrilerek çarpanlara ayrılması sonucu elde edilen Lineweaver-Burk denklemi en yaygın kullanılan doğrusal denklem grafiğidir.



$$V_o = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}[S]}$$

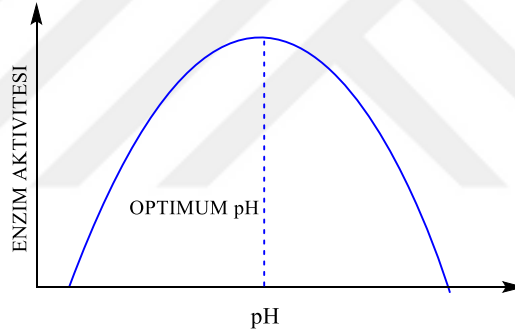
$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]}$$

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{[1]}{V_{max}}$$

Şekil 1.4. Lineweaver-Burk denklemi ve grafiği

1.2.4.c. pH

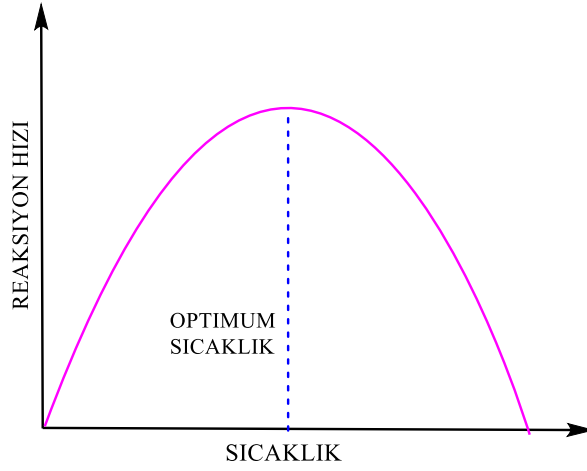
Enzimlerin aktif bölgeleri, substratları ve koenzim molekülleri iyonlaşabilen asidik ve bazik gruplara sahiptirler. Dolayısıyla enzimlerin aktiviteleri yapılarındaki amino asitlerin ve substratların yapılarındaki H^+ iyonu konsantasyonuна bağlı olarak değişir. İyon yüklerindeki değişiklikler substratın bağlanmasını ve reaksiyonun gerçekleşme oranını etkiler. pH değişimi enzimin aktif bölgesinin iyonizasyonunu değiştirerek, substrat moleküllerinin çözünürlüğünü etkiler. Enzimin aktivitesinin maksimum olduğu noktaya optimum pH denir, enzimin aktivitesini uzun süre koruduğu pH aralığına ise stabil pH denilmektedir. Genel bir gösterim olarak pH-hız grafiği çan eğrisi şeklindedir (Martin and Bucke 1990; Buchholz *et al.* 2005; Pandey 2006).



Şekil 1.5. Enzim kataliz reaksiyonları üzerine pH etkisi

1.2.4.d. Isı veya sıcaklık

Enzimatik reaksiyonun hızının maksimum olduğu sıcaklık değerine optimum sıcaklık denir. Sıcaklık artışıyla enzimatik reaksiyonun hızı; sıcaklık belli bir değere ulaşıncaya kadar devam eder; sıcaklık değeri yükseldikçe enzim denatüre olur ve aktivitesini kaybeder. Enzimler saf halde yüksek sıcaklıklarda daha çabuk denatüre olurlar (Ası 1999; Buchholz *et al.* 2005; Pandey 2006; Aehle 2007).



Şekil 1.6. Sıcaklık değişiminin enzimler üzerinde ki etkisi

1.2.4.e. Zamanın enzimatik reaksiyonların hızı üzerine etkisi

Enzim reaksiyonu sonucu açığa çıkan ürünlerin kendi aralarında bağlar kurarak tersinir reaksiyonlara yol açmaları, enzimin farklı etmenlerden dolayı zamanla denatüre olması, enzim inhibisyonuna neden olacak artık ürünlerin oluşması ve substratın tükenmesi gibi nedenlerden dolayı enzim tarafından katalizlenen bir reaksiyonun hızı, zamanla azalmaktadır. Bu sebeplerle enzimlerle yapılacak ölçümler, çoğu kez substratın yaklaşık %10 kadarının kullanıldığı reaksiyonun başlangıç kısmında yapılır (Ası 1999; Aehle 2007).

1.2.4.f. İyonların enzimatik reaksiyonların hızı üzerine etkisi

Bazı enzimler aktif forma dönüşebilmek için metal iyonlarına ihtiyaç duymaktadır. Metal iyonları, genellikle karbonil bağlarda ki elektronlarla veya alkollerdeki oksijen moleküllerinin taşıdığı elektronlar gibi elektron çiftleriyle kompleks oluşturup enzimlerin fonksiyonel grubunu polarize ederek ve yönlendirerek katalitik fonksiyonlarını yerine getirirler. Metal iyonlarının yapısal fonksiyonlarında bulunmaktadır (Aehle 2007; Geçkil 2012).

Metal iyonlarının enzimatik katalizasyonda üstlendikleri roller beş mekanizmada özetlenebilir:

- 1) Metal iyonları enzimlerde komformasyonel değişikliklere neden olurlar. Aktif formda ki tersiyer veya kuarterner yapının devamını sağlarlar. Enzime herhangi bir metalin eklenmesi durumunda enzim aktivitesini kaybederek inaktif forma dönüşebilir.
- 2) Metalloenzimlerdeki metal iyonları, enzim katalizasyonuna doğrudan katılırlar.
- 3) Bir enzim, metal ile enzim-metal kompleksi (EM) oluşturup substrata bağlanabilir ve oluşturdukları EMS kompleksi üzerinden ürün oluşumuna katılır.
- 4) Bir metal ürün ile kompleks oluşturarak ürünün tekrar substrata dönüşümünün önüne geçip reaksiyonun hızını yükseltebilir.
- 5) Bir enzim için esas substrat metal-substrat kompleksi (MS) olabilir; enzim ancak MS kompleksine bağlanabilir.

1.2.5. Enzim inhibisyonu

Enzim inhibisyonu, enzimatik bir tepkimenin hızının inhibitör adı verilen bazı maddeler tarafından azaltılması veya tamamen durdurulması olayıdır. Enzimin yapısının parçalanmasına neden olan inhibitörlere irreversibl (dönüşümsüz) inhibitörler ve inhibitörün etkisi ortadan kalkınca enzim aktivitesinin tekrar kazanması ile sonuçlanan reversibl (geri dönüşümlü) inhibitörler olmak üzere inhibitörlerin iki farklı türde etkileri bulunmaktadır (Ası 1999; Pandey 2006).

1.2.5.a. İrreversibl (dönüşümsüz) enzim inhibisyonları

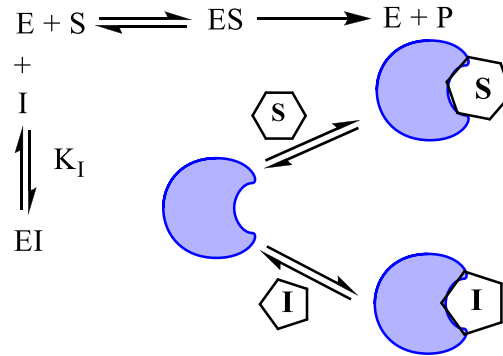
İrreversibl enzim inhibisyonu, bir irreversibl inhibitörün, enzim üzerinde bulunan ve aktivite için esas olan bir fonksiyonel grubu parçalaması veya onunla geri dönüşümsüz olarak birleşmesi sonucu oluşur.

Geri dönüşümsüz inhibüsyonlar Michaelis-Menten prensiplerine uymaz. İrreversibl inhibüsyon çoğunlukla enzimin normal kinetik reaksiyonlarına göre daha yavaş başlar ve tam bir inhibüsyon oluşmaz, fakat inhibisyon etkisi zamanla sürekli olarak artar. (Bisswanger 2002; Geçkil 2012).

1.2.5.b. Reversibl (dönüşümlü) enzim inhibisyonları

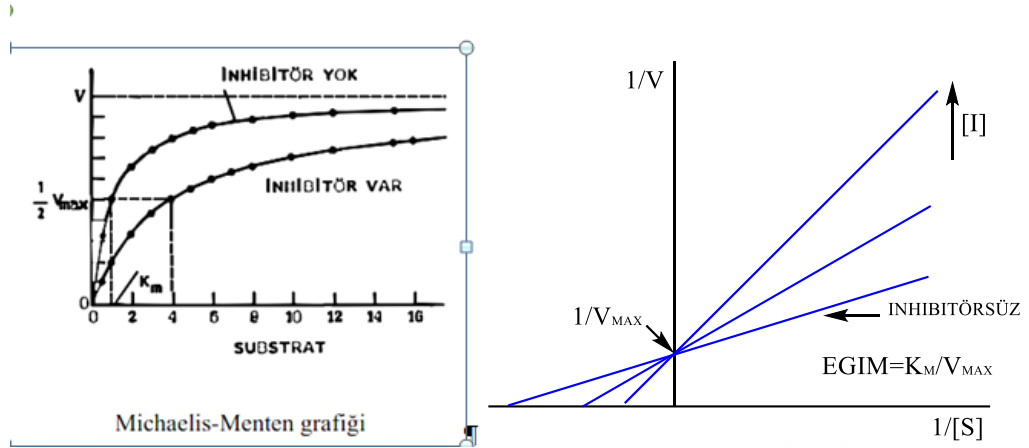
1. Kompetitif (yarışmalı) enzim inhibisyonu

Kompetitif enzim inhibisyon sisteminde inhibitör enzimin aktif bölgesine substrattan önce bağlanmaya çalışır. Enzimin fonksiyonel bölgesine inhibitör bağlanması sonucu enzim substrat birleşimi gerçekleşmez. Kompetitif enzim inhibisyonunda inhibitör madde, enzimin substratına olan ilgisini azaltır. Yarışmalı inhibitör, yapısal olarak substrata benzeyen ve substrat gibi, enzime reversibl bağlanma özelliği gösteren bileşiklerdir (Marangoni 2003).



Şekil 1.7. Kompetitif enzim inhibisyonunda enzim-substrat ilişkisi

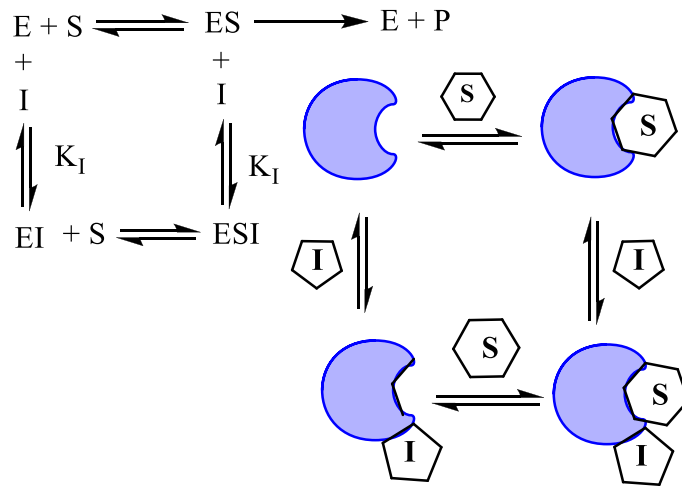
Kompetitif enzim inhibüsyonda maksimum hız değişmez, K_m artar (Gonze and Kaufman 2013).



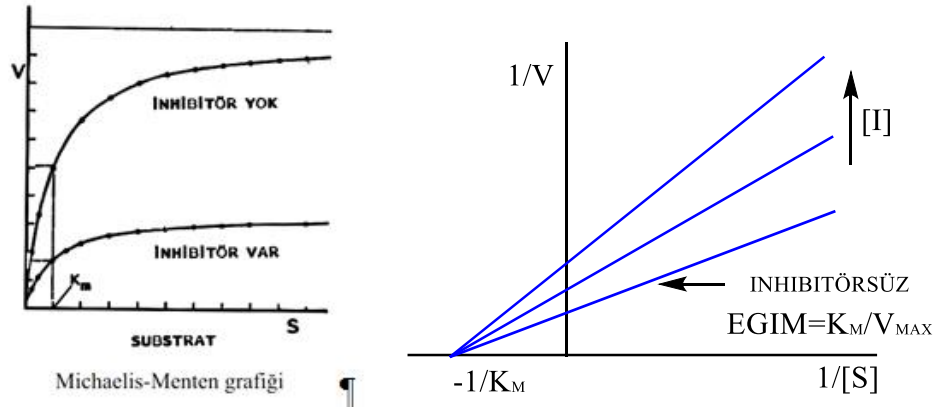
Şekil 1.8. Kompetitif enzim inhibisyonunun Lineweaver-Burk ve Michaelis-Menten grafiği

2. Nonkompetitif (yarışmasız) enzim inhibisyonu

Nonkompetitif enzim inhibisyonunda, yarışmasız inhibitör, enzimin aktif bölgesi dışında bir bölgeye bağlanarak enzimi dönüşümsüz olarak inaktive eder. Inhibitörün enzime bağlanması substratın bağlanmasını önlemez ancak enzim-substrat kompleksinin ürün ve enzime ayrışmasını önler (Marangoni 2003; Geçkil 2012).



Şekil 1.9. Nonkompetitif enzim inhibisyonunda enzim-substrat ilişkisi

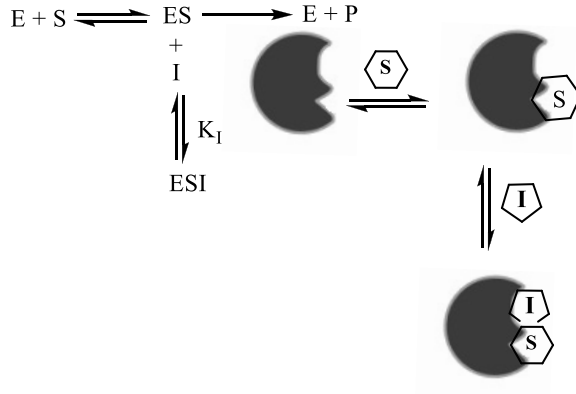


Şekil 1.10. Nonkompetitif enzim inhibisyonunun Lineweaver-Burk ve Michaelis-Menten grafiği

Nonkompetitif enzim inhibisyonunda V_{max} değeri belirgin düzeyde düşer; bu tür enzim inhibitörleri K_m değerini çok az oranda etkiler ya da hiç etki göstermez bu nedenle K_m değişmez (Ası 1999; Geçkil 2012).

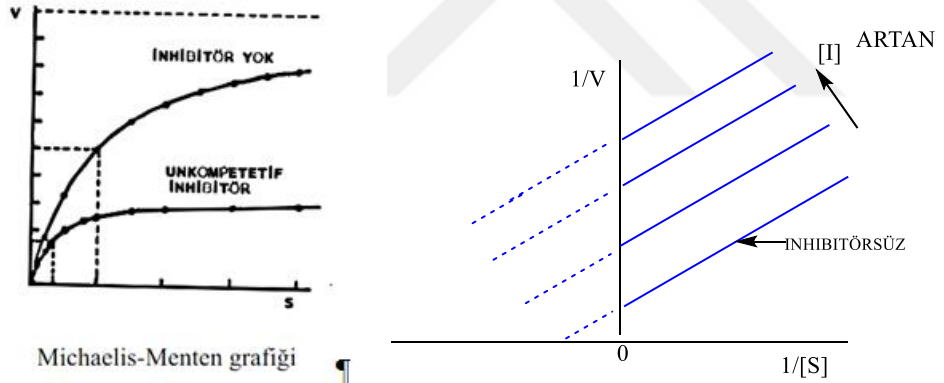
3. Unkompetitif (Yarı yarışmalı) enzim inhibisyonu

Enzim molekülüne yarı yarışmalı bir inhibitörün bağlanmasıyla meydana gelen enzim inhibisyonudur. Nonkompetitif inhibitör reaksiyonunda olduğu gibi unkompetitifli enzim inhibisyonunda inhibitör enzim üzerinde substratın bağlandığı aktif bölgenin dışında bir yere dönüşümlü olarak bağlanır; farklı olarak nonkompetitif inhibitör serbest enzime veya enzim-substrat kompleksine bağlanırken unkompetitif inhibitör, ES kompleksi oluşuktan sonra reversibl olarak bağlanıp enzimi inaktive eder. Unkompetitif inhibitör, ES konsantrasyonunu azaltır (Ası 1999; Purich 2010).



Şekil 1.11. Unkompetitif enzim inhibisyonunda enzim-substrat ilişkisi

Yarı yarışmalı inhibüsyon sisteminde V_{max} değeri azalırken K_m değeri küçülür (Ası 1999; Geçkil 2012).



Şekil 1.12. Unkompetitif enzim inhibisyonunun Lineweaver-Burk ve Michaelis-Menten grafiği

1.2.6. Enzim immobilizasyonu

Enzim immobilizasyonu terimi enzimlerin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel ya da kimyasal olarak bağlanarak, bir matris veya mikrokapsüllerde enzim moleküllerinin tutuklanması, yerleştirilmesi veya hapsedilmesinin yanında katalitik aktivitelerinin de korunması, bu sayede tekrarlanabilir ve sürekli uygulanabilir olması anlamına gelmektedir (Telefoncu 1997; Palmer 2007; Doğan 2008).

Serbest halde enzimin aktivitesini kaybetmeden endüstriyel alanlarda tekrar kullanılması zorluk teşkil etmektedir. Serbest enzimle yapılan çalışmalarda enzimin istenildiği anda ortamdan uzaklaştırılması ve istenilmeyen yan ürünlerin oluşumunu kontrol etmek oldukça zordur. Saf halde bulunan enzimin tekrar kullanılması için yeniden elde edilmesi gerekmektedir. Bu ve benzeri sorunları ortadan kaldırmak için enzim immobilizasyonu teknikleri geliştirilmiştir.

İmmobilize enzimin serbest enzime göre üstünlükleri;

- Enzimlerin yarılanma ömrünü (raf ömrünü) uzatır.
- Organik çözücülerde enzimin kararlılığını korur.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.s.) karşı enzim aktivitesini ve karalı yapısını devam ettirir.
- Uzun süreli, sürekli işlemlere birkaç kez uygulanabilir.
- Serbest enzime göre daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Reaksiyon sonunda süzme, santrifüjleme, çöktürme gibi yöntemlerle ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir probleme yol açmadan ortamdan kolayca uzaklaştırılabilirler.

İmmobilize enzimin dezavantajları;

- Uygun immobilize yöntemin seçiminin zor olması,
- İmmobilizasyon sırasında katalitik aktivitenin kaybolması,
- Katalizör ve taşıyıcının fiziksel ve kimyasal olarak birbirinden ayrılmış olması,
- İmmobilizasyon işlem süresinin uzun olması,
- Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzimin kararlılığını koruyamaması,
- Taşıyıcı materyallerin maliyetinin yüksek olması

1.2.6.a. Enzim immobilizasyonunun tarihçesi

İmmobilize enzimin tarihçesi 19. yüzyılda mikroorganizmaların sirke üretiminde kullanılması, atık sularda damlama yöntemi ile mikrobiyal filtre geliştirme ve atık suları saflaştırma gibi endüstriyel alanlarda kullanılmak amacıyla yapay ortamlara enzimlerin tutturulması ile başlamıştır (Brena and Viera 2006). İmmobilize enzim terimi ilk defa 1971 yılında Enzim Mühendisliği Konferansında kabul edilmiştir.

Enzim immobilizasyonu ilk olarak (1916–1940) Nelsen and Griffin (1916), odun kömürü üzerine adsorbe edilmiş maya invertaz enziminin sukroz disakkaritlerin hidrolizini katalizleyebildiğini gözlemlemeleriyle başlamıştır. İlerleyen çalışmalarda çoğunlukla cam, alumina gibi basit inorganik taşıyıcılar üzerine ya da hidrofobik etkileşimlerle tutturulmuş cam yüzeylere adsorpsiyon yoluyla proteinlerin izolasyonu için adsorban hazırlamak amacıyla biyo-immobilizasyon teknikleri kullanılmıştır.

Enzim immobilizasyonunun gelişme döneminde fiziksel adsorpsiyon yöntemleri ile enzim ve proteinler katı taşıyıcılara bağlanması sağlanmıştır. 1953 yılında Grubhofer ve Schleith'in karboksipeptidaz, diastaz, pepsin ve ribonükleaz gibi çeşitli enzimleri diazolanmış poliaminostiren reçinesi üzerine kovalent bağlanmayla immobilize etmelerine kadar immobilizasyon pratikte kullanılmamıştır. Daha sonra 1956 yılında Mitz, katalaz enzimini DEAE-selüloz üzerine iyonik bağlanmayla immobilizasyonunu gerçekleştirilmiştir. 1955-57 yılında α -amilaz enziminin aktif karbon, bentonit ve kile tutturulması, AMP deaminaz enziminin silikaya, kemotripsinin kaolinite adsorpsiyon yöntemi ile bağlanması (Dickey 1955; McLaren 1957; Metz and Schuster 1959) sağlanmıştır. 1960 yılından sonra artık fiziksel adsorpsiyonlar yerine uzun süreli kovalent olmayan bağlanma yöntemleri ve tutuklama yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca yarı geçirgen küresel membranlar, sentetik polimerler (PVA (polyvinyl alcohol), PAAm (polyacrylamide gel), Naylon, Polisistrin, nitroselüloz, nişasta, silikon gibi doğal polimerler üzerine absorblama teknikleri ve film ve membranlarla ya da kurşunlu boncuklara enzimlerin tutturulması çalışmaları yapılmıştır (Kent and Slade 1960; Brown *et al.* 1968; Haynes and Walsh 1969). Aynı

yıllarda Tripsin, papain, amilaz ve ribonükleazın ve poliakrilamid jel içine tutuklanması (Bernfeld and Wan 1963), karbosipeptidaz A'nın glutaraldehitte çapraz bağlanması (Quioco and Richards 1964) ve karbonik anhidraz enziminin mikrokapsüllenmesi çalışmaları yapılmıştır (Chang 1964). 1970'li yıllarda kovalent bağlama, adsorbsiyon, tutuklama, enkapsülasyon tekniklerinin yanı sıra afinite bağlanma ve koordinasyon bağlama immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir. Örneğin bu dönemde enzimler monomerler halinde çift katlanarak kopolimerizasyon yöntemi ile jel matrikslere tutturularak yapay enzimler oluşturulmuş ve enzimlerin kararlı yapısını koruması sağlanmıştır (Beaucamp *et al.* 1972). 1971 yılında Gregoriadis tarafından amiloglukozidaz enzimi tutuklanmış lipozomlar yapılmış, 1973 yılında Chibata ve arkadaşları mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonunu sağlayarak endüstriyel alanlarda ilk uygulamaları gerçekleştirmiş, poliakrilamid jele tutuklanmış, yüksek aktivitede aspartaz içeren E.coli hücreleri ile amonyum fumarattan L-aspartat üretiminde kullanılmıştır.

1980'li ve 1990'lı yıllarda immobilize enzimlerin organik çözücüler] içinde katalitik olarak aktif ve kararlı yapıda kalması ve sulu ortamlarda gerçekleştirilemeyen enzim reaksiyonlarının oluşması sağlanmıştır (Zaks and Klivanov 1985; Klivanov 1997). Örneğin, doğal olmayan koşullarda çoklu amaçlar için güçlendirilmiş basit yapılı kafes sistemleri, sandviç kompleksleri gibi destek ortamlarına enzimler immobilize edilerek enzimler biyokatalitik yapılarının korunması sağlanmış (Lee *et al.* 1986), tabaka-tabaka kovalent kombinasyon teknikleri ve çapraz bağlama yöntemleri kullanılarak enzimler daha güçlü bağlarla yüklenerek yüksek stabilitede kristal enzimler oluşturulmuş ve özellikle organik çözücüler içinde bu kristal enzimler biyotransformasyon işlemlerinde biyokatalizör olarak kullanılmıştır (Hagerdal 1986).

1.2.6.b. İmmobilizasyon yöntemleri

1. Çözünmez formda immobilizasyon

1.1. Bağlama: Çapraz bağlama

Enzim kopolimerizasyonu

Taşıyıcıya bağlama: Adsorbsiyon

Fiziksel bağlama

İyonik bağlama

Şelat bağlama

Kovalent bağlama

Biyospesifik(Afinite) bağlama

1.2. Tutuklama: Jelde tutuklama

Mikrokapsülleme

Lipozom tekniği

2. Çözünen formda immobilizasyon: Ultrafiltrasyon Hollow-fiber Membranlar

1. Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri

a. Bağlama Yöntemleri

1. Çapraz bağlama

Çapraz bağlama yöntemi enzimlerin iki ya da çok fonksiyonlu reaktifler aracılığıyla serbest amin ve karboksil gruplarıyla veya aktif molekülleri ile bağ kuracakları protein moleküllerine ya da çözünmeyen bir taşıyıcı üzerindeki fonksiyonel gruplara, kovalent bağlarla üç boyutlu çapraz bağlanarak suda çözünmeyen kompleksler oluşturması yöntemidir (Sheldon *et al.* 2007; Shah *et al.* 2007).

Proteinlerin çözünmeyen taşıyıcıya çapraz bağlanmasıyla enzimin substrat çözeltisinde kaybolması önlenir. Biyokatalitik birimler kloroformat ve karbonilimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, p-benzokinon, geçiş metal iyonları, epiklorohidrinler, glutardialdehid, glutaraldehid, diizosiyanat, heksametilen diizosiyanat, toluen diizosiyanat gibi iki ya da çok fonksiyonlu reaktifler yardımıyla

kendi aralarında çapraz bağlar yaparak enzimlerin sabit materyale bağlanması sağlanır (Honda *et al.* 2006; Wang *et al.* 2008).

Çapraz bağlanma ile enzimlerin immobilizasyonunun uygulanabilirliği kolay olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için oluşturulması gereken koşulların seçimi ve kurulması zordur (Jansen *et al.* 1979). Bu yöntemde enzim aktivitesi reaksiyon süresi, pH, sıcaklık, iyonik şiddet, çapraz bağlanma için kullanılan materyalin konsantrasyonu ve yapısı ayrıca enzim konsantrasyonu ve yapısı gibi faktörlere ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır. Enzimin çapraz bağlanması genelde lizinin amino grupları aracılığı ile gerçekleşir. Ancak bazı durumlarda sisteinin sülfidril grupları, tirozinin fenolik OH grupları veya histidinin imidazol grupları da çapraz bağlanma yönteminde kullanılmaktadır (Margolin *et al.* 2001).

Çapraz bağlama yöntemleri doğrudan çapraz bağlama, CLEC: Çapraz bağlı enzim kristali (Cross-linked enzyme crystal), CSDE: Çapraz bağlı püskürtülerek kurutulmuş enzim (Cross-linked spraydried enzyme) ve CLEA çapraz bağlı enzim agregatları olmak üzere beş farklı şekilde uygulanmaktadır.

2. Enzim kopolimerizasyonu

Enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranarak matrikse bağlanmaktadır. Bu yöntem polimer matrikste tutuklanma tekniğine benzer fakat enzimin matrikste tutulması ve kaçışının önlenmesi gibi üstünlükleri bulunmaktadır (Yıldırım 2010).

3. Taşıyıcıya bağlama

Taşıyıcıya bağlama: protein yapısında olan enzimlerin molekül yüzeylerinde taşıdıkları fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeleri ile destek materyallerine bağlanması tekniğidir. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcı

materyaller doğal veya sentetik yapıda üretilmiş organik ve inorganik materyallerden seçilir. Enzimler ayrıca boncuklar, lifler (elyaf), filmler, membranlar ve kapalı kapsüller gibi farklı matriksler üzerine immobilize edilebilir (Twyman 2005). İdeal bir destek materyali genel olarak; basınca karşı dayanıklı, hidrofilik ve gözenekli yapıda olma, enzimin seçiciliğini artırma, biyolojik uyumluluk, mikrobiyal saldırılara karşı dirençli olma, düşük maliyet, mekanik kararlılık ve uygun tanecikli yapıda olma, kimyasal ve termal kararlılık gösterme, antitoksik ve yeniden kullanılabilme gibi özelliklere sahip olmalıdır (Buchholz ve Klein 1987; Jegannathan *et al.* 2008).

Enzim immobilizasyonda kullanılan taşıyıcılar;

1. Organik taşıyıcılar

Doğal polimerler

- Karbon
- Proteinler, kollojen, albümin, jelatin, ipek
- Polisakkaritler, selüloz, dekstranlar, agar, agaroz, kitin, alginat, nişasta ve kitosan

2. Sentetik Polimerler

- Polistiren
- Diğer polimerler: poliakrilat polimetakrilatlar, poliakrilamidler, poliamitler, vinil ve allil polimerler, naylon mebranlar, oksironlar, metakrilat, iyon değiştirici reçineler, maleik anhidrit polimerleri

3. İnorganik taşıyıcılar

Doğal mineraller: Bentonit, silikajel, hidroksiapatik, zirkonyum dioksit, pomza taşı, nikel oksit, aktif karbon

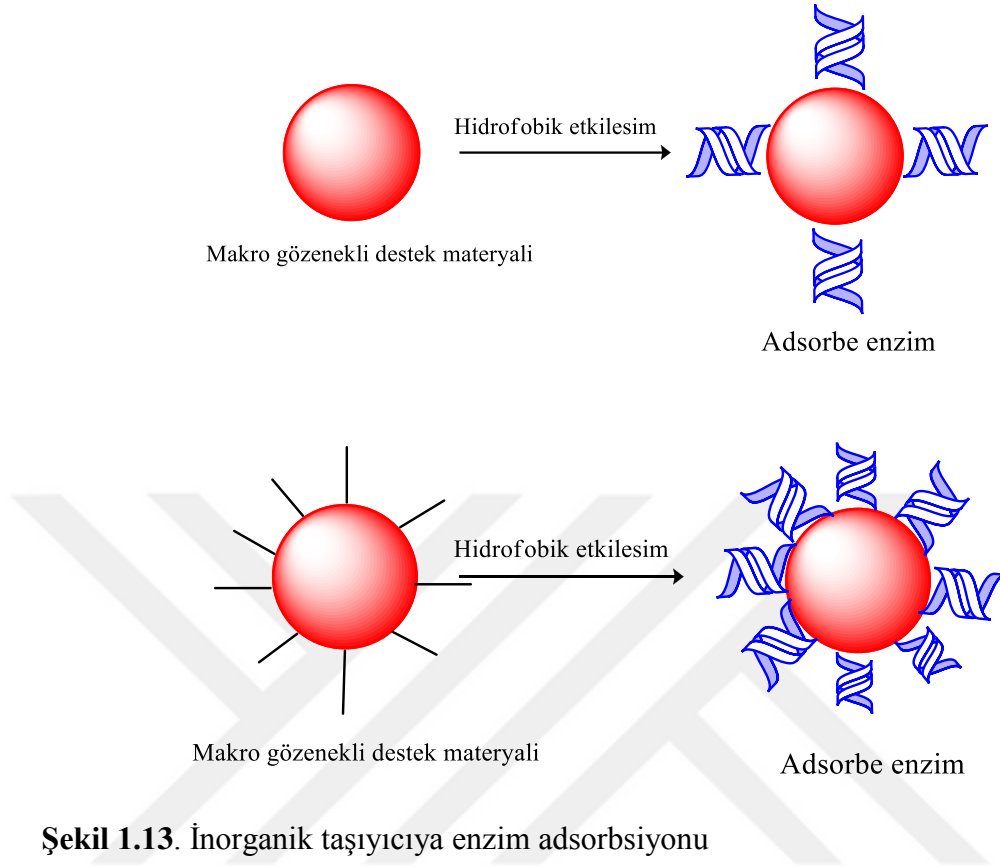
İşlenmiş malzemeler: Camlar (porsuz ve porlu), Metaller, Gözenekli metal oksitler

1. Adsorbsiyon

Bu yöntem; yüzey aktif suda çözünmeyen bir adsorbanın (aktif karbon, gözenekli cam, silikajel, CaCO₃, nişasta, gluten, diatome toprağı, kül, kollodyum, bentonit, hidroksiapatit ve kalsiyum fosfat gibi), enzim çözeltisi ile uygun koşullarda inkübasyona bırakılarak, enzim ile adsorbsiyon özelliklerine sahip bir yüzey aktif taşıyıcı arasında oluşacak hidrofobik bağlanma, van der Waals kuvvetleri, iyonik ve hidrojen bağ etkileşimleri gibi elektrostatik kuvvetler sonucu enzimin bağlanması ve sonrasında tutunmamış enzimin fazlasının iyice yıkanarak uzaklaştırılması esasına dayanır (Nelson and Griffen 1916; Klivanov 1997). Adsorpsiyon tekniğı basit ve uygun taşıyıcı kullanıldığı durumlarda ucuz bir metod olduğu için immobilizasyon tekniklerinde yaygın olarak kullanılır.

Fiziksel adsorpsiyon ile immobilizasyon yönteminde enzimin aktif merkezinin yapısında ve enzimde konformasyonel değişiklikler nadiren oluşmaktadır. İşlem sırasında enzimin aktivitesini kaybetmemesi ve optimum adsorpsiyon koşullarının sağlanabilmesi için uygun çözücü kullanılmalı, sıcaklık, enzim konsantrasyonu, adsorbant konsantrasyonu, pH ve iyon konsantrasyonları kontrol edilmelidir (Kumakura *et al.* 2003).

Fiziksel adsorpsiyon da taşıyıcı materyalin yüzey kimyasına bağlı olarak enzim denatürasyona uğrayabilir. Taşıyıcı ve enzim arasındaki non-kovalent etkileşim yeteri kadar büyük değilse desorpsiyon ile enzim ortama geçebilir ve reaksiyonda ürün kirlenmesine neden olur (Klivanov 1997).



Şekil 1.13. İnorganik taşıyıcıya enzim adsorbsiyonu

2. İyonik bağlanma

İyonik bağlanma metodu enzimin suda çözünmeyen ve iyon değiştirici kalıntıları içeren bir taşıyıcıya iyonik bağlanması esasına dayanmaktadır. İyonik bağlamada genellikle organik desteklerden yapılan iyon değiştirici reçineler, organik (seluloz, dekstran) ve inorganik (silika) destek maddeler ile iyon değiştirici kalıntılarından türeyen iyon değiştirici merkezleri bulunan polisakkaritler ve sentetik polimerler taşıyıcı materyaller olarak kullanılmaktadır. Taşıyıcılar, iyon değiştirici kalıntılarına bağlı olarak anyonik veya katyonik değiştiriciler olarak adlandırılmaktadır (Jegannathan *et al.* 2008).

İyonik bağlama yönteminde fiziksel adsorpsiyon yöntemine göre enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ, iyonik bağlamada çok daha kuvvetlidir. İyonik bağlama optimum koşullarda gerçekleştiğinden enzimin yapısında ve aktif merkezde değişikliğe neden

olmaz. Fakat enzim ile destek arasındaki bağ kovalent bağ kadar g¼c¼l¼ olmadığından enzim kaçışı s¼z konusudur (Kumakura *et al.* 2003; Shah *et al.* 2006).

3. Biyospesifik (Afinite) bağlama

Aktifleştirilmiş taşıyıcı ve protein y¼zeyinde bulunan spesifik gruplar arasında biyoafinite bağların oluşuması ile ger¼ekleřir. Biyoafinite bağları enzim immobilizasyonu, protein dizisinin belirli pozisyonunda bir afinite kuyruğu kullanılarak elde edilir ve bu protein katlanması veya aktivitesini etkilemez (Andreescu *et al.* 2006). Afinite bağlama y¼nteminde ama¼ enzim ve immobilize ligand arasında ¼zel elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerle immobilize edilecek enzim ya da proteinin se¼ici ve sıkı bir durumda bağlanmasını sağlamaktır. Ligand k¼c¼k bir molek¼l veya antikor gibi b¼y¼k proteinler olabilmektedir (Linquiu 2005).

Spesifik affinite etkileşimler ile enzim immobilizasyonun ger¼ekleřmesi i¼in se¼ilecek taşıyıcı biyouyumlu ve gerekli fonksiyonel gruplara sahip olması ve bağlanacak proteinin hedef b¼lgesini tanınması i¼in proteinin ve enzimin aktif b¼lgelerinin işlevselleştirilmesi gerekmektedir (Andreescu *et al.* 2006).

4. Metal veya şelat bağlama

Organik taşıyıcıların y¼zeyinde bulunan ge¼iř metal tuzları veya hidroksitler matriksler ¼zerindeki n¼kleofilik gruplara koordinasyon yoluyla enzim immobilizasyonunun ger¼ekleřtirilmesi y¼ntemidir. Metal bağlama y¼nteminde taşıyıcı olarak genellikle titanyum ve zirkonyum tuzları veya bunların hidroksitleri kullanılmaktadır (Cabral *et al.* 1986; Cabral *et al.* 1991). Metalin tuzları veya hidroksit formu sel¼loz, kitin, alginik asit, silikat gibi destek y¼zeylerine ısıtma veya n¼tralizasyon y¼ntemi ile ¼¼kt¼r¼lerek metalin tuzların enzimle koordinasyonunu sağlamak amacıyla kullanılacak metal tuzları uygun pozisyona getirilir. Y¼ntemin uygulanması basittir ve immobilize edilmiş enzimlerle elde edilen spesifik aktiviteler nispeten y¼ksektir. Bununla birlikte elde edilen sonu¼lar değişken olduğundan

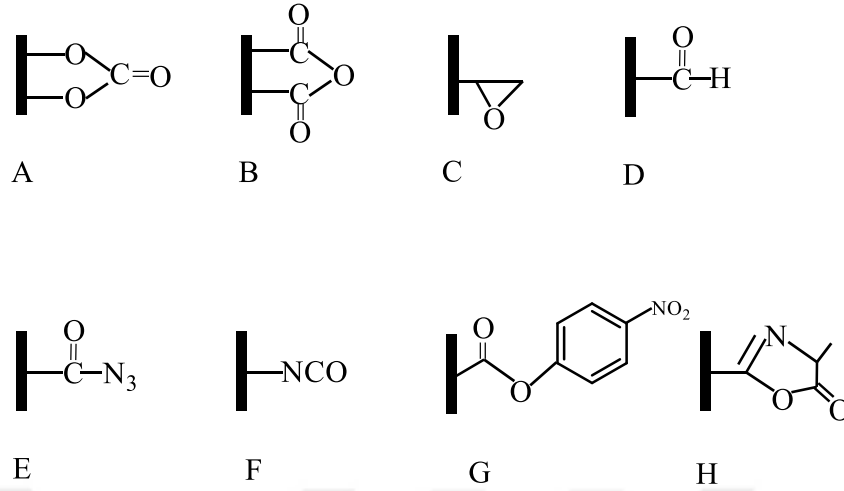
yöntemin tekrar edilebilirlik oranı düşüktür. Metalin destek yüzeyinden kaçmasından dolayı immobilize enzimin operasyonel stabilitesi değişkendir (Kagedal 1998; Brena *et al.* 2006).

Şelatla bağlama yönteminde adsorpsiyon bölgelerinin oluşumunun kontrolünü sağlamak için şelatlayıcı ligandlar, kararlı kovalent bağlar aracılığıyla katı taşıyıcılar üzerine immobilize edilerek metal iyonlarının koordinasyon yoluyla bağlanması ve proteinlerin tutulması için kararlı kompleksler oluşturulması sağlanmış olur. Bu yöntem protein kromatografisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kagedal 1998).

5. Kovalent bağlama

Taşıyıcıya kovalent bağlanma yönteminde enzim zincirindeki amino asitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden bağlanma gerçekleşir. Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir (Telefoncu 1997; Öztürk 2006).

Taşıyıcı materyale enzimin kovalent bağlanması taşıyıcının özel reaktiflerle aktifleştirilmesi ve ardından enzimin kovalent bağlanmasının sağlanması aşamalarından oluşmaktadır. Kovalent bağlamada en sık kullanılan fonksiyonel gruplar karboksil (COOH) grupları (aspartik asit ve glutamik asit), amino (NH₂) grupları (lizin, histidin, arginin), sülfidril (SH) grupları (sistein) ve hidroksil (OH) grupları (serin, treonin ve tirozin) sayılmaktadır (Chae *et al.* 1998; Quirk *et al.* 2001; Yang *et al.* 2003). Taşıyıcı materyalde bulunan fonksiyonel grupların yapısına bağlı olarak siyanojen bromür, karbodiimit, aminoalkiledoksisilan, glutaraldehit, epiklorhidrin gibi özel reaktifler kullanılabilir (Costa *et al.* 2004; Mateo *et al.* 2007).



Şekil 1.14. Kovalent bağlanmada sıklıkla kullanılan fonksiyonel grupların şematik gösterimi

(A: Karbonat, B: Anhidrit, C: Epoksit, D: Aldehit, E: Açılazid, F: İzosiyanat, G: Karboksilli asit fenil ester, H: Lakton)

Kovalent bağlanma yönteminde kullanılacak taşıyıcı mekanik kararlılığa sahip suda çözünmeyen fakat büyük ölçüde hidrofobik karakteri düşük hidrofilik yapıda olmalıdır. Hidrofilik özelliği yüksek olan polisakkarit polimerleri enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılır. Bu amaçla selüloz, dekstran, nişasta ve agaroz taşıyıcıları yaygın kullanılmakta ayrıca taşıyıcı olarak gözenekli silika ve cam da kullanılmaktadır, ancak bunların hidrofilik özelliği polisakkarit polimerlerinden daha düşüktür. Bu tür taşıyıcıların seçiminde ayrıca enzim-taşıyıcı bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmamasının yanında taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözücülere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımaya dikkat edilmelidir (Öztürk 2006; Yıldırım 2010).

Kovalent bağlanmada enzimin aktif merkezi ve konformasyonel yapısı değişiklik göstermekte ve buna bağlı olarak enzimin aktivitesi düşmektedir. Aktivite kaybını önlemek için enzimin katalitik aktivite gösteren grupları dışındaki fonksiyonel gruplarının taşıyıcıya bağlanması sağlanmalıdır. Enzimin katalitik fonksiyonel gruplarının taşıyıcıya bağlanması sonucu aktivite kaybını önlemek için;

- 1) Enzim immobilizasyonu sadece doymuş substrat konsantrasyonunda yarışmalı inhibitör kullanılarak gerçekleştirilmesi sağlanır.
- 2) Tersinir, kovalent olarak bağlanmış enzim-inhibitör kompleksi kullanılmalıdır.

b. Tutuklama (entrapment, hapsedme) yöntemleri

Tutuklama yönteminde enzim molekülünün kimyasal veya fiziksel yollarla herhangi bir taşıyıcıya bağlanmadan belirli bir ortamda tutulması, hapsedilmesi tekniğine dayanır. Tutuklama işlemleri sırasında enzim moleküllerinin polimer matris içindeki kafeslerde veya yarı geçirgen membranlar içinde veya mikrokapsülleme ve misellerde tutulması sağlanır (Telefoncu 1997; Naslıyan 2012).

Tutuklama metodunun en önemli avantajı, farklı yapıda birden fazla enzim, hücrenel organel ve farklı çaptaki mikroorganizmanın eş yöntemler kullanılarak aynı anda immobilizasyonunun yapılabilmesidir. Immobilizasyon sonucu enzimin modifikasyonlara uğramaması ve immobilizasyonun yüksek molekül ağırlıklı enzim inhibitörlerinin etkisini yok etmesi yöntemin avantajları arasında sayılmaktadır. Yüksek molekül ağırlıklı substratların hapsedilmiş enzimlerle etkileşime geçmelerinin zor olması, taşıyıcıların yenilenememesi ve aktive olmamış enzim moleküllerinin membran yüzeyine yapışıp reaksiyon çözeltisine geçişte azalmaya neden olmaları yöntemin dezavantajları arasında sayılmaktadır.

1. Polimer matrikste tutuklama yöntemi

Bu yöntem, çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması ve enzim moleküllerinin çapraz bağlama sonucu oluşan kafeslerde tutulması ve böylece ana çözeltiye geçmeleri önlenmesi esasına dayanmaktadır (Kocaturk 2008). Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamidlerdir. Kullanılan matriks tanecikli, membran veya iplikli yapıda olabilir. Bu yöntem için, enzim çözeltisi polimer çözeltisiyle polimerleşme gerçekleşmeden önce karıştırılır. Polimerleşme esnasında enzim molekülleri polimere bağlanmaz ama

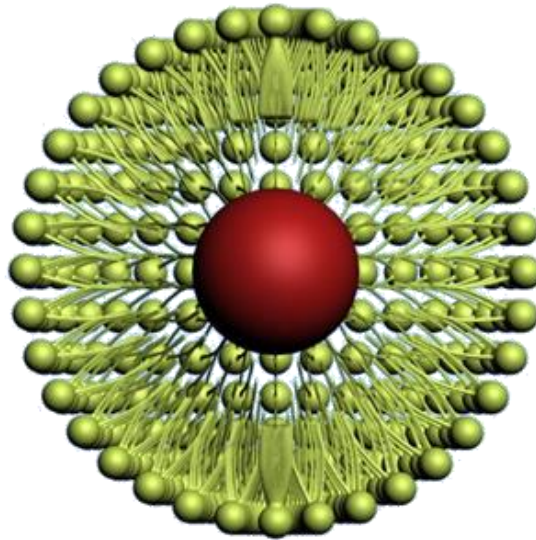
fiziksel olarak polimerin içinde kalır. Polimer matrikste tutuklama yönteminde enzime ve taşıyıcıya bağımlı olarak değişen optimal bir çapraz bağ yüzde oranı hesaplanarak uygulamaya başlanır. Böylece uygun çaplı substrat molekülleri polimer kafes içinde tutuklanmış enzim moleküllerine ulaşır ve reaksiyon ürünlerinin dışarı çıkması engellenmiş olur. Bu yöntem ile immobilize edilecek enzimin substratının küçük molekül olması gerekir. Yöntemin avantajları; uygulanmasının kolay olması, gerçek bir fiziksel yöntem oluşu ve çok az miktar enzimle gerçekleştirilmesidir. Yöntemin dezavantajları ise; immobilizasyon işlemi sırasında inaktivasyonun deney koşullarına çok sıkı bağımlı oluşu ve immobilize enzimin ancak küçük molekül substratlara karşı iyi bir aktivite göstermesidir (Cao 2005; Yıldırım 2010).

2. Mikroapsülleme yöntemi

Mikroapsülleme yöntemi, enzim moleküllerin küresel naylon, selüloz, polisülfon, poliakrilat gibi yarı geçirgen polimer membranlar içinde hapsedilme temeline dayanır (Costa *et al.* 2004). Mikroapsülleme yönteminde herhangi bir kimyasal bağlanma olmadığından enzim aktifliği serbest enzim aktifliğine yakındır (Cao 2005). Mikroapsülleme yöntemi ile yüzey-hacim oranı büyük oranda genişletilerek mikroapsül içerisinde enzim-substrat reaksiyonunun birleşme olasılığı artırılır. Yarı geçirgen membran gözenek çapları, büyük protein ve enzimlerin mikroapsül dışına çıkmasına engel olacak, küçük substrat ve ürünlerin serbestçe girip çıkmasına izin verecek şekilde seçilmelidir. Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu sürekli ve sürekli olmayan yarı geçirgen mikroapsüllerde tutuklama olmak üzere iki grupta incelenebilir. Sürekli mikroapsüllerde çerçeve membran katı, süreksiz mikroapsüllerde ise bir sıvı tabakadır. Immobilizasyonda kullanılan çerçeve maddesinin (membran) yarı geçirgen olması zorunludur (Özdemir 2010). Yöntemin en büyük dezavantajları mikroapsülasyon sırasında enzimin bazen inaktive olması, immobilizasyon için yüksek enzim konsantrasyonuna ihtiyaç duyulmasıdır (Costa *et al.* 2004; Özdemir 2010).

3. Lipozom tekniği

Sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanır. Bu immobilizasyon tekniğinde enzim yarı geçirgen bir zarla çevrelenerek enzime geniş bir hareket alanı sağlanır. Yarı geçirgen özellik gösteren oyuk elyaf membranları ve ultrafiltrasyon membranların kullanımı enzimlerin çözünür formda immobilizasyon yöntemlerinden biridir. Yöntemin en önemli avantajları; süresiz, dönüşümlü, hiçbir kimyasal bileşimin veya tekniğin kullanımını gerektirmeden son derece kolay bir yöntemle fiziksel olarak uygulanabilmesidir. Oyuk elyaf membranlar ile ultrafiltrasyon membranları enzimi geçirmediği için substrat ve ürünün geçişine izin verir. Ayrıca mikropların enzime ulaşmasını engelleyerek koruyucu etki gösterirler. Enzim desteğe herhangi bir bölgeden bağlanmadığı için moleküler geometrisi, esnekliği ve dolayısıyla katalitik etkinliği değişmez, aynı anda bir adımda birçok enzimin immobilizasyonuna olanak sağlar ve oldukça büyük bir kontakt yüzeyine sahiptir. Önemli sakıncaları ise; substrat ve ürünün membranda geçişinin çözünürlüğe bağımlı olması, işlem sırasında enzimin inaktif olması ve sıvı olan membrandan enzimin kaçma olasılığıdır (Regen *et al.* 1984; Çağdaş *et al.* 2014).



Şekil 1.15. Lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu

Çizelge 1.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması

Özellik	Kovalent bağlama	İyonik bağlama	Adsorbsiyon	Çapraz bağlama yöntemi
Hazırlanması	Zor	Kolay	kolay	Zor
Enzim aktivitesi	Yüksek	Yüksek	Düşük	Orta
Bağ gücü	Kuvvetli	Orta	Zayıf	Kuvvetli
Substrat spesifikliğı	Değişebilir	Değişmez	Değişmez	Değişebilir
Yenilenme	Mümkün değil	Mümkün	Mümkün	Mümkün değil
Genel uygulanabilirlik	Orta	Orta	Düşük	Yüksek
İmmobilizasyon masrafı	Yüksek	Düşük	Düşük	Düşük
Enzimin Mikrobiyal Ataklara Karşı Korunabilmesi	Hayır	Hayır	Hayır	Mümkün
Kararlılık	Yüksek	Orta	Düşük	Yüksek

1.3. Endüstriyel Enzimler

Enzim kaynağı olarak bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalar ve funguslar bilinmektedir. Ancak son dönemlerde funguslardan elde edilen enzimlerin daha yüksek katalitik aktivite göstermeleri, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri sebebiyle bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kaynaklı enzimlere göre daha çok tercih edilmektedir (Onem *et al.* 2015). Ticari olarak kullanılan enzimlerin endüstriyel bir ürünün üretilmesinde bazı avantajlara sahip olması gerekmektedir. Buna göre, bir enzimin herhangi bir endüstri alanında kullanılabilmesi maliyet bakımından ucuz olması, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olması ve en önemlisi de enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmaması, yani güvenilir olmasına bağlıdır (Wiseman 1987).

Hidrolaz enzim grubunda yer alan hidrolitik aktiviteye sahip olan enzimler tüm endüstriyel enzimlerin yaklaşık %75'ini oluşturmaktadır. Proteaz grubundaki enzimler kullanımda ilk sırayı alırken, karbonhidrat polimerleri parçalayan enzimler ikinci sırada yer almaktadırlar (Hamilton *et al.* 1999; Bhat 2000). Karbonhidrat parçalayan enzimlerden amilazlar, enzim piyasasında yaklaşık %25'lik bir paya sahiptir (Sindhu *et al.*1997; Rao *et al.*1998). Endüstride meyve suyu durultma ve verim arttırmada pektin liyaz, mannanaz, ksilinaz ve selülaz enzimleride tek tek veya beraber kullanılmaktadır. Yine bitkisel yağ ekstraksiyonunda da belirtilen hidrolitik enzimler kullanılmaktadır. Yine kağıt hamuru beyazlatılmasında ksilanazların kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (Wainq and Ingworsen 2003). Dünya pazarı incelendiğinde endüstriyel enzimlerin 1.6 milyar dolarlık ticari pazar payına sahip olduğu tahmin edilmektedir. Bu enzimler sektörlere göre %29 gıda endüstrisi, %15 hayvan yemi sektörü ve %56 genel amaçlı teknik alanlar şeklinde dağılım göstermektedirler (Uhlig 1998). Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle endüstriyel enzimler ile ilgili yapılan çeşitli araştırmalar biyoteknolojide gün geçtikçe daha da önem kazanmaktadır.

1.4. Türkiye'de Meyve Suyu Üretimi

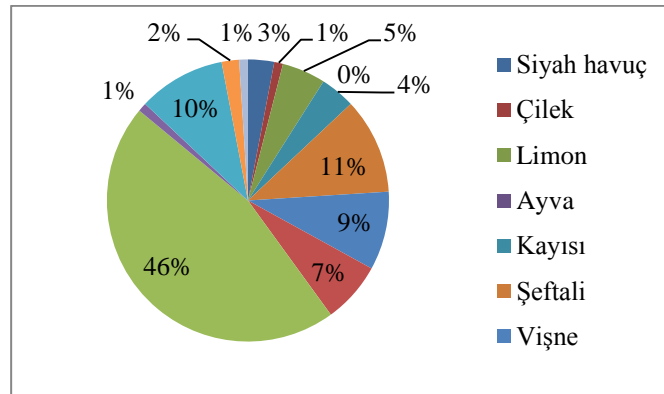
Amerika ve AB'de uygulanan sistemle aynı doğrultuda, ülkemizde de meyve suyu ve benzeri ürünler, Türk Gıda Kodeksi yönetmeliği gereğince içerdikleri meyve oranına göre 4 ana kategoriye ayrılmaktadır. Bunlar %100 meyve suyu, meyve nektarı, meyveli ve aromalı içeceklerdir (Akdağ 2011).

Limon, vişne gibi bazı meyvelerin tatları çok ekşidir ya da şeftali kayısı gibi çok yoğun kıvamlıdır. Bu sebepten dolayı bu gibi meyveleri %100 meyve suyu olarak tüketmek uygun değildir. Bu meyvelerin suları belirli bir miktar suyla seyreltilir ve tat dengesini korumak için şeker ilave edilir. Bu kategori meyve nektarı olarak isimlendirilmekte olup, nektarlara eklenmesine izin verilen şeker miktarı ve minimum meyve oranı yasal olarak yine Türk Gıda Kodeksince belirlenmiştir (Anonim 2016).

Türkiye’de yıllık 16.3 milyon ton meyve üretimi yapılmaktadır ve dünya üretiminde 6. sırada yer alarak, dünya meyve üretiminin yaklaşık %3’ünü karşılamaktadır. Türkiye, dünyada meyve üretiminde; kayısı ve vişne üretiminde birinci, nar üretiminde üçüncü, elma ve domates üretiminde dördüncü ve şeftali ile üzüm üretiminde ise altıncı sırada yer almaktadır.

Türkiye’de meyve suyu işlenmesinde kullanılan başlıca meyveler ise; elma, kayısı (zerdali dahil), şeftali, vişne, portakal, üzüm ve nardır. Ancak son dönemde hem Türkiye tarımsal üretimindeki, hem de meyve suyu sanayisindeki gelişmelere paralel bahsedilen meyvelere ek olarak havuç, limon, üzüm, çilek, ayva, domates, armut, mandalina, kuşburnu, karadut gibi meyvelerin de suları üretilmektedir (Anonim 2016).

Ülkemiz meyve suyu sanayisinde işlenen meyvelerde en büyük payı yaklaşık % 46 ile elma almaktadır. İkinci sırada yer alan şeftaliyi, son dönemde hızlı bir artış göstererek payını %10’a çıkaran nar izlemektedir. Bunların ardından ise sırasıyla vişne, portakal ve kayısı gelmektedir.



Şekil 1.16. Türkiye’deki meyve suyu üretiminin dağılımı

Meyve Suyu Endüstrisi Derneği (MEYED) verilerine göre meyve suyuna işlenen meyve miktarı 2000 yılında 433 bin ton iken, 2007 yılında 737 bin tona çıkmış, 2010 yılında ise 825 bin tona yükselmiştir.

Meyve suyuna işlenen meyveler arasında elma %46 pay ve 376 bin ton ile ilk sırada gelmekte, söz konusu ürünü %11 pay ve 95 bin ton ile şeftali, %10 pay ve 79 bin ton ile nar, %9 pay ve 73,5 bin ton ile vişne ürünleri takip etmektedir (Akdağ 2011).

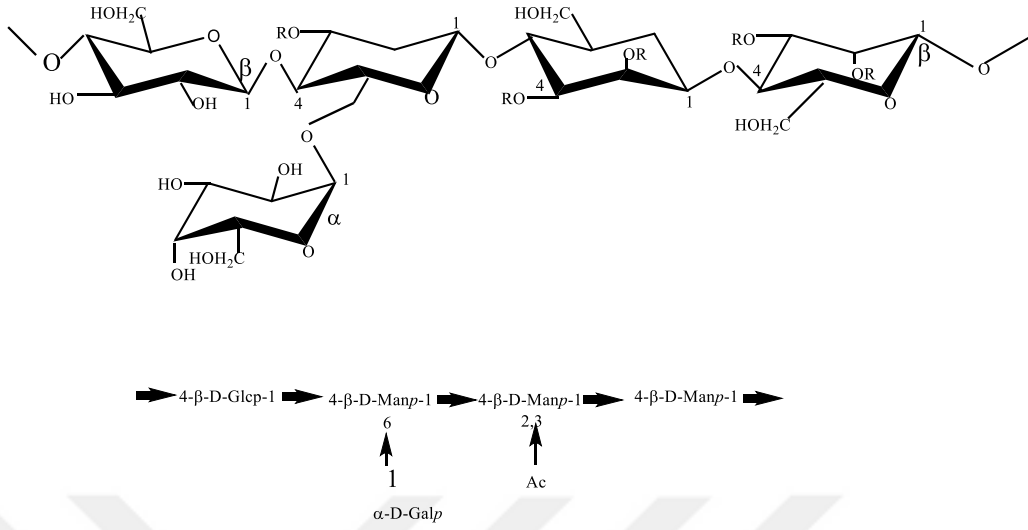
Bunula beraber Türkiye'nin meyve suyunun bir miktarında ithal etmektedir. 2012 yılında ihracata paralel olarak dış pazardan ithalat oranı artış göstermiş ve 47 milyon dolara ulaşmıştır. En fazla ithalat 22,3 milyon dolarla Avusturya'dan gerçekleştirilmiştir (Akdağ 2011).

1.5. Mannan ve Mannanaz Enzimi

Hücre duvarının temel yapısı selüloz, hemiselüloz ve lignin polisakkarit bileşimlerinden oluşur. Bu bileşimlerden hemiselüloz; yaklaşık 100-200 heteropolisakkaritin polimerizasyon derecesi (DP), bir veya birkaç tip şeker monomerlerinden oluşmuş bir ana zincir ve bu ana zincire bağlı farklı tipte yan grupların birleşmesinden oluşur (Chen 2014). Hemiselüloz yapısında ki monomer sayısına, içerdiği glikozil kategorisine göre piran tipi, furan türü, α -glikozid bağ bağlantılı tip, " β - glikozid bağ bağlantılı tipi, L tipi konfigürasyon, D- tipi konfigürasyon yapılandırma tiplerine göre ve glikoziller arasındaki 1-2, 1-3, 1-4 ve 1-6 bağ gruplarına göre çeşitlenirler (Rovio *et al.* 2008; Chen 2014).

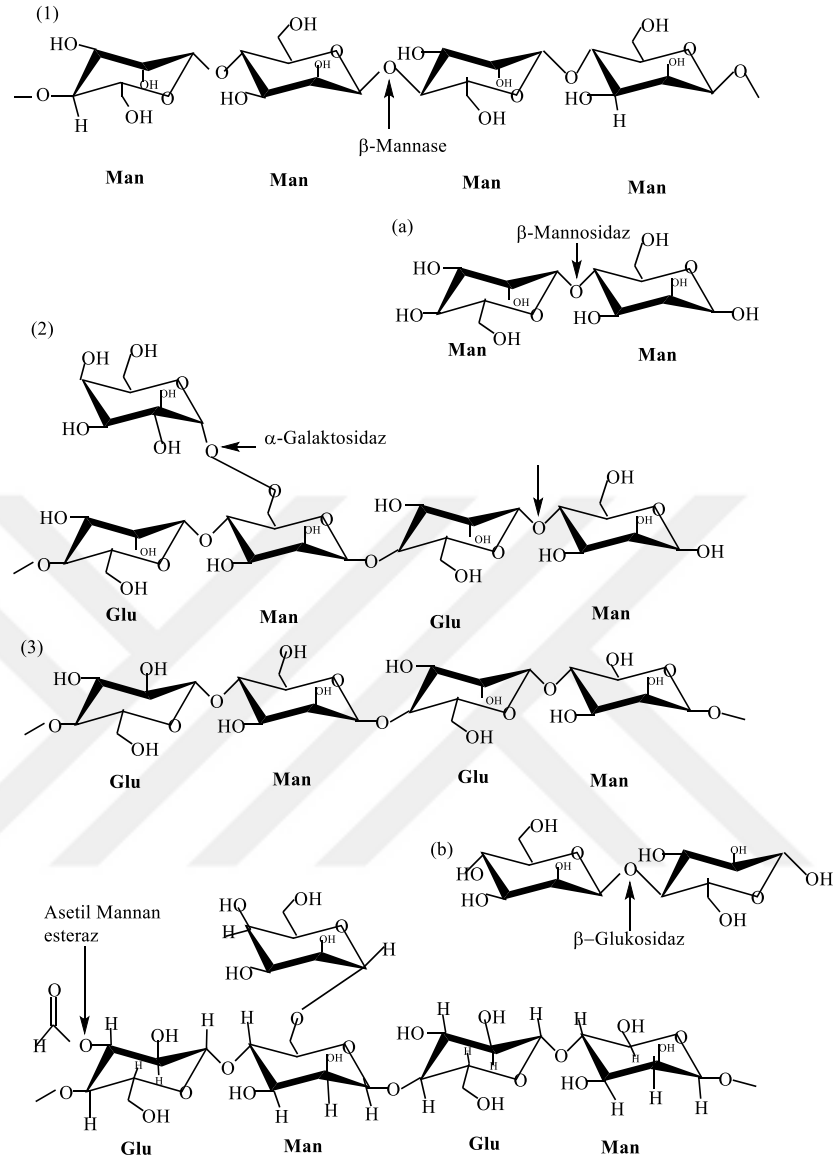
Yumuşak odun dokulu bitki hücre çeperinde bulunan hemiselüloz; temel olarak galaktoglukomannan, glukomannan, arabinoglukuronoksilan, arabinogalaktan, ksiloglukan ve diğer glukanların yanı sıra pektin polisakkaritlerinden oluşur.

Sert odun dokulu bitkilerde hemiselüloz temel olarak ksilan özellikle O-asetil-4-O metilglukurono- β -D-xylan, β -(1-4)-bağlı D- mannopiranoz ve D-glikopiranoz ünitelerine bağlı az miktarda glukomannanlardan oluşur.



Şekil 1.17. Yumuşak dokulu odunlarda Galaktoglukomannan yapısı

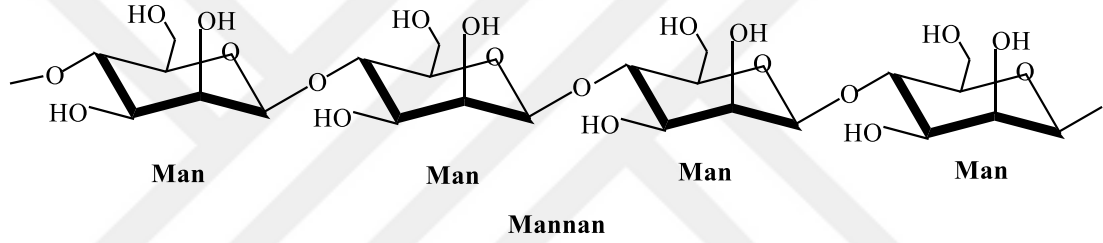
Hemiselüloz yapısının önemli parçası olan mannan molekülleri bir polimer oluşturmak için birbirine bağlı mannoz moleküllerinin homo ve hetero yapılarının bir araya gelmesiyle oluşur. Mannanlar, β -1,4-bağlantılı omurgalarının sadece D-mannoz kalıntısına (mannanlar) bağlı olup olmamasına ya da mannoz ve D-glikoz kalıntısının (glukomannanlar) birleşimini içermesine bağlı olarak Linear mannan ve glukomannan zincirleri olmak üzere iki ana gruba ayrılır (Antalis *et al.* 1973; Liepman *et al.* 2007). Bu ana grupların her biri α -1,6-bağlantılı D-galaktoz yan grupların sayısına göre galaktomannan veya galaktoglukomannan alt gruplara ayrılır. Böylece mannanlar; linear mannan, glukomannan, galaktomannan ve galaktoglukomannan olmak üzere dört alt grupta sınıflandırılır (Petkowicz *et al.* 2001; Moreira and Filho 2008; Zyl *et al.* 2010). Mannoz ve glikoz kalıntılarının omurgaları C-2 veya C-3 grupları asetillenmesine göre de mannan alt grupları birbirinden ayırt edilir (Matheson 1990).



Şekil 1.18. Farklı formlarda ki mannan yapılarının ve bunları hidrolizleyen enzimler Lineer mannan temel yapısı (1), dallı galaktomannan (2), linear glukomannan (3), dallı galaktoglukomannan (4). Mannan omurgası β -mannanaz enzimi tarafından hidrolizlenirken α -galaktosidaz ve asetil mannan esteraz enzimleri galaktoz ve asetil gruplarını serbest bırakır. β -mannanaz enzimi tarafından üretilen mannaoz ve glukomannoz oligosakkaritleri β -mannosidaz (a) ve β -glukosidaz (b) enzimleri tarafından mannoz, glukoz ve galaktoz monosakkaritlerine hidrolizlenir (Zyl *et al.* 2010).

Linear mannanlar; β -(1 \rightarrow 4)-linear zinciri ile -D-mannoprianosil kalıntısına bağlı linear zincirlerden oluşmuş, %5 galaktoz içeren homopolisakkaritlerdir (Van Zyl *et al.* 2010). Linear mannanlar özellikle birçok bitkinin tohumlarında örneğin yeşil kahve, Hindistan cevizi (*Phytelphas macrocarpa*) çekirdeği, Afrika hurması kozalağında ve bazı alglerin hücre duvarlarında bulunmaktadır (Petkowicz *et al.* 2001; Petkowicz *et*

al. 2007). Linear mannanların α -1,6-zincirine bağlı D-galaktoz ünitesinde ki küçük dereceli değişimler sonucu; linear mannan zincirinde yaklaşık 15 derecelik polimerizasyon açısının içine sıkışmış yoğun granüler ve kristalin yapıda mannan I veya mannan A ve mannan mikrofiberlerin içinde kristal yapısı düşük yüksek polimerizasyon açısına (\sim 80) sahip mannan II veya B olarak adlandırılan iki farklı linear mannan çeşidi bulunmaktadır (Zyl *et al.* 2010). Her iki mannan formu çözünmeyen formda bulunur ve endospermin katı sert yapıda olmasını ve korunmasını sağlar (Petkowicz *et al.* 2007; Dhawan and Kaur 2007; Moreira and Filho 2008; Schroder *et al.* 2009).



Şekil 1.19. Linear mannan yapısı

Galaktomannanlar β -(1 \rightarrow 4)-linear zinciri ile D-mannoz kalıntısına ve α -(1 \rightarrow 6)-bağları ile D-galaktoz yan gruplarına bağlanmış linear zincirlerden oluşan heteromannan grubudur. Farklı bitkilerden elde edilen glukomannanlar herhangi bir galaktoz yan zinciri olmaksızın heteromannaların dallanmamış parçaları arasında moleküller arası etkileşimin toplamını oluşturan mannan omurgasını belirlemede kullanılan ve hiperengel olarak adlandırılan moleküller arası ilişki miktarını belirlemede anahtar rolü oynayan mannoz /galaktoz (M/G) oranının farklı substrat kaynaklarında örneğin; keçi boynuzu zambında 4:1, tara zambı 3:1, guar zambı 2:1 ve çemen otu zambı için 1:1 oranında ki değişmelerde olduğu gibi kullanılan kaynaklara göre yapısal değişimler gösterirler (Goldstein *et al.* 1973; Hagglund 2002; Stoll *et al.* 2005; Klyosov *et al.* 2012). Galaktomannanlar diğer mannan tiplerine göre suda çözünebilir ve su tutma kapasitesine sahip olduğu için tohumlarda su tutma ve depolama işlevini görür (Hagglund 2002).

Diğer hücre duvarı bileşenleri gibi selüloz ve ksilan ile ilişkili olan glukomannanlar β -(1,4)-bağı ile D mannoz ve D-glukoza bağlı düz zincirlerden oluşur. Glukomannanlar parakristalin dizileri arasında düzenlenmiştir ve selüloz mikrofibriler yüzeyinde absorbe edilir (Popa and Spiridon 1998; Willför *et al.* 2003; Moreira and Filho 2008; Zyl *et al.* 2010). Glukomannanlar suda çözünebilir, genellikle aynı yapısal özelliklere sahip olup bitkilerin tohumlarında, yumrularında, köklerinde, soğansı yapılarında bulunmaktadır (Hagglund 2002).

Galaktoglukomannanlar D galaktoz kalıntısının α -1,6-bağlantılı terminal dalların D-glukoz ve D-mannoz birimlerine bağlandığı, temel omurgasını β -(1 \rightarrow 4)-D-manopiranosil ve β -(1 \rightarrow 4)-D-glukopiranosil kalıntıları ile α -(1 \rightarrow 6)-D-galaktopiranosil ve O-asetil gruplarının oluşturduğu mannan grubu polisakkaritlerdir (Timell 1967; Popa and Spiridon 1998; Moreira and Filho 2008; Han *et al.* 2010; Van Zyl *et al.* 2010; Malgas *et al.* 2015). Galaktoz/glukoz/mannoz molar oranları yaklaşık 1:1:3 ve 0.1:1:3'tür (Timell 1967). Galaktoglukomannanlar büyük D-galaktoz yan zincirleri içermesi nedeniyle suda çözünebilme özelliği kazanmışlardır (Kollarova *et al.* 2006).

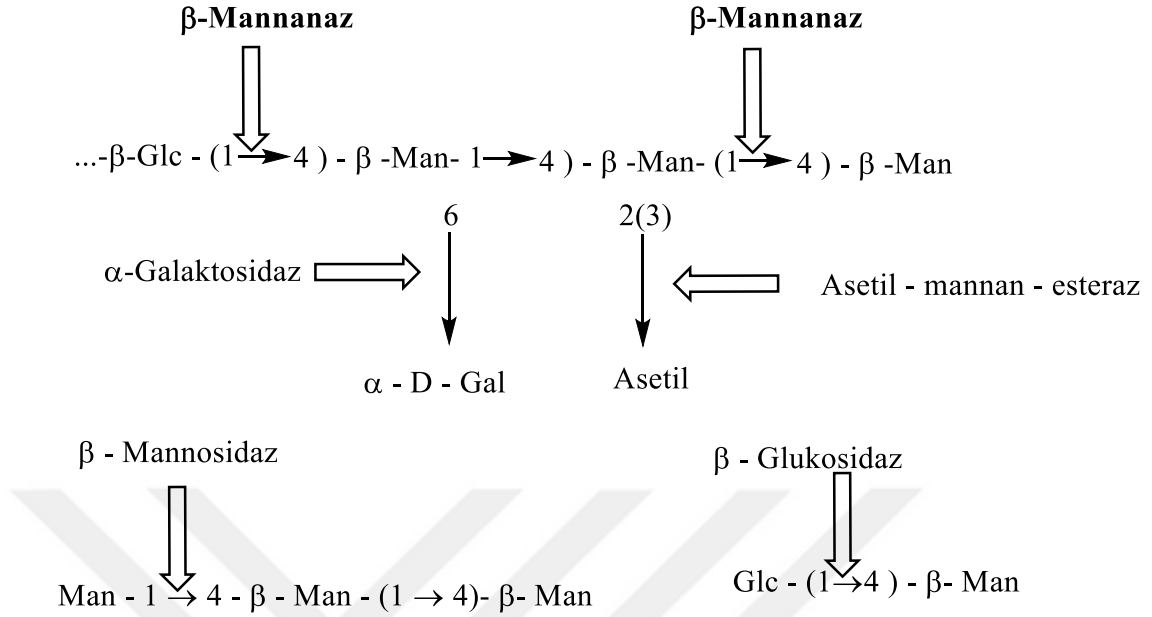
1.5.1. Mannan sindiren enzimler

Selüloz ve hemiselülozun iç içe geçmiş liflerinin indirgenmesi ve farklı kaynakların selüloz ve hemiselüloz içeriklerine göre polisakkaritleri indirgeyen enzimler çeşitlenmektedir. Bu enzimler genellikle bir ya da daha fazla katalitik veya katalitik olmayan alt birimlerden oluşmaktadırlar (Warren 1996). Polisakkaritleri indirgeyen enzimlerin en yaygın katalitik modülleri O-glikozit hidrolazlar (GH) ve katalitik olmayan karbonhidrat bağlayıcı (CBM) modülleridir (Coutinho and Henrissat 1999). Glikozit hidrolaz enzim ailesi üyesi olan mannan-parçalayıcı enzimler; β -mannanaz (1,4- β -D-mannan mannohidrolase EC 3.2.1.78), β -manosidaz (1,4- β -D-mannopiranozit hidrolaz, EC 3.2.1.25) ve β -glukosidaz (1, 4- β -D-glukosit glukohidrolaz, EC 3.2.1.21) enzimlerinin yanı sıra mannan omurgasına bağlanmış α -1,6- D-galaktoprinozöl alt ünitesini koparan 1,6- α -D-galaktosidaz galaktohidrolaz (α -galaktosidaz) ve galaktoglukomannanlardan asetil grupları serbest bırakan asetil

mannan esteraz enzimlerinden oluşurlar (Filho 1998; Shallom and Shoham 2003; Van Zyl *et al.* 2010; Ghosh *et al.* 2013).

Glikozit hidrolaz enzim ailesinin 1, 2 ve 5 grubunda yer alan β -mannosidaz (1,4- β -D-mannopiranozit hidrolaz, EC 3.2.1.25), enzimi β -1,4-bağlı mannozidazların dışa doğru hareket ederek hidrolizlenmesini katalizler. Mannan oligosakkaritlerden ve sindirilmeden kalmış mannan polisakkaritlerinden mannoz salınmasını sağlar (Gonzalez and Jordan 2000; Shallom and Shoham 2003; Moreira and Filho 2008). β -mannosidaz enzimi eubakteriya, arkebakteriya, bitkiler, mantarlar ve hayvanlar da dahil olmak üzere farklı tiplerdeki organizmalardan izole edilmiştir. Mikroorganizmalarda β -mannosidaz enzimi çürümekte olan bitki materyalinde mannan ve heteromannanları sindirme, bitkilerde filizlenme sırasında tohum endospermünde depolanmış polisakkaritlerin serbest kalmasında rol oynar (Hagglund 2002).

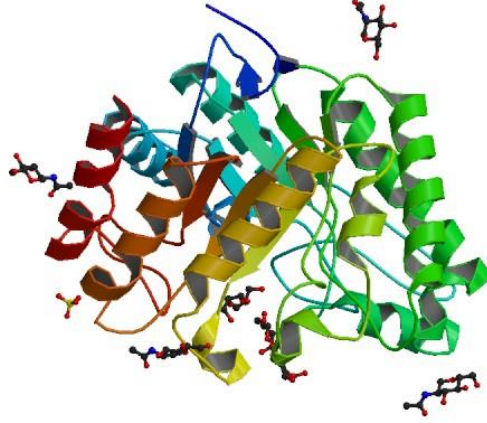
β -glukosidazlar (EC 3.2.1.21) β -mannanazlarla birlikte Glukomannan ve galaktoglukomannanlardan salınan oligosakkaritlerin indirgenmeyen uçlarındaki 1,4- β -D-glukopiranozu hidrolize eden ve GH ailesinin 1 ve 3.grubunda bulunan ekzo-enzimlerdir (Xiao *et al.* 2004; Chauve *et al.* 2010; Mangals *et al.* 2015).



Şekil 1.20. Mannan sindiren enzimler ve yapıları

1.5.1.a. Mannanaz enzimi

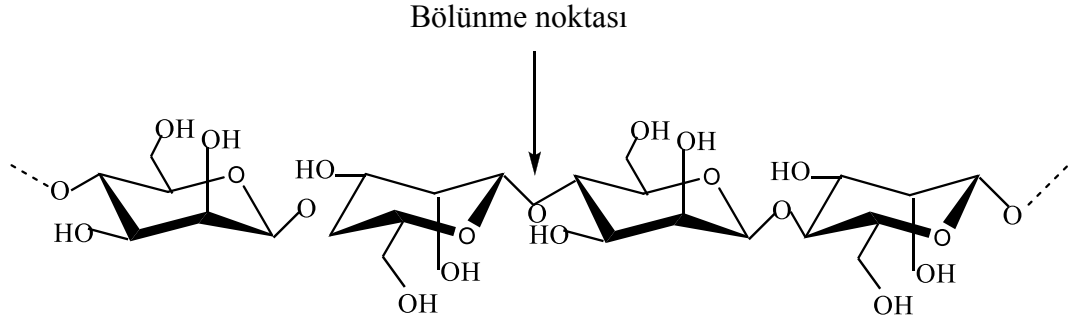
Mannazlar genellikle modüler yapıda görülür ve genellikle iki protein domaininden oluşurlar (Perret *et al.* 2004). Bu proteinler, genel olarak yapısal olarak farklı katalitik ve katalitik olmayan modüller içerir (Dhawan and Kaur 2007). Her iki enzim ailesi üç boyutlu yapısına göre büyük glikozit hidrolaz GH-A klanınının (β/α) 8 katalitik modülünde katlanmış halde görülür (Stoll *et al.* 2005; Moreira and Filho 2008). Mannanaz enzimlerinin en önemli katalitik olmayan modülleri glikosid hidrolazlar enzim aileleri içinde aynı işlevi gören ve polisakaritlere enzimin hedeflemesini ve bağlanmasını kolaylaştıran karbonhidrat bağlanma modülleri I, II, III ve V. (KBM) modüllerinden oluşmaktadır (Hagglund 2002).



Şekil 1.21. *Trichoderma reesei* bakterisinden izole edilmiş β -manannaz enziminin üç boyutlu yapısı

β -1,4-mananazlar (β -mananaz; EC 3.2.1.78) mannan bazlı polisakkaritler; galaktomannan, glukomannan, galaktoglukomannan ve mannanın 1,4- β -D mannan ana zincir içinde mannoglikosidik bağların rastgele hidrolizini katalizeleyen ve yeni zincir uçları üreten endohidrolaz enzimlerdir (Zhang *et al.* 2000; Cai *et al.* 2011; Malgaset *et al.* 2015). *Aspergillus niger* fungusundan izole edilmiş mannanaz enziminin Davies ve arkadaşları tarafından verilen isimlendirmeye ve 5 substrat bağlanma alt ünitesi α , β , γ , δ ve ϵ ayrıca bu alt ünitelere eşdeğer -3, -2, -1, +1, ve +2, olarak numaralandırılmış sisteme göre adlandırılmıştır (Davies *et al.* 1998). Etkin bir hidroliz için bu enzimin en az dört alt- bağlanma ünitesinin olması gereklidir (Harjunpaa *et al.* 1995).

β -mannanaz enzimi tarafından hidrolizlenen mannanların parçalanması sonucu genellikle mannobioz ve manotrioz oligosakkaritler oluşurken az miktarda mannoz ve mannotetrozlarda bazı reaksiyonlarda oluşabilmektedir (Hagglund 2002; Moreira and Filho 2008; Van Zyl *et al.* 2010).



Şekil 1.22. β -mannanaz enziminin mannan polisakkaritini β -1,4 bağlantı bölgesinden hidrolizleme mekanizması

Farklı kaynaklardan elde edilen enzimlerin üç boyutlu yapısal benzerlikleri ve amino asit dizi benzerlikleri temel alınarak oluşturulmuş enzim ailelerinin yapı benzerliği olarak gruplandırılmasına göre sınıflandırılmış glikoliz hidrolaz enzim ailesi içerisinde β -mannanaz enzimi 5, 26 ve 135. gruplarda yer alır.

Bacillus circulans, *Clostridium cellulolytic*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma fusca*, *Aspergillus aculeatus*, *Agaricus bisporus* gibi bakteri ve ökaryot organizmalardan elde edilen β -mannanaz enzimi GH 5 ailesinin üyeleri arasında bulunurken *Bacillus subtilis*, *Cellulomonas fimi*, *Clostridium thermocellum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Piromyces sp.*, ve *Humicola insolens* izole edilmiş β -mannanaz enzimi GH 26 enzim ailesi içinde *Caldocellulosiruptor saccharolyticus* ve *Cellvibrio japonicus* gibi bazı bakteri türlerinden izole edilmiş β -mannanaz enziminin GH 5 ve 26 enzim ailesinin her iki grubuna dahil olduğu belirtilmiştir (Gibbs *et al.* 1996; Larsson *et al.* 2006; Dhawan and Kaur 2007; Moreira and Filho 2008).

β -mannanaz enzimi iki yer değiştirme reaksiyonu yoluyla oluşan bir mekanizma ile substratlarını hidrolizler. Bu mekanizmada, glikozidik bağın hidrolizi aktif bölgede konumlandırılmış iki karboksilatları (glutamatlar veya aspartatlar) kapsayan genel asit-baz katalizlenmesi yoluyla ilerler. Çift değiştirme reaksiyonunun ilk adımında nükleofilik karboksilatın anomerik karbonunu koparmasını ve aglikon salınımına neden olan kovalent enzim-glikosidaz ara bileşiğinin oluşması ikinci adımda enzimin glikozidi serbest bırakması sonucu oluşan nükleofilik suyun kovalent ara bileşiği

parçalaması ile reaksiyon sona erer (Withers 2001; Chauhan *et al.* 2012; Ardevol and Rovira 2015).

1.5.1.b. Mannanaz enzim kaynakları

Mananazlar doğada her yerde bulunmaktadır ve büyük ölçüde doğal ortamlarda izole edilen mikroorganizmalar, funguslar ve ökaryotik organizmalardan izole edilmektedir.

Nem içeriği, kültür derinliği, O₂ ve CO₂ transferinin kontrol edilebilirliği, optimum sıcaklık ve pH değerlerinin ayarlanabilmesi nedeniyle mikroorganizmalar ve funguslar katı-sıvı hal fermantasyon yöntemleri ile yetiştirilerek mannannaz enzimi saflaştırılmaktadır (Moreira and Filho, 2008). Mikrobiyal mananazlar çoğunlukla hücre dışı olan ve büyük ölçüde sıcaklık, pH, nitrojen ve karbon kaynakları, inorganik tuzlar, çalkalama ve çözülmüş oksijen konsantrasyon oranları gibi beslenme ve fizikokimyasal faktörlerden etkilenmektedir (Mabyalwa and Setati 2006; Li *et al.* 2006; Lin *et al.* 2007). Glukomannan, galaktomannan, galaktoglukomannan farklı manan substratlar mannannaz üretim koşullarını ayrıca etkilemektedir (Dhawan and Kaur 2007).

Manan-sindiren enzimlerin saflaştırılması, ultrafiltrasyon, amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyonu, hidrofobik etkileşim ve iyon değiştirme kromatografisi gibi prosedürlerin alternatif kombinasyonlarını içeren temellere dayanır (Ademark *et al.* 1998).

Bakteriler mayalar ve mantarlardan izole edilmiş β -mannannaz enziminin fizikokimyasal özellikleri ve izole edildiği kaynaklardan bazıları Çizelge 1.3'te sunulmuştur.

Çizelge 1.3. Mannanaz enzim kaynakları

Organizma	Enzim	Optimum sıcaklık (°C)	Stabil sıcaklık	Optimum pH	Stabil pH	Moleküler ağırlık (kDa)	K _m (mg/m L ⁻¹)	V _{max} (μmol dak ⁻¹ mg ⁻¹)	Kaynak
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Mannanaz	72	10 dak. (50°C)	3.3	3.2	41.9	2.73	-	Gübitz <i>et al.</i> 1996
<i>Trichodera harzianum</i>	ManI	55	5s. (55°C)	3.0	-	32.5	1.3	3.6	Ferreira and Filho 2004
<i>Bacillus subtilis</i> WY34	Mannanaz	65	30 dak. (60°C)	6.0	5.5-10.1	39.6	7.6	970.3	Jiang <i>et al.</i> 2006
<i>Haliothis discus hannai</i>	Mannanaz	45	30 dak. (40°C)	7.5	7.0	39	-	-	Ootsuka <i>et al.</i> 2006
<i>Pichia pastoris</i>	Mannanaz	50	50 dak. (60°C)	2.4	2.2-8.0	48	0.93	344.83	Chen <i>et al.</i> 2007
<i>Aspergillus niger</i>	Man5D	72	2s (60°C)	4.0-6.0	4.0-8.0	65	3.00	510	Benech <i>et al.</i> 2007
<i>Acinetobacter sp.</i> ST 1-1	Mannanaz	40	30 dak. (40-50°C)	6.0	3.0-10.0	-	-	-	Titapoka <i>et al.</i> 2008
<i>Scopulariopsis candida</i> LMK004 suşu	Mannanaz	50	3s (30-40°C)	5.0	5.0-6.5	41	-	-	Mudau and Setati 2008
<i>Scopulariopsis candida</i> LMK008 suşu	Mannanaz	40	3s (30-40°C)	6.0	6.0-7.0	29	-	-	Mudau and Setati 2008
<i>Aspergillus niger gr</i>	Mannanaz	65	8s (60°C)	5.5	4.0-8.0	-	-	-	Kote <i>et al.</i> 2009
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 3448	Mannanaz	55	1s 45°C	5.5	4.0-7.5	-	5.5 mg/mL	275 U/mg	Fattah <i>et al.</i> 2009
<i>Aspergillus fumigatus</i> IMI 385708	AsT1	60	4s (50°C)	4.5	3.5-8.5	60 kDa	-	-	Durıksu <i>et al.</i> 2009
<i>Bacillus subtilis</i> MA-139	Mannanaz	50	30 dak. (50-80°C)	6.0	5.0-7.0	38	-	-	Qiao <i>et al.</i> 2010
<i>Phialophora sp</i> P13	man5AP13	60	2s (50-70°C)	1.5	1.5-7.0	44.26	2.5 mg/mL	1,668 U/dak mg	Zhao <i>et al.</i> 2010
<i>Penicillium pinophilum</i> C1	man5C1	70	1s (37-70°C)	4.0	3.0-10.0	65	5.6	2785	Cai <i>et al.</i> 2011
<i>Bacillus sp.</i> N 16-5	MAN330 MAN493	70°C	10 dak. (60-80°C)	9.5	5-11	33 55	-	-	Pan <i>et al.</i> 2011
<i>Cellulosimicrobium sp.</i> HY-13	ManK,	50	1s (37-55°C)	7.0	6.0-9.0	35	1.47	-	Kim <i>et al.</i> 2011
<i>Bacillus subtilis</i> BCC 41051	Mannanaz	60	30 dak. (42°C)	7.0	5.0-11.5	38	-	-	Sumppunn <i>et al.</i> 2011
<i>Chaetomium sp.</i> CQ31	CsMan5A	65	30 da (55°C)	5.0	5.0-11.0	50	3.1	5974.3	Katrolia <i>et al.</i> 2012

1.5.1.c. β-mannanaz enziminin uygulama alanları

Günümüzde geliştirilmiş teknolojik araçlarla genom dizilemelerin kolay şekilde belirlenebilmesi, biyo-informatik araçların çoğalması, gen ekspresyonlarının ve klonlama çalışmalarının artması, protein mühendisliğinin gelişmesiyle yeni enzimlerin üretilmesi ve farklı kaynaklardan izole edilmiş enzimlerin tanımlanması,

karakterizasyonunun yapılması ile enzimlerin uygulama alanlarınının çoğalmasında ve geniş alanlarda kullanılabilirliğini kolaylaştırmıştır.

1. Sağlık alanlarında kullanımları

İnsan sağlığını korumak amacıyla alternatif tıpta kullanılan ve özellikle bağırsak mikroflorası üzerine yararlı etkileri bulunan prebiyotikler olarak kullanılan konjak unu glukomannanların üretiminde mannanaz enzimleri kullanılmaktadır. Konjak ununun ticari üretimini artırmak ve hidrolizini kolaylaştırmak amacıyla *Bacillus sp.* MSJ-5 suşundan klonlanmış Man5 (endo β -mannanaz) tarafından konjak un üreten manno-oligosakkaritler (MOS) tanımlanmıştır (Zhang *et al.* 2009).

Mannozların yapı katkı maddesi olması nedeniyle toz halinde yüksek oranda biyo uyumluluk göstermesi, tablet içinde sıkıştırılabilme özelliklerinden dolayı ağızda kolay erimeme ve sadece belirli bir bağıl nem değerlerinde geçici nem işlenerek mannoz parçacıkları arasındaki sıvı köprüler meydana getirmek üzere, su oranı fazla olmayan ortamda çözünebilme özelliklerinden dolayı hızlı çözünebilen tablet üretiminde (Callihan *et al.* 2005; Fu *et al.* 2006) kullanılmaktadır.

Diğer enzimler ile birlikte mannanaz enzimi; düşük maliyetli mannanca zengin hurma çekirdeği kek, guar sakızı ve hindistan cevizi unu gibi substratlardan mannoz üretiminde kullanılmaktadır. Bu substratlardan özellikle guar sakızının protein kullanımını azaltmadan vücutta plazma kolesterol seviyesini ve yağlanmayı azalttığı ve fekal atılım hacmini artırdığı yapılmış çalışmalarla ortaya konmuştur (Takeno *et al.* 1990).

2. Gıda ve yem uygulamalarında kullanımları

Farklı mannanaz karışımlarının kahve çekirdeklerinin işlenmesi ve fermantasyonu, sıvı kahve ekstratlarının viskozitesinin azaltılması, kahve mannanların hidrolizinde, ayrıca sıvı kahve ekstratlarında galaktomannanları hidrolizlemede, hızlı hazırlanan

kahvelerde tercihen anlık kahve dondurarak kurutma sırasında jel oluşumunu inhibe etme işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Nicolas *et al.* 1998; Oosterveld *et al.* 2003; Nunes *et al.* 2006).

S.rolfsii bakterisinden izole edilmiş β -mannanaz enziminin kahve mannanların hidrolizlenmesinde etkili olduğu ayrıca saf haldeki mannan solüsyonlarında ve çözülmüş kahve konsatrelere vizkoziteyi azalttığı ortaya konmuştur (Sachslehner *et al.* 2000).

β -mannan soya unu, guar unu, hindistan cevizi unu, hurma çekirdeği unu gibi yaygın olarak kullanılan yem katkı maddelerinde bulunan bir polisakkarittir. Mannan substratları yüksek oranda lif içermeleri, bazı esansiyel amino asitlerinden yoksun olmaları, lezzet oranlarının düşük olması, mannan, galaktomannan, ksilan ve arabinoksilan gibi birçok anti-besinsel faktörlerle birleştiğinde yüksek viskozite göstermeleri gibi ortak özellikler taşırlar. Bu nedenlerden dolayı insan ve hayvanların bağırsak sistemlerinde bunların sindirimi kısıtlıdır (Dhawan and Kahur 2007).

Özellikle hayvan beslenmesinde yem katkı maddesi olarak kullanılan mannan içerikli diyetlerde β -mananaz enziminin kullanılması ile hücre duvarı içerisinde ki β -mannanların parçalanması ve kapsüllenmiş besinlerin salınımı sağlanmakta, hayvan duodenum ve jejunumu kaplayan villusların yüksekliğini artırarak geniş bir yüzey alanı oluşturulup besin maddelerinin absorpsiyon oranının artması ve sindirilmiş besin maddelerinin vizkozitesini azaltması sağlanmıştır (Adibmoradi and Mehri 2007; Cauhan *et al.* 2012).

Penicillium pinophilum C1 suşundan izole edilmiş asidik β -mananaz enzim geninin *Pichia pastoris* vektöründe klonlanarak izolasyonu yapıldığı ve karakterizasyonunun belirlendiği Man5C1 enziminin hayvan beslenmesi uygulamalarında kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla pepsin içeren ve pepsin içermeyen yapay gastrik ortam oluşturulmuş ve bu ortama 1 U mL⁻¹ rMan5C1 enzimi 37°C'de 60 dakika boyunca inkübasyona bırakılmış ve 2.0- 5.5 arasında değişen yapay gastrik

pH'larında enzimin aktivitesinin sürdüğü, in vitro ortamda locust bean gum mannan substratının yapay gastrik ortamında şekerleri indirgeyerek yavaş yavaş biriktiği, locust bean gum içerikli pepsinli yapay mide sindirim ortamda 8.96 mg.g^{-1} ve pepsinsiz ortamda 8.66 mg g^{-1} oranında sindiriminin gerçekleştiği böylece izole edilmiş rMan5C1 enziminin hayvan sindirim sisteminde kullanılabilirliği ortaya konmuştur (Cai *et al.* 2011).

Enerji seviyeleri farklı diyetlerle beslenmiş broyler tavuklarında β -mananaz enziminin yem sindirimi ve gelişim parametreleri üzerinde etkisinin araştırıldığı farklı bir çalışmada bu enzimin besin maddelerine eklenmesi ile incelenen hayvanların vücut ağırlık artışı, gut morfolojisi, yem dönüşüm oranı, kuşların bağışıklık oranı ve organların nispi ağırlığını önemli derecede iyileştirdiği belirtilmiştir (Imran *et al.* 2014; Muhammad *et al.* 2015). β -mannan kaynağı olarak guar sakızının kullanıldığı ve farklı enerji seviyelerinde hazırlanmış Mısır-Soya unu tabanlı diyetlerle beslenen broyler tavuklarıyla yapılan çalışmalar sonucu; endo- β -D-mananaz enziminin su çıkışını önemli oranda azaltarak beslenme oranını ve toplam kuru dışkı çıkışını ve nitrojen kullanımını artırdığı, böylece β -mannan ihtiva eden diyetlerde besin kullanımının iyileştirebileceği gösterilmiştir (Daskiran *et al.* 2004; Mussini *et al.* 2011).

Mısır-Soya unu tabanlı diyetlerle beslenen domuzlarda β -mananaz enziminin büyüme verileri, performans özellikleri ve besin sindirilebilirliği üzerinde etkisinin ölçüldüğü çalışmada β -mananaz enziminin hayvanların ağırlık artışında, yem alımı ve yemden yararlanma oranı üzerinde çok önemli etki gösterdiği ve toplam sindirilebilirlik oranını artırdığı belirtilerek β -mananaz enziminin sadece kanatlı hayvanlarda değil ruminant hayvanlarda da yemlerin sindirilmesi yemden yararlanma oranı, performans özellikleri ve hayvanların vücut ağırlıklarının artışında önemli etkileri olduğu ortaya konmuştur (Petty *et al.* 2002; Lv *et al.* 2013).

Ciprinoid ve *grass carp* gibi tatlı su balıklarının mideleri yoktur bu nedenle tripsin ve pepsin proteinleri nötr pH değerine sahip gastrointestinal sisteme doğrudan salgılanır.

Son zamanlarda yapılmış olan çalışmalarda aktif ve nötr pH aralığında kararlı ve özellikle proteolize dirençli MAN5A ve MANB48 gibi rekombinant β -mannanaz enzimleri balık yemi katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır (Li *et al.* 2008; Yang *et al.* 2009).

3. Kağıt ve selüloz sanayi uygulamalarında kullanımları

Mannanaz enzimi yumuşak odun hamurlarının ağartılması proseslerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. β -mannanaz enzimi ve yardımcı enzimler kullanılarak odun yapısında selüloza zarar vermeden mannan yapılarını parçalayıp odun liflerinden lignin çıkartılması ve odun hamurunun ağartılması işlemlerinde ilk basamak olarak uygulanmaktadır. Bu işlemler için ilk adımda alkali ortamda lignine kovalent bağlı hemiselülozun hidrolizlenmesi sağlanarak ligninin uzaklaştırılması kolaylaştırılmış olur (Filho 1998; Dhawan and Kaur 2007).

2000'li yılların başlarında özellikle ambalaj kağıdı hamurlarının ağartılması üzerinde enzimlerin etkisinin araştırıldığı çalışmada *Caldibacillus cellulovorans* bakterisinden izole edilmiş β -1,4-Mannanaz enzim geninin klonlanıp izole edilmiş rekombinant ManAd3 enziminin ambalaj kağıdı hamurlarının ağartılma prosesinde ve hamurun parlaklığını artırmada kullanılabileceği belirtilmiştir (Sunna *et al.* 2000).

Phanerochaete chrysosporium fungusundan klonlanan ve *Aspergillus niger* vektöründe ekspresyonu sağlanmış rekombinant man5D enziminin yumuşak ambalaj kağıdı hamurunda glukomannanları hidrolize ederek kağıdın ağartılması işleminde ön ağartma maddesi olarak pozitif etki gösterdiği ortaya konmuştur (Benech *et al.* 2007).

Endo β -1,4-mannanaz enziminin *Penicillium oxalicum* fungusundan klonlanan rekombinant rPoMan5A enziminin selüloz serbest bırakma özelliğinden dolayı kağıt içeren uygulamalar ve kağıt hamurunu beyazlatma proseslerinde kullanılabileceği önerilmiştir (Liao *et al.* 2014).

4. Deterjan endüstrisinde kullanım alanları

Deterjan bileşenlerini güçlendirmek ve leke çıkarıcı ajanlara ek olarak alkali mannanazlar deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır. Mannanaz enzimi özellikle dondurmalarda kullanılan yoğunlaştırma ajanları, soslar, saç jöleleri, şampuanlar, diş macunları ve pek çok ev ürünlerinde kullanılan mannan içeren; zamklı (galaktomannanlar, glukomananlar ve guar sakızı) bileşiklerin hidrolizlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (Moreira and Filho 2008; Zyl *et al.* 2010). Mannanaz enzimi guar içerisindeki mannoz ünitelerini birbirine bağlayan β -1,4-bağlarını kopararak zamkları küçük karbonhidrat fragmentlerine parçalar. Bu küçük fragmentler suda çözünerek kumaşların liflerinden ayrılır ve yıkama esnasında parçalanarak uzaklaştırılır (Kirk *et al.* 2002; Schafer *et al.* 2005).

Sulu olmayan sıvı deterjan bileşimlerine katılan borat iyon konsantrasyonu ve mannanaz enzim oranı her iki bileşenin performansını maksimize ederek kirleri çıkartmanın yanı sıra kumaşların parlaklığını korumada etkili olduğu belirtilmiş ve yapılan buluş patent olarak desteklenmiştir (Bettiol *et al.* 2000). Farklı kaynaklardan izole edilen alkalitik-termotolerantları yüksek mannanaz enzim kaynaklarının deterjan endüstrisinde kullanılabilirliği üzerinde durulmuştur (Takeda *et al.* 2004; He *et al.* 2008; Sharounya *et al.* 2015).

5. Meyve sularında durultma işlemlerinde kullanım alanları

Weissella viridescens (LB 37) bakterilerden izole edilmiş saf halde bulunan enzimler pulp haline getirilmiş mevsim meyvelerinden elma, portakal, nar, çilek, kivi meyvelerinin yapısında bulunan mannanın β -mannanaz enzimi tarafından hidrolizi ve meyve sularında durultma etkisinin araştırılmış olduğu çalışmada kivi suyundan %117.21 oranında verim elde edildiği (Adıgüzel vd 2015), Zhao *et al.* (2010) tarafından asidofilik *Phialophora sp.* P13 bakterisinden izole etmiş oldukları mannanaz enziminin gastrik ortamda mannanları hidrolize etme ve meyve suyu arıtma

prosesinde kullanılabilceği gösterilmiştir. Farklı bir çalışma rneğinde *Bacillus pumilus* M27 suşundan izole edilmiş β -mannanaz enziminin meyve sularında verimi artırma ve durutma etkisinin arştırılması sonucu β -mannanaz enziminin uygulandığı meyve sularında özellike elma suyunda verimin %154 oranında artığı ve mannanaz enziminin meyve sularında durultma ve verim artırma proseslerinde kullanılabilirliği üzerinde durulmuştur (Adiguzel *et al.* 2015). *Lactobacillus plantarum* (M24) bakterisinden saflaştırılmış β -mannanaz enziminin meyve sularında durultma etkisinin arştırıldığı diğer bir arãtırma da özellikle şeftali suyunda %223.1 oranında verimin arttığı gösterilmiş böylece mannanaz enziminin meyvelerin yapısında bulunan mannanları hidroliz ederek ortamın vizkositesinin azalması ve mannanların yapısında bulunan suyun hidroliz sonucu açığa çıkmasıyla meyve suyunun miktarını arttırma da kullanılabilirliği gösterilmiştir.

6. Diğer kullanım alanları

Mananazların su arıtma sistemleri, vakum kanalizasyon sistemleri, atık su arıtma ve soğutma suyu arıtma sistemlerinde balık kontrol ajanı olarak önemli rol oynadıkları ayrıca bakterilerin geniş alanlara yayılarak çoğalmasını ve adhezyonunu kontrol ettikleri, su yatağı sistemleri yüzeylerinde oluşan biyofilm kalıntılarını yok ettikleri ortaya konmuştur (Pee *et al.* 2002).

Mananazlar, aynı zamanda sondajlama işlemleri sırasında petrol veya gaz akışını arttırmak için kullanılabilir. Bu amaçla kullanılan guar gumları gibi doğal polimerler yüksek sıcaklığa dayanıklı mannanazlar tarafından hidroliz edilerek yapışkan polimer zeltilelerinin, petrol ve gaz akışının sağlanması için açık yarıklara yaslanıp, gaz ve petrol akışının yarıklardan kolayca geçmesinde etkili olduğu belirtilmiştir (Comfort *et al.* 2004)

Hindistan cevizini yapısal hücre duvarı ana parçaları olan mannan ve galaktomannanları hidrolizleyerek enzimatik yağ ekstraksiyonlarında mannanaz enzimi kullanılmaktadır. Enzimatik işlemler yağ ekstraksiyonu sırasında oluşabilecek

aflatoksin kontaminasyonlarını önler ve ürünlerin oksidatif ekşime sorunlarını ortadan kaldırır. Mannanaz enzimi kullanımının hindistan cevizinden yağ üretimi, aromatik proteinler içeren ve içecek olarak kullanılabilen sıvı üretiminde, hindistan cevizi proteini elde edilmesinde ve yağ ekstraksiyonlarında kullanılabilirliği büyük önem taşımaktadır (Chen *et al.* 2003).

Selüloz, ksilanaz ve mannanaz içeren enzim kokteylleri kullanılarak lignoselülozik biyomaslardan fermente şekerler hidrolizlenip biyoetanol üretimi sağlanmıştır (Varnai *et al.* 2011). Palmiye yağı ekstresi elde edilirken oluşan atık ürünlere selüloz, ksilanaz, mannanaz içeren enzim kokteylleri uygulanarak herhangi bir ön muamele gerektirmeden enzimlerin palmiye yağı ekstresinin yapısında bulunan heksoz şekerlerini hidrolize ederek biyoetanol üretimi gerçekleştirilmesi sağlanmıştır (Jorgensen *et al.* 2010).

1.6. Ebişke Mantarı

Ebişke (*Clitocybe geotropa*) Tricholomataceae familya grubuna ait olan bir mantardır ve özellik olarak uzun saplı ve geniş alanlara yayılma özelliği göstererek genellikle ormanlık alanlarda yaygın olarak görülür. Soğuk hava şartlarından fazla etkilenmez Ekim - Aralık aylarında görülürler. Ebişke mantarı ilk olarak 1792 yılında Fransız mikolog Jean Baptiste Francois Pierre Bulliard tarafından tanımlanmış ve daha sonra 1872 yılında diğer bir Fransız mikolog Lucien Quelet bu mantar türünü *Clitocybe* cinsi altında *Clitocybe geotropa* olarak isimlendirmiştir. Türkiye’de ebişke mantarı olarak bilinmektedir ve halk arasında pazarlarda satılan, yemeklik olarak kullanılan, toksik olmayan bir mantar türüdür. Daha çok Ege Bölgesi ve Karadeniz Bölgesinde yaygın olarak görülmektedir (Anonymous 2016a; Anonymous 2016b).



Şekil 1.23. Ebişke (*Clitocybe geotropa*) mantar resmi

Bu çalışmanın birinci aşamasında; mannanaz enzimi ebişke (*Clitocybe geotropa*) mantarından amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadexs iyon değişim kromatografisi ve Sephakryl S200 jel filtrasyon teknikleri kullanılarak saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise; saf enzim nano-Fe₃O₄ ile modifiye edilen kitosan partiküllerine immobilize edilmiş ve son olarak serbest ve immobilize enzimlerin meyve suyu endüstrisinde kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Ademark *et al.* (1999) Hemiselülozun monomerik şekerlere ayrılmasında önemli rol oynayan β -mannosidaz enziminin *Aspergillus niger* mantarından izole edildiği ve karakterizasyonun tanımlandığı çalışmada amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon yöntemi kullanılarak yapılmış analizler sonucu izole edilmiş enzimin izoelektrik noktası 5.0 olarak bulunmuştur. SDS-PAGE jel elektroforezi ile enzimin molekül ağırlığı 135-kDa ve iki alt üniteden oluştuğu ortaya konmuştur. 50mM sodyum sitrat tamponu içerisinde 24 saat inkübasyona bırakılmış β -mannosidaz enziminin maksimum pH 2.4–5.0 ve 70°C sıcaklıkta aktivite gösterdiği, p-nitrophenyl- β -D mannopiranosid substratı kullanılarak K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.30 mM ve 500 nkat mg^{-1} olarak ölçülmüştür. β -mannosidaz enziminin manno oligosakkaridler; GalMan2, GalMan3 ve Gal2Man5 oligosakkarit substratları ile 48 saat inkübasyonu sonucu GalMan 2 substratının %43 oranında GalMan ve mannoza dönüştüğü, GalMan 3'ün tamamının mannoza dönüştüğü, Gal2Man5 substratının yaklaşık %18 oranında mannoz ve Gal2Man4'e dönüştüğü gözlenmiştir.

Zhang *et al.* (2000) *Bacillus licheniformis* bakterisinde çöktürme, ultrafiltrasyon ve iyon değişim kromatografisi yöntemleri kullanılarak β -mannanaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu yapıldığı çalışma sonucu lokust bean gum substratı kullanılarak yapılmış maksimum enzim aktivitesi ölçüldüğü optimum pH 7.0, sıcaklık 60°C olarak bulunmuş, 6 saat boyunca ölçülen stabil pH ve sıcaklık sırasıyla pH 6.0 ve 50°C olarak ölçülmüştür. 70°C ve pH 6.0 ortamında enzim aktivitesinin 1 saatten sonra gözlenmediği ortaya konmuştur.

Hagglund (2002) Hemiselülozu-parçalayıcı enzimlerin yapısı ve işlevini incelemek amacıyla yapılmış tez çalışmasında yumuşak odun dokusunun içerdiği hemiselülozun yapısında bulunan mannan ve galaktoglikomannan gibi heteromannan parçalayan β -mannanaz (*TrMan5A*) enziminin yapısı ve işlevi incelenmiştir. Bu amaçla kamçılı mantar türü *Trichoderma reesei* mantarından izole edilmiş β -mannanaz enziminin katalitik alt ünitesi ve karbonhidrat bağlayıcı alt üniteleri (KBM; karbonhidrat

bağlayıcı modül) araştırılmış. Araştırmalar sonucu KBM alt ünitesinin farklı substratlarda mannan ve türevlerinin parçalamaları üzerinde etkileri incelenmiş ve KBM alt ünitesinin selülozu bağladığı mannan bağlanmasında etkisi olmadığı bulunmuştur. *TrMan5A* enziminin yanı sıra mavi midye (*Mytilus edulis*) izole edilmiş β -mannanaz (*MeMan5A*) ve *Aspergillus niger* mantarından saflaştırılmış β -mannozidaz (*AnMan2A*) enzimlerinin katalitik alt ünitelerinin polimerik mannanı indirgeyebildiği anlaşılmıştır. Sonuç olarak, yapılmış olan tez çalışmasında *TrMan5A* enziminin iki modül içinde polisakkarit etkileşimi kompleks alt-tabakaların hidrolizi genel enzimatik etkinlik ve spesifikliğini belirlemek için önemli olduğunu ve sunulan sonuçlar bitki polisakkarit bozulması mekanizmalarını ortaya çıkarmak için karmaşık yüzeylerde mananaz enziminin kullanımının önemi üzerinde belirtilmiştir.

Xu *et al.* (2002) Mavi midye *Mytilus edulis* sindirim sisteminden izole edilmiş endo- β -1,4-mannanaz enziminin iki varyantının iyon afinite kromatografisi, guanidin hidroklorid varlığında veya yokluğunda belirlenen boyut dışlama kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi kullanılarak endo- β -1,4-mannanaz enziminin karakterizasyonu ve protein dizi sekansının yapıldığı çalışma sonucu MALDI-TOF kütle spektrometrisi kullanılarak monomerik proteinlerin moleküler ağırlıkları 39.216 ve 39.265 Da olarak bulunmuş, poliakrilamid jel kullanılarak her iki enzimin izoelektronik noktası yaklaşık olarak 7.8 olarak belirlenmiştir. Optimum pH aralığı 4.0-9.0, stabil pH yaklaşık 5.2 olarak bulunmuş, ManA ve ManB enzim varyantları için optimum sıcaklık 50–55°C, stabil sıcaklık 40-50°C olarak ölçülmüştür. Her iki enzim locust bean gum ve Afrika hurma kozalağı substratlarında bulunan galaktomannanların tümünü parçaladığı, ksilen ve karboksimetil selüloz çapraz bağlantılarını sindiremediği belirtilmiştir.

Puchart *et al.* (2004) *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (eski adıyla *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749) fungusundan sıvı kültür ortamında DEAE Sefaroz ve Fenil Sefaroz kolon kromatografileri kullanılarak izole edilmiş ekstraselüler endo- β -1,4-mannanaz, *MAN I* (major tip) ve *MAN II* (minör tip) enzimlerinin SDS-PAGE elektroforezi ile molekül ağırlıkları *MAN I* ve *MAN II* enzimleri için sırasıyla 60 ve 63

kDa olarak tespit edilmiş ve her iki enzim için optimum pH 4.5, optimum sıcaklık 60°C, stabil pH aralığının 4.5–8.5 arasında değiştiği son olarak sabit sıcaklığın 50–75°C aralıklarında olduğu bildirilmiştir. Lokust bean galaktomannan substratı kullanılarak belirlenmiş K_m (mg/ml) ve V_{max} ($\mu\text{mol.dak}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) değerleri *MAN I* için 3.07 mg/ml ve 1935 $\mu\text{mol.dak}^{-1}.\text{mg}^{-1}$; *MAN II* enzimi için 3.12 mg/ml ve 214 $\mu\text{mol.dak}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ olarak ölçülmüştür.

Phothichitto *et al.* (2006), 23 toprak örneğinden izole edilmiş 19 bakteri ve 4 fungus türünde mannaz enziminin izolasyonunu ve üretimini sağlamak, enzimin özelliklerini tanımlamak amacıyla yaptıkları çalışmalarında *Salmonella serovar Enteritidis* S003, *Escherichia coli* E010, *Lactobacillus reuteri* AC5. izolatlarından elde edilen *Bacillus circulans* NT 6.7, suşunda yüksek mannaz aktivitesi görüldüğü (0.306 unit/ml), *Bacillus circulans* (NT 6.7,) suşunda morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal özellikleri (API 50 CHB, %99.5) ve 16 S rDNA sekansı (%99) tanımlanmış ve bu suşlarda mannaz enziminin optimum pH 7.0-9.0, optimum sıcaklık ve stabil sıcaklık değeri 50°C olarak tespit edilmiştir. Mannaz üretiminde *B.circulans* NT 6.7 suşunun kullanılabilceği ileri sürülmüştür.

Benech *et al.* (2007) *Phanerochaete chrysosporium* cDNA'sında kodlanan endo-1,4- β -D-mannanaz enziminin *man5D* geni klonlanarak, *Aspergillus niger* fungusunda ekspresyonunun yapıldığı çalışmada, gen sekans analizi sonucu enzimin N-terminal ucunda: bir salgı sinyal peptidi, selüloz bağlayıcı domain, bağlayıcı bölge ve bir glikozil hidrolaz ailesi 5 katalitik bölgesinden oluştuğu anlaşılmıştır. Rekombinant *man5D* molekül ağırlığının SDS-PAGE analizi sonucu yaklaşık 65 kDa olduğu bildirilmiştir. Optimal enzim aktivitesinin pH 4.0-6.0 ve 60°C olduğu enzim stabilitesinin pH 4.0-8.0 ve 60°C'ye kadar korunduğu, belirlenmiş, optimum koşullarda LBG, mannan, galaktomannan ve glukomannan substratları kullanılarak V_{max} (U/mg) değerleri LBG substratı için V_{max} ; 510 U/mg; K_m (mg/mL) değerleri; 3 olduğu bildirilmiştir. Yumuşak odundan yapılmış hamur kağıdına *Man5D* enzimi uygulanarak bu enzimin esas olarak glukomannan hidrolize ettiği ve bir ön ağartma

maddesi olarak kağıt sanayinde pozitif etkisi olduğu yapılmış çalışmada ortaya konmuştur.

Maria *et al.* (2008) solar tuzdan izole ettiği *Scopulariopsis candida* fungusunun LMK004 ve LMK008 suşlarından izole ettikleri endo- β -1,4-mannanaz enziminin karakterizasyonu ve saflaştırılması çalışmasında enzimi saflaştırmak için amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi metodlarını kullanmışlardır. β -mannanaz proteinin molekül ağırlıkları LMK004 ve LMK008 suşunda ayrı olmak üzere sırasıyla 41 ve 28 kDa olarak tahmin edilmiştir. LMK004 suşundan izole edilen β -mannanaz enziminin optimum pH 5.0 ve 50°C'de yüksek aktivite göstermiş, 24 saat boyunca 4°C'de pH 5.0–6.5 aralığında \geq %80 oranında aktivite göstermiş olduğu, LMK008 suşunda 30 ve 40°C sıcaklıkta pH 6–7 aralığında 3 saat boyunca aktivite gözlemlendiği bildirilmiştir.

Song *et al.* (2008) Antartika Yosun Böceği türü *Cryptopygus antarcticus* klonlanmış β -1,4-D-mannanaz (*CaMan*) enziminin karakterizasyonunun yapılmış olduğu çalışma sonucu *CaMan* enziminin soğuk aktif enzim özelliklerini gösterdiği bildirilmiş ve *E. coli Rosetta-gami* (DE3) ekspresyonu sağlanıp nikel afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. SDS-PAGE jel elektroforezi sonucu proteinin molekül ağırlığı yaklaşık 40kDa olarak bulunmuştur. *CaMan* enziminin locust bean gum (LBG) substratında 416.3 U/mg, konjak ununda 302.6 U/mg ve β -1,4-mannan substratında 203.8 U/mg aktivite gösterdiği, gua-gum, karboksimetil selüloz, çözünebilir nişasta ve laminarin substratlarında enzimin aktivite göstermediği belirtilmiştir. Standard LBG metodu kullanılarak optimum pH 3.5 olarak belirlenmiş ve enzimin maksimum %50 aktivitesinin pH 2.5–6.0 aralığında devam ettiği, 7.0 üzerindeki pH larda aktivitenin kaybolduğu, optimum sıcaklığını 30°C'de gösterdiği enzimin 0–5°C'lerde aktivitesini %20–40 oranında sürdürdüğü ve 45°C üzerinde ki sıcaklıklarda enzim aktivitesinin gözlenmediği bildirilmiştir. Na⁺, K⁺, Mg²⁺, ve Cu²⁺ metal iyonlarının enzim aktivitesini güçlendirdiği, Ca²⁺ ve Zn²⁺ iyonlarının 5 mM konsantrasyonları aktiviteyi iki kat artırdığı, Mn²⁺, Hg²⁺, ve Ag⁺ metal iyonlarının enzim aktivitesini yüksek

oranda inhibe ettiği, EDTA'nın enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı yapılmış olan çalışmada ortaya konmuştur.

Zahura *et al.* (2010) Mannan proteinini parçalayan β -1,4-mannanaz enziminin deniz tavşanı *Aplysia kurodai* sindirim sisteminden amonyum sülfat çöktürmesi ve konvensiyonel kolon kromatografisi yöntemi ile izole edildiği çalışmada *AkMan* olarak adlandırılan enzimin SDS-PAGE analizi ile molekül ağırlığının 40,000 Da olduğu belirlenmiş, sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) kullanılarak optimal sıcaklık 55°C ve pH 4.0–7.5 aralığında enzim aktivitesinin yüksek olduğu dolayısıyla enzimin asidik pH larda stabilitesini koruduğu bildirilmiştir. *AkMan* metal iyon aktivitesinin ölçümü sonucu Fe^{3+} iyonunda enzim aktivitesinin tamamen durduğu, Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Ag^+ iyonlarında aktivitenin %80–50 arasında azaldığı, Co^{2+} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , DTT ve 2-merkaptoetanol ortamında ise enzim aktivitesinin %50 oranında arttığı bildirilmiştir. β -1,4-mannanaz enziminin, konjak kökü ve galaktomannan (tara zamkı ve guar sakızı) substratlarının yanı sıra, linear β -1,4-mannandan gelen glukomannanı parçaladığı Selüloz, agaroz, dekstran ve ksilan karboksimetil substratlarında enzim aktivitesinin görülmediği ortaya konmuştur.

Dyk *et al.* (2010) bitki biyokütlelerinin sindirmesinde rolü bilinen mikro organizmalarda bulunan enzimlerin bitkilerde bulunan benzer substratlarda şeker monomerlerinin indirgeyici etkilerini araştırmışlardır. *Bacillus licheniformis* SVD1 bakteri suşunun selülotik ve hemiselülotik sistemleri incelenerek sahip olduğu multi enzim kompleksi içerisinde şeker monomerlerinin indirgeyen enzimlerin çeşitliliğini incelemek için araştırma yapmışlardır. Bu çalışmada, zimojen analiz yöntemi kullanılarak iki endoglukanaz (25-27 kDa, 30-32 kDa), yedi ksilanaz (20 kDa, 38 kDa, 42 kDa, 45 kDa, 48 kDa, 54 kDa ve 70 kDa), iki mannanaz (25 kDa, 40–42 kDa) ve bir pektinaz (pektateliyaz 70-72 kDa) enzimi tanımlanmış. SDS-PAGE jel elektroforezi ile proteinlerin molekül ağırlıkları; endoglukanaz 55 kDa, mannanaz 53 kDa ve pektin metil esteraz için 38 kDa olarak bulunmuştur. Multipli enzim kompleksi içinde mannanaz enzimi için lokust bean gum substratı kullanılarak optimum pH 6.0–7.0 aralığında yüksek aktivite gösterdikten sonra pH 9.0 aralığında enzim aktivitesinin

tekrar yükseldiği bildirilmiştir. Böylece hem selülotik yapıların kompozisyonunun çözülmesi ile kompleks lino selülotik yapıların parçalanmasında multipli enzim komplekslerinin kullanılabilirliği ortaya konmuştur.

Shi *et al.* (2011) *Streptomyces sp.* S27 fungusundan izole edilmiş β -mannosidaz geni, *man2S27* geninin klonlanarak *Escherichia coli* BL21 (DE3) suşunda eksprese edilmesi ve rekombinant *man2S27* geninin ürettiği enzim ve protein karakterizasyonunun yapıldığı çalışmada *man2S27* geninin 2499 bp uzunluğunda, 832 amino asit kodladığı ve molekül ağırlığının 92.6 kDa olduğu bildirilmiştir. Rekombinant *Man2S27* enziminin optimum pH ve stabil pH belirlemek amacıyla farklı pH'larda hazırlanmış 0.1 M McIlvaine tamponu (pH 2.0–8.0), 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0–9.0), ve 0.1 M glisin-NaOH (pH 9.0–12.0) tamponları kullanılarak 37°C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmış enzimin optimum pH'sı 7.0 olarak tespit edilmiş ve stabil pH 6.0–9.0 aralığında değiştiği belirtilmiştir. Optimum sıcaklık için 1 M McIlvaine tamponu (pH 7.0) kullanıldığı farklı sıcaklıklarda (20–80°C) 10 dakika enzim inkübasyondan sonra optimum sıcaklık 50°C olarak belirlenmiş ve stabil sıcaklık aynı tampon kullanılarak 1 saat boyunca yapılmış aktivite ölçümleri sonucu 40-50°C'de yüksek aktivite gösterdiği 20 dak. ölçümden sonra diğer sıcaklık değerleri için enzim aktivitesinin düştüğü ortaya konmuştur. Enzim aktivitesi üzerindeki çeşitli metal iyonları ve kimyasal reaktifler etkisini ölçmek için 1 M McIlvaine buffer (pH 7.0) içeren 5 mM of AgNO₃, CaCl₂, CoCl₂, CrCl₃, NiSO₄, CuSO₄, MgSO₄, FeSO₄, MnSO₄, ZnSO₄, EDTA, SDS veya β -merkaptolanol kullanılan çalışmada EDTA, Ca²⁺ ve Mg²⁺ iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin bulunmadığı, Cr³⁺ ve SDS'li ortamda enzim aktivitesinin yüksek oranda inhibe olduğu ve Ag⁺, Hg²⁺ enzim aktivitesinin tamamıyla durduğu gösterilmiştir. p-NP- β -MP substrat ortamında K_m, V_{max} ve kcat değerleri 0.23±0.01 mM, 197±4.96 μ mol.dak⁻¹.mg⁻¹ ve 305±7.65 s⁻¹ belirlenmiştir.

Zhao *et al.* (2011) *Aspergillus niger* CBS 513.88 fungusundan klonlanmış mannan endo-1,4- β -mannosidaz *man26A* geninin konstitütif ekspresyon vektörü pGAPzaA aracılığıyla *Pichia pastoris* aktararak ekspresyonunun sağlandığı ve enzim

karakterizasyonunun yapılmış olduğu çalışmada rekombinant *man26A* protein molekül ağırlığının yaklaşık 45 kDa olduğu, 5–60°C sıcaklık aralığında enzimin %30 oranında aktivite gösterdiği en yüksek aktivitenin optimum 45°C ve pH 5.0 olduğu değerlerde görüldüğü, LBG substratında (%100), konjak tozu (%36.0) ve guar zambında (%14.2) oranında aktivite gösterdiği, akgürgen ksilanı, çözülebilir nişasta ve karboksil metil selüloz substratlarında aktivite görülmediği bildirilmiştir. Guar gum substratı, konjak tozu ve LBG substratları kullanılarak belirlenmiş V_{max} (U/mg) değerleri sırasıyla; 769.20, 1250.00 ve 5000.00; K_m (mg.mL⁻¹) değerleri; 2.87, 23.50 ve 26.50 olarak bildirilmiştir. Sonuç olarak *rman26A* enziminin asidik pH aralıklarında aktivite göstermesi, stabil sıcaklık aralığının geniş olması, yüksek termotoleransı ve ekspresyonunun kolay yapılabilmesi nedenleriyle gıda alanlarında, hayvan yemi ve biyoyakıt üretiminde enzimin kullanılabilirliğinin mümkün olduğu savunulmuştur.

Dilokpimol *et al.* (2011) *Aspergillus nidulans* FGSC A4 suşundan kolonlanmış Glikozid hidrolaz 5 (GH5) ailesi üyesi endo-β-1,4-mannanaz *ManA* ve *ManC* ve *Pichia pastoris* X33 vektöründe eksprese etmişlerdir. Kültür ortamında her iki enzimin 120 ve 145 mg/L, oranında verimle izolasyonunun yapılmış olduğu çalışmada mutant enzimlerin monomerlerinin SDS-PAGE ve jel filtrasyon analizleri ile molekül ağırlıkları 59 ve 56 kDa olarak bulunduğu belirtilmiştir. *ManA* ve *ManC* enzimleri aynı optimum pH 5.5 da aktivite göstermiş ve (N %95 aktivite) pH 4.5–7.0 ve 4.0–8.0, *ManA* ve *ManC* enzimlerinin stabilitesini koruduğu, maksimum enzim aktivitelerinin 50°C de gösterdiği ve 40°C sıcaklıkta üç saat inkübasyona kadar enzim aktivitesinin %95 oranında stabilitesini koruduğu çalışmada bildirilmiştir. *ManA* enzimleri için Locust bean gum galaktomannan, guar gum galaktomannan substratları kullanılarak ölçülmüş V_{max} (U/mg) değeri sırasıyla; 400±4 ve 390±6 *ManC* enzimi için Locust bean gum galaktomannan, Guar gum galaktomannan ve konjak glukomannan substratlarında sırasıyla 320±4, 300±1, 270±1 olarak bulunmuştur. M4-M6 hidroliz (0,2-6,0 mM) substratlarının başlangıç değerleri *ManA* için (60 nM, 30 nM ve 10 nM M4, M5 ve M6 için sırasıyla) *ManC* için (75 nM, 15 nM ve 12 nM sırasıyla, M4, M5 ve M6.) belirlenmiş oranlarda enzim kinetiklerinin ölçülmesi sonucu *ManA* enzim

K_m (mM) değerleri M5 için 2.9 ± 0.03 , M6; 1.8 ± 0.08 , *ManC* enzimi için K_m (mM); M5 için 1.8 ± 0.13 ve M6; 0.6 ± 0.04 olduğu bildirilmiştir.

Blibech *et al.* (2011) *Penicillium occitanis* (Pol6) fungusunda β - mannanaz enziminin çapraz bağlama reaksiyonu ile kitin üzerinde glutaraldehid moleküllerine immobilize edilmesi ve immobilizasyon koşulları, immobilize edilmiş enzimin karakterizasyonun belirlendiği çalışmada serbest enzim aktivitesi DNS metoduna göre keçiboynuzu zamkı (LBG) serbest indirgeyici şeker oranının llmesine dayanarak 50 mM sodyum asetat tamponu pH 5.5 ve 0.5 mL dilue enzim solüsyonunun 50°C 'de 30 dak. inkübasyona bırakıldıktan sonra 540 nm de spektrofotometrik aktivite tayini ölümü yapılarak belirlenmiştir. Enzim immobilizasyonu kitin (0.5 g)%2.5(v/v), 5 mL glutaraldehid ile çalkalanmış, çözelti santrifüjden geçirilmiştir (4000 rpm'de 10 dakika) ve daha sonra glutaraldehid serbest olana kadar damıtılmış su ile bir kaç kez solüsyon yıkanma işleminden geçirilmiştir. Çözelti halinde ki kitin solüsyonuna 0.5 mL enzim eklenerek (87 U/ml) 4°C 'de bir gece inkubasyona bırakılmıştır. Bağlanmayan enzim saf su ile yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra immobilize enzim solüsyonu 37°C 'de 24 saat bekletilerek miks solüsyonun kuruması sağlanmış ve 4°C 'de depolanmıştır.

$$\text{İmmobilizasyon verimi} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

$$\text{Etkinlik verimi} = \frac{C}{A} \times 100$$

A= immobilizasyon için kullanılan toplam enzim aktivitesi

B= Bağlanmamış enzim aktivitesi

C= İmmobilizasyonu sağlanmış enzim aktivitesi

A-B= Teorik immobilize enzim aktivitesi kullanılarak

%2.5 gluteraldehid konsantrasyonda ve 3 mg/mL enzim eklenerek immobilizasyon şartları optimize edilerek alınmış ölçümler sonucu kitin bağlı enzim aktivitesinin %72,17, immobilizasyon veriminin %94,81 oranında gerçekleştiği bildirilmiştir.

Serbest ve immobilize enzim aktiviteleri 40–70°C arasında değişen farklı sıcaklıklarda, pH değerleri 50 mM Na-sitrat ve Na-fosfat tamponu (pH 2–6), Tris-HCl tamponu (pH 7–9) ve glisin (pH 10) farklı tamponları kullanılarak ölçülmüştür. Bağlı ve serbest enzimin optimum 60°C’de yüksek aktivite gösterdiği, bağlı enzimin aktivitesinin ise 60-80°C’lerde serbest enzime göre aktivitesini %70 oranında koruduğu tespit edilmiştir. 40-70°C arasında pH 4.0 olduğu ortamda 10 saat boyunca yarım saat aralıklarla stabil sıcaklık ölçümü alınmış ve stabil sıcaklık aralıklarında bağlı enzimin 60°C sıcaklıkta 6 saat boyunca enzim aktivitesini %50 oranında korurken serbest enzimin aynı koşullarda enzim aktivitesini 4 saat boyunca sürdürdüğü gözlenmiştir. Optimum pH değeri serbest enzimde bağlı enzime göre daha asidik olduğu bağlı enzimin optimum pH’sının 4.0’a doğru kaydığı, 4 saat boyunca 50°C’de inkübasyona bırakılmış bağlı enzimin 2.0-9.0 aralığında değişen farklı pH larda aktivitesini %50 oranında koruduğu böylece pH stabilite çalışmasının immobilizasyon işleminin alkalın ve ağır asidik ortamından mannanaz enzim aktivitesini koruduğu bildirilmiştir. 4°C’de pH 7’de 150 gün boyunca depolanmış kitosan-immobilize mannanaz enziminin depolanma dayanıklılığının ölçülmesi sonucu 120 gün depolanmış enzimin aktivitesini %70 oranında korurken serbest enzimin %50 aktivitesini sürdürdüğü ayrıca lokus bean gum hidrolizi sonucu manotrioz ve manotetroz şekerlerini indirgediği yapılmış analizlerle ortaya konmuştur.

Zhou *et al.* (2012) *Sphingomonas sp.* JB13 suşundan izole edilmiş mannanaz kodlayan genin (1191 bp) klonlandığı klonlanmış rekombinant *ManAJB13* geni *Escherichia coli* BL21 (DE3) suşunda eksprese edilerek enzimin karakterizasyonu tanımlanmıştır. Ekspresyonu yapılmış enzim saflaştırılarak SDS-PAGE analizi sonucu protein molekül ağırlığı yaklaşık 48.0 kDa olarak belirlenmiş, pH 6.5 ve 37°C sıcaklıkta %0.5 (w/v) locust bean gum ve konjak tozu substratlarında *rManAJB13* enziminin spesifik aktivitesi 119.9 ve 126.3 U mg⁻¹ olarak bulunmuştur. 37°C sıcaklıkta saflaştırılmış

rManAJB13 optimal mannanaz aktivitesi pH 6.5'ta ve maksimum aktivitenin pH 5.0 ve 8.0 aralığında ölçüldüğü, enzimin termal aktivitesi pH 6.5'ta, optimal 40°C, enzim stabilitesinin 37°C 60 dak. inkübasyonda aktivitesini sürdürürken, 45°C sıcaklıkta 15 dak. bekletilmiş enzim aktivitesinin yarı yarıya düştüğü gözlenmiştir. Enzim aktivitesi üzerindeki 10 mM konstrasyonunda hazırlanmış çeşitli metal iyonları ve kimyasal reaktiflerin (KCl, CaCl₂, CoCl₂, NiSO₄, CuSO₄, MgSO₄, FeSO₄, FeCl₃, MnSO₄, ZnSO₄, HgCl₂, EDTA, β-merkaptotanol, SDS, yada 10% ethanol (v/v)) etkisinin ölçülmesi sonucu Pb²⁺, SDS, Hg²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺ iyon ortamında enzimin güçlü oranda inhibe olduğu, 10 mM Zn²⁺, Co²⁺ ve %10 (v/v) etanol, β-Merkaptotanol, Ni²⁺, Mg²⁺ ve EDTA enzim aktivitesini sırasıyla 1.7-, 1.6-, 1.6- ve 1.2-kat arttığı, Fe³⁺, K⁺, Ca²⁺ ve Cu²⁺ iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde etkisi bulunmadığı bildirilmiştir. Locust bean gum substratı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiğine göre K_m, V_{max} değerleri sırasıyla 5.0 mg mL⁻¹ ve 277.8 μmol.dak⁻¹.mg⁻¹ olduğu yapılmış çalışmada ortaya konmuştur.

Katrolia *et al.* (2012) *Chaetomium sp.* CQ31 fungusundan klonlamış yeni bir mannanaz gen kaynağı olarak üretmişlerdir. Rekombinant mannanaz enzim geni *CsMan5A* geninin klonlanması ve eksprese ettiği enzimin karakterizasyonunun yapılmış olduğu çalışmada *Pichia pastoris* fungusuna transforme edilip ekspresyonu sağlanan *CsMan5A* geninin 251bp ORF(Açık okuma bölgeleri) içerdiği ve 416 aminoasit kodladığı yapılmış olan RACE-PCR ve gen sekanslama teknikleri ile belirlenmiştir. Q-Sefaroz kolum kromatografisi ile eksprese edilmiş mannanaz enzimi saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Miller tarafından tanımlanmış DNS metodu ile enzim aktivitesi ölçülmüş bu amaçla 100μL mannanaz enzimi 50 mM Na-sitrat tamponu (pH 5.0) içinde çözündürülmüş 900 μL %5 locust bean gum (LBG) substratı kullanılarak 55°C'de 10 dak. inkübasyona bırakıldıktan sonra 1 mL %40 sodyum-potasyum tartarat eklenmiş DNS çözeltisi enzim karışımı 15 dak. 100°C su banyosunda inkübasyona bırakıldıktan sonra 540nm absorbans değerinde spektrofotometrik ölçüm alınmıştır. Sodyum sitrat (pH 3.5–6.0), sodyum asetat (pH 4.0–5.5), MOPS (pH 6.0–8.0), sodyum fosfat (pH 6.0–8.0), CHES (pH 8.0–10.0), CAPS (pH 9.0–11.0) ve GlisinNaOH (pH 9.0–12.0) tamponları kullanılarak optimum

pH 5.0, DNS ve LBG substratı kullanılarak optimum sıcaklık 65°C olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi üzerinde metal iyonlarının ve metal-şelatlayıcı kimyasal reaktiflerin enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin ölçülmesi ile Mn^{2+} , Ag^+ , SDS (kontrolde göre, %50, %20, %20 oranında) aktivitenin düşük olduğu ve Hg^{2+} iyonu bulunan ortamda enzim aktivitesinin tamamen kaybolduğu gözlenmiştir. Enzimin substrat spesifikliğinin LBG galaktomannan(%100) guar gum galaktomannan (%71.3) ve konjak glukomannan (%46.1) gözlendiği, karboksimetil selüloz (CMC), nişasta, ksilen ve Avisel substratlarında enzim aktivitesinin gözlemlenmediği, LBG, guar gum ve konjak tozu substratları ile belirlenmiş K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla LBG substratı için K_m 3.1 mg.mL⁻¹ ve V_{max} değeri 5974.3µmol.dak⁻¹.mg⁻¹ olarak ölçüldüğü bildirilmiştir. Sonuç olarak mannan polisakkaritlerini mannoz ve manno oligosakkaritlere degrade etmenin yanı sıra mannonitroz ve mannotetraoz enzimlerinin hidrolize edebilme özelliği ölçülmüş rekombinant CsMan5A mannanaz enziminin gıda, yem ve kağıt/kağıt hamuru endüstrisinde kullanılabileceği önerilmiştir.

Katrolia *et al.* (2012) *Chaetomium sp.* CQ31 ve *Pichia pastoris* bakterilerinde ifade ettikleri ve amino asit sekansının belirlendiği mannanaz geni (*CsMan5A*) ve enziminin karakterizasyonu çalışmaları sonucu enzimim optimal pH 5.0 ve 65°C'de aktivite gösterdiği, enzimin lokust bean gum (K_m ; 3.1 mg. mL⁻¹), guar gum (K_m ; 9.3 mg.mL⁻¹) ve konjak unu (K_m ;10.5 mg.mL⁻¹) substratlarında aktivite gösterdiği bulunmuştur.

Zahura *et al.* (2012) deniz gastropod türü *Aplysia kurodai* sindirim sıvısından amonyum sülfat çöktürme yöntemi, Toyopearl Butyl-650 M, Toyopearl DEAE-650 M, ve Superdex 200 10/300 GL kolon kromatografileri ile saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık 100 kDa olan β-D-mannosidaz (EC 3.2.1.25) enziminin biyokimyasal karakterizasyonunun yapılmış olduğu çalışmada saflaştırılmış enzim *AkMnsd* olarak adlandırılmıştır. Enzimin optimum pH 4.5 ve 40°C aktiviteye sahip olduğu, 38°C altında pH 2.0-6.7 aralığında enzim stabilitesini koruduğu ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış (0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, ve 5.0 mM) p-nitrophenyl β-D-mannopiranosid substratları kullanılarak kinetik parametreler, Michaelis–Menten

sabiti (K_m) değeri; 0.10 mM ve maksimum reaksiyon hızı (V_{max}); 3.75 $\mu\text{mol/dak/ mg}$ olarak belirlenmiştir.

Utami *et al.* (2013) manno-oligosakkarid prebiotiğinin üretiminde kullanılan palm kernel kekinin (PKC) hidrolize edilmesinde kullanılmak üzere bakteriyel mannanaz enzim karakterizasyonu yapılan çalışmada toprak örneklerinden izole edilmiş *Brevibacillus borstelensis* bakterisinin A2 izolatında tanımladıkları mannanaz enziminin optimum pH 7.0 ve optimum 90°C sıcaklık olarak bulunmuştur. Yapılmış olan çalışma sonucunda lokal A2 izolatından (*B. borstelensis*) üretilen mannaz enziminin PKC prebiyotik üretiminde kullanılabileceği ortaya konmuştur.

Chantorn *et al.* (2013) *Klebsiella oxytoca* KUB-CW2-3 suşundan iyon değişim kromatografisi ile izole ettikleri mannanaz S1 enzim formunun S1 protein moleküler ağırlığı yaklaşık 165 kDa ve apI değeri 3.5 olarak tespit edilmiştir. Mannanaz enzim aktivitesinin DNS metoduyla ölçüldüğü çalışmada optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 4.0 ve 40°C olarak bulunmuştur, ayrıca pH 3.0–6.0 aralığında enzim aktivitesinin stabil olduğu gözlenmiştir. Enzimin, Michaelis-Menten sabitleri K_m ve maksimum hızı V_{max} ve katalitik sabiti (kcat) değerleri; LBG ve konjac mannan substratları için, sırasıyla 1.038–1.056 mg/ml, 6.149–6.183 $\mu\text{U ml}^{-1}\text{dak}^{-1}$ ve 0.047 s^{-1} olarak bulunmuştur. Metal iyon aktivitesinde Co^{2+} (%129) aktivite gösterdiği, EDTA ve Zn^{2+} metal iyonlarında enzimin tamamen inhibe olduğu ortaya konmuştur.

Adesina *et al.* (2013) *Aspergillus niger* ve *Trichoderma sp.* funguslarından izole ettikleri β -mannanaz enziminin üretimi ve karakteristiğini belirlemek için yaptıkları çalışmalarında her iki izolatta β -mannanaz enziminin optimum pH 5.0 ve optimum sıcaklık *A. niger* için 30°C, *Trichoderma sp.* için 30°C ve 50°C olarak bulunmuştur.

Arotupin *et al.* (2013) tarımsal atıklardan izole edilmiş 12 farklı Locust Bean Gum (LBG) ve Copra Mealin karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Çalkalamalı ve stabil agar besiyerlerinde üretilen 11 mantar izolatından (1C=Rhizopus japonicus PAP-1C, 2A=Aspergillus flavus LAD-2A, 5A=A. fumigatus LAD-A5,5B=Rhizopus japonicus

YP-5B, 7A=R. japonicus BN-7A, 7B= R. japonicus LBW-7B, 8A= R. japonicas LBW-8A, 9A11=A. glaucus LAD-9A11, 9A12= R. stolonifer LAD-9A12, 10A= A. flavus LAD-10A, 12C=Trichosporonoides oedocephalis FCN-12C) mannanaz enziminin üretimini yapmıştır. Başka bir çalışma sonucu, 11 izolatta enzim aktivitesi sabit ve çalkalamalı besiyerinde sırasıyla 0.370, 21.667 U/ml 0.278, 3.982 U/ml oranında değiştiği ve en yüksek enzim aktivitesinin 5A izolatında görüldüğü bildirilmiştir.

Ghosh *et al.* (2013) *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 suşunda β -(1→4)-mannanaz enziminin termostabil etkisi, gen sekansı ve klonlama çalışmaları sonucu enzimin karakterizasyonu ve saflaştırılmasının yapıldığı çalışmada sekanslama analizleri ile *CtManf* ve *CtManT* enzimlerinin sentezlediği iki tip protein tanımlanmıştır. Tanımlanan enzimleri ve proteinleri kodlayan gen bölgeleri pET28a (+) plazmid vektörüne klonlanarak *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinde ekspresyonu sağlanmış ve bu hücrelerden enzimlerin izolasyonu yapılmıştır. Enzim saflaştırılmasının kontrolü amaçlı uygulanan SDS-PAGE elektroforez analizleri ile *CtManf* ve *CtManT* olmak üzere her iki tip proteinin molekül ağırlığı sırasıyla 53kDa ve 38 kDa olarak bulunmuştur. *CtManf* enzimi için optimum pH ve sıcaklık 6.9 ve 60°C, *CtManT* enzimi için 6.5 pH ve 50°C olarak belirlenmiştir. Substrat spesifikliğini belirlemek amacıyla farklı substratlarla yapılmış analizler sonucu *CtManf* ve *CtManT* enzimlerinin galaktomannan substratları içerisinde karob galaktomannan 97.0±5.0 ünite.mg⁻¹ ve 91.0±4.0 ünite.mg⁻¹ oranında yüksek aktivite gösterdiği, lokust bean galaktomannan, konjak glukomannan, ve guar galaktomannan substratlarında enzim aktivitelerinin giderek azaldığı, K_m değerleri locust bean galactomannan 1.5±0.1 1.4±0.4, 3.9×10² 3.7×10² Ca²⁺ ve Mg²⁺ metal iyonu tuzlarında aktivitelerinin yüksek olduğu ve Ca²⁺ iyonunda 100°C erime sıcaklığına kadar aktivite gösterdiği ve termostabil etkilerini koruduğu yapılmış olan çalışmayla ortaya konmuştur.

Wang *et al.* (2013) Gram pozitif *Bacillus subtilis* TJ-102 bakteri suşundan β -mannanaz enzimini saflaştırılma ve karakterizasyonunu tanımlama amaçlı yapılmış çalışmada SDS-PAGE jel elektroforezi kullanılarak enzimin molekül ağırlığı 38kDa olarak

bulunmuş, optimum pH 5.0-8.0, optimum sıcaklık 50–65°C aralığında değiştiği, 1 saatlik inkübasyondan sonra stabil pH 5.0-8.0 aralıklarında enzim aktivitesinin devam ettiği, 4 saat boyunca ölçülen stabil sıcaklık değerinin 50°C'de sabitlendiği belirtilmiştir. Farklı iyon ortamlarında enzim inhibisyonun ölçülmesi sonucu Cr^{3+} , Cu^{2+} ve Fe^{+3} iyonlarının enzim aktivitesinin inhibe ettiği. K^+ , Fe^{2+} , Ca^{2+} ve Na^+ iyon ortamında enzim aktivitesinin az miktarda görüldüğü ve β -mannanaz enziminin gluko-mannooligosakkarid içeren (GDO) konjak ununu %57.76 oranında verimle %8.71 mannoz ve %14.49 glukoza hidrolizlediği ve sonuç olarak β -mannanaz enziminin odun endüstrisinde kullanılabilirliği ispat edilmiştir.

Tsukagoshi *et al.* (2014) Termitlerin bağırsaklarında bulunan simbiyotik protistlerin lignoselülozu doğal ortamda sindiren enzimler taşınmasından yola çıkılarak *Reticulitermes speratus* termitinden klonlanmış glikozid hidrolaz 26 gen ailesi üyesi mannanaz *RsMan26H* enzim geninin ekspresyonun gerçekleştirmişlerdi. Enzimin saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonunun tanımlandığı çalışmada *Pichia pastoris* fungusunda ekspresyonu yapılmış rekombinant *RsMan26H* geninin kodladığı proteinin molekül ağırlığı SDS-PAGE analizi sonucu 40 kDa olduğu belirlenmiştir. Locust bean gum galaktomannan substratı kullanılarak optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 5.0 ve 40°C olarak belirlenmiş, pH 5.0-6.5 aralığında enzim stabilitesini koruduğu, 30-40°C aralıklarında enzimin termostabilitesini koruduğu bildirilmiştir. *RsMan26H* enziminin özellikle manno-oligosakkarid reaksiyonlarında mannobiyoz ürettiği, mannotriozları parçalayarak mannoz ve mannobiyoz üretimini sağladığı yapılan analizlerle ortaya konmuştur.

Liao *et al.* (2014) *Penicillium oxalicum* fungusundan klonlanan endo-1,4- β -mannanaz enziminin, *Pichia pastoris* vektöründe ekspresyonu sağlandıktan sonra rekombinant *rPoMan5A* olarak tanımlanmış enzimin karakterizasyon çalışmaları sonucu molekül ağırlığı 61.6 kDa olarak belirlenmiş ve locust bean gum substratı kullanılarak saf *rPoMan5A* enzim aktivitesi 420.9 U.mg⁻¹ olarak ölçülmüştür. Optimum pH ve sıcaklık değerleri 80°C ve pH 4.0 olarak belirlenmiş, enzimin 58 saat sonra 60°C sıcaklıkta aktivitesini koruyarak termostabilitesinin çok yüksek olduğu ve genel olarak

40-90°C sıcaklıklarda enzim aktivitesinin sürdüğü, stabil pH aralığının 3.0-7.0 arasında değiştiği analizler sonucu ortaya konmuştur. Locust bean gum, konjak mannan ve guar sakızı substraları için ayrı ayrı olmak üzere K_m değerleri 7.6 mg mL^{-1} , 2.1 mg mL^{-1} ve 2.3 mg mL^{-1} ; V_{max} değerleri $1425.5 \text{ } \mu\text{mol.dak}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, $154.8 \text{ } \mu\text{mol.dak}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, $18.9 \text{ } \mu\text{mol.dak}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ olarak ölçülmüştür. Fe^{3+} ve Hg^{2+} iyonlarında enzim aktivitesinin sonlandığı, hidrolitik ürünlerin analizleri sonucu *rPoMan5A* enziminin farklı tipteki mannan polimerlerinin hidrolizlediği ve mannobiyoz, manotrioz ve manopentoz gibi çeşitli mannoz ve manno oligosakkaritleri serbest bıraktığı yapılmış olan çalışmada ortaya konmuştur.

Olaniyi *et al.* (2015) sıvı hal fermantasyonunda üretilmiş *t* fungusunda β -mannanaz enziminin mineral tuz çöktürme yöntemiyle sıvı ortamdan izole etmişlerdir. Saf enzim kaynağı olarak santrifüjden geçirilmiş ekstraselüler supernatantın kullanılmıştır. Lowry metoduyla protein içeriğinin belirlendiği, DNS metodu ve locust bean gum substratı ve farklı karbon kaynağı olarak tarım-atıkları kullanılarak enzim aktivitesinin ölçülmüştür. Çalışmada maksimum β -mannanaz aktivitesinin (41.667 U/mL) 120 saatlik inkübasyondan sonra gözlemlendiği, farklı tarım atıklarından portakal kabuklarının karbon kaynağı olarak kullanıldığı ortamda enzim aktivitesinin (50.000 U/ml) yüksek olduğu ve protein içeriğinin 1.482 mg/ml olarak belirlendiği bildirilmiştir. β -mannanaz enziminin optimum pH 6.0 (130.556 U/mL) ve bu pH'da protein içeriği; 1.76 mg/mL , optimum sıcaklık 30°C (136.418 U/ml) ve protein içeriği 1.875 mg/ml olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak tarım atıkları kullanılarak β -mannanaz enziminin optimum koşullarının belirlendiği çalışmada özellikle balık yavrularının larva dönemlerinde, balık yem formülasyonunun belirlenmesinde β -mannanaz enziminin katkıda bulunduğu ortaya konmuştur.

Nadaroglu *et al.* (2015) *Lactobacillus plantarum* (M24) bakterisinden amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi (DEAE-Sephadex) yöntemleri ile β -mannanaz enziminin saflaştırılarak karakteristik özellikleri belirlendiği ve meyve sularında durultma işleminde kullanımının araştırıldığı çalışma da 2619.05 kat saflaştırılmış enzim SDS-PAGE elektroforezinden geçirildikten sonra yaklaşık 36.4 ve

55.3 kDa ağırlığında iki bant verdiği tespit edilmiştir. Locust bean gum substratı kullanılarak maksimum 50°C sıcaklıkta enzim aktivitesinin yüksek olduğu, stabil sıcaklığı 30-70°C arasında değiştiği ve stabil pH için 50 mM sodyum asetat tamponu (pH 3.0- 5.0), 50 mM fosfat tamponu (pH 6.0-7.0), 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 7.0 -9.0), 50 mM karbonat tamponları (pH 10.0) kullanılarak ölçülmüş maksimum enzim aktivitesinin pH 8.0 olduğu bildirilmiştir. Locust bean gum substratı için V_{max} değerleri 78.74 EU.dak⁻¹ ve K_m 0.592 mM olarak belirlenmiştir. Fe²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ ve Zn²⁺ metal iyonlarının 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarında enzim iyon aktivitesinin çalışılmış tüm metal iyonlarında enzim aktivitesinin görüldüğü özellikle Co²⁺ ve Zn²⁺ metal iyon aktivitelerinin 5 mM konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin maksimum %254.1 ve %286.3 oranlarına ulaştığı bildirilmiştir. Mannanaz enziminin meyve sularını saflaştırma prosesinde kullanılmış olan elma, portakal, şeftali, üzüm ve kayısı sularından enzimin 50°C sıcaklıkta ve pH 8.0 ortamında şeftali suyunu 183.15 verimle %223.1 oranında durulattığı ortaya konmuştur.

Soni *et al.* (2015) termotolerant *Aspergillus terreus* FBCC 1369 fungus suşunda yüzey yanıt metodolojisi ve hurma çekirdeği kek (PKC) substratı kullanılarak β-mannanaz enzim üretimini optimize etmek amacıyla yapılmış olan çalışmada substratın parçacık boyutu, pH, nem oranı, karbon ve nitrojen ihtiyaçları incelenmiş sonuç olarak optimize edilmemiş koşullarda *Aspergillus terreus* fungusunun ürettiği enzim miktarının ölçülmesi sonucu optimum koşullar 5 g 0.5 mm'lik PKC substratı, Locust Bean Gum %1 (w/v) ve karbon ve nitrojen kaynağı olarak %1 (w/v) üre kullanılan, 12.8 ml nem oranı ve pH 8.0 olarak ölçülmüş ortamda yüksek oranda (417 U/gds) β-mannanaz enziminin üretildiği bildirilmiştir.

Yang *et al.* (2015) termofilik *Neosartorya fischeri* P1 fungusundan klonlanan yeni β-mannanaz geni *man5P1* geninin *Pichia pastoris* metalotrofik fungusunda ekspresyonunun yapmışlardır. Gen sekansının belirlendiği, enzimatik ve biyokimyasal karakterizasyonunun aydınlatıldığı çalışmada ekspresyonu sağlanan *man5P1* geninin aminoasid sekansı sonucu N-ucunda 19-sinyal peptid kalıntısı olduğu ve glikozid hidrolaz 5 ailesinin katalitik domainlerini içerdiği yapılan analizlerle ortaya

konmuştur. İyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmış rekombinant *man5P1* proteinin SDS-PAGE analizi ile molekül ağırlığının yaklaşık 43.0 kDa olduğu bildirilmiştir. 50°C’de 10 dak. 200 mM glisin-HCl (pH 2.0–3.0), McIlvaine tamponu (pH 3.0–8.0), Tris-HCl (pH 8.0–9.0), ve glisin-NaOH (pH 9.0–12.0) farklı tamponlarında bekletilmiş enzim aktivitesinin optimal pH 4.0 ve 50°C’de 1 saat substratsız inkübasyona bırakılmış enzimin pH 3.0–7.0 aralığında aktivitesini sürdürdüğü, 10 dak. optimal pH ve 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, ve 90°C sıcaklıklarında optimum sıcaklık 80°C olarak belirlenmiş ve 0, 2, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300 ve 360 dak. ayrı ayrı sıcaklıklarda enzim aktivitesinin ölçümü sonucu enzimin 40–75°C’de stabilitesini koruduğu bildirilmiştir. Ayrıca 1-5 mM konsantrasyonlarında hazırlanmış çeşitli metal iyonların ve kimyasal reaktiflerin *rMan5P1* aktivitesi üzerindeki etkilerinin araştırılması sonucu Fe³⁺, Cu²⁺, SDS, ve EDTA kısmen enzim aktivitesini inhibe ederken Ni²⁺, Mn²⁺, ve β-merkaptolanol un enzim aktivitesini güçlendirdiği sunulmuştur. Farklı substratlar kullanılarak enzimin substrat spesifikliğı McIlvaine tamponu içinde optimal koşullarda 10 dak. inkübasyondan sonra alınan ölçümler sonucu *rMan5P1*enziminin LBG substratında (%100), konjak tozu (%61.5) ve guar zambında (%41.1) oranında aktivite gösterdiği bildirilmiştir. LBG substratı kullanılarak kinetik parametreler K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.83±0.2 mg/mL ve 1937.2±28.7 l mol/dak/mg olarak bulunmuş sonuç olarak rekombinant *Man5P1*enzim geninin üstün özellikleri çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanım için potansiyel aday olarak kullanılabileceğı önerilmiştir.

Liu *et al.* (2015) Polisakkarid mannanları ve manno-oligosakkaritleri hidrolize edebilen β-mannanaz enziminin endüstriyel alanlarda uygulanmak üzere yeni enzim kaynağı oluşturması için *Bacillus subtilis* YH12 suşundan saflaştırılan yeni endo-1,4-β-mannanaz enziminin homojenizasyonu ve biyokimyasal karakterizasyonunun yapılmış olduğu çalışmada SDS-PAGE analizine göre enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 40.0 kDa olarak belirlenmiştir. saflaştırılmış enzimin optimum pH değeri 6.5 ve pH 4.5–7.5 aralığında %80 oranında enzimin aktivitesini koruduğunu bu koşullara göre saflaştırılmış endo-1,4-β-mannanaz enziminin asidik yiyecekli katkı maddelerinde aktivitesini yüksek oranda koruduğı bulunmuştur. Enzimin optimal

sıcaklığı 55°C, termal stabilitesini 60°C sıcaklıkta 1 saat inkübasyonda sonra %85 oranında koruduğu ve böylece *B. Subtilis* mikroorganizmasından saflaştırılmış mannanaz enziminin gıda endüstrisinde yüksek sıcaklıklarda uygulanan gıdaların granülasyonu ve kurutma işlemlerinde aktivitesini yüksek oranda koruduğu sonucuna varılmıştır. Enzim aktivitesi üzerindeki çeşitli metal iyonları ve kimyasal reaktifler etkisini ölçmek için 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarında hazırlanmış ditiyotretol (DTT), EDTA, SDS, fenilmetil sülfonil florid (PMSF), β-merkaptotanol ve Tween 20, 40, 60 ve 100 kullanıldığı çalışmada Na⁺, K⁺, Ca²⁺ ve Co²⁺ iyonlarında enzim aktivitesinin arttırdığı özellikle 1 mM Mg²⁺ ve Ba²⁺ ortamında enzim aktivitesinin%37 ve %.23 oranında arttığı, 1 mM Ag⁺ iyonlu ortamda aktivitenin%54.2 oranında azaldığı, Cu²⁺, Mn²⁺, Li⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺ ve Al³⁺ iyonlarında enzim aktivitesinin kısmen azaldığı sonucuna varılmıştır. β-merkaptotanol ortamında enzim aktivitesinin %123.7 oranında arttığı ve farklı derecelerde ki Tween kimyasal reaktının enzim aktivitesini artırırken EDTA, PMSF, DTT ve SDS reaktantlarında saflaştırılmış enzimin aktivitesinin inhibe ettiği bildirilmiştir. Mananaz enziminin LBG substratının hidroliz derecesinin Michaelis-Menten denklemine göre enzimin V_{max} 166.7 U/mg ve K_m değeri 30 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak yapılmış olan çalışmada, gıda ve hayvan teknolojisinin potansiyel uygulamalarında kullanılabilir yeni bir mananaz enzimi tanımlanmıştır.

Zang *et al.* (2015) yeni termostabil mannanaz enzimi kaynağı olarak kullanılmak amacıyla *Bacillus pumilus* GBSW19 bakteri suşundan izole edilmiş β-mannanaz enziminin *E.coli* vektörüne klonlanılarak ekspresyonunu yapmışlardır. Şaflştırma ve karakterizasyonunun belirlenmiş olduğu çalışmada β-mannanaz enziminin glikozid hidrolaz 5(GH5) enzim ailesi içinde 28 aminoasitlik sinyal peptidi taşıdığı ve katalitik domain içerip karbonhidrat bağlama modülü taşımadığı bildirilmiştir. Enzim karakterizasyonu çalışmaları sonucu enzimin moleküler ağırlığının 45 kDa olduğu, pH 3.0–12.0 aralığında farklı tamponlar enzimin optimum pH'sının yaklaşık 6.5 ve stabil pH aralığının 5–11 arasında değiştiği bildirilmiştir. Tris–HCl tamponu (pH 7.0) kullanılarak 0 ve 100°C arasında değişen sıcaklıklarda enzim optimum sıcaklığının

65°C olduğu ve 60°C’de 12 saat boyunca enzim aktivitesini %50 oranında koruduğu ortaya konmuştur.

Malgas *et al.* (2015) Mannan degrades eden enzimlerin davranışları özellikle substrat spesifikliği ve farklı glikozit hidrolaz (GH) enzim aileleri ile sinerjilerinin araştırılmış olduğu bir araştırma yapmışlardır. Bu çalışmada *Cyamopsis tetragonolobus* tohumları (*Aga27A*, *GH27*) ve *Aspergillus niger* (*AgIC*, *GH36*) kaynaklı galaktozidaz enzimi ve *Clostridium cellulovorans* (*ManA*, *GH5*) ve *A. niger* (*Man26A*, *GH26*) klonlanmıştır. Mannanaz enzimlerinin *E. coli* BL21 (DE3) suşunda ekspresyonu sonucu, mannanaz enziminin nikel afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmış ve moleköl ağırlığı yaklaşık 47 kDa olarak bulunmuştur. Optimal pH 50 mM sodyum sitrat tamponu (pH 4.0-6.0) ve 50 mM sodyum fosfat taponu (pH 6.0-8.0) kullanılarak *ManA* için 5.5-7.0 ve *Man26A* için 4.0-5.0 olarak bulunmuştur, 50 mM sitrat tamponu (pH 5.0) kullanılarak 30–90°C aralığında optimum sıcaklık *ManA* ve *Man26A* enzimleri için sırasıyla 40°C ve °C olarak tespit edilmiştir. Enzimlerin termal stabilitesi *ManA* için 37°C’de 90 dak. inkübasyonda aktivite devam ederken 50°C’de 30 dak. İnkübasyondan sonra aktivite gözlenmemiş, *Man26A* enziminde 24 saatlik inkübasyondan daha uzun sürede 37°C ve 50°C sıcaklıklarda enzim aktivitesinin devam ettiği bildirilmiştir. Locust bean gum hidrolizi ile enzimlerin sinerjik etkileri ölçülmüş ölçüler sonucu her iki mannanaz enziminin %75 oranında galaktoz serbest bıraktığı, guar gamında %25 oranında galaktoz serbest bıraktığı belirlenmiştir (Adıgüzel vd 2015).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmada kullanılan cihazlar

Elektroforez	(BioRad)
Hassas Terazi	(KERN ABS)
pH Metre	(WTW Series pH 720)
Vorteks	(Heidolp)
Steril Kabin	(ESCO)
Etüv	(P Selecta Cod:2001248)
Otoklav	(P Selecta)
Soğutmalı santrifüj	(J.P. Selecta Cenrtrofriger-BL)
Buz dolabı	(Bosch KAN62V70NE-Ever Med Medical refrigeration)
Su Banyosu (P Selecta)	
UV-VIS Spektrofotometre	(PG Instrument T80 UV/VIS Spectrometer)
Distile su cihazı	(GFL 2004)
Manyetik karıştırıcı	(Wise Stir MSH-20D, Stuart SB162-Are)
Peristaltik Pompa	(Labor –Schlaucpumpe- PLP 33)
Nanodrop	
UV VIS Spektrofotometre	(Epoch)

3.1.2. Araştırmada kullanılan kimyasallar

Sığır serum albumin (SSA), Locust bean gum, Na-Fitat, Ksilan, Kitin, Nişasta, Jelatin, DEAE-Sefadeks Sepharil S-200, dithioerythritol, β -merkaptotanol SDS-PAGE analizleri için Sigma(USA) firmasından, Etanol, sodyum asetat (CH_3COONa), ammonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), sodyum klorid (NaCl) ve sodyum hidrojen fosfat

monohidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) Merck (Darmstadt, Germany) firmasından satın alınmıştır ve bütün kimyasallar analitik saflıkta kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

3.1.3.a. DNS çözeltilisinin hazırlanması

10gr NaOH, 10gr DNS ve 0.5 gr Na_2SO_3 alınarak distile su ile çözdürülüp son hacim distile su ile 1lt'ye tamamlanmıştır.

3.1.3.b. Sodyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) tamponu hazırlama

20 mM sodyum sitrat 1 lt saf suda çözdürülüp 0.1 M NaOH/HCl solüsyonları kullanılarak pH 6.0'a ayarlanmıştır.

3.1.3.c. Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltinin hazırlanması

100 mg Coomassie brilliant blue G-250 alınarak, 100 mL %95'lik fosforik asitte çözüldükten sonra 50 mL %95'lik etanol katılarak boyanın tam olarak çözünmesi sağlanmış ve çözeltinin son hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

3.1.3.d. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin çözüldüğü tampon çözelti

0,1 M Tris-HCl tamponu (pH 8.0); 1.211 g (0.01 mol) Tris 95 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'ı 8.0'a getirilmiş ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

3.1.3.e. β -mannanaz enzim substrat çözeltisi

0.05 gr Locust Bean Gum daha önce hazırlanmış 100ml, 20mM sodyum sitrat tamponu içinde çözdürülerek hazırlanmıştır.

3.1.3.f. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponunun hazırlanışı

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 0,65 mL

%10'luk SDS 4,0 mL

Gliserol 1,0 mL

β -merkaptoetanol 1,0 mL

Bromfenol mavisi 0,01 g

Distile su 0,5 mL

3.1.3.g. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tampon

Tris-HCl 1,5g

Glisin 7,2 g

SDS- 1,0 g

3.1.3.h. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi

0,1 g Coomassie brilliant blue R-250, 50mL metanolde çözülerek çözeltiliye 10 mL saf asetik asit ve 40 mL distile su ilave edilmiştir.

3.1.3.i. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi

Hacimce %10 asetik asit, %30 metanol ve %60 mL distile su içerecek şekilde hazırlamak için 100 mL asetik asit ve 300 mL metanol, 600 mL saf su ile karıştırılmıştır.

3.1.3.i. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları

Çizelge 3.1. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışım miktarları ve oranları

	Ayrırma jeli	Yığılma jeli
	%10	%3
15 g akrilamid 0.4 g bisakrilamid alınarak son hacim saf su ile 30 mL'ye tamamlanır	19.8 mL	2 mL
1.5 M tris-HCL (pH 8.8) Tris-HCl 11.82 g alınarak pH 8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlanır.	22.5 mL	-
Saf su	14.1 mL	15.6 mL
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) Tris-HCl 3.94 g alınarak pH 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlanır.	-	2.48 mL
%10'luk SDS SDS 1g alınarak son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanır.	0.9 mL	0.1 mL
%10'luk amonyum persülfat Amonyum persülfat 1g alınarak son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanır.	800 µL	400 µL
TEMED	130 µL	30 µL

3.1.3.j. Amonyum sülfat çöktürmesi

Proteinlerin su içerisindeki çözünürlüklerini artırmak için ortama bir miktar nötral tuz (NaCl ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gibi) ilave edildiğinde proteinleri yüzeyinde veya iç kısımlarında bulunan hidrofobik grupların su ile etkileşim derecesi artar, böylece proteinlerin çözünürlük oranları artmış olur. Bu işleme salting in, Protein çözeltisine çok miktarda nötral tuz ilave edildiğinde, proteinlerin genellikle iç kısımlarında yer alan hidrofobik gruplar etrafındaki su molekülleri tuz iyonları tarafından uzaklaştırılır, bu durumda hidrofobik grupların birbirleri ile olan etkileşimleri artar ve proteinler çökmesi olayına salting out denir (Çiftçi vd 2004).

Protein çözeltilisinde hidrofobik alanları büyük ve daha fazla olan proteinler, hidrofobik alanları küçük ve daha az olan proteinlere göre daha çabuk birbirleri ile etkileşerek çökerler. Bu olaya proteinlerin fraksiyonlanması denir. Bu işlem için protein çözeltilisine farklı derişimlerde amonyum sülfat eklenir, oluşan çökelti santrifüjleme ile geri elde edilir ve uygun bir tamponda tekrar çözülür. Böylece çöktürme işlemi ile kısmi bir saflaştırma yapılmış olunur (Tarhan 1997; Ersöz 2010).

Çöktürme işleminde en fazla kullanılan tuz amonyum sülfattır. Amonyum sülfat proteinleri denatürasyon, proteolizis ve bakteriyel kontaminasyona karşı kararlılığını korur. Ayrıca, amonyum sülfatın çözünürlüğü çok az değişir (0-30°C) ve büyük miktarlarda ucuz bir şekilde saf olarak elde edilebilmektedir (Metin 2007).

Nötral tuzların ilavesiyle proteinlerin çöktürülerek fraksiyonlara ayrılması yönteminde kullanılan Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan +2 değerlikli tuz kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu işlem için kullanılacak uygun amonyum sülfat konsantrasyonu aşağıda verilen formüle göre hesaplanmaktadır:

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1.77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V: mantar süpernatant hacmi

S1: 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S2: 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

3.1.3.k. Optimum pH tayini için kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanışları

Mannanaz enziminin optimum ve stabil pH; 2.0-6.0 aralığındaki aktivitelerini belirlemek amacıyla farklı tamponlar kullanılmıştır.

1. Sodyum asetat tamponu

0,1 M asetat tamponu için 0,82 g sodyum asetat 100 mL distile su içinde çözülmüştür. pH:4-5 değerlerini ayarlamak için 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl çözeltisi kullanılmıştır.

2. Sodyum fosfat tamponu

0,1 M sodyum fosfat tamponu için 7,3 g sodyum fosfat alınarak 100 mL distile su içinde çözülmüştür. pH:6-7 değerlerini ayarlamak için 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl çözeltisi kullanılmıştır.

3. Tris-HCl tamponu

pH: 7.0-9.0 aralığındaki β -mannanaz enzim aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır. 10 mM Tris-HCl tamponu için 0,121 g tris HCl 100 mL distile suda çözülerek uygun pH değerlerini ayarlamak üzere 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl çözeltisi kullanılmıştır.

4. Karbonat tamponu

β -mannanaz enziminin pH:10,0-11,0 aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla 10 mM karbonat tamponu için 10,6 g sodyum karbonat 100 mL distile suda çözülerek karbonat tamponu hazırlanmıştır. Uygun pH değerlerini ayarlamak üzere 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl çözeltisi kullanılmıştır.

3.1.3.1. Bazı metal iyonlarının, kimyasalların saflaştırılan mannanaz enzimi üzerine etkisinin incelenmesi

Stok çözeltiler (5 mM)

CuCl₂ (MA: 134,45 g/mol); 0,034 g

MgCl₂ (MA: 203,3 g/mol); 0,051 g

HgCl₂ (MA: 271,52 g/mol); 0,068 g

ZnCl₂ (MA: 236,3 g/mol); 0,059 g

FeCl₂ (MA: 198,83 g/mol); 0,05 g

CaCl₂ (MA: 111,1 g/mol); 0,028 g tartılmış ve 50 mL saf suda çözülmüştür.

1 mM için bu çözeltiler 5 kat seyreltilmiştir.

K_m değeri için farklı substratların hazırlanışı

2 mM kazeinden 0,085 g

2 mM pektin için 0.015 g

2 mM selüloz için 0.06 g

2 mM nişasta için 0.016 g

2 mM fitat için 0.67 g alınarak daha önce hazırlanmış 20 mM, pH 6.0'a ayarlanmış sodyum sitrat tamponundan 50 mL içerisinde çözdürülmüştür.

3.2. Metod

Bu çalışmada kullanılan Ebişke (*Clitocybe geotropa*) mantarı Karabük ve çevresinden Ekim-Kasım aylarında toplanmış ve çalışıncaya kadar -20°C'de bekletilmiştir. Ebişke (*Clitocybe geotropa*) mantarı Atatürk Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikologları tarafından tanımlanmıştır.

3.2.1. Mannanaz enziminin *Clitocybe geotropa* mantarından saflaştırılması

Mannanaz enzimi ebişke mantarından 3 basamakta saflaştırılmıştır.

3.2.1.a. Mannanaz enziminin amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yöntemi ile kısmi saflaştırılması

İlk basamakta homojenatın önce %0-20, 20-40, 40-60, 60-80 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında, ham ekstrakta katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ az miktarlarda ilave edilmiştir. %0-20 aralığı için gerekli olan amonyum sülfat tartılmış ve $+4^\circ\text{C}$ 'de manyetik karıştırıcı üzerinde yavaş yavaş homojenata ilave edilerek karışması sağlanmıştır. Ardından karışım 10.000 xg'de 20 dakika boyunca $+4^\circ\text{C}$ 'de santrifüj edilerek çökmesi sağlanmıştır. Çökelek Tris-HCl tamponunda çözdürülerek aktivite analizlerinde kullanılmak üzere $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır. Elde edilen süpernatanta %20-40 aralığı için gerekli olan amonyum sülfat tartılarak yavaş yavaş ilave edilmiştir. Diğer yüzdelik dilimler için ayrı ayrı olmak üzere işlem her basamakta gerçekleştirilmiştir. Son çöktürme işleminin ardından elde edilen süpernatant ve çökeleklerin enzim aktivitesine bakılmış ve Bradford metoduna göre protein tayini yapılmıştır (Bradford 1976). Her bir aralıkta elde edilen çökelti en ufak hacimdeki pH'sı 7.0 olan Tris-HCl tamponunda çözülerek aktivitesi ve protein miktarı tespit edilmiştir. Çözeltiler, çalışma tamponuna karşı (0.1 M Tris-HCl tamponu, pH 7.0) tampon üç defa değiştirilmek suretiyle 3 saat pH'sı 6.0 olan 20 mM Na-sitrat tamponu içerisinde çözülerek ve yine aynı tampona karşı diyaliz edilmiştir (Nadaroglu *et al*, 2013). Diyaliz işlemi manyetik karıştırıcı üzerinde ve buz içerisinde $+4^\circ\text{C}$ gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.b. β -mannanaz enzimin DEAE-Sefadeks iyon-değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılması

İyon değişim kromatografisi proteinlerin elektrik yüküne bağlı olarak ayrışmasını sağladığından dolayı protein saflaştırma işlemlerinde çok uygulanan önemli bir tekniktir. İyon-değişim kromatografisi metodunda pozitif veya negatif yüke sahip iyon ve moleküllerin ayrışması sağlanmaktadır. Sabit faz yüzeyinde pozitif veya negatif yüklü gruplar bulunur. Eğer pozitif yüklü iyon ya da moleküllerin elde edilmesi isteniyorsa, numune katyon deşistiren kolona uygulanmalıdır. Bu halde nötr ve negatif

yüklü olanlar mobil fazda kalırlar ve pozitif yüklü olanlar sabit faza bağlanırlar. Negatif yüklü maddelerin elde edilmesi istenirse, bu kez bir anyon değiştiricisi kolona ilave edilir. Böylece nötr ve pozitif olanlar, hareketli fazla kolondan geçip atılırlar. Sabit faza bağlanmış olan türler, hareketli fazdaki iyon yoğunluğu artırılarak veya pH değiştirilerek kolondan ayrılırlar. İyon değişim kromatografisinde negatif yüklü proteinlerin saflaştırılmasında kolon dolgu maddesi olarak pozitif yüke sahip DEAE Sephadexs kullanılmıştır.

Çalışmamızda diyalizden elde edilen homojenat 80-100 mL yatak hacmine sahip olan ve 20 mM sodyum sitrat (pH; 6.0) ile dengelenmiş DEAE- Sephadexs iyon değişim kolonuna tatbik edilmiştir. Daha sonra 20 mM sodyum sitrat (pH; 6.0) ile yıkama işlemi yapılarak yıkama tamamlandıktan sonra elüsyon için gradient mikserin kolona bağlı olan ve bir mekanik karıştırıcı ile karıştırılan haznesine 250 mL, 20 mM sodyum sitrat tamponu (pH; 6.0) ve bu hazneye açılan diğer hazneye ise 250 mL, 1 M NaCl doldurulmuş ve artan iyonik şiddetle lineer gradient elüsyonu yapılmıştır. Elüatlar, kolon akış hızı 15 mL/saat'e ayarlanarak 3 mL'lik hacimler halinde tüplere alınarak ve her bir elüatın 280 nm'de absorbansına ve 540 nm'de locust bean gum substratı ile aktivitesine bakılmıştır. Aktivite gösteren tüpler birleştirilerek, Tüp Sayısı- Aktivite/Absorbans grafiği çizilmiştir. Birleştirilen elüatlar ve kolona tatbik edilen numune için Bradford metoduna göre kantitatif protein tayini ve enzim aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplanıp saflaştırma oranları belirlenmiştir (Nadaroglu 2013).

3.2.1.c. Mannanaz enziminin Sephakril S200 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılması

İyon değişim kolonundan elde edilen mannanaz enzim aktivitesi gösteren fraksiyonlar birleştirilip 20 mM sodyum sitrat tamponu (pH; 6.0) karşı diyaliz edilmiştir. Ardından 10 kDa protein boyutuna sahip olan Amicon membrane konsentratör ile konsantre edilmiş ve 0.5 M NaCl içeren 20 mM sodyum sitrat tamponu (pH; 6.0) ile önceden dengelenmiş Sephakril S200 (120 cm x 1 cm) kolonuna tatbik edilmiştir. Daha sonra

mannanaz enzimi aynı tampon ile kolondan elüe edilmiştir. Aşağıda 3.2.1.g bölümünde anlatıldığı gibi tüm fraksiyonlarda absorbans ve aktivite ölçümü yapılmıştır. Mannanaz aktivitesi gösteren tüm fraksiyonlar birleştirilip kullanılıncaya kadar +4°C’de bekletilmiştir.

3.2.1.d. SDS-PAGE elektroforezi

Clitocybe geotropa mantarından saflaştırılan β -mannanaz enziminin alt birim sayısı kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılarak belirlenmiştir. SDS-PAGE elektroforezi iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığma jeli %3, ayırma jeli %10 olacak şekilde Laemmli (1970) tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin alt birim sayısı belirlenmiştir (Laemmli 1970).

Bu amaçla elektroforez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlenmiştir. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbirine üzerine konuldu ve elektroforezin dökme aparatına sabitlenmiştir. Çizelge 3.2.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar cam pipetle dökülmüş ve jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturulmuştur. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra üst yüzeydeki n-bütanol dökülmüştür. Cam plakaların arasına tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edilmiş ve Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklenmiştir (1 gece). Numuneler her birinden 20 μ g olacak şekilde hazırlanmıştır. Toplam hacim 100 μ L olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katılarak, 3 dakika su banyosunda inkübe edilip ve numuneler soğutulup numuneler enjektör yardımıyla yuvalara ekilmiştir. Numuneler yüklenerek polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirilip elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konulmuş ve yürütme işlemi 80 V 30 dak. örneklerin yığma jeline ilerlediği görüldükten sonra 160 V yürütme işlemine devam edilmiştir. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarılmış yığma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi

içine konulmuştur ve 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerine bırakılmıştır. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılarak renksizleştirme çözeltisine konmuştur. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde jel birkaç defa yıkanmıştır. Renklendirme boyası uzaklaşıp bantlar belirginleşinceye kadar yıkama ve çalkalama işlemine devam edilmiş ve jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğraf makinesi ile görüntüler kaydedilmiştir.

3.2.1.e. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini

Clitocybe geotropa mantarından izole edilen β -mannanaz enziminin molekül ağırlığı Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi tekniği kullanılarak belirlenmiştir. 0.05 M Na_2HPO_4 1 mM DTT (ditioeritretol pH 7.0) tampon çözeltisi kullanılarak dengelenmiş kolondan öncelikle molekül ağırlığı bilinen standart protein markırı: 205 kDa, miyozin, 116 kDa, β -galaktozidaz, 97 kDa, fosforilaz b; 66 kDa, sığır serum albumin; 55 kDa, glutamik dehidrojenaz, 45 kDa, ovoalbumin; 36 kDa, gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz; 29 kDa; karbonik anhidraz'dan oluşan standart protein çözeltisi yüklenip aynı tampon çözeltiler kullanılarak protein kolondan elüe edilmiştir. Daha sonra *Clitocybe geotropa* mantarından saflaştırılan β -mannanaz enzimi kolona yüklenmiş ve 0.05 M Na_3PO_4 /1 mM DTT (pH:7) tamponu ile enzim kolondan elüe edilip elde edilen sonuçlar standart grafiklerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.2.1.f. Sefadeks G 100 jel filtrasyon yöntemi ile molekül ağırlığı tayini

Clitocybe geotropa mantarından saflaştırılan β -mannanaz enziminin moleküler ağırlığını belirlemek için Sefadeks G 100 (3.0x50 cm) jel filtrasyon kolonu kullanılmıştır. 0.05 M Na_2HPO_4 , 1 mM dithioeritretol pH 7.0 tampon çözeltisi kullanılarak kolon dengelenmiştir. Öncelikle kolondan molekül ağırlığı bilinen standart protein markırı geçirilmiş (sığır serum albumin, 66 kDa; yumurta ovalbumini, 45 kDa; pepsin, 34 kDa; tripsinojen, 24 kDa; β -laktoglobulin ve 14 kDa lizozim) ve aynı tampon çözelti kullanılarak protein kolondan elüe edilmiştir. Daha sonra

kolondan *Clitocybe geotropa* mantarından saflaştırılan β -mannanaz enzimi geçirilerek aynı koşullarda elüe edilmiştir. Elüsyon hacmi standart protein markırıla kıyaslanarak grafik çizilmiş ve saf β -mannanaz enziminin molekül ağırlığı hesaplanmıştır (Whitaker 1963).

3.2.1.g. Protein miktarı tayini

Bradford metodu, bir örnek içersindeki protein miktarının kantitatif olarak belirlenmesi için kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde boya olarak, proteinlerdeki pozitif yüke bağlanan negatif yüklü Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanılır. Asidik çözeltilerde Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile proteinlerin kompleks oluşturması, oluşan kompleksin maksimum absorpsiyonunun 595 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır. Yöntem duyarlılığı (1-100 μ g protein/mL) oldukça yüksektir (Bradford 1976; Sarıbuğa 2013).

Toplam protein miktarı Bradford yöntemine göre belirlenmiştir. Protein tayini için saflaştırmanın tüm basamaklarında elde edilmiş çökelekler ve ham ekstraktan 100 μ L ve 5 mL Coomassie Brilliant Blue boyası eklenmiştir. Örnek numuneler 15 saniye çalkalandıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve oluşan mavi kompleksin absorbans değişimi spektrofotometrik olarak 595 nm dalga boyunda saf suya karşı absorbans değeri ölçülmüştür.

Elde edilen değerler, sığır serum albumini kullanılarak çizilmiş standart grafik değerleri ile karşılaştırılarak, örneklerdeki toplam protein değerleri hesaplanmıştır (Bradford 1976). Ölçümler en az üç tekrarlı olarak yürütülmüştür.

3.2.1.h. β -mannanaz enzimi aktivite tayini

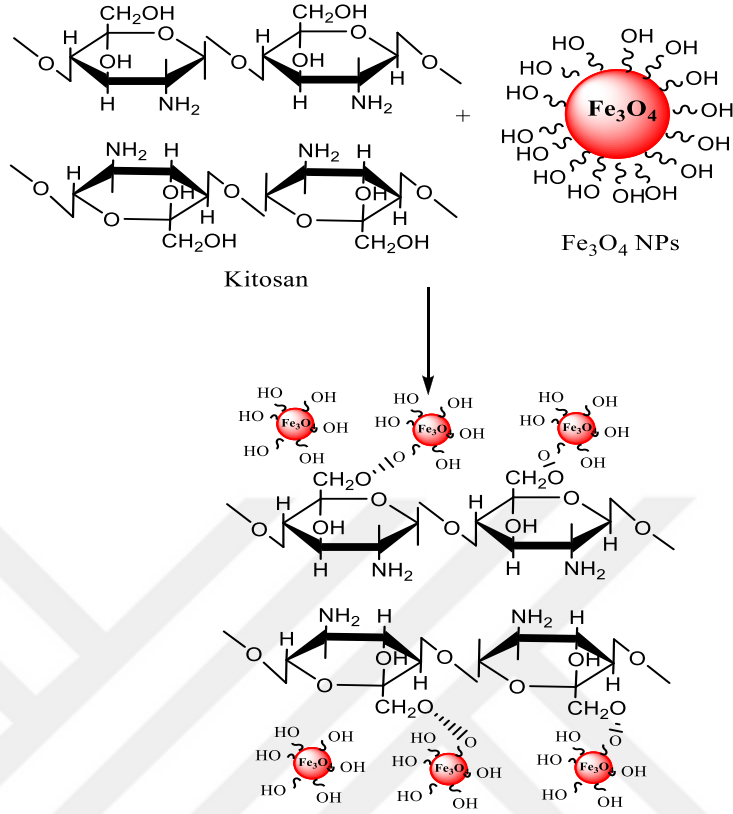
Aktivite ölçümü locust bean gum'ın mannanaz enzimi ile hidroliz edilmesinin ardından DNSA (3.5-dinitrosalisilik asid) ile renkli kompleks oluşturulması ve 540 nm'deki absorbans değişimine dayanan prensibe göre yapılmıştır (Miller 1959; Bailey

1992). β -mannanaz aktivite ölçümlerinde locust bean gum substratı kullanılmıştır. Locust bean gum tampon karışımından 900 μ L alınıp 0.1mL enzim karışıma eklenmiş ve çözelti daha önce 50°C'ye ısıtılmış su banyosunda 10 dak. bekletildikten sonra üzerine 1,5mL DNS çözeltisi eklenmiştir. Solüsyon 5 dak. 90°C su banyosunda bekletilip 540 nm'de absorbans değeri ölçülüp sonuçlar kaydedilmiştir. Kör örnek enzim yerine destile su konularak hazırlanmış kör örnek enzim yerine destile su konularak hazırlanmıştır.

3.2.1.i. Saflaştırılan enzimin destek materyaline İmmobilizasyonu

1. Kitosan destek materyalinin nano magnetitlerle kaplanması

β -mannanaz enziminin kitosan destek materyaline immobilizasyonundan öncelikle kitosanın yüzeyi Fe_3O_4 nanopartikülü ile kaplanmıştır. 1.54 g Fe_3O_4 nanopartikülü ve 5 g kitosan tartılarak %2'lik asetik asit ortamında 24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. 24 saat sürenin ardından Fe_3O_4 nanopartikülleri 1N NaOH içeren %26'luk etil alkol içerisine alınmıştır. Ardından saf su ile yıkanmış ve glutaraldehitte muamele edilme aşamasına kadar oda sıcaklığında saklanmıştır.

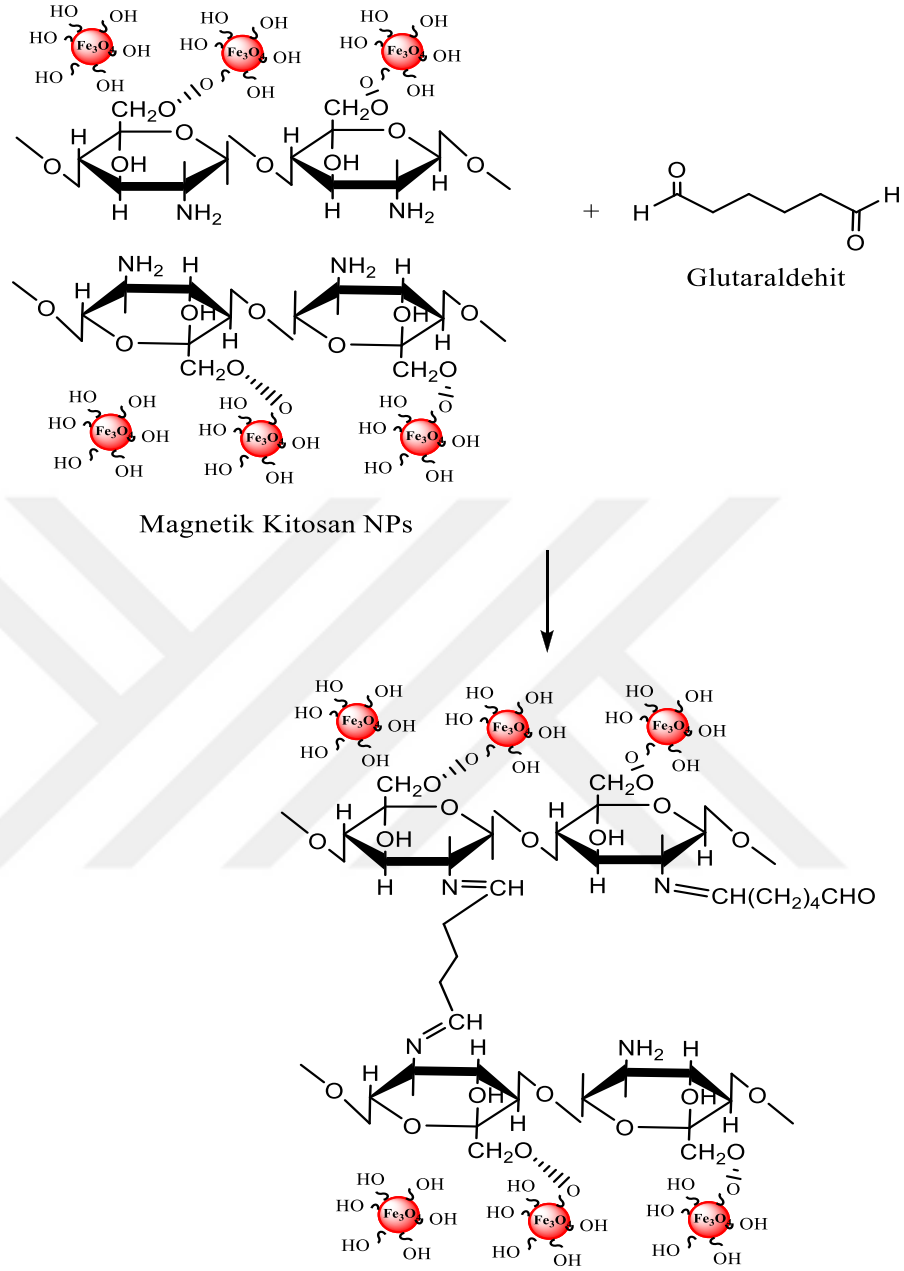


Şekil 3.1. Kitosan molekülünün Fe_3O_4 nanopartikülleri ile kaplanması reaksiyonu

2. Kitosanın glutaraldehite bağlanması ve schiff bazının indirgenmesi

Shao-Hua Chiu ve arkadaşlarının (2004) yöntemi kullanılarak magnetik kitosan moleküllerine glutaraldehit bağlanmıştır.

Magnetik kitosan nanopartikülleri üç saat boyunca asetik asit ile karıştırıldıktan sonra magnetik nanokitosan molekülleri etil alkol ortamında 1N NaOH ilave edilerek ortam nötralize edilmiş ve saf su ile yıkanmıştır. Kitosan molekülüne amin grubu bağlamak amacıyla %52'lik glutaraldehit çözeltisiyle 4 saat boyunca muamele edilmiştir. Son olarak bağlanmayan glutaraldehitler distile suyla vakum altında kitosan molekülleri yıkanarak ortamdan uzaklaştırılmıştır ve 50°C 'de kurutulmuştur. Boratynski ve Zal (1990) tarafından önerilen yöntemle göre ortamda glutaraldehit kalıp kalmadığı kontrol edilmiştir. Glutaraldehit bağlanması sonucunda arta kalan serbest amino grubu miktarının tayini Alptekin ve ark. (2009) tarafından önerilen yöntemle göre yapılmıştır.

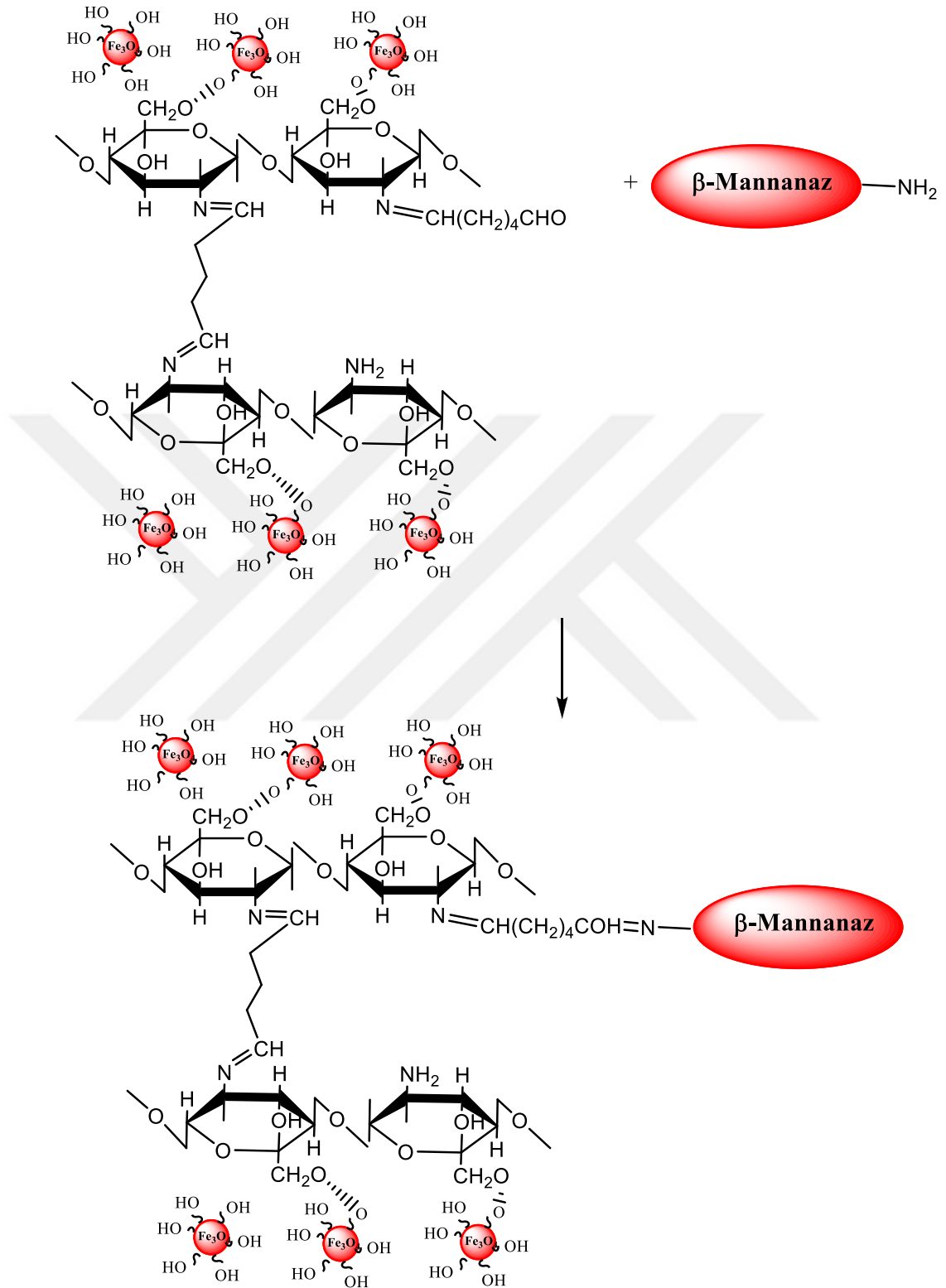


Şekil 3.2. Magnetik kitosan molekülünün glutaraldehitle bağlanma reaksiyonu

Daha sonra kurutulmuş destek materyalinden 1 g alınarak üzerine 10 mL 50 mM fosfat tamponu içerisinde (pH 7.0) hazırlanmış olan 0,25 M sodyum siyanoborhidrür (NaCNBH₃) çözeltisi ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 12 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılarak oluşan Schiff bazının indirgenmesi sağlanmıştır (Şekil 3.2). Elde edilen destek materyali bol saf su ile yıkanarak oda sıcaklığında 1 gece kurutulmuş ve kullanılıncaya kadar 4°C’de saklanmıştır.

3. Nano magenetik kitosan moleküllerine saflaştırılan β -mannanaz enziminin immobilize edilmesi

Nano Fe_3O_4 ile yüzeyi modifiye edilmiş ve glutaraldehitte etkinleştirilmiş destek materyaline *Clitocybe geotropa* mantarlarından saflaştırılmış β -mannanaz enziminin (68 EU/mL; 1,08 mg protein /mL) immobilizasyonunu gerçekleştirmek için daha önceden hazırlanmış ve kurutulmuş nano kitosan destek materyalinden 1 g alınarak 10 mL, 20 mM sodium sitrat tamponu içerisine bekletilmiştir. Ardından saf β -mannanaz enzimi çözeltiye ilave edilerek ultrasonik banyoda 30 dak süreyle inkübasyona bırakılıp enzimin destek materyaline Schiff bazı oluşturarak bağlanması sağlanmıştır (Zang *et al.* 2014) . Reaksiyon ortamındaki protein miktarı farklı zaman aralıklarında Warburg ve Bradford yöntemleri ile takip edilerek enzimin sabit materyale bağlanma miktarı zamana karşı belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Magnetik kitosan nano partiküllerinin glutaraldehit ara kolu üzerinden β -mannanaz enzimi ile Schiff bazı oluşturarak kovalent immobilizasyon reaksiyonu

3.2.1.j. Nano magenetik özellik kazandırılmış kitosan moleküllerine saflaştırılan mannanaz enziminin immobilize edilmesi için optimum koşulların belirlenmesi

Mannanaz enziminin destek materyaline en uygun immobilize olduğu koşulların belirlenmesi için tüm immobilizasyon çalışmalarında aşağıdaki optimizasyon işlemleri yapılmıştır:

En uygun immobilizasyon pH'sının belirlenmesi için immobilize enzim

pH: 4-5 için asetat tamponu,

pH: 6-7 için fosfat tamponu,

pH: 8-9 için Tris-HCl tamponları kullanılarak immobilizasyon yapılmıştır.

En uygun immobilizasyon sıcaklığının belirlenmesinde belirlenen pH'da 10, 15 ve 20°C 'de immobilizasyonlar yapılmıştır. Mannanaz bağlanma verimliliği (E) aşağıdaki gibi tanımlanır:

$$E = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100$$

C₀: β-mannanaz proteinin immobilizasyondan sonraki miktarı

C₁: β-mannanaz proteinin başlangıç miktarı

İmmobilize β-mannanazenzim aktivitesi aşağıdaki gibi hesaplanmıştır

$$\text{İmmobilize } \beta - \text{mannanaz} = \frac{A}{A_1 - A_0} \times 100$$

A:İmmobilize β-mannanaz enzim aktivitesi

A₁:Serbest enzimin immobilizasyondan sonra aktivitesi

A₀:Serbest enzimin immobilizasyondan önceki aktivitesi

3.2.1.k. *Clitocybe geotropa* mantarından saflaştırılan β -mannanaz enzimi üzerine kinetik çalışmalar

1. Optimum pH'nın belirlenmesi

Clitocybe geotropa mantarından saflaştırılan serbest ve immobilize β -mannanaz enziminin optimum pH çalışması locust bean gum substratı ve standart enzim aktivite yolu izlenerek belirlenmiştir. Optimum pH'nın belirlenmesi amacıyla dokuz farklı pH için 10mM dört farklı tampon çözeltisi hazırlanmıştır.

Bunlar;

Tampon çözeltiler

- pH: 2-3-4-5 için asetat tamponu,
 - pH: 6-7 için fosfat tamponu,
 - pH: 8-9 için Tris-HCl tamponu
- pH: 10 için Karbonat tamponu

Bu tampon çözelti aralıklarında enzimin aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülerek, bulgular grafik halinde verilmiştir.

2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Clitocybe geotropa mantarından saflaştırılan serbest ve immobilize β -mannanaz enziminin optimum sıcaklık çalışması enzimin substratı olan locust bean gum ile yapılmıştır. Bunun için 10°C-100°C arasında sıcaklık değerleri 10'ar °C artırılarak her bir sıcaklık değeri için bir tüp ve o sıcaklığa ait bir kör oluşturularak enzimin aktif olduğu sıcaklık aralığı belirlenmiştir.

3. Enzimin stabil olduğu pH'nın bulunması

β -mannanaz enziminin stabil olduğu pH'yı tespit etmek için yarım birim arttırılmak suretiyle pH'da (3,0–4,5) asetat tamponu, (5,0–7,5) fosfat tamponu ve (8,0–9,0) Tris/HCl tamponu kullanılarak belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 500 mL'sine, 250 μ L enzim çözeltisi ilave edilerek 4°C'de muhafaza edilmiştir. Başlangıçta aktiviteler ölçüldükten sonra 1 hafta boyunca her gün aynı saatlerde aktivite ölçümü yapılarak enzimin stabil olduğu pH aralığı belirlenmiştir. İnkübasyon süresine karşılık aktivite değerleri grafikler halinde gösterilmiştir.

4. Enzim için termal stabilizasyon çalışması

β -mannanaz enziminin termal stabilizasyonu ile ilgili çalışmalar enzimin locust bean gum substrat için optimum pH'sında ve 30-90°C aralığında yedi farklı sıcaklıkta yapılmıştır. İstenilen sıcaklıklar, su banyosu kullanılarak ayarlanmış ve çalışılan her bir sıcaklık değerinde deney tüpü içerisine 300 μ L enzim çözeltisi konulup aktivite ölçümü yapılmıştır. İçerisine enzim çözeltisi konulan tüp iki saat boyunca çalışılan sıcaklığa ayarlanmış olan çalkalamalı su banyosunda bekletilerek ve her on beş dakikada bir aktivite ölçümü yapılmıştır.

5. Enzim için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması

Maksimum aktivite (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitinin (K_m), grafiksel değerlendirilmesinde, $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ değerlerinin çizilmesi ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği kullanılmıştır. β -mannanaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri ile ilgili çalışmalar, 20 mM sodyum sitrat tamponunda (pH 6.0) hazırlanmış 5 mM konsantrasyonunda locust bean gum, nişasta, selüloz, fitat, ksilan, kazein jelatin ve pektin substratlarından 0.05 gr alınarak tampon içinde katı halde ki materyaller çözülerek yapılmıştır. Bunun için önce β -mannanaz enzimi ile locust bean gum, nişasta, selüloz, fitat, ksilan, kazein, jelatin ve pektin substratlarının konsantrasyonları sabit tutularak altı farklı substrat konsantrasyonunda optimum aktive ölçümleri

yapılmış ve Lineveawer-Burk grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerden elde edilen denklemlerden yararlanılarak her bir substrat için ayrı ayrı K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge halinde verilmiştir.

6. Bazı metal iyonlarının, kimyasalların saflaştırılan β -mannanaz enzimi üzerine etkisinin incelenmesi

β -mannanaz enziminin aktivitesi üzerine 5 mM ve 1 mM konsantrasyonlarındanda hazırlanan Ca^{2+} , Mg^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} ve Fe^{2+} gibi bazı metal iyonlarının etkileri in vitro olarak araştırılmıştır. Bunun için 700 μ L substrat ve 200 μ L enzim katılarak metal iyonlarından 50-100-500 μ L alınarak standart aktivite ölçümü yapılmıştır. İnhibisyon etkileri %Aktivite şeklinde grafiklendirilmiştir.

3.2.1.l. Meyve suyu durultma işlemi

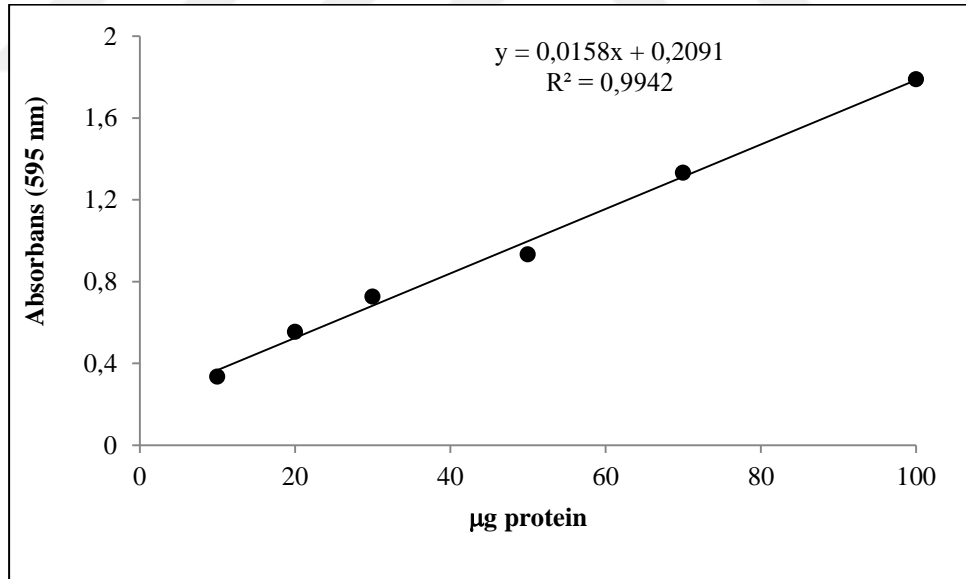
Mevsim meyvelerinden elma, portakal, nar, çilek, kivi gibi bazı meyveler pulp haline getirilerek hem immobilize enzim homojenatı hemde saf enzim eklenerek bunlara karşı saf su eklenmiş kör numuneleri hazırlanarak 4 saat boyunca enzimin optimum pH ve optimum sıcaklık ortamında çalkalamalı inkübatörde bekletilerek durultma işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından, meyve suları vakum altında süzülüp elde edilen verim hesaplanmış ve sonuçlar % verim olarak Çizelge halinde sunulmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Bulgular

4.1.1. Kantitatif protein tayin standart eğrisinin çizimi

Kantitatif protein tayini Bradford metoduna göre kantitatif protein miktarı belirlenerek *Clitocybe geotropa* mantarından (Bradford 1976) β -mannanaz enzim saflaştırma aşamalarında elde edilen ham ekstrakt, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz sonrası elde edilen diyalizat çözeltilerinin ve yıkama sularının protein miktarları standart grafik kullanılarak tespit edilmiştir. Standart çözeltideki μg proteine karşılık gelen absorban değerleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Standart çözeltideki μg proteine karşılık gelen absorban değerleri

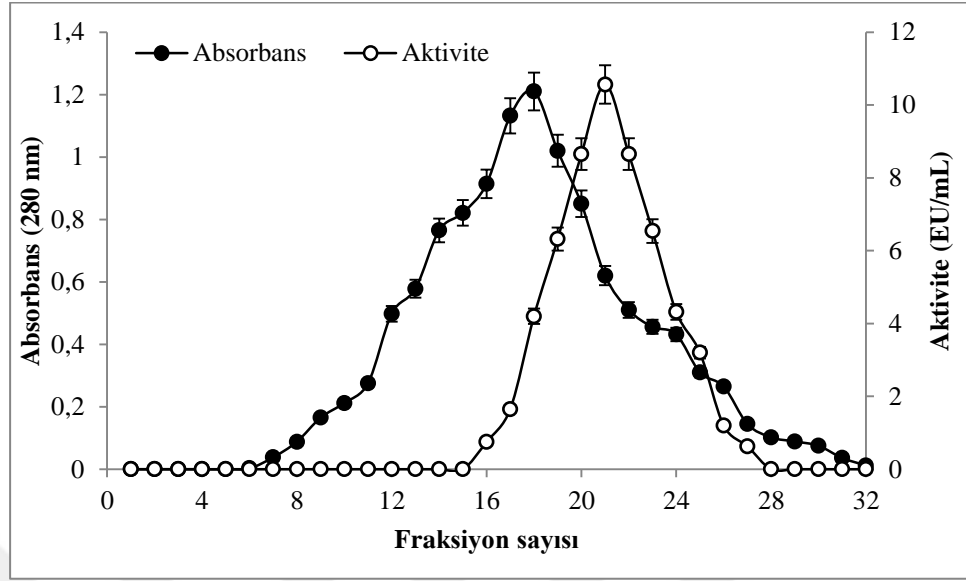
4.1.2. Enzimin saflaştırılması

4.1.2.a. Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları

Mannanaz enzimi *Clitocybe geotropa* mantardan 3 basamakta saflaştırılmıştır. İlk basamakta homojenatın önce %0-20, 20-40, 40-60, 60-80 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılmıştır. Çöktürme işlemleri sırasında 10.000xg'de 20 da. boyunca santrifüj yapılmıştır. Her defasında çökelekte ve süpernatanda bulunan enzim aktivitesine bakılmış ve amonyum sülfat çöktürme işlemleri sırasında kullanılacak katı amonyom sülfat miktarı formülle hesaplanmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi yapıldıktan sonra çökelek ve süpernatantda mannanaz aktivitesine bakılıp enzimin en yüksek aktivite gösterdiği aralık %60-80 olarak bulunmuş ve bu aralıklarda amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır.

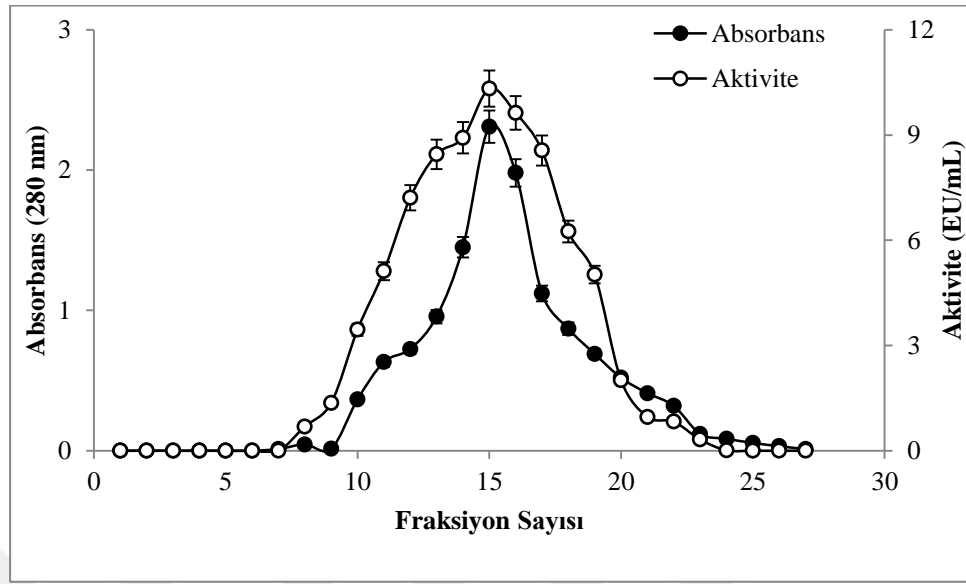
4.1.2.b. Ebişke mantarından (*Clitocybe geotropa*) saflaştırılmış β -mannanaz enziminin DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılma sonuçları

Clitocybe geotropa mantarından saflaştırılan β -mannanaz enziminin amonyum sülfat çöktürmesi uygulandıktan sonra tuzun uzaklaştırılması amacıyla Diyaliz işlemi yapılmış elde edilen homojenat DEAE-Sephadex iyon değişim kolonuna tatbik edilmiştir. Kolon kromatografisi sonucu elde edilen elüatların 280 nm'de absorban değerleri spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (Nadaroglu 2013). β -mannanaz enziminin DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi absorban değer grafiği Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. DEAE-selüloz iyon değişim kromatografi kolonu kullanılarak β -mannanaz enziminin gradient elüsyon sonucu;
 (—●—): 280 nm'de absorbansı, (—○—): aktivite, kolon 3 x 30 cm, jel yüksekliği 20 cm, elüsyon hızı 80 mL/saat ve fraksiyon hacmi 3 mL

DEAE-selüloz iyon değişim kolonundan elde edilen elüatlarda her bir elüatın enzim aktivitesine bakılarak aktivite gösteren tüpler birleştirilmiştir. %100 amonyum sülfat çöktürmesi yapıldıktan sonra Sefakril S 200 jel filtrasyon kolonuna uygulanmıştır. Elde edilen elüsyonlarla ilgili absorbans ve aktivite değerlerini gösteren grafik Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3. *Clitocybe geotropa* mantarından saflaştırılan β -mannanaz enziminin Sephakil S200 jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile saflaştırılması sonucu elde edilen elüsyon grafiği: (—●—): 280 nm'de absorbansı, (—○—): aktivite, kolon 3 x 30 cm, jel yüksekliği 20 cm, elüsyon hızı 80 ml/saat ve fraksiyon hacmi 3 mL

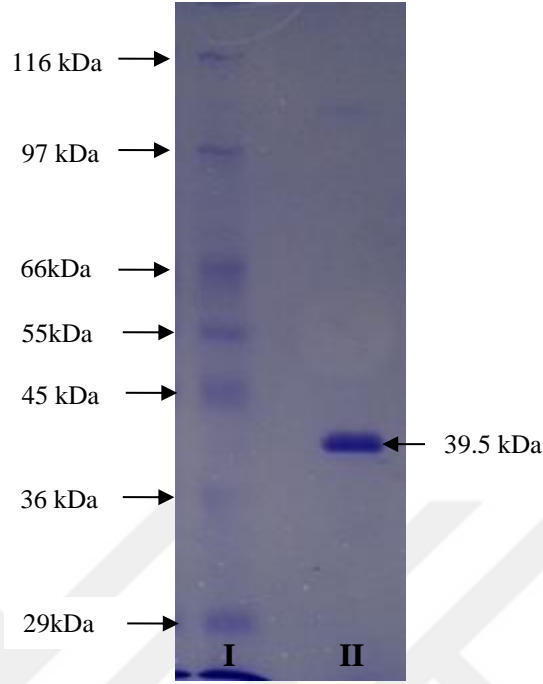
β -mannanaz enziminin saflaştırma basamakları sırasında her bir adımda enzimin protein miktarı ve aktivite ölçümü yapılarak saflaştırma Çizelgesi oluşturulmuştur (Çizelge 4.1). Saflaştırma prosedürünün son aşamasında uygulanan Sephakil S200 jel filtrasyon kromatografisi ölçümleri sonucu β -mannanaz enziminin *Clitocybe geotropa* mantarından ilk adımda amonyum sülfat çöktürmesi sonucu %64.7 verim oranıyla 13.96 kat saflaştırılmış ikinci adımda DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi kullanılarak %34.2 verimle 55.7 kat saflaştırma sağlanmış son adımda Sephakil S 200 jel filtrasyon kolonundan geçirilen enzim ürününden %21.3 verimle 176.4 kat saflaştırılma sağlanarak spesifik aktivite 83.81 EU/mg protein olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1. *Clitocybe geotropa* mantarını saflaştırmak için belirlenen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürme aralığı ve β -mannanaz enziminin aktivite değerleri

Saflaştırma Basamakları	Hacim mL	Aktivite EU/mL	Toplam Aktivite (EU)	% Verim	Protein (mg/ml)	Spesifik EU/mg	Saflaştırma Katsayısı
Ham ekstrakt	30	69.0±0.17	2.07x10 ³	100	145.3±0.12	0.475	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (% 60-80)	25	53.7±0.13	1.34 x10 ³	64.7	8.1±0.23	6.63	13.96
DEAE-Sephadex	25	28.3±0.09	7.08 x10 ²	34.2	1.07±0.7	26.45	55.7
Sephakril S 200	25	17.6±1.6	4.40 x10 ²	21.3	0.21±0.6	83.81	176.4

4.1.2.c. Ebişke mantarından (*Clitocybe geotropa*) saflaştırılmış serbest ve immobilize β -mannanaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez sonucu

Sephakril S200 jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmış mannanaz enziminin saflığını ve alt birim sayısını belirlemek amacıyla daha önce materyal-metod yönteminde anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan SDS-poliakrilamid jel elektroforez yöntemi kullanılarak protein bantları ve bant büyüklüklerini belirlemek amacıyla düşük molekül ağırlıklı standard protein karışımı kullanılarak görüntü alınmıştır. SDS-Page jel elektroforez analizi sonucu *Clitocybe geotropa* mantarından saflaştırılmış β -mannanaz enziminin tek alt üniteli ve molekül ağırlığı 39.5 kDa olarak ölçülen bant görüntüsü elde edilmiştir (Şekil 4.4).

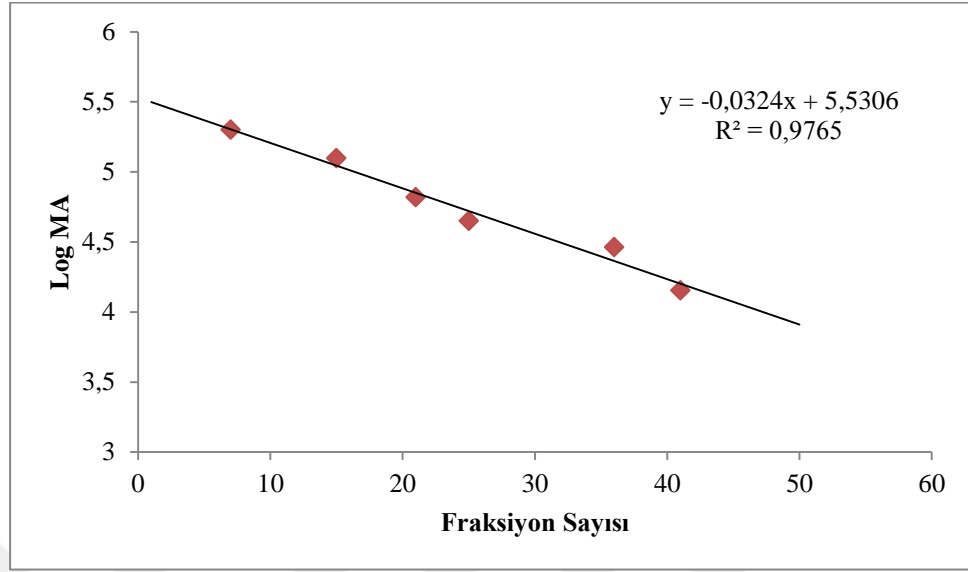


Şekil 4.4. β -mannanaz enziminin SDS-PAGE jel görüntüsü

[Sütun (I); standart protein markırı (Sigma), band büyüklüğü: 205 kDa, miyozin, 116 kDa, β -galaktozidaz, 97 kDa, fosforilaz b; 66 kDa, sığır serum albumin; 55 kDa, glutamik dehidrojenaz, 45 kDa, ovoalbumin; 36 kDa, gliseralehid-3-fosfat dehidrojenaz; 29 kDa; karbonik anhidraz) Sütun (II); *Clitocybe geotropa* mantarından saflaştırılmış β -mannanaz enzimi]

4.1.2.d. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini sonuçları

Clitocybe geotropa mantarından izole edilen β -mannanaz enziminin molekül ağırlığı Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Standart protein çözeltileri kullanılarak Ebişke mantarından saflaştırılmış β -mannanaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı 39.5 kDa olarak belirlenmiştir. Molekül ağırlığı tayini için hazırlanan standart grafik Şekil 4.5'te verilmiştir.



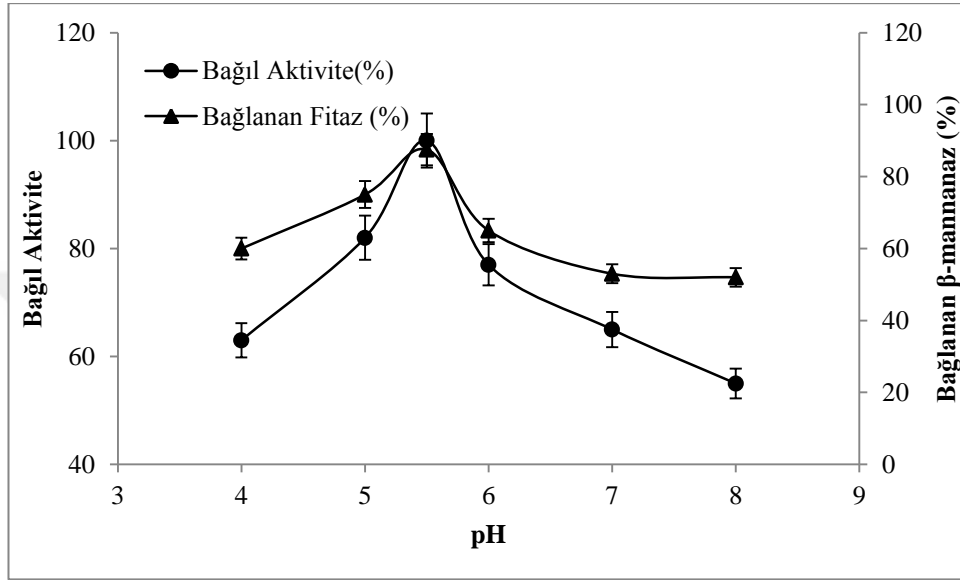
Şekil 4.5. *Clitocybe geotropa* mantarından izole edilmiş β -mannanaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği

4.1.2.e. β -mannanaz enziminin magnetik kitosan molekülüne glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent bağlanması için immobilizasyon koşullarının optimizasyonu

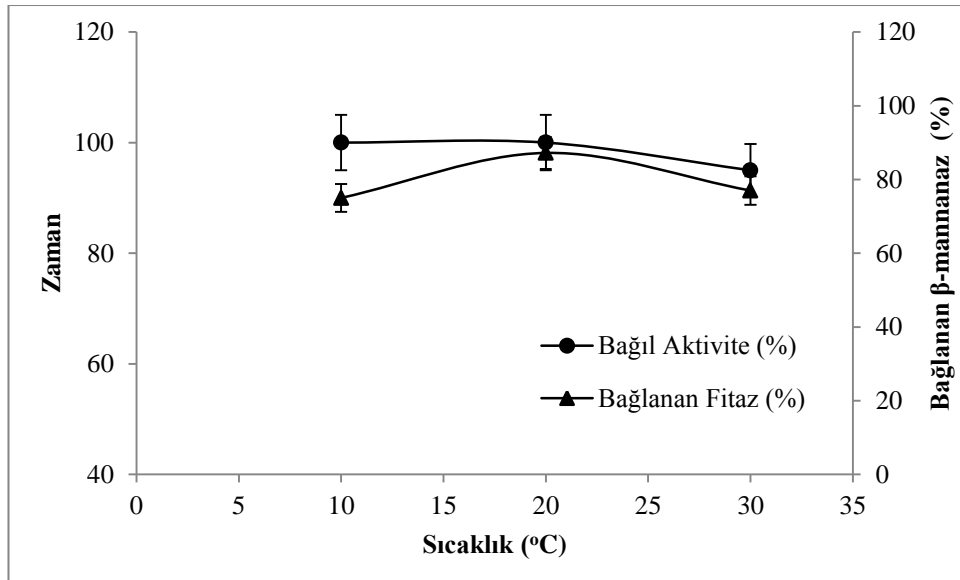
β -mannanaz enziminin destek materyaline en uygun immobilize olduğu koşulları belirlemek amacıyla yapılan optimizasyon çalışmaları için kitosan molekülleri asetik asit ile muamele edilerek 3 saat boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra kitosan molekülleri etil alkol ortamında 1N NaOH ilave edilerek ortam nötralize edilmiş ve saf su ile yıkanmıştır. Kitosan molekülüne amin grubu bağlamak amacıyla %5'lik glutaraldehit çözeltisiyle 4 saat boyunca muamele edilmiştir. Kitosan tanecikleri öncelikle saf su içerisinde dispers edilmiş olan Fe_3O_4 ile muamele edilerek kitosan yüzeyinin manyetik özellik kazanması sağlanmıştır. Kitosanın Fe_3O_4 nano partikülleri ile muamele edilmesinin ardından saf su ile yıkanarak ortamda bağlı olmayan nano partiküller uzaklaştırılmıştır. Nano Fe_3O_4 ile yüzeyi modifiye edilmiş ve glutaraldehit ile etkinleştirilmiş destek materyali ile Na-sitrate tampon çözeltisi (pH 6.0) içerisinde, 0.25 M $NaCNBH_3$ ve *Clitocybe geotropa* mantarlarından saflaştırılan mannanaz enzimi (68 EU/mL; 1,08 mg protein/mL) immobilize edilmiştir. β -mannanaz enziminin glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak

immobilizasyonunun gerçekleşmesi için en yüksek aktivite pH 5 ve 20°C sıcaklıkta elde edilmiştir (Şekil 4.6).

A.



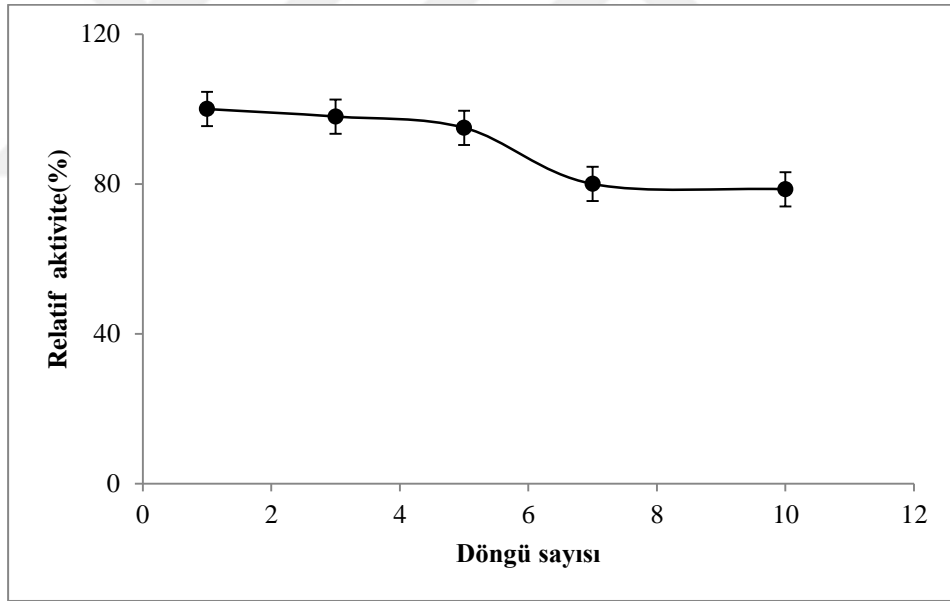
B.



Şekil 4.6. İmmobilizasyon A.pH'sına ve sıcaklığına bağlı olarak glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent immobilizasyonu esnasında *Clitocybe geotropa* mantarından izole edilmiş β -mannanaz enziminin bağlı aktivite (-▲-) ve bağlanan β -mannanaz (-●-) derişimleri

4.1.2.f. İmmobilize β -mannanaz'ın tekrar kullanılabilirliği

İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği, seçilen taşıyıcının ya da metodun etkinliğini değerlendirme açısından oldukça önemlidir. Tekrar kullanılabilirlik, kararlılık ve ekonomik açılardan immobilize enzimler serbest enzimlere göre daha avantajlıdır (Hung *et al.* 2003). Bu çalışmada immobilize β -mannanaz enziminin tekrar kullanılabilirliği ard arda aktivite ölçümleri yapılarak belirlenmiş ve immobilize β -mannanaz enziminin 10 döngüden sonra aktivitesinin sadece %21.4'ünü kaybettiği görülmüştür (Şekil 4. 7). İmmobilize β -mannanaz enziminin aktivitesinde önemli bir azalma olmadan gösterdikleri bu tekrar kullanılabilirlik özelliği, enzimin gıda endüstrisinde rahatlıkla kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.7. immobilize β -mannanaz enziminin tekrar kullanılabilirlik oranı

4.1.2.g. Serbest ve immobilize β -mannanaz enziminin kinetik parametreleri

1. Ebişke mantarından (*Clitocybe geotropa*) saflaştırılan serbest ve immobilize β -mannanaz enzim aktivitesi üzerine pH'nın ve sıcaklığın etkisi sonuçları

β -mannanaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla immobilize ve serbest enzim için ayrı ayrı olmak üzere pH 3.0-11.0 aralıklarında farklı pH'larda optimizasyon çalışması yapılmıştır. En uygun immobilizasyon pH'sının belirlenmesi amacıyla İmmobilize enzim için

pH: 4-5 için asetat tamponu,

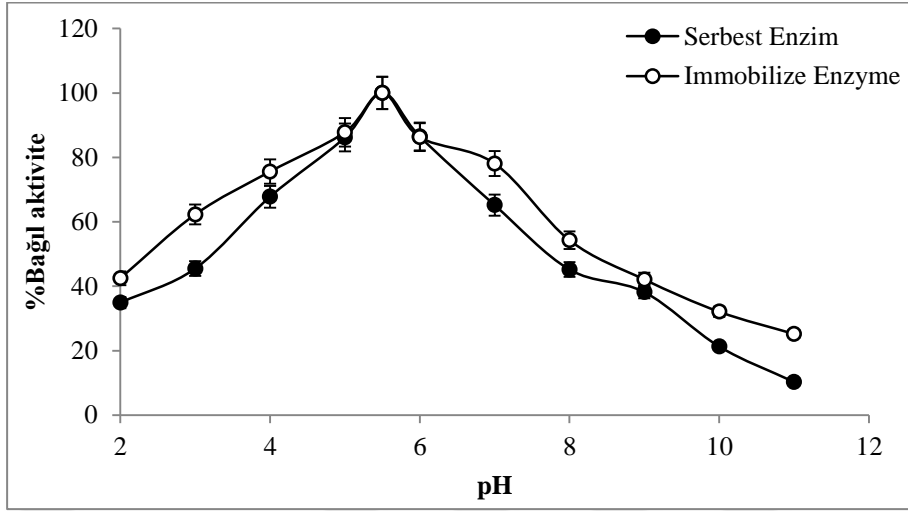
- pH: 6-7 için fosfat tamponu,
- pH: 8-9 için Tris-HCl tamponu;

Serbest enzim için

- pH: 2-3-4-5 için asetat tamponu,
- pH: 6-7 için fosfat tamponu,
- pH: 8-9 için Tris-HCl tamponu

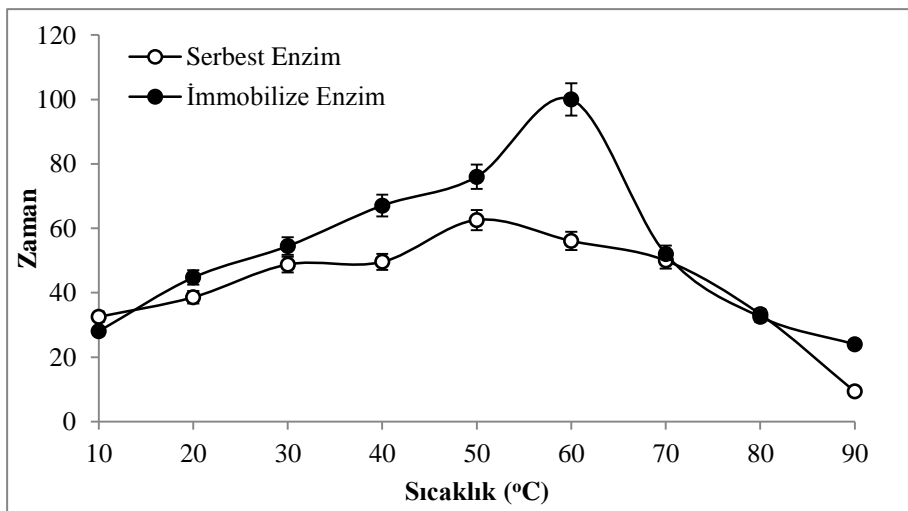
pH: 10 için Karbonat tamponu kullanılarak immobilizasyon çalışması ve aktivite tayini yapılmıştır.

DNS standart enzim aktivitesi ve Locust bean gum substratı kullanılarak spektrofotometrik olarak aktivitenin ölçülmesi sonucu elde edilen sonuçlara göre aktivite hesaplanmış ve “% Bağıl aktivite-pH” grafiği çizilmiştir. Ölçümler sonucu serbest ve immobilize β -mannanaz'ın optimum pH değerleri 5.0 olarak belirlenmiştir. Ebişke mantarından saflaştırılan immobilize ve serbest β -mannanaz enziminin optimum pH grafiği Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8. Ebişke mantarından (*Clitocybe geotropa*) saflaştırılmış serbest ve immobilize β -mannanaz enziminin optimum pH grafiği

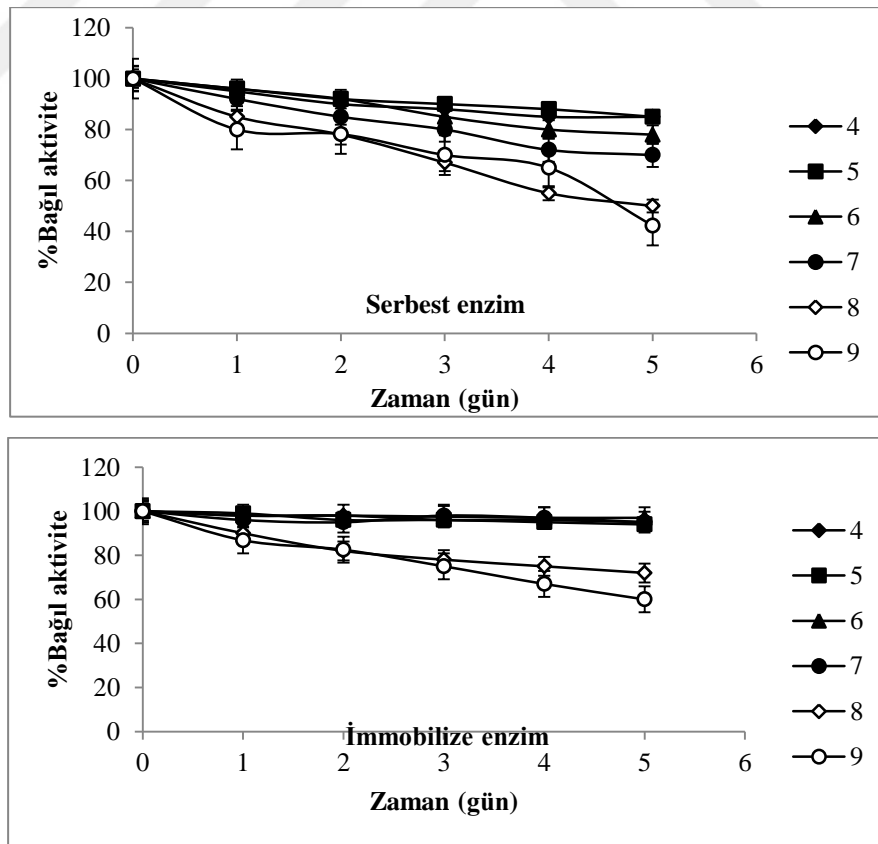
Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi için 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 90°C'lik sıcaklıklar su banyosu kullanılarak ayarlanmış ve standart enzim aktivite ölçümü yapılarak serbest ve immobilize β -mannanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri hesaplanmıştır. Enzimin optimum sıcaklığı 60°C olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre “%Bağlı Aktivite-Sıcaklık” grafiği çizilmiş ve Şekil 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.9. Ebişke mantarından (*Clitocybe geotropa*) saflaştırılmış serbest ve immobilize β -mannanaz enziminin optimum sıcaklık değer grafiği

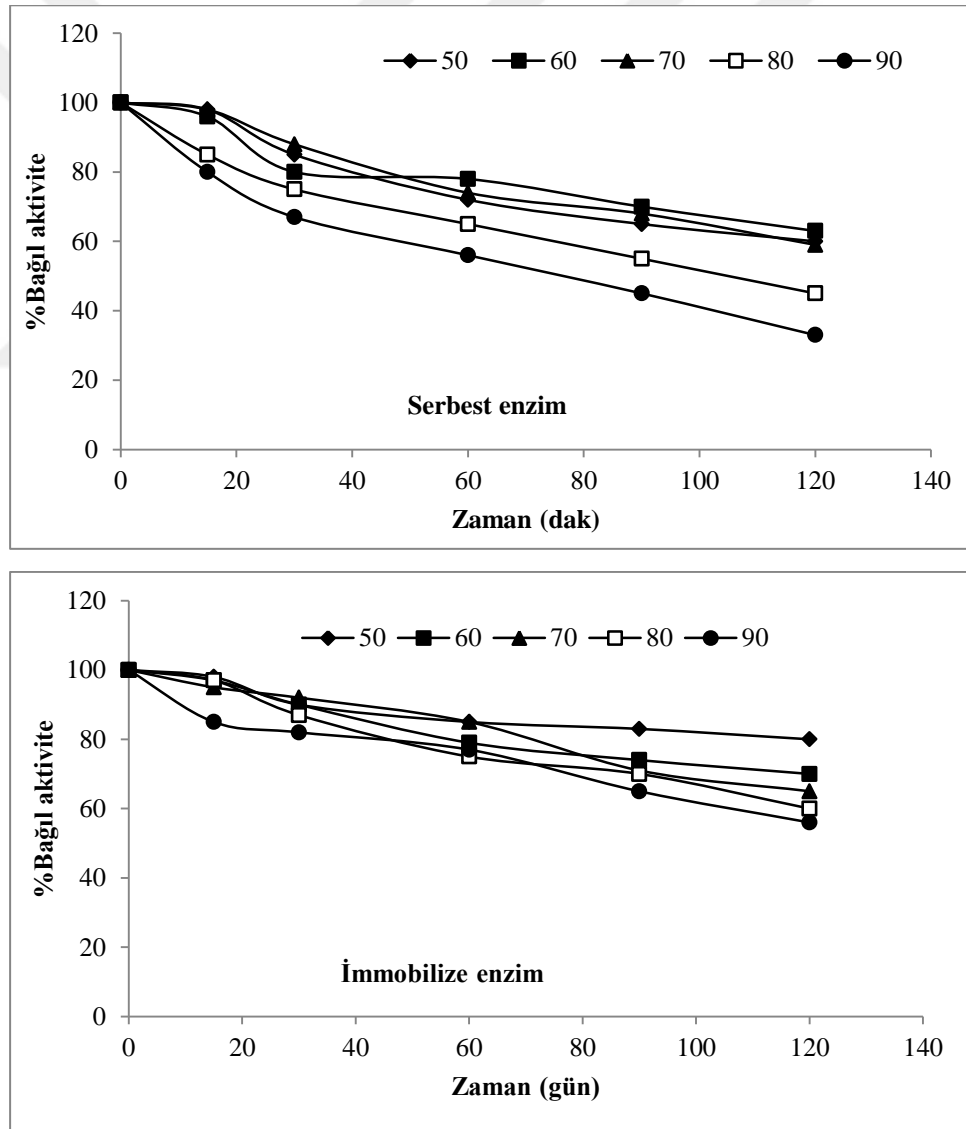
2. Serbest ve immobilize β -mannanaz enziminin stabil pH ve stabil sıcaklık sonuçları

Serbest ve immobilize β -mannanaz enziminin stabil olduğu pH'yı tespit etmek için yarım birim arttırılmak suretiyle pH'da (3.0–4.5) asetat tamponu, (5.0–7.5) fosfat tamponu ve (8,0–9,0) Tris/HCl tamponu kullanılarak belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinden 500 mL, 250 μ L enzim çözeltisine ilave edilerek 4°C'de muhafaza edilmiştir. Başlangıç aktiviteleri ölçüldükten sonra 1 hafta boyunca her gün aynı saatlerde aktivite ölçümü yapılarak enzimin stabil olduğu pH aralığı belirlenmiştir. İnkübasyon süresine karşılık aktivite değerleri Şekil 4.10'da ki grafiklerde gösterilmiştir. Elde edilen bulgular sonucu serbest ve immobilize enzimin pH 5.0 ve 6.0 aralıklarında daha stabil olduğu ve enzim aktivitesini 1 haftanın ardından yaklaşık %90 oranında koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Ebişke mantarından (*Clitocybe geotropa*) saflaştırılmış serbest ve immobilize β -mannanaz enziminin stabil pH karşılaştırılması

β -mannanaz enziminin termal stabilizasyonu ile ilgili çalışmalar locust bean gum substratı kullanılarak optimum pH'sında ve 30-90 °C aralıklarında değişen yedi farklı sıcaklıkta yapılmıştır. İçerisine enzim çözeltisi konulan tüp iki saat boyunca çalışılan sıcaklığa ayarlanmış olan çalkalamalı su banyosunda bekletilerek ve her on beş dakikada bir aktivite ölçümü yapılmıştır. Yapılan ölçümlere göre "Bağlı Aktivite (%) - Zaman" grafiği olarak Şekil 4.11'de verilmiştir. Elde edilen bulgulardan immobilize enzimin serbest enzime göre özellikle 20 ve 60°C'lerde çok daha stabil olduğu belirlenmiştir.

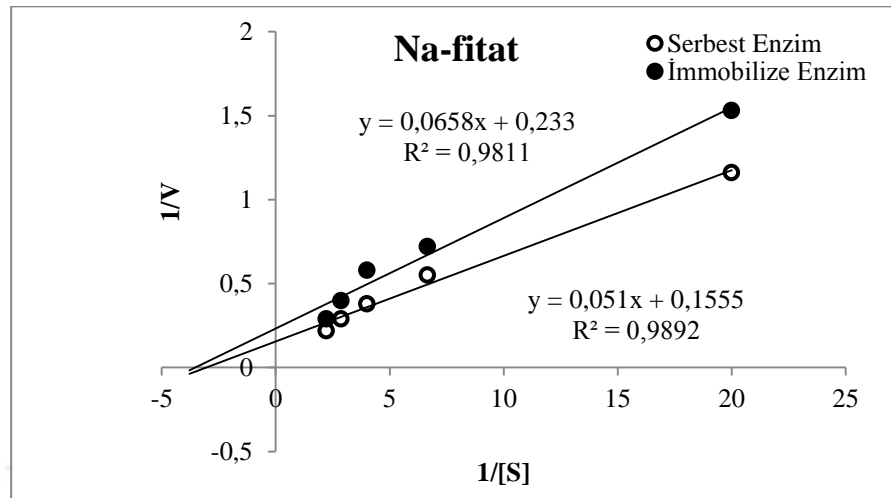


Şekil 4.11. Serbest ve immobilize β -mannanaz enziminin termal stabilizasyon bağlı sıcaklık değerlerinin karşılaştırılması

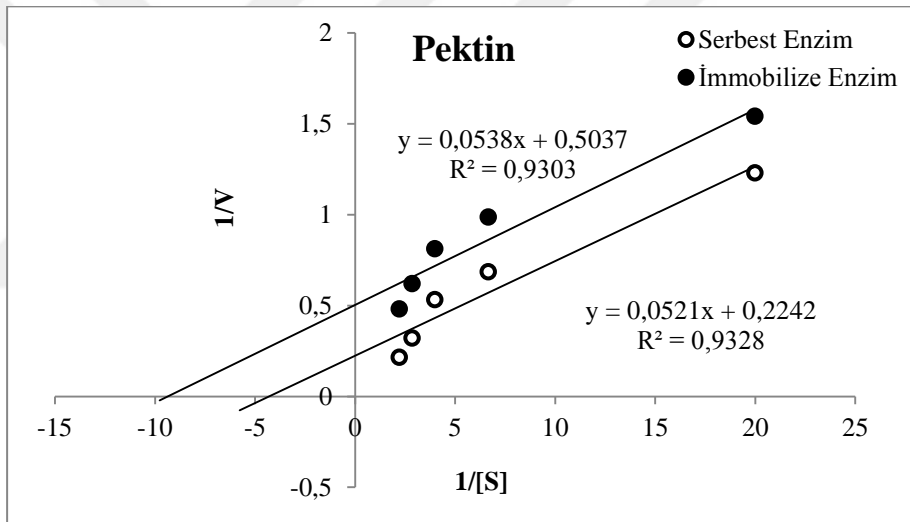
3. Ebişke mantarından (*Clitocybe geotropa*) saflaştırılmış serbest ve immobilize β -mannanaz enziminin V_{max} ve K_m sonuçları

Maksimum aktivite (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitinin (K_m) belirlenmesi amacıyla, grafiksel olarak, $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ değerlerinin çizilmesi ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği kullanılmıştır. β -mannanaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri ile ilgili çalışmalar, 20mM sodyum sitrat tamponunda (pH 6.0) hazırlanmış 5 mM konsantrasyonunda locust bean gum, nişasta, selüloz, fitat, ksilan, kazein jelatin ve pektin substratları olmak üzere altı farklı substrat konsantrasyonunda optimum aktive ölçümleri yapılmış ve Lineveawer-Burk grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerden elde edilen denklemlerden yararlanılarak her bir substrat için ayrı ayrı K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmış ve substrat spesifikliği belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

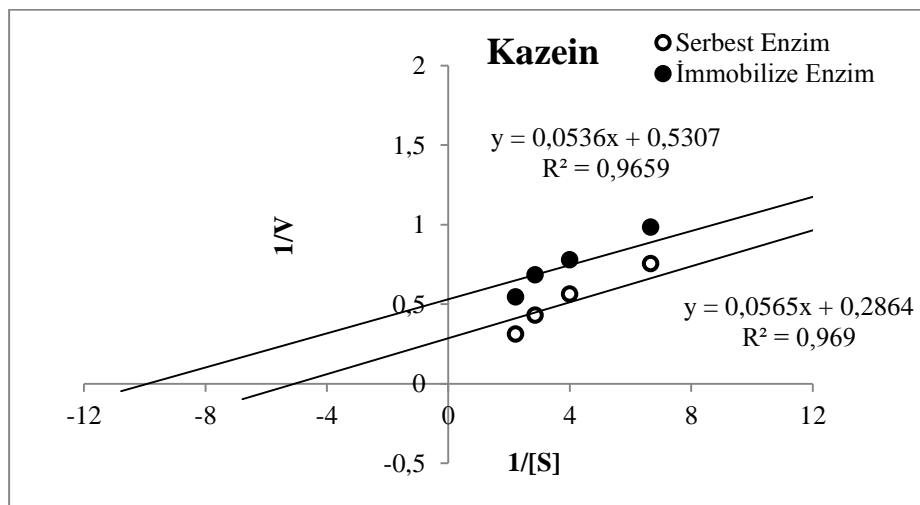
A.



B.

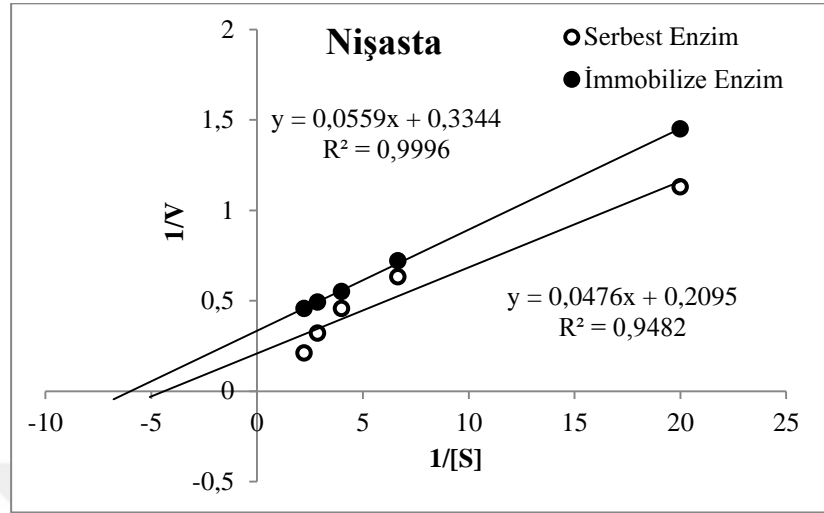


C.

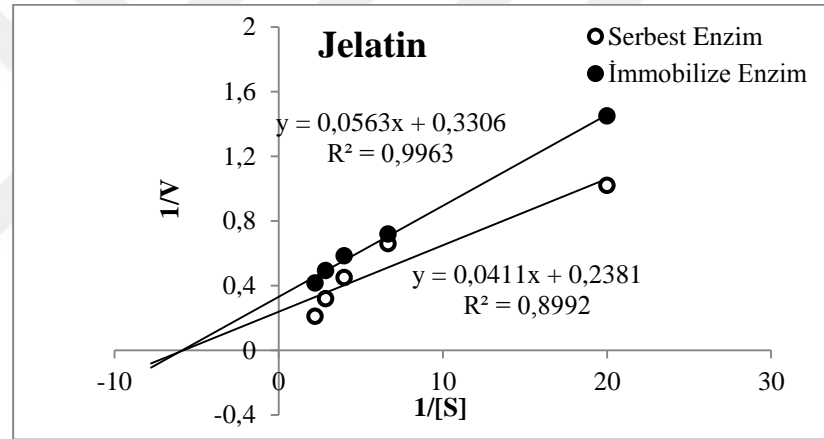


Şekil 4.12. (devam)

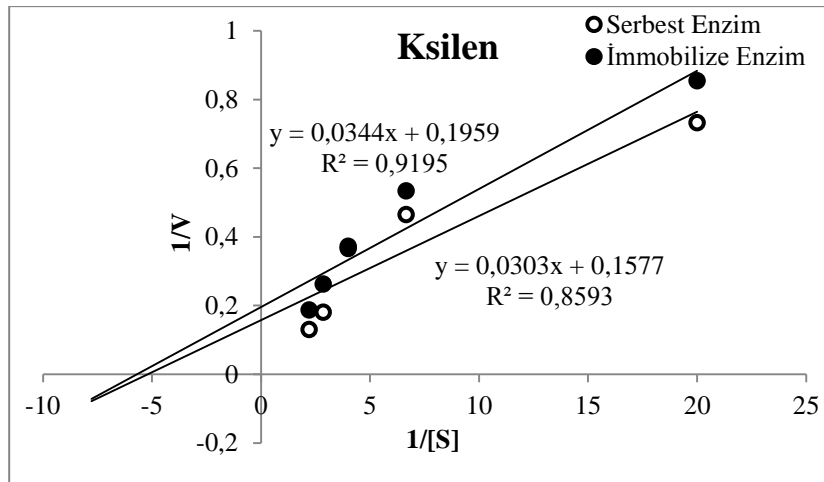
D.



E.



F.



şekil 4.12. Ebişke mantarından (*Clitocybe geotropa*) saflaştırılan β -mannanaz enzimi için A. Na-fitat, B.Pektin, C. Kazein, D. Nişasta, E. Jelatin ve F. Ksilen substratları ile elde edilen Lineweaver-Burk grafikleri

Çizelge 4.2. Serbest halde ve nanomagnetik kitosan molekülleri üzerine immobilize edilmiş β -mannanaz enzimi için V_{max} ve K_m değerleri

Substrat adı	Serbest β -mannanaz		İmmobilize β -mannanaz	
	V_{max} (EU/mg)	K_m (mg/mL)	V_{max} (EU/mg)	K_m (mg/mL)
Locust bean gum	4.292	0.282	6.43	0.328
Pektin	1.99	0.107	4.46	0.233
Kazein	1.884	0.101	3.492	0.197
Nişasta	2.99	0.167	4.77	0.227
Jelatin	3.025	0.170	4.199	0.173
Ksilen	5.105	0.176	6.341	0.192
Na-fitat	2.99	0.167	5.23	0.309

Kullanılan tüm substratlara karşı serbest mannanaz enzimine göre immobilize mannanaz enziminin V_{max} değerlerinin arttığı ve K_m değerlerinde ise özellikle bazı substratlarda (Pektin, nişasta ve locust bean gum) azalma meydana gelmiştir. En yüksek V_{max} değerini çalışmada substrat olarak kullanılan locust bean gum substratında göstermiştir ve serbest-immobilize β -mannanaz enzimlerinin V_{max} değerleri sırasıyla 4.3 EU/mg ve 6.34 EU/mg olarak bulunmuştur. K_m değerleri ise sırasıyla 0.282 mg/mL ve 0.328 mg/mL olarak hesaplanmıştır.

4. Serbest ve immobilize β -mannanaz enziminin aktiviteleri üzerine Cu^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} ,nin etkisi

β -mannanaz enziminin serbest ve magnetik kitosan üzerine immobilize halde ki aktiviteleri üzerine 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarında hazırlanan $CuCl_2$, $HgCl_2$, $FeCl_2$, $MgCl_2$, $ZnCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $CdCl_2$ ve $CoCl_2$, gibi bazı metal iyonlarının etkileri in vitro olarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre metal iyonlarının inhibisyon etkileri konsantrasyona karşı Enzim Ünitesi (EU/mL)-Metal iyonu konsantrasyonu olarak Şekil 4.12'de verilmiştir. Serbest ve immobilize β -mannanaz enzimi % Bağlı Aktivite değerleri ise Çizelge 4.3'de gösterilmektedir. Elde edilen

bulgulardan 5 mM konsantrasyon da Mg^{2+} iyonunun serbest enzimi %10 oranında inhibe ettiği her iki konsantrasyon da ki Zn^{2+} iyonunun serbest ve immobilize haldeki enzim üzerinde %10 oranında inhibisyon etkisi olduğu tespit edilmiştir. Immobilize mannanaz enziminin Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonlu ortamda tamamen inhibe olduğu diğer metal iyonlarının genel olarak serbest ve immobilize enzimin aktivitesini artırdığı özellikle 1 mM ve 5 mM Zn^{2+} iyonunda immobilize enzimin aktivitesini %430.0, serbest enzimin aktivitesini ise %363.3 oranında artırdığı yapılmış ölçümlerle belirlenmiştir.

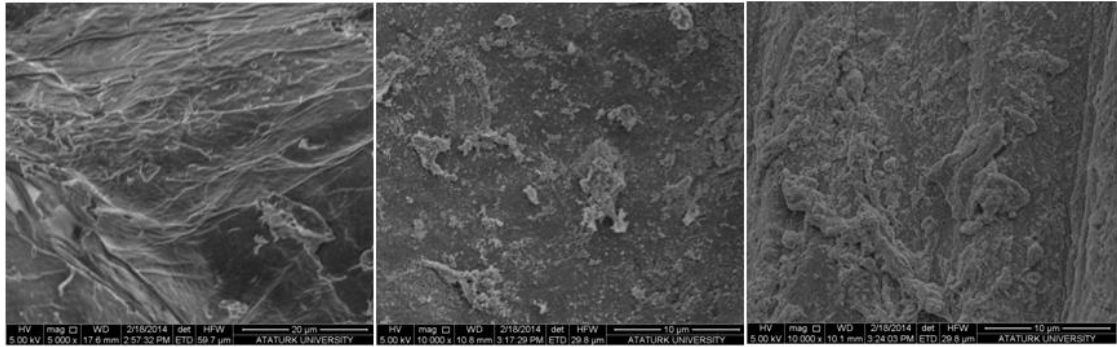
Çizelge 4.3. Bazı metal iyonlarının serbest ve immobilize β -mannanaz enzimi üzerine etkileri

Serbest β -mannanaz				
Metal İyonları	Konsantrasyon (mM)	Bağlı Aktivite (%)	Konsantrasyon (mM)	Bağlı Aktivite (%)
İyonsuz ortam	-	100 \pm 0.0	-	100 \pm 0.0
Cu^{2+}	1	187.9 \pm 0.03	5	151.5 \pm 0.15
Fe^{2+}	1	103.03 \pm 1.2	5	118.2 \pm 1.1
Ca^{2+}	1	107.6 \pm 0.45	5	133.4 \pm 0.31
Mg^{2+}	1	109.0 \pm 0.32	5	89.7 \pm 0.04
Zn^{2+}	1	93.9 \pm 0.25	5	90.9 \pm 0.09

İmmobilize β -mannanaz				
Metal İyonları	Konsantrasyon (mM)	Bağlı Aktivite (%)	Konsantrasyon (mM)	Bağlı Aktivite (%)
İyonsuz ortam	-	100 \pm 0.0	-	100 \pm 0.0
Cu^{2+}	1	100.4 \pm 0.36	5	153.4 \pm 0.44
Fe^{2+}	1	163.4 \pm 0.06	5	176.7 \pm 0.14
Ca^{2+}	1	63.4 \pm 0.32	5	40.5 \pm 0.28
Mg^{2+}	1	103.3 \pm 0.03	5	83.4 \pm 1.05
Zn^{2+}	1	363.3 \pm 0.6	5	430.0 \pm 0.01

4.1.3. Kitosan destek materyalinin yapısal morfoloji analizi

Yüzeiden yayılan ikincil elektronlarla yapılan ölçüm, özellikle yüzeyin engebelli (topografik) yapısıyla ilişkili yüksek çözünürlüklü görüntü alınmasını sağlayan SEM taramalı mikroskop kullanılmıştır. Doğal kitosan, glutaraldehit ile aktifleştirilmiş Fe₃O₄ nano partiküllerle kaplanmış kitosan destek materyali ve bu destek materyaline enzim immobilize edilmesinden sonra magnetik kitosan nanopartikül görüntüsü ve β-mannanaz enzimi immobilize edilmiş magnetik kitosan nanopartiküllerin morfolojik yapısı SEM görüntüleri alınarak analiz edilmiştir. SEM görüntüleri Şekil 4.12’de verilmektedir. SEM görüntülerine göre β-mannanaz enzimi immobilize edilmiş magnetik kitosan destek materyalinin duvar kalınlığı 20~30 nm ve gözenek büyüklüğü 0.5~1 µm kadardır. SEM görüntüleri sonucuna göre enzimin magnetik hale getirilen poroz özelliğinin arttığı ve daha fazla enzim immobilize edilebilir olduğu, modifiye nano magnetik kitosan destek materyalinin enzim immobilizasyonu için uygun morfolojik yapıya sahip ve yapısal olarak stabil olduğu sonucuna varılmıştır.

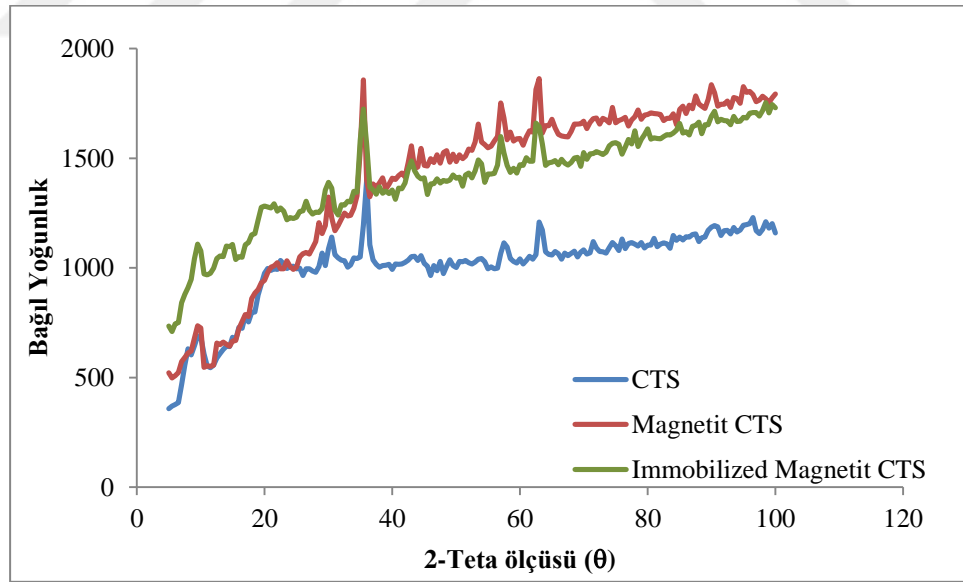


Şekil 4.13. Kitosan (I), magnetik kitosan nanopartikül (II) ve β-mannanaz enzimi immobilize edilmiş magnetik kitosan nanopartiküllerin (III) SEM görüntüleri

4.1.4. X-Ray difraksiyon (XRD) analizi sonuçları

X- ışını analiz yönteminde atomla etkileşen X-ışını dalgalarının oluşturduğu kırınım desenleri incelenerek kristalin yapısı hakkında bilgi sağlanabilmektedir. Yani bu teknik ile numuneye ait kristal örgü parametreleri, farklı sıcaklıklarda oluşan faz

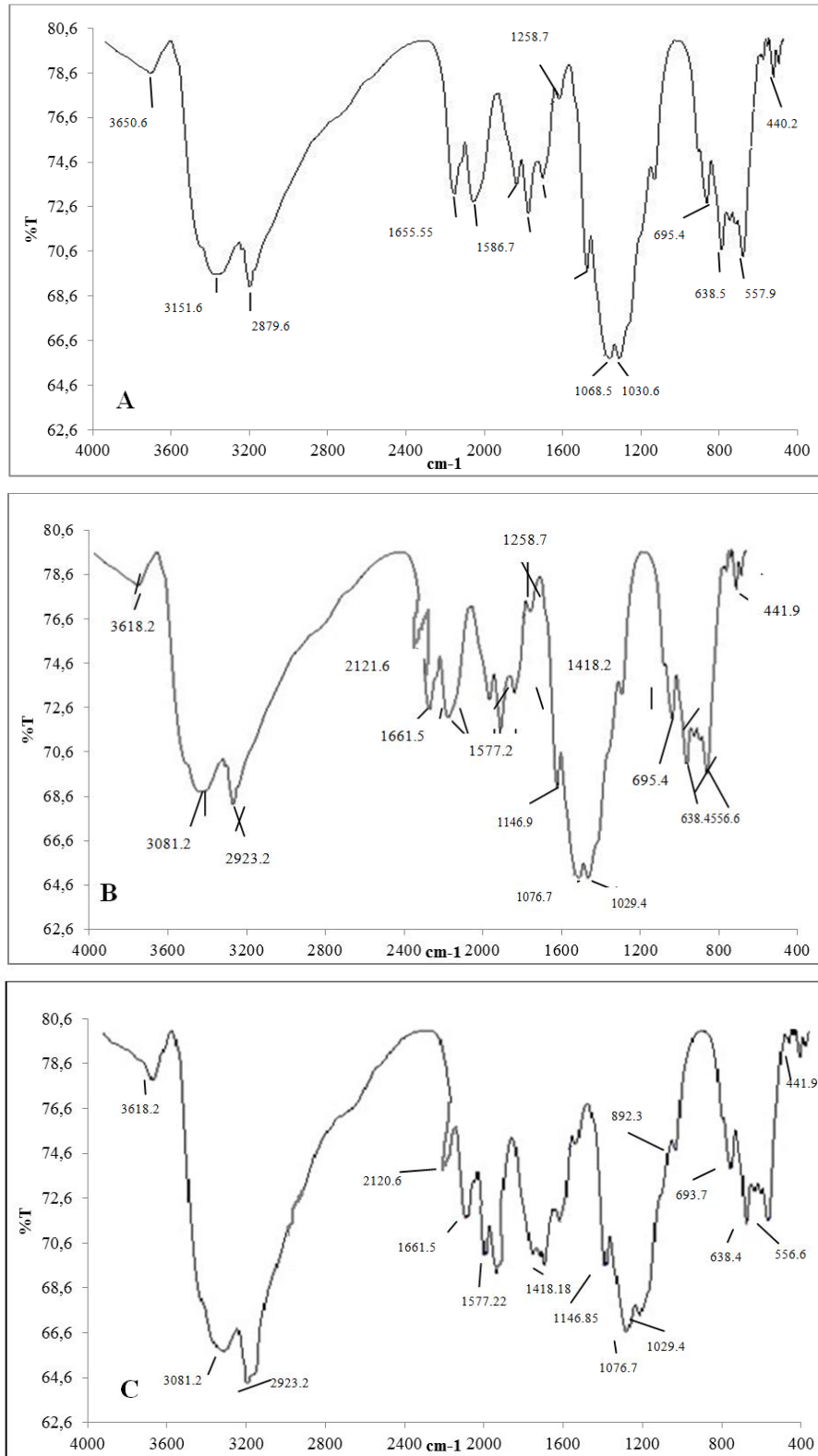
yapıları, düzlemler arası mesafe ve farklı faz bileşenleri belirlenebilmektedir. Kitosan, magnetik kitosan nanopartiküllü ve β -mannanaz enzimi immobilize edilmiş magnetik kitosan nanopartiküllerin X- ışınları toz kırınım metoduyla elde edilen profillerin yorumlanması ilkesine dayanan XRD analiz görüntüleri Şekil 4.13'de verilmiştir. Yapılan analiz sonucu kitosana ait XRD toz kırınım deseni incelendiğinde $2\theta = 9,5^\circ$ ve $20,5^\circ$ 'deki kristal kitosanın tipik parmak izi geniş difraksiyon pikleridir (Ogawa *et al.*, 1984). β -mannanaz enzimi immobilize Fe_3O_4 nanopartiküllerle modifiye kitosan yapılarında yaklaşık $2\theta=20.5^\circ$ olarak görüldüğü, görülen diğer küçük ve geniş pikin kitosana ait olduğu görülmektedir. Ayrıca, $2\theta=34.0^\circ$, 42.5° , 53.5° , 57.0° , 63.0° 'da görülen beş difraksiyon pik Fe_3O_4 nanopartiküllere ait olduğu görülmüştür (Cao *et al.*, 2014). Elde edilen sonuçlara göre Fe_3O_4 nanopartiküllerle kitosanın modifiyesinin sağlanmış olduğu ve *Clitocybe geotropa* mantarından saflaştırılmış β -mannanaz enziminin magnetik kitosan yüzeyine immobilizasyonunun sağlandığı elde edilmiş XRD sonuçlarına göre kanıtlanmış olmaktadır.



Şekil 4.14. Kitosan, magnetik kitosan nanopartikül ve β -mannanaz enzimi immobilize magnetik kitosan nanopartiküllere ait XRD toz kırınım desenleri.

4.2. FTIR Spektroskopisi Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy FTIR): Analizi Sonuçları

Kızılötesi (IR) absorpsiyon spektroskopisi bir tür titreşim spektroskopisidir; IR ışınları molekülün titreşim hareketleri tarafından soğurulmaktadır. Matematiksel Fourier dönüşümü spektroskopisinde ışın şiddeti, zamanın bir fonksiyonu olarak alınır. Her dalga boyunu ayrı ayrı tarama gereksizdir hızlı ve yüksek çözünürlükte spektrumlar elde edilerek moleküler bağ karakterizasyonu yapılan ışınlarla belirlenip; katı, sıvı, gaz veya çözelti halindeki organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar, iki bileşiğin aynı olup olmadığı, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik yada alifatik olup olmadığının belirlendiği tekniktir (Kyomugasho *et al.* 2015). FTIR tekniği ile doğal yapıda ki kitosan, magnetik Fe₃O₄-kitosan nanopartikülü ve β-mannanaz enzimi immobilize edilmiş magnetik Fe₃O₄-kitosan yapıları FT-IR spektrumları alınmış ve sonuçlar Şekil 4.14'te verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre kitosan yapısına ait spektrum geniş bir aralıkta 3650.60-2879 cm⁻¹'de (O-H, hidroksil ve serbest amino gruplarının -NH gerilme titreşimlerinden), 2879.93 cm⁻¹ ve 2116 cm⁻¹'de yer alan titreşimler kitosan yapısında yer alan -CH₃ ve -CH₂ gruplarına, 1638.38-1029.96 cm⁻¹'de ise amid ve sekonder amid yapısında yer alan -C=O ve -N-H bağlarının gerilme titreşimlerine aittir (Fig 4.13a-c). Fig 4.13b-c yer alan 557.92 cm⁻¹ ve 440.23 cm⁻¹ pikleri Fe₃O₄ nanopartiküllerinin Fe-O gruplarına aittir. Fig 4.13a; 4.13b-c ile kıyaslandığında 1661.5 cm⁻¹'de yeni keskin bir pik görülmektedir. Bu durum 2116.66 cm⁻¹'de yer alan N-H piki 1589.68 cm⁻¹'ye kaydığını ve kitosanın glutaraldehitte shift bazı oluşturmak üzere reaksiyona girdiğini göstermektedir (Guo *et al.* 2005; Li *et al.* 2008). Şekil 4.14 c'deki pik farklılığına göre β-mannanaz enzimi immobilize edildikten sonra magnetik Fe₃O₄-kitosan nanopartikül yapısında yer alan fonksiyonel gruplarda önemli bir değişiklik olmadığı görülmektedir. FT-IR spektrum analiz sonuçlarına göre magnetik nano Fe₃O₄'ün kitosan moleküllerine kaplandığı ve mannanaz enziminin magnetik Fe₃O₄-kitosan nanopartikülleri üzerine başarılı bir şekilde immobilize edildiği ortaya konmuştur.



Şekil 4.15. FT-IR spectrum of doğal kitosan (a), nano magnetit kitosan (b), mannanaz immobilize edilmiş nanomagnetit kitosan (c)

4.3. Meyve Suyu Durultma İşlemi

Meyve suyu durultma ve verimi artırmak amacıyla kullanılan mannanaz enzimi meyvelerin yapısında bulunan mannanların hidrolize edilerek ortamın vizkositesinin azalması ve mannanların yapısında bulunan suyun hidroliz sonucu açığa çıkmasıyla meyve suyunun miktarının artması sağlanmış olmaktadır. Mannanaz enziminin mevsim meyvelerinden seçilmiş elma, portakal, nar, çilek, kivi gibi meyvelerin pulp haline getirilmiş meyve sularına immobilize enzim homojenatı ve saf enzim eklenerek bunlara karşı saf su eklenmiş kör numunelerine karşı durultma işlemi gerçekleştirilmiş ve meyve sularında verim oranı hesaplanmıştır. Ortamdan katı meyve pulplarının uzaklaştırılması ile meyve sularında verim artışı % Verim olarak Çizelge halinde sunulmuştur.



Şekil 4.16. Meyve verimi artış oranları ve durultma yüzdeleri

Portakal, nar, çilek, kivi, kuşburnu ve elma suyu hacminin serbest ve immobilize mannanaz enziminin meyve pulplarını hidrolizlemesi sonucu kontrol ile karşılaştırıldığında meyve suyu hacminde artış olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, özellikle kuşburnu üretimi üzerinde serbest ve immobilize mannanaz enziminin sırasıyla % 146,2 ve % 223,1 oranında verimi artırdığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. *Clitocybe geotropa* mantarından saflaştırılmış serbest ve immobilize endo- β -1,4 mannanaz enziminin pulp haline getirilmiş farklı meyve sularında verim oranı üzerine etkisi

Meyveler (5 g)		Kontrol	Serbest mannanaz	Immobilize mannanaz
Portakal	Hacim	7.0	7.2	7.9
	Verim (%)	-	102.9	112.9
Nar	Hacim	6.3	7.0	8.0
	Verim (%)	-	111.2	126.98
Çilek	Hacim	6.4	7.0	7.2
	Verim (%)	-	109.4	112.5
Kivi	Hacim	7.0	7.5	8.0
	Verim (%)	-	107.1	114.3
Kuşburnu	Hacim	6.5	9.5	14.5
	Verim (%)	-	146.2	223.1
Elma	Hacim	6.0	7.0	8.0
	Verim (%)	-	116.7	133.3

Çalışmamızda meyveler pulp haline getirilerek kontrole göre katı madde oranının ölçülmesi sonucu özellikle kuşburnu suyunda kuru madde ağırlığının serbest enzim uygulamasında %36.0 oranında, magnetit kitosan moleküllerine immobilize edilmiş bağlı enzim uygulamasında ise kuru madde oranının %43.6 oranında azaltıldığı görülmüştür. Elma meyvesinde ise serbest enzimde %10.25, immobilize enzim uygulamasında da %33.6 oranında katı madde miktarında azalma olmuştur. Kuru madde oranında tespit edilen azalış oranları meyve suyu üretiminde verim artışının sağlanmış olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.5. *Clitocybe geotropa* mantarından saflaştırılmış serbest ve immobilize endo- β -1,4 mannanaz enziminin pulp haline getirilmiş farklı meyve sularında kuru madde ağırlığında azalış oranı ve yüzdesi

Meyveler (5 g)		Kontrol	Serbest mannanaz	Immobilize mannanaz
Portakal	Kurumadde oranı (g)	4.17	3.66	3.22
	Azalma (%)	-	12.2	22.8
Nar	Kurumadde oranı (g)	4.93	4.23	3.93
	Azalma (%)	-	14.2	20.3
Çilek	Kurumadde oranı (g)	4.53	2.96	2.90
	Azalma (%)	-	34.6	35.98
Kivi	Kurumadde oranı (g)	4.1	3.44	3.27
	Azalma (%)	-	16.1	20.2
Kuşburnu	Kurumadde oranı (g)	5.0	3.2	2.82
	Azalma (%)	-	36	43.6
Elma	Kurumadde oranı (g)	5.27	4.73	3.5
	Azalma (%)	-	10.25	33.6

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapmış olduğumuz çalışmada Ebişke (*Clitocybe geotropa*) mantarından β -mannanaz enziminin izolasyonu yapılarak enzimin karakterizasyonu belirlenmiştir. Karakterize edilen saf enzim, magnetik kitosan nanopartiküllere kovalent olarak immobilize edilmiştir. Immobilize enzim ve saf halde bulunan enzimler pulp haline getirilmiş mevsim meyvelerinden elma, portakal, nar, çilek ve kivi gibi meyvelerin yapısında bulunan mannanın β -mannanaz enzimi tarafından hidrolizi ve meyve sularında durultma etkisi araştırılmış sonuçlar % verim olarak sunulmuştur. Elde edilen bulgular sonucu Ebişke (*Clitocybe geotropa*) mantarından saflaştırılmış β -mannanaz enziminin stabil pH ve sıcaklık aralığının yüksek olması nedeniyle gıda endüstrisinde kullanımının büyük avantaj sağlayacağı önerilmiştir.

β -mannanaz enziminin *Clitocybe geotropa* mantarından ilk adımda amonyum sülfat çöktürmesi sonucu %64.7 verim oranıyla 13.96 kat saflaştırılmış ikinci adımda DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi kullanılarak %34.2 verimle 55.7 kat saflaştırma sağlanmış ve son adımda Sephakril S 200 jel filtrasyon kolonundan geçirilen enzim ürününden %21.3 verimle 176.4 kat saflaştırılma sağlanarak spesifik aktivite 83.81 EU/mg protein olarak hesaplanmıştır. β -mannanaz enzimi öncelikle kitosan Fe_3O_4 nano partiküller kullanılarak magnetik hale getirildikten sonra magnetik kitosan nanopartiküllerine glutaraldehit ara kolu üzerinden *Clitocybe geotropa* mantarından saflaştırdığımız β -mannanaz enzimi kovalent olarak immobilize edilmiştir. Magnetik kitosan molekülüne immobilize mannanaz enziminin sistem morfolojisi alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (SEM), FT-IR ve X-ray differaksiyon analiz (XRD) yöntemleri ile tanımlanmıştır. Glutaraldehit ara kolu üzerinden magnetik kitosan yüzeyine enziminin kovalent immobilizasyonu için en uygun pH 5.5 ve sıcaklık 20°C olarak belirlenmiştir. Optimum pH ve sıcaklık değerlerinde saflaştırılmış mannanaz enziminin 1 saatlik inkübasyondan sonra magnetik kitosan molekülüne (MG-CTS) %85,6 oranında bağlı olduğu tespit edilmiştir.

Clitocybe geotropa mantarından saflaştırılan β -mannanaz enziminin alt birim sayısı

kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılarak belirlenmiştir. β -mannanaz enziminin SDS-PAGE jel görüntüsü düşük molekül ağırlıklı standart protein markırı (Sigma), (Page Ruler™ Broad Range Unstained Protein Ladder) kullanılarak ölçüm yapılmış ve sonuç olarak β -mannanaz enziminin tek alt üniteli ve molekül ağırlığının 39.5 kDa olduğu gözlenmiştir.

Farklı organizmalarda β -mannanaz enziminin izolasyonunun yapıldığı çalışmalar sonucunda mannanaz enziminin molekül ağırlıkları için incelenmiş literatürlerden Jiang *et al.* (2006); 39.6 kDa, Ootsuka *et al.* (2006); 39 kDa, Qiao *et al.* 2010; 38kDa, Sumppunn *et al.* 2011; 38 kDa, Xu *et al.* (2002); 39 2 kDa, Ghosh, *et al.* (2013); 38kDa, Wang *et al.* (2013); 38 kDa, Liu *et al.* (2015); Tsukagoshi *et al.* (2014); Zahura *et al.* (2010); 40 kDa olarak verilmiş çalışma örneklerinde çalışmamızda bulduğumuz değere en yakın molekül ağırlık değerleridir.

Clitocybe geotropa β -mannanaz enziminin serbest ve immobilize optimum pH'sını belirlemek amacıyla immobilize ve serbest enzim için pH 3.0-11.0 aralıklarında olmak üzere farklı pH'larda optimizasyon çalışması yapılmıştır. Ölçümler sonucu serbest ve immobilize β -mannanaz'ın optimum pH değerleri 5.0 olarak belirlenmiştir. Saf ve immobilize enzimin standart pH değerleri ise 5.0 ve 6.0 aralığında bulunmuştur.

Farklı mikroorganizmalar ve funguslardan izole edilmiş β -mannanaz enziminin optimum pH ve stabil pH aralıklarının belirlenmiş olduğu farklı kaynaklardan elde edilmiş çalışmalarda Zang *et al.* (2015) *Bacillus pumilus* GBSW19 bakterisi suşundan izole edilmiş β -mannanaz enziminin optimum pH yaklaşık 6.5 ve stabil pH aralığının 5.0–11.0 arasında değiştiği, Malgas *et al.* (2015) *Clostridium cellulovorans* (ManA, GH5) ve *A.niger* (Man26A, GH26) funguslarından klonlanmış mannanaz enzimlerinin optimal pH değerleri ManA için 5.5–7.0 ve Man26A için 4.0–5.0 olarak bulunmuş olması, Tsukagoshi *et al.* (2014) Termitlerin bağırsaklarında bulunan simbiyotik protistlerin lignoselülozu doğal ortamda sindiren enzimler taşımasından yola çıkılarak *Reticulitermes speratus* termitinden klonlanmış mannanaz RsMan26H enziminin optimum pH 5.0 ve enzim stabilitesinin pH 5.0–6.5 aralığında değiştiğini göstermesi, Adesina *et al.* (2013) *Aspergillus niger* ve *Trichoderma sp.* funguslarından izole

ettikleri β -mannanaz enziminin optimum pH 5.0 olarak belirlenmiş olması, Katrolia *et al.* (2012) *Chaetomium sp.* CQ31 fungusundan klonlanmış rekombinant mannanaz enzim geni CsMan5A enziminin optimum pH 5.0 olarak tespit edilmesi, Dilokpimol *et al.* (2011) *Aspergillus nidulans* FGSC A4 suşundan klonlanmış endo- β -1,4-mannanaz ManA ve ManC enzimleri aynı optimum pH 5.5 da aktivite göstermiş olduklarını ve pH 4.5–7.0 ve 4.0–8.0, ManA ve ManC enzimlerinin stabilitesini koruduğunun belirtilmiş olması, Zhao *et al.* (2011) *Aspergillus niger* CBS 513.88 fungusundan klonlanmış mannan endo-1,4- β -mannosidaz man26A optimum pH 5.0 olarak ölçülmesi, Maria *et al.* (2008) solar tuzdan izole ettiği *Scopulariopsis candida* fungusunun LMK004 ve LMK008 suşlarından izole ettikleri endo- β -1,4-mannanaz enziminin optimum pH 5.0 ve 24 saat boyunca 4°C’de pH 5.0 -6.5 aralığında%80 oranında aktivite göstermiş olduğu, pH 6-7 aralığında stabil aktivitesini koruması, Mudau and Setati (2008) *Scopulariopsis candida* LMK004 suşundan klonladıkları mannanaz enziminin optimum pH 5.0 ve stabil pH aralığının 5.0-6.5 arasında değişmesi, Katrolia *et al.* (2012) *Chaetomium sp.* CQ31 suşundan klonladıkları mannanaz enziminin optimum pH değeri 5.0 ve stabil pH aralığının 5.0–11.0 arasında olması yapmış olduğumuz *Clitocybe geotropa* mantarından izolasyonu sağlanmış β -mannanaz enzimi için bulmuş olduğumuz optimum pH değeri 5.0 ve stabil pH aralığı 5.0 ve 6.0 değerlerini destekler niteliktedir.

Ebişke mantarından izole edilen serbest ve immobilize β -mannanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi için 10- 90°C sıcaklık aralıkları su banyosu kullanılarak ayarlanmış ve standart enzim aktivite ölçümü yapılarak serbest ve immobilize β -mannanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 60°C olarak belirlenmiştir. β -mannanaz enziminin termal stabilizasyonu belirlemek amacıyla enzimin optimum pH’sında (pH: 5.0) ve 30-90°C aralıkları olmak üzere yedi farklı sıcaklıkta iki saat boyunca her on beş dakikada bir aktivite ölçümü yapılmış, yapılan ölçümlere göre immobilize enzimin serbest enzime göre özellikle 20 ve 60°C’lerde çok daha stabil olduğu görülmüştür.

Zang *et al.* (2015) *Bacillus pumilus* GBSW19 bakteri suşundan izole edilmiş β -mannanaz enziminin optimum sıcaklığının 65°C olduğu ve 60°C’de 12 saat boyunca

enzim aktivitesini %50 oranında koruduğu anlaşılmıştır. Liu *et al.*(2015) *Bacillus subtilis* YH12 suşundan saflaştırdıkları β -mannanaz enziminin optimal sıcaklığın 55°C olduğu, enzimin termal stabilitesini 60°C sıcaklıkta 1 saat inkübasyonda sonra %85 aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Wang *et al.* (2013). Gram pozitif *Bacillus subtilis* TJ-102 bakteri suşundan β -mannanaz enzimini saflaştırılma ve karakterizasyonunu tanımlama amaçlı yapılmış çalışmada stabil sıcaklığın 50-65°C aralığında değiştiği, 4 saat boyunca ölçülen optimum sıcaklık değerinin 50°C'de sabitlendiği, Ghosh *et al.* (2013) *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 suşunda β -(1→4)-mannanaz enziminin termostabil etkisinin araştırılması sonucu CtManf enzimi için optimum sıcaklık 60°C, olarak belirlenmiştir. Puchart *et al.* (2004) tarafından yapılan diğer bir çalışmada; *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 fungusundan izole edilmiş ekstraselüler endo- β -1,4-mannanaz, MAN I (major tip) ve MAN II (minör tip) enzimlerinin optimum sıcaklık 60°C, stabil sıcaklığın 50–75°C aralıklarında olduğu belirlenmiştir. Yine Zhang ve grubu tarafından (2000) *Bacillus licheniformis* bakterisinde β -mannanaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu yapıldığı çalışma sonucunda optimum sıcaklık 60°C'de olması ve 6 saat boyunca ölçülen stabil sıcaklık değeri 50°C olarak ölçülmüştür ve bizim araştırmamızı desteklemektedir.

Phialophora sp P13 suşundan izole edilmiş olan man5AP13 enziminin ve *Bacillus subtilis* BCC 41051 suşundan izole etmiş oldukları mannanaz enzimlerinin optimum sıcaklığının 60°C olduğu ve iki saat boyunca 50-70°C aralıklarında enzim aktivitesinin sürdüğü belirlenmiştir ve ebişke mantarından izole ettiğimiz serbest ve immobilize β -mannanaz enzimi için ölçtüğümüz optimum ve stabil sıcaklık sonuçları ile aynı doğrultudadır (Zhao *et al.* 2010; Summpunn *et al.* 2011)

β -mannanaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri 20mM sodyum sitrat tamponunda (pH 6.0) hazırlanmış 5 mM konsantrasyonunda locust bean gum, nişasta, selüloz, fitat, ksilan, kazein jelatin ve pektin substratların kullanılarak her bir substrat için ayrı ayrı hesaplanmıştır. En yüksek V_{max} değerini çalışmada locust bean gum substratında göstermiştir . Serbest ve immobilize β -mannanaz enzimlerinin V_{max} değerleri sırasıyla 10.2EU/mg ve 14.35 EU/mg olarak bulunmuştur. K_m değerleri ise sırasıyla 0.588 mg/mL ve 0.122 mg/mL olarak hesaplanmıştır.

Puchart *et al.* (2004) *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 suşundan izole ettiği β -mannanaz enzimlerinin locust bean galaktomannan substratı kullanılarak belirlenmiş K_m (mg/mL) ve V_{max} ($\mu\text{mol dak}^{-1} \text{mg}^{-1}$) değerleri MAN I için 3.07 mg/mL ve 1935 $\mu\text{mol.dak}^{-1} \text{mg}^{-1}$; MAN II enzimi için 3.12 mg/mL ve 213 $\mu\text{mol dak}^{-1} \text{mg}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Song *et al.* (2008) Antatika Yosun Böceği türü *Cryptopygus antarcticus* klonlanmış β -1,4-D-mannanaz (CaMan) enziminin CaMan enziminin locust bean gum (LBG) substratında 416.3 U/mg aktivite göstermiştir. Zhao *et al.*(2011) *Aspergillus niger* CBS 513.88 fungusundan klonlanmış olduğu mannan endo-1,4- β -mannosidaz man26A enziminin guar gum substratı, konjak tozu ve LBG substratları kullanılarak V_{max} (U/mg) ve K_m değerleri belirlenmiştir. LBG substratı için V_{max} 1250. U/mg ve K_m değeri 23.50 mg mL⁻¹olarak bildirilmiştir. *Aspergillus nidulans* FGSC A4 suşundan kolonlanmış glikozid hidrolaz 5 (GH5) ailesi üyesi endo- β -1,4-mannanaz ManA ve ManC enzimlerinden ManA ve ManC enzimleri için V_{max} değeri LBG substratı için; ManA enzimi 400 \pm 4 ManC enzimi 320 \pm 4, olarak bulunmuştur (Dilokpimol *et al.*2011). *Sphingomonas sp.* JB13 suşundan izole edilmiş mannanaz enziminin Locust bean gum substratı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiğine göre K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 5.0 mg.ml⁻¹ ve 277.8 $\mu\text{mol.dak}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir (Zhou *et al.*2012). *Chaetomium sp.* CQ31 fungusundan klonlanmış yeni bir mannanaz gen kaynağı olarak üretilen rekombinant mannanaz enzim geni CsMan5A K_m değerleri LBG substratı için 3.1 mg mL⁻¹ olarak belirlenmiş ve V_{max} değerinin 5974.3 $\mu\text{mol dak}^{-1} \text{mg}^{-1}$ olarak ölçülmüştür (Katrolia *et al.* 2012). *Klebsiella oxytoca* KUB-CW2-3 suşundan klonlanmış mannanaz enziminin Michaelis-Menten sabitleri (K_m), maksimum hızı (V_{max}) değerleri; LBG substratı için sırasıyla 1.038mg/mL, 6.149 $\mu\text{Uml}^{-1}\text{dak}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Chantorn *et al.* 2013). *Penicillium oxalicum* fungusundan klonlanan endo-1,4- β -mannanaz enziminin, Locust bean gum, konjak mannan ve guar sakızı substratları kullanılarak belirlenmiş K_m değerleri ise sırasıyla LBG sustratı için; 7.6 mg mL⁻¹, V_{max} değerleri 1425.5 $\mu\text{mol dak}^{-1} \text{mg}^{-1}$, olarak ölçülmüştür (Liao *et al.* 2014). Nadaroglu ve grubu (2015) tarafından *Lactobacillus plantarum* (M24) suşundan saflaştırılan endo-1,4- β -mannanaz enziminin V_{max} değerleri 78.74 mannan dak¹ ve K_m değeri locust bean gum substratı için 0.592 mM olarak belirlenmiştir. Termofilik *Neosartorya fischeri* P1 fungusundan elde edilen yeni β -mannanaz eniziminin man5P1 LBG substratı

kullanılarak kinetik parametreleri olan K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.83 ± 0.2 mg/mL ve 1937.2 ± 28.7 mol/dak/mg olarak bulunmuştur (Yang *et al.* 2015).

Serbest ve immobilize β -mannanaz enziminin metal iyonlarına karşı dayanıklılığını belirlemek amacıyla $CuCl_2$, $HgCl_2$, $FeCl_2$, $MgCl_2$, $ZnCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $CdCl_2$ ve $CoCl_2$ gibi bazı metal iyonlarının hem serbest hemde immobilize enzim aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır. 1 mM ve 5 mM konsantrasyonda etkisi denenen metal iyonlarının inhibitör/aktivator sonuçları ölçülmüştür. Serbest mannanaz enzimini 5 mM konsantrasyonda Mg^{2+} iyonunun yaklaşık %10 oranında enzim aktivitesini inhibe ederken Zn^{2+} iyonunun 1 mM ve 5mM konsantrasyonda serbest ve immobilize enzimi yaklaşık %10 civarında inhibe ettiği belirlenmiştir. Immobilize mannanaz enziminin ayrıca Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarının bulunduğu ortamda inhibe olduğu gözlemlenmiştir. Genel olarak kullanılan diğer metal iyonlarının hem serbest hemde immobilize mannanaz enzim aktivitesini arttırdığı görülmüştür. Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} ve Hg^{2+} metal iyonlarının immobilize mannanaz enziminin aktivitesini arttırdığı özellikle 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarında Zn^{2+} iyonunun serbest ve immobilize enzim için sırasıyla %363.3 ve %430.0 oranında enzimi aktive ettiği belirlenmiştir.

Enzimin neredeyse tüm metal iyonları tarafından aktive olması enzimin endüstriyel amaçlı olarak kullanımı için uygun olacağını düşündürmektedir. Tarafımızdan önceden mantar kaynaklarından elde edilen mannanaz enzimlerinde metal iyonlarının aktive ettiği belirlenmiştir ve bu bulgular bizim çalışmamızı destekler niteliktedir (Onem ve Nadaroglu 2014). Nadaroglu *et al.* (2015) *Lactobacillus plantarum* (M24) suşundan izole ettikleri β -mannanaz enziminin çeşitli metal iyonları ve kimyasal reaktifler etkisini ölçmek için kullandıkları Fe^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} ve Zn^{2+} metal iyonlarının 1mM ve 5 Mm konsatrasyonlarında enzim iyon aktivitesinin çalışılmış tüm metal iyonlarında görüldüğü özellikle Co^{2+} ve Zn^{2+} metal iyon aktivitelerinin 5 mM konsatrasyonlarında enzim aktivitesinin maksimum %254.1 ve %286.3 oranlarına ulaştığı sunulmuştur ve yapılmış olan çalışmada sunulan veriler bizim çalışmamızda ulaştığımız verilerle aynı doğrultudadır.

Zahura *et al.* (2010) Mannan karbohidrat polimerini parçalayan β -1,4-mannanaz

AkMan enziminin metal iyon aktivitesinin ölçümü sonucu bizim çalışmamızın aksine Fe^{3+} iyonunda enzim aktivitesinin tamamen durduğu, Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Ag^+ iyonlarında aktivitenin %80-50 oranında azaltıldığı, Co^{2+} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , DTT ve 2-merkaptoetanol ortamında ise enzim aktivitesinin %50 oranında arttığı bildirilmiştir. Shi *et al.* (2011) *Streptomyces sp.* S27 fungusundan izole edilmiş β -mannosidaz geni olan, man2S27 enzim aktivitesi üzerindeki çeşitli metal iyonları ve kimyasal reaktifler etkisini ölçmek için 1 mM McIlvaine tamponu (pH 7.0) içeren 5 mM konsantrasyonlarında hazırlanmış farklı iyonlarının etkilerinin ölçülmesi sonucu yine çalışmamızın aksi doğrultusunda EDTA, Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin bulunmadığı, Cr^{3+} ve SDS'li ortamda enzim aktivitesinin yüksek oranda inhibe olduğu ve Ag^+ ve Hg^{2+} enzim aktivitesinin tamamıyla durduğu gözlenmiştir.

Mevsim meyvelerinden elma, portakal, nar, çilek, kivi gibi bazı meyveler pulp haline getirilerek hem immobilize enzim homojenatı hemde saf enzim eklenerek bunlara karşı saf su eklenmiş kör numuneleri hazırlanmış ve 4 saat boyunca enzimin optimum pH ve optimum sıcaklık ortamında çalkalamalı inkübatörde bekletilerek durultma işlemini gerçekleştirdiğimiz çalışma sonucu portakal, nar, çilek, kivi, kuşburnu ve elma suyu hacminin serbest ve immobilize mannanaz enziminin meyve pulplarını hidrolizlemesi ile kontrol karşılaştırıldığında meyve sularının verimlerinde artış olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, özellikle kuşburnu üretimi üzerinde serbest ve immobilize mannanaz enziminin sırasıyla %146,2 ve %223,1 oranında verimi artırdığı tespit edilmiştir.

Mannanaz enzimi kullanılarak meyve sularını durultma işlemlerinde kullanımına dair birkaç literatür bulunmaktadır. Çalışmamızda meyveler pulp haline getirilerek kontrole göre katı madde oranının kuru ağırlığı %36.0 oranında azaltılmıştır. Bunun bir sonucu olarak, meyve suyu üretim verimi arttırılmıştır. Nadaroglu vd (2015) tarafından yapılmış olan çalışmada bizim çalışmamızla aynı doğrultuda mannanaz enzimi uygulanmış meyve sularında kontrollerine göre meyve içeriklerindeki mannan oranlarının azalmasından dolayı meyve sularında verimin arttırdığı, Adıgüzel vd (2015) tarafından yapılmış farklı bir çalışmada ise *Bacillus pumilus* (M27) suşundan izole edilmiş mannanaz enziminin elma suyunu %154 oranında berraklaştırdığı

belirlenmiştir. Başka bir çalışmada ise; *Lactobacillus plantarum* (M24) bakterisinden saflaştırılmış β -mannanaz enziminin meyve sularını durultma ve saflaştırma prosesi çalışmasında özellikle şeftali suyunu %223.1 durulttuğu belirlenmiştir (Nadaroglu vd 2014). *Weissella viridescens* (LB 37) saflaştırılmış endo-beta-1,4 mannanaz enziminin mevsim meyvelerini durultma işleminde kullanılabilirliğinin incelendiği çalışmada Adıguzel vd (2015) elde edilen sonuçlar çalışmamızı destekler niteliktedir.

Sonuç olarak; meyve suyu üretiminde yüksek viskoziteye ve bulanıklığa sahip olan olgun meyve materyallerinden meyve suyu eldesinde mannanaz enzimi kullanılarak berraklaştırma prosesleri maliyeti oldukça düşürmektedir. Meyve suyu eldesi mannanaz enziminin kullanımı ile ortamın hem viskozitesi azalmakta hemde mannanlar hidroliz olduğu için yapı içerisinde tutulan suyun salınımı sağlanmış ve meyve suyunun miktarının artması sağlanmış olmaktadır. En büyük etkiyi kuşburnu suyu elde etmede göstermiş olduğu belirlenmiş ve içerisinde bulunduğumuz Doğu Anadolu Bölgesinde fazla miktarda kuşburnu doğal ortamda yetişmekte olması elde ettiğimiz ebişke mannanaz enzimi kullanılarak kuşburnu suyu üretiminde rahatlıkla kullanılabilceği düşünülmektedir.

Ayrıca ucuz ve kolayca üretimi sağlanabilinen Ebişke (*Clitocybe geotropa*) mantarlarından yeni ve biyogüvenli olarak izole edilen β -mannanaz enziminin karakterizasyonunun belirlenmesi ve magnetik kitosan moleküllerine immobilizasyonu sonucu yüksek oranda katalitik aktivitesini koruması, metal iyonlarına karşı dirençli olması, yüksek sıcaklıkta ve farklı pH'larda enzim stabilitesini koruması nedenlerinden dolayı özellikle meyve sularında verim artırma ve durultma işlemleri olmak üzere gıda, yem ve gübre endüstrilerinde daha uzun süre ve dayanıklı olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abhilash, M., 2010. Potential applications of Nanoparticles. International Journal of Pharma and Bio Sciences V1(1).
- Ademark, P., Lundqvist, J., Hagglund, P., Tenkane, M., Torto, N., Tjerneld, F., Stalbrand, H., 1999. Hydrolytic properties of a β -mannosidase purified from *Aspergillus niger*. Journal of Biotechnology, (75) 281–289.
- Ademark, P., Varga, A., Medve, J., Harjunpaa, V., Drakenberg, T., Tjerneld, F., Stalbrand, H., 1998. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: purification and properties of a β -mannanase. J Biotechnol 63:199-210.
- Adesina, F.,C., Oluboyede, O.,A., Agunbiade, O., S., Aderibigbe,B., O., Kolade, O.H., Oluwole, E., M. 2013. Production and characterization of fungal extracellular β -mannanase. American Journal of Research Communication, www.usa-journals.com, ISSN: 2325-4076.
- Adibmoradi, M., Mehri, M., 2007. Effects of β -mannanase on broiler performance and gut morphology. 16th European Symposium on Poultry Nutrition, Stasbourg, France, pp 471–47.
- Adiguzel, A., Nadaroglu, H. and Adiguzel, G. 2015. Purification and characterisation of β -mannanase from *Bacillus pumilus* (M27) and its applications in some fruit juices, Journal of Food Science and Technology 52(8):5292–5298.
- Adiguzel, G., Sonmez, Z., Adiguzel, A., and Nadaroglu, H., 2015. Purification and characterization of a thermostable endo-beta-1,4 mannanase from *Weissella viridescens* LB37 and its application in fruit juice clarification. Eur Food Res Tech DOI: 10.1007/s00217-015-2584-x.
- Aehle, W., 2007. Enzymes in Industry: Production and Applications. Wiley-VCH 4.
- Al-Ghazzewi F.H., Khanna, S., Tester, R.F., Piggott, J., 2007. The potential use of hydrolysed konjac glucomannan as a prebiotic. J Sci Food Agric 88(7) 1758-66.
- Alptekin, Ö., Tükel, S.S, Yıldırım D., and Alagoz D., 2009. Characterization and properties of catalase immobilized onto controlled pore glass and its application in batch and plug-flow type reactors, Journal of Molecular Catalysis:Enzymatic 58 (1), 124-131.
- Akdağ, E.,2011. Türkiye Meyve Suyu v.b. Ürünler Sanayi Raporu, Meyve Suyu Endüstrisi Derneği (Meyed)
- Anonim, 2016. “Türkiye cumhuriyeti ekonomi bakanlığı, meyve suları sektör raporu 2012.
- Anonymous, 2016a. “<http://www.wildfooduk.com/mushroom-guides/funnel-mushroom-mushroom/>“
- Anonymous, 2016b. <http://www.first-nature.com/fungi/clitocybe-geotropa.php>.
- Andreescu, S., Bucur, B. and Marty, J.L., 2006. Affinity Immobilization of Tagged Enzymes. Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells, Second Edition Edited by: J. M. Guisan © Humana Press Inc., Totowa, NJ., Vol.9; pp.97–106.

- Antalis, C., Fogel, S. and Ballousu, C. E., 1973. Genetic Control of Yeast Mannan Structure. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 248, No. 13, Issue of July 10, PP. 4655-4659.
- Ardevol, A. and Rovira, C., 2015. Reaction mechanisms in carbohydrate-active enzymes: Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Insights from ab Initio Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Dynamic Simulations. *J. Am. Chem. Soc.*, 137, 7528–7547.
- Arotupin, D.J. and Olaniyi, O.O., 2013. Screening and identification of mannanase producing fungi isolated from selected agricultural wastes, *British Microbiology Research Journal* 3(4): 635-644.
- Arslan, F., 2004. Ksantin Tayini İçin Polipirol Filme Ksantin Oksidaz Enziminin İmmobilizasyonu ile Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması. Dok. Tezi Gazi Üni. Fen Bil. Ens.
- Ası, T., 1999. Tablolarla Biyokimya. Cilt 2, <http://veterinary.ankara.edu.tr/~fidanci>
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K., 1992. Interlaboratory testing methods for assay of xylanase activity. *J Biotech* 23: 257-270.
- Ban, Z., Barnakov Y.A., Li F., Golub, V.O., Connor C.J., 2005. The Synthesis of core-shell iron-gold nanoparticles and their characterization. *J. Mater. Chem.*, 15, 4660-4662.
- Beaucamp, K., Bergmeyer, H., Ulrich, B., Heinz, K., Jaworek, D., Hochstetter, M., 1972. Carrier-bound proteins. *Ger Offen*, DE 71-2128743.
- Beilen, J.B. and Li, Z., 2002. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, (13) 4, p. 338–344.
- Benech, R.O., Li, X., Patton, D., Powlowski, J., Storms, R., Bourbonnais, R., *et al.*, 2007. Recombinant expression, characterization, and pulp prebleaching property of a *Phanerochaete chrysosporium* endo-1,4-β-D-mannanase. *Enzyme and Microbial Technology*, (41) 740–747.
- Bettiol, J.L.P., Boutique, J.P., Gualco, L.M.P., Johnston, J.P., 2000. Nonaqueous liquid detergent compositions comprising a borate releasing compound and a mannanase. Patent EP1059351.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, (18) 355-383.
- Bisswanger, H., 2002. *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*, WILEY-VCH, ISBN 3-527-30343-X.
- Blibech, M., Chaari, F., Bhiri, F., Dammak, I., Ghorbel, R.E., Chaabouni, S. E., 2011. Production of manno-oligosaccharides from locust bean gum using immobilized *Penicillium occitanis* mannanase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (73) 111–115.
- Boratynski, J., and Zal T., 1990. Colorimetric micromethods for glutaraldehyde determination by means of phenol and sulfuric acid or phenol and perchloric acid *Analytical Biochemistry* 184, Issue 2, 1 February, Pages 259-262.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Chemistry*, 2, 248-253.
- Brena, B., Gonzalez, P.P, Viera, F.B., 2013. Immobilization of enzymes: A literature survey. *Methods Mol Biol.*;1051:15-31. doi: 10.1007/978-1-62703-550-7_2.

- Brena, B.M. and Batista- Viera, F., 2006. Immobilization of Enzymes. Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells, Second Edition Edited by: J. M. Guisan © Humana Press Inc., Totowa, NJ., Vol.2; pp.15– 30.
- Brena, B.M. and Viera F.B., 2006. Immobilization of Enzymes and Cells Methods in Biotechnology book (22)15-30 DOI: 10.1007/978-1-59745-053-9_2.
- Brown, H.D., Patel, A.B. and Chattopadhyay, S.K.,1968. Enzyme entrapment within hydrophobic and hydrophilic matrices. Journal of Biomedical Materials Research, 2:231-235.
- Buchholz, K. and Klein, J., 1987. Characterization of Immobilized Biocatalysts. In: Methods in Enzymology volume 135, (Mosbach, K. ed.), Academic Press, London, pp.3–30.
- Buchholz, K. and Poulson, P.B., 2000. Overview of History of Applied Biocatalysis, in: Applied Biocatalysis, 1–15, A.J.J. Straathof, P. Adlercreutz, (Eds.), Harwood Academic Publishers.
- Buchholz, K., Kasche, V., Bornscheuer, U.T., 2005. Biocatalysts and Enzyme Technology. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, ISBN: 3-527-30497-5.
- Buxbaum, E. 2007. Fundamentals of Protein Structure and Function. Springer, pp. 59-63, West Indies.
- Cabral, J.M.S. and Kennedy, J.F., 1991. Covalent and coordination immobilization of proteins. In: Protein immobilization. Fundamentals and Applications (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, New York, NY, pp.73–138.
- Cabral, J.M.S., Novais, J.M. and Kennedy J.F., 1986. Immobilization studies of whole microbial cells on transition metal activated inorganic supports. Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.23; pp.157–162.
- Çağdaş, M., Sezer, A.D.,and Bucak, S.,2014. Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Delivery Drug. Application of Nanotechnology in Drug Delivery, DOI: 10.5772/58459.
- Cai, H., Shi, P., Luo, H., Bai, Y., Huang, H., Yang, P. and Yao, B.,2011. Acidic β -mannanase from *Penicillium pinophilum* C1: Cloning, characterization and assessment of its potential for animal feed application. Journal of Bioscience and Bioengineering,112 (6), 551–557.
- Callihan, J.A., Fu, Y., Jeong, S.H., Kim, J., Pai, C.M., Park, K.,*et al.et al.*,2005. Mannose-based fast dissolving tablets. United States of America patent, WO2004047810A1.
- Cao, L., 2005. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp.174.
- Champe, P. and Harvey, R., 1997. “Enzimler”, Biyokimya, Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul, 48-53.
- Chang ,T.M.,1964. Semipermeable Microcapsules. Science, 146(3643):524-5.
- Chantorn, S.T., Pongsapipatana, N., Keawsompong, S., Ingkakul, A., Haltrich, D., Nitisinprasert, S., 2013. Characterization of mannanase S1 from *Klebsiella oxytoca* KUB-CW2-3 and its application in copra mannan hydrolysis, ScienceAsia39, doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2013.39.236.
- Chaplin, M. and Bucke, C.,1990. Enzyme Technology, Cambridge University Press

- Chauhan, P.S., Puri, N., Sharma, P., Gupta, N., 2012. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* (93) 1817–1830.
- Chauve, M., Mathis, H., Huc, D., Casanave, D., Monot, F., Ferreira, N.L., 2010. Comparative kinetic analysis of two fungal β -glucosidases. *Biotechnol Biofuels* 3(3). doi:10.1186/1754-6834-3-3.
- Chen, B.K., and Diosady, L.L. 2003. Enzymatic aqueous processing of coconuts. *Int. J. Appl. Sci. Engg.* 1: 55–61.
- Chen, D.H., Liao, M.H., 2002, Preparation and characterization of YADH-bound magnetic nanoparticles, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16, 283-291.
- Chen, H., 2014. *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*, DOI 10.1007/978-94-007-6898-7_2, Chemical Industry Press, Beijing and Springer ScienceCBusiness Media Dordrecht 2014.
- Chen, X., Cao, Y., Ding, Y., Lu, W., Li, D., 2007. Cloning, functional expression and characterization of *Aspergillus sulphureus* β -mannanase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 128:452–461.
- Çiftçi, M., Adıgüzel, A., Erat, M., Şahin, M., 2004. *Bacillus* sp.(BA-142) Bakterisinden Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Kısmen Saflaştırılması Ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.* 35(3-4)151-158.
- Comfort, D.A., Swapnil, R., Chhabra, S.R., Connors, S.B., Chou, C.J., Epting, K.L., 2004. Strategic biocatalysis with hyperthermophilic enzymes. *Green Chem* (6) 459-465.
- Costa, S.A., Azevedo, H.S. and Reis, R.L., 2004. Enzyme Immobilization in Biodegradable Polymers for Biomedical Applications. 1936-C017. *fm Page.*, Vol.17; pp. 301-324.
- Coutinho, P.M., and Henrissat. B., 1999. Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach, p. 3-12. In H. J. Gilbert, G. J. Davies, B. Henrissat, and B. Svensson (ed.), *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*, vol. 246. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Daskiran, M., Teeter, R.G., Fodge, D. and Hsiao, H.Y. 2004. An Evaluation of Endo- β -D-mannanase (Hemicell) Effects on Broiler Performance and Energy Use in Diets Varying in β -Mannan Content. *Poultry Science*, (83) 662–668
- Demirel, G., Ozcetin, G., Sahin, F., Tümtürk, H., Aksoy, S., Hasirci, N. 2006. Semi-interpenetrating polymer networks (IPNs) for entrapment of glucose isomerase. *Reactive and Functional Polymers*, (66) 389-394.
- Dhawan, S. and Kaur, J., 2007. Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Crit Rev Biotechnol* 27(4)197-216.
- Dickey, F.H., 1955. Specific adsorption. *J. Phys. Chem.*, (59) 695–707.
- Dilokpimol, A., Nakai, H., Gotfredsen, C.H., Baumann, M.J., Nakai, N., Hachem, M.A., *et al.* 2011. Recombinant production and characterisation of two related GH5 endo- β -1,4-mannanases from *Aspergillus nidulans* FGSC A4 showing distinctly different transglycosylation capacity. *Biochimica et Biophysica Acta*, (1814) 1720-1729.

- Doğan, G., 2008. Yeni Nesil Polimerik Nanoyapıların Hazırlanması ve Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılması. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- Duruksu, G., Ozturk, B., Biely, P., Ogel, Z.B., 2009. Cloning, expression and characterization of endo- β -1,4-mannanase from *Aspergillus fumigates* in *Aspergillus sojae* and *Pichia pastoris*. *Biotechnol Prog* (25) 271-276.
- Dyk, J.S., Sakka, M., Sakka, K., Pletschke, B.I., 2010. Identification of endoglucanases, xylanases, pectinases and mannanases in the multi-enzyme complex of *Bacillus licheniformis* SVD1, *Enzyme and Microbial Technology*, (47) 112–118.
- Ersöz, H., 2010. Alkoldehidrogenaz (Adh) Enziminin Tavuk Karaciğerinden Saflaştırılması Ve Florisil Üzerine İmmobilizasyonu. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Etcı, K., 2011. Sol- Jel Tekniğine Göre Manyetik Nanopartiküllere Lipaz İmmobilizasyonu Ve Bazı Enantiyoseçimli Tepkimelerde Kullanılması. Yük.Lis.Tezi, Selçuk Üni. Fen Bil. Ens.
- Fan, Z., Wagschal, K., Chen, W., Montross, M.D., Lee, C.C., Yuan, L., 2009. Multimeric hemicellulases facilitate biomass conversion. *Appl Environ Microbiol* (75) 1754–7.
- Fattah, A.A.F., Hashem, A.M., Ismail, A.M.S., Refai, E.M.A., 2009. Purification and some properties of β -mannanase from *Aspergillus oryzae* NRRL 3448. *J App Sci Res* 5(12) 2067-2073.
- Ferreira, H.M. and Filho, E.X.F., 2004. Purification and characterization of a β -mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. *Carbohydrate Polym* 57:23–29.
- Filho, E.X.F., 1998. Hemicellulases and biotechnology. In: Pandalai SG(ed) Recent research developments in microbiology. Research Signpost, Trivandrum, pp 165–176.
- Fu Y, Jeong SH, Kim J, Callihan JA, Park K, Pai CM *et al. et al.*, 2006. Mannose-based fast dissolving tablets. United States of America patent US20060134195A1.
- Geçkil, H., 2012. Biyokimya II. İnönü Üni. Fen Ed. Fak. Biyoloji Bölümü yayınları p. 89-101.
- Ghosh, A., Luis, A.S., Bras, L.A. Fontes, G.A., 2013. Thermostable Recombinant β -(1 \rightarrow 4)-Mannanase from *C. thermocellum*: Biochemical Characterization and MannoOligosaccharides Production. *J. Agric. Food Chem.*, (61) 12333–12344 dx.doi.org/10.1021/jf403111g.
- Gibbs, M.D., Elinder, A.U., Reeves, R.A., and Bergquist, P.L. 1996. Sequencing, cloning and expression of the β -1,4-mannanase gene manA from the extremely thermophilic anaerobic bacterium *Caldicellulosiruptor bescii* Rt8B.4. *FEMS Microbiol. Lett.* (141) 37–43.
- Goldstein, A. M., Alter, E. N. dan Seaman, J. K. 1973. Guar gum, p. 303-321. In R. Whistler and J.M. BeMiller (ed.), *Industrial Gums*. Academic Press, New York.
- Gonzalez, D. S. and Jordan, I. K., 2000. The α -Mannosidases: Phylogeny and Adaptive Diversification. *Mol Biol Evol* 17 (2) 292-300.

- Gonze, D. and Kaufman, M., 2013. Chemical and enzyme kinetics. "homepages.ulb.ac.be.
- Gübitz, G.M., Hayn, M., Sommerauer, M., Steiner, W., 1996. Mannandegrading enzymes from *Sclerotium rolfsii*: Characterization and synergism of two endo β -mannanases and β -mannosidase. *Biores Technol* (58) 127–135.
- Gupta, A.K., Gupta, M., 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26(18), 3995-4021.
- Hagerdal B. H., 1986. Water activity a possible external regulator in biotechnical processes. *Enzyme Microb Technol*, (8) 322-327.
- Hagglund, P., 2002. Mannan-hydrolysis by hemicellulases, Enzyme-polysaccharide interaction of a modular β -mannanase. Doctoral dissertation, Lund University Dep. of Biochemistry, Sweden ISBN: 91-628-5203-5, LUNKDL/(NKBK-1074)/ 1-176 /2002.
- Hamilton, L.M., Kelly, C.T., ve Fogarty, W.M., 1999. Purification and properties of the raw starch degrading α -amylase of *Bacillus* sp. IMD434. *Biotechnology Letters*, (21) 111-115.
- Han, Y., Dodd, D., Hespden, C.W., Adjei, S., Schroeder, C.M., Mackie, R.I., Cann, I.K.O., 2010. Comparative analyses of two thermophilic enzymes exhibiting both β -1,4 mannosidic and β -1,4 glucosidic cleavage activities from *Caldanaerobius polysaccharolyticus*. *J Bacteriol* 192(16) 4111-4121.
- Harjunpaa, V.A., Telemann, M., Siikaaho and Drakenberg, T., 1995. Kinetic and stereochemical studies of manno-oligosaccharide hydrolysis catalysed by β -mannanases from *Trichoderma reesei*. *Eur. J. Biochem.* (234) 278-283.
- Haynes, R. and Walsh, K.A., 1969. Enzyme envelopes on colloidal particles. *Biochem Biophys Res Commun*, (36) 235–242.
- He, X., Liu, N., Li, W., Zhang, Z., Zhang, B., Ma, Y., 2008. Inducible and constitutive expression of a novel thermostable alkaline β -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Enzyme and Microbial Technology* (43) 13–18.
- Henrissat, B., 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.* (280) 309-316
- Ho, G.H., Liao, C.C., 1985. Multi-layer immobilized enzyme compositions, US Patent 4,506,015 A.
- Honda, T., Miyazaki, M., Nakamura, H. and Maeda, H., 2006. Immobilization of enzymes on microchannel surface through cross-linking polymerization AICHe Spring National Meeting, Orlando, FL, USA.
- Hung, T.C., Giridhar, R., Chiou, S.H., Wu, W.T., 2003. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (26) 69-78.
- Immobilized Enzymes: Past, Present and Prospects Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design. Linqiu Cao Copyright © 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ISBN: 3-527-31232-3.
- Imran, M., T.N., Pasha, Saima, Akram, M., Mehmood, K., Sabir, A.J., 2014. Effect of β -Mannanase on Broilers Performance at Different Dietary Energy Levels. *Global Veterinaria*, 12 (5) 622-626.

- Jansen, E.F., Tomimatsu, Y., Olsan, A.C., 1979. "Cross-linking of α -chymotrypsin and other proteins by reaction with glutaraldehyde". Arch. Biochem. Biophys., Vol.144; pp. 394–400.
- Jegannathan, K.R. and Abang, S., 2008. Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase-A Critical Review. Critical Review in Biotechnology., Vol.28; pp. 253–264.
- Jiang, Z., Wei, Y., Li, D., Chai, P., Kusakabe, I., 2006. High-level production, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. Carbohydrate Polym (66) 88–96.
- Jorgensen, H., Sanadi, A.R., Felby, C., Lange, N.E.K., Fischer, M., Ernst, S., 2010. Production of ethanol and feed by high dry matter hydrolysis and fermentation of palm kernel press cake. Appl Biochem Biotechnol (161) 318-332.
- Kagedal, L., 1998. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. In: Protein Purification (Janson, J. C. and Rydén, L., eds.), Wiley-VCH, New York, NY, pp. 311-342.
- Kahraman, A.S., 2008, Non-Manyetik Ve Manyetik Lateks Partiküllerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Doku Mühendisliği Uygulamaları, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 1-97.
- Kaplan, D.L. and Gross, R.A., 2000. Introduction to Enzyme Technology in Polymer Science. ACS Symposium Series, Vol. 764, Chapter DOI: 10.1021/bk-2000-0764.ch007.
- Kara, F., Demirel, G., Tümtürk, H. 2006. Immobilization of urease by using chitosan–alginate and poly(acrylamide-co-acrylic acid)/ κ -carrageenan supports. Bioprocess and Biosystems Engineering, (29) 207-211.
- Karube, I., Yugeta, Y. and Suzuki, S., 1977. Electric field control of lipase membrane activity. Biotechn. Bioeng., Vol.19; pp.1493–1501.
- Katrolia, P., Zhou, P., Zhang, P., Yan, Q., Li, Y., Jiang, Z., Xu, H., 2012. High level expression of a novel-mannanase from *Chaetomium* sp. Exhibiting efficient mannan hydrolysis, Carbohydrate Polymers (87) 480-490.
- Kent, L.H., Slade, J.H.R., 1960. Immunochemically-active cross-linked polystyrene preparations. Biochemistry Journal, (77) 12–17.
- Kim, D.Y., Ham, S.J., Lee, H.J., Kim, Y.J., Shin, D.H., Rhee, Y.H., Son, K.H., Park, H.Y., 2011. A highly active endo-1,4- β -mannanase produced by *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13, a hemicellulolytic bacterium in the gut of *Eisenia fetida*. Enzyme Microb Technol (48) 365-370.
- Kirk, O., Borchet, T.V., Fuglsang, C.C., 2002. Industrial enzyme applications. Curr Opin Biotechnol 13:345–351.
- Klibanov, A.M., 1997. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? Trends Biotechnol, 15:97-101.
- Klyosov AA, Dotsenko GS, Hinz SWA, Sinitsyn AP (2012) Structural features of β -(1-4)-D-galactomannans of plant origin as a probe for β -(1-4)-mannanase polymeric substrate specificity. Carbohydr Res 352:65–69.
- Kocatürk, S., 2008. Enginar Polifenol Oksidazının Alginat Ve Karragenan Jellerde İmmobilizasyonu ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi. Yük.Lis.Tez, Fen Bil. Ens., Trakya Üniversitesi.
- Kollarova, K., Liskova, D., Capek, P., 2006, Further biological characteristics of galactoglucomannan oligosaccharides. Biologia Plantarum, 50 (2), pp 232-238.

- Kote, N.V., Patil, A.G.G., Mulimani, V.H., 2009. Optimization of the production of thermostable endo- β -1,4 mannanase from a newly isolated *Aspergillus niger* gr and *Aspergillus flavus* gr. Appl Biochemistry Biotechnology 152:213-223.
- Kumakura, M. and Kaetsu, I., 2003. Immobilization of cellulase using porous polymer matrix. J Appl Polymer Sci., Vol.29(9); pp.2713-2718.
- Kyomugasho, C., Christiaens, S., Shpigelman, A., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E., 2015. FT-IR spectroscopy, a reliable method for routine analysis of the degree of methylesterification of pectin in different fruit- and vegetable-based matrices. Food Chemistry (176) 82-90.
- Larsson, A.M., Anderson, L., Xu, B., Munoz, I.G., Uson, I., Janson, J.C., Stalbrand, H., Stahlberg, J., 2006. Three-dimensional crystal structure and enzymic characterization of β -mannanase Man5A from blue mussel *Mytilus edulis*. J Mol Biol 357:1500-1510.
- Lee, K.M., Blaghen, M., Samama, J.P., Biellmann, J.F., 1986, Cross-linked crystalline horse liver alcohol dehydrogenase as a redox catalyst: activity and stability towards organic solvent. Bioorg Chem 14:202-210.
- Li, Y., Yang, P., Meng, K., Wang, Y., Luo, H., Wu, N., Fan, Y., Yao, B., 2008. Gene, cloning, expression and characterization of a novel β - mannanase from *Bacillus circulans* CGMCC 1416. J Microbiol Biotechnol 18:160–166
- Li, Y.N., Meng, K., Wangm Y.R., and Yao, B., 2006. β -mannanase from *B. subtilis* B36: purification, properties sequencing, gene cloning and expression in *E. coli*. Z. Naturforsch (C). 61: 840-846.
- Liao, H., Li, S., Zheng, H., Wei, Z., Liu, D., Raza, W., Shen, Q. and Xu, Y., 2014. A new acidophilic thermostable endo-1,4- β - mannanase from *Penicillium oxalicum* GZ-2: cloning, characterization and functional expression in *Pichia pastoris*. BMC Biotechnology, (14) 90.
- Lin, S.S., Dou, W.F., Xu, H., Li, H.Z., Xu, Z.H., and Ma, Y., 2007. Optimization of medium composition for the production of alkaline β -mannanase by alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 using response surface methodology. Appl. Microbiol. Biotechnol. 75 (5) 1015–1022.
- Linqiu, C., 2005. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Applications and Design, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim., pp.475-481.
- Liu, H.X., Gong, J.S., Li, H., Lu, Z.M., Li, H., Qian, J.Y., *et al.* 2015. Biochemical characterization and cloning of an endo-1,4- β -mannanase from *Bacillus subtilis* YH12 with unusually broad substrate profile. Process Biochemistry, (50) 712–721.
- Lv, J.N., Chen, Y.Q., Guo, X.J., Piao, X.S., Cao, Y.H. and Dong, B., 2013 Effects of Supplementation of β -Mannanase in Corn-soybean Meal Diets on Performance and Nutrient Digestibility in Growing Pigs. Asian-Aust. J. Anim. Sci., 26(4) 579-587
- Mabyalwa, M.M., and Setati, M.E., 2006. Screening and identification of endomannanase-producing microfungi from hypersaline environments. Current Microbiol. 52 (6): 477–481.
- Madigan, M.T. and Martinko, J.M., 2010. Mikroorganizmaların Biyolojisi 11.baskı Çeviri Editörü : Prof. Dr. Cumhuri Çökmüş Palme Yayıncılık p.110-118.

- Maity, D., Agrawal, D.C., 2007, Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 308, 46-55.
- Malgas, S., Dyk, S.J., Pletschke, B.I., 2015. β -Mannanase (Man26A) and α -galactosidase (Aga27A) synergism A key factor for the hydrolysis of galactomannan substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, (70) 1–8.
- Manecke, G., Foerster, H.J., 1969. Reactive polystyrene as carriers of enzymes and proteins. *Makromolekular Chemistry*, 91:136–154.
- Marangoni, A.G., 2003. *Enzyme Kinetics: A Modern Approach*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. P.70-116, Isbn 0-471-15985-9.
- Maria, M. M. and Evodia, S.M., 2008. Partial purification and characterization of endo- β -1,4-mannanases from *Scopulariopsis candida* strains isolated from solar salterns, *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (13), pp. 2279-2285.
- Martin, F. and Bucke C.C., 1990. *Enzyme Technology*. Cambridge University press, ISBN:0 521 34429 8(Google Books).
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M. and Fernandez-Lafuente, R., 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol.*, Vol.40; pp.1451-1463.
- Matheson, N.K., 1990. Mannose-based polysaccharides in carbohydrates. *Met in Plant Biochem.books* 2:371–413 edited by Dey, P.M.
- Mclaren, A.D., 1957. Concerning the pH dependence of enzyme reactions on cells, particulates and in solution. *Science*, (125) 697-697.
- Messing, R., 1975. *Immobilized Enzymes For Industrial Reactors*. Academic press, London.
- Metin, K., 2007. Moleküler Biyoloji Teknikleri II: Protein Analiz Teknikleri. *Moleküler Biyoloji* (Yıldırım, A., Bardakcı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B.), Nobel Yayıncılık, Sayfa 555-598, Ankara.
- Metz, M.A. and Schuster, R., 1959. Isolation and proteolysis enzymes from solution as dry stable derivatives of cellulosic ion exchangers. *Journal of Americane Chemistry. Soc.*, 81:4024-4028.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* (31) 426-428.
- Moreira, L.R. and Filho, E.X., 2008. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl Microbiol Biotechnol.* 79(2):165-78. doi: 10.1007/s00253-008-1423-4.
- Mudau, M.M. and Setati, M.E., 2008. Partial purification and characterization of endo- β -1,4 mannanases from *Scopulariopsis candida* strains isolated from solar salterns. *African Journal of Biotechnology* 7(13):2279–2285.
- Muhammad, S., Fawwad, A., Mansoor, J. and Shahbaz, A., 2015. Effect of β -Mannanase on Broiler's Performance. *Scholarly Journal of Agricultural Science*, Vol. 5(7), pp. 237-246.
- Mussini, F.J., Coto, C.A., Goodgame, S.D., Lu, C., Karimi, A.J., Lee, J.H. and Waldroup, P.W., 2011. Effect of β -Mannanase on Broiler Performance and Dry Matter Output Using Corn-Soybean Meal Based Diets. *International Journal of Poultry Science*, 10 (10): 778-781.

- Muthana, M., Scott, S. D., Farrow, N., Morrow, F., Murdoch, C., Grubb, S., Brown, N., Dobson, J., Lewis, C. E., 2008, A novel magnetic approach to enhance the efficacy of cell-based gene therapies, *Gene Therapy*, 15(12), 902-910.
- Nadaroglu, H., Adiguzel, A. and Adiguzel G., 2015. Purification and characterisation of β -mannanase from *Lactobacillus plantarum* (M24) and its applications in some fruit juices. *International Journal of Food Science and Technology*, (50)., 1158–1165 doi:10.1111/ijfs.12739.
- Nagarajan, R., Hatton, T.A., 2008. Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation and Functionalization. Oxford University Pres., Washington, DC.
- Nasliyan, M.V., 2012. Çeşitli Dokulardan Aldoz Redüktaz Enziminin İzolasyon ve Immobilizasyonu Ankara Üniversitesi, Fen Bil. Ens.Yük.Lis. Tezi.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2004. Lehninger Principles of Biochemistry, Chapter 6. W. H. Freeman, Fourth Edition.
- Nelson, J.M. and Griffin, E.G., 1916. Adsorption of invertase. *J Am Chem Soc.*, Vol.38; pp.1109-1115.
- Nicolas, P., Raetz, E., Reymond, S., Sauvegeat, J.L., 1998. Hydrolysis of the galactomannans of coffee extract with immobilized β -mannanase. Patent US5714183.
- Nunes, F.M., Reis, A., Domingues, M.R., Coimbra, M.A., 2006. Characterization of galactomannan derivatives in roasted coffee beverages. *J Agric Food Chem* 54(9) 3428-3439.
- Olaniyi, O.O., Ekundayo, T.C., Igbe, O.F. and Fagbohunbe, Y.D., 2015. Influence of cultural and nutritional factors on β -mannanase Production by *Penicillium italicum* under submerged state fermentation. *British Microbiology Research Journal*, 5(6): 481-489 ISSN: 2231-0886.
- Onem, H., Cicek, S., Nadaroglu, H., 2015. Immobilization of a thermostable phytase from pınar melkior (*Lactarius piperatus*) onto magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles. *CYTA - Journal of Food*, 50(5) 1158-1165.
- Oosterveld, A., Harmsen, J.S., Voragen, A.G.J., Schols, H.A., 2003. Extraction and characterization of polysaccharides from green and roasted *Coffea arabica* beans. *Carbohydrate Polymers* (52) 285-296.
- Ootsuka, S., Saga, N., Suzuki, K.I., Inoue, A., Ojima, T., .2006. Isolation and cloning of an endo- β -1,4-mannanase from Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *J Biotechnol* 125:269-280.
- Özdemir, Ç., 2010, Farklı Nanomalzemeler İle Glukoz Biyosensörlerinin Hazırlanması ve Uygulama Potansiyellerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi Ege Üniversitesi, İzmir, 14-15.
- Ozturk, B., Cekmecelioglu, D. and Ogel, Z. B., 2010. Optimal conditions for enhanced β -mannanase production by recombinant *Aspergillus soja*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (64) 135–139.
- Palmer, T., 2007. “Enzymes”, Horwood Publishing, England, 361-370.
- Pan, X., Zhou, J., Tian, A., Le, K., Yuan, H., Xue, Y., Ma, Y., Lu, H., 2011. High level expression of a truncated β -mannanase from alkalophilic *Bacillus* sp. N16-5 in *Kluyveromyces cicerisporus*. *Biotechnol Lett* 33:565–570
- Pandey, A. and Ramachandran, S., 2006. Enzyme Technology: General Introduction, (A. Pandey, C.Webb, C.R. Soccol And C. Larroche, Editörler), Springer

- Science And Business Media, Inc. And Asiatech Publishers Inc., New York, P 1-11.
- Park, D., Haam, S., Jang, K., Ahn, I.S., Kim, W.S. 2005. Immobilization of starch-converting enzymes on surfacemodified carriers using single and co-immobilized systems: properties and application to starch hydrolysis. *Process Biochemistry*, (40) 53-61.
- Pearce, J.M., 2012. Make nanotechnology research open-source. *Nature* 491: 519–521.
- Peçe, Y.S., 2014. Enzim İmmobilizasyonu. Yük.Lis. Tez, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bil. Ens.
- Pee, V., Ignatius, K.L., Speybroeck, V., Michel, M.P., Jozef, V.P., 2002. Use of mannanases as a slime control agents. Patent EP0871596 Application Number: EP19960916095.
- Pekdemir, M.E., 2011. Manyetik Nanopartiküller Kullanılarak Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektrometrisi İle İmmunoassay Sisteminin Geliştirilmesi, GOP Uni. Fen Bil. Ens. Yük.Lis. Tezi
- Perret, S., Belaich, A., Fierobe, H. P., Belaich, J. P., and Tardif, C. 2004. Towards designer cellulosomes in Clostridia: mannanase enrichment of the cellulosomes produced by *Clostridium cellulolyticum*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 40: 255-259.
- Petkowicz, C.L.O., Reicher, F., Chanzy, H., Taravel, F.R., Vuong, R., 2001. Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*. *Carbohydr Polym* 44:107–112.
- Petkowicz, C.L.O., Schaefer, S., Reicher, F., 2007. The mannan from *Schizolobium parahybae* endosperm is not a reserve polysaccharide. *Carbohydr Polym* 69:659–664.
- Petty, L.A., Carter, S.D., Senne, B.W., and Shriver, J.A., 2002. Effects of β -mannanase addition to corn-soybean meal diets on growth performance, carcass traits, and nutrient digestibility of weaning and growing-finishing pigs. *Anim. Sci.* 80: 1012–1019.
- Phothichitto, K., Nitisinprasert, S. and Keawsompong S., 2006. Isolation, Screening and Identification of Mannanase Producing Microorganisms, *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 40 (Suppl.): 26-38.
- Polaina, J. and MacCabe, A.P., 2007. *Industrial Enzymes*. Springer, The Netherlands, p. 9.
- Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L., 2005. *Biochemistry*. New York, p. 190.
- Popa, V.I., Spiridon, J., 1998. Hemicelluloses: structure and properties. In: Dumitriu S (ed) *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*. Marcel Dekker, New York, pp 297–311.
- Pucharta, V., Vrsanska, M., Svobodab, P., Pohlb, J., Ogel, Z. B., Bie, P., 2004. Purification and characterization of two forms of endo- β -1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749). *Biochimica et Biophysica Acta*, (1674) 239-250.
- Purich, D.L., 2010. *Enzyme Kinetics: Catalysis & Control A Reference of Theory and Best-Practice Methods* ISBN: 978-0-12-380924-7.

- Qiao, J., Rao, Z., Dong, B., Cao, Y., 2010. Expression of *Bacillus subtilis* MA139 β -mannanase in *Pichia pastoris* and the Enzyme Characterization. *Appl Biochemistry Biotechnology* (160):1362–1370.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Gathe, M.S., Deshpande, V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Micrbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3):597-635.
- Regen, S.L., Singh, M., Sameul, N.K., 1984. Functionalized Polymeric Liposomes, Efficient Immobilisation of α -Chymotrypsin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (119) 646–651.
- Reslow, M., Adlercreutz, P., Mattiason, B., 1992. On the importance of the support material for bioorganic synthesis: Influence of water partition between solvent, enzyme and solid support in water poor reaction media. *Eur J Biochem*, (172) 573-578.
- Rovio, S., Simolin, H., Koljonen, K., Siren, H., 2008. Determination of monosaccharide composition in plant fiber materials by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr A*. 1185(1) 139-44. doi:10.1016/j.chroma.2008.01.031.
- Sabini, E., Schubert, H., Murshudov, G., Wilson, K.S., Siika-Aho, M., Penttila, M., 2000. The Three-Dimensional Structure of a *Trichoderma Reesei* Beta-Mannanase from Glycoside Hydrolase Family 5. *Acta Crystallogr., Sect. D* 56: 3
- Sachslehner, A., Foid, G., Foid, N., Gübitz, G., Haltrich, D., 2000. Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Biotechnology* (80) 127–134.
- Sayın, M., 2009. Sığır Serum Paraoksonaz Enziminen Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu. *Yük.Lis.Tez*, Balıkesir Üni., Fen Bil. Ens.
- Schafer, T., Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., Pedersen, S., Salmon, S., *et al. et al.*, 2005. Enzymes for Technical Applications. *Biopolymers Online book*. p-381-386 Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark DOI: 10.1002/3527600035.bpol7013.
- Schroder, R., Atkinson, R.G., Redgwell, R.J., 2009. Re-interpreting the role of endo- β -mannanases as mannan endotransglycosylase/hydrolases in the plant cell wall. *Ann Bot* 104(2):197–204.
- Shah, R., Hoss, U., Gottlieb, R.K., Soundararajan, G., Holker, J.D., 2007: US20070227907.
- Shallom, D. and Shoham, Y., 2003. Microbial hemicellulases. *Curr Opin Microbiol* 6:219–228
- Sharounya, E.E., Toukhyb, N.M.K., Sersyc, N.A. and Gayar, A.A., 2015. Optimization and purification of mannanase produced by an alkaliphilic-thermotolerant *Bacillus cereus* N1 isolated from Bani Salama Lake in Wadi El-Natron. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29, (2), 315-323.
- Sheldon, R.A., 2007. Enzyme immobilisation: the quest for optimum performance. *Adv Synth Catal.*, Vol.349; pp.1289–1307.
- Sheldon, R.A., 2010. Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs) as Industrial Biocatalysts. *Biocatalysis Challenges for Pharmaceuticals and Fine Chemicals*. SCI HQ, London. Delft University of Technology CLEA Technologies B.V., Vol. 2; pp.1831–2000.

- Shi, P., Yao, G., Cao, Y., Yang, P., Yuan, T., Huang, H., *et al. et al.*, 2011. Cloning and characterization of a new β -mannosidase from *Streptomyces* sp. S27. *Enzyme and Microbial Technology*, (49) 277–283.
- Sindhu, G.S., Sharma, P., Chakrabarti, T., Gupta, J.K., 1997. Strain improvement for the production of a thermostable α -amylase. *Enzyme Microb. Technol.* 24:584-589.
- Song, J.M., Nam, K.W., Kang, S.G., Kim, C.G., Kwon, S.T., Lee, Y.H., 2008. Molecular cloning and characterization of a novel cold-active β -1,4-D-mannanase from the Antarctic springtail, *Cryptopygus antarcticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* (151) 32–40.
- Soni, H., Ganaie, M.A., Pranaw, K., Kango, N., 2015. Design-of-experiment strategy for the production of mannanase biocatalysts using plam karnel cake and its application to degrade locust. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.01.001i>.
- Spahn, C. and Minter, S.D., 2008. *Enzyme Immobilization in Biotechnology Recent Patents on Engineering*, (2) 195-200.
- Stoll, D., LeNours, J., Anderson, L., Stalbrand, H., and LoLeggio, L. 2005. The structure and characterization of a modular endo- β -1,4-mannanase from *Cellulomonas fimi*. *Biochem.* 44(38): 12700–12708.
- Summpunn, P., Chaijan, S., Isarangkul, D., Wiyakrutta, S., Meevootisom, V., 2011. Characterization, gene cloning and heterologous expression of β -Mannanase from a thermophilic *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiology* 49(1):86–93.
- Sunna, A., Gibbs, M.D., Chin, W.J., Nelson, P.J. and Bergquist, P.L., 2000. A Gene Encoding a Novel Multidomain β -1,4-Mannanase from *Caldibacillus cellulovorans* and Action of the Recombinant Enzyme on Kraft Pulp. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66 (2) 664–670.
- Takeda, N., Hirasawa, K., Uchimura, K., Nogi, Y., Hatada, Y., Akita, M. *et al. et al.*, 2004. Purification and enzymatic properties of a highly alkaline mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain JAMB-750. *J. Biol. Macromol.* 4: 67–74.
- Takeno, F., Yamada, H., Sekiya, K., Fujitani, B., Ohtsu, K., 1990. Effect of partially decomposed guar gum on high-cholesterol-fed rats and non-dietary fiber-fed rats. *J Jpn Soc Nutr Food Sci* (43) 421–425.
- Tartaj, P., Morales, M. P., Gonzales-Carreno, T., Veintemillas-Verdaguer, S., Serna, C. J., 2005, Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 290, 28-34.
- Tejo, B. A., Salleh, A.B and Pleiss, J., 2004, Structure and dynamics of *Candida rugosa* lipase: The role of organic solvent, *Journal Molecular Model*, 10, 358-366.
- Telefoncu, A., 1997, *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*, *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı*, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- Timell, T.E., 1967. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Sci Technol* 1:45–70.
- Titapoka, S., Keawsompong, S., Haltrich, D., Nitisinprasert, S., 2008. Selection and characterization of mannanase producing bacteria useful for the formation of pre biotic manno oligosaccharides from copra meal. *World J Microbiol Biotechnol* 24:1425–1433.

- Tsukagoshi, H., Nakamura, A., Ishida, T., Otagiri, M., Moriya, S., Samejima, M., *et al.*, 2014. The GH26 β -mannanase RsMan26H from a symbiotic protist of the termite *Reticulitermes speratus* is an endo-processive mannanohydrolase: Heterologous expression and characterization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (452) 520-525.
- Twyman, R.M., 2005. Immobilized Enzyme. University of York, UK. This article is a revision of the previous-edition article by G A Marko-Varga., pp.1182-1187.
- Uhlig, H., 1998. *Industrial Enzymes and Their Applications*. Wiley, 435 p, New York.
- Utamia, W., Meryandini, A. and Wiryawan, K. G., 2013. Characterization of Bacterial Mannanase for Hydrolyzing Palm Kernel Cake to Produce Manno-oligosaccharides, <http://medpet.journal.ipb.ac.id/DOI:10.5398/medpet.2013.36.3.192> Prebiotics.
- Uygun, M., Uygun, D.A., Karagozler, A.A., 2013. Immobilization of α -amilase onto PVA-alginate spheres. *Tralleis Elektronik Dergisi* 1 45-50.
- Van Zyl, W.H., Rose, S.H., Trollope, K., Gorgens, J.F., 2010. Fungal β - mannanases: mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. *Pro Biochem* 45:203-1213.
- Varnai, A., Huikko, L., Pere, J., Siikaaho, M., Viikari, L., 2011. Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood. *Biores Technol* 102:9096-9104.
- Vereda, F., Vicente, J., Hidalgo-Alvarez, R., 2008, Colloidal characterization of micron-sized rod-like magnetite particles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 319, 122–129.
- Vogel, V. and Baird, B., 2003. Report of the national nanotechnology initiative workshop, Arlington, VA, 3, VCH, Weinheim, 617-642.
- Wainq, M., and Ingvorsen, K., 2003. Production of β - xylanase and β -xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*. *Extremophiles*, 7 (2) 87- 93.
- Wang, M., You, S., Zhang S., Qi, W., Liu, Z., Wu, W., Su, R., He, Z., 2000. Purification, characterization, and production of β - Mannanase anase from *Bacillus subtilis* TJ-102 and its application in gluco-mannooligosaccharides preparation. *Eur Food Res Technol*, 237:399–408 DOI 10.1007/s00217-013-2002-1.
- Wang, Y., Li, B., Zhou, Y., Jia, D., 2008, Chitosan-induced synthesis of magnetite nanoparticles via iron ions assembly. *Polymers For Advanced Technologies*, (19) 1256-1261.
- Warren, R. A. 1996. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 183-212.
- Whitaker, J.R., 1963. Determination of molecular weight of proteins by gel filtration on sephadex. *Analytical Chemistry*, 35, 1950-1953.
- Whitehurst, R.J. and Law, B.A., 2002. *Enzymes in Food Technology*. Sheffield Academic Press, ISBN 1–84127-223-X.
- Whitehurst, R.J., van Oort, M., 2010. *Enzymes in Food Technology*. WileyBlackwell, pp. 388, USA.
- Whiteleya, C.G. and Leeb, D.J., 2006. Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme and Microbial Technology* (38) 3-4, p. 291-316.

- Willför, S., Sjöholm, R., Laine, C., Roslund, M., Hemming, J., Holmbom, B., 2003. Characterisation of water-soluble galactoglucomannan from Norway spruce wood and thermomechanical pulp. *Carbohydr Polym* 52:175-187.
- Withers, S.G., 2001. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydr Polym* 44(4) 325-327.
- Wiseman, A., 1987. Chapter 3: The Application of Enzymes in Industry. *Handbook of Enzymes Biotechnology*, 2nd ed., Horwood, Chichester, 274-373.
- Wolfson, D., Olmstead, S., Meiss, D., And Ralston, J., 2008. Making Sense Of Digestive Enzymes. Klaire Labstm . A Division of Protherar, Inc.
- Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D.J., Saddler, J.N., 2004. Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Appl Biochem Biotechnol* (113-116) 1115-1126.
- Xu, B., Hagglund, P., Stalbrand, H., Janson, J.C., 2002. endo- β -1,4-Mannanases from blue mussel, *Mytilus edulis*: purification, characterization, and mode of action. *Journal of Biotechnology*, (92) 267-277.
- Yang, H., Shi, P., Lu, H., Wang, H., Luo, H., Huang, H., Yang, P., Yao, B., 2015. A thermophilic β -mannanase from *Neosartorya fischeri* P1 with broad pH stability and significant hydrolysis ability of various mannan polymers. *Food Chemistry*, (173) 283-289.
- Yang, P., Li, Y., Wang, Y., Meng, K., Luo, H., Yuan, Y., Bai, Y., Zhan, Z. and Yao, B., 2009. A novel β -mannanase with high specific activity from *Bacillus circulans* CGMCC1554: gene cloning, expression and enzymatic characterization. *App Biochem Biotechnol* 159:85-94.
- Yener, F., 2007. Pektinaz Enziminin Farklı İki Destek Üzerine İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu. *Yük.Lis.Tez, Fen Bil. Ens., Çukurova Üniversitesi*.
- Yıldırım, D., 2010. *Mucor Miehei* ve *Pseudomonas* sp. Lipazlarının Aktifleştirilmiş Florisil Desteğe Glutaraldehit ve Polisüksinimid Üzerinden Ayır Ayır İmmobilizasyonu ve İmmobilize Lipazın Esterleşme Reaksiyonlarında Kullanımı. *Dok.Tezi, Fen Bil. Ens., Çukurova Üniversitesi*.
- Zahura, U.A. Rahman, M.M., Inoue, A., Ojima, T., 2012. Characterization of a β -D-mannosidase from a marine gastropod, *Aplysia kurodai*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* (162) 24-33.
- Zahura, U.A., Rahman, M.M., Inoue, A., Tanaka, H., Ojima, T., 2010. An endo- β -1,4-mannanase, AkMan, from the common sea hare *Aplysia kurodai*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* (157) 137-143.
- Zaks, A. and Klibanov, A.M., 1985. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 82(10) 3192-6.
- Zang, H., Xie, S., Wu, H., Wang, W., Shao, X., Wu, L., Rajer, F. U., Gao, X., 2015. A novel thermostable GH5 7 β -mannanase from *Bacillus pumilus* GBSW19 and its application in manno-oligosaccharides (MOS) production. *Enzyme and Microbial Technology* (78) 1–9 <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.007>.
- Zhang J., He, Z. and Hu, K., 2000. Purification and characterization of β -mannanase from *Bacillus licheniformis* for industrial use. *Biotechnology Letters*, (22) 1375-1378.
- Zhang M, Chen X-L, Zhang Z-H, Sun C-Y, Chen L-L, He H-L, et al., 2009. Purification and functional characterization of endo--mannanase MAN5 and its

- application in oligosaccharide production from konjac flour. *Appl Microbiol Biotechnol*, 83:865–73
- Zhao, J., Shi, P., Luo, H., Yang, P., Zhao, H., Bai, Y., Huang, H., Wang, H., Yao, B., 2010. An acidophilic and acid-stable β -mannanase from *Phialophora* sp. P13 with high mannan hydrolysis activity under simulated gastric conditions. *J Agric Food Chem* 58:3184-3190.
- Zhao, W., Zheng, J. and Zhou, H., 2011. A thermotolerant and cold-active mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Aspergillus niger* CBS 513.88: Constitutive overexpression and high-density fermentation in *Pichia pastoris*. *Bioresource Technology*, (102) 7538-7547.
- Zhou, J., Zhang, R., Gao, Y., Li, J., Tang, X., Mu, Y., *et al. et al.*, 2012. Novel low-temperature active, salt-tolerant and proteases-resistant endo-1,4- β -mannanase from a new *Sphingomonas* strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 5 (113), 568- 574.
- Zyl, W.H., Rose, S.H., Trollope, K., Görgens, J.F., 2010. Fungal β -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. *Process Biochemistry* (45) 1203-1213.

ÖZGEÇMİŞ

01.01.1986'da Erzurum'da doğdu. İlk ve ortaöğretimini Erzurum'da tamamladı. 2009 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. Mezun olduğu 2009 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Biyometri ve Genetik anabilim dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2013 yılında bu bölümden mezun olup aynı bölümde doktora eğitimine başladı. Doktora çalışması ile birlikte Nanobilim ve Nano Mühendislik Anabilim Dalı, Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine devam etmektedir.