



**FARKLI AMİNOASİT İÇEREN NANOFİBRİLLERDE *BACILLUS*  
*SUBTILIS*  
E6-5 SUŞUNDAN HAM PROTEAZ VE TİCARİ PROTEAZIN  
İMMOBİLİZASYON ÇALIŞMALARI**

**Baran Enes GÜLER**



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI AMİNOASİT İÇEREN NANOFİBRİLLERDE *BACILLUS SUBTILIS*  
E6-5 SUŞUNDAN HAM PROTEAZ VE TİCARİ PROTEAZIN  
İMMOBİLİZASYON ÇALIŞMALARI**

**Baran Enes GÜLER**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2017

## TEZ ONAYI

Baran Enes GÜLER tarafından hazırlanan 'Farklı aminoasit içeren nanofibrillerde *Bacillus subtilis* E6-5 suşundan ham proteaz ve ticari proteazın immobilizasyon çalışmaları' adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

**Başkan** : Prof. Dr. Elif DEMİRKAN  
Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

**Üye** : Doç. Dr. Ferda ARI  
Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

**Üye** : Doç. Dr. Yakup AYKUT  
Uludağ Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,  
Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

25.12.2017

**Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

.../.../...

**Baran Enes GÜLER**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### FARKLI AMİNOASİT İÇEREN NANOFİBRİLLERDE *BACILLUS SUBTILIS* E6-5 SUŞUNDAN HAM PROTEAZ VE TİCARİ PROTEAZIN İMMOBİLİZASYON ÇALIŞMALARI

**Baran Enes GÜLER**

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Bu çalışmada, elektrospin yöntemiyle yüksek yüzey alanına sahip, glisin, tirozin ve glutamik asit aminoasitleri ile oluşturulmuş poliamid 6 polimer yüzeyler üretilmiştir. Yeni izole edilen *Bacillus subtilis* E6-5 suşundan elde edilen proteaz ve ticari proteaz (ORBA Biyokimya/İstanbul) enzimlerinin, hem glutaraldehit (GA) ile aktifleştirilmiş PA6/aminoasit nanolif yüzeylerine hemde saf PA6/aminoasit yüzeylerine immobilize edilerek enzim aktiviteleri ve tekrar kullanılabilirlikleri incelenmiştir.

Liyofilize *Bacillus subtilis* E6-5 proteazı ile yapılan çalışmalarda glutaraldehit ile aktifleştirilmiş PA6 nanolifler ve glutaraldehit ile aktifleştirilmeyen PA6 nanoliflerde glutamik asit aminoasidi varlığında immobilizasyonun daha başarılı olduğu saptanmıştır. Glutaraldehit ile aktifleştirilmemiş ve aktifleştirilmiş yüzeylerde immobilize edilen liyofilize proteaz enziminin 4 kez kullanımı olmasına rağmen, en iyi işlevsel stabilite 2 kez kullanım ile elde edilmiştir. Saf PA6/glutamik asit nanoliflerinde iki tekrarlı kullanım sonucu enzimin immobilizasyon verimi %38 olarak bulunmuştur. Glutaraldehit ile aktifleştirilmiş PA6 nanoliflerde de PA6/glutamik asit nanolif yüzeyleri iki tekrarlı kullanım sonucu enzimin immobilizasyon verimi %65 olarak bulunmuştur. Nanoliflerin glutaraldehit ile aktifleştirilmesi sonucu enzim immobilizasyon verimi iki kat arttırılmıştır. Ticari proteaz ile yapılan çalışmalarda ise glutaraldehit ile aktifleştirilmemiş nanolif yüzeylerde enzimin 6 kez kullanımı olmasına rağmen en işlevsel stabilite 3 tekrarlı kullanımda elde edilmiştir. En başarılı immobilizasyon verimi PA6 nanoliflerde %58 olarak bulunmuştur. Glutaraldehit ile aktifleştirilmiş PA6 nanoliflerde de enzim 6 kez kullanım bulmuş fakat işlevsel stabilite 4 tekrarlı kullanıma kadar korunmuştur. PA6/tirozin nanoliflerde enzim immobilizasyon verimi %43 olarak tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus subtilis*, Proteaz, İmmobilizasyon, Elektroçekim

**2017, x+76 sayfa.**

## ABSTRACT

MSc Thesis

### IMMOBILIZATION STUDIES OF COMMERCIAL PROTEASE AND RAW PROTEASE FROM *BACILLUS SUBTILIS* E 6-5 STRAIN ON NANOFIBERS CONTAINING DIFFERENT AMINOACIDS

**Baran Enes GULER**

Uludağ University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

**Supervisor:** Prof. Dr. Elif DEMIRKAN

In this study, polyamide 6 polymer surfaces that have high surface area were produced by electrospinning method with the participation of glycine, tyrosine and glutamic acid amino acids. Protease was produced by newly isolated *Bacillus subtilis* E6-5 strain and commercial protease (ORBA Biochemistry/ Istanbul) were immobilized on both pure PA6/amino acid surfaces and glutaraldehyde (GA) activated PA6 / aminoacid nanofibers. In this direction enzyme stability and reusabilities were investigated.

In studies with lyophilized *Bacillus subtilis* E6-5 protease, glutaraldehyde activated PA6 nanofibers and glutaraldehyde unactivated PA6 nanofibers were found to be more immobilized in the presence of glutamic acid amino acid. Although the lyophilized protease enzyme immobilized on non-glutaraldehyde activated and activated surfaces has been used 4 times, the best functional stability has been achieved with 2 times use. In pure PA6 / glutamic acid nanofibers, the immobilization yield of the two repeated use enzymes was found to be 38%. In glutaraldehyde-activated PA6 nanofibers, the PA6 / glutamic acid nanofibers surfaces were found to have 65% immobilization yield of the two repetitive use enzymes. The enzyme immobilization efficiency has been doubled by glutaraldehyde activation of nanofibers. In studies with commercial proteases, the most functional stability was obtained for 3 repeated uses, although the enzyme was used 6 times on the non-glutaraldehyde activated nanofiber surfaces. The most successful immobilization was found in 58% of PA6 nanofibers. In glutaraldehyde-activated PA6 nanofibers, the enzyme was found to be used 6 times, but the functional stability was maintained as much as 4 times of repeated use. The enzyme immobilization yield in PA6 / tyrosine nanofibers was 43%.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus subtilis*, Protease, Immobilization, Elektrospinnig

**2017, x+76 pages.**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca engin bilgi birikimi ve sonsuz anlayışıyla bu çalışmayı yürütmemi sağlayan, her daim bana yol gösteren ve göstermeye devam eden Sayın Prof. Dr. Elif DEMİRKAN'a,

Nanolifler hakkında öğrettikleri ve immobilizasyon çalışmasındaki yol göstericiliği ve yardımları için Sayın Doç. Dr. Yakup AYKUT'a

Laboratuvar çalışmalarında bana her daim yardım eden Arş. Gör. Tuba SEVGİ'ye,

Her zaman dostluk ve yardımlarıyla yanımda olan doktora öğrencileri Maoulida ABDOU, Behice ZEREN ve yüksek lisans öğrencisi Büşra ÖZALPAR'a,

Tez çalışmalarım ve yaşamımda her daim bana destek olan Merve ÖZERKAN'a

Yaşamımın her alanında beni destekleyen ve desteklemeye devam edip günlere getiren, sevgili Aileme,

En içten duygularıyla teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Baran Enes GÜLER

... /... /...

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
1. GİRİŞ .....	1
2.KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	3
2.1.Proteazların Tarihçesi.....	3
2.2.Proteazların Katalitik Mekanizmaları .....	5
2.3. Proteazların Adlandırılması ve Sınıflandırılması.....	6
2.3.1 Endopeptidazlar.....	8
2.3.1.1. Serine Proteazlar (E.C. 3.4.21).....	9
2.3.1.2. Aspartik Proteazlar (E.C. 3.4.23).....	10
2.3.1.3.Sistein/Tiyol Proteazlar (E.C. 3.4.22) .....	10
2.3.1.4.Metalloproteazlar (E.C. 3.4.24).....	11
2.3.2.Oligopeptidazlar .....	12
2.3.3. Ekzopeptidazlar.....	12
2.3.3.1.Aminopeptidazlar (E.C 3.4.11) .....	13
2.3.3.2. Karboksipeptidazlar .....	14
2.3.4.Omegapeptidaz.....	14
2.4.Proteaz Kaynakları .....	15
2.4.1. Bitkisel Proteazlar .....	16
2.4.2. Hayvansal Proteazlar.....	18
2.4.3.Mikrobiyal Proteazlar.....	19
2.5. <i>Bacillus</i> Proteazının Genel Özellikleri.....	21
2.6. Proteazların Endüstriyel Kullanım Alanları.....	22
2.6.1. Gıda Endüstrisi.....	23
2.6.2.Fotoğraf Endüstrisi.....	24
2.6.3. Tekstil Endüstrisinde Proteazlar .....	25
2.6.4.Deri Endüstrisinde Kullanımı .....	26



2.6.5. Deterjan Endüstrisinde Kullanımı.....	27
2.6.6. Endüstriyel ve Evsel Atıkların Yönetimi .....	28
2.6.7. Sağlık Endüstrisi .....	28
2.7. Enzim İmmobilizasyonu ve Tarihi.....	29
2.8. İmmobilizasyon Metotları .....	31
2.8.1. Adsorblanma Yoluyla İmmobilizasyon .....	32
2.8.2. Kovalent Bağlanma Yoluyla İmmobilizasyon .....	32
2.8.2.1. İyonik bağlanma yoluyla immobilizasyon .....	33
2.8.2.2. Çapraz bağlama yoluyla immobilizasyon .....	33
2.8.3. Matrikse Tutuklama Yoluyla İmmobilizasyon .....	33
2.8.4. Enkapsülasyon Yoluyla İmmobilizasyon.....	34
2.9. İmmobilizasyonda Destek Materyalinin Seçimi .....	34
2.10. Polimer Nanolifler.....	34
2.10.1. Polimer Nanolif Üretim Yöntemleri .....	35
2.10.1.1. Meltblowing (Eriyik Üfleme) yöntemi ile nanolif üretimi .....	35
2.10.1.2. Fibrilasyon ile nanolif üretimi.....	35
2.10.1.3. Bikomponent lifler yolu ile nanolif üretimi .....	36
2.10.1.4. Spunbond yöntemi ile nanolif üretimi.....	36
2.10.1.5. Elektro çekimle polimer nanolif üretimi .....	36
2.11. Elektro çekim yönteminde etkili parametreler .....	37
2.11.1. Polimer çözeltisi parametreleri .....	38
2.11.1.1. Konsantrasyon ve viskozite.....	38
2.11.1.2. Çözeltinin Elektriksel İletkenliği .....	39
2.11.1.3. Yüzey gerilimi.....	39
2.11.1.4. Çözücünün dielektrik etkisi.....	39
2.11.1.5. Molekül ağırlığı.....	39
2.11.2. Proses Parametreleri .....	40
2.11.2.1. Besleme hızı .....	40
2.11.2.2. Toplayıcı plaka ve düze arası mesafe.....	40
2.11.2.3. Düze iç çapı.....	40
2.11.2.4. Voltaj.....	41
2.11.2.5. Toplayıcı plaka cinsi .....	41
2.11.3. Ortam parametreleri .....	41
2.11.3.1. Sıcaklık.....	41

2.11.3.2. Nem ve atmosfer koşulları .....	41
2.11.3.3. Elektrik alanı .....	42
2.12. Nanoliflerle Enzim İmmobilizasyonu .....	42
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	43
3.1. Materyal .....	43
3. 2. Yöntem.....	43
3.2.1 Bakteri Üretiminde Kullanılan Besiyerleri ve Bakteri Üretim Koşulları.....	43
3.2.2. <i>Bacillus subtilis</i> E6-5 şuşundan elde edilen proteaz enziminin liyofilize edilmesi .....	44
3.2.3. Elektro çekim yöntemiyle polimer nanoliflerin üretimi .....	45
3.2.4 Aminoasit Yüklü Poliamid 6 (PA6) Nanoliflerle Enzim İmmobilizasyonu .....	45
3.2.5. Nanoliflerin karakterizasyonu üretilen nanoliflerin morfoloji analizleri .....	46
3.2.6. Liyofilize ve ticari enzimin aminoasit içeren nanolifler üzerine immobilizasyonu .....	46
3.2.7. Enzim aktivite tayini .....	46
3.2.8. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliğinin tespiti .....	47
4. BULGULAR .....	49
4.1.Aminoasit Katkılı PA6 Nanoliflerin Elde Edilmesi.....	50
4.2. <i>Bacillus</i> Kaynaklı Liyofilize Proteaz Enzimin İmmobilizasyonu.....	52
4.2.1.Saf PA6 ve Aminoasit Katkılı PA6 Nanoliflere İmmobilizasyonu .....	52
4.2.2. PA6/GA ve PA6/Aminoasit+GA Nanoliflere İmmobilizasyonu.....	52
4.3. Ticari Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu.....	53
4.3.1.Saf PA6 ve Aminoasit Katkılı PA6 Nanoliflere İmmobilizasyonu .....	53
4.3.2. Ticari Proteaz Enziminin PA6/GA ve PA6/Aminoasit+GA Katkılı Nanoliflere İmmobilizasyonu.....	54
4.4. <i>Bacillus</i> Kaynaklı Liyofilize Proteaz ve Ticari Proteaz Enzim İmmobilizasyonda Tekrar Sayısının Karşılaştırılması.....	55
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	58
KAYNAKLAR .....	63
ÖZGEÇMİŞ .....	76

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde Orantı
Au-Pd	Altın-Paladyum
C	Karbon Atomu
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum Klorür
Co <sup>+2</sup>	Kobalt
H <sup>+</sup>	Hidrojen İyonu
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
HCN	Hidrosiyamik asit
IU	Uluslararası Enzim Ünitesi
IU/mL	Mililitredeki Uluslar Arası Ünite
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Potasyum Fostat Dibasic
kDa	Kilodalton
mg/L	Litredeki miligram miktarı
Mg <sup>+2</sup>	Magnezyum
MgSO <sub>4</sub>	Magnezyum Sülfat
mL	Mililitre
Mn <sup>+2</sup>	Mangan(II)
Mol	Molarite
N	Azot
NaCl	Sodyum Klorür
NaCO <sub>3</sub>	Sodyum Karbonat
NaOH	Sodyum Hidroksit
°C	Santigrad Derece
PA6	Poliamid 6 naylon
pH	Power of Hydrogen
w/w	Kütle/Kütle oranı
Zn <sup>+2</sup>	Çinko
α	Alfa
β	Beta

## Kısaltmalar

AC Güç Kaynağı  
AIDS  
Asp  
DAN  
DC Güç Kaynağı  
DEAE  
DFP  
DMF  
EC  
EDTA  
EPNP  
FSIS  
GA  
Glu  
Gly  
GRAS  
HCN  
HIV1  
His  
IUBMB  
Biyoloji Birliği  
Lys  
Met  
PA6  
RNA  
SARS  
Ser  
Try

## Açıklama

Doğru Akım Güç Kaynağı  
Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliđi Sendromu  
Aspartik Asit Aminoasidi  
Diazoasetil Norlösin Metil Ester  
Alternatif Akım Güç Kaynağı  
Diethylaminoethyl  
Diisopropyl Fluorophosphate  
N, N-dimetilformamid  
Enzim Komisyonu  
Etilen Diamin Tetra Asetik Asit  
1,2-epoxy*p*-nitrofenoksi propan  
Food Safety and Inspection Service  
Glutaraldehit  
Glutamikasit Aminoasidi  
Glisin Aminoasidi  
Generally Recognized As Safe  
Hidrosiyamik Asit  
İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü  
Histidin Aminoasidi  
Uluslararası Biyokimya ve Moleküler  
Lisin Aminoasidi  
Metiyonin Aminoasidi  
Poliamid 6 naylon  
Ribonükleik Asit  
Ciddi Akut Solunum Yolu Sendromu  
Serin Aminoasidi  
Tirozin Aminoasidi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2. 1. Proteazların Katalitik Mekanizması .....	5
Şekil 2. 2. Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Uluslararası Sınıflandırma Komitesinin (IUBMB) peptidazlar için ileri sürdüğü enzim sınıflandırması .....	8
Şekil 2. 3. Endopeptidazların polipeptid üzerindeki etki mekanizması .....	9
Şekil 2. 4. Ekzopeptidazların polipeptid üzerindeki etki mekanizması .....	12
Şekil 2. 5. Aminopeptidazların alt grupları ve etki mekanizmaları .....	13
Şekil 2. 6. Karboksipeptidazların alt grupları ve etki mekanizmaları .....	14
Şekil 2. 7. Omega peptidazların etki mekanizması .....	14
Şekil 2. 8. Proteazın biyolojik kaynaklara göre dağılımı .....	15
Şekil 2. 9. Proteazın biyolojik kaynaklarda dağılımı .....	16
Şekil 2. 10. Mikrobiyal Enzimlerin Yıllık Kullanım Değerleri .....	20
Şekil 2. 11. Proteazların endüstride kullanım yüzdeleri .....	23
Şekil 2. 12. İmmobilizasyon Metotları .....	31
Şekil 2. 13. Enzim taşıyıcı yüzeyleri; a. boncuk, b. nanolif, c. kapsül, d. film e. membran .....	34
Şekil 2. 14. İnsan saç ve nanoliflerin boyutlarının karşılaştırılması .....	35
Şekil 2. 15. Elektro çekim yöntemiyle nanolif üretiminin ve Taylor konisinin şematik gösterimi .....	37
Şekil 2. 16. Polimerin viskozitesiyle ilişkili boncuk oluşumu .....	38
Şekil 3. 1. Deneysel aşamaların şematik olarak gösterilmesi .....	49
Şekil 4. 1. Aminoasit katkılı PA6 nanoliflerin SEM görüntüleri (A,B,C,D 1'ler 15,96 KX büyütme, A,B,C,D 2'ler 25,22 KX büyütme) ve oluşan nanolif kalınlıkları: (A) Saf PA6, (B) PA6/Glisin, (C) PA6/Tirozin, (D) PA6/Glutamik asit. ....	51
Şekil 4. 2. PA6 ve PA6/Aminoasit katkılı nanoliflerin tekrarlı kullanımı.....	52
Şekil 4. 3. PA6/GA ve PA6/Aminoasit+GA katkılı nanoliflerin tekrarlı kullanımı.....	53
Şekil 4. 4. PA6 ve PA6/Aminoasit katkılı nanoliflere immobilize edilmiş ticari proteaz enziminin tekrarlı kullanımı .....	54
Şekil 4. 5. PA6-GA ve PA6/Aminoasit-GA katkılı nanoliflere immobilize edilmiş ticari proteaz enziminin tekrarlı kullanımı .....	55
Şekil 4. 6. (A) Liyofilize proteaz enziminin tekrarlı kullanımı, (B) Ticari proteaz enziminin tekrarlı kullanımı .....	56
Şekil 4. 7. Glutaraldehit ile aktifleştirilmiş (A) Liyofilize proteaz enziminin tekrarlı kullanımı, (B) Ticari proteaz enziminin tekrarlı kullanımı .....	56

## ÇİZELGELER DİZİNİ

**Sayfa**

Çizelge 3. 1. Bakterinin saklanması, geliştirilmesi ve enzim üretim kapasitelerinin ölçülmesinde kullanılan besiyerleri .....	44
---	----



## 1. GİRİŞ

Enzimler, canlılığın sürdürülebilmesi için büyük öneme sahip biyomoleküllerdir. Canlılar tarafından üretilen enzimler, çeşitli maddeler içeren, belirli bir kimyasal reaksiyonun katalizinden sorumlu, reaksiyona katıldığında reaksiyondan etkilenmeden ve değişmeden çıkabilen, katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu (ribozimler) hariç olmak üzere çoğunlukla protein yapıda olan molekülleridir ve bunlar içerdikleri aminoasitlerin sıralanışına bağlı olarak farklı üç boyutlu yapı kazanırlar (Keha ve ark. 2004). Bu yapı enzimlerin katalitik olarak aktif olmasını sağlar (Onat ve Emerk 1997). Hücrelerde önemli metabolik görevlere sahip olan enzimler, günümüzde artık birçok alanda değişik amaçlar da kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata da girmiştir.

Enzimler ekmek, bira, peynir gibi temel gıdaların yapımının yanı sıra deterjan ve temizlik maddesini üretiminde kullanıldığı gibi, tıpta teşhis ve tedavide de önemli roller oynamaktadır (Gupta 2002).

Endüstride kullanılan kimyasal katalizörlerle kıyaslandığında enzimlerin kullanımı pek çok avantaj sağlamaktadır. Yüksek katalitik etkinlik ve özgüllüklere sahip olmaları, gereksiz yan ürünleri oluşturmaması, enzimlerin protein yapıda olmaları biyolojik olarak bozulabilmelerine olanak tanınması ve atık bertarafını kolaylaştırması nedeni ile enzimlerin endüstriyel olarak kullanımı 1960'lerden bu yana artan bir ivmeyle yaygınlaşmaktadır (Krajewska 2003, Aehle 2004).

Enzimler sadece bir kere kullanılmaları, pahalı olmalarından dolayı büyük masraflara neden olmaktadır. Enzimlerin saflaştırma ve izole etme basamaklarının zaman alıcı ve maliyetinin yüksek olması, analitik reaktif olarak kullanılan enzimlerin deney şartlarına ve çevre koşullarına duyarlı olup yüksek ve düşük sıcaklıklarda kısa kullanım süreleri, çoğu enzimin suda çözülmüş olarak kullanımıyla ürüne kontamine olmaları ve yeniden kullanım için geri elde edilememeleri gibi birçok dezavantajları vardır (Atlow 1984). Bundan dolayı, enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanımlarının artmasıyla bu enzimlerin daha ekonomik ve daha kullanışlı hale getirme yolları aranmaktadır. Bu nedenle, gerek uzun süre ve tekrar kullanabilmesi ve gerekse de istenildiği anda reaksiyon ortamından uzaklaştırabilmek amacıyla enzimler, destek görevi gören

materyaller (matriksler) yardımıyla suda çözünmeyen hale getirilerek immobilize edilmektedir. İmmobilizasyon ifadesi hareket edememek, sabitleme anlamına gelmektedir. Genel olarak immobilize enzimler, katalitik aktivitelerini koruyarak, belli bir bölgeye üzerine fiziksel olarak tutuklanmış, tekrar ve sürekli olarak kullanılabilen enzimler olarak tanımlanabilir (Worsfold 1995).

Enzim immobilizasyonunda destek malzemesi olarak doğal ve sentetik birçok organik ve anorganik materyal kullanılmaktadır (Baştürk ve ark. 2013). Bu destek malzemelerinden bir tanesi de elektrospin yöntemi ile üretilen nanoliflerdir. Polimer çözeltisine yüksek gerilim uygulanarak nano boyutlarda lifler elde edilebilmektedir (Baştürk ve ark. 2012).

Günümüzde, endüstriyel öneme sahip enzim olan proteazlar Novo, Gist-Brocades, Genencor ve Miles laboratuvarları gibi büyük üretici firmalar ile dünya çapındaki toplam enzim market payının yaklaşık olarak %60'ına sahiptir (Feijoo-Siota ve Villa 2011). Proteaz enzimleri deterjan, gıda, deri, tekstil ve ilaç sanayi endüstrisinde kullanım alanı bulmuştur (Öztürk 2004).

Bu çalışmada Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvar'ında daha önceden proteaz enzimi üretimi için topraktan izole edilmiş (TÜBİTAK Hızlı Destek programı 113Z868 no'lu proje) ve yeni adlandırılmış olan *Bacillus subtilis* E6-5 şuşu kullanılarak proteaz enzimi üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen enzim liyofilize edilmiştir. Hem liyofilize hem de ticari proteaz (ORBA Biyokimya, İstanbul) enzimlerinin elektrospin yöntemi kullanılarak dünyada ilk kez gerçekleştirilerek farklı aminoasit içeren nanoliflerde immobilizasyonu araştırılmıştır. Aminoasitler farklı yan gruplara sahip oldukları için elektriksel yükleri farklılık göstermektedir. Bu nedenle çalışmada nanolifler ile birlikte aminoasitlerin immobilizasyonda etkisi olup olmadığı ortaya konulmuştur.



## 2.KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1.Proteazların Tarihçesi

Enzimler, tarihi devirlerden beri bilmeden de olsa insanların yaşamına dahil olup, çeşitli işlerde kullanılmış biyomoleküllerdir. Bilindiği üzere ekmeğin üretilmeye başladığı tarih olarak belirtilen milattan önce 3000’li yıllarında, Mısır halkı mayaları kullanıp ekmek yapmışlardır. Daha eski bir döneme, milattan yaklaşık 8500 yıl önceye tarihlendirilen şarabın da insanlar tarafından bilincinde olmadan fermantasyon yoluyla üretildiği yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur. Proteinlerin enzimatik hidrolizinden de çok eski çağlardan beri çeşitli amaçlarla bilinçsiz olarak faydalanılmıştır. Geçmişimizde kullanırken farkında olmadığımız proteolitik enzimler, günümüz göz önüne alındığında geniş bir inceleme ve uygulama alanına sahiptir.

1700’ lerin sonlarına doğru buzağuların mide mukozasında bulunan bir maddenin etleri yumuşattığı, peynirleri olgunlaştırdığı anlaşıncaya bu mukoza basit olarak bu işlemler için kullanılmıştır (D’Reaumur 1752). Ancak proteazlarla ilgili ayrıntılı araştırmalar, 1783 yılında, Spallanzani ile başlamıştır. Spallanzani, mide sıvısında bulunan bu maddenin proteinleri parçalama özelliğinde olduğunu bulmuştur (Hoffmann-Ostenhof 1954, Aunstrup 1973). 1800’lerde, çeşitli kaynaklardan proteolitik enzimler elde edilmiş ve mide’den salgılanana ‘pepsin’, pankreasta tarafından salgılanana ‘tripsin’, bağırsak mukozasından elde edilene ise ‘erepsin’ adı koyulmuştur (Keay ve ark. 1972). 1894 yılına gelindiğinde ise Japon bilim insanı Jokichi Takamine mikrobiyal enzim eldesine ilk defa *Aspergillus oryzae*’den üreterek başlamıştır (Takamine 1894). Elde ettiği enzim solüsyonu proteolitik ve karbohidraz enzimlerini barındırmakta ve ‘Takadiastas’ adı ile tanınmaktadır. 1907 yılında Otto Röhm hayvansal organların da enzim içeriğinin kullanılabileceğini pankreatik proteaz enziminin deri endüstrisinde kullanılmasıyla göstermiştir (Röhm 1908). Röhm (1908) bu enzimin patentini alarak ticari formda kullanılmasını sağlamak amacıyla ürün haline getirmiş ve adını ‘Oropon’ koymuştur. Wallerstein tarafından bir çeşit bitki olan *Carica papaya* (Papaya) proteazı olan papain, bira üretimi sırasında biranın bulanıklığının giderilmesinde kullanılmıştır. 1913 yılında ise enzim katkılı deterjan yine Otto Röhm tarafından üretime konulmuştur.

1930'lu yılların ortalarında ise J. Northrop pepsin, kimotripsin ve tripsin enzimlerini kristalize etmiş ve enzimlerin proteinlerden oluştuğunu net bir şekilde ortaya koymuştur. 1938 yılında ise Northrop ve Stanley, 'Kristalize Enzimler' adlı makalelerinde pepsinojen, ribonukleaz, pepsin inhibitörleri, heksokinaz karboksipeptidaz, birkaç farklı enzimi saflaştırıp, kristalize ettiklerini açıklamıştır ve bu çalışmalarıyla 1946 Nobel Kimya Ödülü'nü almaya hak kazanmıştır (Anonim 1946).

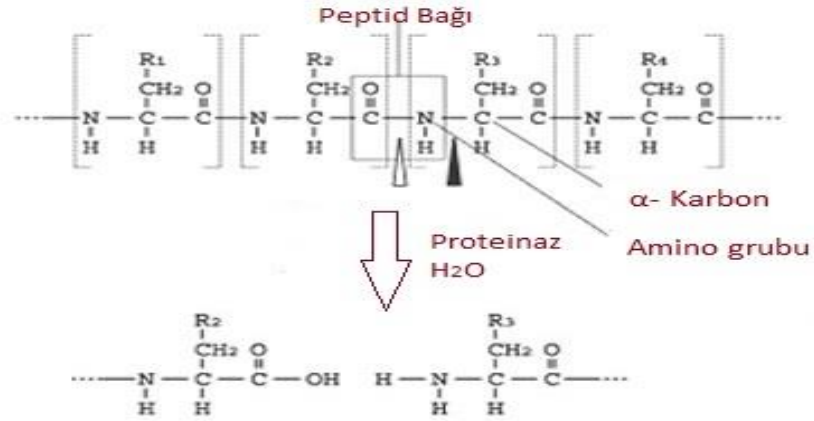
Proteaz enzim kaynağı olarak *Rhizopus* sp., *Bacillus cereus*, *Penicillium* sp., *Bacillus coagulans*., *Clostridium* sp., *LactoBacillus* sp., *Candida* sp., *Pseudomonas* sp., *Aspergillus* sp., *Streptococcus* sp., *Streptomyces* sp. gibi çok farklı çeşitlilikte mikroorganizma türleri tespit edilmiştir (James ve David 1986). *Bacillus*'ten izole edilen proteaz enzimi 1959'da Jaag adlı bilim insanı tarafından, deterjanların içerisine eklenmiştir (Uhlig 1998). 1950'li yıllarda global çapta dericilik, bira yapımı ve tekstil sanayisinde kullanılmak için çok çeşitli enzimler üretilmekte fakat bunlar arasında proteaz ve amilaz büyük bir kullanıma sahipti. 1960'da Novo Nordisk şimdiki adıyla Novozymes firması, *Bacillus licheniformis*'ten elde ettiği proteaz enzimini deterjanlarda kullanımı amacıyla ticari boyutlarda üretmeye başlamışlardır. Ancak üretilen bu enzimlerin kullanımıyla birlikte, İngiltere'de alerjik reaksiyon belirtileri ve akciğer kanseri vakalarında artış gözlemlenmiş, enzimlerin doğrudan kullanımı yerine granüler halde kullanılmasıyla bu vakaların önüne geçilmiştir. 1971 yılında Ulusal Amerikan Bilim Kurumu bu türevde deterjanların zararsız olduğunu söylemiştir (Uhlig 1998).

Singh ve ark. (1999), Himalaya dağı topraklarından izole ettikleri alkalofilik *Bacillus sphaericus* suşundan proteaz elde etmişlerdir. Ürettikleri enzimin 50–55 °C'de ve pH 10.5'de en iyi aktiviteyi gösterdiği bildirmişlerdir. Üretilen bu enzim 500 mg/L klor içeren ortamda aktivitesini korumuş ve deterjanlarda kullanılabilir bir katkı maddesi olduğu ortaya çıkarılmıştır. Proteazların endüstriyel olarak kullanımından sonra özellikle alkalen proteazların önümüzdeki yıllarda büyük gelişme göstermeleri beklenmektedir (Rai 2010). Endüstriyel enzimlerin global pazar payı 1,6 milyar \$'ın üzerindedir (Zakaria 2006). Dünya genelinde kullanılan ticari enzimlerin %60'ını proteazlar, %28'ini karbohidrazlar, %3'ünü lipazlar ve geri kalan kısmını diğer enzimler oluşturmaktadır (Wiseman 1987, Rao ve ark. 1998, Sidhu ve ark. 1997).

Günümüzde enzimler hakkındaki bilgiler ve kullanım alanları halen artmaktadır. Gelişmekte olan elektroforetik ve kromatografik yöntemler sayesinde enzimlerin ileri analizleri yapılabilmektedir. Ayrıca enzimlerin 3 boyutlu yapılarının gün ışığına çıkarılmasıyla etki mekanizmaları ve yapıları en ince ayrıntısına kadar incelenmeye devam etmektedir.

## 2.2. Proteazların Katalitik Mekanizmaları

Proteazlar, proteoliz olarak isimlendirilen süreçte, aminoasit birimlerinden oluşmuş proteinlerinde bulunan peptid bağlarının hidrolizini katalizlerler (Mizuno 2003), (Şekil 2.1).



**Şekil 2. 1.** Proteazların Katalitik Mekanizması (Mizuno 2003)

Moleküler boyutta çalışan bıçaklar gibi işlev gören proteazlar; bilinen tüm proteinlerin, büyüklüklerinin kontrolü, yapıları, biçimleri ve son olarakta yok edilmeleri için uzun aminoasit dizileri arasındaki bağları hidrolizlerler. Proteazlar, proteinlerin biyolojik olarak dönüşümünü, sentez sonrası modifikasyonlarını ve aktivasyonunu kontrol altında tutarak, gebeliğin başlaması, sindirim, gelişim, olgunlaşma, yaşlılık ve hatta ölüm gibi fizyolojik süreçlerde çok önemli rol oynarlar (Shen ve Chou 2009).

Virüslerden omurgalılara kadar çeşitli organizmalarda bulunan proteazlar, Peptid hidrolazları olarakta isimlendirilmektedirler. Proteazlar, 10 kDa'luk boyutta monomerlerden, çoklu birimlerden meydana gelmiş komplekslere kadar proteinlerin peptid bağlarının hidrolizlemesini sağlamaktadır. Bu anlatılan özellikler proteazların biyolojik katalizörler olarak hayati rolünü açıklamaktadır (Castro ve ark. 2010).

### **2.3. Proteazların Adlandırılması ve Sınıflandırılması**

Proteazlar ya da diğer isimlendirilmeleri olan peptidazlar/proteolitik enzimler proteinlerdeki peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir (Polgar 1989). Proteazların karakterizasyonu yapılarındaki biyokimyasal çeşitlikten kaynaklı olarak çok zordur. Proteazlar ilk olarak, moleküler büyüklükleri, yükleri ve substrat spesifikliğine göre sınıflandırılmış, daha sonraları katalitik aktif bölgelerine, aksiyon mekanizmalarına ve 3 boyutlu yapılarına göre sınıflandırılmaya başlanmışlardır (Beynon ve ark. 1989, Barrett 1994, Rao ve ark. 1998).

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Adlandırma Komitesi (The Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB) tarafından belirlenen enzim sınıflandırılma standartında enzimler katalizledikleri reaksiyonun tipine göre 6 ayrı sınıfa ayrılmışlar ve proteazlar 3. sırada yer alan hidrolazlar sınıfına dahil edilmiştir. Genel olarak bir literatür taraması yapıldığında, proteazların ele alınış şekline çeşitli şekilde sınıflandırıldığı görülmektedir (Uhlir 1998).

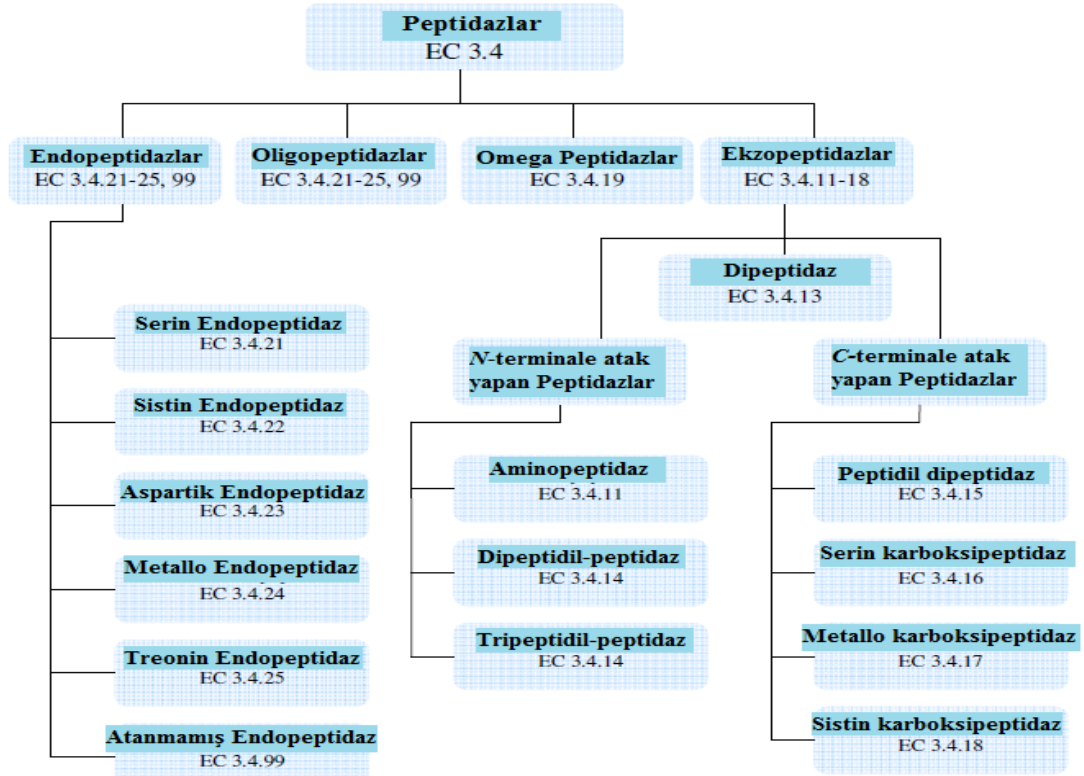
Proteazlar elde edildikleri kaynaklara göre ele alınacak olursa 3 gruba ayrılmaktadır. Bunlar; hayvansal kaynaklı, bitkisel kaynaklı ve mikrobiyal kaynaklı proteazlardır. Proteazlar mikroorganizmalardan salınmasına bağlı olarak, hücre içerisinde görev üstlenmek üzere sentezlenen intraselüler proteazlar, periplazmik proteazlar ve ortama salınan ekstraselüler proteazlar olmak üzere üç gruba ayrılırlar (Kohlmann ve ark. 1991, El-Safey ve ark. 2004, Nascimento ark. 2004). İntraselüler proteazlar, metabolizma ve düzenleme süreçlerinde hayati rollere sahiptir. Ekstraselüler proteazlar, ortamdaki

proteinler hidrolizinde ve ticari işlemlerdeki hidrolitik ürünlerin eldesinde çok önemli role sahiptir (Gupta ve ark. 2002).

Proteazlar optimum çalışma pH'larına göre ise 4 gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar, asidik, nötral, alkalın ve yüksek-alkalin proteazlardır (Guangrong ve ark. 2006). Asidik proteazlar hayvan hücrelerinde, mayalarda, bakterilerde ve küflerde bulunur. Nötral proteazlar (papain, bromelain, ficin) bitkisel kökenden izole edilen sistein proteazları içerir (Sumantha ve ark. 2006). Bakteriyel nötral proteazlar genellikle pH 5.0-8.0 aralığında üretilmektedir. Bu nötral proteazlar ısıya karşı genellikle dayanıksızlardır. Alkalın proteazlar, alkalın ortamlardan üretilirler ve katalitik doğalarından dolayı geniş kullanım alanlarına sahiptirler (Asokan ve ark. 2010).

Substrat spesifikliğine bağılı olarak ise çok farklı gruplara ayrılabilirler. Bunlar arasında kollojenazlar, keratinazlar ve elastazlar örnek verilebilir. (Sumantha ve ark. 2006).

Proteazların sınıflandırılmasında benzer gruptaki hidroliz için göreceli seçicilik esası üzerinden daha geniş kapsamlı sınıflandırılmaya gidilmiştir. Bunlar; iki büyük sınıf olan endopeptidazlar (büyük proteinlerin uçlarından uzağı atak yapanlar) ve ekzopeptidazlara (polipeptidin ucuna atak yapanlar), iki küçük sınıf olan oligopeptidazlar (küçük proteinlerin uçlarından uzağı atak yapanlar) ve omega-peptidazlara (proteinlerin uçlarına hareket edenler) ayrılabilirler. Proteazların (peptidazlar) terminolojinin genel detayları Şekil 2.2' de verilmiştir (Ather 2009).



**Şekil 2. 2.** Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Uluslararası Sınıflandırma Komitesinin (IUBMB) peptidazlar için ileri sürdüğü enzim sınıflandırması (Ather 2009)

### 2.3.1 Endopeptidazlar

Endopeptidazlar; polipeptid zincirini uç bölgelerinde bulunan N ve C atomlarına sergiledikleri seçilimli reaksiyonlar ile karakterize edilmektedirler. Polipeptid zincirinde bulunan serbest karboksi veya serbest amino gruplarının enzimin aktivesi üzerine olumsuz etkisi bulunmaktadır. Bu serbest uçların çıkarılması olayında endopeptidazlar sınırlı ve özgül role sahiptirler. Örnek vermek gerekirse sentezlenen proteinlerin, işlev göreceği yere ulaştıklarında sinyal peptidlerinin uzaklaştırılması (sinyal peptidaz I) ve öncül proteinlerin olgunlaşması (enteropeptidaz) (Barrett ve Rawlings 1991).

Endopeptidazlar; Aktif bölgelerinde yer alan fonksiyonel grup ve bunların katalitik mekanizmasına dayanarak, farklı gruplara ayrılmaktadırlar. Serin proteazlar (EC 3.4.21), aspartik proteazlar (EC 3.4.23), sistein proteazlar (EC 3.4.22) ve metallo proteazlar (3.4.24) olmak üzere dört gruba ayrılmaktadırlar (Alpan 2008). Bunların yanı sıra katalitik mekanizması tam olarak bilinmeyen endopeptidaz belirlenmiş ve EC 3.4.99 numarası ile kodlanmıştır (Sevinç 2010). Endopeptidazların etki mekanizması

genel olarak Şekil 2.3'te şematize edilmiştir. Canlı organizmalarda dört sınıf endopeptidaz saptanmış ve endopeptidazın dört sınıfından üçü bakterilerde izole edilmiş ve saflaştırılmıştır; Serin, sistein ve metalloproteazlar (Liao ve McCallus 1998).



Şekil 2. 3. Endopeptidazların polipeptid üzerindeki etki mekanizması (Sevinç 2010)

### 2.3.1.1. Serine Proteazlar (E.C. 3.4.21)

Serin proteazlar, ticari olarak öneme sahip, proteaz grupları içerisinde en çok çalışılan ve en iyi bilinen proteaz sınıfıdır. Aktif bölgelerinde serin (Ser), histidin (His) ve aspartik (Asp) aminoasitleri içermektedirler (Garcia-Carreno 1993). Yapısında bulunan serin (Ser) aminoasiti katalitik metabolizma sırasında substratlarla, aktivatörlerle veya inhibitörlerle bağ kurmaktadır. Serin proteazlar, üç boyutlu yapıları, aminoasit dizileri ve aktif bölge konfigürasyonlarındaki benzerliklere ve farklılıklara göre yirmi aileye ve altı klana ayrılmıştır (Barett 1994, Zeigler 2001). Subtilisin ailesi ve kimotripsin ailesi (kimotripsin, memeli elastazları ve birkaç bakteriyel proteaz) serin proteazlar içerisinde en iyi bilinen alt gruplardır. Subtilisin ailesi mekanizmalarında SH grubunu, termitaz ve proteinaz K'yı içermektedir (Zeigler 2001). Subtilisin ailesinde bulunan proteazlar hidrofobik ya da aromatik aminoasitler dışında kalan tüm aminoasit peptid bağlarını hidrolizlerler. Subtilisin ailesinin katalitik üçlü dizilişi Asp-32, His-64 ve Ser-221 şeklindedir (Bond 1989).

Kimotripsin, triptofan, fenilalanin, tirozin gibi hidrofobik aminoasitlerden sonra yer alan peptid bağlarını hidrolizlerler. Tripsin, lizin ve arjinin gibi pozitif yüklü aminoasitleri takip eden peptid bağlarını hidrolize ederler (Bond 1989).

Bakterilerden, mayalardan, küflerden, mantarlardan elde edilebilen serin proteazlar karboksil uç tarafındaki ayrılmalarda, tirozin, fenilalanin veya lizinin bulunduğu bölgelerden hidroliz işlemi gerçekleştirilir. Serin proteazların moleküler ağırlıkları genellikle 18 kDa ve 35 kDa arasındadır. Fakat *Blakeslea trispora* adlı mikroorganizmadan izole edilen serin proteazın 126 kDa moleküler ağırlığına sahip olduğu bildirilmiştir (Govind ve ark. 1981).

### **2.3.1.2. Aspartik Proteazlar (E.C. 3.4.23)**

Aspartik proteazlar, genel olarak bilinen ismiyle asidik proteazlar, katalitik aktivite gösterebilmeleri için aspartik asit köküne ihtiyaç duyan endopeptidazlardır. Aspartik proteazlar, pepsin, retropepsin ve pararetrovirüslerdeki enzimler olmak üzere üç aileye ayrılmaktadırlar. Aspartik proteazlar çeşitli sayıda substrat özgüllüğü gösterebilirler. Özellikle iki hidrofobik aminoasit kalıntısı içeren peptid bağlarının hidrolizinde en yüksek aktiviteyi göstermektedirler. Örnek vermek gerekirse, pepsin hidroliz edilecek olan peptid bağlarının her iki yanında da aromatik kalıntılar içeren peptid bağlarını tercih etmektedir. Aspartik proteazların molekül ağırlıkları genellikle yaklaşık 35 kDa'dur ve 323 ila 340 aminoasit dizisinden oluşmaktadırlar. Birçok aspartik proteaz düşük pH aralıklarında maksimum aktivite gösterir ve izoelektrik noktaları ise pH 3.0-4.5 aralığında değişmektedir. Ayrıca aspartik proteazlar pepstatin, diazoasetil norlösin metil ester (DAN) ve 1,2-epoxy-p-nitrofenoksi propan (EPNP) tarafından inhibe olurlar (Rao ve ark. 1998, Zeigler 2001).

### **2.3.1.3. Sistein/Tiyol Proteazlar (E.C. 3.4.22)**

Sistein proteazlar hem prokaryotlar hemde ökaryotlar tarafından üretilmektedir. Sistein proteazların aktif bölgelerinde sistein (SH-) ve histidin grupları vardır (Garcia-Carreno ve ark. 1993). Tiyol proteazlar sadece HCN (hidrosiyamik asit) varlığında ve sistein bulunması durumunda aktif olarak iş görürler. Sistein proteazlar, sistein ve histidin kalıntıları arasındaki düzen farklılıklarına bağlı olarak yirmi aileye ayrılırlar (Barett 1994). Diğer yandan, papain benzeri, tripsin benzeri, glutamik asit benzeri ve diğerleri şeklinde de aktif merkezlerinin özgüllüğüne göre dört gruba bölünebilirler. Sistein proteazlar genellikle nötral koşullarda üretilmektedir. Moleküler ağırlıkları 32 kDa'dan



52 kDa'ya kadar değişmekte olup izoelektrik noktaları pH 4.9 ile 8.4 arasında değişmektedir. (Rao ve ark. 1998). Papain benzeri endoproteazlar en çok bilinen gruptur (Gençkal 2004). Sistein proteazlar aynı zamanda 'kaspazlar' olarakta bilinmekte ve apoptoziste görev almaktadırlar. Birbirleri aktifleştirecek bir şelale şeklinde reaksiyon dizisine sebep olurlar (Ulukaya 2003). Sistein proteazlar, peptid bağlarına üzerinde bir nükleofil ve bir proton verici baz taşıyan bir sistein kalıntısının -SH grubu tarafından atak yapar. Proton verici Peptid bağlarına, serin proteaz enzimi üzerinde bir nükleofil ve bir proton verici / genel baz taşıyan bir Sistein kalıntısının -SH grubu tarafından saldırı yapılır. Diğer yandan, katalitik mekanizmada nükleofilik atak olarak adlandırılır. Proton verici, imidazolium halkasını içeren bir histidin kalıntısı olmalıdır (Supuran ve ark. 2002).

#### **2.3.1.4.Metalloproteazlar (E.C. 3.4.24)**

Metalloproteazlar, iki değerli bir metal iyonu (katalitik çinko, manganez, kobalt, nikel veya bakır) ile aktifleştirilmiş metalik bir merkeze köprülenmiş bir su molekülünün nükleofilik saldırısı sayesinde peptid bağlarını parçalayan enzimlerdir. Enzimin aktif merkezinde metal iyonu korunmuş glutamik asit (Glu), aspartik asit (Asp), histidin (His) veya lizin (Lys) olabilen üç korunmuş aminoasit kalıntısı ile kompleks oluşturur (Hase ve Finkelstein 1993, Supuran ve ark. 2002, Mansfeld 2007). Katalitik ve yapısal metal bağlama bölgelerinin özellikleri, x-ışını kristalografik analizleri ile tanımlanmaktadır. En çok çalışılan metalloproteaz olan çinko içeren metalloproteazlar kristal yapılarında bir katalitik çinko atomuna (üç aminoasit kalıntısıyla düzenlenmiş) ve bir aktif su molekülüne sahiptir. Metalloproteazlar 30 aileye ayrılmaktadır ve bunlardan 17'si endopeptidaz, 12 ailesi ekzopeptidaz ve sadece 1 ailesi endopeptidaz ve ekzopeptidazlara dahildir. Ayrıca metalloproteazlar aminoasit sekansları ve aminoasitlerle metal bağlanma bölgelerinin ilişkisine göre 14 farklı klana ayrılmaktadır (Mansfeld 2007). Metalloproteazlar genellikle nötral ortamlarda üretilirler ve optimum çalışma aralıkları pH 5.0 ile pH 9.0 arasında değişmektedir (Zeigler 2001, Rao ve ark. 1998). *Pseudomonas aeruginosa* ve *Serratia* spp.'nin ürettiği metalloproteazlar pH 7.0-9.0 aralığında optimum aktivite aralığına sahiptirler ve moleküler ağırlıkları 45 ile 60 kDa arasında değişmektedir. Metalloproteazların hepsi EDTA gibi şelat ajanı tarafından

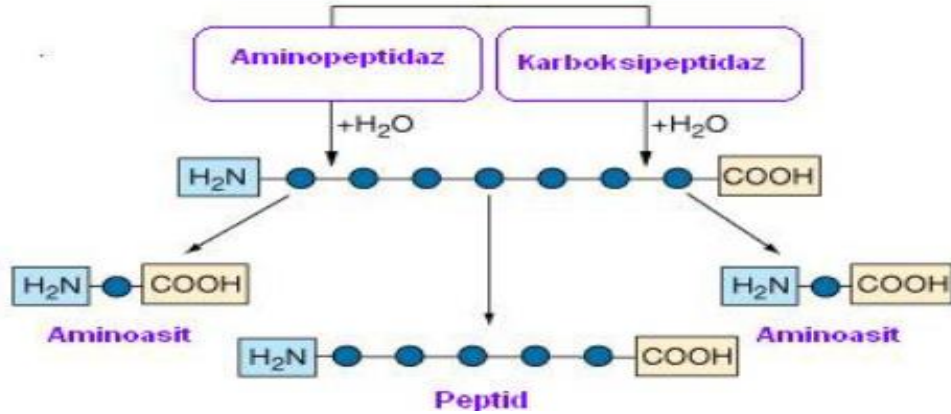
inhibe edilebilmekte fakat DFP veya sülfidril ajanlar tarafından inhibe edilememektedirler.

### 2.3.2.Oligopeptidazlar

Oligopeptidazlar, peptidleri parçalayan ancak proteinleri parçalayamayan bir enzimdir, bu enzimin aktif bölgesinin yalnızca peptidler tarafından ulaşılabilir kadar dar bir boşluğa sahip olmasından kaynaklanır. Yaklaşık olarak 30 aminoasit uzunluğunda olan bu oligopeptidler patojenlerin tespitinde ve nörolojik olaylarda görev almaktadır. Dolayısıyla, bu moleküllerin sürekli olarak üretilmesi ve inaktif hale getirilmesi gerekir; bu, oligopeptidazların rolüdür (Anonim 2017b).

### 2.3.3. Ekzopeptidazlar

Ekzopeptidazlar uzun polipeptid zincirlerinde bulunan uç bölgelere etki ederek aktivite gösterirler. Etki ettikleri uç N terminaliyse aminopeptidaz, C terminaliyse karboksipeptidaz ismini alırlar. Ekzopeptidazların genel çalışma mekanizması Şekil 2.4'te şematize edilmiştir.



Şekil 2. 4. Ekzopeptidazların polipeptid üzerindeki etki mekanizması (Sevinç 2010)

Ekzopeptidazlar, serbest N-terminal amino grubu, C-terminal karboksi grubu ya da her ikisinin de ihtiyaç duyarlar ve uçtan uç peptid bağına geçmemek üzere bağları hidroliz etmektedirler (Hasegawa 1960, Nardi 1960, Rao ve ark. 1998). Uluslararası enzim

komisyonu 74 tane ekzopeptidazı listesine almıştır. Karboksipeptidazlar CP, aminopeptidazlar AP ile sembolize edilmektedir (Sarı 2011).

### 2.3.3.1. Aminopeptidazlar (E.C 3.4.11)

E.C 3.4.11 grubunda bulunan aminopeptidazlar, polipeptidin serbest N-terminal ucuna atak yaparlar ve atak sonucu sadece bir aminoasit kalıntısı, iki aminoasit kalıntısı ya da üç aminoasit kalıntısı bırakırlar. Aminopeptidazların, ifade edilmiş proteinlerde N-terminal Metiyonini (Met) uzaklaştırdığı bilinmektedir. E.C. 3.4.14 grubunda bulunan dipeptidil-peptidaz N-terminal dipeptidi hidroliz ederek uzaklaştırır. E.C 3.4.14 grubunda bulunan tripeptidil peptidaz ise, polipeptidin N-terminal ucundaki tripeptidi hidroliz eder (Şekil 2.5).



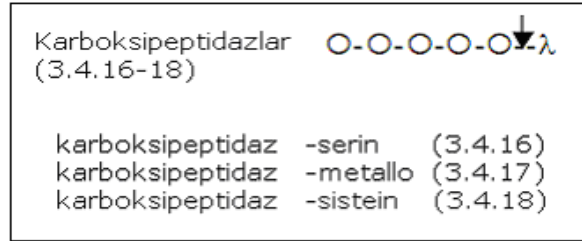
Şekil 2. 5. Aminopeptidazların alt grupları ve etki mekanizmaları (Tanksale 2001)

Aminopeptidazlar genellikle hücre içerisinde kullanılmak üzere sentezlenen enzimlerdir, fakat *Aspergillus oryzae* ile yapılan çalışmada organizmanın ekstraselüler aminopeptidaz ürettiği ortaya konulmuştur (Labbe ve ark 1977). Bakteri ve mantarlardaki aminopeptidazların substrat özgülüğü oldukça farklılık sergiler.

Aminopeptidazlar, metallo aminopeptidaz, serin aminopeptidaz ve sistein aminopeptidaz olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Bu sınıflandırma aktif bölgelerinin özgül proteaz inhibitörlerine göre yapılmaktadır. (Rao ve ark. 1998, Tekin 2008, Sarı 2011). *Escherichia coli*'den elde edilen aminopeptidazlar yaklaşık 40 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. Bu peptidazın  $Mg^{+2}$  veya  $Mn^{+2}$  iyonlarına ihtiyaç duyup, pH 7.5-10.5 aralığında aktivite gösterdiği belirlenmiştir. *Bacillus licheniformis*'in 34 kDa moleküler ağırlığına sahip aminopeptidazının mol başına 1g/atom  $Zn^{+2}$  içerdiği ve aktivitesinin  $Co^{+2}$  varlığında arttığı tespit edilmiştir.

### 2.3.3.2. Karboksipeptidazlar

Karboksipeptidazlar, polipeptid zincirin karboksil (COOH) ucuna etki ederler. Hidroliz sonucu bir aminoasit veya dipeptid polipeptidten ayrılır (Şekil 2.6). Karboksipeptidazların aktivite göstebilmesi için hidroliz edecekleri C-terminalde  $\alpha$ -karboksil grubuna ihtiyaçları vardır (Rao ve ark. 1998, Sarı 2011). Karboksipeptidazlar aktif bölgelerinde buldukları aminoasit kalıntılarına göre üç ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar; şekil 2.6'da gösterildiği gibi metallo-karboksipeptidazlar (E.C 3.4.17), serin-karboksipeptidazlar (E.C 3.4.16) ve sistein-karboksipeptidazlar (E.C 3.4.18)'dir (Rawlings ve Barrett 1997). Metallo karboksipeptidazlar aktif merkezlerinde  $Zn^{+2}$  atomu içermektedirler. Kofaktör olarak bir çinko atomu içermektedir. Serin karboksipeptidazlar ise aktif merkezlerinde Asp, His ve Ser aminoasitlerinden oluşan katalitik olarak aktif bir üçlü içermektedir (Tanksale 2001).

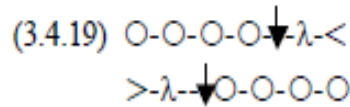


Şekil 2. 6. Karboksipeptidazların alt grupları ve etki mekanizmaları (Tanksale 2001)

### 2.3.4. Omegapeptidaz

Omegapeptidazlar, ekzopeptidazların aksine serbest olarak bulunan N- veya -C terminal uçlarına ihtiyaç duymazlar fakat terminal uca yaklaştıkça hareket alanları artmaktadır (Şekil 2.7).

#### Omega peptidaz



Şekil 2. 7. Omega peptidazların etki mekanizması (Tanksale 2001)

Hareket alanlarının  $\alpha$ -karboksilin  $\alpha$ -amino grubuyla yaptığı bağ dışındaki yerde olması nedeniyle ekzo ve endopeptidazlardan tamamen farklı ele alınırlar. İzopeptid bağlarıyla bağlı veya siklize uç kalıntıları üzerine hareket edebilirler. Farklı özelliklere sahip omegapeptidazlar bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak ubiquitinil hidrolazlar, gama-glutamil hidrolazlar ve piroglutamil peptidazlar verilebilir.

#### 2.4. Proteaz Kaynakları

Proteazlar yaşayan tüm organizmalarda fizyolojik olarak gerekli olduğundan doğada yaygın olarak bulunan enzim gruplarından birisidir (Rao ve ark. 1998). Enzimler üretildikleri hücreler dışında da fizyolojik çevrelerinden bağımsız olarak kataliz gerçekleştirebilirler. Proteazlar bitki ve hayvan hücrelerinden, mikroorganizmalardan fermantasyon yoluyla elde edilerek ticari olarak kullanılmaktadır (Gençkal 2004). Bitkiler yapısında %44 oranında proteaz bulundurmasıyla en iyi proteaz kaynaklarından biri olarak görünmektedir. %18 oranında proteaz içerikleriyle bakteriler ikinci sırada, %15 oranıyla mantarlar üçüncü sırada yer almaktadır (Şekil 2.8).

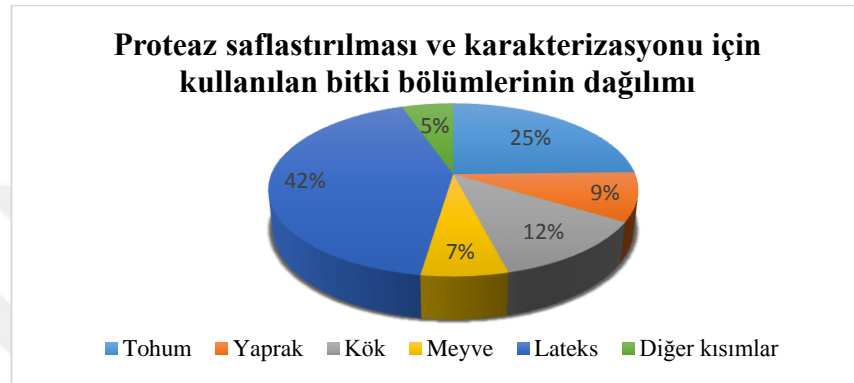


Şekil 2. 8. Proteazın biyolojik kaynaklara göre dağılımı (Mahajan ve Badgujar 2010)

Mikroorganizmalarca üretilen enzimlerin istenilmeyen yan ürün meydana getirmemeleri, katalitik olarak aktivitelerinin yüksek olması, ucuz yollarla üretilmeleri ve stabiliteyi, yüksek saflıkta elde edilmelerinden dolayı, endüstriyel alanda kullanılan proteazlar ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan üretilmektedir (Horikoshi 1999).

### 2.4.1. Bitkisel Proteazlar

Bitkilerden elde edilen proteazlar aktif bölgelerinde bulunan sülfidril gruplarınca karakterize edilmektedir (Uhlig 1998). Tropikal bitkiler başta olmak üzere çok sayıda bitkiden izole edilebilmektedir. Bitkilerde bulunan proteazlar bitkide neredeyse tüm dokularda bulunmaktadır. Fakat proteazların bitkilerde en çok bulunduğu kısımlar lateks ve tohumlarıdır (Şekil 2.9)



Şekil 2. 9. Proteazın biyolojik kaynaklarda dağılımı (Mahajan ve Badgular 2010)

Bitkisel proteazların yaklaşık olarak %43,9 tam olarak karakterize edilememiştir. Fakat karakterize edilenlerin çoğu sistein ve serin endopeptidazlardır. Bitkilerde genellikle sistein ve serin endoproteazlar bulunmaktadır. Bitkilerde, aminopeptidazlar ve aspartik peptidazlar az miktarda bulunmaktadır (Mahajan ve Badgular 2010). Bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanılması, enzimlerin izolasyonları, bitkilerin gelişimi için iklimsel koşulların ve toprağın rolünden dolayı zaman alan bir süreçtir. Bu zorlu süreçlere rağmen bitkisel proteazlar gıda başta olmak üzere çeşitli endüstri alanında kullanılmaktadır. FSIS (Food Safety and Inspection Service) tarafından onaylı ve GRAS (Generally Recognized As Safe) statüsünde kabul gören beş adet eksojen enzim bulunmaktadır ve bunların birçoğu bitkisel orijinlidir (Katsaros ve ark. 2010, Zhao ve ark. 2012). Bitkisel orijinli elde edilen proteazlardan en iyi bilinenleri papain, bromelin ve fisindir. Endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin başında gelen “papain”, papaya (*Carica papaya*) adlı bitkiden elde edilmektedir. Enzimin ham halinde, birkaç adet proteaz ve peptidaz izozimi barındırdığından geniş özgüllüğe sahiptir. Enzimin optimum çalışma aralığı pH 5.0-9.0 arasındadır ve substrat mevcudiyetinde 80-90°C ye kadar dayanıklıdır. Papain enzimi, aromalı protein hidrolizatlarının hazırlanmasında

geniş kapsamlı olarak kullanılmaktadır (Rao ve ark. 1998). Papain kullanımı çok eskilere dayanmaktadır. Bilim insanları, tropikal bölgelerde yaşayan bazı yerli insanların, etlerini pişirmeden önce papaya bitkisinin yapraklarına sardıklarını görmüşlerdir. Papaya bitkisinin yapraklarına sarılan etlerin iyi piştiği ve sindiriminin kolaylaştığı yönündeki bilgiden hareketle yapraklardaki ve meyvelerdeki madde araştırılmaya başlanmıştır. Araştırma sonunda bitkinin meyvesinde, yapraklarından daha çok miktarda papain içerdiği bulunmuştur (Uhlig 1998). Günümüzde enzim yeşil olgunlaşmamış meyvenin çizilmesiyle elde edilmektedir. Meyve yapısındaki renksiz lateks, koagülasyondan önce dakikalar içerisinde beyaz rengine döner. 200 gram ham papain elde etmek için 1 kilogram lateks gereklidir ve ağaç başına yaklaşık olarak 450 gram lateks elde edilmektedir. Ham papainin yapısında %10 oranında protein, papain benzeri fakat spesifikleri farklı %45 oranında kimopapain A ve B ve birkaç enzim vardır.

Bir diğer bitkisel kaynaklı enzim ise bromelindir. Bromelain ananas bitkisinin (*Ananas comosus*, *Ananas bracteatus*) suyundan ve köklerinden elde edilmektedir. Bromelain enzimi, sistein proteazlar içerisinde karakterize edilmiştir. pH 5.0-9.0 arasında aktiftir ve 70°C'de inaktif hale gelmektedir (Rao ve ark. 1998). Bitkinin meyvesinden ağırlıklı olarak bromelain elde edilirken, kök kısmından ananin ve comasain adlı enzimler elde edilmektedir (Rowan ve ark. 1990). Bromelain enzimin endüstride çeşitli kullanım alanlarına sahiptir. Bunların başında sağlık preparatları, binaların stabilizasyonu, tekstil sektörü, kozmetik gibi alanlar gelmektedir (Chakravarthy ve Achary 2012). Bromelain enziminin üretiminin büyük bir kısmı Great Food (Biochem) firması tarafından yapılmaktadır.

İncir (*Ficus glabrata*)'den elde edilen fisin enzimi çok yüksek miktarda proteaz aktivitesi göstermektedir. 10 ile 15 gram bitkiden yaklaşık olarak 100-150 miligram fisin eldesi mümkündür. Fisin, aromatik ve yüksüz aminoasitler içeren bağlarda oldukça etkilidir. Optimum çalışma pH'sı 6,5'tir ve pH 4.0 ile pH 9,5 arasında etkisinin gösterebilmektedir. Enzim, kurutma sırasında aktivitesinin büyük bölümünü kaybetmekte, *Ficus glabrata* haricinde diğer birkaç incir türünden de elde edilebilmektedir (Polaina ve MacCabe 2007).

Keratinaz adlı enzimde bitkiler bazıları tarafından üretilmekte, keratin yapısını bozabilen bir enzimdir. Atık su drenaj alanlarının tıkanmaması için ve saç, yün gibi keratin yapıların parçalanması işlemlerinde oldukça önemlidir.

Tüm bunlara ek olarak zingibain ve aktinidin enzimleride bitkisel kaynaklı enzimlerdir. Zingibain, zencefil bitkisinin rizomundan, aktinidin ise kivi meyvesinden elde edilmektedir (Katsaros ve ark. 2009, Ha ve ark. 2012, Zare ve ark. 2013).

#### **2.4.2. Hayvansal Proteazlar**

Hayvanlardan elde edilen proteazların en bilinenleri tripsin, pepsin, rennin ve kimotripsindir. Giriş kısmında da bahsedildiği gibi enzimlerin ve proteinlerin yapısı çözülmeden önceki zamanlarda da pepsin ve pankreas sıvısının proteinleri parçaladığı bilinmekteydi. Hayvansal kaynaklı proteazlarının elde edilmesi, çok miktarda hayvanın kesilmesini gerektirdiği için bir takım siyasal ve tarımsal kurallar tarafından kontrol altındadır (Mahajan ve Badgular 2010). Tripsin sindirim işleminde görev alan başlıca proteazlardandır. Gıda maddesi olarak alınan proteinlerin hidrolizi bu enzim tarafından sağlanmaktadır. Tripsin, serin proteaz ailesi içerisinde ve arjinin, lisin rezidülerinin dahil olduğu karboksil gruplardaki peptid bağlarını hidrolize ederler. Proteaz inhibitörlerinin böcek bağırsağındaki enzimi inhibe etme özelliklerinden yola çıkarak, bu enzim zararlı haşerelerin biyokontrolü için hedef olarak ilgi görmüştür. Enzim meydana getirdiği protein hidrolizatlarının çok acı bir tada sahip olması nedeniyle gıda sektöründe fazla bir kullanım alanı bulamaz ama bunun yanında bakteriyel ortamların oluşturulmasında ve kristalize veya saf formlarının yara tedavisinde kullanımı mümkündür (Mahajan ve Badgular 2010).

Saf hali oldukça pahalı olan kimotripsin ise hayvanların pankreas ekstratlarından elde edilen bir enzimdir. Pahalı olmasından kaynaklı sadece analitik uygulamalarda ve teşhis işlemlerinde kullanılmaktadır. Kimotripsin enzimi özellikle fenilalanin, triptofan veya tirozin aromatik aminoasitlerinden birisinin bulunduğu karboksil gruplarındaki peptid bağlarını hidrolize etmek için özgüdür. Kimotripsin, önce aktif olmayan formda yani



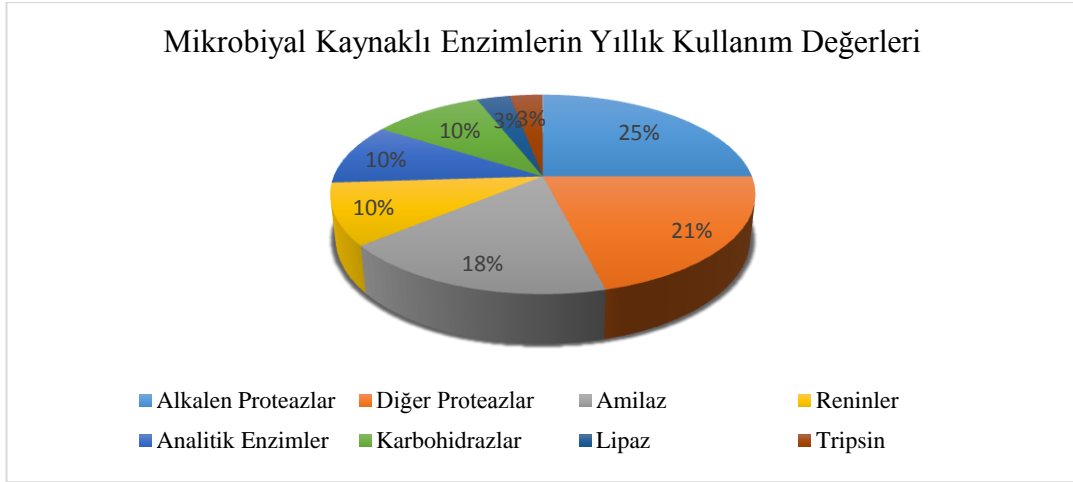
kimotripsinojen olarak pankreasta salgılanır ve depolanır, birkaç basamaklı süreçlerle tripsin tarafından aktive edilir (Mahajan ve Badgujar 2010).

Pepsin, 1836 yılında Ch. Schwann tarafından keşfedilmiş olup ortaya çıkarılan ilk hayvansal proteazdır. Mide içerisinde inaktif proenzim olarak sentezlenmekte ve pepsinojen adını almaktadır. Mide asidinin etkisiyle aktif hale geçmektedir. Aspartik proteazlar içerisinde giren pepsin enzimi, insan immün yetmezliğine yol açan HIV1 virüsünün olgunlaşmasından sorumlu enzime benzemektedir. Optimum aktiviteyi pH 2.0 ile pH 4.0 arasında göstermekte olup ortam pH'sı 6.0 ya yaklaştığında inaktif hale geçmektedir. Enzim, özellikle aromatik aminoasitler arasındaki peptidlere atak yapmakta, glutamik asit, sistin ve sistein peptidlerinin hidrolizini sağlar (Rao ve ark. 1998).

Renin, bütün memelilerin midelerinde inaktif bir form olan prorenin olarak üretilmekte olan pepsine benzeyen bir proteazdır. Hayvanlardan elde edilen renin için en yaygın olarak kullanılan kaynak yeni doğmuş sütle beslenen buzağı şirdenidir (Sevinç 2010, Sarı 2011). Öncül prorenin olarak sentezlenen enzim, pepsin veya kendi işleviyle aktif renine dönüşmektedir (Rao ve ark. 1998). Enzimin aktif hale geçmesi için pH 5.0'in altındaki H<sup>+</sup> iyonlarına ihtiyaç vardır. Renin enzimi temelde peynir endüstrisinde kullanılmaktadır. Renin enzimi aktif bölgelerinde Asp215 ve Asp32 adındaki iki tane aspartik asit kalıntısı bulundurlar. Renin enzimi kazein proteinindeki Phe105 ve Met106 yı birbirine bağlayan peptid bağımlı hidrolizleyerek, çözünmez para-kapa-kazein oluşturur ve bu sayede sütü pıhtılaştırır (Ulus 2012). Yüksek miktarda saf hale getirilmiş enzim, 10 dakika içerisinde 72 milyon birim sütü çöktürebilmektedir (Uhling 1998).

### **2.4.3.Mikrobiyal Proteazlar**

Günümüzde proteaz kaynağı olarak kullanılan canlılar arasında bakteriler, mantarlar ve virüsler gibi mikroorganizmalar başı çekmektedir. Öyle ki dünya genelindeki enzim satışının yaklaşık olarak %40'lık kesimi mikroorganizmalardan üretilmektedir. Mikroorganizmalardan bir yıl içerisinde elde edilen enzimlerin kullanım yüzdesi şekil 2.10' da gösterilmiştir.



**Şekil 2. 10.** Mikrobiyal Enzimlerin Yıllık Kullanım Değerleri (Alpan 2008)

Mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamalar sırasında neredeyse tüm özelliklerinin modifiye edilebilmesi, uygun kültür ortamlarında kolaylıkla üretilmeleri, bu canlıları uygun proteaz kaynağı yapmaktadır. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı proteazların üretimindeki zorluklar nedeniyle, dünya genelinde ihtiyaç duyulan proteaz enziminin büyük çoğunluğu bu nedenle mikroorganizmalarca karşılanmaktadır. Ayrıca hayvansal kaynaklardan elde edilen materyallerin, hayvandan insana geçen SARS, deli dana ve kuş gribi gibi hastalıkların artışıyla, kullanımı şüphe uyandırmış, mikrobiyal kaynaklara yönelim artmıştır.

Fungal kaynaklardan elde edilen proteazlar çok çeşitlidir. *Aspergillus oryzae*'den üretilen proteazlar genellikle pH 4.0-11.0 arası gibi geniş bir skalada aktivite göstermektedir ve geniş bir spektrumda özgüllük gösterebilmektedirler (Schall 2007). Fungal proteazlar, saflaştırma basamaklarındaki kolaylıklar, hücrelerin asit filtreleme teknikleriyle son üründe bulunmamaları ve ucuz oluşturulabilen ortamlarda üretilmeleri yönünden pek çok avantaj sunmaktadır (Gupta ve ark. 2002). Fungal asidik proteazlar pH 4.0-4.5 aralığında optimum aktivite göstermekte olup, fungal nötral proteazlar pH 7.0'de aktivite göstermektedir. *Aspergillus oryzae*'den üretilen asidik proteazlar sindirime yardımcı olarak ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır (Vishwanatha ve ark. 2009). Fungal nötral proteazlar gıdalarda bulunan protein hidrolizatlarının acılığının giderilmesinde kullanılmaktadır (Rao ve ark. 1998). Süt endüstrisinde, peynir

yapımında kullanılan renin enzimi *Rhizomucor pusillus* ve *R. miehei*'den, invaziv aspergilloz izlenmesi ve tanısında kullanılan enzimler *A. fumigatus*'dan elde edilmektedir. Viral proteazlar, kanser ve Aids gibi bir takım ölümcül hastalıklara yol açan, virüs proteinlerinin etkilerinden dolayı önem kazanmaktadır. Viral proteazlar, virüsün replikasyonu, birleşimini düzenlemek için optimize edilmiş proteazlardır. Birçok virüste aspartik, serin ve sistein proteazlar bulunmaktadır. Aspartik proteazlar, virüsün tutunmasını ve homodimer replikasyonu ile çoklu protein öncülleri olarak tanımlanmaktadır. Otoliz mekanizmasıyla olgun proteazlar oluşturulmaktadır. Günümüzde AIDS'in yayılmasını ve öldürücü etkisinin ortadan kaldırılabilmesi için etkili proteaz inhibitörlerin dizaynı üzerinde birçok çalışma mevcuttur (Rao ve ark. 1998).

Endüstriyel alanda kullanılan 10'dan fazla bakteriyel proteazın *Bacillus* türlerinden elde edildiği bilinmektedir. Enzim üretiminde kullanılan bakterilerin kullanılmasında birçok avantaj vardır. Örnek vermek gerekirse büyük bir kısmı kemoorganotrof olduğundan dolayı besin gereksinimleri azdır ve kolaylıkla kültüre alınabilirler. *Bacillus* cinsinin ticari üretimde kullanımının en önemli gerekçesi dirençli spor yapılarına sahip olmaları nedeniyle kültürün kaybedilmesinin zorluğudur. Hem sentetik hemde kompleks ortamlarda kolaylıkla üretilmektedirler. Bunun yanı sıra *Bacillus* cinsine ait türler post-ekspansiyon ve durgunluk fazlarında da ekstrasellüler proteazlar üretebilmektedir (Mabrouk ve ark. 1998).

## **2.5. *Bacillus* Proteazının Genel Özellikleri**

*Bacillus* cinsi Bacillaceae ailesi içerisindeki iki cinsten birisidir. Günümüzde *Bacillus* cinsine ait 200'den fazla tür bilinmektedir. Bunlardan en iyi bilinenleri *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. licheniformis*, *B. sphaericus*'tir (Claus ve Berkeley 1986). *Bacillus* türleri çürümekte olan organik materyaller üzerinde, toprakta, akuatik ortamlarda, sebzelerde ve kimi türlerin vücut florasında yer almaktadır (Anonim 2017c)

Alkalın serin proteazlar ilk olarak 1971 yılında Japon bilim adamı Horikoshi tarafından topraktan izole edilen *Bacillus* sp. 221 suşundan ekstrasellüler olarak izole edilmiştir. İzole ettiği enzimin optimum çalışma pH'sı 11.5 civarında olup, enzim pH 13.0'te

aktivitesinin % 75'ini korumuştur. *Bacillus* sp. HS08 suşundan elde edilen serin proteazlar deterjanlarda katkı maddesi olarak kullanılan ısıya dayanıklı enzimlerdir (Guangrong ve ark. 2006). *Bacillus* JB türü tarafından üretilen JB1 balıkçılıkta kullanılmakta ve verim kaybını azaltmaktadır. (Sung ve ark. 2010). Nötral ortamlarda yaşayan *Bacillus* türlerinden izole edilen subtilisin proteazlar genel olarak pH 8.0-10.0 arasında değere sahiptir (Laan ve ark. 1991). *Bacillus* cinsine ait türler tarafından üretilen proteazların çoğunluğu alkali serin proteazlar içerisinde. Bu tip enzimler bağın karboksil tarafında bulunan tirozin, lösin veya fenilalanin arasındaki peptid bağlarını hidrolizler. Birçok alkali proteaz optimal olarak pH 10.0 değerine sahip ve izoelektrik noktası ise pH 9.0 dolaylarıdır. Bakteriyel alkali proteazlar optimum olarak yaklaşık 60°C'de iş görebildiklerinden deterjan sanayisinde kullanım için elverişlidir (Rao ve ark. 1998). Ayrıca alkalın serin proteazların moleküler ağırlıkları genellikle 15-30 kDa arasında değişmektedir (Boguslawski ve ark. 1983).

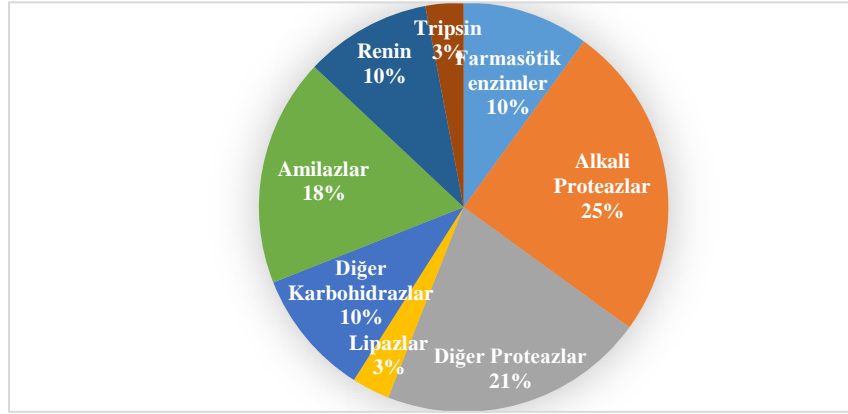
Potansiyel olarak en iyi proteaz üreticileri *B. licheniformis*, *B. amyloliquifaciens*, *B. Mojavensis*, *B. subtilis* suşlarıdır. Yıllık bazda yaklaşık olarak 500 metrik ton saf enzim üretilmektedir. Bu üretilen enzimler deterjan sanayisinde, gıda alanında, ilaç sektöründe ve deri üretiminde kullanılabilir olmasından kaynaklı ilgi gün geçtikçe artmaktadır (Saeki ve ark. 2007, Dias ve ark. 2008).

*Bacillus* türlerinden elde edilen nötral proteazlar genellikle pH 7.0 civarında optimum aktivite göstermekte olup, azot kontrolü, biranın bulanıklığının giderilmesi, sütteki proteinlerin modifikasyonlarında ve soya modifikasyonlarında tatlandırıcı olarak kullanılan çinko metalloproteazlardır (Ward ve ark. 2004).

## **2.6. Proteazların Endüstriyel Kullanım Alanları**

Proteazlar ticari alanlardaki uygulamaları bakımından endüstride kullanılan enzimlerin en önemli grubudur. Geniş substrat spesifitelerinden dolayı çoğunlukla farmasötik, gıda, deterjan endüstrilerinde olmak üzere peptid sentezi, protein hidrolizatı oluşturma, biyo iyileştirme gibi çeşitli alanlarda kullanılmakta ve endüstriyel enzimlerden elde edilen dünya çapındaki satış gelirinin yaklaşık olarak %60'lık kısmını oluşturmaktadır (McGrath 2005, Shankar ve ark. 2011).

Proteazların dünyadaki yıllık bazda kullanımı şekil 2.11’de gösterilmiştir (Ahmad 2013).



Şekil 2. 11. Proteazların endüstride kullanım yüzdeleri (Ahmad 2013)

Proteaz enziminin 2021 yılına kadar global enzim piyasasındaki yıllık değerinin 2,21 milyar \$ olarak öngörülmekte ve yıllık büyüme oranının %6’ya ulaşacağı tahmin edilmektedir (Anonim 2011).

### 2.6.1. Gıda Endüstrisi

Mikrobiyal kaynaklı proteaz enzimleri gıda sanayisinde çok eski zamanlardan beri kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde proteazların kullanımı yüksek besin değerine sahip protein hidrolizatlarının oluşturulmasında kullanılmıştır. Bu protein hidrolizatları kan basıncı düzenlemede, bebek maması içeriklerinde, diyet ürünlerinde, alkollü içecek ve meyve sularının zenginleştirilmesinde önemli rol oynamaktadır (Woodward 1985, Neklyudov ve ark. 2000). Rebeca ve ark. (1991) *B. Subtilis*’ten elde edilen proteaz kullanarak yüksek besin değerine sahip balık hidrolizatlarını ürettiklerini rapor etmişlerdir. Bebek mamasında kullanılan proteazlar süt proteinini serbest aminoasit ve küçük peptitlere parçaladığı için alerjik reaksiyon riskini azaltır. Protein hidrolizatları sağlık ürünler, klinik beslenme ve diyet gibi çeşitli alanlarda kullanıma sahiptir. Fakat elde edilen hidrolizatların acı tada sahip olması kullanımı etkileyen bir faktördür. Bu acı tadın gideriminde laktik asit bakterisinden elde edilen aminopeptidaz enzimi büyük öneme sahiptir (Rao ve ark. 1998).

*Bacillus* 'ten elde edilen proteazlar bisküvi, kek ve kraker yapımında kullanılmaktadır. Proteazların bu gibi gıda maddeleri yapımında kullanım amacı hamurun yumuşamasını geciktirmektir. Proteazlar hamurun uzama kabiliyeti ve kuvvetini arttırdığı bilinmektedir (Çelik 2006). Proteazlar ayrıca pişirme süreçlerinde de kullanılmaktadırlar. Proteazlar, proteoliz tepkimesiyle un içindeki gluteni zayıflatarak hamur oluşumunu arttırmakta ve oluşan hamurun yumuşak olmasını sağlamaktadır. Ayrıca proteazlar kuş tüyü, boynuz, tırnak gibi keratin içeren yapıları parçalayarak proteinli hayvan yem katkı maddesi üretiminde kullanılırlar. Kaliteli protein içeriklerinden kaynaklı soya fasülyeleri yüzyıllardır besin olarak tüketilmektedir. Soya ürünü ve sosu hazırlamaktadır proteazlar kullanılmaktadır. Gıda alanında kullanılan en önemli proteaz enzimlerinden biriside papaindir. Biranın soğukta saklanması ve etin yumuşatılmasında kullanılmasıyla iki önemli uygulama alanına sahiptir. Proteaz enzimleri ayrıca yağ eldesinde de kullanılmaktadır. Nijerya kavun çekirdeği %50 oranında protein, %30 oranında yağ içermekte fakat yağın tamamı bilinen geleneksel yöntemlerle elde edilememektedir. Bu çekirdeklere proteaz enzimleri uygulandığında ise yağ eldesi önemli derecede artış göstermektedir (Çelik 2006). Besin eldesinde kullanılan proteazların kullanıldığı en önemli sektörlerden biriside peynir yapımıdır. Proteazlar, peynir yapımında önemli fonksiyona sahiptir. Belli peptid bağlarını p-k-kazein ve makro peptidlere hidrolizlerler. 1979 yılında immobilize alkalın proteazın peynir üretiminde kullanıldığı bildirilmiştir (Ohmiya ve ark. 1979). Whey adı verilen önemli bir yan ürün peynir yapımında ortaya çıkmaktadır. Proteaz enzimi biyokonversiyon işlemi sırasında whey'i protein hidrolizatlara dönüştürmektedir. (Perea ve ark. 1993).

### **2.6.2.Fotoğraf Endüstrisi**

Alkalın proteazların kullanılması fotoğrafik ve röntgen filmlerinden gümüşün geri kazanımı için kritik bir rol oynar. Atık haldeki bu filmlerde bulunan jelatin katmanında ağırlık olarak %1,5-2 oranında gümüş bulunmaktadır. Eski yöntemlerde gümüşün geri eldesi için filmler yakıldığından dolayı bu yöntemler çevreye zarar vermektedir. Ayrıca filmin ana materyali olan polyester maddesi bu yöntemde yanmakta ve geri kazanılamamaktaydı. Gümüş, jelatine bağlı bulunduğu bu jelatin katmanından proteolitik enzimler kullanılarak geri kazanımı mümkün olmuştur. Ayrıca

bu işlem sırasında polyester herhangi bir zarar görmediğinden, polyesterinde geri kazanımı mümkün olmuştur. Ishikawa ve ark. (1993) *Bacillus* sp. B21-2 suşundan elde ettikleri alkalın proteazının röntgen filmlerindeki gümüş partiküllerini geri kazanmak için jelatin katmanın hidroliz işlemine kullanıldığını bildirmişlerdir. Fujiwara ve ark. (1991) *B. subtilis*'ten elde edilen proteazının 50-60 °C sıcaklıkta ve 30 dakika içerisinde gümüş parçacıkları jelatinden uzaklaştırdığını bildirmişleridir. Singh ve ark. (1999) kullandıkları proteazla bu olayın 50 °C ve 12 dakika içerisinde gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir.

### 2.6.3. Tekstil Endüstrisinde Proteazlar

Tekstil endüstrisinde proteazlar, protein içeren ürünlerin enzimatik olarak ön terbiyesinde kullanılmaktadır. Kumaş üretiminde gerekli olan maddeler lifsi yapıdadırlar. İpek, angora, kaşmir doğal protein lifleridir (Duran ve ark. 2007). Protein içeren liflerin özelliklerini içerdikleri aminoasit miktarı, cinsi yerleşim şekilleri belirlemektedir. Bu özelliklerine dayanarak yün esaslı ürünler pronaz, pepsin ve papain gibi proteazlarla muamele edilerek esneklik ve doğal kirlerinden uzaklaştırılması sağlanır. Proteazların kullanıldığı işlemler kimyasal maddelerle yapılanlara göre daha az masraf getirmiş ve iyi sonuçlar vermiştir. (Karmakar 1999). İpeğinde tekstil materyali olarak kullanılabilmesi için proteazlarla muamele edilmesi gerekmektedir. Ham ipek kesiksiz ve ince protein esaslı bir maddedir. İçeriğinde fibrin ve serisin barındırmaktadır. Ham ipek'te bulunan %25 oranında serisin ipek ipliklerinin etrafını çevrelemektedir. İpeğe koruyuculuk sağlayan serisin denilen bu tabakanın ipeğin boyanmasından önce uzaklaştırılması gerekmektedir. Geleneksel yöntemlerde nişasta kullanılmakta ve ipe iplikleri çekilerek serisinden uzaklaştırılmaktadır. Ayrıca ham ipek ipliklerindeki ipek özünü yani serisini temizlemek amacıyla pişirme işlemide uygulanmaktadır. Geleneksel yöntemde sabun içeren alkalın ortamlarda pişirme işlemi yapılmaktadır (Kanehisa 2000). Ancak bu yöntemler pahalı ve ipeğe zarar veren yöntemlerdir. Bu nedenle boyama işleminin öncesinde enzimlerin kullanılması alternatif olarak ortaya atılmıştır (Puri 2001). Bununla birlikte, proteolitik enzimlerin kullanılması daha iyi bir yöntemdir, çünkü ipek özünü lifli proteine hasar vermeden temizler.

#### 2.6.4.Deri Endüstrisinde Kullanımı

Derilerin işleme süreçlerinde kullanılan hidrojen sülfid ve diğer kuvvetli kimyasallar çevre kirliliği oluşturması bakımından oldukça önemlidir. Günümüzde deri işleme süreçleri; ıslatma, sepileme, kireçlik, kireç giderme, sama ve kıl giderme gibi bazı adımlar içerir. Ancak bu işlemler sırasında yüksek miktarlarda kimyasal madde ve atık su ortaya çıkmaktadır. Bu gibi kimyasalların kullanımı yerine çevreci bir yaklaşım olan enzimatik yöntemler giderek daha çok tercih edilmektedir (Andersen 1998).

Deri endüstrisinin bu farklı aşamalarında farklı proteazlar kullanılmaktadır. Derinin ıslatılma aşamasında genellikle nötral proteazlar, kıllardan arındırılması aşamasında alkalın proteazlar ve yıkamada da asidik proteazlar kullanılmaktadır. (Nilegaonkar ve ark. 2007). Deri işleme sürecinin değişik aşamalarında ki özellikle kılların uzaklaştırılmasında zararlı kimyasalların yerine enzim kullanımı oluşan kirliliği %80-90 oranında azaltmaktadır. Endüstriyel bazda enzimatik tüy giderimi, genel olarak az miktarda kireç kullanılmasıyla tüy giderme verimini artırır ve tüy alma prosesinin maliyetini azaltır (Thanikaivelan ve ark. 2004). Son dönemlerde ise mikrobiyal alkalın proteazların kullanımıyla kireç gereksini azalmış ve tüy giderme süresini azaltmıştır. Alkalın proteazlar tüy giderme işlemini, tüy köklerinin genişlemesi ve bu sayede saç bezciğindeki proteinlere proteaz atağını kolaylaştırarak yapmaktadır (Gupta ve ark. 2002). Enzimatik süreçlerin kullanıldığı işlemler sadece çevre kirliliğinin önüne geçmez aynı zamanda yüksek kalitede ürünler oluşturur. Proteaz enzimlerinin kullanılmasıyla istenmeyen pigmentlerin uzaklaşması ve deri yüzeyinin genişletilmeside sağlanmaktadır. Gupta ve arkadaşları (2002) *B. subtilis* IIQDB32 suşundan elde ettikleri alkalın proteazıyla koyun derisindeki kılların uzaklaştırılabildiğini bildirmişlerdir.

Günümüzde, bakterilerden elde edilen proteazlar kimyasal maddelerin yerine temizleme ajanı olarak kullanılmaktadır. Hameed ve ark. (1999) *B. subtilis* k2 suşundan elde ettikleri alkalın proteazı deri işleme ve temizleme süreçlerinde kullanmıştır. Proteaz enzimleri aynı zamanda deri işleme sonucu oluşan artıkların işlenmesinde de yararlıdır. Dalev ve Simeonova (1992) deri endüstrisinde oluşan atıkların tam kullanımı için alkalın proteaz kullandıkları bir teknik geliştirmişlerdir.



### 2.6.5. Deterjan Endüstrisinde Kullanımı

Geçtiğimiz son 30 yılda deterjanlarda kullanılan proteazlar giderek önem kazanmış ve deterjanların anahtar bileşenleri haline gelmiştir. Proteazların çamaşır deterjanlarında ana bileşen haline geldiğinden beri proteaz enziminin toplam satışının %25 'i deterjan endüstrisine yöneliktir (Rao ve ark. 1998). Röhm ve Hass işlenmemiş pankreatik enzimi tripsini deterjanları Burnus'ta kullanmış ama deterjanın sahip olduğu yüksek alkalinite nedeniyle enzimden çok verim alınamamıştır. Alkali proteazlar çeşitli kaynaklardan elde edilse de (Singh ve ark. 2000), *Bacillus* cinsi bakteriler deterjan endüstrisinde en çok kullanılan mikroorganizmadır. Çeşitli ortamlardan izolasyonun kolay olması ve hem kompleks hem de sentetik ortamlarda üretilebilmeleri nedeniyle tercih edilmektedirler. Alkalifilik ve termofilik *Bacillus* tarafından üretilen proteaz enzimleri yüksek sıcaklık ve pH'lara dayanabilmektir. (Johnvesly ve Naik 2001). *Bacillus*'tan elde edilen alkaline proteaz olan subtilisin ilk olarak 1960'lı yıllarda deterjanlar içerisinde kullanılmaya başlamıştır. Bu yıllardan sonra maxacal ve purafect (Genencor), KAP (Kao), alkalaz ve savinaz (Novoenzim) ve balp (Henkle) gibi birçok yüksek alkaline enzim bulunmuştur. Fakat bulunan bu subtilinlerde ciddi bir problem ortaya çıkmıştır. Deterjanlarda kullanılacak enzimin oksitleme ajanı ve ağartıcı maddelerle beraber kararlılığını koruyabilmelidir. Bu sorunları bazı firmalar protein mühendisliğini kullanarak oksitlenmeyen aminoasitli Met kalıntılarıyla ortadan kaldırmıştır. Enzimlerin deterjanlarda kullanılması, yüksek verimlilik, çevreye zararın minimuma indirilmesi ve enerji tasarrufu gibi birçok avantaj sunmaktadır. Proteaz enzimi kontak lens ve protez dişlerin temizliğinden, gündelik çamaşırların temizlenmesine kadar bir ok deterjan için katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca alkaline proteazlar kullanıldıkları deterjanların kalitesini arttırmaktadır. Deterjan katkı maddesi olarak kullanılacak proteazlar belirli birçok kriter altında çalışabilmelidir bunlar; yüksek sıcaklık ve alkaline pH'larda etkin olmalı, deterjanlar içerisinde bulunan sürfaktan, sodyum hipoklorit ve oksitleyici ajanlarla deaktive olmamalıdır. Alkaline proteazının kararlılığı konusundaki önceki araştırmalar, *Bacillus calusii* 1-52'de yapılan bir araştırmada elde edilen proteazının %1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muameleden sonra %114 seviyelerine kadar aktivite gösterirken (Joo ve ark. 2003), *Vibrio fluvialis* VM10'dan elde edilen alkaline proteazı %4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muameleden sonra %132 aktivite ortaya koymuştur (Venugopal ve Saramma 2006). *Bacillus* sp. JB-99 (Johnvesly ve Naik 2001), *Bacillus* sp. L21 (Tari ve

ark. 2006), *Bacillus mojavensis* (Beg ve ark. 2003), *Bacillus* sp. L21 (Genckal ve ark. 2006), alkalofik *Bacillus* sp. 2-5 ve *Bacillus licheniformis* RP1 (Sellami-Kamoun ve ark. 2008) türlerinden elde edilen alkalın proteazların deterjan endüstrisi için kullanılabilir olduğu gösterilmiştir. Kullanılacak olan enzimin deterjan formülasyonuna uygun olup olmadığını kontrol amacıyla uygulanan testlerden birisi kan lekesinin çıkarabilmesidir. Akalifilik bir bakteri ve *Pseudomonas aeruginosa* PD100 türlerinden proteazların deterjan eksikliğinde pamuklu kıyafetlerden kan lekesini çıkarmak için kullanıldığını göstermektedir (Najafi ve ark. 2005).

#### **2.6.6.Endüstriyel ve Evsel Atıkların Yönetimi**

Dailey (1994) *B. Subtilis* elde edilen alkalın proteaz enzimi, kümes hayvanlarının beslendiği ve kesimhanelerinde oluşan tüy kirliliğinin giderilmesinde kullanmıştır. Atık tüyler kümes ağırlığının %5'ini oluştururken zengin keratin yapısı sayesinde proteazlarca tamamen parçalanarak yem katkı maddesi olarak kullanılabilir hale gelmiştir. Ayrıca *B. amyloliquefaciens* ve *Streptomyces* sp. gibi türlerden elde edilen proteaz enzimi, boruların tıkanmasına neden olan kılların parçalanmasında kullanılmıştır. Bu proteaz solüsyonu Genex firması tarafından patentlenmiştir (Jacobson ve ark. 1985).

#### **2.6.7.Sağlık Endüstrisi**

Proteazlar günümüzde sağlık endüstrisinde de kullanılmaktadır. *B. subtilis* 316M suşundan elde edilen proteazın elastolitik aktivitesini ortaya konmasıyla yatak yaraları, çıban, derin iltihapların ve yanığın tedavisinde kullanılabileceği açıklanmıştır (Kudrya ve Simonenko 1994). Kim ve arkadaşları (1996) *Bacillus* sp. CK 11-4 suşundan elde ettikleri alkali proteazın fibrinolitik aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuş ve trombolitik ajan olarak kullanmışlardır. *Aspergillus oryzae*'dan elde edilen proteazların ağız yoluyla alınmasıyla belirli litik enzim eksikliği sendromunu tedavi etmek için sindirim yardımcısı olarak kullanılmıştır (Rao ve ark. 1998).

## 2.7. Enzim İmmobilizasyonu ve Tarihi

İmmobilizasyon kelime anlamı olarak, sınırlama, hareketsiz hale getirmek şeklinde tanımlanabilmektedir. Enzimler immobilizasyonu, suda çözünebilir ve serbest halde bulunan enzim moleküllerinin, suda çözünmez katı bir destek materyali kullanılarak hareketinin sınırlandırılması olayıdır. Enzimler çözünmez katı taşıyıcılar içerisinde fiziksel veya kimyasal bağlarla bağlanabildiği gibi, diğer bir durumda enzimler serbest halde bulunur fakat destek materyalleriyle birlikte belirli bir bölgeye de hapsedilebilmektedirler. Bu yöntemler yalnızca, enzimler için değil aynı zamanda hücresel yapılara ve çeşitli hücrelere uygulanabilmektedir.

Nelsen ve Griffin (1916) odun kömürünün üzerine adsorplanmış maya invertazının sükröz şekerinin hidrolizini gerçekleştirebildiğini gözlemlemişlerdir. Bu yıldan sonra fizyolojik aktif proteinlerin kovalent bağlanma yoluyla çeşitli taşıyıcı materyaller üzerine immobilizasyonu üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Tüm bu çalışmalara rağmen 1953 yılında Schleith ve Grubhofer'ın diyastaz, pepsin, karboksipeptidaz ve ribonükleaz enzimlerini kovalent bağlanma yoluyla diazolanmış poliaminstiren reçinesi yüzeyine immobilize etmelerine kadar immobilizasyon işlemi kullanım alanı bulamamıştır. 1956 yılında Mitz adlı araştırmacı katalazın DEAE-selüloz üzerine iyonik bağlanma yöntemiyle immobilizasyon çalışmasını yayınlamıştır. Wan ve Bernfield 1963 yılında ribonükleaz, papain ve amilazı jel içerisinde tutuklamış. Richards ve Quijcho 1964 yılında karboksipeptidaz A enzimini çapraz bağlanma metoduyla enzim immobilizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Klinik uygulamalarda kullanılan karbonik anhidraz enzimi 1964 yılında Chang tarafından mikrokapsülasyon metoduyla immobilize edilmiş, bir diğer klinik uygulama alanı bulunan amiloglukosidaz Gregoriadis (1972) tarafından lipozomlar içerisinde immobilize edilmiştir. Enzim immobilizasyonu 1960'lı yıllarda çalışılmaya başlanmıştır. Immobilize enzimin endüstriyel kullanımına ilk kez 1969 yılında, Tanabe Seiyaku (Japonya) firması tarafından başlanmış olup, immobilize edilen aminoasilaz enzimi ile L-aminoasit üretimi gerçekleştirilmiştir. Chibata adlı araştırmacı 1969 yılında fungal kaynaklı aminoasilaz enzimini DEAE Sephadex kullanarak iyonik olarak immobilize etmiş, immobilize ettiği enzim ile N-acil-D, L aminoasitleri hidrolize etmiş, L-aminoasitlere ve N-acil-D aminoasitlere dönüştürerek immobilize enzimlerin endüstriyel uygulamalarda

kullanımında ilk başarılı isim olmuştur (Chibata ve ark. 1972). İmmobilize enzim ismi ilk olarak 1971 yılında düzenlenen Enzim Mühendisliği konferansında önerilmiş ve kabul görmüştür (Hartmeier 1988). Doğru immobilizasyon yöntemini belirlemek için bazı koşullar vardır. Bunlar; işlemin enzimin doğal aktivitesini bozmaması veya ona yakın tutması, enzimin kararlılığını etkilememesi, düşük maliyetli olması şeklinde sıralanabilir (Andreescu ve ark. 2006).

Enzimlerin endüstride kullanılması sırasında oluşan sorunlar, enzimlerin immobilize edilmesi sayesinde aşılabilmektedir. Endüstriyel uygulamaların çoğunluğunun sulu ortamlarda gerçekleşmesi nedeniyle enzimlerin immobilizasyon yoluyla kazanılması büyük bir avantaj sağlamaktadır. İmmobilize edilmemiş enzimler hem büyük bir maliyet doğurmakta hem de çevre açısından kirliliğe yol açmaktadır (Wiseman 1986). Enzimlerin kimyasal ve katalitik özelliklerini kaybetmeden immobilize edilmesi için birçok yöntem denenmektedir. Bu amaç doğrultusunda enzim için uygun immobilizasyon yöntemini belirlemede bazı şartlar bulunmaktadır.

Bunlar;

- İmmobilizasyon işlemi sonucu, immobilize enzimin aktivitesinin, doğal enzimin aktivitesine yakın değerler sergilemesi
- Biyomolekül kararlılığını sağlaması
- Düşük üretim maliyetine sahip olması (Andreescu vd. 2006).

İmmobilizasyon sayesinde enzimlerin oksitleyici maddeler, yüzey aktif maddeler ve yüksek sıcaklık gibi zor tepkime ortamlarından etkilenmeleri engellenebilir. Günümüzde yüzlerce enzim, İmmobilizasyon yoluyla gıda, deterjan, tekstil, ilaç sektöründe kullanılmaktadır. Birçok sektörde kullanım alanı bulan immobilize enzimlerin avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır.

Avantajları şu şekilde sıralanabilmektedir (Arıca 2000);

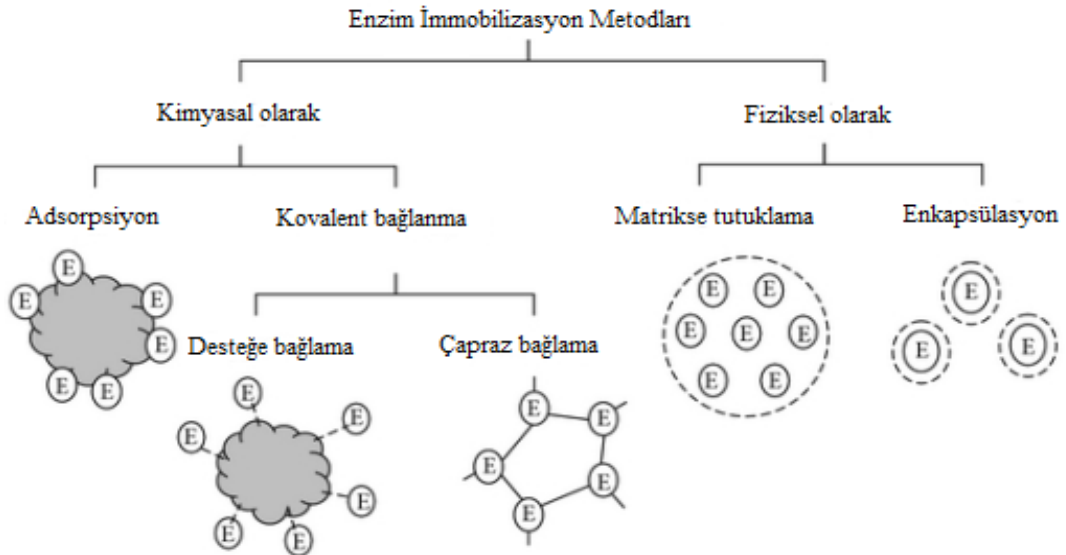
- Kesikli proseslerde kullanılabilirlik
- Elde edilen üründe enzimin bulunmaması
- Enzim fonksiyonlarının kontrolünün kolay olması
- Kirlenici atık sorunu en az düzeye indirmesi

- Enzimin kararlılığının artırılması
- Ürün eldesindeki maliyeti düşürülmesi

Bütün bu avantajlarının yanı sıra immobilizasyon işlemi sırasında enzimin doğal aktivitesinde kayıplar yaşanabilmektedir (Arıca 2000).

## 2.8. İmmobilizasyon Metotları

Günümüzde aktif olarak kullanılan enzim immobilizasyon yöntemleri Şekil 2.12’de gösterilmiş olup bu yöntemlerin kombinasyonlarının yapılması mümkündür. Günümüzde immobilizasyon tekniklerindeki gelişmeler sonucu sorunlara etkili ve çabuk çözümler sunabilmektedir fakat her bir enzim için kabul edilen genel bir metot bulunmamakta (Uhlig 1998) ve bu nedenle immobilizasyon işlemleri deneme yanılma yoluyla bulunmaktadır. Bu nedenle immobilizasyon süreçlerinde, kullanılacak enzimin kimyasal yapısının, substrat etkileşimlerinin ve ürünlerinin özellikleri dikkate alınmalıdır (Krajewska 2003). Bunların yanı sıra immobilizasyon işleminde, enzim bağlanma bölgesinde yer alan aktif grupların kimyasal yapısının değişmemesi ve aktivite kaybının gözlemlenmemesi veya en alt düzeyde olmasına dikkat edilmelidir.



Şekil 2. 12. İmmobilizasyon Metotları (Taher ve ark. 2011)

### **2.8.1. Adsorblanma Yoluyla İmmobilizasyon**

En basit ve en eski immobilizasyon yöntemi olan adsorblama iyonik ve fiziksel bağlanma olayına dayanmaktadır (Woodward 1985). Enzimlerin fiziksel olarak adsorpsiyonunda Van der Waals güçleri, hidrojen bağlanma ve hidrofobik etkileşimler, enzimin matrikse bağlanmasında önemlidir. Enzimin aktif bölgesinde bulunan kısımlar bu tarz bağlanmadan etkilenmez ve bu sayede enzim aktivitesini korumaya devam eder (Mulchandam ve ark. 1998). Bu yöntemde bağın kuvveti, reaksiyon şartlarındaki değişiklere kontrol edilebilmektedir. Kimyasal maddelerin kullanımına gerek kalmaması işlemin ılımlarda koşullarda yapılabilmesi, işlemin kolay olması ve aktivite kaybının en az düzeyde olması bu yöntemin avantajları olarak sayılabilir. Ayrıca yöntem, oluşturulan bağların kısmen zayıf olduğundan, bazı durumlarda enzimin destekten ayrılması ve reaksiyon ortamına karışması gibi dezavantajlara sahiptir (Pryakhin ve ark. 1977, Kumakura ve ark. 2003).

### **2.8.2 Kovalent Bağlanma Yoluyla İmmobilizasyon**

Kovalent bağlanma yoluyla enzimlerin immobilizasyonu, suda çözünmeyen aktifleştirilmiş taşıyıcı yüzey arasında kovalent bağ oluşturma esasına dayanmaktadır (Kennedy 1995). Bu yöntemin birçok avantajı bulunmaktadır. Enzim ve taşıyıcı yüzey arasında oluşturulan bağın kararlı ve sağlam olması neticesinde enzimin tepkime ortamına geçmesi engellenmiş olur. Bu yöntemde kovalent bağ oluşumu genellikle enzimin yüzeyinde bulunan aminoasit kalıntıları ve taşıyıcı yüzeyde bulunan fonksiyonel grup veya gruplar arasında meydana gelmektedir.

Kovalent bağlanma sırasında, enzimin aktif bölgesinin bu bağa katılmaması gerekmektedir. Bu nedenle bağlanma sırasında çözeltiliye enzim inhibitörleri eklenir. Oluşturulan bağın uzunluğu kısa tutulduğunda ve sayısının fazla olması durumunda enzim sertliği artmaktadır. Bu tarz kovalent bağlanma yolunda, enzimin kararlılığı arttığı için, enzim pH, sıcaklık ve çözücülere karşı kararlı artmaktadır (Mateo ve ark. 2007).

### **2.8.2.1. İyonik bağlanma yoluyla immobilizasyon**

Bu yöntem basit ve geri dönüştürülebilirdir. Fakat genellikle enzimin hem aktifliğini koruduğu hemde enzimin güçlü bağ kurabileceği koşulları sağlamak güçtür. Kovalent olmayan immobilizasyon yönteminin doğası gereği süreç, sıcaklık, polarite ve iyonik kuvvetlerin değiştirilmesiyle tersine döndürülebilmektedir. Yöntemdeki başarı genel olarak enzimin güçlü bağlandığı ve aktif formda kaldığı koşullar tespit edildiğinde sağlanır. Substat ve oluşan ürünler yüklü olduğu durumda, yüklü taşıyıcıların kullanılması, difüzyon ve dağılma nedeniyle kinetiğin bozulması sorun teşkil edebilir. (Goldman ve ark. 1968, Goldstein 1972).

### **2.8.2.2. Çapraz bağlama yoluyla immobilizasyon**

Çapraz bağlama yoluyla immobilizasyon, iki veya daha çok fonksiyonlu reaktiflerin aracılığında enzimlerin ya da bunların arasındaki aktif moleküller arasında kovalent bağlar oluşturma esasına dayanmaktadır (Eldin 2000, Albayrak ve ark. 2002). Yöntemde kullanılan fonksiyonlu bağlama reaktifleri, glutaraldehid, glutardialdehid heksametilen, diizosiyanat, tolüen gibi maddelerden seçilebilmektedir.

### **2.8.3. Matrikse Tutuklama Yoluyla İmmobilizasyon**

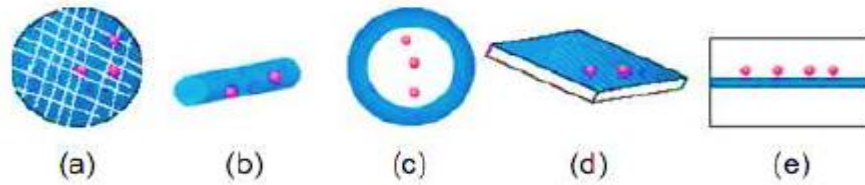
Matrikse tutuklama yoluyla immobilizasyon, enzimin genellikle sol-jel ya da organik polimer içerisine fiziksel olarak yerleştirilmesine dayanır (Bickerstaff 1991, Sheldon 2010). Bu yöntem adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yolundan farklıdır, enzim çözelti içerisinde serbest halde bulunur, fakat taşıyıcı yapının içerisinde hareketsiz olarak bulunmaktadır. Taşıyıcı materyalin gözenekleri enzimin dışarıya çıkmasını engelleyecek kadar küçük fakat substratın ve reaksiyon ile oluşan ürünün hareket etmesine izin verecek boyutta olmalıdır. (Bickerstaff 1997).

#### 2.8.4. Enkapsülasyon Yoluyla İmmobilizasyon

Bu yöntemde enzimler küresel şekile sahip, yarı geçirgen membranlar içerisinde tutuklanmaktadır. Yarı geçirgen yapıdaki membran, büyük molekül ağırlığına sahip protein ya da enzimin mikrokapsül dışarısına çıkışını engellerken, daha küçük boyuttaki substrat ve ürünün dışarıya çıkışına izin verir. Mikrokapsülleme yöntemiyle büyük yüzey-hacim oranına ulaşıldığından, mikrokapsül içerisindeki enzim-substrat reaksiyonunda artış meydana gelir (Chang 1976).

#### 2.9. İmmobilizasyonda Destek Materyalinin Seçimi

Enzimler, lifler, boncuklar, filmler, membranlar veya kapalı kapsüller gibi birçok değişik matriks yüzeyine immobilize edilebilirler (Twyman 2005), (Şekil 2.13). İmmobilizasyonda seçilecek olan destek materyali, hem organik hemde inorganik yapıda olabilmektedir. İmmobilizasyon işleminde kullanılacak destek materyalinde birkaç özellik aranmaktadır. Bunların başında, suda çözünmeme, mekanik stabilite, ucuzluk, termal kararlılık ve zehirsizlik gelmektedir (Gloger 1981).

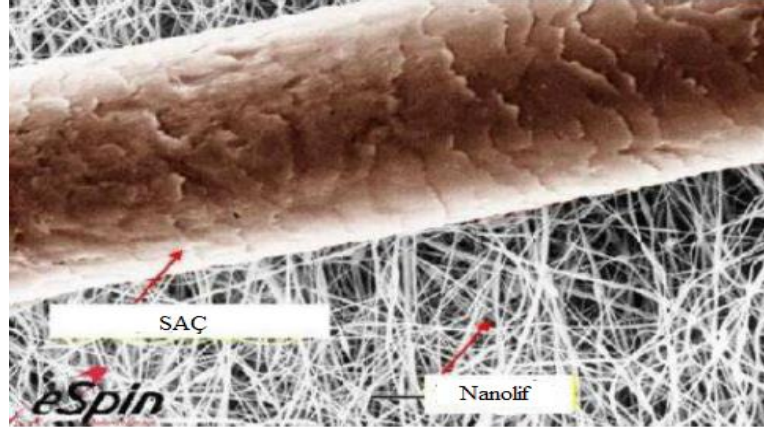


**Şekil 2. 13.** Enzim taşıyıcı yüzeyleri; a. boncuk, b. nanolif, c. kapsül, d. film e. membran (Twyman 2005).

#### 2.10. Polimer Nanolifler

Genellikle 1  $\mu\text{m}$ ' den daha küçük çapa sahip, ipliksi bir formda olan nano malzemeler nanolif olarak adlandırılmaktadırlar. Sahip oldukları yüksek gözenek ve küçük gözenek sayısı, geniş yüzey alanı gibi özellikler neticesinde nanolifler birçok sektörde kullanım bulur (Li ve ark. 2010). Şekil 2.14'te insan saçıyla nanolifler arasındaki boyut karşılaştırılması verilmiştir.





**Şekil 2. 14.** İnsan saçı ve nanoliflerin boyutlarının karşılaştırılması (Anonim 2009)

### **2.10.1. Polimer Nanolif Üretim Yöntemleri**

Nanolifler günümüzde, meltblowing, fibrilasyon, bikomponent, spunbond ve elektro çekim adı verilen yöntemleriyle üretilmektedir. (Celep 2007).

#### **2.10.1.1. Meltblowing (Eriyik Üfleme) yöntemi ile nanolif üretimi**

Nanoliflerin üretiminde kullanılan en yaygın tekniklerden birisi Meltblowing tekniğidir (Şafak 2012). Yöntemde herhangi bir çözücü kullanılmadığı için sentetik lif üretmek için kullanılan yöntemlerinden en basit olanıdır (Koç 2004). Yöntem 1930'lu yıllarda poliamid 6 ve poliamid 6.6 polimerlerinden nanolif üretmek için geliştirilmiştir (Rangkupan 2002). Meltblowing yönteminde katı halde olan polimer ekstruderde eritilip filtrasyon işleminden sonra düzenekten fişkırtılır ve hava üflemesiyle inceltir.

#### **2.10.1.2. Fibrilasyon ile nanolif üretimi**

Nanolif üretmek için kullanılan bir diğer yöntemde, selüloz gibi lineer yapıya sahip fibrillerden nano boyutta lifler halinde fibrilasyonudur (Senol ve ark. 2005). Farklı çözücülerin yöntemde kullanılması, jelleşme, çözünme ve nano gözenekli köpük oluşturma maksadıyla kurutmayı içermektedir ve bütün bu işlemler uzun zaman almaktadır.

### **2.10.1.3. Bikomponent lifler yolu ile nanolif üretimi**

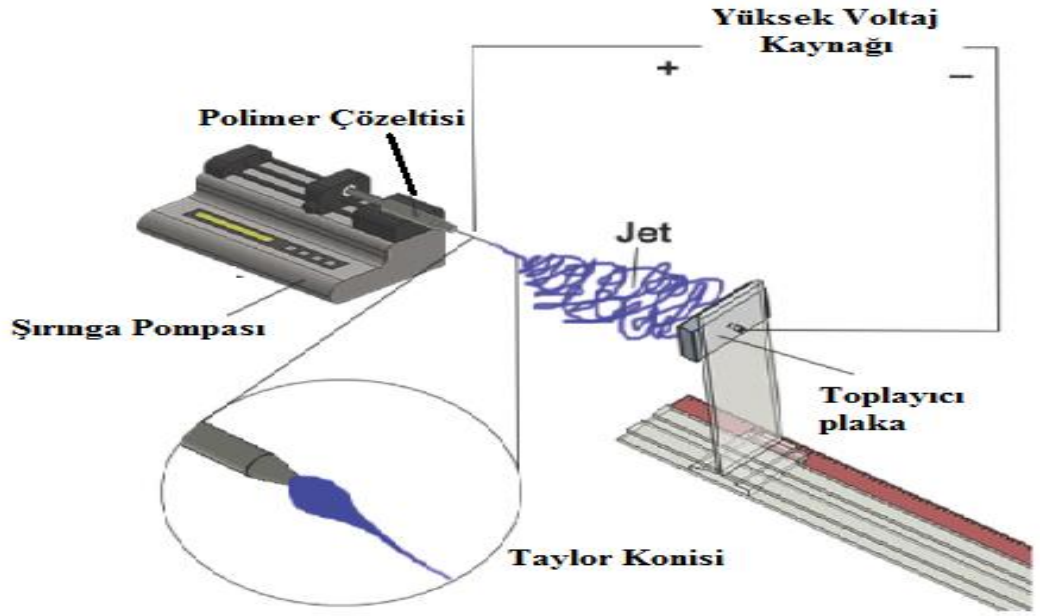
Aynı lif üzerinde bulunacak olan iki farklı polimerin aynı düzeden geçirilerek elde edilen lifler, bikomponent lif olarak tanımlanabilir. Bu yöntemle üretilen lifler genellikle kesit şekillere göre; yan yana, iç içe, denizde adacık veya dilimli pasta bikomponent lif olarak ayrılmaktadır (Kikutani ve ark. 1996).

### **2.10.1.4. Spunbond yöntemi ile nanolif üretimi**

Kullanılan hava hacmi ve sıcaklık gibi temel farklılıklara, Meltblowing yönteminden ayrılmakla beraber meltblowing yöntemine çok benzemektedir. Meltblowing yönteminden bir diğer farklı yönü ise germe işleminin polimer soğuyup katılaştığında uygulanmasıdır. Bu nedenle spunbond yöntemiyle üretilen nanolifler, meltblowing yöntemine göre daha kalındır (Celep 2007).

### **2.10.1.5. Elektro çekimle polimer nanolif üretimi**

Özellikle maliyet, nanolif çapının istenilen boyutta üretilebilmesi ve ticari olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olması, düzeneğin basit olması ve proses parametrelerinde değişiklik yapılabilmesi, elektro çekim yöntemini mevcut diğer nanolif üretime üstün kılmaktadır. Bu nedenlerle elektro çekim yöntemi polimer bazlı nanolif üretim yöntemlerinin en etkin olarak kullanılan yöntemidir. Sistem basit bir şekilde tarif edilecek olursa, yüksek gerilim sağlayan bir güç kaynağı, metal bir uca sahip şırınga ve nanoliflerin toplanacağı topraklanmış bir yüzeyden meydana gelmektedir. Elektro çekim yönteminde (şekil 2.15), bir pompa yardımıyla şırınga içerisindeki polimer akışkanı iğne ucuna gönderilir.



**Şekil 2. 15.** Elektro çekim yöntemiyle nanolif üretiminin ve Taylor konisinin şematik gösterimi (Barraza ve ark. 2015).

Elektrot bağlanmış iğne ucuna yüksek gerilimli güç kaynağından yüksek gerilim uygulanır. Uygulanan bu yüksek voltaj kritik bir seviyeye geldiğinde, şırınga ucundaki polimer damlasında jet oluşumu meydana gelir ki buna Taylor konisi (şekil 2.17) adı verilmektedir. Oluşturulan bu polimer jeti, topraklanmış zemine yani daha düşük potansiyeldeki bölgeye doğru yönelir. Yöntemde çözücü kullanılmışsa artan hız ve voltajdan kaynaklı buharlaşır. Çözücüsü buharlaşan polimer lineer bir yapıda nanolif toplayıcı zemin üzerinde toplanır (Dalton ve ark. 2005, Teo ve ark. 2007, Li ve ark. 2008).

### **2.11. Elektro çekim yönteminde etkili parametreler**

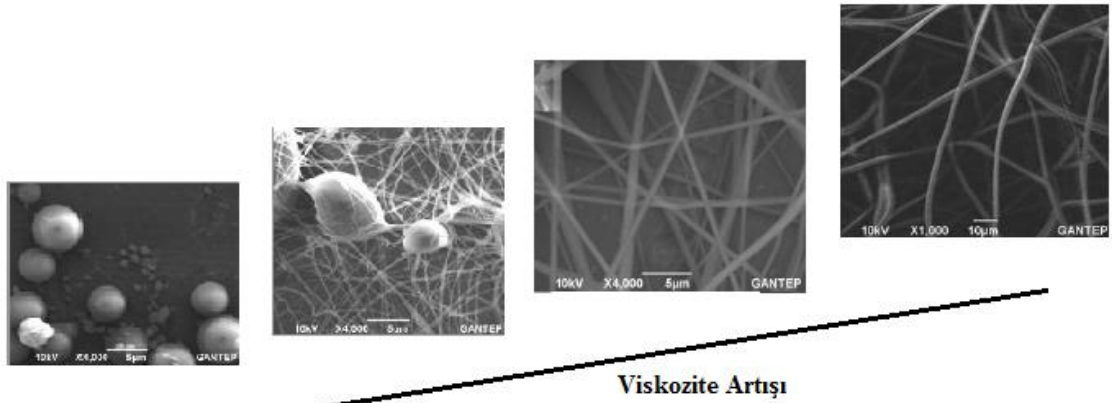
Elektro çekim yönteminde sistemi üzerinde etkili olan parametrelerin başlıcası polimer çözeltisine ait olmakla birlikte, sistem üzerinde çevresel ve proses parametreleride etkili olmaktadır (Lyons ve ark. 2004).

### 2.11.1. Polimer çözeltisi parametreleri

Elektro çekim yönteminde kullanılmak üzere seçilen polimer için uygun olan çözücü kullanılmalı, çözücü kullanılmadığı durumlarda sıcaklık etkisi kullanılmalıdır. Çözücü ve sıcaklığın etkisiyle polimer akışkan bir hale getirilmelidir. Polimer çözeltisinin sahip olduğu içerik ve özellik elektro çekim sırasında oluşturulacak nanolifin yapısında değişikliklere neden olabilmektedir.

#### 2.11.1.1. Konsantrasyon ve viskozite

Kullanılan çözeltinin viskozitesi azdan çoğa doğru gittikçe nanolif çapıda paralel olarak artmaktadır. Çözeltinin viskozitesi artırılmak istendiğinde polimer konsantrasyonu artırılmaktadır. Konsantrasyonun artmasıyla birlikte oluşan zincirli yapılar birbirinden kopmadan topraklanmış yüzey üzerinde nananolif olarak toplanır. Konsantrasyon artışı ve buna bağlı viskozitenin artması şırıngadan polimerin geçişini zorlaştıracak için istenmeyen bir durumdur (Zhong ve ark., 2002). Fakat çözeltinin viskozitesinin az olmasında nanolif oluşumunu olumsuz etkileyip boncuk sayısını arttırmaktadır (şekil 2.16). Bu nedenle oluşturulmak istenen nanolif çapı viskoziteyle yakından ilişkilidir. (Baumgarten 1971, Fong ve ark. 1999, Megelski ve ark. 2002).



Şekil 2. 16. Polimerin viskozitesiyle ilişkili boncuk oluşumu (İçoğlu 2014)

### **2.11.1.2. Çözeltinin Elektriksel İletkenliği**

Polimerler genel olarak iletken maddeler olup, yalnızca birkaç dielektrik materyal iletken değildir. Jet oluşumunda polimer çözeltisi içerisindeki iyon yüklerinin etkisi büyüktür (Subbiah ve ark 2005). Çözeltinin elektriksel iletkenliğinin yüksek olduğu durumlarda elektro çekimle üretilen nanoliflerin çapı ciddi oranlarda düşerken, iletkenliğin düşük olduğu durumlarda jetteki uzamanın yetersiz olması nedeniyle liflerde düzgün olmayan ve boncuk yapıları ortaya çıkmaktadır. Genel olarak elektro çekim nanoliflerin elektriksel iletkenliği yüksek olmasından kaynaklı nanolif çapı küçük olmaktadır (Bhardwaj 2010).

### **2.11.1.3. Yüzey gerilimi**

Yüzey gerilimi, çözeltinin birim kütlesindeki yüzey alanını azaltmaktadır. Elektro çekim işleminin en başında yapılması gereken elektriksel yüke sahip polimer çözeltisinin yüzey geriliminin azaltılmasıdır. Yüzey gerilimi, jet oluşturulduktan sonra boncuk oluşturan bir parametredir. Yüzey gerilim katsayısının düşürülmesiyle daha ince filamentler elde edilir (Celep 2007).

### **2.11.1.4. Çözücünün dielektrik etkisi**

Elektro çekim yönteminde kullanılan çözücü maddelerin dielektrik katsayıları, oluşturulan nanolif çapı üzerinde önemli bir etkidir. Genel olarak yüksek dielektrik özelliğe sahip çözeltiler, boncuk ve nanolif çapını azaltmaktadır. (Son ve ark. 2004). Dielektrik katsayısını arttırmak ve bu sayede boncuksuz, düşük nanolif elde etmek amacıyla çözeltilere N, N-dimetilformamid (DMF) gibi çözücüler eklenebilmektedir.

### **2.11.1.5. Molekül ağırlığı**

Moleküler ağırlık oluşturulmak istenen çözeltinin viskozitesini etkilemektedir. Moleküler ağırlık arttıkça oluşturulan çözeltinin viskoziteside artmaktadır. Elektro çekim yönteminde kullanılacak çözeltinin moleküler ağırlığı ve viskozite bu nedenle

önemli bir parametredir. Molekül ağırlığı arttıkça viskozitenin yanında zincir uzunluğuda artmaktadır. Uzun zincirlerin birbirine tutunması güçleşmektedir. (Buchko ve ark. 1999).

## **2.11.2. Proses Parametreleri**

### **2.11.2.1. Besleme hızı**

Uygulanacak voltaj için belirli bir debi miktarı bulunmaktadır. Besleme hızı, elektro çekim yöntemine gönderilen polimer çözelti miktarını belirlemektedir. Besleme hızındaki artış liflerin kalın olmasına ve boncukların büyümesine sebep olmaktadır. Bu nedenle eşit dağılımlı bir çap ve aralıksız nanolif üretimi için optimum debi hızı ayarlanmalıdır (Andray 2008).

### **2.11.2.2. Toplayıcı plaka ve düze arası mesafe**

Toplayıcı plaka ve düze arası mesafe lif yapısını etkileyen bir diğer parametredir. Elektro çekim yönteminde, toplayıcı plaka ve düze arası mesafe elektriksel alan ve uçuş süresini etkilemektedir. (Kireççi ve ark. 2012). Düze ve plaka arası mesafenin kısa olması uçuş süresini azaltmaktadır. Bunun nedeni mesafe kısa tutulduğu zaman elektriksel alan şiddetide artmakta ve jet daha da hızlanmaktadır Uçuş süresi kısaldıkça çözücünün buharlaşması için gerekli süre elde edilememektedir. Çözücünün uzaklaşmaması ıslak liflerin oluşturur.

### **2.11.2.3. Düze iç çapı**

Düze iç çapı küçüldükçe nanolif çapıda düşmektedir. İç çap küçüldükçe iğne ucunda oluşan damlacık daha küçük olacağından, damlacığın sahip olduğu yüzey gerilimi artar. Jetin uçuş süresi artar ve gerildiği süre arttığından daha ince lifler oluşur. Ancak düze iç çapı çok küçük olduğu durumda çözeltinin püskürtülmesi zorlaşmakta ve tıkanmalara yol açmaktadır ayrıca boncuk oluşumuda artmaktadır.

#### **2.11.2.4. Voltaj**

Elektro çekim yönteminde voltajın artması ile birlikte yüklenen gerilimde artmaktadır. Bu durum nanolif çapını küçültmektedir. Genellikle elektrik kaynağı olarak DC güç kaynağı kullanılmaktadır. AC güç kaynaklarında üretilen nanolif çapları DC güç kaynaklarıyla elde edilenlere göre daha fazla olmaktadır (Andray 2008).

#### **2.11.2.5. Toplayıcı plaka cinsi**

Elektro çekim yönteminin prensibi gereği besleme ünitesi ile toplayıcı arasında bir elektriksel alan olmalıdır. Bu elektriksel alanı sağlamak amacıyla genellikle toplayıcı plaka olarak alüminyum folya gibi iletken bir madde kullanılır. Bu materyal elektriksel olarak topraklanarak stabil bir potansiyel fark oluşturulur (Andray 2008). Toplayıcı plakanın hareketli olup olmaması, materyali ve sahip olduğu şekil nanoliflerin yapısını etkilemektedir.

#### **2.11.3. Ortam parametreleri**

##### **2.11.3.1. Sıcaklık**

Yüksek sıcaklıklar çözücünün işlem sırasında buharlaşmasını hızlandıracağından elektro çekim yönteminde hızlanmaktadır. Yüksek sıcaklık ayrıca viskoziteyi azaltacağından daha ince nanolifler ortaya çıkarmaktadır. (Celep 2007, Dinç 2013).

##### **2.11.3.2. Nem ve atmosfer koşulları**

Ortam nemi arttığında lif üzerinde küçük dairesel gözenekler ortaya çıkmakta, artış çok fazla olduğunda oluşan bu gözenekler birleşerek daha büyük gözeneklere yol açmaktadır. Elektro çekim işlemi atmosfer basıncında yapıldığında jet oluşumunda karasızlıklar olabilmektedir (Bhardwaj 2010, Dinç 2013).

### **2.11.3.3. Elektrik alanı**

Elektrik alanı etkisinde kalan parçacığa etki eden beş adet kuvvet vardır. Bunlar; itme kuvveti, yüzey gerilimi kuvveti, elektrik kuvveti, viskoelastik kuvvet ve yerçekim kuvvetidir.

### **2.12. Nanoliflerle Enzim İmmobilizasyonu**

Elektro çekim yöntemiyle üretilmiş nanoliflerin yüzey alanları çok büyük olduğundan kullanılan cihazın verimliliğinde artış amacıyla birçok yöntem kullanılmaktadır. (Whang ve ark. 2009, Aykut 2012). İmmobilize edilen enzimlerin aktiviteleri ve stabiliteleri artış gösterdiğinden yöntemin avantajlı olduğu bildirilmiştir (Demirkan ve ark. 2011). Elektro çekimle üretilen nanolif yüzeyine enzimlerin immobilizasyonu bahsedilen bu avantajları daha da arttırmakta çünkü yüzey alanı fazla olduğundan daha çok sayıda enzim molekülü yüzeye immobilize edilebilmektedir.



### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

Bu çalışmada, Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvar'ında daha önceden proteaz enzimi üretimi için topraktan izole edilmiş (TÜBİTAK Hızlı Destek programı 113Z868 no'lu proje) ve yeni adlandırılmış olan *Bacillus subtilis* E6-5 şuşundan elde edilen proteaz enzimi ile ORBA Biyokimya (İstanbul)'dan temin edilen ticari proteaz enzimleri kullanılmıştır. İmmobilizasyonda nanolif yüzey elde edilmesi amacıyla Poliamid 6 (PA6) ve Glisin, Glutamik asit ve Tirozin aminoasitleri ve Glutaraldehit (GA) materyal olarak kullanılmıştır.

#### **3. 2. Yöntem**

##### **3.2.1 Bakteri Üretiminde Kullanılan Besiyerleri ve Bakteri Üretim Koşulları**

Çalışmada kullanılan ticari olmayan enzimin üretildiği bakterinin saklanması (kültür saklama), geliştirilmesi (öninkübasyon) ve enzim üretim kapasitelerinin ölçülmesinde farklı içerikli besiyerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Tüm besiyerleri pH'ları 7.0'ye ayarlandıktan sonra 121 °C'de 15 dk. süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

Çizelge 3. 1. Bakterinin saklanması, geliştirilmesi ve enzim üretim kapasitelerinin ölçülmesinde kullanılan besiyerleri (Sevinç 2010)

İçerik (%g)	Kültür Saklama Besiyeri (Sevinç 2010)	Bakteri Geliştirme Besiyeri (Sevinç 2010)	Enzim Üretim Besiyeri (Qadar ve ark.2009)
Nutrient Broth	0.8	0.8	-
NaCl	0.8	-	-
Agar	2.0	-	-
Glukoz	-	-	0.1
Pepton	-	-	1.0
Maya özütü	-	-	0.002
MgSO <sub>4</sub>	-	-	0.01
CaCl <sub>2</sub>	-	-	0.01
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	0.05
pH	7.0	7.0	7.0

Kültür saklama ortamından alınan *Bacillus* sp. kültürü 18 saat boyunca öninkübasyona bırakılmış bu süre sonunda bakteri kültürünün optik yoğunluğu (OD) 600 nm’de spektrofotometrede ölçülerek fizyolojik tuzlu su yardımıyla 0.3 ‘e ayarlanmıştır.

Bu şekilde ayarlanan kültürden, içerisinde 250 mL enzim üretim ortamı bulunan 1000 mL’lik 4 erlene % 1 oranında aşılınmış ve 37 °C’de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 48 saat boyunca besiyerinde inkübe edilmiştir. Üretim sonucunda besiyerini 6000 devir/dakika’da 15 dakika santrifüjlenerek enzim içeren süpernatant kısım peletten ayrılmıştır. Süpernatant kısmı liyofilizasyon için kullanılmıştır.

### 3.2.2. *Bacillus subtilis* E6-5 şuşundan elde edilen proteaz enziminin liyofilize edilmesi

Temel besiyerinde 1000 ml üretim sonucunda elde edilen ham enzim ekstratı -20°C’de bir gece bekletilmiştir. Dondurulmuş örnekler liyofilizatör (CHRIST Alpha 2-4 LD plus) kullanılarak liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon işlemi -55°C’de yapılmış ve enzim örneğinin toz haline getirilmesi sağlanmıştır. Toz örnekler saf suda (20 ml’de) çözünerek immobilizasyon için kullanıma hazır hale getirilmiştir.

### 3.2.3. Elektro çekim yöntemiyle polimer nanoliflerin üretimi

PA6, PA6/glisin, PA6/glutamik asit, PA/tirozin formik asit içerisinde uygun konsantrasyonlarda laboratuvar koşullarında çözdürülerek solüsyon hazırlanmıştır.

Şekil 2.15'ten de görüldüğü gibi hazırlanan elektro çekim solüsyonu iletken bir borudan kontrollü bir şekilde akıtılmış ve bu iletken boruya yüksek miktarda elektrik akımı uygulanmıştır.

İletken borunun tam karşısına belirli bir mesafede topraklanmış bir iletken plaka yerleştirilmiştir, iletken boruya yüksek voltaj uygulandığı için bu iletken borudan topraklanmış plakaya doğru bir elektrik alanı oluşturulmuştur. İletken borunun içerisinden akmakta olan solüsyon damlacığı bu elektrik alanı boyunca iletken borudan topraklanmış plakaya doğru fırlar ve plakaya ulaşınca kadar kat ettiği yol boyunca uzar ve topraklanmış plaka üzerinde nanolif formunda toplanmıştır. Solüsyon içerisindeki komponentlere göre hibrit nanolif yapısı oluşur. Diğer taraftan solüsyon içerisindeki solvent yol boyunca uzamadan dolayı buharlaştırılmış ve uzayan polimer solüsyonundan uzaklaştırılmıştır. Böylece sadece kuru polimer nanolif formunda plaka üzerinde toplanmıştır. Bu çalışmada alifatik zincirli, polar olmayan bir aminoasit olan Glisin aromatik zincirli, polar bir aminoasit olan Tirozin ve asidik yan zincire sahip Glutamik asit aminoasitleri kullanılmıştır. Bu aminoasitler (Glisin, Tirozin ve Glutamik asit) elektrospinning çözeltisi içerisine eklenerek PA6 ile homojen bir özelti hazırlanması sağlanmıştır. Böylece elde edilecek PA6 nanoliflerin içerisinde eklenen aminoasitlerde mevcut olması sağlanmıştır. Elde edilen nanoliflerin taramalı elektron mikroskobu ile morfoloji analizleri yapılmıştır.

### 3.2.4 Aminoasit Yüklü Poliamid 6 (PA6) Nanoliflerle Enzim İmmobilizasyonu

Glisin, tirozin, glutamik asit yüklü PA6 nanolifler elektro çekim yöntemiyle üretilmiştir. Proteaz enzimlerinin fiziksel adsorpsiyon metoduyla üretilen nanolifler yüzeyine tutunması sağlanmıştır. Enzimlerin tekrar kullanılabilirliği test edilerek yorumlanmıştır. Saf PA6 nanolif üretimi için üretiminde %15 w/w PA6 polimeri formik asit içerisinde laboratuvar koşullarında manyetik karıştırma yöntemiyle çözdürülerek elektro çekim

solüsyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyon içerisinde polimer miktarını referans olarak %20 w/w glisin, tirozin, glutamik asit katılarak homojen solüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyonlar elektro çekim işlemine tabi tutularak nanolifler üretilmiştir.

### **3.2.5. Nanoliflerin karakterizasyonu üretilen nanoliflerin morfoloji analizleri**

Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) analizleri, SEM–Zeiss evo 40 (Thermionic elektron tabancalı) marka elektron mikroskopunda yapılmıştır. Nanoliflere SEM analizinden önce Bal-Tec SCD005 cihazı ile yüzeyde iletkenlik sağlanması için altın-paladyum (Au-Pd) kaplaması yapılmıştır. Lif çapları büyük olan nanoliflerin morfolojik analizleri optik mikroskopla da yapılmıştır. Elektro çekim çözeltilerinin viskozite analizleri Anton Paar /MCR 302 cihazıyla yapılmıştır.

### **3.2.6. Liyofilize ve ticari enzimin aminoasit içeren nanolifler üzerine immobilizasyonu**

Deneylerde kullanılan enzimler nanolif yüzeyine iki farklı şekilde immobilize edilmiştir. Birinci immobilizasyon şeklinde 1 ml enzim solüsyonları (liyofilize enzim 246 IU/ml, ticari enzim 82.300 IU/ml) yüzeyine direkt olarak damlatılmış, fiziksel adsorbsiyon metoduyla enzimlerin nanolif yüzeyine immobilizasyonu sağlanmıştır. İkinci yöntemde ise nanolif yüzeylere önce suyla seyreltilmiş gluteraldehit ile aktive edilmiş ve hemen ardından 1 ml enzim solüsyonları yüzeye damlatılmıştır. Her iki yöntemden sonra immobilize enzimler 12 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra enzim aktivite deneyleri yapılmıştır.

### **3.2.7. Enzim aktivite tayini**

Proteaz enzim tayini Anson tarafından önerilen yöntemin bir modifikasyonu ile yapılmıştır (Keay ve Wildi 1970).

Proteaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, substrat olarak %2'lik kazein çözeltisi kullanılmıştır. 2 gram kazein 20 mL 0.1 M NaOH içerisinde tamamen çözülünceye

kadar sürekli karıştırılarak ısıtılmıştır. Bu şekilde hazırlanan kazein çözeltisinin hacmi 0.05 M fosfat tamponu (pH 7.0) ile 100 mL'ye tamamlanmış ve pH'sı 1/3 oranında seyreltilmiş fosforik asit ile 7.0'ye ayarlanmıştır.

Deneylerde 1 adet kör tüp ve her bir enzim örneği (*Bacillus proteazı* ve ticari proteaz) için 2 adet örnek tüpü kullanılmıştır. Her iki örnek tüpüne 1'er mL substrat çözeltisi, kör tüpüne ise 2 mL Triklor asetik asit (TCA) çözeltisi aktarılmış ve tüpler 37°C'lik su banyosunda 10 dakika bekletilerek reaksiyon sıcaklığına getirilmiştir. Daha sonra substrat içeren tüplere 1'er gr immobilize enzim içeren nanolif, kör tüpe ise 1 mL fosfat tamponu (pH 7.0) ilave edilerek 37°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda nanolifler uzaklaştırılmış ve örnek tüpler içerisine 2 mL 0.4 M TCA çözeltisi konarak durdurulmuştur. Kör tüpüne ise 1 mL substrat eklenmiştir. Bu karışım, 37°C'de 20 dakika bekletildikten sonra oluşan pütürlü yapıyı gidermek için 6000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant kısmından alınan 1 mL'lik örneklere, 5 mL 0.4 M NaCO<sub>3</sub> ve 1 mL 1/3 oranında seyreltilmiş folin çözeltisi eklenmiş, karışım vortekslendikten sonra 20 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta bekletilmiştir. Bu süre sonunda çözeltinin optik yoğunluğu, enzim aktivitesinin belirlenmesi için 660 nm'de köre karşı okunmuştur.

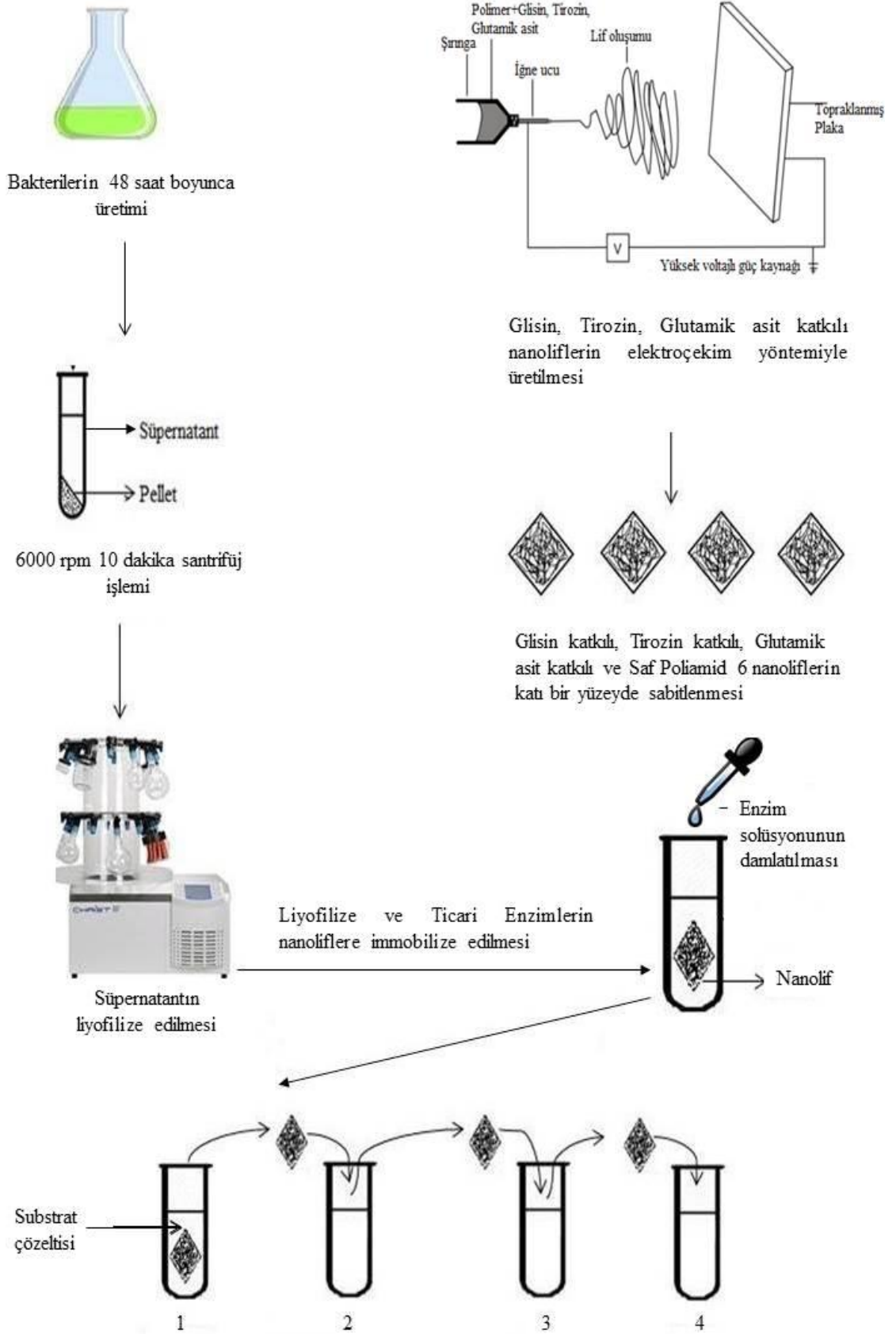
Aynı işlemler immobilize olmayan serbest enzimler için de yapılmış ve enzimlerin aktiviteleri belirlenmiştir. 1 mL enzim çözeltisi kullanılmıştır. Proteaz aktivitesi ölçümlerinde, standart eğri 0-60 U/g/mL tirozin içeren çözeltiler ile hazırlanmıştır. Yönteme göre 1 U/g/mL tirozin, 2 U/mL enzim aktivitesine karşılık gelmektedir (Keay ve Wildi 1970). Enzim aktivitesi standart koşullarda, 1 U/g/mL tirozin açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

### **3.2.8. Immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliğinin tespiti**

Nanolif yüzeyine immobilize edilen enzimlerin tekrar kullanılabilirliğini tespit etmek için immobilize enzim içeren nanolifler aktivite tayinlerinde tekrarlı hidroliz reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Her bir enzim aktivite tayini sonrasında nanolifler deiyonize su ile yıkanıp bir sonraki enzim aktivite tayininde kullanılmışlardır. İlk

aktivite %100 olarak tanımlanmıştır. Bu deneysel çalışmalar Şekil 3.1’de şematik olarak özetlenmiştir.





Şekil 3. 1. Deneysel aşamaların şematize olarak gösterilmesi

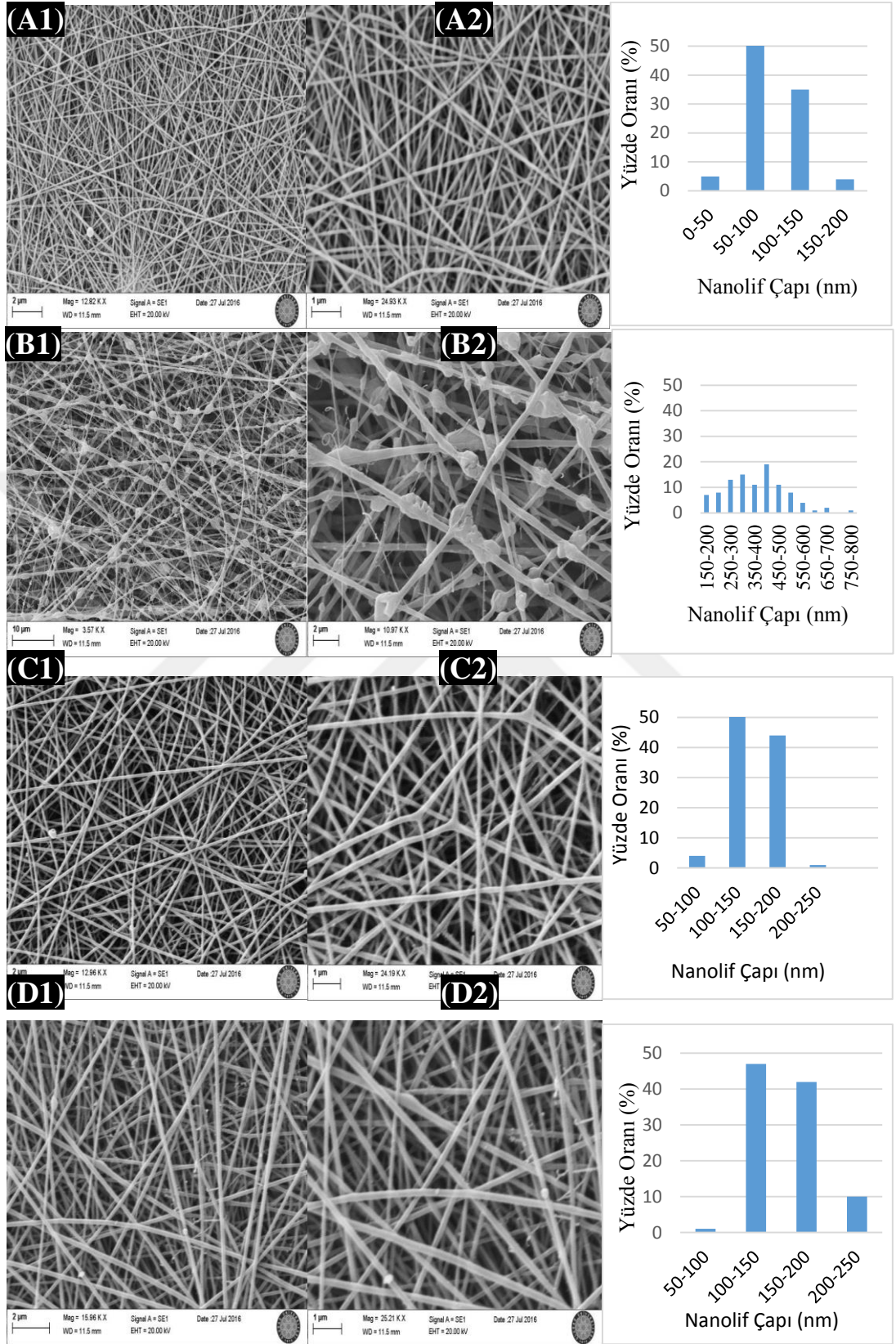
## 4. BULGULAR

### 4.1.Aminoasit Katkılı PA6 Nanoliflerin Elde Edilmesi

Yapılan çalışmalarda kullanılan nanolifler elektro çekim tekniğiyle üretilmiş olup, elektro çekimde kullanılacak olan polimer çözeltisinin içerisine farklı aminoasitler konulmuştur. Elektro çekim yönteminde aminoasitlerin kullanılmasıyla nanolif yapısı ve çapları gösterilmiştir (Şekil 4.1). Uygun koşullar altında 1 mL enzim solüsyonu nanolifler üzerine damlatılarak fiziksel adsorpsiyon metoduyla tutunması sağlanmıştır. Bunun için ticari proteaz enzimi ve liyofilize *Bacillus* enzimi saf PA6/Aminoasit ve PA6/Aminoasit-Glutaraldehit yüzeylere fiziksel olarak immobilize edilmiştir.

Saf PA6 (şekil 4.1A) ile üretilen nanoliflerin uniform ve oval yapıda olduğu gözlemlenmiştir. Saf PA6 'da nanolif çapları 50 ve 150 nm aralığında yoğunlaşmıştır. Glisin katkılı PA6 (şekil 4.1B) nanoliflerinde 150 nm'den 800 nm'ye kadar geniş aralığa sahip bir nanolif çapı elde edilmiştir. Fakat oluşan nanoliflerin %20'lik kısmı 400-450 nm aralığındadır. Glisin katkısıyla oluşturulan nanoliflerde uniform yapı gözlemlenmemiştir. Nanolifler üzerinde boncuklanmalar meydana gelmiştir. Tirozin katkısıyla oluşturulmuş PA6 (şekil 4.1C) nanolifler uniform yapıda ve oval olarak gözlemlenmiştir. Nanolif çapları yoğun bir şekilde 100-200 nm arasında gözlemlenmiştir. Glutamik asit katkılı PA6 nanolifler (şekil 4.1D), glisin katkılı nanolifere göre çok daha az boncuklanma göstermiş ve oluşan lifler uniform olmuştur. Oluşturulan nanolifler ağırlıklı olarak 100-200 nm çapa sahiptir.



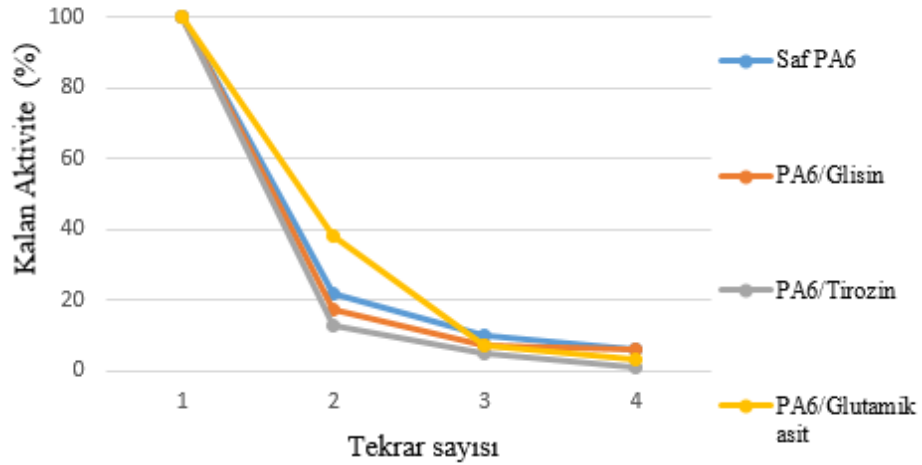


**Şekil 4. 1.** Aminoasit katkılı PA6 nanoliflerin SEM görüntüleri (A,B,C,D 1'ler 15,96 KX büyütme, A,B,C,D 2'ler 25,22 KX büyütme) ve oluşan nanolif kalınlıkları: (A) Saf PA6, (B) PA6/Glisin, (C) PA6/Tirozin, (D) PA6/Glutamik asit.

## 4.2. *Bacillus* Kaynaklı Liyofilize Proteaz Enzimin İmmobilizasyonu

### 4.2.1. Saf PA6 ve Aminoasit Katkılı PA6 Nanoliflere İmmobilizasyonu

*Bacillus* kaynaklı liyofilize enzimin saf PA6 yüzeylere immobilizasyonu sonucu enzimlerin tekrar kullanılabilirliği araştırılmıştır. İmmobilize enzimler her tekrar sonrası saf suyla yıkanıp bir sonraki tekrara kadar 4 °C 'de saklanmıştır. Şekil 4.2 de saf PA6 ve aminoasit katkıli PA6'lı ortamlarda immobilizasyon veriminin düştüğü görülmektedir. Bir tekrarlı kullanım sonrası enzim aktivitelerinde önemli düşüşler görülmüştür. İki tekrarlı kullanımda PA6/Glutamik asit kompleksi varlığında aktivite %38 korunmuştur. Diğer nanolif komplekslerin aktiviteleri 2 tekrarlı kullanım sonrası %20'nin altına düşmüştür.

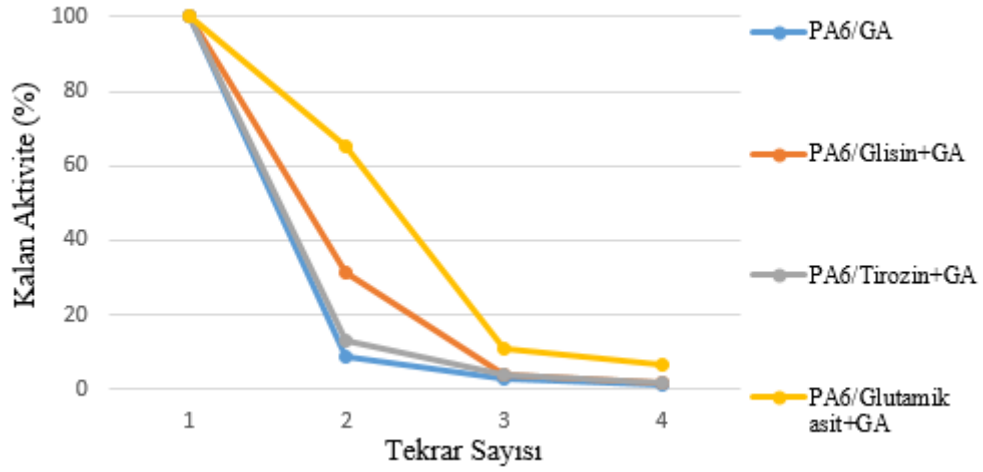


Şekil 4. 2. PA6 ve PA6/Aminoasit katkıli nanoliflerin tekrarlı kullanımı

### 4.2.2. PA6/GA ve PA6/Aminoasit+GA Nanoliflere İmmobilizasyonu

*Bacillus* kaynaklı liyofilize enzimin PA6/GA ve PA6/Aminoasit-GA yüzeylere immobilizasyonu sonucu enzimlerin tekrar kullanılabilirliği araştırılmıştır. İmmobilize enzimler her tekrar sonrası saf suyla yıkanıp bir sonraki tekrara kadar 4 °C 'de saklanmıştır. Şekil 4.3'te PA6/Aminoasit+GA ortamlarda immobilizasyon tekrar kullanım sayısı verilmiştir. PA6/Glutamik+GA asit hariç diğer yüzeylerde birinci tekrar sayısından sonra önemli düşüşler gözlemlenmiştir. Glutaraldehit modifiyeli

PA6/Aminoasit komplekslerinde de Glutamik asit katkıli nanolifler 2 tekrarlı kullanımdan sonra aktivitesinin %65'ini korumuştur.

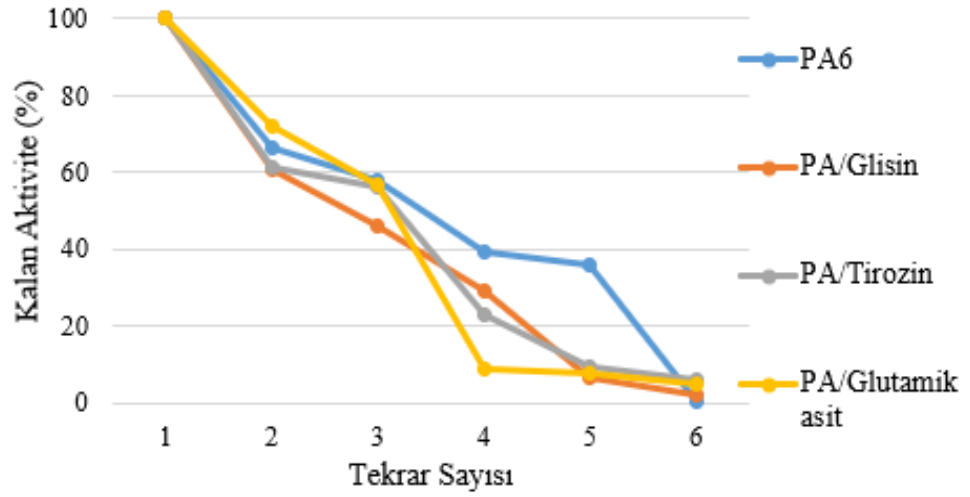


Şekil 4. 3. PA6/GA ve PA6/Aminoasit+GA katkıli nanoliflerin tekrarlı kullanımı

### 4.3. Ticari Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu

#### 4.3.1. Saf PA6 ve Aminoasit Katkıli PA6 Nanoliflere İmmobilizasyonu

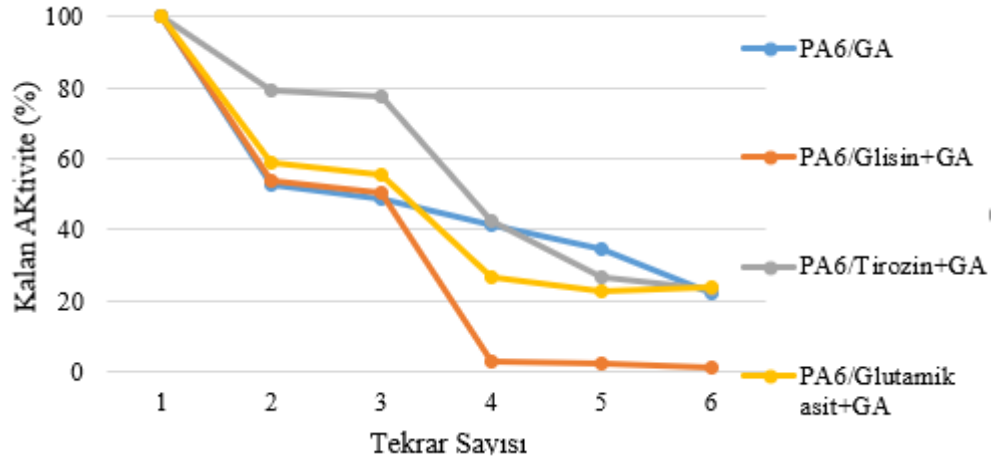
Ticari olarak kullanılmakta olan proteaz enzimi için de liyofilize hale getirilmiş enzimlere uygulanan metotlar uygulanmıştır. İmmobilize enzimler her tekrar sonrası saf suyla yıkanıp bir sonraki tekrara kadar 4 °C 'de saklanmıştır. Enzimin immobilize edilecek yüzeyler PA6/Aminoasit olarak üretilmiştir. Şekil 4.4'te Saf PA6 ve PA6/Aminoasit katkıli nanoliflere immobilize edilmiş ticari proteaz enziminin tekrarlı kullanımı verilmiştir. Nanoliflere uygulanan immobilizasyon sonucu 3 tekrarlı kullanımdan sonra enzim aktivitelerinde önemli düşüşler gerçekleşmiştir. Genel olarak immobilizasyon 3. tekrarda komplekslerin kalan aktiviteleri %20'nin altında tespit edilmiştir.



**Şekil 4. 4.** PA6 ve PA6/Aminoasit katkıli nanoliflere immobilize edilmiş ticari proteaz enziminin tekrarlı kullanımı

#### 4.3.2. Ticari Proteaz Enziminin PA6/GA ve PA6/Aminoasit+GA Katkıli Nanoliflere İmmobilizasyonu

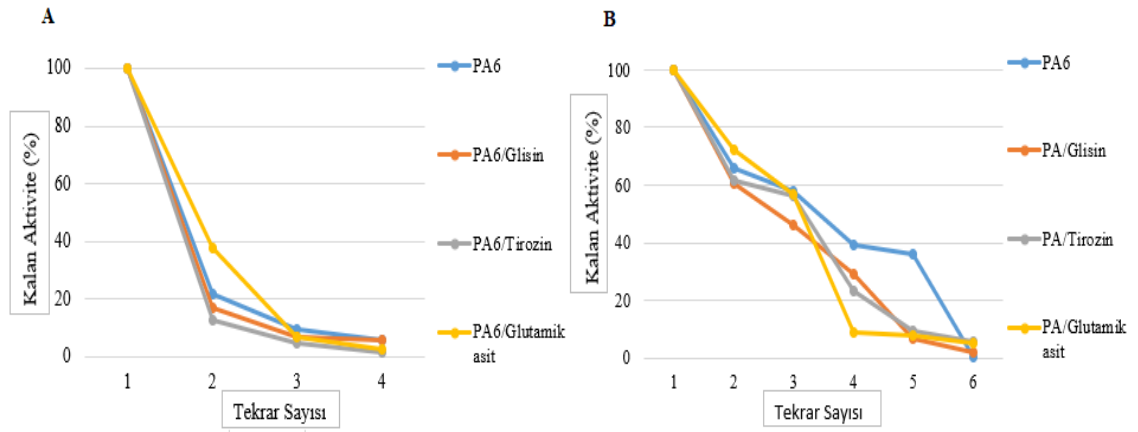
PA6 yüzeyler aminoasit katkıli olarak üretilip GA ile aktifleştirilmiştir. Yapılan immobilizasyon çalışmasının tekrar sayısı ve aktiviteleri Şekil 4.5'te verilmiştir. Genel olarak immobilizasyon 3 tekrar sayısına kadar elde edilmiştir. Şekil 4.5'te glutaraldehit ile aktifleştirilmiş saf PA6 ve PA6/Aminoasit katkıli nanoliflere immobilize edilmiş ticari proteaz enziminin tekrarlı kullanımı verilmiştir. Nanoliflere uygulanan immobilizasyon işlemi sonucu 4 tekrarlı kullanımdan sonra enzim aktivitelerinde önemli düşüşler gerçekleşmiştir. PA6/Tirozin nanolifler 4 tekrarlı kullanım sonucu aktivitesinin %43'ünü korumuştur.



**Şekil 4. 5.** PA6-GA ve PA6/Aminoasit-GA katkıli nanoliflere immobilize edilmiş ticari proteaz enziminin tekrarlı kullanımı

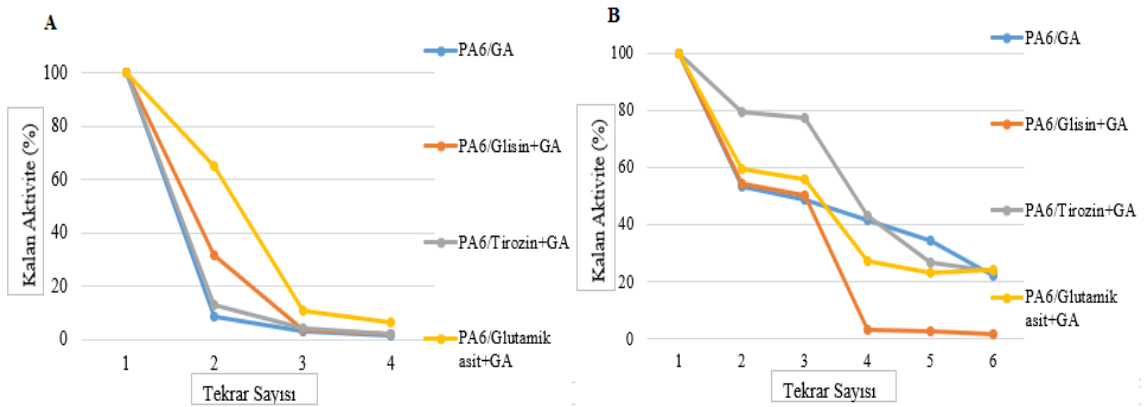
#### 4.4. *Bacillus* Kaynaklı Liyofilize Proteaz ve Ticari Proteaz Enzim İmmobilizasyonda Tekrar Sayısının Karşılaştırılması

*Bacillus* kaynaklı liyofilize proteaz ve ticari proteaz enzimleriyle yapılan immobilizasyon çalışması sonucu enzimin kullanılma sayıları ve yaşadıkları aktivite kayıpları şekil 4.6'da verilmiştir. Liyofilize enzimler ile yapılan aktivite deneyleri 4 tekrar sayısına kadar sürdürülmüş, ticari enzimlerde ise aktivite testleri 6 tekrar sayısına kadar sürdürülmüştür. Liyofilize enzimlerde 2 tekrarlı kullanımdan sonra enzimler nanoliflerden uzaklaşmış ve bu nedenle aktivitelere düşüşler gözlemlenmiştir. Ticari enzimlerde ise liyofilize enzimlerden farklı olarak 3 tekrarlı kullanıma kadar enzimlerin aktivitelerinin çoğunluğunu korumuştur.



**Şekil 4. 6.** (A) Liyofilize proteaz enziminin tekrarlı kullanımı, (B) Ticari proteaz enziminin tekrarlı kullanımı

*Bacillus* kaynaklı liyofilize proteaz ve ticari proteaz enzimlerinin glutaraldehit ile aktifleştirilerek kullanıldığı immobilizasyon çalışması sonucu enzim kullanılması ve yaşadıkları aktivite kayıpları şekil 4.7’de verilmiştir. Liyofilize enzimlerle yapılan aktivite deneyleri yine 4 tekrar sayısına kadar sürdürülmüş, ticari enzimlerde ise aktivite testleri yine 6 tekrara kadar sürdürülmüştür. Liyofilize enzimlerde 2 tekrarlı kullanımdan PA6/Glutamik asit nanolifler varlığında aktivitenin %65’i korunmuştur. Ticari enzimlerin glutaraldehit ile muamelesi sonucu tekrar sayısı 4’e kadar devam etmiştir.



**Şekil 4. 7.** Glutaraldehit ile aktifleştirilmiş (A) Liyofilize proteaz enziminin tekrarlı kullanımı, (B) Ticari proteaz enziminin tekrarlı kullanımı

*Bacillus* kaynaklı liyofilize proteaz ve ticari proteaz enzim immobilizasyonda tekrar sayısının karşılaştırıldığında her iki enzimin sahip olduğu serbest aktivite arasındaki

büyük fark nedeniyle ticari proteaz enzimiyle yapılan çalışma daha başarılı olarak tespit edilmiştir.



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Enzimler, kimyasal ve biyolojik alanlarda son derece spesifik, verimli ve çevre dostu katalizörlerdir (Sheldon ve ark. 2004). Endüstriyel enzimler çoğu zaman stabiliteyi arttırmak ve biyoreaktörlerde tekrarlanan kullanımını kolaylaştırmak için immobilize edilirler (Indira ve ark. 2009). Enzimler, homojen kataliz sistemlerinde su içinde çözünürler ve bu nedenle ürünü kirletirler ve bir kural da tekrar kanşımından aktif formda geri kazanılamazlar (Krajewska 2004). Pratik uygulamada, enzimin serbest formunun istikrarsızlığı ve tekrar kullanılamaması gibi engelleri aşmak için enzimlerin hareketsiz, çözünmeyen bir materyal üzerine ya da içine immobilize edilmesi önem taşımaktadır (Huang ve ark. 2009). Enzim immobilizasyonundaki sorunların üstesinden gelmek için birçok metot önerilmiştir (Senay ve Oztop 2003). Yeniden kullanılabilirlik ile ilgili olarak, ikinci ve üçüncü işlem döngüsünde yüksek enzim aktivitesinin muhafaza edilmesi immobilizasyonun önemli bir özelliğidir. (Indira ve ark. 2009). Katalizörlerin yeniden kullanılabilirliği, katalitik süreçte önemli bir gerekliliktir. Enzimlerin tekrar kullanılması, maliyetli ve bulaşmaya ve aktivite kaybına neden olabilecek ayırma ve saflaştırma gerektirir. Immobilize enzimleri kullanıldığı reaksiyonlarda reaktiflerin, ürünlerin ve reaksiyon ortamlarının kolay ayrılması, immobilize enzimin kolaylıkla geri kazanılması ve tekrar tekrar veya sürekli tekrar kullanımı dahil olmak üzere serbest enzimlere kıyasla çeşitli avantajları vardır (Varavinit ve ark. 2009).

Günümüzde immobilizasyon da kullanılan materyaller arasında nanofiberler göze çarpmaktadır. Çünkü nano ölçekli materyallerin, enzim yüklemesi için büyük yüzey / hacim oranlarına sahip olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Elektrospin nanofiberleri, yüksek spesifik yüzey alanlarına, enzim aktifliğine erişime izin veren ince gözenekli yapıya ve düşük difüzyon direncine sahip oldukları için, enzim immobilizasyonu için umut verici desteklerdir. Bu sistemler aynı zamanda kolay kurtarılabirlik ve aynı zamanda sürekli operasyonlar için potansiyel uygulanabilirlik de sağlamaktadır. Poliamid 6 kolay elde edilebilir bir malzeme olduğu için immobilizasyon çalışmaları için uygun bir materyaldir (Chen ve ark. 2004).



Bu çalışmada yeni izole edilen *Bacillus subtilis* E6-5 şuşundan elde edilen proteaz ve ticari proteaz (ORBA Biyokimya/İstanbul) enzimlerinin ilk kez hem glutaraldehitli (GA)PA6/aminoasit nanolif yüzeylerine hemde saf PA6/aminoasit yüzeylerine immobilizasyonu araştırılmıştır. Poliamid 6 nanolifler serbest N-H ve C=O gruplarına sahiptir. Bu gruplar ile aminoasitlerin karboksi ve amino grupları arasında bağ oluşabilir (Monsan ve ark. 1975). Yapılan çalışmada liyofilize enzimlerin saf PA6/aminoasit nanolifler üzerine immobilize edilmesi sonucu, PA6/tirozin nanolifler ilk tekrar sayısı göz önüne alındığında diğer nanoliflerden daha yüksek aktiviteye sahip olmasına rağmen 2 tekrarlı kullanımında aktivitesinin %13'ünü koruyabilmiştir. (Bkz. Şekil 4.2). 2 tekrarlı kullanım sonucu PA6/Glutamik asit kompleksi varlığında enzim aktivitesi %38 oranında korunmuştur. PA6/Glutamik asit kompleksini kalan aktivite yüzdesiyle sırasıyla saf PA6 kompleksi, PA6/Glisin, PA6/Tirozin kompleksleri takip etmiştir. 2 tekrarlı kullanım sonucu nanoliflerde bulunan enzimlerin nanoliflerden ayrıldığı yapılan enzim aktivitesi sonuçlarından saptanmıştır.

Liyofilize enzimlerin glutaraldehit ile etkinleştirilmiş PA6/Aminoasit nanoliflere uygulanması sonucu ise ilk aktivitesi en yüksek kompleks olarak PA6/Tirozin+GA tespit edilmiştir. PA6/Tirozin+GA 'lı nanolifleri sırasıyla PA6/Glisin+GA, PA6/Glutamik asit+GA ve PA6/GA nanolifleri takip etmiştir. 2 tekrarlı kullanım sonucu en az aktivite kaybı PA6/Glutamik asit+GA nanoliflerde saptanmış ve kalan enzim aktivitesi %65 olarak tespit edilmiştir. PA6/Glutamik asit+GA nanolifleri sırasıyla %32'lik kalan aktiviteyle PA6/Glisin+GA, %13 kalan aktiviteyle PA6 / Glisin+GA ve %9'lük kalan aktiviteyle PA6/GA takip etmiştir. 3. ve 4. tekrarlarda nanoliflerde bulunan enzimlerin nanoliflerden nanoliflerden ayrıldığı yapılan enzim aktivitesi sonuçlarından saptanmıştır. Çalışma sonucunda en başarılı enzim immobilizasyon verimi PA6/Glutamik asit+GA nanolifleriyle sağlanmıştır. Glutaraldehit ile aktifleştirilen PA6/Glutamik asit kompleksi 2 tekrarlı kullanım sonucu aktivitesinin %65'ini korumuştur. Glutaraldehit ile aktifleştirilmemiş PA6/Glutamik asit kompleksi ise iki tekrarlı kullanım sonucu aktivitesinin %38'ini korumuştur. Bu sonuca göre nanolif GA ile aktifleştirildiğinde iki katı bir başarı göstermiştir. Tanksale ve arkadaşları (2001) *Conidiobolus macrosporus*'dan elde edilen proteaz enzimini poliamid üzerine immobilizasyonu çalışmasında %1.76'lık glutaraldehit kullanarak enzimin çapraz olarak

nanoliflere immobilize etmişler ve verimin %58 oranında olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuç çalışmamızla paralellik göstermektedir.

İmmobilizasyon çalışmalarında glutaraldehit aktifleştici (çapraz bağlayıcı) ajan olarak kullanılmaktadır. Liyofilize enzim ile yapılan çalışmada saf PA6/Aminoasit kompleksiyle ve PA6/Aminoasit+GA kompleksiyle elde edilen sonuçlar göz önüne alındığı zaman PA6/Glisin+GA kompleksi hariç diğer tüm PA6/Aminoasit+GA komplekslerinde ilk aktivitelerin glutaraldehit içermeyenlerden komplekslerden daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Ara halka olarak kullanılan glutaraldehit molekülünün fonksiyonel grubu olan -CHO ile enzim ve kullanılan aminoasitlerin sahip olduğu amino grubu arasında bir örtüşme gerçekleşmez ise glutaraldehitin sahip olduğu fonksiyonel grup (-CHO) enzimin sahip olduğu amin gruplarına veya aminoasit kalıntılarına rastgele bağlanabilir ve bu durum enzim konfigürasyonunda değişikliğe neden olabilir. Bu durumda enzimin işlevi azalabilir veya enzimi tamamen inaktifleştirebilir (Mohamed ve ark. 1997). Liyofilize enzimlerle yapılan çalışmalarda glutaraldehitli nanoliflerdeki ilk aktivitelerindeki düşüklük ve immobilize edilmiş enzimin bir tekrarlı kullanımdan sonra aktivitesini yitirmesine bu etki yol açmış olabilir. Ayrıca immobilizasyon işlemi kullandığımız çeşitli aminoasitlerin sahip olduğu serbest amino grubu glutaraldehitin aldehit grubuyla bağ yapıp enzimin tam olarak nanolif yüzeylerine bağlanmasını engellemiş olabilir (Migneault ve ark. 2004). Liyofilize enzim için yapılan çalışmada en başarılı kompleks hem glutaraldehitli hemde glutaraldehitsiz nanoliflerde glutamik asit ile oluşturulan nanolifler olarak tespit edilmiştir. Bu etkiye glutamik asitin sahip olduğu negatif yüke sahip olan yan grup yol açmış olabilir. Glutamik asitin sahip olduğu fazladan COOH grubu amino gruplarıyla bağ yapmış olabilir.

Ticari proteaz enziminin glutaraldehit katkısız nanolifler üzerine immobilize edilmesi sonucu, ilk tekrarda en yüksek aktivite PA6/Glisin nanolifine immobilize edilen proteaz enziminde tespit edilmiştir. PA6/Glisin'i, saf PA6, PA6/Tirozin ve PA6/Glutamik asit nanolifleri takip etmiştir.

PA6/Glisin nanoliflerinin ilk tekrardaki yüksek immobilizasyon başarısına rağmen ilerleyen tekrarlarda sahip olduğu aktiviteyi büyük oranda koruyan saf PA6 nanoliflerin daha verimli olduğu görülmüştür. Saf PA6 nanoliflerin immobilizasyon başarısı 3 tekrarlı kullanıma kadar aktivitesinin %58'ini korumasıyla ortaya konulmuştur. Saf PA 6'yı 3 tekrarlı kullanıma kadar aktivitesinin %57'sini koruyan PA6/Glutamik asit nanolifleri takip etmiştir. PA/Tirozin nanolifleri 3. tekrarda aktivitesinin %56'sını koruyabilmiştir. PA/Glisin nanolifleri ise %46'sını koruyabilmiştir. Ticari proteaz enzimiyle yapılan çalışmada enzimin yaşadığı aktivite kayıpları 6 tekrara kadar incelenmiştir. Genel olarak tüm immobilize edilmiş enzimler 3 tekrarlı kullanıma kadara aktivitesinin bir bölümünü korumuşlardır.

Glutaraldehit ve aminoasit katkılı PA6 nanoliflerle yapılan çalışmada başlangıç aktiviteleri göz önüne alındığında PA6/GA kompleksi en yüksek aktiviteye sahiptir. PA6/GA kompleksini sırasıyla PA6/Glutamik asit+GA, PA6/Glisin- GA ve PA/Tirozin+GA kompleksi takip etmiştir. Fakat 2 ve 3 tekrarlı kullanım sonucu PA/Tirozin+GA kompleksi aktivitesini PA6/GA kompleksine göre daha fazla korumuştur. Aktivite deneyleri 6 tekrarlı kullanıma kadar sürdürülmüştür. PA/Tirozin+GA nanoliflere immobilize edilmiş enzimler 4 tekrarlı kullanıma kadar aktivitesinin %43'ünü koruyarak en başarılı immobilizasyon olarak görülmektedir. PA6/GA kompleksi ise 4. tekrarda aktivitesinin %42'sini korumuştur. PA6/Glutamik asit+GA kompleksi ise 3 tekrarlı kullanımda aktivitesinin %59'unu korumuş ve 4 tekrarlı kullanımdan sonra stabilitesini koruyamayarak aktivitesinin %26'lık bir kısmını korumuştur. PA6/Glisin+GA kompleksi 3. tekrarda aktivitesinin %56'sını korumasına rağmen stabilitesini koruyamamış ve 4. tekrardan sonra tüm aktivitesini kaybetmiştir.

Silva ve arkadaşları (2007) yaptıkları çalışmada PA 6,6 kullanmışlar ve nanolif yüzeyler üzerine lakkaz enzimini immobilize edip verimliliğini test etmişlerdir.

Saallah ve arkadaşları (2016), Polivinil Alkol (PVA) ile beraber su içerisinde çözdürülen siklodekstrin glukano transferaz enzimlerinden elektro çekim yöntemiyle nanolifler üretmiş,  $176 \pm 46$  nm çaplarındaki lifleri glutaraldehit ile muamele edip enzimleri çapraz bağlama yoluyla nanolif yüzeyine immobilize etmişlerdir.

Glutaraldehit ile muamele edilmemiş nanoliflere göre %31 oranına yaklaşan enzim aktivitesi gözlemlenmiştir.

Yapılan literatür çalışmalarında aminoasitler ile ilgili bu konuda yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır, ilk kez bu çalışma ile konu ele alınmıştır. Liyofilize *Bacillus* enzimiyle yapılan çalışmada en uzun tekrar sayısı ve aktivitesiyle PA/Glutamik asit kompleksi en başarılı olarak tespit edilmiştir. Ticari enzim ile yapılan çalışmada ise en başarılı kompleksin 4 tekrarlı kullanımında %43'lük kalan aktivitesi tespit edilen PA/Tirozin+GA olduğu tespit edilmiştir. Ticari ve liyofilize enzimlerin tekrar kullanım sayılarındaki değişiklik ticari ve liyofilize enzimlerin sahip oldukları serbest enzim aktivitesinin farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Ticari enzimler yüksek oranda saf ve sahip oldukları enzim ünitesinin yüksek olması doğrultusunda nanoliflere daha çok immobilize oldukları tespit edilmesine rağmen, *Bacillus* kaynaklı proteaz enziminin sahip olduğu düşük enzim ünitesi göz önüne alındığında immobilizasyonun liyofilize enzim içinde başarılı olduğu tespit edilmiştir. İleri araştırmalar ile bu konuda elde edilecek bilgiler çoğaltılabilir ve diğer aminoasitlerinde fiziksel immobilizasyondaki etkileri araştırılabilir.

Elde edilen bu immobilizasyon koşulu tekstil ve gıdanın farklı alanlarında kullanım alanı bulabilir.

## KAYNAKLAR

- Anonim 1946.** Nobel prize in chemistry. [www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1946/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1946/)-(Erişim Tarihi: 15/08/2017).
- Anonim 2009.** Nanolif ve insan saçının karşılaştırılması. <http://fyzmatik.pise.cz/866-svet-bez-nabijecek-svet-s-nanovlakny.html> (Erişim Tarihi: 25/09/2017).
- Anonim 2011.** Report of annual growth of enzyme industry. (<http://report2011.novozymes.com/>) (Erişim tarihi: 26/07/2017).
- Anonim 2017a.** Oligopeptidazaların yapısı. (<https://en.wikipedia.org/wiki/Oligopeptidase>)-(Erişim Tarihi: 05/04/2017).
- Anonim 2017b.** [http://www.researchandmarkets.com/research/17qrqp/proteases\\_market-](http://www.researchandmarkets.com/research/17qrqp/proteases_market-). (Erişim Tarihi: 08/07/2017).
- Anonim 2017c.** <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/DosyaGoster.aspx?DIL=1&BELGEANAH=782&DOSYASIM=210010201.pdf>. (Erişim Tarihi: 05/06/2017).
- Aehle, W. 2004.** Enzymes in Industry Production and Applications. Wiley, Weinheim, 516 pp.
- Ahmad, J., Ansari, T.A. 2013.** Alkaline Protease Production Using Proteinaceous Tannery Solid Waste. *J. Pet. Environ. Biotechnol.*, 4(1): 136.
- Albayrak, N., Yang, S.T. 2002.** Immobilization of beta-galactosidase on fibrous matrix by polyethyleneimine for production of galacto-oligosaccharides from lactose, *Biotechnol. Prog.*, 18(2): 240-251.
- Alpan, L.G. 2008.** Bazı ekstrem termofil anaerobik bakterilerin alkali proteazlarının özelliklerinin belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Andersen, L.P. 1998.** Method for dehairing of hides or skins by means of enzymes. U.S Patent No. 5, 834, 229.
- Andray, A.L. 2008.** Science and technology of polymer nanofibers. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 403 pp.
- Andreescu, S., Bucur, B., Marty, J.L. 2006.** Affinity Immobilization of Tagged Enzymes. *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, Ed: J. M. Guisan, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, pp: 97-106.
- Arica, M.Y. 2000.** Epoxy-derived pHEMA membrane for use bioactive macromolecules immobilization: covalently bound urease in a continuous model system. *Journal of Applied Polymer Science*, 77 (9): 2000-2008.
- Asokan, S., Jayanthi, C. 2010.** Alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans*. *Journal of Cell and Tissue Research* 10(1): 2119-2123.
- Ather, A. 2009.** Identification, Cloning and Expressions of Proteases from a Cold Adapted Organism *Aliivibrio salmonicida*. *Master Thesis*, Biology Faculty of science, University of Tromsø, Norway.

- Atlow, S.C., Bonadonna-Aparo, L., Klibanow, A.M. 1984.** Dephenolization of industrial wastewaters catalysed by polyphenol oxidase. *Biotechnology Bioengineering*, 26(6): 599-603.
- Aunstrup, K. 1973.** Industrial production of proteolytic enzymes: Industrial aspects of biochemistry. Ed: B. Spencer, Amsterdam, pp: 23-46.
- Aykut, Y. 2012.** Enhanced Field Electron Emission from Electrospun Co-Loaded Activated Porous Carbon Nanofibers. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 4(7): 3405-3415.
- Barett A.J. 1994.** Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods Enzymol.*, 244: 1–15.
- Barrett, A. J., Rawlings, N.D. 1991.** Types and families of endopeptidases. *Biochem. Soc Trans.*, 19(3): 707-15.
- Baştürk, E., Demir, S., Daniş, Ö., Kahraman, M.V. 2012.** Covalent immobilization of  $\alpha$ - amylase onto thermally cross-linked electrospun PVA/PAA nanofibrous hybrid membranes. *Journal of Applied Polymer*, 127(1): 349-355.
- Baştürk, E., Oktay, B., Apohan-Kayaman, N., Kahraman, V. 2013.** Highly Porous Starch/Poly (ethylene-alt-maleic anhydride) Composite Nanofiber Mesh. *Polymer Composite*, 34(8): 1321-1324.
- Baumgarten, P.K. 1971.** Electrostatic Spinning of Acrylic Microfibers. *Journal of Colloid Interference Science*, 36(1): 75-79.
- Beg Q.K., Sahai V., Gupta R. 2003.** Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. *Process Biochemistry*, 39(2): 203-209.
- Beg, Q.K., Saxena, R.K., Gupta, R. 2002.** Kinetic determination for an alkaline protease from *Bacillus mojavensis* using response surface methodology. *Biotechnol Bioeng.*, 78(3): 289-295
- Bernfeld, P., Wan, J. 1963.** Antigens and enzymes made insoluble by entrapping them into lattices of synthetic polymers. *Science*, 142: 678–679.
- Beynon J., Bond. J.S. 1989.** Proteolytic enzymes: a practical approach. IRL Press, New York, 259 pp.
- Bhardwaj, N., Kundu, S.C. 2010.** Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique. *Biotechnology Advances*, 28: 325-347.
- Bickerstaff, G.F. 1991.** Enzymes in Industry and Medicine. Cambridge University Press, UK, 105 pp.
- Bickerstaff, G.F. 1997.** Immobilization of Enzyme as the 21 st Century Begins: Immobilization of Enzyme and Cells, Ed.: Guisan J.M., Humana Press, New York, USA, pp: 1-13.
- Bond, J.S. 1989.** Proteolytic enzyme: a practical approach, Ed.: Beynon, R., s. 232-240.

- Buchko, C.J, Chen, L.C, Shen, Y., Martin, D.C. 1999.** Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer*, 40(26): 7397-7407.
- Castro, H., Abreu, P., Geraldo, R., Martins, R., Santos, R., Loureiro, N., Cabral, L., Rodrigues, C. 2010.** Looking at the proteases from a simple perspective. *Journal of Molecular Recognition*, 24(2): 165-181.
- Celep, Ş. 2007.** Nanoteknoloji ve tekstilde uygulama alanları. *Yüksek Lisans Tezi*, ÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana.
- Chakravarthy, P.K., Acharya, S. 2012.** Efficacy of extrinsic stain removal by novel dentifrice containing papain and bromelain extracts. *J Young Pharm.*, 4(4): 245–249.
- Chang, C.S. 2004.** Bleach-resistant alkaline protease produced by a *Bacillus sp.* isolated from the Korea polychaete, *Periserrula leucophryna*. *Process Biochemistry*, 39(11): 1441-1447.
- Chang, T.M.S. 1964.** Semipermeable microcapsules. *Science*, 146: 524–525.
- Chang, T.M.S. 1976.** Microencapsulation of enzymes and biological methods in enzymology. Academic Press Inc., New York, 218 pp.
- Chen, H., Hsieh, Y. 2004.** Enzyme immobilization on ultrafine cellulose fibers via poly (acrylic acid) electrolyte grafts. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(4): 405-413.
- Chibata, I., Tosa, T., Sato, T., Mori, T., Matuo, Y. 1972.** Fermentation technology today. Proceeding of IV International Fermentation symposium, 19-25 March 1972, Kyoto, Japan.
- Claus, D.R., Berkeley, C.W. 1986.** The genus *Bacillus*: Bergey's manual of systematic bacteriology Ed.: Sneath P.H.A., Springer, Germany, 722 pp.
- Çelik, N. 2006.** *Bacillus clausii* GMBAE 42'den Saflaştırılan Alkalen Proteazın Termal inaktivasyon Kinetiğinin Belirlenmesi ve Cu+2 iyonları ile Termostabilizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, KÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli.
- D'reaumur, R. 1752.** Observations sur la digestion des oiseaux. *Histoire de l'academie royale des sciences*. 1752: 266-461.
- Dailey, T.A., Meissner, P., Dailey, H.A. 1994.** Expression of a cloned protoporphyrinogen oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(2): 813-815.
- Dalev, P.G., Simeonova, L.S. 1992.** An enzyme biotechnology for the total utilization of leather wastes. *Biotechnology Letters*, 14(6): 531-534.
- Dalton, P.D., Klee, D., Moller, M. 2005.** Electrospinning with dual collection rings. *Polymer*, 46(3): 611–614.
- Demirkan, E., Dincbas, S., Sevinc, N., Ertan, F. 2011.** Immobilization of *B. amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase and comparison of some of its enzymatic properties with the free form. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(6): 6690-6701.

- Dias, D.R., Vilela D.M., Silvestre M.P.C, Schwan R.F. 2008.** Alkaline protease from *Bacillus* sp. isolated from coffee bean grown on cheese whey. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 2027-2034.
- Dinç, H. 2013.** Polivinil borat sentezi; Elektrosprin yöntemiyle nanofiber hazırlanması ve karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Konya.
- do Nascimento, W.C.A., Martins, M.L.L. 2004.** Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology* 35(1-2): 91-96.
- Duran, K., Özdemir, D., Namlıgöz, S. 2007.** İpek liflerindeki serisinin enzimatik olarak uzaklaştırılması. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 3: 182-186.
- Eldin, M.S.M. 2000.** Immobilization of penicillin G acylase onto chemically grafted nylon particles. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 10(4): 445.
- El-Safey, E.M., Abdul-Raouf U.M. 2004.** Production, purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus*. International Conferences For Development And The Environment In The Arab World, March 23-25, Egypt.
- Feijoo-Siota, L., Villa, T. 2011.** Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food Bioprocess Technol.*, 4(6): 1066–1088.
- Fong, H., Chun, I., Reneker, D.H. 1999.** Beaded Nanofibers Formed During Electrospinning. *Polymer*, 40(16): 4585-4592.
- Fujiwara, N., Yamamoto, K., Masui, A. 1991.** Utilization of a thermostable alkaline protease from an alkaliphilic thermophile for the recovery of silver from used X-ray film. *J. Ferment Bioeng.*, 72 :306-308.
- García-Carreño F. L. 1992.** Protease inhibition in theory an practice. *Biotechnology Education* 3(4): 145-150.
- Gençkal, H., Tari, C. 2006.** Alkaline protease production from *Bacillus* sp. isolated from natural habitat. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4): 703-710.
- Gloger, M., Tischer, W. 1981.** Determination of Catalytic Activity of Immobilized Enzyme, *Methods of Enzymatic Analysis*, 1(2-3): 142-154.
- Goldman, R., Kedem, O., Silman, I., Caplan, S., Katchalski-Katzir, E. 1968.** Papaincollodion membranes. I. Preparation and properties. *Biochemistry*, 7(2): 486–500.
- Goldstein, L. 1972.** Microenvironmental effects on enzyme catalysis. A kinetic study of polyanionic and polycationic derivatives of chymotrypsin. *Biochemistry*, 11(2): 4072–4084.
- Govind, N.S., Mehta, B., Sharma, M., Modi, V.V. 1981.** Protease carotenogenesisin *Blakesleatrispora*. *Phytochemistry*, 20: 2483-2485.



- Gözükara, F., Arıkan, B. 2012.** Termofil *Bacillus* sp. Bakterisinden lichenaz ( $\beta$ -1,3 VE 1,4 GLUCANASE) enzimi üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik kullanılabilirliği. *Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 27:5.
- Gregoriadis, G., Ryman, B.E. 1972.** Lysosomal Localization of P-Fructofuranosidase-Containing Liposomes Injected into Rats. *Journal of biochemistry*, 129: 123-133.
- Grubhofer, N., Schleith, L. 1953.** Modified ionexchange resins as specific adsorbent. *Naturwissenschaften*, 40: 508–508.
- Guangrong, H., Dehui, D., Weilian, H., Jiabin, J. 2008.** Optimization of medium composition for thermostable protease production by *Bacillus* sp. HS08 with a statistical method. *Afr. J. Biotechnol.*, 7(8): 1115-1122.
- Gupta R., Beg Q.K., Khan S., Chauhan B. 2002.** An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60(4): 381–395.
- Gupta, R., Qasim, K., Beg., Lorenz, P. 2002.** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1): 15-32.
- Ha, M., El-Din, A., Bekhit, A., Carne, A., Hopkins, D.L. 2012.** Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin ve zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food Chemistry*, 134(1): 95-105.
- Hameed, A., Kesharvarz, T., Evans, C.S. 1999.** Effect of dissolved oxygen tension and ph on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus* K2, for use in leather processing. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(1): 5-8.
- Hartmeier, W. 1988.** Immobilized Biocatalysts: An introduction. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 212 pp.
- Hase C.C., Finkelstein R.A. 1993.** Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. *Microbiological Reviews*, 57(4): 823-837.
- Hasegawa, J. 1960.** Exopeptidases of the human skin. An application of ultramicrotitration and volume measurement methods to a quantitative study of the exopeptidases in skin sections. *Arch Dermatol.*, 82(4): 595-604.
- Hoffmann-Ostenhof, O. 1954.** Enzymologie, Springer, Wien, 13: 25-27.
- Horikoshi, K. 1999.** Alkaliphiles: Some application of their products for biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63(4): 735-750.
- Huang, X., Yu, A., Jiang, J., Pan, C., Qian, J., Xu, Z. 2009.** Surface modification of nanofibrous poly (acrylonitrile-co-acrylic acid) membrane with biomacromolecules for lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57(1-4): 250–256.
- Indira, A.R., Bernd H.A.R. 2009.** One-Step production of immobilized amylase in recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental*, 75(7): 2012–2016.

**Ishikawa, H., Ishimi, K., Sugiura, M., Sowa, A., Fujiwara, N. 1993.** Kinetics and mechanism of enzymatic hydrolysis of gelatin layers of X-ray film and release of silver particles. *TJT. T Ferment. Bioeng.*, 76: 300-305.

**İçoğlu, H.İ. 2014.** Elektrosprin yönteminde çevresel parametrelerin nanolif özellikleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi, *Doktora Tezi*, ÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana.

**Jacobson, J.W., Glick, J.L., Madello, K.L. 1985.** Composition for cleaning drains clogged with deposits containing hairs. US Patent: 4,540,506.

**James, E.B., David, F.O., 1986.** Biochemical Engineering Fundamentals. McGraw Hill Book Company, USA, 984 pp.

**Johnvesly, B., Naik, G.R. 2001.** Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochem.*, 37(2): 139-144.

**Joo, H. S., Kumar, C.G., Park, G.C., Raik, S.R., Chang, C.S. 2004.** Bleach-resistant alkaline protease produced by a *Bacillus* sp. isolated from the Korea polychaete, *Periserrula leucophryna*. *Process Biochemistry*, 39(11): 1441-1447.

**Kanehisa, K. 2000.** Woven or knit fabrics manufactured using yarn dyed raw silk. US Patent: 8979947

**Karmakar, S.R. 1999.** Chemical Technology in The Pretreatment Process of Textiles. Elsevier Science B.V., Netherlands, 497 pp.

**Kasavi, C. 2006.** Kovalent bağlanma ve fiziksel adsorbsiyon metodları ile proteaz enziminin immobilizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, İSTANBUL.

**Katsaros, G.I., Tavantzis, G., Taoukis, P.S. 2010.** Production of novel dairy products using actinidin and high pressure as enzyme activity regulator. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(1): 47-51.

**Keay, L., S.B., Wildi. 1970.** Proteases of the genus *Bacillus*. I. Neutral Proteases. *Biotechnology. Bioengn.* 12(2): 179-212.

**Keay, L., Wildi, B.S. 1970.** Proteases of the genus *Bacillus*. I. Neutral proteases. *Biotechnology and Bioengineering*, 12 (2): 179-212.

**Keha, E.E., Küfreviođlu, Ö. 2004.** Biyokimya. Aktif Yayınevi, Erzurum, 653 pp.

**Kennedy, J.F. 1995.** Handbook of enzyme technology: Principles of immobilization of enzymes, Ed.: Wiseman, A., Prentice Hall Ellis Harwood, New York, pp: 235.

**Kikutani, T., Radhakrishnan, J., Arikawa, S., Takaku, A., Okui, N., Jin, X., Niwa, F., Kudo, Y. 1996.** High-speed melt spinning of bicomponent fibers: Mechanism of fiber structure development in poly(ethyleneterephthalate)/polypropylene system. *J. Appl. Polym. Sci.*, 62(11): 1913-1924.

**Kim, W., Choi, K., Kim, Y., Park, H., Choi, J., Lee, Y., Oh, H., Kwon, I., Lee, S. 1996.** Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus*

sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl Environ Microbiol.*, 62(7): 2482-2488.

**Kireççi, A., Özkoç, Ü., İçoğlu, H.İ. 2012.** Determination of optimal production parameters for polyacrylonitrile nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 124(6): 4961-4968.

**Koç E., Demiryurek O. 2004.** Sentetik lif üretim esasları ve tekstilde ekstrüzyon işlemi. *Tekstil Teknoloji Dergisi*, 9: 100-118.

**Kohlmann K.L., Nielsen S.S., Steenson L.R., Ladisch M.R. 1991.** Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. *Journal of Dairy Science* 74(10): 3275-3283.

**Krajewska, B. 2003.** Application of Chitin and Chitosan Based Materials for Enzyme Immobilization: a Review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2-3): 126-139.

**Kudrya, V. A., Simonenko, I.A. 1994.** Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41(5): 505–509.

**Kumakura, M., Kaetsu, I. 2003.** Immobilization of cellulase using porous polymer matrix. *J. Appl. Polymer Sci.*, 29(9): 2713–2718.

**Kyte, J., Doolittle, R.F. 1982.** A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1):105-132.

**Laan, J.C.V., Gerritse G., Mulleners L.J., Hoek R.A.V., Quax, W.J. 1991.** Cloning, characterization, and multiple chromosomal integration of a *Bacillus* alkaline protease gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(4): 901-909.

**Labbe J.P., Rebegrotte P., Turpine M. 1974.** Demonstrating extracellular leucine aminopeptidase (E.C 3.4.1.1) of *Aspergillus oryzae* (IP 410): leucine aminopeptidase 2 fraction. *C.R. Acad. Sci.*, 278(D): 2699.

**Li, T.B., Liang J., Xu B.S., Wang J. 2010.** Preparation and characteristic of one dimensional Magnesium Borate Nanomaterials. *Journal of Inorganic Materials*, 25: 947.

**Li, X., Yao, C., Sun, F., Song, T., Li, Y., PU, Y. 2008.** Conjugate Electrospinning of Continuous Nanofiber Yarn of Poly(L-lactide) / Nanocalcium Phosphate. *Journal of Applied Polymer*, 107(6): 3756-3764.

**Liao, C.H., McCallus, D.E. 1998.** Biochemical and genetic characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. *Applied and Environmental Microbiology* 64(3): 914-921

**Lyons, J., Li, C., Ko, F. 2004.** Melt-Electrospinning Part I: Processing Parameters and Geometric Properties. *Polymer*, 45(22): 7597-7603.

**Mabrouk, S.S., Hashem, A.M., El-Shayep, M.A., Ismail, M.S., Abdel-Fattah, A.F. 1999.** Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresource Technology*, 69(2): 155-159.

- Mahajan, R., Badgujar, S. 2010.** Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. *Journal of Pharmacy Research*, 3(9): 2048-2068.
- Mansfeld J. 2007.** Metalloproteases: Industrial Enzymes, Ed.: Polaina, J. P. MacCabe, A., Springer, Spain, pp: 221-242.
- McGrath, B.M., Gary, W. 2005.** Directory of Therapeutic Enzymes. CRC Press, USA, 312 pp.
- Megelski, S., Stephens, J.S., Chase, D.B., Rabolt, J.F. 2002.** Micro and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macromolecules*, 35(22): 8456-8466.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M.J., Waldron, K.C. 2004.** Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37:790-802.
- Mitz, M.A. 1956.** New soluble active derivatives of an enzyme as a model for study of cellular metabolism. *Science*, 123: 1076-1077.
- Mizuno, H., Mal, T.K., Tong, K.I., Ando, R., Furuta, T., Ikura, M., Miyawaki, A. 2003.** Photo-Induced Peptide Cleavage in the Green-to-Red Conversion of a Fluorescent Protein. *Molecular Cell*, 12(1): 1051-1058.
- Monsan, P., G. Puzo, Mazarguil, H. 1975.** Étude du mécanisme d'établissement des liaisons glutaraldehyde protéines. *Biochimie.*, 57:1281-1292.
- Mulchandam, A., Rogers, K.R. 1998.** Methods in Biotechnology, Enzyme and Microbial Biosensors Techniques and Protocols. Humana Press Inc., New Jersey, 264 pp.
- Najafi, M.F., Deobagkar, D., Deobagkar, D. 2005.** Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(2): Issue of August 15.
- Nardi, G.L. 1960.** Serum "trypsin" (or arginine exopeptidase) screening test for cancer of the pancreas. *Gastroenterology*, 38(1): 50-51.
- Nelson, J.M., Griffin, E.G. 1916.** Adsorption of invertase. *J. Am. Chem. Soc.*, 38(5): 1109-1115.
- Neurath, H. 1999.** Proteolytic enzymes, past and future. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96: 10962-10963.
- Nilegaonkar, S.S., Zambare, V.P., Kanekar, P.P., Dhakephalkar, P.K., Sarnaik, S. S., Chandrababu, N.K., Rajaram, R., Ramanaiah, B., Ramasami, T., Saikumari, Y.K., Balaram, P.A. 2008.** Novel protease for industrial application. U.S. Patent/2008/0220499 A1, 2007.
- Ohmiya, K., Tanimura, S., Kobayashi, T., Shimizu, S. 1979.** Application of immobilized alkaline protease to cheese-making. *Journal of food science*, 44: 1584-1588.

**Onat, T., Emerk, K. 1997.** Temel Biyokimya. Saray Medikal Yayıncılık, İzmir, 932 pp.

**Öztürk, M.H. 2004.** Partial Purification And Characterization Of Alkaline Proteases From Isolated *Bacillus* Strains. *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, *Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı*, İstanbul.

**Perea A., Ugalde U., Rodriguez I., Serra J. L. 1993.** Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: Applications in industrial whey bioconversion processes. *Enzyme Microb. Technol.*, 15: 418–423.

**Polaina, J., Maccabe, A.P. 2007.** Industrial Enzymes Structure: Function and Applications. Springer, Netherlands, 641 pp.

**Polgar, J. 1989.** Mechanisms of Protease Action. CRC Press, USA, 232 pp.

**Pryakhin, A.N., Chukhrai, E.S., Poltorak, O.M. 1977.** Glucose 6-phosphate dehydrogenase immobilized by adsorption on silica gel solid supports. West Moskov Univ. Ser 2 Khim., 18(1): 125.

**Puri, S., Khalil, O., Gupta, R. 2002.** Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. *Cur. Microbiol.*, 44(4): 286-290.

**Quioco, F.A., Richards, F.M. 1964.** Intermolecular cross-linking of a protein in the crystalline state: carboxypeptidase. *A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 52(3): 833–839.

**Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R. 2007.** Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol.*, 40(6): 1451–1463.

**Rai, S.K., Mukherjee, A.K. 2010.** Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solventstable subtilisin-like serine protease (Alzwioprose) from *Bacillus* DM-04. *Biochemical Engineering Journal*, 48(2): 173-180.

**Rangkupan, R. 2002.** Electrospinning Process of Polymer Melts, *PhD Thesis*, The Graduate Faculty Of The University Of Akron, USA.

**Rao, Ch.S., Sathish T., Ravichandra P., Prakasham R.S. 2009.** Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. *Process Biochemistry*, 44(3): 262–268.

**Rao, M.B., Tanksale, A.M., Gathe, M.S., Deshpande, W. 1998.** Molecular and Biotechnological aspect of Microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3): 597-635.

**Rawlings, N.D., Barrett, A.J. 1997.** Classification of peptidases by comparisons of primary and secondary structures: Proteolysis in Cell Functions, Ed.: Hopsu-Havu, V.K., Jarvinen, M., Kirschke, H., IOS Press, Amsterdam, pp: 13-21.

**Rowan, A.D., Buttle, D.J., Barrett, A.J. 1990.** The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochem J.*, 266(3): 869-875.

- Röhm, O. 1908.** Preparation of hides for the manufacture of leather. U.S. Patent P: 886,411.
- Saallah, S., Naim, M., N., Lenggoro, I., W., Mokhtar, M., N., Bakar, N.F.A., Gen, M. 2016.** Immobilisation of cyclodextrin glucanotransferase into polyvinyl alcohol (PVA) nanofibres via electrospinning. *Biotechnology Reports*, 10: 44-48.
- Saeki, K., Ozaki, K., Kobayashi, T. Ito, S.J. 2007.** Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. *Biosci. Bioeng.*, 103(6): 501-508.
- Saramma, M., Saramma, A. 2007.** An Alkaline protease from *Bacillus Circulans* BM15, newly isolated from a mangrove station: characterization and application in laundry detergent formulations. *Indian Journal of Microbiology*, 47(4): 298-303.
- Sarı, E. 2011.** *Bacillus circulans* M34'ten Proteaz Enziminin Saflastırılması ve Karakterizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi.*, AÜ Fen Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, Ankara.
- Schall, R. 2007.** Systematic identification of substrates for profiling of secreted protease from *Aspergillus* species. *Journal of Microbiological Methods*, 71(2): 93-100.
- Sellami-Kamoun, A., Haddar, A., Ali, N.E.H., Ghorbel- Frikha, B., Kanoun, S., Nasri, M. 2008.** Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiological Research*, 163: 299-306.
- Senay, A.C., Oztop, H.N. 2003.** Immobilization of catalase into chemically cross-linked chitosan beads. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(7): 889-894.
- Senol, F., Tayyar, E., Dogan, G., Yaman, N. 2005.** Nanolifler ve Uygulama Alanları. *Tekstil Maraton*, 3: 20-25.
- Sevinç, N. 2010.** Türkiye Topraklarından İzole Edilen *Bacillus sp.* Suşlarından Proteaz Üretimi, Kısmi Saflastırılması ve Karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, U.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Shankar, S., Rao, M., Laxman R. S. 2011.** Purification and Characterization of an Alkaline Protease by a New Strain of *Beauveria sp.* *Process Biochemistry*, 46(2): 579–585.
- Sheldon, A.R., Rantwijk F. 2004.** Biocatalysis for sustainable organic synthesis. *Australian Journal of Chemistry*, 57(4): 281-289.
- Sheldon, R.A. 2010.** Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs) as Industrial Biocatalysts. *Biocatalysis Challenges for Pharmaceuticals and Fine Chemicals*. 14 October, 2010, Delft University of Technology CLEA Technologies, London.
- Shen, H., Chou, K. 2009.** Identification of proteases and their types. *Analytical Biochemistry*, 385(1): 153–160.
- Sidhu, G.S., Sharma, P., Chakrabarti, T., Gupta, J.K. 1997.** Strain improvement for the production of a thermostable  $\alpha$ -amylase. *Enzyme and Microbial Technology*. 21(7): 25-530.

- Silva, C., Silva, C.J., Zille, A., Guebitz, G.M., Paulo, A.C. 2007.** Laccase immobilization on enzymatically functionalized polyamide 6,6 fibres. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(6-7): 867-875.
- Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C. 2000.** Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochemistry*, 36(8-9): 781-785.
- Singh, J., Vohra, R., Sahoo, D. 1999.** Alkaline protease from a new obligate alkalophilic isolate of *Bacillus sphaericus*. *Biotechnology Letters*, 21(10): 921-924.
- Son, W.K., Youk, J.H., Lee, T.S., Park, W.H. 2004.** Electrospinning of ultrafine cellulose acetate fibers: Studies of a new solvent system and deacetylation of ultrafine cellulose acetate fiber. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 42 :5-11.
- Subbiah, T., Bhat, G.S., Tock, R.W., Parameswaran, S., Raumkumar, S.S. 2005.** Electrospinning of Nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 96: 557-569.
- Sumantha, A., Larroche, C. 2006.** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. *Food Technology and Biotechnology* 44(2): 211-220.
- Sung, J.H., Ahn, S.J., Kim, N.Y., Jeong, S.K., Kim, J.K., Chung, J.K., Lee, H.H. 2010.** Purification molecular cloning and biochemical characterization of subtilisin JB1 from a newly isolated *Bacillus* JB1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(3): 900-901.
- Supuran C.T., Scozzafava, A. 2002.** Bacterial protease inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 22(4): 329-372.
- Taher, H., Al-Zuhair, S., Al-Marzouqi, A. H., Haik, Y., Farid, M. 2011.** A review of enzymatic transesterification of microalgal oil-based biodiesel using supercritical technology. *Enzyme Research*, 2011: 1-25.
- Takamine, J. 1894.** Preparing and making taka-koji. U.S. Patent, P:525-820.
- Tanksale, A., Chandra, P.M., Rao, M., Desphande, V. 2001.** Immobilization of alkaline protease from *Conidiobolus macrosporus* for reuse and improved thermal stability. *Biotechnology Letters*, 23(1): 51-54.
- Tanksale, M.A. 2001.** Molecular aspects of a fungal alkaline protease, *Ph.D. Thesis*, Faculty of Science, University of Pune, India.
- Tekin, N., 2008.** Türkiye Kaynaklı *Bacillus* spp.'lerin Alkalen Proteaz Üretim Kapasiteleri ve Enzimlerin Kısmen Karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, AÜ, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Teo, W.E., Gopal, R., Ramaseshan, R., Fijihara, K., Ramakrishna, S. 2007.** A Dynamic Liquid Support System for Continuous Electrospun Yarn Fabrication. *Polymer*, 48: 3400-3405.
- Thanikaivelan, P., Rao, J.R., Nair B.U., Ramasami, T. 2004.** Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. *Trends in Biotechnol.*, 22(4): 181-188.

- Twyman, R.M. 2005.** Immobilized Enzymes: Encyclopedia of Analytical Science, Ed.: Worsfold P., Townshend, A., Poole, C., Elsevier, pp: 1182-1187.
- Uhlig, H. 1998.** Industrial Enzymes and Their Applications, John Wiley & Sons, USA, 472 pp.
- Uludag, Y.B. 2000.** İmmobilize glukomilaz ile maltodekstrinden glukoz üretimi. *Yüksek Lisans Tezi*, GYTE, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.
- Ulukaya, E. 2003.** Apoptozis Ders Notları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı.
- Ulus, Y. 2012.** Endüstriyel kullanım amaçlı kimozen enziminin alternatif bir sistemle rekombinant olarak üretilmesi, saflaştırılması ve karakterizasyonu. *Doktora Tezi*, GOP Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Tokat.
- Varavinit, S., Chaokasem, N., Shobsngob, S. 2002.** Immobilization of a thermostable alpha-amylase. *Science Asia*, 28(2002): 247-251.
- Velasco, B.R.D., Álvarez S.A.S., Villarreal, G.L.J., Paz, G.J.A., Iglesias, A.L., Vera, G.R. 2015.** Designing a Low Cost Electrospinning Device for Practical Learning in a Bioengineering Biomaterials Course. *Rev. Mex. Ing. Biomed.*, 37(1): 7-16
- Vishwanatha, K.S., Appu Rao, A.G., Singh, S.A. 2010.** Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85(6): 1849-1859.
- Whang, Z., G., Wan, L., S., Liu, Z., M., Huang, X., J., Xu, Z., K. 2009.** Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56(4): 189-195.
- Wiseman, A. 1987.** Handbook of enzyme biotechnology: The application of enzymes in industry. Ed.: Alan Wiseman, pp. 274-373.
- Woodward, J. 1985.** Immobilized enzymes: adsorption and covalent coupling: Immobilized cells and enzymes: A Practical Approach, IRL, Oxford, UK., pp: 3-17.
- Worsfold, P.J. 1995.** Classification and Chemical Characteristics of Immobilized Enzymes, *Pure and Applied Chemistry*, 67(4), 597-600.
- Zakaria, A.Q. 2006.** Production and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase by thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Journal of Biotechnology* 1: 850-857.
- Zare, H., Moosavi-Movahedi, A.A., Salami, M., Mirzaei, M., Saboury, A.A., Sheibani, N. 2013.** Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica* cv. Sabz) latex. *Phytochemistry*, 87: 16-22.
- Zeigler, D.R. 2001.** The genus *Geobacillus*. *Bacillus Genetic Stock Center Catalog of Strains*. 3(7): 1-25.
- Zhao, G., Zhou, M., Zhao H., Chen, C., Xie, B., Zhang, X., He, H., Zhou, B., Zhang, Y. 2012.** Tenderization Effect of Cold-adapted Collagenolytic Protease MCP-01 on Beef Meat at Low Temperature and Its Mechanism. *Food Chemistry*, 134(4): 1738-1744.



**Zhong, X.H., Kim, K.S., Fang, D.F., Ran, S.F., Hsiao, B.S., Chu, B. 2002.** Structure and Process Relationship of Elektrospun Bioabsorbable Nanofiber Membranes. *Polymer*, 43(16): 4403-4444



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Baran Enes GÜLER  
Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara, 29.09.1992  
Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu

Lise : Bursa Ertuğrulgazi Lisesi / 2006 - 2010  
Lisans : Uludağ Üniversitesi / 2010 - 2015  
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi / 2015 - 2017

Çalıştığı Kurumlar : ---  
İletişim (e-posta) : brns.glr@gmail.com