

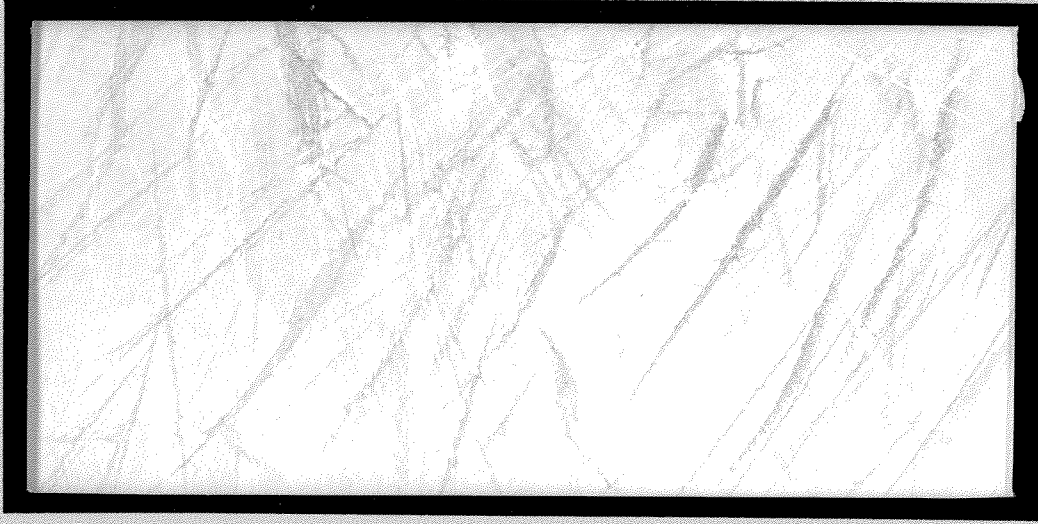
DUP

1997_815



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY



**Makina, Kimyasal Teknolojiler, Malzeme ve İmalat Sistemleri
Araştırma Grubu**

**Mechanical Engineering, Chemical Technologies, Material
Sciences and Manufacturing Systems Research Grant
Committee**

**SELÜLAZ REAKTÖRLERİNDE SÜREÇ
VERİMİNİN ARTTIRILMASI**

PROJE NO: MİSAG-70

**Doç. Dr. UFUK BAKIR
Prof. Dr. HALUK HAMAMCI
Prof. Dr. ALTAN ERARSLAN
JÜLİDE BİLEN**

**MART 1988
ANKARA**

ÖNSÖZ

Bu rapor sadece TÜBİTAK tarafından desteklenen “SELÜLAZ REAKTÖR-
LERİNDE SÜREÇ VERİMİNİN ARTIRILMASI” isimli, TÜBİTAK MİSAG-70 numaralı
projenin sonuç raporudur. 10.11.1995 ile 10.11.1997 tarihleri arasında Doçent Dr. Ufuk
Bakır’ın yürütücülüğünde, Prof. Dr. Haluk Hamamcı ve Prof. Dr. Altan Erarşlanın
katkılarıyla ODTÜ Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans öğrencisi Jülide Bilen tarafından
ODTÜ Gıda Mühendisliğinde yapılmıştır. Selülaaz enzim kompleksi, reaktör süreç verimini
artırabilmek için bisimidoesterler grubundan üç değişik boya sahip çapraz bağlayıcı
kullanılarak çapraz bağlanmıştır. Çapraz bağlama işlemi selülaaz kompleksindeki enzimlerin
aktivitelerini önemli ölçüde azaltmamıştır. Bu ümit verici ilk verinin ardından yapılan
detaylı ısı inaktivasyon çalışmaları çapraz bağlamanın enzimin ısı dayanıklılığını pek
değiştirmedeği gözlenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Önsöz.....	2
İçindekiler.....	3
Tablo Listesi.....	6
Şekil Listesi.....	7
Simgeleme.....	13
Öz.....	14
Abstract.....	16
1. Giriş	18
1.1. Enzimlerin ısı İnaktivasyon Mekanizması.....	22
1.2. Protein Dayanıklılığının artırılması.....	23
1.2.1. Tutuklama metodu ile Dayanıklılığın Artırılması.....	23
1.2.2. Katkı Maddeleri ile Dayanıklılığın Artırılması	24
1.2.3. Kimyasal Değişiklikler Yolu ile Dayanıklılığın Artırılması.....	24
1.2.4. Protein Mühendisliği Yolu ile Dayanıklılığın Artırılması.....	25
1.2.5. Doğal Olarak Bulunan Dayanıklı Proteinler.....	25
1.3. Çapraz Bağlama.....	25
1.3.1. Çapraz Bağlayıcı Kimyasalların Genel Özellikleri.....	26
1.3.2. İmidoesterler.....	26
1.3.3. Çapraz Bağlama Çalışmaları.....	27
1.3.4. Selülaz Kompleksi.....	28

1.3.5. Selülaz Üreten Mikroorganizmalar.....	28
1.3.6. Selülaz kompleksi moleküllerinde yapılan kimyasal değişiklikler.....	29
2. DENEYSEL	
2.1. Malzeme.....	30
2.2. Metodlar.....	30
2.2.1. Selülaz aktivite tayini.....	30
2.2.2. Çapraz bağlama.....	33
2.2.3. Protein miktarı (konsantrasyonu) tayini.....	33
2.2.4. Isıl inaktivasyon deneyleri.....	33
2.2.5. Kalan aktivite hesabı	34
2.2.6. Doğal enzime göre kalan aktivite hesabı.....	34
2.2.7. Kinetik çalışmalar.....	34
2.2.8. <i>Trichoderma reseei</i> kullanarak β -glukosidaz üretimi.....	35
2.2.8. β -glukosidaz enziminin saflaştırılması.....	36
2.2.9. SDS-Elektroforez metodu.....	37
3. Veriler ve tartışma.....	38
3.1. Selülaz aktivite tayin metodlarının belirlenmesi.....	38
3.2. Çapraz bağlamanın endoglukanaz, sellobiyohidrolaz ve toplam selülaz aktiviteleri ve ısıl inaktivasyonları üzerindeki etkisi.....	42
3.2.1. DMS kullanarak çapraz bağlama.....	44
3.2.2. DMA kullanarak çapraz bağlama.....	51

3.2.3. DTBP kullanarak çapraz bağlama.....	53
3.3. Çapraz bağlamanın β -glukosidaz aktivitesi ve ısı inaktivasyonu üzerindeki etkisi.....	56
3.3.1. Ticari β -glukosidaz kullanılması	56
3.3.2. <i>Trichoderma reseei</i> β -glukosidaz'ının kullanılması.....	61
3.3.2.1. β -glukosidaz'ın <i>T. reseei</i> fermentasyonu ile üretilmesi ve saflaştırılması.....	61
3.3.2.2. Çapraz bağlamanın etkilerinin incelenmesi.....	63
3.4. Çapraz bağlayıcı boyunun selülaz sistemi üzerindeki etkisi.....	66
3.5. Isı inaktivasyon kinetik çalışmaları.....	68
4. Sonuçlar.....	77
5. Referanslar.....	79

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: β -glucosidaz enziminin saflaştırma kademeleri sırasında saflaştırma miktarları.....	63
---	----

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 1: Filtre kağıdı şeklinin toplam selülaz aktivitesine olan etkisi.....39
- Şekil 2: Filtre kağıdı yüzey alanı ya da ağırlığının toplam selülaz aktivitesine olan etkisi..... 39
- Şekil 3: Enzim konsantrasyonunun toplam selülaz aktivitesine olan etkisi..... 40
- Şekil 4: Enzim konsantrasyonunun sellobiyohidrolaz aktivitesine olan etkisi...40
- Şekil 5: Enzim konsantrasyonunun endoglukanaz aktivitesine olan etkisi.....41
- Şekil 6: Doğal selülaz kompleksinin ısıl dayanıklılık eğrisi.....42
- Şekil 7: Doğal sellobiyohidrolazın ısıl dayanıklılık eğrisi.....43
- Şekil 8: Doğal endoglukanazın ısıl dayanıklılık eğrisi.....43
- Şekil 9: DMS konsantrasyonunun toplam selülaz aktivitesine olan etkisi.....44
- Şekil 10: DMS konsantrasyonunun sellobiyohidrolaz aktivitesine olan etkisi....45
- Şekil 11: DMS konsantrasyonunun endoglukanaz aktivitesine olan etkisi..... 45
- Şekil 12: Doğal ve çapraz bağlanmış selülaz kompleksinin toplam selülaz aktivitesinin 65 °C de ısıl inaktivasyon kinetiği.....46
- Şekil 13: Doğal ve çapraz bağlanmış selülazın sellobiohidrolaz aktivitesinin 65 °C de ısıl inaktivasyon kinetiği.....46
- Şekil 14: Doğal ve çapraz bağlanmış selülazın endoglukanaz aktivitesinin 65 °C de ısıl inaktivasyon kinetiği.....47
- Şekil 15: Doğal ve çapraz bağlanmış selülazın toplam selülaz

aktivitesinin 67.5 °C de ısı inaktivasyonu.....	47
Şekil 16: Doğal ve çapraz bağlanmış selülazın sellobiohidrolaz	
aktivitesinin 67.5 °C de ısı inaktivasyonu.....	47
Şekil 17: Doğal ve çapraz bağlanmış selülazın endoglukanaz	
aktivitesinin 67.5 °C de ısı inaktivasyonu.....	48
Şekil 18: Doğal ve çapraz bağlanmış selülazın toplam selülaz	
aktivitesinin 70 °C de ısı inaktivasyonu.....	48
Şekil 19: Doğal ve çapraz bağlanmış selülazın sellobiohidrolaz	
aktivitesinin 70 °C de ısı inaktivasyonu.....	48
Şekil 20: Doğal ve çapraz bağlanmış selülazın endoglukanaz	
aktivitesinin 70 °C de ısı inaktivasyonu.....	49
Şekil 21: Doğal ve çapraz bağlanmış selülazın toplam selülaz	
aktivitesinin 72.5 °C de ısı inaktivasyonu.....	49
Şekil 22: Doğal ve çapraz bağlanmış selülazın sellobiohidrolaz	
aktivitesinin 72.5 °C de ısı inaktivasyonu.....	49
Şekil 23: Doğal ve çapraz bağlanmış selülazın endoglukanaz	
aktivitesinin 72.5 °C de ısı inaktivasyonu.....	50
Şekil 24: Doğal ve çapraz bağlanmış selülazın toplam selülaz	
aktivitesinin 75 °C de ısı inaktivasyonu.....	50
Şekil 25: Doğal ve çapraz bağlanmış selülazın sellobiohidrolaz	
aktivitesinin 75 °C de ısı inaktivasyonu.....	50
Şekil 26: Doğal ve çapraz bağlanmış selülazın endoglukanaz	

aktivitesinin 75 °C de ısı inaktivasyonu.....	51
Şekil 27: Doğal ve çapraz bağlanmış selülazın toplam selülaz aktivitesinin 67.5 °C de ısı inaktivasyonu.....	52
Şekil 28: Doğal ve çapraz bağlanmış selülazın toplam selülaz aktivitesinin 67.5 °C de ısı inaktivasyonu.....	52
Şekil 29: Doğal ve çapraz bağlanmış selülazın toplam selülaz aktivitesinin 67.5 °C de ısı inaktivasyonu.....	52
Şekil 30. DTBP konsantrasyonunun toplam selülaz aktivitesi üzerindeki etkisi.....	53
Şekil 31. DTBP konsantrasyonunun sellobiohidrolaz aktivitesi üzerindeki etkisi.	53
Şekil 32. DTBP konsantrasyonunun endoglukanaz aktivitesi üzerindeki etkisi.....	54
Şekil 33. Doğal ve DTBP ile çapraz bağlanmış selülazların toplam selülaz aktivitesinin 65 °C de ısı inaktivasyon eğrileri.....	54
Şekil 34. Doğal ve DTBP ile çapraz bağlanmış selülazların toplam selülaz aktivitesinin 67.5 °C de ısı inaktivasyon eğrileri.....	55
Şekil 35. Doğal ve DTBP ile çapraz bağlanmış selülazların toplam selülaz aktivitesinin 70 °C de ısı inaktivasyon eğrileri.....	55
Şekil 36. Doğal ve DTBP ile çapraz bağlanmış selülazların toplam selülaz aktivitesinin 72.5 °C de ısı inaktivasyon eğrileri.....	55
Şekil 37. Doğal ve DTBP ile çapraz bağlanmış selülazların toplam selülaz	

aktivitesinin 75 °C de ısı inaktivasyon eğrileri.....	56
Şekil 38. DMS konsantrasyonunun β -glukosidaz aktivitesine olan etkisi.....	57
Şekil 39. Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış β -glukosidaz aktivitesinin 55 °C de ısı inaktivasyonu.....	57
Şekil 40. Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış β -glukosidaz aktivitesinin 57.5 °C de ısı inaktivasyonu.....	58
Şekil 41. Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış β -glukosidaz aktivitesinin 60 °C de ısı inaktivasyonu.....	58
Şekil 42. Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış β -glukosidaz aktivitesinin 62.5 °C de ısı inaktivasyonu.....	58
Şekil 43. Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış β -glukosidaz aktivitesinin 65 °C de ısı inaktivasyonu.....	59
Şekil 44. Doğal ve DTBP ile çapraz bağlanmış β -glukosidaz aktivitesinin 55 °C de ısı inaktivasyonu.....	60
Şekil 45. Doğal ve DTBP ile çapraz bağlanmış β -glukosidaz aktivitesinin 57.5 °C de ısı inaktivasyonu.....	60
Şekil 46. Doğal ve DTBP ile çapraz bağlanmış β -glukosidaz aktivitesinin 60 °C de ısı inaktivasyonu.....	60
Şekil 47. Doğal ve DTBP ile çapraz bağlanmış β -glukosidaz aktivitesinin 62.5 °C de ısı inaktivasyonu.....	61
Şekil 48. Doğal ve DTBP ile çapraz bağlanmış β -glukosidaz aktivitesinin 65 °C de ısı inaktivasyonu.....	61

Şekil 49. <i>Trichoderma reesei</i> kullanılarak β -glucosidaz üretim grafiği.....	62
Şekil 50. Doğal β -glucosidaz'ın ısı dayanıklılık eğrisi.....	64
Şekil 51. DMS konsantrasyonunun β -glucosidaz aktivitesi üzerindeki etkisi.....	65
Şekil. 52. DMA konsantrasyonunun β -glucosidaz aktivitesi üzerindeki etkisi.....	65
Şekil 53. DTBP konsantrasyonunun β -glucosidaz aktivitesi üzerindeki etkisi.....	65
Şekil 54. Toplam selüloz aktivitesi için 65 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.....	68
Şekil 55. Toplam selüloz aktivitesi için 67.5 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.....	69
Şekil 56. Toplam selüloz aktivitesi için 70 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.....	69
Şekil 57. Toplam selüloz aktivitesi için 72.5 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.....	69
Şekil 58. Toplam selüloz aktivitesi için 75 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.....	70
Şekil 59. Sellobiyohidrolaz için 65 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.....	70
Şekil 60. Sellobiyohidrolaz için 67.5 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.....	71
Şekil 61. Sellobiyohidrolaz için 70 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.....	71
Şekil 62. Sellobiyohidrolaz için 72.5 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.....	71
Şekil 63. Sellobiyohidrolaz için 75 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.....	72
Şekil 64. Endoglukanaz için 65 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.....	72
Şekil 65. Endoglukanaz için 67.5 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.....	73
Şekil 66. Endoglukanaz için 70 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.....	73
Şekil 67. Endoglukanaz için 72.5 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.....	73
Şekil 68. Endoglukanaz için 75 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.....	74
Şekil 69. β -glucosidaz için 55°C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.....	74
Şekil 70. β -glucosidaz için 57.5°C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.....	74

Şekil 71. β -glukosidaz için 60°C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.....	75
Şekil 72. β -glukosidaz için 62.5°C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.....	75
Şekil 73. β -glukosidaz için 65°C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.....	75
Şekil 74. Sellobiyohidrolaz ve β -glukosidaz'ın Arrhenius grafikleri.....	76

SİMGELEME

CMC	Karboksimetil selüloz
DEAE	Dietilenaminoetil
DMA	Dimetil adipimidat
DMS	Dimetil suberimidat
DTBP	Dimetil-3,3'-dithiobispropionimidat
EU	Enzim ünitesi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
ΔG_{stab}	Kararlılık serbest enerjisi

ÖZ

Bu araştırmanın amacı selüloz reaktörlerinde süreç verimini artırmak amacıyla ile selüloz enzim kompleksini bisimidoesterler grubundan çapraz bağlayıcılar kullanarak çapraz bağlayarak ısı dayanıklılığını artırmak ve çapraz bağlanmış enzim sisteminin ısı inaktivasyonunu doğal enzimin ısı inaktivasyonu ile karşılaştırarak incelemektir.

Selüloz, selülozu önce oligosakkaritlere ve en sonunda da glikoza parçalayan, üç farklı bileşene sahip kompleks bir enzim sistemidir. Bu bileşenler endoglukanaz (EC 3.2.1.4), sellobiyohidrolaz (EC 3.2.1.91) ve β -glukosidaz (EC 3.2.1.21) olarak adlandırılır. Selüloz enzimleri *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Trichoderma* gibi mikroorganizmalar tarafından üretilirler.

Araştırmada *Trichoderma reesei* selülozu ve çapraz bağlayıcı olarak bisimidoester grubundan değişik çapraz bağlama boylarına sahip üç değişik çapraz bağlayıcı (dimetil suberimidat (DMS), dimetil adipimidat (DMA) ve dimetil-3,3'-dithiobispropionimidat (DTBP)) kullanıldı. Serbest amino gruplarını birbirine bağlayan bisimidoesterlerin çapraz bağlayıcı olarak seçilmesinin nedeni, selülozların aktif bölgelerinde katalitik fonksiyonu olan ve amino grubu içeren bazı amino asitlerden bulunmamasıdır.

DMS ile çapraz bağlama hem selüloz kompleksi hem de bileşenlerinin aktivitelerini hemen hemen hiç düşürmedi. Öte yanda DMA ve DTBP enzimlerin aktivitelerinde % 10-15 civarında düşümlere yol açtı. Bu sonuçlar da DMS'in boyunun (11Å) molekülleri çapraz bağlamaya daha uygun olduğunu gösterdi.

Selüloz kompleksinin ısı dayanıklılığını DMA azaltırken, en olumlu etki DMS ile alındı. DMS ile çapraz bağlama sonucu olan bu olumlu etki en çok β -glukosidaz enziminde

% 1-5 arasında görüldü. Ancak ısı dayanıklılıktaki artış miktarı endüstriyel kullanımda verimi artırabilecek ölçüde büyük değildi.

Anahtar kelimeler: Selülaz , Sellobiohidrolaz, endoglukonaz, β -glukosidaz, çapraz bağlama, ısı dayanıklılık ve bisimidoester.

ABSTRACT

The aim of this study was to increase the process efficiency of cellulase reactors by increasing the heat stability with the help of crosslinking the cellulase complex and to study the thermal inactivation of crosslinked cellulase by comparison with the native one.

Cellulase is an enzyme complex containing at least three different components, endoglucanase (EC 3.2.1.4), cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) and β -glucosidase (EC 3.2.1.21) that hydrolyze cellulose to oligosaccharides and finally glucose and produced by many microorganisms like *Aspergillus*, *Fusarium* and *Trichoderma* species.

In this study *Trichoderma reesei* cellulase and three different crosslinkers having different crosslinking distances (dimethyl suberimidate (DMS), dimethyl adipimidate (DMA) ve dimethyl-3,3'-dithiobispropionimidate (DTBP)) were used. Bisimidoesters which link free amino groups to each other, were selected since no basic amino acid residue was reported in the active site of cellulases.

Crosslinking with DMS did not decrease the activities of both total cellulase complex and its components significantly. On the other hand, DMA and DTBP crosslinking decreased the activities around 10-15%. The results suggested the suitability of the length of DMS for crosslinking cellulases.

While thermal stability of cellulases decreased by DMA, increases were obtained with DMS. Although most significant changes were observed with β -glucosidase, the increases are in the range of 1-5% which is not sufficient to increase the efficiency of cellulases in industry.

Keywords: Cellulase, cellobiohydrolase, endoglucanase, β -glucosidase, crosslinking, thermostability and bisimidoesters.

1. GİRİŞ

Selüloz dünya üzerinde en çok bulunan ve yaklaşık 8,000-12,000 glukoz molekülünün β -1→4 glukosidik bağlarla lineer bir şekilde bağlanması ile oluşan bir homo-polimerdir. Genel olarak bitkilerin hücre duvarlarında ve denizlerde yaşayan aljilerde bulunmasına karşılık bakteriler, bazı deniz canlıları gibi değişik birçok organizma tarafından da üretilmektedir. Yıllık üretim miktarı 7.5×10^{10} ton olarak tahmin edilmektedir (Kubicek ve ark., 1993). Yıllık üretim miktarı düşünüldüğünde anlaşılacağı gibi gelecekte enerji, kimyasal ve gıda üretimi için kaynak olarak kullanılmaya çok uygun bir hammaddedir.

Birçok bitkisel atık içinde çok miktarda bulunan bu polimer, değişik amaçlarla kullanılmak üzere, şeker şurubu haline dönüştürülebilir. Bu amaçla kullanılacak iki yol vardır: kimyasal ya da enzimatik. Kimyasal yöntemde asitleme yolu ile selüloz hidroliz edilmektedir. Bu yöntemin dezavantajları arasında çok miktarda asit kullanılması, bu işlemin toksik ve korosif etkileri, istenmeden oluşan yan ürünler ve dolayısıyla saf bir glukoz şurubu elde edilemeyişi sayılabilir. Enzimatik yöntemde ise selülozun tam olarak hidroliz edilebilmesi için birden fazla enzime ihtiyaç duyulmaktadır. Selülaz enzim kompleksi en az üç değişik enzimden oluşmakta - endoglukanaz, sellobiyohidrolaz ve β -glukosidaz - ve selüloz bu üç enzimin birlikte çalışması ile enzim reaktörlerinde önce suda çözünen oligosakkaritlere daha sonra da glukoz şurubu haline çevrilmektedir. Enzimatik hidroliz süreç koşullarının rahatlığı (yüksek sıcaklık, ekterm pH vs.'ye ihtiyaç duyulmaması), reaksiyonların yüksek seçiciliği nedeni ile istenmeyen yan ürün üretiminin olmaması ve ürünün tam saflıkta olması, süreçlerin daha kolay kontrol edilmesi, enerji gereksinmesinin az olması gibi nedenlerden dolayı kimyasal hidrolize tercih edilmektedir.

Bu yöntemin dezavantajları yüksek enzim fiyatları ve enzimlerin dayanıksız moleküller oluşudur, ancak geliştirilen yeni teknolojilerle daha dayanıklı enzimlerin daha ucuza üretilip satışa çıkarılması bu dezavantajları en aza indirmektedir. Bu aşamadan sonra, gıda ve yem sanayilerinde, biyoteknoloji sanayi kollarında (fermentasyon ortamı olarak değişik mikroorganizmaların üretilmesinde, şekerin etanole çevrilerek enerji üretiminde) kullanılabilir. Selüloz ayrıca selülozu şeker şurubuna çevirme amacından ayrı olarak, tekstil sanayiinde kot kumaşlarının beyazlatılmasında, pamuklu kumaşların yüzeylerinin daha düzgün hale getirilmesinde, lignin üretiminde, bitkisel kaynaklardan çeşitli tat maddeleri, enzimler, polisakkaritler vs üretmek amacı ile hücre duvarlarının kırılmasında da kullanılmaktadır (Mandels, 1985).

Selüloz-selüloz reaktörlerine gelince, selülozun suda çözünmemesinden ayrıca doğal olarak genellikle hemiselüloz ve ligninle beraber çok kompleks bir yapı oluşturduğundan dolayı, substratı rahatça parçalayabilmek için hammaddeye bir ön işlem (ısıtma, buharlama, fiziksel parçalama vs) uygulanmakta buna ek olarak ta enzim moleküllerinin suda çözünür durumda olmaları hidroliz işlemini kolaylaştırmaktadır. Kullanılan reaktör tipleri de bu uygulamaya uygun olarak kullanılabilir karıştırılmalı tank reaktörlerdir. Bu reaktörlerde çözünmüş selülozun geri kazanılmasındaki güçlüklerden ötürü genellikle kesikli biçimde kullanılmakla beraber sürekli olarak da kullanılabilirler. Ayrıca hidroliz işlemi ve hammadde ön işleminin (cam bilyelerle yapılan parçalama işlemi) birlikte yapılabilirdiği 'aşındırılmalı reaktörler' de karıştırılmalı tank reaktörlerdir (Ryu ve Lee, 1983).

Enzimatik süreçlerde, enzim reaksiyonlarının ekonomik olabilmesi büyük ölçüde enzimin reaksiyon şartlarında etkili olarak kullanıldığı süreye, bir başka deyişle de yarılanma ömrüne bağlıdır. Reaksiyonların yüksek sıcaklıklarda yapılabilmesi reaksiyon

hızını artırıp süreç süresini düşürerek verimini artırmak, reaksiyon ortamının viskozitesini düşürerek enerji tasarrufu sağlamak, reaksiyon ortamında istenmeyen mikroorganizmaların çoğalması riskini düşürmek gibi çok önemli avantajlar sağlamaktadır. Enzimler biyolojik molekülleri olduklarından -termofilik organizmalardan elde edilenleri hariç- yüksek sıcaklıklarda kullanmaya pek elverişli değildirler ve çok çabuk aktivitelerini kaybederler. Dolayısıyla endüstriyel uygulamalarda daha verimli sonuçlar elde edebilmek için, yüksek sıcaklıklarda kullanılmaya dayanıklı, (ısıya dayanıklı) enzim ya da enzim komplekslerine ihtiyaç vardır.

Enzimlerin dayanıklılıklarını artırmak amacı ile tutuklama metodu sıklıkla kullanılan bir methodur ancak metodunun selüloz-selülaz sistemi için, selülozun suda çözünür olmamasından dolayı verimli olarak kullanılması zor görülmektedir. Bu durumda selülaz moleküllerinin dayanıklılıkları indirekt olarak reaktör ortamına koruyucu bir takım maddelerin (bazı suda çözünür polimerler, şekerler, alkoller, tuzlar vs)ilavesi ile artırılabilir. Ortama konulan bu maddelerin reaksiyonları yavaşlatmaması, durdurulmaması gerekmektedir, ayrıca son üründen ayrılmaları da problemlili olabilir. Enzimlerin dayanıklılıklarını artırmak için uygulanabilecek bir diğer metod da enzimlerin yapılarının protein mühendisliği veya değişik kimyasallar yardımı ile değiştirilmesidir.

Bu çalışmada selülaz moleküllerinin yapıları kimyasal bir metolla (molekülleri kendi içlerinde çapraz bağlayarak) değiştirerek ısıya daha dayanıklı bir hale getirilmeye çalışılmıştır. Çapraz bağlama kurulan kovalent bağlar yardımı ile enzimlerin ısı işlem sırasında açılmalarını engelleyerek ısı dayanıklılıklarını artırabilmektedir. Oluşturulacak bu enzimlerin hidroliz verimini yüksek tutmak için suda çözülmüş olarak kesikli reaktörlerde kullanılması düşünülmüştür.

Çalışmada çapraz bağlamayıcı olarak bisimidoesterler grubundan üç değişik boyda kimyasal kullanılmış ve çapraz bağlamanın selülazın ısı dayanıklılığı üzerindeki etkisi doğal enzimin ısı dayanıklılığı ile karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. Literatürde selülazın çapraz bağlanması ile ilgili bir bilgi mevcut olmadığı için sonuçlar literatürdeki bu boşluğu doldurmuş ve çapraz bağlama selülaz kompleksinin ısı dayanıklılığını artırmasa da, çapraz bağlamanın enzimlerin aktivitelerini değiştirmediği için bisimidoesterlerin değişik amaçlarla selülaz bileşenlerinin çapraz bağlanmasında kullanılabileceğini göstermiştir.

Bu çalışma sırasında proje öneri formunda yapılması planlanan çalışmalarda bazı değişiklikler yapılmıştır. Proje önerisinde ticari selülaz kompleksi ile çalışılacağı ve öncelikle kompleksin bileşenlerine ayrılacağı, daha sonra da saflaştırılan enzimlerin tek tek çapraz bağlanarak ısı inaktivasyonlarına bakılacağı belirtilmişti. Bu yolla tek tek değişik çapraz bağlayıcılarla bağlanan enzimler sürecin amacına uygun oranlarda birbiri ile karıştırılıp kullanılacaktı. Bu yol en uzun ve zahmetlisi olsa da, bilimsel açıdan en doğru sonucu vereceği için önerilmişti. Ancak için ekonomik yönü düşünöldüğünde, ilk olarak enzimleri birbirinden ayırmadan çapraz bağlama işleminin yapılması, çapraz bağlamanın enzimlerin bireysel aktiviteleri ve toplam selülaz aktivitesi üzerindeki etkilerinin incelenmesinin daha uygun olduğuna karar verildi. Eğer enzimleri ayırmadan toplam selülaz sisteminin ısı dayanıklılığı artırılabilirse, endüstri açısından çok daha ekonomik, dolayısı ile de pratikte uygulanabilme olasılığı daha yüksek olan bir çözüm bulunmuş olacaktı. Ayrıca bu yöntem araştırmanın sarf malzeme giderini de kısmen azaltacağı için daha uygun göröldü. Dolayısı ile selülazın saflaştırılması ilk sıradan alındı ve ilk sıraya selülazın saflaştırılmadan çapraz bağlanması getirildi. Bir diğer değişiklik te selülaz

kompleksinde β -glukosidaz enzimi çok az miktarda bulunduğu için bu enzimin *T. reesei* fermentasyonu ile üretilip kısmi saflaştırılması ve çapraz bağlama işleminin yapılması oldu. Bu çalışmaya bir ön çalışma olarak da satın alınan saf (Sigma) β -glukosidaz ile çapraz bağlama ve ısı inaktivasyon işlemleri yapıldı.

1.1. Enzimlerin Isıl İnaktivasyon Mekanizması

Enzimlerin katalitik fonksiyonları olan birer protein molekülü olduğunu düşünürsek, ısı inaktivasyon mekanizmasını anlayabilmek için öncelikle proteinlerin 3-boyutlu yapılarının nasıl oluştuğuna bakmamız gerekir. Proteinler yapıları amino asit dizilimlerine ve içinde buldukları ortamın fiziksel parametrelerine bağlı olarak değişen dinamik sistemlerdir. Genel olarak proteinlerin dayanıklılığı molekül içi ve moleküller arası etkileşimlerin nazik dengesine bağlıdır ve kararlılık serbest enerjisi (ΔG_{stab}) proteinin nasıl denature olduğuna bakmaksızın 60 kJ/mol civarında bulunmuştur. Proteinin 3-boyutlu kompakt yapıyı kazanırken dayanıklılığını pozitif veya negatif yönde etkileyen birçok etkileşimin getirdiği serbest enerjiler düşünülürse, ΔG_{stab} 'nin büyük sayılar arasındaki küçük bir fark olduğu görülür (Jaenicke, 1991). Sulu ortamlarda protein yapısını belirleyen etkileşimlere gelince, bunları hidrofobik etkileşimler, elektrostatik etkileşimler, Van der Waals etkileşimleri, hidrojen bağları olarak sıralayabiliriz. Bu etkileşimlerin hiç birinde kovalent bağ kurulmadığı için de protein yapılarının çok dayanıklı olduğu söylenemez.

Proteinlerin inaktivasyonu birçok konformasyonel değişimden sonra molekülün tamamen açılmasına, bir başka deyişle 3-boyutlu yapının kaybedildiği bir amino asit zinciri haline gelmesine neden olur. Genel olarak inaktivasyon, bu süreçteki değişimler tek tek düşünülmeden, iki basamaklı bir süreç olarak düşünülebilir:

$$N \leftrightarrow I \Rightarrow D$$

Bu denklemdeki N, I ve D harfleri sırasıyla proteinin doğal, geçiş ve denature olmuş durumlarını göstermektedir. İnaktivasyon genelde tersinir konformasyon değişiklikleri ile başlar ve agregasyon, amino asit zincirinde veya konformasyonda oluşan dönüşü olmayan değişimlerle sonuçlanır (Zentgraf ve Ahern, 1991). Buradan yola çıkarak proteinlerin dayanıklılıklarını artırmak için en genel stratejinin inaktivasyonun ilk basamağı olan tersinir çözülme engellemenin olduğunu söyleyebiliriz (Klibanov ve Mozhaev, 1978).

1.2. Protein Dayanıklılığının artırılması

Genelde proteinlerin dayanıklılığını artırmak için değişik metodlar kullanılmaktadır. Bunları tutuklama, dayanıklılığı artırıcı katkı maddelerinin kullanılması, molekülde kimyasal değişiklikler yapılması, yönlendirilmiş mutasyon yoluyla protein mühendisliği ve ekstrem şartlarda yaşayan mikroorganizmaları izole ederek bunların salgıladığı dayanıklı enzimlerin üretilmesi olarak sıralayabiliriz.

1.2.1. Tutuklama metodu ile Dayanıklılığın Artırılması

Tutuklanmış enzim suda çözünmeyen bir taşıyıcıya ya da birbirine bağlanmış, veya yine suda çözünmeyen bir yapıda hapsedilmiş böylelikle de suda çözünür halden çözünmez hale geçmiş enzim olarak tanımlanabilir. Tutuklanmış enzim yapmanın en önemli amaçlarından biri enzimin suda çözünmez duruma geçerek daha uzun süre kullanılabilmesidir. Tutuklama metoduna ve enzimin yapısına bağlı olarak enzimin aktivitesinde ve özelliklerinde hiç bir değişiklik olmadığı gibi pozitif veya negatif yönde büyük değişiklikler olabilmektedir. Pozitif yönde olan değişikliklerden biri de enzimi dış

etkilerden koruduğu, eğer varsa taşıyıcı ile veya moleküller arasında kurulan kovalent bağlarla yapının açılmasını zorlaştırdığı ve ortamın hücre içi doğal ortama daha çok benzediği için dayanıklılığın artmasıdır (Gianfreda ve Scarfi, 1991). Örnek olarak β -glukosidaz'la yapılan bir çalışma gösterilebilir. Bu çalışmada enzim dextran ile konjugat edilerek silika üzerine tutuklanmıştır. İlk işlem olan konjugasyon sonunda enzimin optimal sıcaklığı ve ısıl dayanıklılığı artmış, tutuklama işlemi sonucunda ise ısıl dayanıklılığındaki artış daha yüksek seviyelere varmıştır (Fagain ve O'Kennedy, 1991).

1.2.2. Katkı Maddeleri ile Dayanıklılığın Artırılması

Sulu ortamlarda kullanılırken, saklanırken, dondurulurken ya da dondurmali kurutma sırasında birçok değişik kimyasal proteinlerin dayanıklılığını artırmaktadır. Bu kimyasallar substratlar, özel ligantlar, tuzlar, gliserol, proteinler indirgeme ve metalleri tutucu ajanlar gibi çok değişik kapsamlı maddelerdir (Fagain O'Kennedy, 1991).

1.2.3. Kimyasal Değişiklikler Yolu ile Dayanıklılığın Artırılması

Enzimler çok değişik yollarla kimyasal olarak değişikliğe uğratılabilir. Bu gibi reaksiyonların kimyaları iyi bilinmektedir ve bu amaçla kullanılabilir çok sayıda kimyasal bulunmaktadır. Kimyasal değişiklik metodu protein mühendisliğine bir alternatif olarak gösterilebilir ve çok daha az yapısal bilgiye ihtiyaç duyulduğu, deneyler kolay olduğu ve sonuçlara kolay ulaşıldığı için birçok durumda tercih edilmektedir. Kimyasal değişiklikler yolu ile dayanıklılığın artırılması metodları dört ana başlıkta toplanabilir (Fagain ve O'Kennedy, 1991).

- a. iki fonksiyonlu kimyasallar yardımı ile çapraz bağlama,
- b. hidrofobik kimyasallar yardımı ile hidrofobik etkileşimlerin

güçlendirilmesi,

- c. Yapıya yeni iyonik ve hidrojen bağlar kazandırabilmek için yeni polar ya da yüklü gruplar eklemek,
- d. protein yüzeyine daha hidrofilik bir yapı kazandırarak dayanıklılığı bozan yüzey hidrofobik etkileşimlerini azaltmak

1.2.4. Protein Mühendisliği Yolu ile Dayanıklılığın Artırılması

Protein mühendisliği enzim inaktivasyonuna neden olan değişimleri engellemek amacı ile yapılır. Rekombinant DNA teknikleri ile yapılan yönlendirilmiş mutasyon ile proteinlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerini değiştirmek ve hatta yeni yapılar oluşturmak mümkün olmaktadır. Bu iş için öncelikle proteinin amino asit dizilimi, ve 3-boyutlu yapılarını bilmek ve protein dayanıklılığında önemli olan yapısal düzenlemeleri yapmak gerekmektedir.

1.2.5. Doğal Olarak Bulunan Dayanıklı Proteinler

Dayanıklı proteinler elde etmenin bir başka yolu da ekstrem şartlarda yaşayan organizmaları bulup, istenilen enzimleri üretip üretmediğine bakmaktır. Eğer üretiyorsa enzimin geni izole edilip daha uygun başka bir mikroorganizma içine transfer edilip, üretilir. Bu yöntemin dezavantajı doğadan bulunan çok sayıda mikroorganizmayı test etmek yorucu ve zahmetlidir.

1.3. Çapraz Bağlama

Çapraz bağlama kimyasal bir metoddur. Bu metod da protein molekülleri kendi içlerinde, başka moleküllere ya da sabit bir tutucuya değişik kimyasallar yardımı ile bağlanırlar. Genellikle ısı işleminden dolayı olan inaktivasyon proteinlerin ikincil ve üçüncül yapılarının bozulmasından kaynaklanmaktadır. Bu yapılarda hidrojen, elektrostatik,

hidrofobik gibi kuvvetli olmayan bağlarla oluştuğu için moleküle çapraz bağlayıcı yardımı ile kovalent bağlar eklenir ve ısı işlem sırasında molekülün kolayca açılması önlenmiş olur. Eğer uygun bir çapraz bağlayıcı bulunabilirse ve proteinin yapısı ve aktivitesi bozulmaz ise. proteinin ısı dayanıklılığı artabilir (Wong ve Wong, 1992).

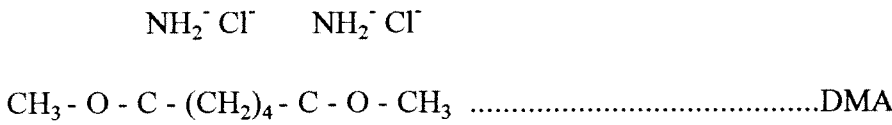
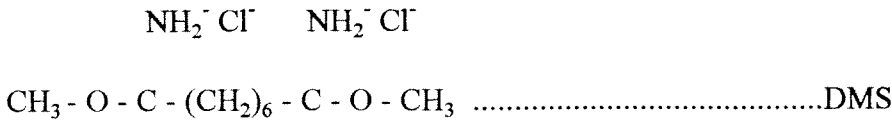
1.3.1. Çapraz Bağlayıcı Kimyasalların Genel Özellikleri

Çapraz bağlayıcılar genel olarak iki gruba ayrılabilir. Bağladıkları grupların arasına mesafe koyanlar ve koymayanlar. Araya mesafe koymayanlar çapraz bağlanacak iki grubu direk olarak birbirine bağlarlar. Diğer çapraz bağlayıcıların ise belli uzunlukları vardır ve bu uzunlukların ucunda birbirinin aynı ya da değişik iki reaktif grup bulundurlar.

1.3.2. İmidoesterler

İmidoesterler homo-iki fonksiyonlu çapraz bağlayıcı grubuna girerler. Fonksiyonel grupları arasında belli bir mesafe vardır ve fonksiyonel grupları da bazik ortamda aminlerle reaksiyona girerek imidoaminleri oluşturur. Proteinlerin yapısında kimyasal değişiklik yapmak için kullanılan bu kimyasalların birçok avantajı vardır. Reaksiyonlar oda sıcaklığında ve pH 7 ile 10 değerleri arasında olur. Proteinlerde bulunabilen birçok değişik reaktif grup arasında sadece amin grupları ile reaksiyona girer ve çapraz bağlama işleminden sonra fizyolojik pH değerlerinde aminler gibi artı bir yük taşırlar (Means ve Ludwig, 1962). ϵ - ve α - amino gruplarının ikisinde kimyasal tepkimeye girer (Hunter ve Ludwig, 1962). Reaksiyon hızı pH'a çok bağlıdır (Hand ve Jenks, 1962). Bu çalışmada kullanılan dimetil suberimidat, dimetil adipimidat ve dimetil-dithiobis propionimidat imidoesterler grubuna girerler ve çapraz bağlama boyları birbirinden farklıdır. DMA, DMS ve DTBP'nin çapraz

bağlama boyları sırasıyla 9,11 ve 13 Å'dur. DMA, DMS ve DTBP'nin kimyasal formülleri aşağıda sırasıyla gösterildiği gibidir (Ji, 1983):



1.3.3. Çapraz Bağlama Çalışmaları

Proteinlerin dayanıklılıklarını artırmak için değişik çapraz bağlayıcılar kullanılarak yapılan birçok çalışma literatürde mevcuttur; glüteraldehid kullanılarak laktat dehidrogenazın ısı inaktivasyon başlangıç sıcaklığı 5 °C kadar artırılmıştır (Gottschalk ve Jaenicke, 1987). Gliseraldehid-3-fosfat imidoesterler kullanılarak çapraz bağlanmış ve maksimum dayanıklılık artışı dimetilpimelimidat ile sağlanmıştır (Torchilin ve Trubetskoy, 1984). Bir başka çalışmada tripsin imidoesterler kullanılarak çapraz bağlanmış ve dayanıklılığı artırılmıştır (Rajput ve Gupta, 1988). İmidoesterler kullanılarak çapraz bağlanan *Bam*HI enziminin ısı dayanıklılığı beş defa artırılmıştır (Dubey ve ark., 1989).

Glukoamilazın ısı dayanıklılığı imidoesterler kullanılarak iki kat artırılırken(Tatsumoto ve ark., 1989) kymotripsinin ısı dayanıklılığının kullanılan çapraz bağlayıcıların boyu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Wong ve Wong, 1992). Penisilin asilaz ile yapılan çalışmalarda ise imidoesterler kullanılarak enzimin yarılanma ömrü özellikle 40 - 50 °C'ler arasında önemli ölçüde arttırılmıştır (Erarslan ve Koçer, 1992).

1.3.4. Selüloz Kompleksi

Selüloz içerisinde en az üç değişik enzim içeren bir enzim kompleksidir. Bu üç enzim endoglukanaz, sellobiohidrolaz ve β -glukosidaz olup selüloz moleküllerini önce oligosakkaritlere en sonunda ise glukoza parçalarlar.

Endoglukanazlar (EC 3.2.1.4) selüloz polimerini molekülün iç bölgelerinden rastgele parçalarlar. Sellobiohidrolazlar (EC 3.2.1.91) molekülün indirgen ucundan sellobioz üniteleri ayırırlar. β -glukosidaz'lar ise (EC 3.2.1.91) sellobiozları glukoza haline dönüştürürler (Singh ve Hayashi, 1995).

1.3.5. Selüloz Üreten Mikroorganizmalar

Selüloz polimerini parçalayan bu enzim kompleksi birçok değişik mikroorganizma tarafından üretilmekte ve hücre dışına salınmaktadır. Bu mikroorganizmalar arasında en önemlileri değişik iplikli küflerdir. Bu küfler arasında en önemlileri de *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* olarak sıralanabilir. Selüloz üreten bakteriler arasında aktinomisetler önemli bir yer tutarlar ki bunlar arasında en önemlileri *Streptomisetler*, *thermoaktinomisetler* dir. Anaeroblar arasındada *Clostridium thermocellum*'dan bahsedilebilir (Singh ve Hayashi, 1995).

1.3.6. Selülaz kompleksi moleküllerinde yapılan kimyasal değişiklikler

Selülaz enzimleri ile yapılan kimyasal değişiklikler daha çok yapısal araştırmalarla, aktif bölge değişiklikleri ile ve selülazın reaktör ortamından ayrılabilmesi ile ilgilidir. Örneğin Singh ve Hayashi (1995) *Schizophyllum commune* 'den elde edilen endoglukanazın seluloz hidrolizinde asidik bir amino asit yan grubunun görev aldığı enzim molekülünde yapılan kimyasal değişiklikler yolu ile anlaşılmıştır. Evans ve arkadaşları (1993) sellobiyohidrolaza pentaaminrutenyum bağlayarak aktivitesini bir parça artırırken, Mata ve arkadaşları da (1993) β -glukosidazı kimyasal değişikliklere uğratarak aktif bölgesini incelemişlerdir. Tutuklama çalışmaları genellikle β -glukosidaz ile yapılmıştır (substratı çözünür olduğu için) ama sonuçları çok başarılı olmasa da endoglukanaz ve sellobiyohidrolaz ile yapılanları da vardır (Simionescu ve Popa, 1987,1990). Yeni olan bir çalışmada da selülaz *S. cerevisiae*'nın hücre duvarına genetik yolla aktif olarak immobilize edilmiştir (Murai ve arkadaşları, 1997).

Park ve Kajiuchi (1995) selülaz moleküllerine aktivitesini ve reaktör ortamından kolay ayrılmasını sağlamak amacı ile amfilik polimer molekülleri ekleyerek moleküllerde değişiklikler yapmıştır. Oluşan bu moleküllerin ısıya, pH ve organik çözücülere karşı daha dayanıklı olduğu bildirilmiştir. Detaylı ısıl deaktivasyon çalışmaları yapılmamakla beraber selülaz için kullanılan biyodönüşüm sıcaklığı olan 50 °C'de 90 saatlik bir kullanım sonucunda kimyasal olarak değiştirilmiş enzimin % 90'ının deaktive olmadığı belirtilirken bu oran doğal enzimde % 80 olarak verilmiştir.

2. DENEYSEL

2.1. Malzeme

Selülaz enzim kompleksi NOVO'nun İstanbul temsilciliği tarafından temin edilmiştir. Avisel (mikro kristal selüloz) ve p-nitrofenol Merck AG'den, β -glukosidaz, karboksimetil selüloz, p-nitrofenol- β -glukopiranosid, bisimidoesterler (DMS, DMA ve DTBP) Sigma' dan alınmıştır. Araştırmada kullanılan diğer bütün kimyasallar Sigma, Merck veya Bio-Rad' dan temin edilmiş olup analitik saflıktadır.

2.2. Metodlar

2.2.1. Selülaz aktivite tayini:

Literatürde incelenen her çalışmada toplam selülaz, endoglukanaz, sellobiyohidrolaz ve β -glukosidaz aktivitelerini ölçmek için birbirinden az ya da çok farklı metodların kullanıldığı görülmüştür. Kullanılan metodunun doğru sonuç verebilmesi ve sonuçların tekrarlanabilir olması açısından deneylerde kullanılacak aktivite ölçüm metodlarının reaksiyon hızı ve zaman ilişkileri incelenmiş, en hassas ve uygun değerler (substrat cinsi, konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve zaman) kullanılmıştır. Aşağıda belirtilen metodlarda önceden belirlendikten sonra kullanılan bu uygun değerler verilmiştir.

- Toplam selülaz aktivitesi:

- Toplam selülaz aktivitesini belirlemek için 1 numaralı Whatman filtre kağıdı substrat olarak kullanıldı.
- Toz halinde bulunan ticari enzim pH 4.8, 0.1 M asetat tamponu içinde çözülür. Çözünmeyen çökeltiler soğutmalı santrifuj ile ayrılır.

- 1.5 ml 50 °C' ye getirilmiş enzim solüsyonuna 50 mg ağırlığındaki (1cm x 6 cm) kesilerek rulo haline getirilmiş filtre kağıdı yerleştirilir.
- 50 °C' de 20 dakika beklenir. Enzim-substrat reaksiyonu tüpün kaynayan su banyosunda 5 dakika bekletilmesiyle durdurulur.
- Filtre kağıdı çıkartılır ve indirgen şeker miktarına Nelson-Somogyi metodu (Nelson, 1944) kullanılarak bakılır.
- Verilen reaksiyon süresi içinde oluşan şeker miktarı enzim aktivitesi ünitesine dönüştürülür. Bir ünite toplam selüloz aktivitesi kullanılan reaksiyon koşulları altında bir dakikada 1 µmol indirgen şekeri ortama çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.
- **Sellobiyohidrolaz aktivitesi:**
- Selülazın bu bileşeni için özel bir substrat olmamasına rağmen, Avicel ile sellobiyohidrolazın aktivitesi diğer iki bileşene göre çok yüksek olduğu için genellikle diğer substratlara göre tercih edilmektedir (Ghose, 1987).
- % 1(a/h) Avisel pH 4.8, 0.1 M asetat tamponu içinde hazırlanmaktadır. 1 ml substrat solüsyonu bir ml enzim solüsyonu ile karıştırılır.
- 50 °C'deki su banyosunda 15 dakika bekletilir.
- Reaksiyon kaynayan su banyosunda 2 dakika tutularak durdurulduktan ve kullanılmayan Aviselin santrifuj ile ayrılmasından sonra indirgen şeker miktarına Nelson-Somogyi metodu yardımı ile bakılır (Nelson, 1944).
- Enzim aktivitesi hesaplanır. Bir ünite sellobiyohidrolaz aktivitesi kullanılan reaksiyon koşulları altında bir dakikada 1 µmol indirgen şekeri ortama çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

■ **Endo-1,4-β-glukanaz aktivitesi:**

- Substrat olarak karboksimetil selüloz (CMC) kullanılmıştır.
- pH 4.8, 0.1 M asetat tamponu içerisinde %1 (a/h) CMC solüsyonu hazırlanır.
- Eşit hacimdeki enzim ve substrat solüsyonları karıştırılır ve 50 °C'deki su banyosunda 15 dakika bekletilir.
- Reaksiyon Nelson solüsyonu ilave edilerek durdurulur ve ortamdaki indirgen şeker miktarına Nelson-Somogyi metodu ile bakılır.
- Enzim aktivitesi hesaplanır. Bir ünite endo-1,4-β-glukanaz aktivitesi kullanılan reaksiyon koşulları altında bir dakikada 1 μ-mol indirgen şekeri ortama çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

■ **β-glukosidaz aktivitesi**

- Substrat olarak 2.5 mM p-nitrofenil-β-D-glukopiranosid kullanılmıştır.
- Deneyden hemen önce hazırlanan 0.1 ml substrat solüsyonu 0.8 ml pH 4.8'de hazırlanmış 0.1 M asetat tamponuna ilave edilip 37 °C'deki su banyosunda bir süre bekletilmiş ve 0.1 ml enzim solüsyonu ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır.
- Zamana karşı numuneler alınıp reaksiyon 2 ml 1M sodyum karbonat solüsyonunun ilavesi ile durdurulmuştur.
- Solüsyonların absorbanları 405 nm'de ölçülmüştür.
- Standart olarak p-nitrofenol solüsyonları kullanılmıştır.
- Bir ünite β-glukosidaz 37 °C'de 1 dakika içinde 1 μmol p-nitrofenol üreten enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Bütün enzimler için spesifik aktivite ise 1 mg proteindeki enzim ünite miktarı olarak tanımlanmıştır.

2.2.2. Çapraz bağlama

Enzim solüsyonu 0.1 M glisin-NaOH, pH 9 tamponu içerisinde hazırlanır. Aynı tampon içerisinde çapraz bağlayıcı solüsyonu da hazırlanır. İki solüsyon karıştırıldıktan sonra bir saat oda sıcaklığında bekletilir. Bisimidoesterler oda sıcaklığında hidrolize olduğundan reaksiyonu durdurmak için özel bir işleme gerek yoktur (Rajput and Gupta, 1987). pH değeri pH 4, 0.1 M asetat tampon çözeltisi eklenerek (1:1.75 oranında) 4.8'e ayarlanır. Bu arada kontrol olarak doğal enzimin de pH'ı 9'a çıkarılıp aynı koşullarda - çapraz bağlayıcı eklenmeden- bekletilmiştir.

2.2.3. Protein miktarı (konsantrasyonu) tayini

Protein konsantrasyonu Lowry metodunun biraz değiştirilmiş yeni bir yöntemi ile ölçülmüştür (Hartree, 1972). Standart olarak Bovine serum albumin (BSA) kullanılmıştır.

2.2.4. Isıl inaktivasyon deneyleri

Çapraz bağlama işleminden sonra doğal ve çapraz bağlanmış enzimlerin pH değerleri pH 4.8'e düşürüldü. Daha sonra sıcak su banyosu kullanılarak enzim solüsyonlarının sıcaklıkları 55 ile 75 °C arasında belirli sıcaklıklara getirildi ve bu sıcaklıklarda planlanan süreler tutuldu. Solüsyonların sıcaklıklarının aniden yükseltilmesine ve işlem bittikten sonra düşürülmesine dikkat edildi. Daha sonra solüsyonlardaki enzim aktiviteleri belirlendi.

Bütün deneyler en az iki defa yapıldı ve ortalamaları alındı.

2.2.5. Kalan aktivite hesabı

Isıl işlemden sonra enzim solüsyonlarında kalan enzim aktiviteleri aşağıda gösterilen formül yardımı ile bulundu:

$$\% \text{ Kalan Aktivite} = (\text{spesifik aktivite} / \text{başlangıçtaki spesifik aktivite}) \times 100$$

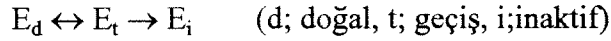
2.2.6. Doğal enzime göre kalan aktivite hesabı

Çapraz bağlanmış enzimin ısı işlemden sonraki kalan aktivitesini doğal enzimin ısı işlemden sonra kalan aktivitesi ile karşılaştırmak için relatif kalan aktivite aşağıda verilen formül aracılığı ile hesaplanmıştır:

$$\text{Relatif kalan aktivite} = \left(\frac{\text{çapraz bağlı enzimin ısı işlemden sonraki kalan aktivitesi}}{\text{doğal enzimin ısı işlemden sonraki kalan aktivitesi}} \right) \times 100$$

2.2.7. Kinetik çalışmalar

Doğal ya da çapraz bağlanmış enzimlerin ısı inaktivasyonu iki basamaklı bir süreç olarak düşünülebilir.



İlk basamak ısıya çok hassas bir süreç olup enzim doğal durumdan geçiş durumuna geçer, ikinci basamakta ise birinci dereceden bir inaktivasyona aşağıda gösterildiği şekilde uğrar;

$$\frac{dE_t}{dt} = -k_d E_t$$

$$\ln \left(\frac{E_i}{E_t} \right) = -k_d t$$

k_d : inaktivasyon katsayısı

Enzim deaktivasyonunun birinci dereceden kinetik inaktivasyonla açıklanabileceği durumlarda $\ln (E_i/E_t)$ zamana göre çizildiğinde doğrusal bir bağıntı elde edilmesi gerekir ve bu doğrunun eğimi de inaktivasyon katsayısını (k_d) verir. Deneysel inaktivasyonun aktivasyon enerjisi de aşağıda gösterilen Arrhenius denklemleri kullanılarak ($\ln k_d$ değerlerinin $1/T$ değerlerine karşı çizilip eğiminin hesaplanması ile) belirlenir.

$$k_d = A \exp\left(-\frac{E}{RT}\right)$$

E: İnaktivasyonun aktivasyon enerjisi, cal/mol

R: Gaz sabiti, 1.987cal/mol-K

T: Sıcaklık (K)

A: Frekans faktörü

2.2.8. *Trichoderma reesei* kullanarak β -glukosidaz üretimi

Trichoderma reesei ATCC 26921 suşu patates-dekstroz agarı (Difco) üzerinde 4 °C'de saklandı. Fermentasyondan önce yine patates-dekstroz sıvı ortamı içinde çoğaltılan suş, % 5-10 oranında enzim üretim ortamına aktarıldı. Enzim üretiminde kullanılan ortamın kompozisyonu aşağıda verildiği gibidir (Mendel ortamı) (Taj-Aldeen, 1993):

-Amonyum sülfat, 1.4 g/ L,

-potasyumdihidrofosfat, 2.0 g/L,

-magnezyum sülfat, 0.3 g/L,

-kalsiyum klorür, 0.4 g/L,

-üre, 0.3g/L

-peptone, 1g/L

-Tween 80, 0.2 ml/L

- demir sülfat, 5 mg/L
- mangan sülfat, 1.6 mg/L
- çinko sülfat, 1.4 mg/L
- kobalt klorür, 3.7 mg/L
- % 1 filtre kağıdı

Ortama enzim üretimini artırması için %1 nişasta ilave edildikten sonra pH'sı 4.8'e ayarlandı ve otoklavda 15 dakika steril edildi. Daha sonra inokulasyon yapıp 28 °C'deki çalkalayıcı inkübatörde fermentasyona başlandı. Çalkalama hızı 200 d/d olarak tutuldu. Fermentasyon süresince gūnaşırı veya her gün numune alınıp ortama salınan β-glukosidaz aktivitesine ve protein konsantrasyonuna bakıldı.

2.2.8. β-glukosidaz enziminin saflaştırılması

Fermentasyon durdurulduktan sonra hücreler sıvı ortamdan Sorval soğutmalı santrifuj kullanılarak 4 °C'de 10,000 x g'de 10 dakikalık işleme ayrıldı. Daha sonra kısmi saflaştırma sağlamak ve sıvı hacmi azaltmak amacı ile amonyum sülfat (% 80 doygunluk) ile çöktürüldü. Bu işlem için amonyum sülfat ilave edildikten sonra 4 °C'de bir gece magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak beklendi. Ertesi sabah oluşan çökelti soğutmalı santrifuj ile (12,000 x g, 30 dakika) ayrıldı. Çökelti 25 ml 10 mM, pH 4.8 asetat tamponu içerisinde çözüldükten sonra 50 ml'lik küçük boy Amicon ultrafiltrasyon cihazı ve basınç yaratmak için de azot gazı kullanılarak PM 10 (Amicon, MWCO 10,000 Da) membranı ile amonyum sülfat tuzlarından ayrıldı. Ultrafiltrasyon sırasında solüsyonun hacmi 5 ml'ye düştükten sonra üç defa aynı tampon kullanılarak 30 ml'ye çıkarıldı. Daha sonra enzim karışımındaki selüloza bağlanabilen enzimleri -sellobiyohidrolaz ve endoglukanaz-

ortamdan uzaklaştırabilmek için ortama Avisel (mikro kristal selüloz) ilave edildi ve oda sıcaklığında bir saat beklendi. Daha sonra Avicel ve ona bağlanan enzimler sıvı fazdan santrifuj (5000 x g'de 10 dakika) ile ayrıldı. Bu işlemden sonra ortamın pH'sı 7'ye getirildi ve DEAE-sephadex kolonuna (1.5 cm x 20 cm) verildi. Kolon daha önce 5 hacimlik aynı tampon kullanılarak pH ayarı yapılmıştı. Protein kolona 0.4 ml/dak hızı ile verildi ve 1.5 ml'lik numuneler kolondan toplandı. β -glukosidaz kolona tutunmadan kolondan aktı. Bu şartlarda diğer selüloz komponentlerinin kolona bağlanacağı biliniyordu (Gong ve ark., 1977). Kolondan β -glukosidaz aktivitesi olan fraksiyonlar toplandı ve ultrafiltrasyon sistemi kullanılarak pH ayarlaması yapıldı ve hacmi azaltıldı. Enzimin ne kadar saflaştırıldığını belirlemek amacı ile her aşamadan sonra saflık derecesi hesaplandı.

İşlemden sonraki spesifik aktivite

Saflık derecesi = -----

Fermentasyon ortamındaki spesifik aktivite

2.2.9. SDS-elektroforez uygulaması

Saflaştırılan β -glukosidaz'ın saflığı SDS-elektroforez tekniği ile bakıldı. Yerleştirme ve ayırma jel konsantrasyonları % 2.5 ve 10 olarak yapıldı ve Laemli (1970)'nin anlattığı şekilde elektroforez işlemi yapıldı. Jel boyutları 8cmx7.3cm idi. Elektroforez 100 Voltluk sabit elektrik kaynağı ile 60 dakika yapıldı. Elektroforez işleminden sonra % 0.1 Komasi mavi % 40 metanol ve % 10 asetik asit içeren boya solüsyonunda bir gece boyandı. Ertesi gün % 40 metanol ve % 10 asetik asit içeren solüsyon içerisinde fazla boyası alındı ve protein bantları incelendi.

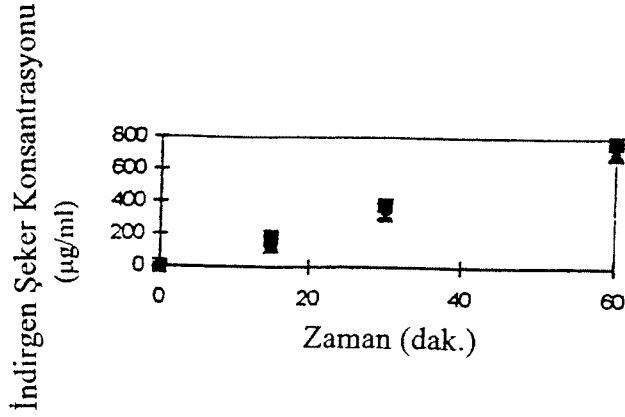
3. VERİLER VE TARTIŞMA

Projenin ilk bölümünde elimizde bulunan selüloz kompleksi bileşenlerine ayrıştırılmadan kullanıldı. Saflaştırma yapılmadan selüloz kompleksi değişik çapraz bağlayıcılarla çapraz bağlandı ve çapraz bağlamanın enzimin bileşenlerinin ısı dayanıklılığına olan etkisi incelendi. Bu amaçla toplam selüloz, sellobiohidrolaz, endoglukanaz ve β -glukosidaz aktivite ölçümleri için sırasıyla filtre kağıdı, Avisel, karboksimetilselüloz ve p- nitrofenol- β -D-glukopiranosid kullanarak, reaksiyonların başlangıç hızlarını ölçmek için reaksiyon koşulları optimize edildi. Enzim kompleksinde β -glukosidazın konsantrasyonunun çok düşük olmasından dolayı bu enzim T. reseei kullanılarak üretildi ve kısmi saflaştırmadan sonra çapraz bağlama çalışmalarının yapıldı. Ayrıca Sigmadan satın alınan saf β -glukosidaz kullanılarak aynı işlemler yapıldı.

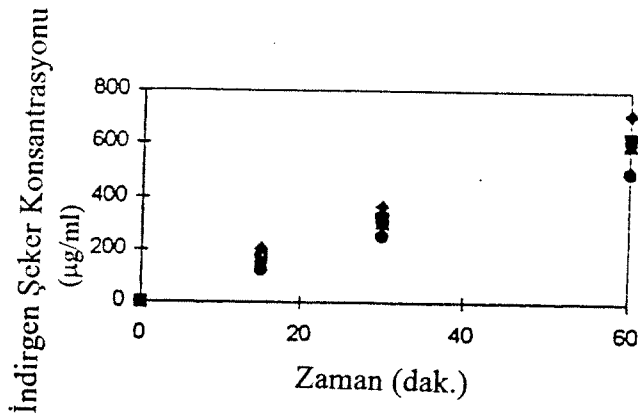
3.1. Selüloz aktivite tayin metodlarının belirlenmesi

İlk olarak toplam selüloz aktivitesini ölçmek için literatürde kullanılan metodlar taranarak filtre kağıdı seçildi ve enzim konsantrasyonu, substrat (filtre kağıdı) şekli, ağırlığı ve alanının aktivite ölçümüne olan etkileri incelendi. Şekil 1 ve 2'de gösterildiği gibi indirgen şeker konsantrasyonu reaksiyon süresi ile lineer olarak arttı ve filtre kağıdı ağırlığı ya da şeklinin reaksiyon hızını çok az etkilediği bulundu. Yüksek enzim konsantrasyonlarında, mesela 333 μg protein / ml, ise lineer ilişki 20-30 dakikalık bir reaksiyon süresinden sonra bozulmaktaydı (Şekil 3). Enzim aktivite testlerinde gerçek enzim aktivitesi ancak reaksiyonun başlangıç hızı belirlenerek hesaplanabilir. Buradan yola çıkarak yapılan bu bir dizi deneyin sonucunda 80 μg protein / ml enzim ve 50 mg filtre

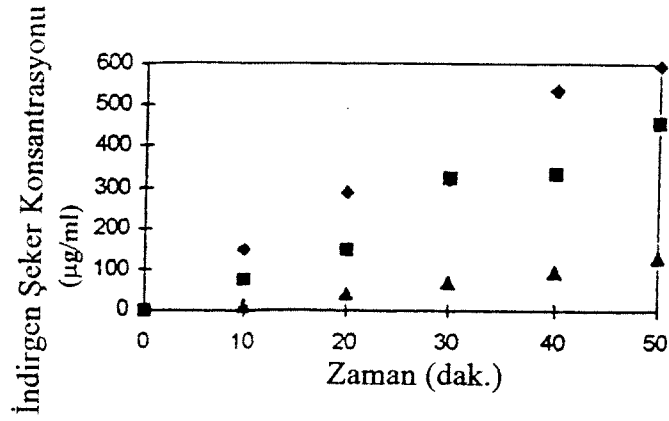
kağıdı kullanarak 50 °C'de 20 dakikalık reaksiyon ile toplam selüloz aktivitesinin ölçülmesine karar verildi.



Şekil 1: Filtre kağıdı şeklinin toplam selüloz aktivitesine olan etkisi. Filtre kağıdı ağırlıkları 50±1 mg olarak sabit tutuldu. (◆: 1 cmx6cm, ■: 0.8cmx7.5cm, ✕: ikiye katlanmış, ▲: 0.4cmx7.5cm.)



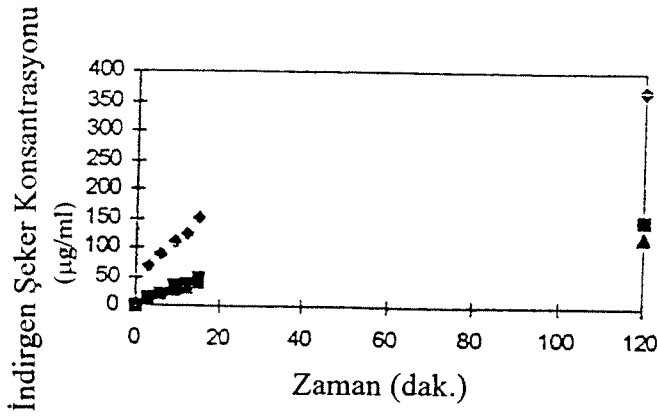
Şekil 2: Filtre kağıdı yüzey alanı ya da ağırlığının toplam selüloz aktivitesine olan etkisi. (◆: 1 cmx6cm; 50 mg, ■: 1cmx5cm; 42 mg, ▲: 1cmx4cm; 33 mg, ●: 1 cmx3cm; 25 mg.)



Şekil 3: Enzim konsantrasyonunun toplam selülaz aktivitesine olan etkisi. (◆: 0.333 mg protein/ ml, ■: 0.166 mg protein/ml, ▲: 0.083 mg protein/ml.)

Aynı şekilde sellobiyohidrolaz aktivitesini ölçmek için gerekli şartlar belirlendi.

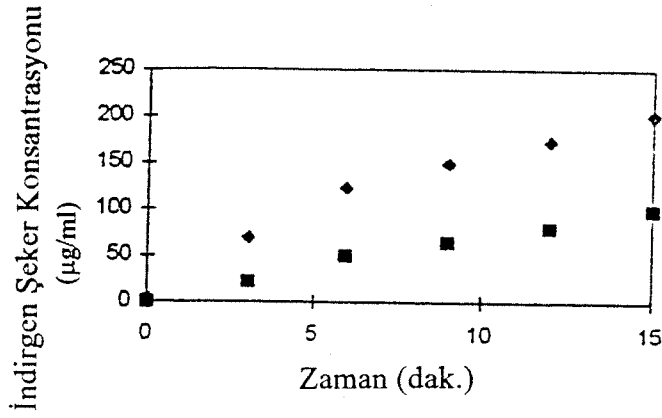
Değişik enzim konsantrasyonları kullanılarak yapılan deneylerin sonuçları Şekil 4’de verilmiştir.



Şekil 4: Enzim konsantrasyonunun sellobiyohidrolaz aktivitesine olan etkisi. (◆: 0.5 mg protein/ ml, ■: 0.1250 mg protein/ml, ▲: 0.0625 mg protein/ml.) Avicel konsantrasyonu %1; Reaksiyon sıcaklığı 50 °C.)

Yapılan çok sayıda deneyler sonucunda reaksiyon süresinin arttırılmasının sonuçların birbirine olan yakınlığını (tekrarlanabilirliğini) düşürdüğü gözlenmiştir. Sonuç olarak deneylerde 40 µg protein / ml enzim, 1% avicel konsantrasyonu kullanılmasına ve reaksiyonun 50 °C 'de 20 dakika sürdürülmesine karar verildi.

Endoglukanaz enziminin iki değişik enzim konsantrasyonundaki reaksiyon hız grafikleri Şekil 5'te gösterilmiştir. Selülazın bu bileşeni için de aktivite testi % 1'lik karboksimetil selüloz kullanarak 50 °C'de 15 dakikalık reaksiyon süresi olarak belirlenmiştir.

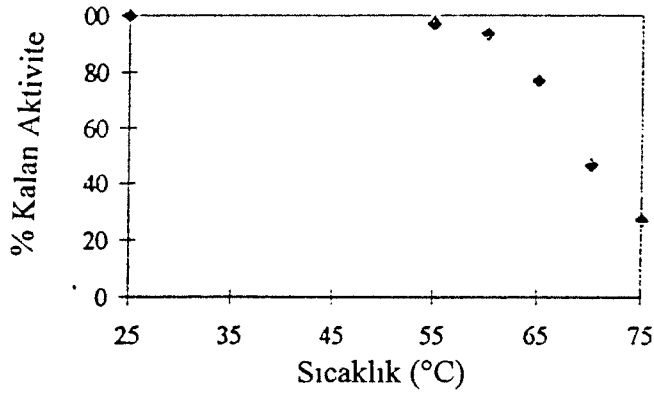


Şekil 5: Enzim konsantrasyonunun endoglukanaz aktivitesine olan etkisi. (◆: 0.25 mg protein/ ml, ■: 0.0625 mg protein/ml.) Karboksimetil selüloz konsantrasyonu %1; Reaksiyon sıcaklığı 50 °C.)

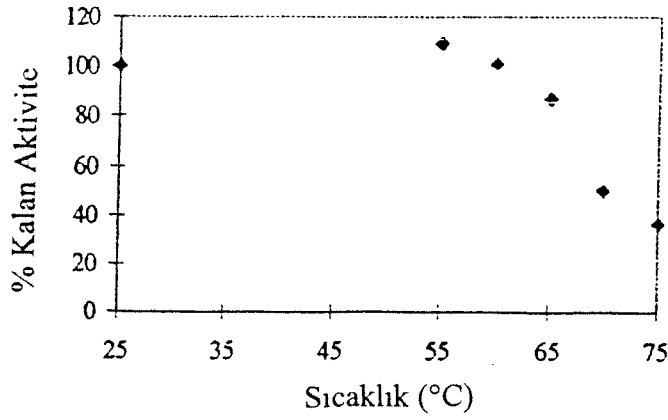
3.2. Çapraz bağlamanın endoglukanaz, sellobiyohidrolaz ve toplam selülaz aktiviteleri ve ısı inaktivasyonları üzerindeki etkisi

Çapraz bağlama deneylerine başlamadan önce doğal selülaz kompleksinin çapraz bağlama reaksiyonu koşullarında dayanıklı olup olmadığı incelendi. Bisimidoesterlerle yapılan çapraz bağlama oda sıcaklığında ve bazik pH değerlerinde 1 saat süre ile yapılmaktadır. pH değeri 7 ile 10 arasında değişebilir ancak değer yükseldikçe reaksiyonun hızı da artmaktadır. 0.1 M pH 9 glisin tamponu içinde yapılan pH stabilite deneyleri 3 saat boyunca kompleksin bileşenleri üzerinde yüksek pH değerinin olumsuz bir etkisinin olmadığını gösterdi.

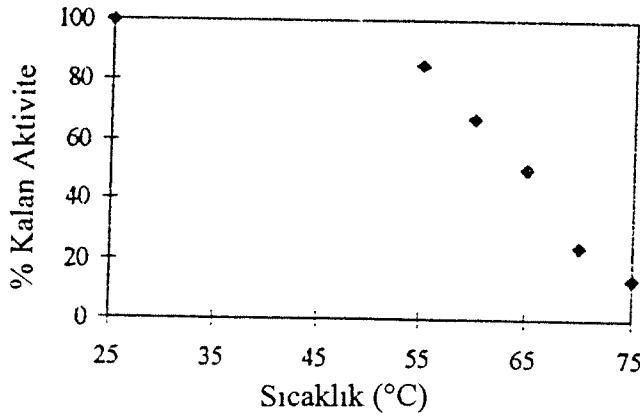
Selülaz kompleksinin ve bileşenlerinin ısı dayanıklılıkları enzim kompleksinin 55 ile 75 °C arasında değişik sıcaklıklarda 15'er dakika tutulup daha sonrada kalan enzim aktivitelerinin incelenmesi ile bulundu. Şekil 6,7 ve 8'den de görülebileceği gibi selülaz kompleksinin inaktivasyonu 55 °C civarında başlamaktadır. Sıcaklık arttıkça enzimlerin inaktivasyonu da azalmakta 70 °C den sonra aktivitenin % 50'den fazlası kaybedilmektedir.



Şekil 6: Doğal selülaz kompleksinin ısı dayanıklılık eğrisi. 15 dakikalık ısı işlem sonrası kalan enzim aktivitesine bakılarak çizilmiştir.



Şekil 7: Doğal sellobiyohidrolazın ısıl dayanıklılık eğrisi. 15 dakikalık ısıl işlem sonrası kalan enzim aktivitesine bakılarak çizilmiştir.



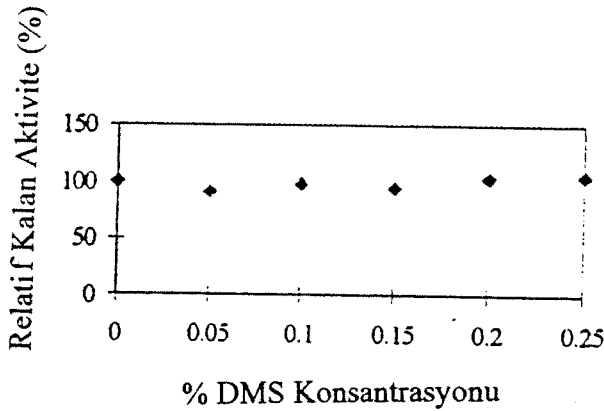
Şekil 8: Doğal endoglukanazın ısıl dayanıklılık eğrisi. 15 dakikalık ısıl işlem sonrası kalan enzim aktivitesine bakılarak çizilmiştir.

Bu çalışmada imidoester grubundan DMA, DMS ve DTBP çapraz bağlayıcı kimyasallar olarak kullanılmıştır. Bu çapraz bağlayıcılar amin gruplarını özellikle de lizin yan gruplarını birbirine bağlarlar (Means ve Feeney, 1971). Selülazların aktif merkezleri ile ilgili çalışmalarda bütün bileşenleri için aktif amino asitlerin asidik amino asitler

(aspartik ya da glutamik asitler) olduğu gösterilmiştir (Kraulis ve ark., 1989; Rouvinen ve ark., 1990). Dolayısı ile çapraz bağlama işlemi için katalitik amino asitlerle reaksiyona girmeyeceği için bisimidoesterler seçildi.

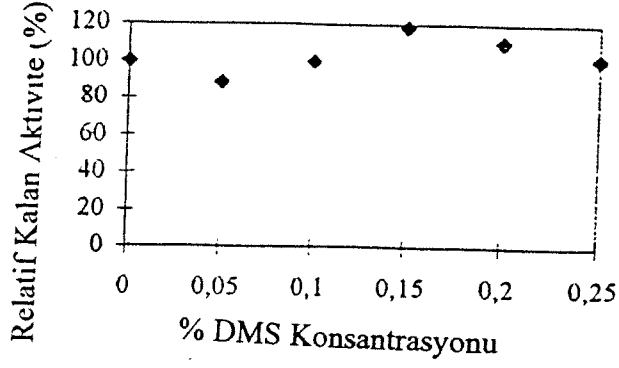
3.2.1. DMS kullanılarak çapraz bağlama

Çapraz bağlama işlemlerinde kullanılacak optimum çapraz bağlayıcı konsantrasyonunu belirleyebilmek için % 0.05 ile % 0.25 (a/h) arasında değişik çapraz bağlayıcı konsantrasyonları denendi. Hemen çapraz bağlama işleminden sonra ve 65 °C'de 15 dakikalık bir ısıl işlemde sonra toplam selülaz ve bileşenlerinin aktivitelerine bakıldı. İlk çapraz bağlayıcı olarak 11Å çapraz bağlama boyuna sahip DMS kullanıldı. Toplam selülaz ve bileşenlerin kalan aktiviteleri Şekil 9, 10 ve 11'de gösterilmiştir. Şekillerden de görüldüğü gibi DMS konsantrasyonlarında kalan aktiviteler arasında kayda değer bir değişiklik yoktur. Ancak sellobiyohidrolazın aktivitesi % 0.15 civarında, endoglukanaz ve toplam selülaz aktiviteleride % 0.25 civarında % 10-20 gibi bir artış göstermektedirler.

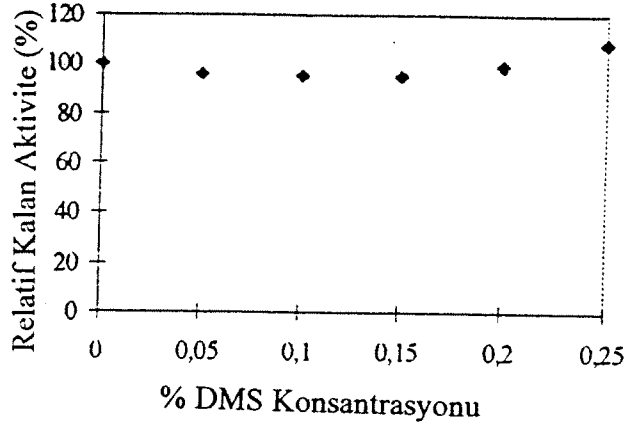


Şekil 9: DMS konsantrasyonunun toplam selülaz aktivitesine olan etkisi. (65 °C 'de 15 dakikalık ısıl işlemde sonra)

Daha detaylı ısıl dayanıklılık çalışmaları bu iki değerin ortalaması olan % 0.20 DMS konsantrasyonu kullanılmıştır.

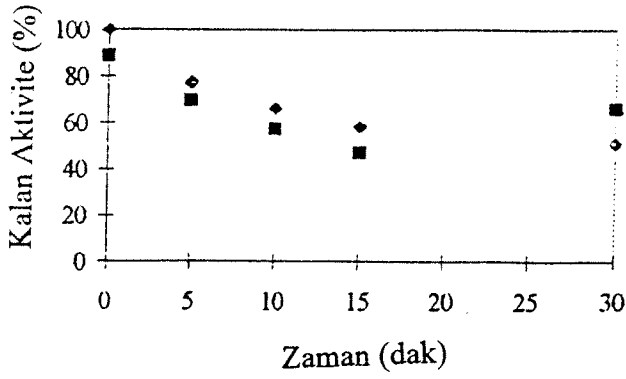


Şekil 10: DMS konsantrasyonunun sellobiyohidrolaz aktivitesine olan etkisi. (65 °C 'de 15 dakikalık ısıl işlemden sonra)

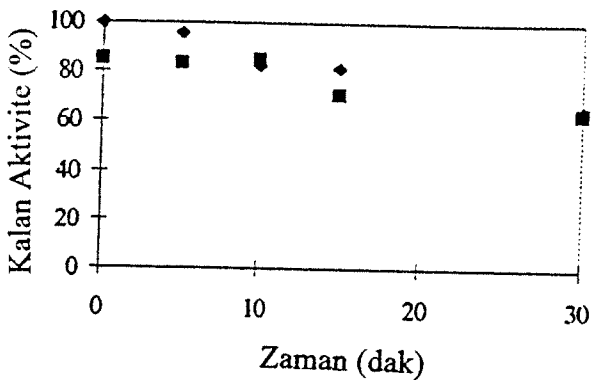


Şekil 11: DMS konsantrasyonunun endoglukanaz aktivitesine olan etkisi. (65 °C 'de 15 dakikalık ısıl işlemden sonra.)

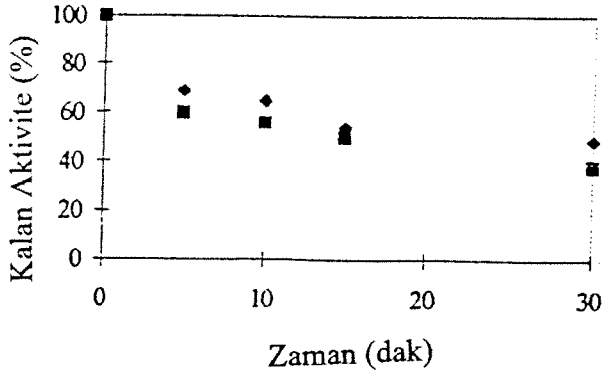
Daha sonra % 0.20 DMS kullanılarak hazırlanan çapraz bağlanmış selülazların ısıl dayanıklılıkları 65-75 °C arası değişik sürelerle tutularak belirlenmeğe çalışılmıştır. Isıl işlemten sonra doğal ve çapraz bağlanmış enzimlerin kalan aktiviteleri zamanın fonksiyonu olarak gösterilmiştir (Şekil 12-26).



Şekil 12: Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış selülaz kompleksinin toplam selülaz aktivitesinin 65 °C de ısıl inaktivasyonu (◆: doğal selülaz, ■: çapraz bağlanmış selülaz.)

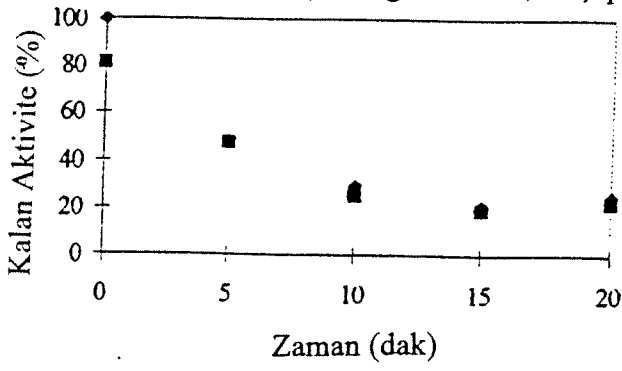


Şekil 13: Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış selülazın sellobiohidrolaz aktivitesinin 65 °C de ısıl inaktivasyonu (◆: doğal selülaz, ■: çapraz bağlanmış selülaz.)



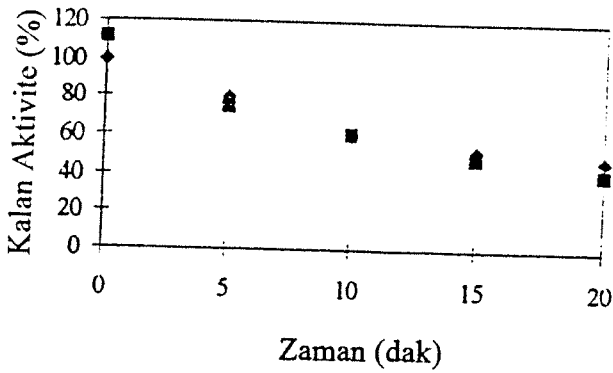
Şekil 14: Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış selülazın endoglukanaz aktivitesinin 65 °C de

ısı inaktivasyonu (◆: doğal selülaz, ■: çapraz bağlanmış selülaz.)



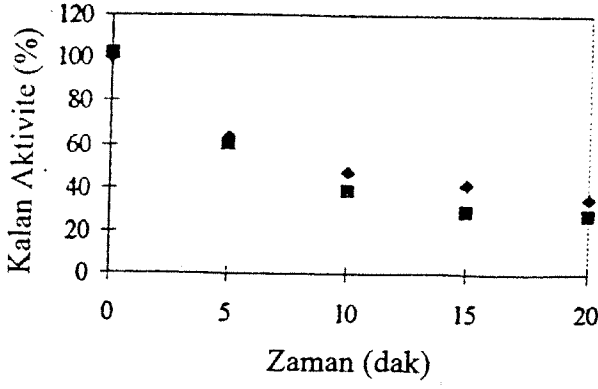
Şekil 15: Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış selülazın toplam selülaz aktivitesinin 67.5 °C

de ısı inaktivasyonu (◆: doğal selülaz, ■: çapraz bağlanmış selülaz.)



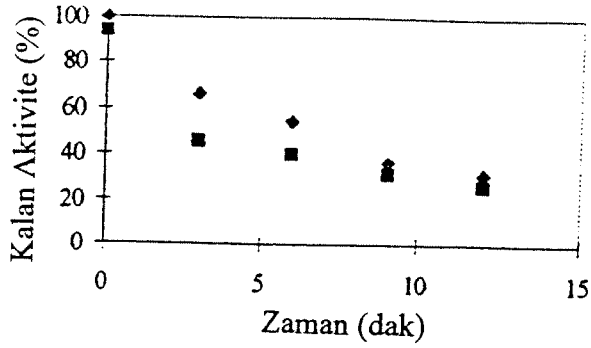
Şekil 16: Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış selülazın sellobiohidrolaz aktivitesinin 67.5

°C de ısı inaktivasyonu (◆: doğal selülaz, ■: çapraz bağlanmış selülaz.)



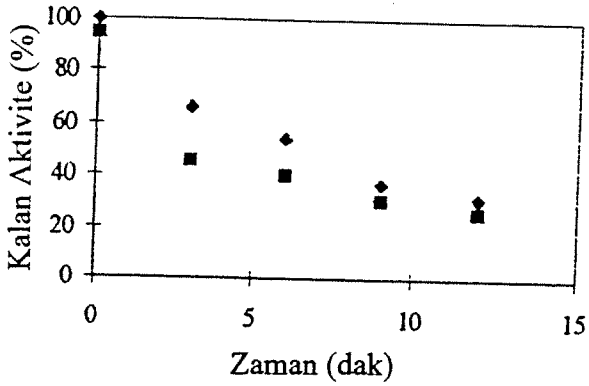
Şekil 17: Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış selülazın endoglukanaz aktivitesinin 67.5 °C

de ısıl inaktivasyon (◆: doğal selülaz, ■: çapraz bağlanmış selülaz.)



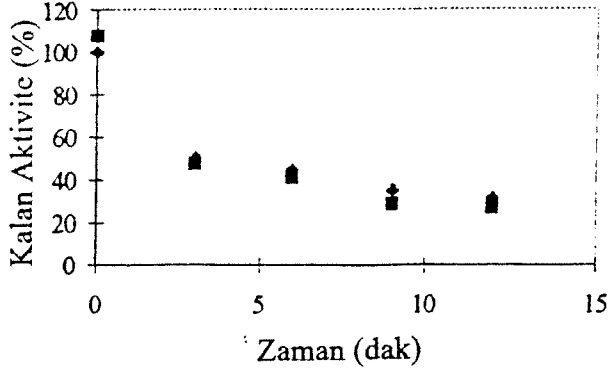
Şekil 18: Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış selülazın toplam selülaz aktivitesinin 70 °C de

ısıl inaktivasyon (◆: doğal selülaz, ■: çapraz bağlanmış selülaz.)

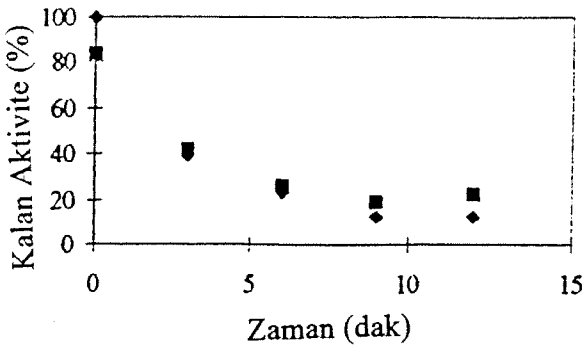


Şekil 19: Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış selülazın sellobiohidrolaz aktivitesinin 70 °C

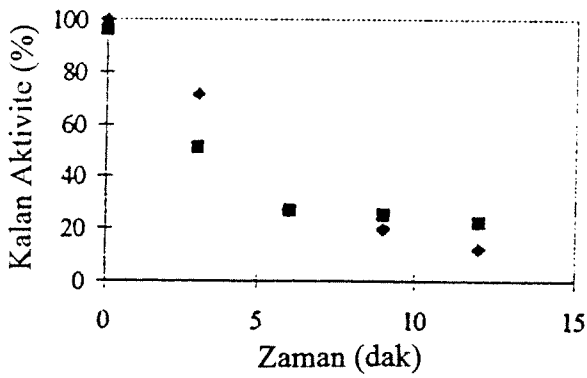
de ısıl inaktivasyon (◆: doğal selülaz, ■: çapraz bağlanmış selülaz.)



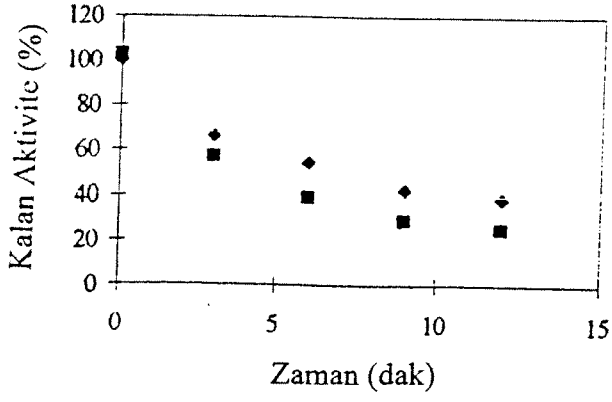
Şekil 20: Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış selülazın endoglukanaz aktivitesinin 70 °C de ısıl inaktivasyonu (◆: doğal selülaz, ■: çapraz bağlanmış selülaz.)



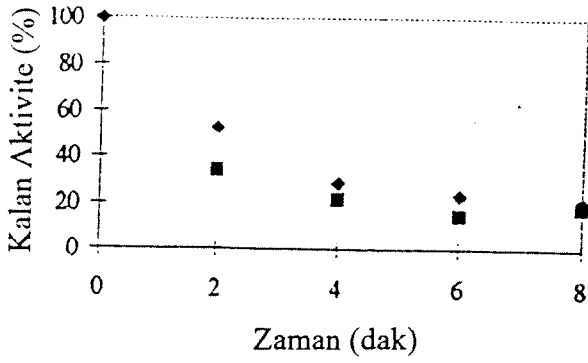
Şekil 21: Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış selülazın toplam selülaz aktivitesinin 72.5 °C de ısıl inaktivasyonu (◆: doğal selülaz, ■: çapraz bağlanmış selülaz.)



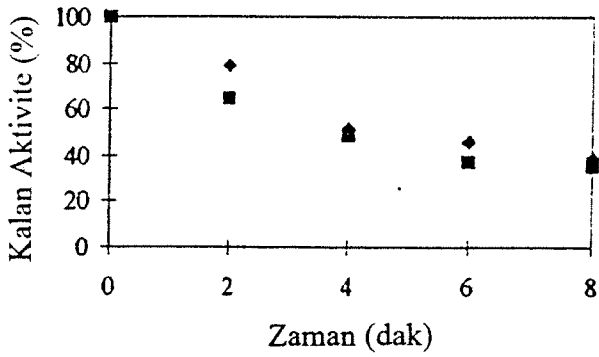
Şekil 22: Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış selülazın sellobiyohidrolaz aktivitesinin 72.5 °C de ısıl inaktivasyonu (◆: doğal selülaz, ■: çapraz bağlanmış selülaz.)



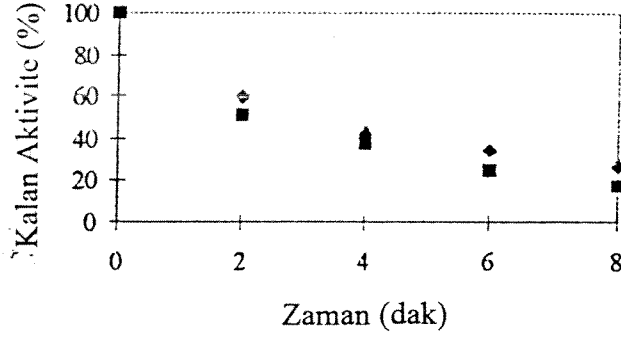
Şekil 23: Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış selülazın endoglukanaz aktivitesinin 72.5 °C de ısıl inaktivasyonu (◆: doğal selülaz, ■: çapraz bağlanmış selülaz.)



Şekil 24: Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış selülazın toplam selülaz aktivitesinin 75 °C de ısıl inaktivasyonu (◆: doğal selülaz, ■: çapraz bağlanmış selülaz.)



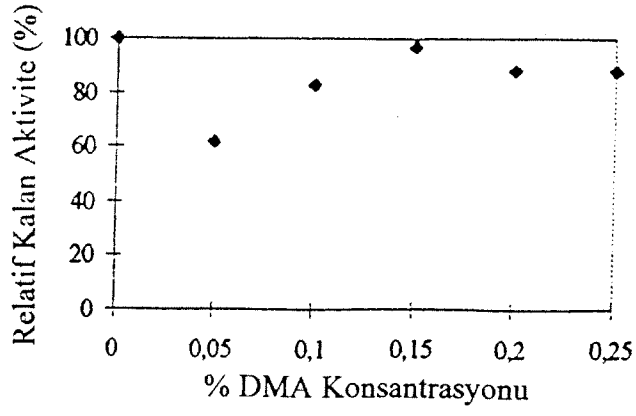
Şekil 25: Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış selülazın sellobiohidrolaz aktivitesinin 75 °C de ısıl inaktivasyonu (◆: doğal selülaz, ■: çapraz bağlanmış selülaz.)



Şekil 26: Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış selülazın endoglukanaz aktivitesinin 75 °C de ısı inaktivasyonu. (◆ : doğal selülaz, ■: çapraz bağlanmış selülaz.)

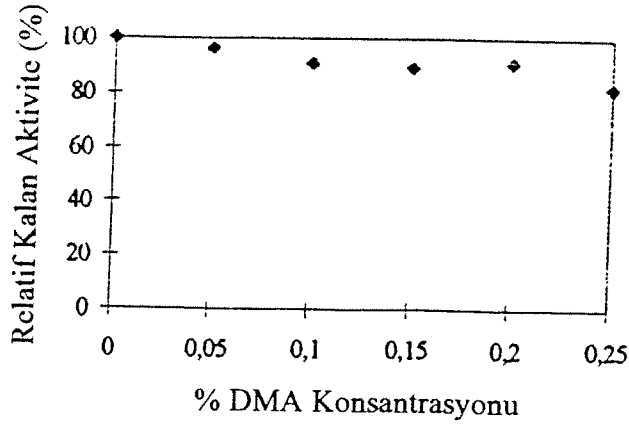
3.2.2. DMA kullanılarak çapraz bağlama

Çapraz bağlama boyunun etkisini incelemek amacı ile çapraz bağlama işlemi ikinci çapraz bağlayıcı olarak kullanılan ve çapraz bağlama boyu 9 Å olan DMA ile tekrarlanmış ve ısı inaktivasyon çalışmaları çapraz bağlanmış ve doğal enzimlerle karşılaştırılmalı olarak yapılmıştır. Şekil 27, 28 ve 29’da DMA konsantrasyonunun 67.5 °C’de 15 dakikalık bir ısı işleminden sonra enzim aktivitesi üzerindeki etkisi verilmiştir. Şekillerden de görüldüğü gibi hiçbir DMA konsantrasyonunda ısı işleminden sonraki kalan aktivite doğal enzimden fazla değildir. Bu ilk bilgisiğında detaylı inaktivasyon çalışmalarına devam etmenin gereksizliği görüldüğü için DMA ile ilgili çalışmalar bu noktadan ileri götürülmemiştir. Bu sonuçlar DMS ile çapraz bağlamadan sonra alınan sonuçlarla karşılaştırılırsa çapraz bağlama boyunun kısaltılmasının enzimin ısı dayanıklılığını artırmak için uygun olmadığı sonucunu verdiği söylenebilir.



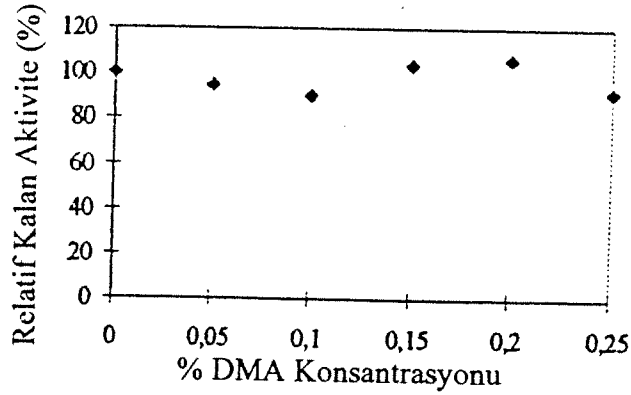
Şekil 27: DMA konsantrasyonunun toplam selülaz aktivitesi üzerindeki etkisi.

(67.5 °C 'de 15 dakikalık ısıtma işleminden sonra.)



Şekil 28: DMA konsantrasyonunun endoglukanaz aktivitesi üzerindeki etkisi.

(67.5 °C 'de 15 dakikalık ısıtma işleminden sonra.)

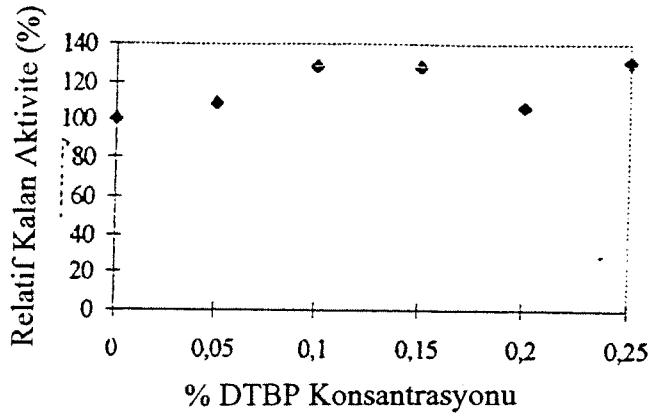


Şekil 29: DMA konsantrasyonunun sellobiohidrolaz aktivitesi üzerindeki etkisi.

(67.5 °C 'de 15 dakikalık ısıtma işleminden sonra.)

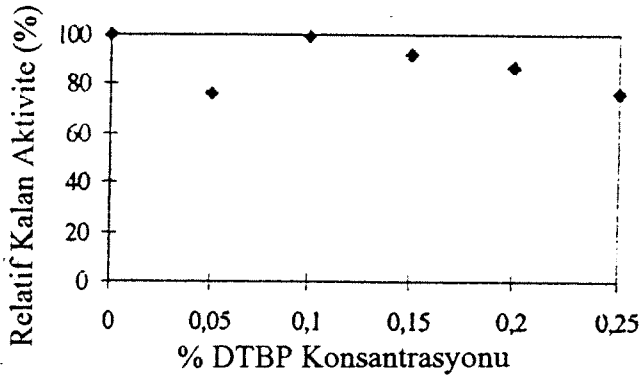
3.2.3. DTBP kullanılarak çapraz bağlama

Bu çalışmada üçüncü olarak 13 Å çapraz bağlama boyuna sahip DTBP çapraz bağlayıcı olarak denenmiştir. Optimal çapraz bağlayıcı konsantrasyonunu belirlemek için çapraz bağlama işlemi % 0.05 ile % 0.25 konsantrasyonları arasında yapılmış ve 67.5 °C’de 15 dakika uygulanan ısıl işlemden sonraki kalan aktiviteleri Şekil 30, 31 ve 32’de gösterilmiştir.



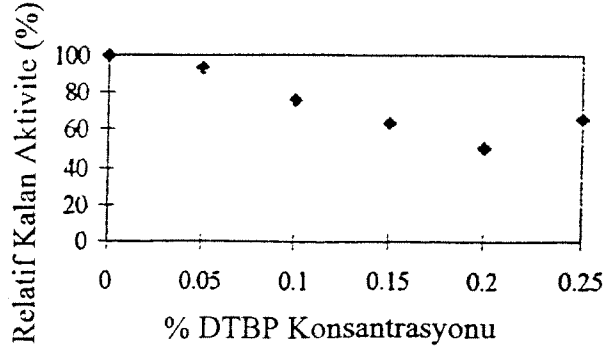
Şekil 30. DTBP konsantrasyonunun toplam selülaz aktivitesi üzerindeki etkisi.

(67.5 °C ‘de 15 dakikalık ısıl işlemden sonra.)



Şekil 31. DTBP konsantrasyonunun sellobiohidrolaz aktivitesi üzerindeki etkisi.

(67.5 °C ‘de 15 dakikalık ısıl işlemden sonra.)

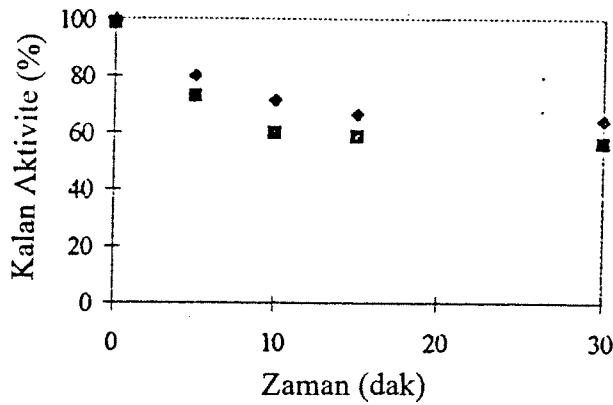


Şekil 32. DTBP konsantrasyonunun endoglukanaz aktivitesi üzerindeki etkisi.

(67.5 °C 'de 15 dakikalık ısıl işlemten sonra.)

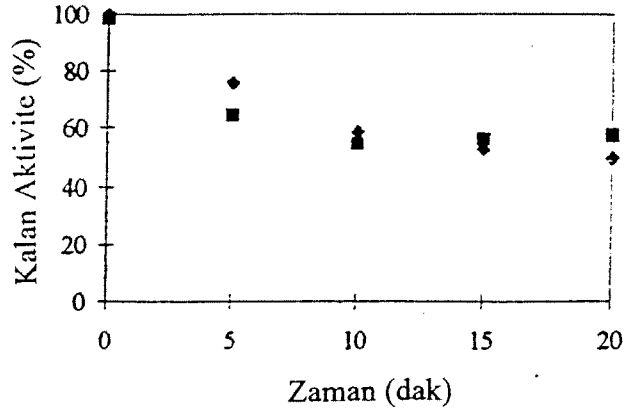
Çapraz bağlama işleminden sonra ortalama % 10'luk aktivite kayıpları görülmüştür.

Isıl işlemten sonra ise çapraz bağlanmış toplam selüloz aktivitesi artarken çapraz bağlanmış sellobiolazlarda pek büyük bir fark olmamış ve endoglukanazlarda ise bir düşüş görülmüştür. Optimum çapraz bağlayıcı konsantrasyonu olarak toplam selüloz aktivitesindeki artışın maksimum olduğu, endoglukanazdaki düşüşünün de nispeten az olduğu % 0.10 DTBP konsantrasyonu seçilmiş ve 65 ile 75 °C'ler arasında detaylı inaktivasyon çalışmaları yapılmıştır (Şekil 33 - 37).



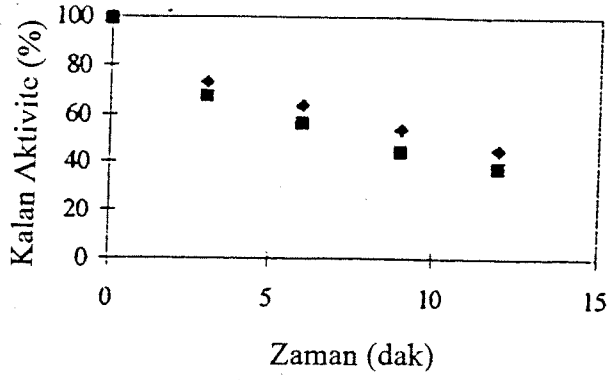
Şekil 33. Doğal ve DTBP ile çapraz bağlanmış selülozların toplam selüloz aktivitesinin 65

°C de ısıl inaktivasyon eğrileri. (▲: doğal selüloz, ■: çapraz bağlanmış selüloz.)



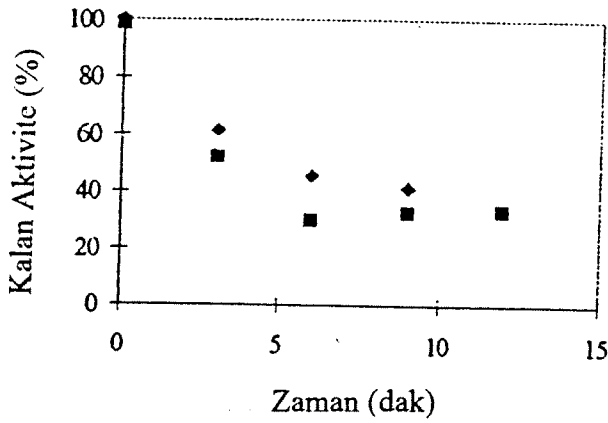
Şekil 34. Doğal ve DTBP ile çapraz bağlanmış selülozların toplam selüloz aktivitesinin 67.5

°C de ısı inaktivasyon eğrileri. (▲: doğal selüloz, ■: çapraz bağlanmış selüloz.)



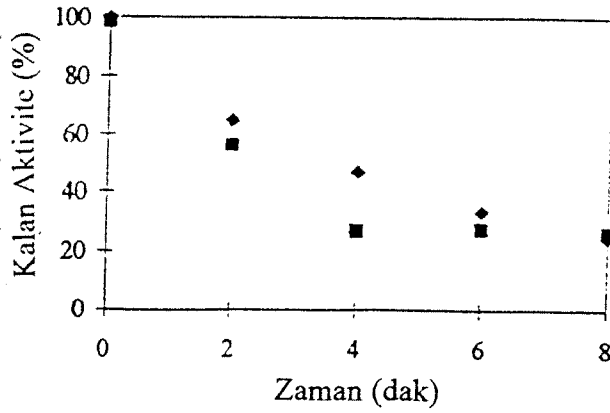
Şekil 35. Doğal ve DTBP ile çapraz bağlanmış selülozların toplam selüloz aktivitesinin 70

°C de ısı inaktivasyon eğrileri. (▲: doğal selüloz, ■: çapraz bağlanmış selüloz.)



Şekil 36. Doğal ve DTBP ile çapraz bağlanmış selülozların toplam selüloz aktivitesinin 72.5

°C de ısı inaktivasyon eğrileri. (▲: doğal selüloz, ■: çapraz bağlanmış selüloz.)



Şekil 37. Doğal ve DTBP ile çapraz bağlanmış selülazların toplam selülaz aktivitesinin 75 °C de ısı inaktivasyon eğrileri. (▲: doğal selülaz, ■: çapraz bağlanmış selülaz.)

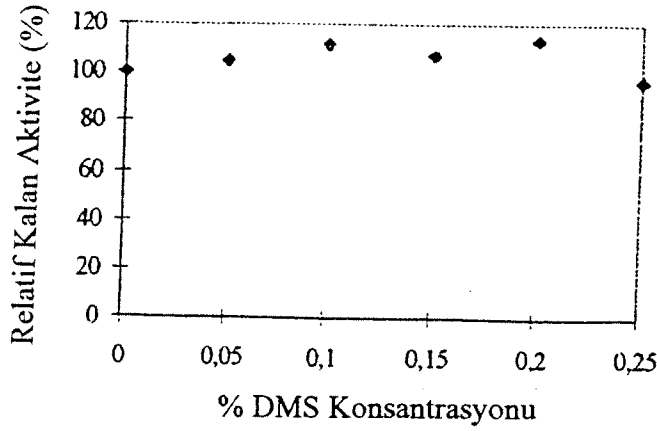
DTBP çapraz bağlanmış enzim kullanılarak değişik sıcaklıklarda yapılan inaktivasyon çalışmalarının toplam selülaz aktiviteleri üzerindeki etkileri Şekil 33-37 arasında gösterilmiştir. Bu şekillerden de görüldüğü gibi sadece 67.5 °C' de ve 15 dakikadan daha fazla sürdürülen ısı işlemlerde çapraz bağlamanın çok hafif pozitif bir etkisi görülmüştür. Pozitif etki çok olmadığından DTBP ile çapraz bağlamanın pratikte bir yararı olmayacağı için, selülazın bileşenleri ile bu işlemler tekrar edilmemiştir.

3.3. . Çapraz bağlamanın β -glukosidaz aktivitesi ve ısı inaktivasyonu üzerindeki etkisi

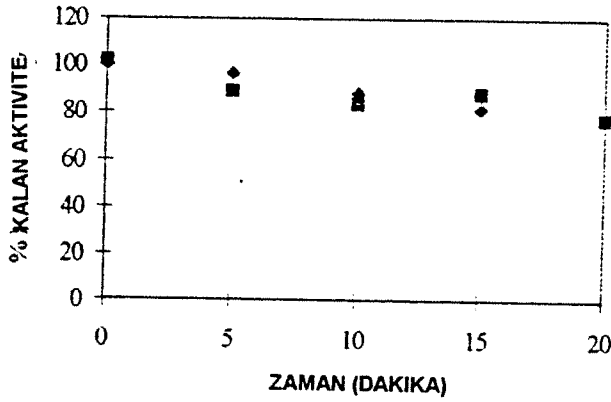
3.3.1. Ticari β -glukosidaz kullanılması

Safılaştırılmaksızın yapılan çapraz bağlama işlemlerinde β -glukosidaz aktivitesine selülaz kompleksindeki konsantrasyonu çok düşük olduğu için bakılmamıştı. Enzimi daha iyi takip edebilmek için sellobiyoz kullanarak aktivite tayini yapmak yerine p-nitrofenil- β -D glukopiranosid kullanılmaya başlanması, enzimin daha konsantre olabilmesi için laboratuarda üretilmesi ve kısmen safılaştırılmasına karar verilmişti. Bu arada enzimin

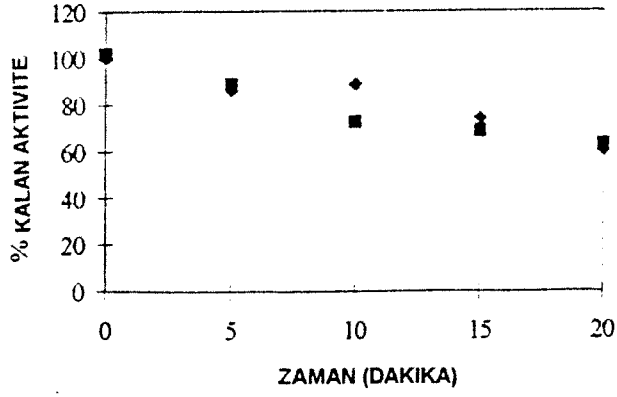
retme ve saflaştırma çalışmaları yapılırken satın alınan saf β -glucosidaz (bademden saflaştırılmış) ile çapraz bağlama çalışmaları yapıldı. DMS ile çapraz bağlama enzimin aktivitesinde bir değişikliğe yol açmadı. Değişik DMS konsantrasyonlarında 60 °C 'de 15 dakikalık bir ısıl işlemden sonra çapraz bağlanmış enzimin ısıl dayanıklılığında % 5-10 civarında bir artış gözlendi (şekil 38). Daha sonra 55 ile 65 °C'ler arasında ısıl inaktivasyon çalışmaları yapıldı. şekil 39-43 den görüldüğü gibi çapraz bağlama enzimin ısıl dayanıklılığını % 1-5 oranında artırdı.



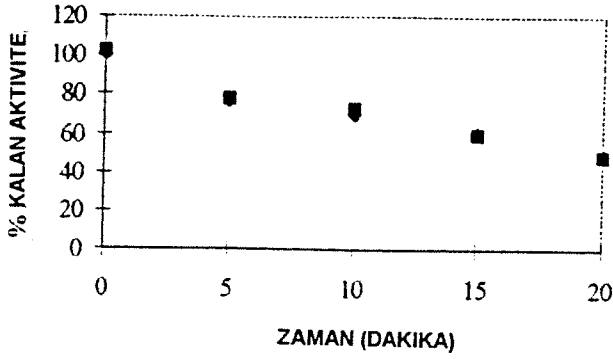
şekil 38. DMS konsantrasyonunun β -glukosidaz aktivitesine olan etkisi. (60 °C 'de 15 dakikalık ısıl işlemden sonra.)



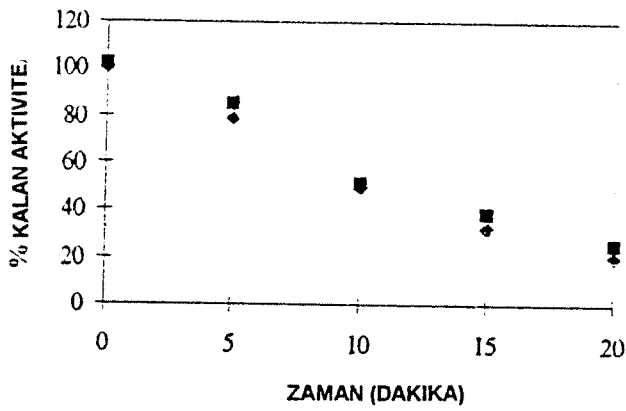
şekil 39. Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış β -glukosidaz aktivitesinin 55 °C de ısıl inaktivasyonu. (♦: doğal selülaz, ■: Çapraz bağlanmış selülaz.)



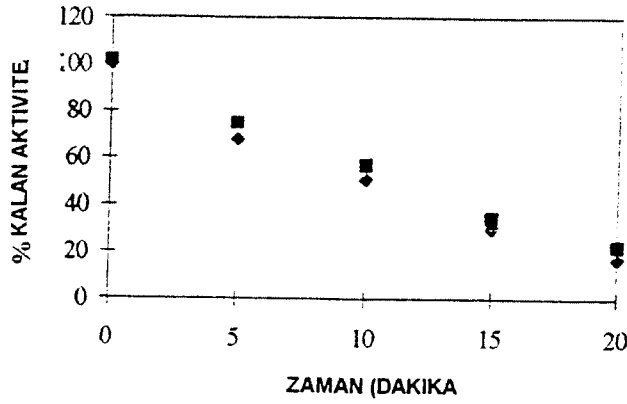
Şekil 40. Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış β -glukosidaz aktivitesinin 57.5 °C de ısı inaktivasyonu.



Şekil 41. Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış β -glukosidaz aktivitesinin 60 °C de ısı inaktivasyonu.



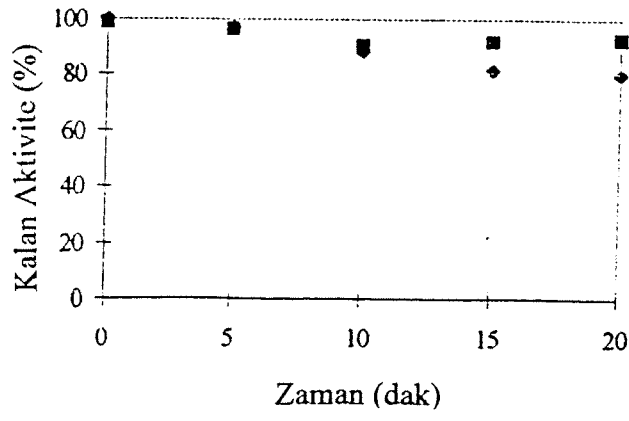
Şekil 42. Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış β -glukosidaz aktivitesinin 62.5 °C de ısı inaktivasyonu.



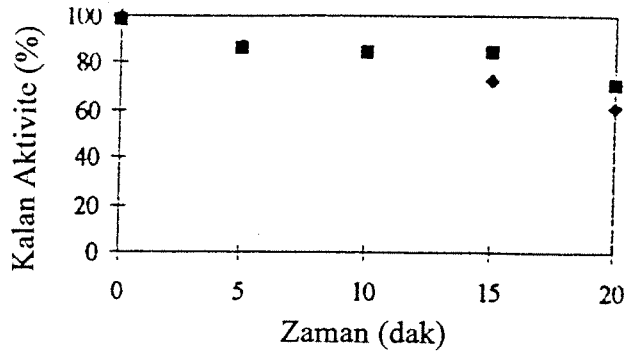
Şekil 43. Doğal ve DMS ile çapraz bağlanmış β -glukosidaz aktivitesinin 65 °C de ısı inaktivasyonu.

DMA kullanılarak yapılan çapraz bağlama işlemlerinde ise çapraz bağlamadan hemen sonra % 10-20 arasında bir düşüş gözlemlendi ve 60 °C'de 15 dakikalık bir ısı işleminden sonra çapraz bağlamanın ısı dayanıklılık üzerinde pozitif bir etkisi olmadığı için detaylı ısı inaktivasyon çalışmaları yapılmadı.

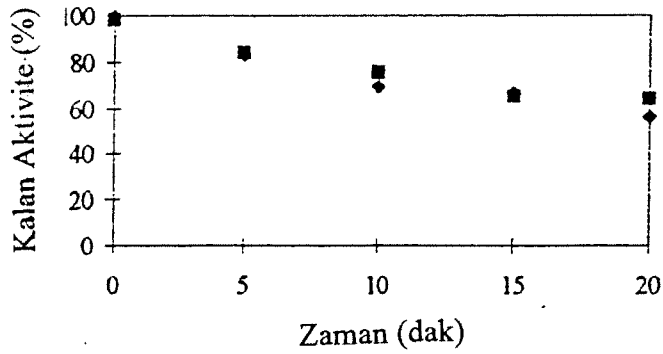
DTBP ile çapraz bağlama ise % 0.2 lik kullanıldığı zaman doğal enzime göre ısı dayanıklılığı artırıyor gibi görüldüğü için 55 ile 65 °C'ler arasında ısı inaktivasyon çalışmaları yapıldı (Şekil 44-48). Şekillerden de görüldüğü gibi çapraz bağlama enzimin ısı dayanıklılığını özellikle daha düşük sıcaklıklarda bir miktar korudu ancak önemli bir artış gözlemlenmedi.



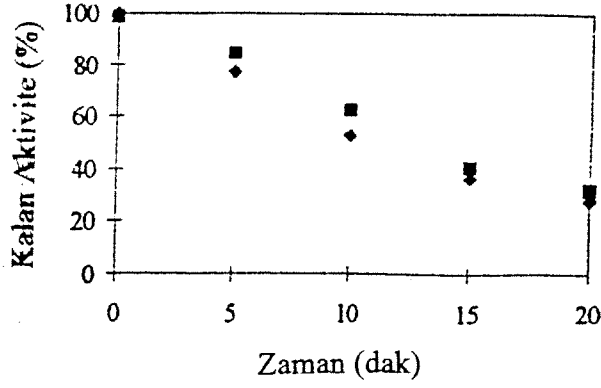
Şekil 44. Doğal ve DTBP ile çapraz bağlanmış β -glukosidaz aktivitesinin 55 °C de ısıl inaktivasyonu. (◆: doğal, ■: çapraz bağlı)



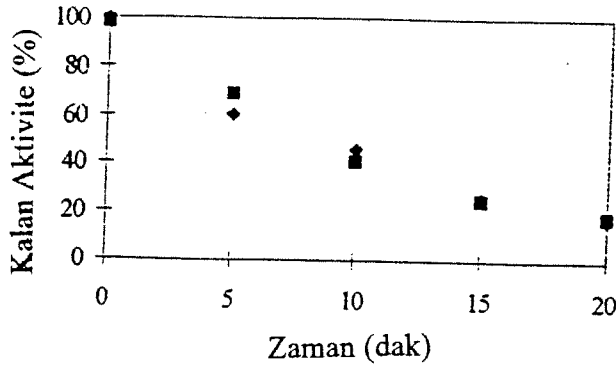
Şekil 45. Doğal ve DTBP ile çapraz bağlanmış β -glukosidaz aktivitesinin 57.5 °C de ısıl inaktivasyonu. (◆: doğal, ■: çapraz bağlı)



Şekil 46. Doğal ve DTBP ile çapraz bağlanmış β -glukosidaz aktivitesinin 60 °C de ısıl inaktivasyonu. (◆: doğal, ■: çapraz bağlı)



Şekil 47. Doğal ve DTBP ile çapraz bağlanmış β -glukosidaz aktivitesinin 62.5 °C de ısıl inaktivasyonu.



Şekil 48. Doğal ve DTBP ile çapraz bağlanmış β -glukosidaz aktivitesinin 65 °C de ısıl inaktivasyonu.

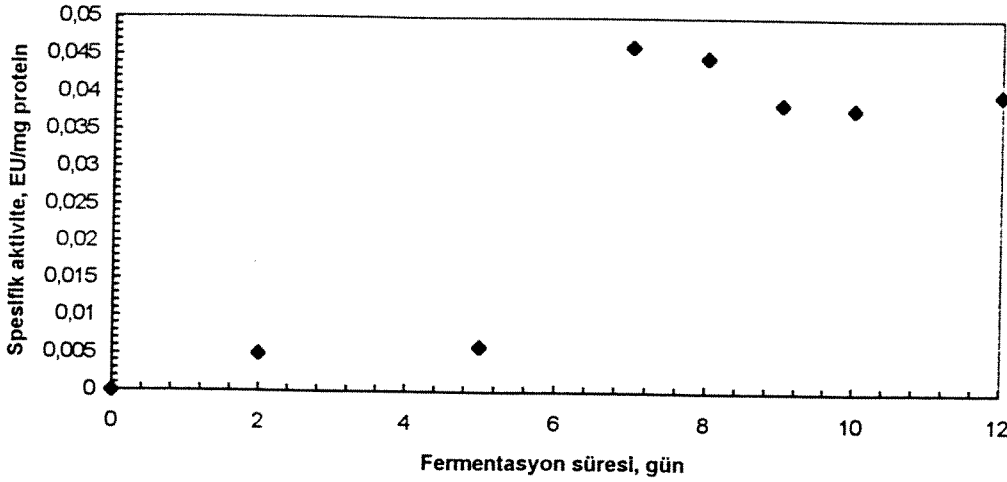
3.3.2. *Trichoderma reesei* β -glukosidazının kullanılması

3.3.2.1. β -glukosidaz'ın *T. reesei* fermentasyonu ile üretilmesi ve saflaştırılması

β -glucosidaz enziminin *T. reesei* kullanılarak üretilmesi için fermentasyon çalışmaları Mandels ortamı içinde ve içine β -glucosidaz miktarını artırmak için % 1 nişasta konularak 28 °C'de çalkalayıcı inkübatörde 12 gün süreyle yapıldı (Taj-Aldeen, 1993). Fermentasyon süresince numuneler alınıp, hücreler uzaklaştırıldıktan sonra kalan sıvının içerdiği protein konsantrasyonu ve β -glucosidaz aktivitelerine bakılıp spesifik aktiviteleri fermentasyon süresine göre çizildi. Şekil 49'dan da görüldüğü gibi enzim üretimi beşinci

günden sonra artmaya başlayıp altıncı, yedinci günler civarında maksimum aktiviteye ulaştı.

Daha sonra muhtemelen proteinin dayanıklılığını koruyamaması sebebi ile aktivitesinde düşüşler gözlemlendi. Dolayısıyla daha sonra yapılan üretim fermentasyonlarında 7 günlük fermentasyon süresi kullanıldı.



Şekil 49. *Trichoderma reesei* kullanılarak β -glucosidaz üretim grafiği.

Fermentasyonlardan sonra hücreler Sorval soğutmalı santrifuj kullanılarak (10,000 x g, 10 dakika) fermentasyon ortamından ayrıldı. Daha sonra enzim amonyum sülfat kullanılarak (%80 doygunluk derecesinde) çöktürüldü ve Tablo 1'den de görüldüğü gibi enzim iki kat saflaştırılmış oldu. Avisel'e adsorbsiyon yolu ile de % 30'luk bir saflaştırma daha sağlandı. DEAE-sefadex kromatografisi kullanılarak enzimin saflığı 5 kere daha arttı. Saflığı toplam 13 kez artan enzim kullanılarak SDS-jel kromatografisi yapıldı. Komasi mavi boyası ile boyandıktan sonra tek bir band görüldü. Daha sonra saflaştırılan enzim zaman kaybetmeden çapraz bağlama işlemi için kullanıldı.

Tablo 1: β -glucosidaz enziminin saflaştırma kademeleri sırasında saflaştırma miktarları.

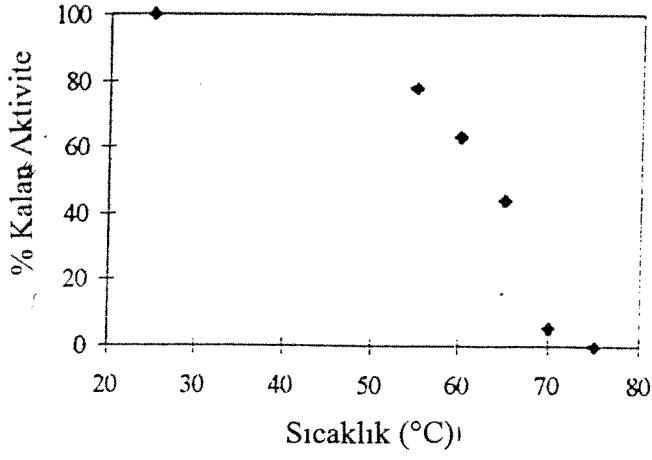
	Spesifik aktivite (EU/mg)	Saflaştırma derecesi
fermentasyon ortamı	0.05	1
Amonyum sülfat çökeltmesi	0.1	2
Avisel Adsorp.	.13	2.3
DEAE-sephadex kromatografisi	0.65	13

İlk olarak doğal enzimin ısı inaktivasyon eğrisi çizildi. Şekil 50’de görüldüğü gibi ısı inaktivasyon 55 °C civarında başlamaktadır ve diğer selüloz bileşenleriyle karşılaştırıldığında ısı dayanıklılığı daha düşüktür.

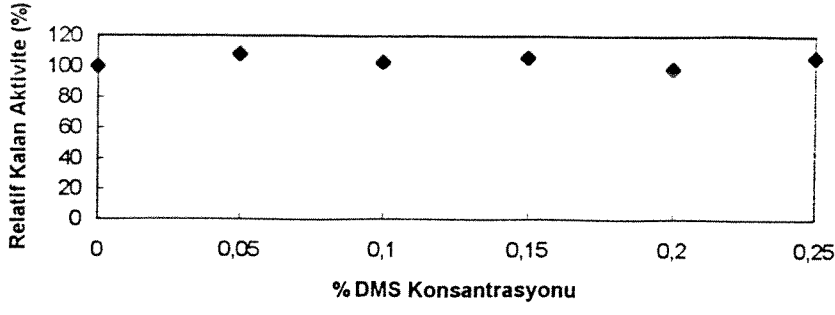
3.3.2.2. Çapraz bağlamanın etkilerinin incelenmesi

Çapraz bağlama işlemi DMS, DMA ve DTBP ile değişik konsantrasyonlarda yapıldı. Çapraz bağlama için DMS kullanıldığı zaman enzim aktivitesi üzerinde olumsuz bir etkisi olmadı. DTBP ve özellikle DMA enzimin aktivitesini %10-25 oranında etkilediler. Şekillerden de (50-52) görüldüğü gibi değişik çapraz bağlayıcılarla bağlamak enzimin ısı dayanıklılığını diğer β -glucosidaz ‘da olduğu gibi ancak % 5 civarında artırmış ve çok

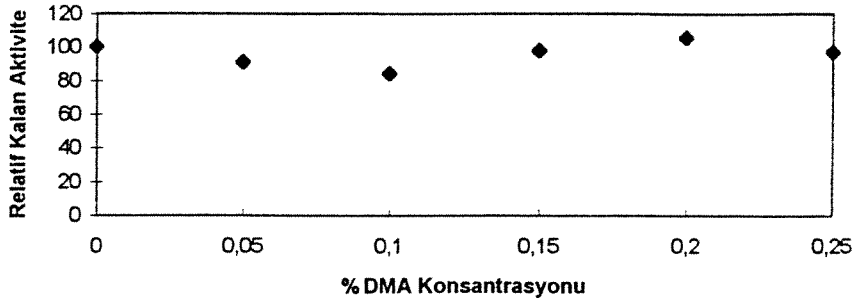
önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Bu nedenle de daha detaylı enzim inaktivasyon çalışmalarını yapılmasına gerek görülmemiştir.



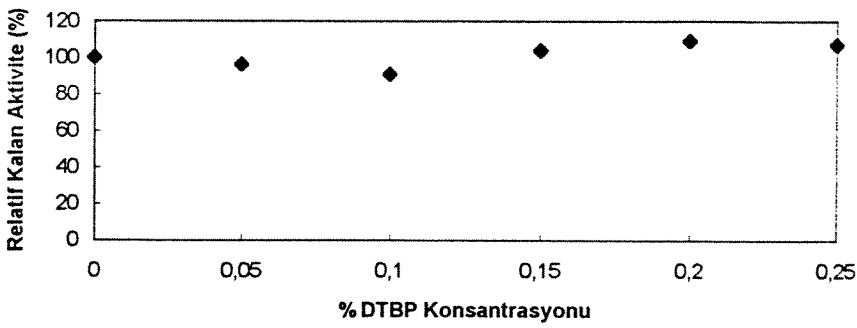
Şekil 50. Doğal β -glucosidaz'ın ısı dayanıklılık eğrisi.



Şekil 51. DMS konsantrasyonunun β -glukosidaz aktivitesi üzerindeki etkisi. (60 °C 'de 15 dakikalık ısıl işleminden sonra.)



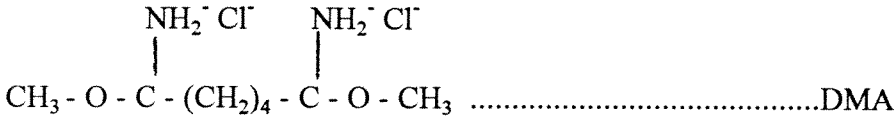
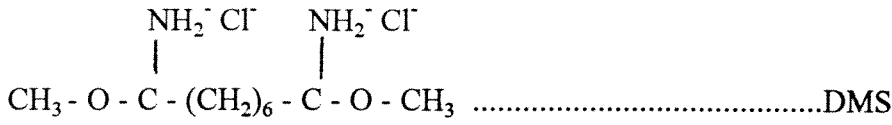
Şekil. 52. DMA konsantrasyonunun β -glukosidaz aktivitesi üzerindeki etkisi. (60 °C 'de 15 dakikalık ısıl işleminden sonra.)



Şekil 53. DTBP konsantrasyonunun β -glukosidaz aktivitesi üzerindeki etkisi. (60 °C 'de 15 dakikalık ısıl işleminden sonra.)

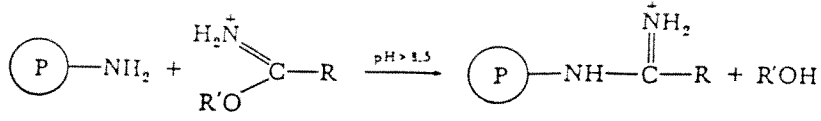
3.4. Çapraz Bağlayıcı Boyunun Selülaz Sistemi Üzerindeki Etkisi

Giriş bölümünde de bahsedildiği gibi imidoesterler homo-iki fonksiyonlu çapraz bağlayıcılar olup fonksiyonel grupları arasında belli bir mesafe vardır ve fonksiyonel grupları da bazik ortamda aminlerle reaksiyona girerek imidoaminleri oluşturur. Bu çalışmada kullanılan dimetil suberimidat, dimetil adipimidat ve dimetil-dithiobis propionimidat'ın çapraz bağlama boyları sırasıyla 9,11 ve 13 Å olup kimyasal yapıları aşağıda gösterilmiştir.



Kimyasal yapılardan görüldüğü gibi DMS ve DMA'nın kimyasal yapıları birbirine çok yakındır ve aralarındaki tek fark DMA'nın iki -CH₂ grubu uzun olmasıdır. DTBP'nin yapısında diğerlerinden farklı olarak bir kükürt atomu bulunmaktadır.

Çapraz bağlama kimyasal reaksiyonu basik pH'da aşağıda görüldüğü şekilde oluşmaktadır (Means ve Feeney, 1971):



Reaksiyondan da açık şekilde görüldüğü gibi protein üzerindeki amino grupları ile bisimidoesterlerin çeşidine bağlı olmaksızın karbon atomu arasında reaksiyon olmakta ve C = N bağı oluşmakta, ayrıca ortama CH₃OH salınmaktadır. Protein üzerindeki (+) yük kayboduğu halde, çapraz bağlayıcı üzerinde amino grubu bulunduğu için proteinin toplam yükünde bir değişiklik olmamaktadır. Çapraz bağlayıcıların iki ucunda da reaktif gruplar bulunduğu için sonuç olarak çapraz bağlayıcı protein üzerinde bulunan iki amino grubunu birbirine bağlanmaktadır. Çapraz bağlayıcılar arasındaki fark da proteine bağlanan iki uç arasındaki mesafedir. Bu mesafe en az DMA ve en çok da DTBP ile sağlanmıştır.

Çapraz bağlayıcıların protein üzerinde bağ kurabilmesi için boyuna uygun olarak iki amino grubu bulması şarttır. Genellikle protein konsantrasyonunun çok yüksek olduğu durumlarda farklı protein moleküllerini de birbirine bağlayabilmektedir. Ancak substratı suda çözünemeyen enzimler için moleküllerin birbirine bağlanması (bir çeşit enzim tutuklanması olacaktır) substratın enzime ulaşmasını engelleyerek, reaksiyon hızını düşürüp hatta tamamen engelleyebilecektir.

Selüla ile yapılan çapraz bağlama çalışmalarında kullanılan üç çapraz bağlayıcıdan hiçbiri sadece çapraz bağlamadan dolayı enzimlerin aktivitelerini çok değiştirmemiştir. Bu da çapraz bağlamanın proteinlerde aktiviteyi düşürecek bir değişikliğe (yapısal değişiklik,

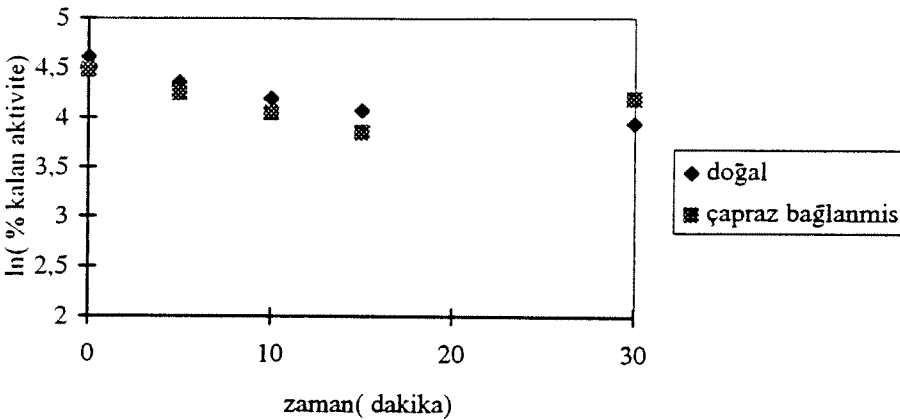
aktif bölge değişiklikleri, aktif bölgenin girişinin kapanması ya da moleküller arası çapraz bağlamadan dolayı substrata ulaşamamak gibi değişiklikler) neden olmadığını göstermektedir. Ancak uygulanan ısı işlemlerden sonra en olumlu etkiyi DMS verdiği için 11 Å'luk çapraz bağlamanın enzimlerin özellikle de β -glukosidaz'ın yapısını olumlu biçimde değiştirdiği ya da yapıyı sağlamlaştırdığı söylenebilir.

3.5. Isıl Deaktivasyon Kinetik Çalışmaları

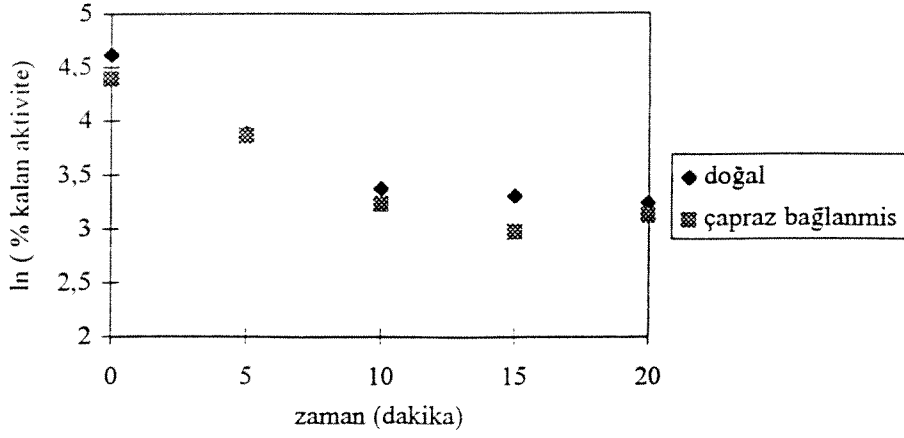
En olumlu sonuçlar DMS ile alındığı için, ısı inaktivasyon kinetik çalışmaları DMS-çapraz bağlı enzimlerin toplam selülaz aktiviteleri, sellobiyohidrolaz aktivitesi, endoglukanaz aktivitesi ve β -glukosidaz aktivitesi için yapılmıştır.

Enzimlerin birinci dereceden ısı inaktivasyona uğrayıp uğramadığını belirlemek için kalan aktivitelerin doğal logaritmaları (\ln) alınarak zamana karşı çizilmiştir. Birinci dereceden ısı inaktivasyona uğrayan enzimlerin bu grafiklerde zamana karşı doğrusal değişimler göstermesi gerekmektedir.

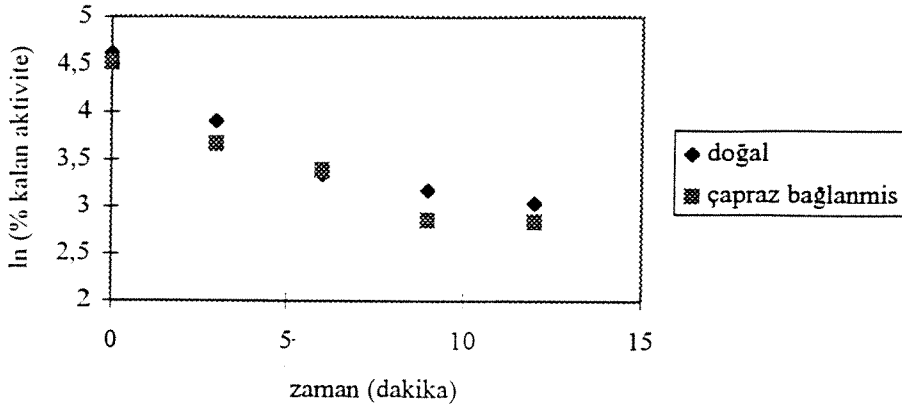
Toplam selülaz aktivitelerinin verildiği grafikler incelenecek olursa (Şekil 54-58) hem doğal hem de çapraz bağlanmış formlarının denenen tüm sıcaklıklarda ısı inaktivasyon kinetiğinin birinci dereceden olmadığı görülmektedir.



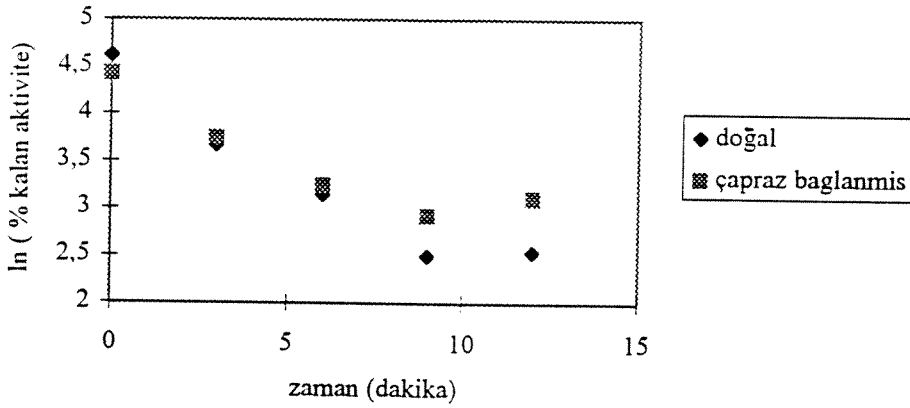
Şekil 54. Toplam selülaz aktivitesi için 65 °C'de ısı inaktivasyon kinetiği.



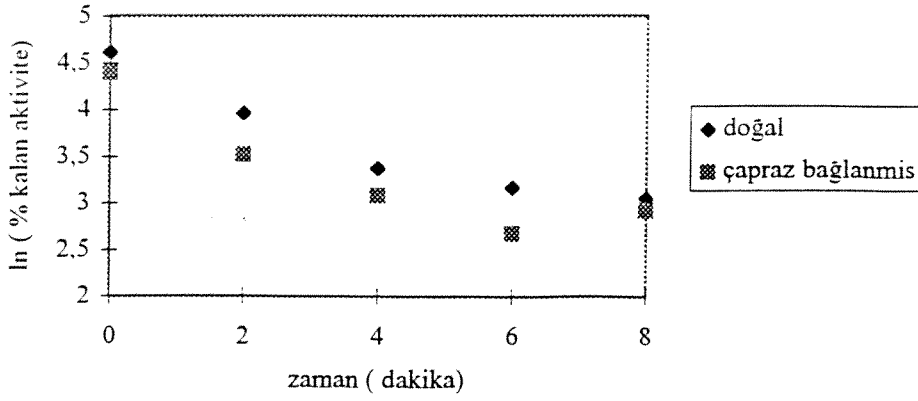
Şekil 55. Toplam selüloz aktivitesi için 67.5 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.



Şekil 56. Toplam selüloz aktivitesi için 70 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.

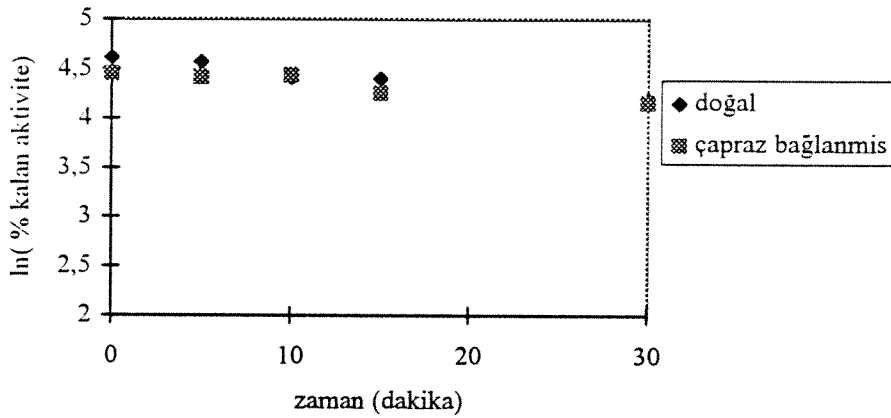


Şekil 57. Toplam selüloz aktivitesi için 72.5 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.

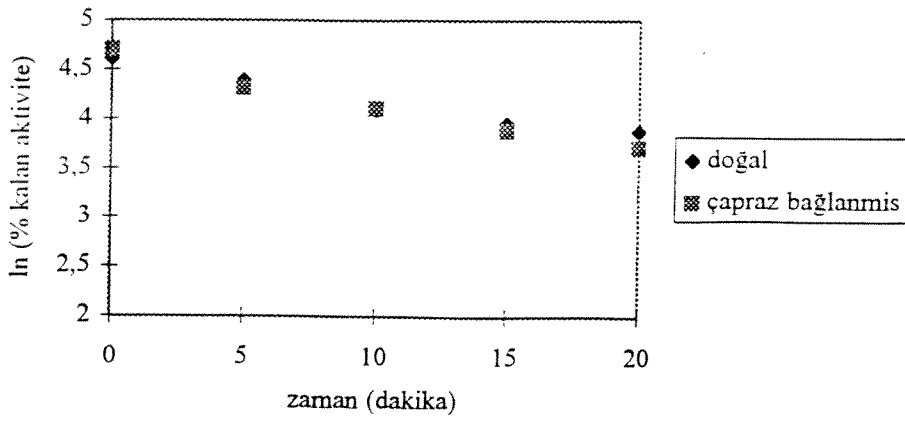


Şekil 58. Toplam selüloz aktivitesi için 75 °C'de ısıl inaktivasyon kinetiği.

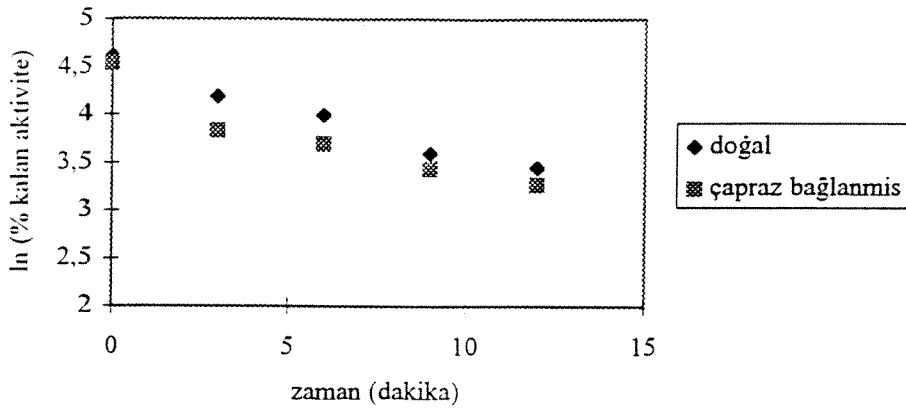
Sellobiyohidrolaz aktiviteleri için hazırlanmış grafikler (Şekil 59-63) doğal enzimin (75 °C hariç) doğrusal bir bağıntı gösterdiği için birinci dereceden bir inaktivasyon olduğu anlaşılmaktadır. Çapraz bağlı enzimde ise doğrusal bağıntı 70 °C'den itibaren bozulmaktadır. Sıcaklık yükseldikçe enzimin birinci derece ısıl inaktivasyondan çıktığı, bu değişikliğin çapraz bağlı enzimde daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştiği görülmektedir.



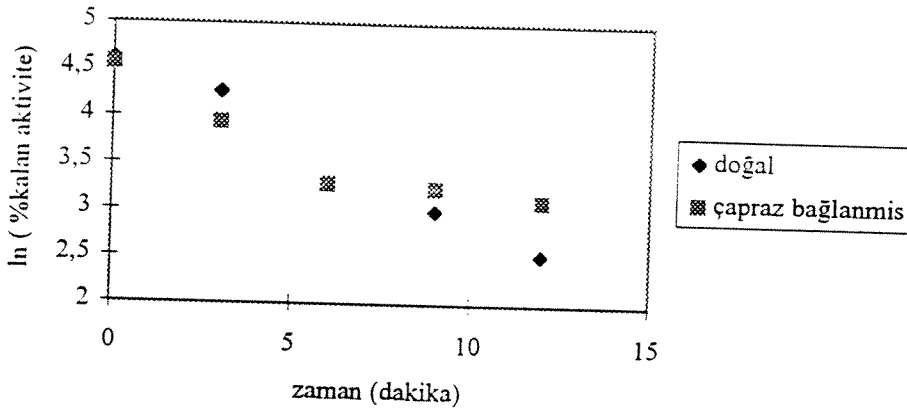
Şekil 59. Sellobiyohidrolaz için 65 °C'de ısıl inaktivasyon kinetiği.



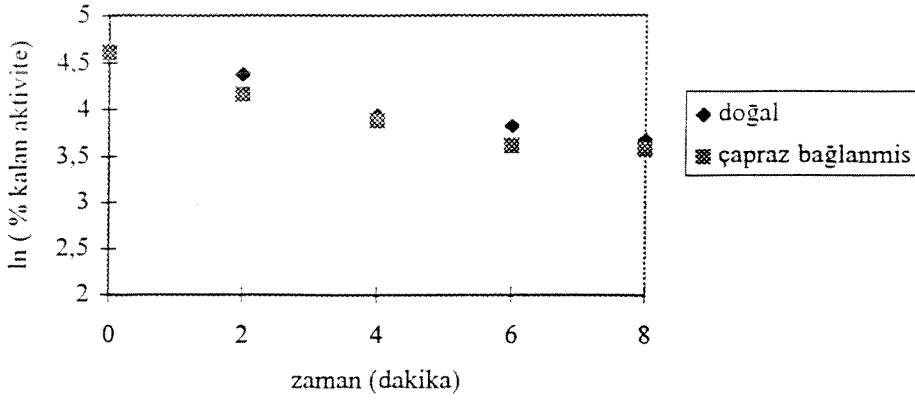
Şekil 60. Sellobiyohidrolaz için 67.5 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.



Şekil 61. Sellobiyohidrolaz için 70 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.

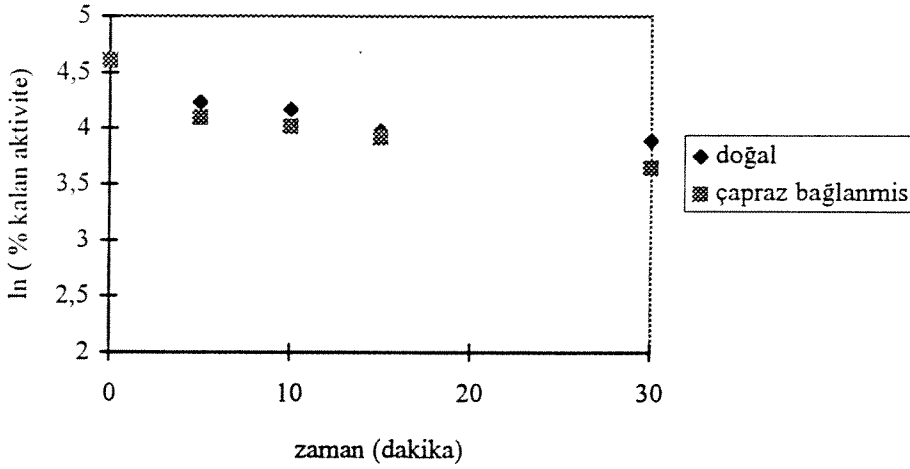


Şekil 62. Sellobiyohidrolaz için 72.5 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.

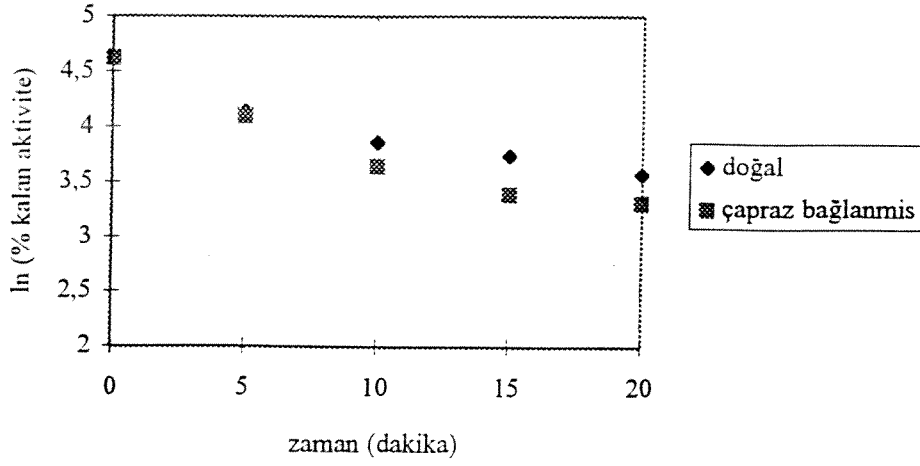


Şekil 63. Sellobiyohidrolaz için 75 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.

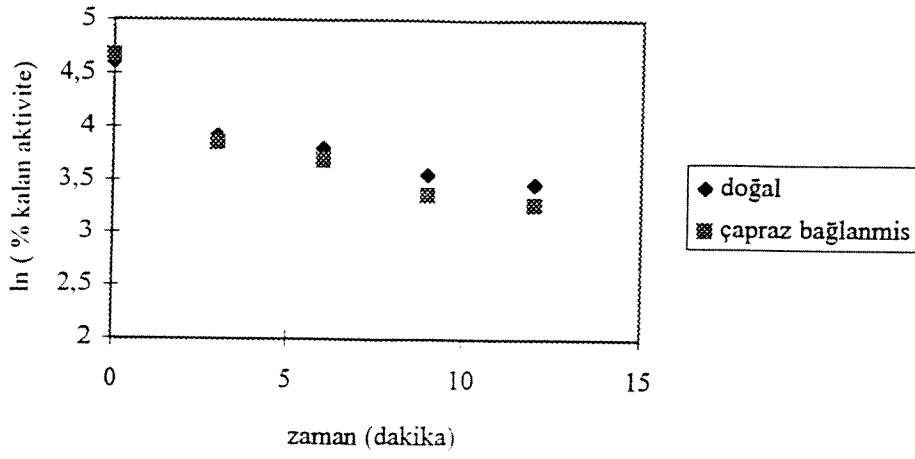
Endoglukanaz deaktivasyon kinetik çalışmaları (Şekil 64-68) ise birinci dereceden inaktivasyon olmadığını gösterdi. 65 ve 70 °C'de yapılan çalışmalarda ilk 5 dakikalık bölümü diğer kısımdan ayırırsak iki değişik deaktivasyon sabitine sahip birinci dereceden inaktivasyon olduğu da söylenebilir. İki değişik deaktivasyon hızının görülmesi ise deaktivasyon mekanizmasının değiştiğini gösteriyor olabilir.



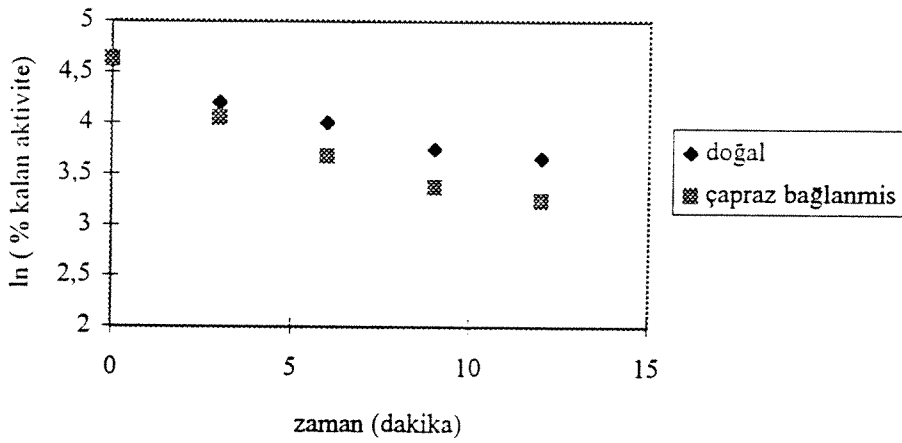
Şekil 64. Endoglukanaz için 65 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.



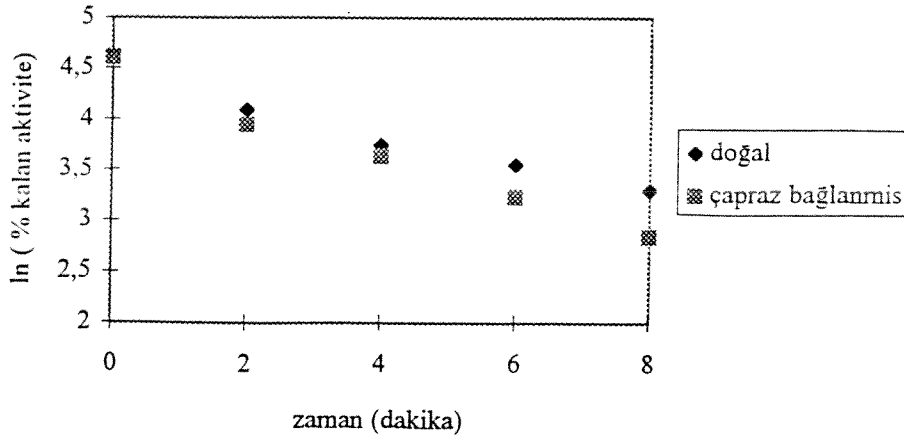
Şekil 65. Endoglukanaz için 67.5 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.



Şekil 66. Endoglukanaz için 70 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.

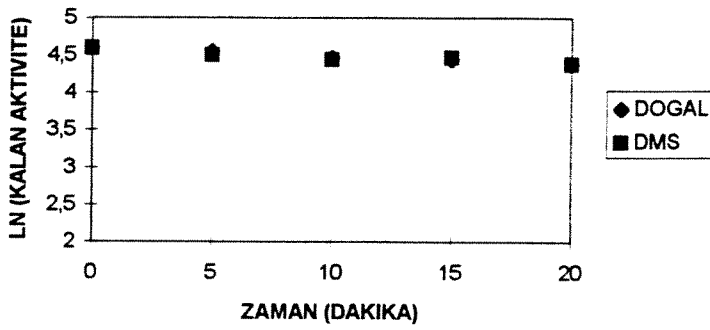


Şekil 67. Endoglukanaz için 72.5 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.

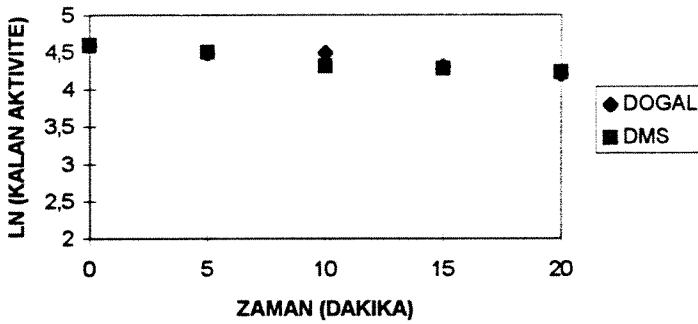


Şekil 68. Endoglukanaz için 75 °C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.

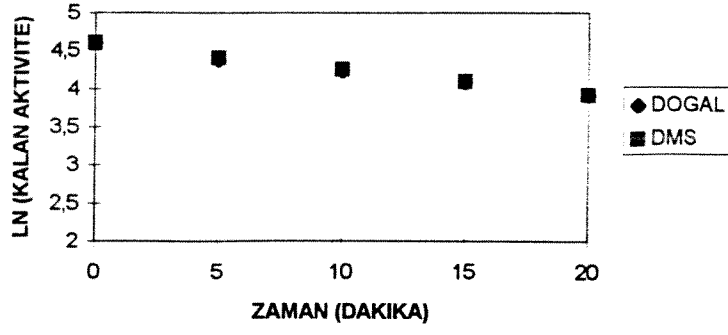
β -glukosidaz aktiviteleri için çizilen grafiklerde (Şekil 69-73) ise birinci dereceden inaktivasyon olduğu görülmektedir. Genel olarak çapraz bağlama inaktivasyon hızlarını çok az yavaşlatmış, inaktivasyon kinetiğinde önemli bir değişime yol açmamıştır.



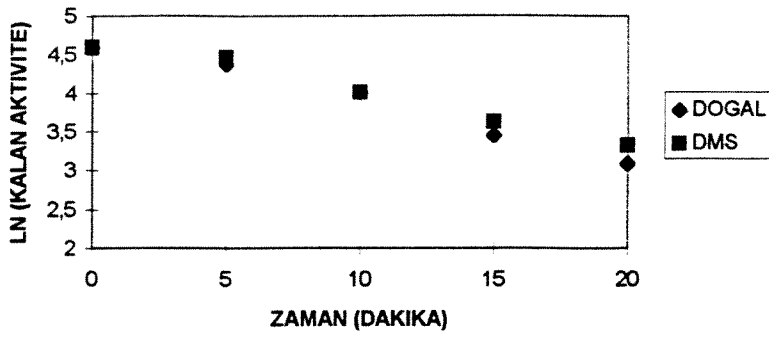
Şekil 69. β -glukosidaz için 55°C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.



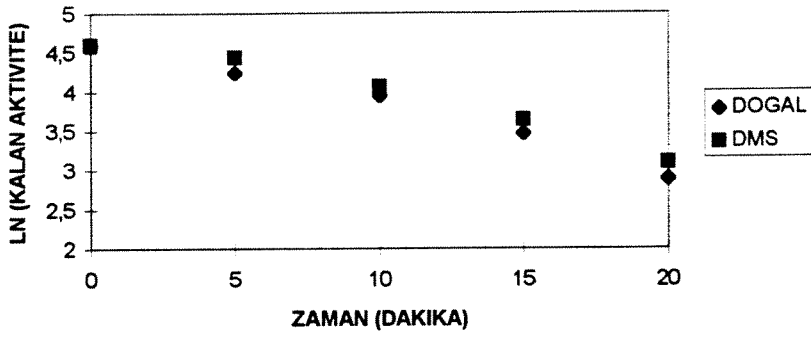
Şekil 70. β -glukosidaz için 57.5°C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.



Şekil 71. β -glukosidaz için 60°C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.



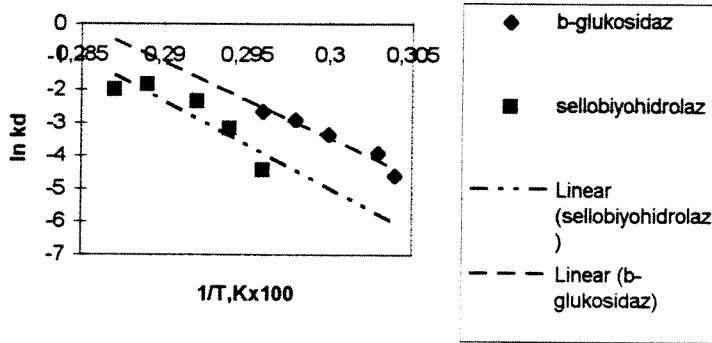
Şekil 72. β -glukosidaz için 62.5°C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.



Şekil 73. β -glukosidaz için 65°C'de Isıl inaktivasyon kinetiği.

sellobiyohidrolazın (doğal ve çapraz bağlanmış) ve β -glukosidaz'ın denenen bütün sıcaklıklarda birinci dereceden inaktivasyona uğradığı, endoglukanazın ise sadece çapraz bağlı formunun yüksek sıcaklıklarda birinci dereceden inaktivasyon gösterdiği bulunmuştur. Genel olarak çapraz bağlama inaktivasyon hızlarını çok az yavaşlatmış, inaktivasyon kinetiğinde önemli bir değişime yol açmamıştır.

Sellobiyohidrolaz ve β -glukosidazın değişik sıcaklıklarda inaktivasyon sabitleri hesaplanmış, inaktivasyon için aktivasyon enerjilerini hesaplamak amacı ile bu değerlerin doğal logaritmaları $1/T$ 'ye göre çizilmiştir. Elde edilen doğruların eğimleri $-(E/R)$ olduğu için aktivasyon enerjileri hesaplanabilmiştir (Şekil 74).



Şekil 74. Sellobiyohidrolaz ve β -glukosidaz'ın Arrhenius grafikleri.

Bulunan aktivasyon enerjileri çapraz bağlı ve doğal formdaki enzimlerin ortalama değerleridir. Sellobiyohidrolaz ve β -glukosidaz için bulunan aktivasyon enerjileri sırası ile 51 ve 45 kcal/mol'dur. Bu sonuçlar da sellobiyohidrolazın inaktivasyon için daha büyük bir enerjiye ihtiyacı olduğunu, bir başka deyişle β -glukosidaz'dan daha dayanıklı olduğunu göstermektedir.

4. SONUÇLAR

Bu projenin amacı selülaz biyoreaktörlerinin süreç verimini artırabilmek için selülaz kompleksinin ısıl dayanıklılığını çapraz bağlama yolu ile artırmak ve çapraz bağlanmış ve doğal enzimlerin ısıl inaktivasyonlarını karşılaştırmalı olarak çalışmaktır.

Amaç pratikte (endüstride) kullanılan selülazın ısıl inaktivasyonunu artırmak olduğu için başlangıç olarak selülazın bileşenleri saflaştırılmadan çapraz bağlama işlemi yapıldı ve bileşimdeki enzimlerin aktiviteleri kendilerine uygun substratlar kullanılarak ölçüldü. Selülaz üreten mikroorganizmalar selülazın bütün bileşenlerinin hepsini birden ürettikleri için saflaştırma yapmadan çapraz bağlama işlemi ile ısıl dayanıklılık artırılabilirse ekonomik olarak endüstride kullanılan süreçlere katkıda bulunulabilecekti.

Doğal enzim kompleksi ile yapılan ısıl inaktivasyon çalışmalarında enzim kompleksindeki ısıya en hassas enzimin β -glukosidaz en dayanıklısının da sellobiohidrolaz olduğu ve ısıl inaktivasyonun 55-60 °C civarında başladığı bulundu.

Bisimidoesterlerle yapılan çapraz bağlama reaksiyonu için basik pH gerekli olduğundan çapraz bağlama denemelerinden önce selülaz kompleksinin pH dayanıklılığına bakıldı ve β -glukosidaz hariç diğer bileşenlerin pH 9'da oda sıcaklığında 3 saatlik bir bekleme süresi sonucunda % 100 aktif oldukları bulundu. β -glukosidaz ise daha hassas olduğu ve yüksek pH'da aktivite kaybını önlemek için bu süre içinde % 100 dayanıklı olduğu pH 7.5'de çapraz bağlama işlemleri yapıldı.

Isıl inaktivasyondan önce sadece çapraz bağlamanın enzimlerin aktivitesi üzerindeki etkisi incelendi. Dimetil suberimidat (DMS)'in enzimin aktivitesini hiç bozmadığı, dimetil dithiobispropionimidat (DTBP) ve dimetil adipimidat (DMA)'ın % 10-15 oranında

düşürdüğü gözlemlendi. Hiç aktivite kaybına sebep olmaması üç değişik boyda olan bu imidoesterlerden selülazlar için en uygununun orta boydaki DMS (11 Å) olduğunu gösterdi.

Isıl işlemlerden sonra DMA ısı dayanıklılığı azaltırken en pozitif etkiyi DMS özellikle de β -glukosidaz üzerinde yaptı. Bu enzimin ısı dayanıklılığı % 1-5 civarında arttı. Ancak artış miktarı endüstride kullanıma uygun olacak biçimde yüksek değildi.

Çapraz bağlayıcıların enzim aktivitelerini pek değiştirmemeleri ilk etapta olumlu bir sonuçtu ancak ısı dayanıklılıklarında kayda değer bir değişiklik yapamadı.

Selülaz kompleksinin ısı dayanıklılığını artırmak için değişik çapraz bağlama boylarında denenen bisimidoesterlerin bu amaca hizmet etmeyeceği görüldü. Selülaz kompleksinin ısı dayanıklılığını artırabilmek için giriş bölümünde bahsedilen diğer metodlar (başka kimyasal değişiklikler, protein mühendisliği vs) denenebilir.

5. Referanslar

- Dubey A.K., Bisaria, V.S., Mukhopadhyay, S.N., Ghose T.K., Stabilization of restriction endonuclease BamHI by crosslinking reagents, *Biotechnology and Bioengineering*, 33, 1311-1316, (1989).

- Erarslan A., Koçer, H., Thermal inactivation kinetics of penicillin G acylase obtained from a mutant derivative of E. coli ATCC 11105, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 55, 79-84, (1992).

- Evans B, Margalit R., ve Woodward J., Attachment of pentaamineruthenium (III) to T. reesei cellobiohydrolase I increases its catalytic activity, *Biochemical and Biophysical research communications*, 195, 497-503, (1993).

- Fagain O.C., O'Kennedy R., Functionally-stabilized proteins, *Biotechnology Advances*, 9, 351-409, (1991).

- Ghose T.K., Measurement of cellulase activities, *Pure and Applied Chemistry*, 59, 257-268, (1987).

- Gianfreda L., Scarfi M.R., Enzyme stabilization: State of the art, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 97-128, (1991).

-Gong C.S., Ladisch M.R. ve Tsao G.T., Cellobiase from *T. viride*: Purification properties, kinetics and mechanism, *Biotechnology and Bioengineering*, 19, 959-981, (1977).

-Gottschalk N., Jaenicke R., Chemically crosslinked lactate dehydrogenase stability and reconstitution after gluteraldehyde fixation, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 9, 389-400, (1987).

-Hand E.S., Jenks P.W., Mechanism of the reaction of imidoesters with amines, *Journal of American Chemical Society*, 84, 3505-3514, (1962).

-Hartree, E.F., Determination of protein: a modification of the Lowry's method that gives a linear response, *Analytical Biochemistry*, 48, 422-427, (1972).

-Hunter M.J., Ludwig M.L., The reaction of imidoesters with proteins and related small molecules, *Journal of American Chemical Society*, 84, 3491-3504, (1962).

-Jaenicke R., Protein conformation, Wiley, Chichester Ciba Foundation Symposium 161, 206-221, (1991).

-Ji, T.H., Bifunctional reagents, *Methods in enzymology*, 91, 580-607, (1983).

- Klibanov A.M., Mozhaev V.V., On the mechanism of irreversible thermoinactivation of enzymes and possibilities for reactivation of irreversibly inactivated enzymes, *Biochemical Biophysical Research Communication*, 83, 1012-1019, (1978).
- Kubicek C.P., Messner R., Gruser F., Mach LR., Kubicek-Pranz M.E., The Trichoderma cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus, *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 90-99, (1993).
- Laemmli U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685, (1970).
- Mandels, M., Application of cellulases, *Biochemical Society Transactions*, 13, 414-416.
- Mata I, Castillon M., Dominguez J, Macarron R. ve Acebal, C., Chemical modification of β -glukosidase from *T. reseei* QM 9414, *J. Biochemistry*, 114, 754-759, (1993).
- Means G.E., Feeney R.E., Chemical modification of proteins, Holden-Day Inc., California, 89-93, (1971).
- Murai T., Ueda M., Atomi H., Shibasaki Y., Kamasawa N., Osumi M., Kawagucki T, Arai M, Tanaka A., Genetik immobilization of cellulase on the cell surface of *S. cerevisiae*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 499-503, (1997).

- Nelson N., Nelson's method for quantitative determination of reducing power of carbohydrates, *Journal of Biological Chemistry*, 153, 375-380, (1944).
- Park J.W., ve Kajiuchi, T., Development of effective modified cellulase for cellulose hydrolysis process, *Biotechnology and Bioengineering*, 45, 366-373, (1995).
- Rajput Y.S., Gupta M.N., Reaction of trypsin with some crosslinking reagents, *Enzyme and Microbial Technology*, 9, 161-163, (1987).
- Rajput Y.S., Gupta M.N., Reaction of trypsin with dimethyl adipimidates: Purification and characterization of a trypsin derivative with decreased autolysis, *Enzyme and Microbial Technology*, 10, 143-150, (1988).
- Ryu S.K., Lee, J.M., Bioconversion of waste cellulose by using an attrition bioreactor, *Biotechnology and Bioengineering*, 25, 53-65, (1983).
- Singh, A. ve Hayashi K., Microbial cellulases: Protein architecture, molecular properties and biosynthesis, *Advances in Applied Microbiology*, 40, 1-44, (1995).
- Taj-Aldeen S.J., Effect of starch on the induction of β -glucosidase in *Trichoderma reesei*, *Mycological Research*, 97, 318-320, (1993).

-Tatsumoto K., Oh K.K., Baker J.O., Himmel M.E., Enhanced stability of glucoamylase through chemical crosslinking, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 76, 293-308, (1989).

-Torchilin V.P., Trubetsky V.S., Stabilization of subunit enzymes by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents, *Annals of New York Academy of Sciences*, 434, 27-30, (1984).

-Wong S.S., Wong L.C., Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes, *Enzyme and Microbial Technology*, 14, 866-874, (1992).

-Zentgraf B., Ahern T.J. Practical importance of enzyme stability, *Pure and Applied Chemistry*, 63, 1527-1540, (1991).

BİLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU	
Proje No: MISAG-70	2- Rapor Tarihi: 10.4.1998
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 10.11.1995 / 10.11.1997	
Projenin Adı: Selüloz Reaktörlerinde Süreç veriminin artırılması	
Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Doç.Dr. Ufuk Bakır Prof.Dr. Altan Erarslan Prof.Dr. Haluk Hamamcı Jülide Bilen	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: O.D.T.Ü. Gıda Müh.Bölümü 06531 ANKARA	
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK	
<p>Öz (Abstract): Bu araştırmanın amacı selüloz reaktörlerinde süreç verimini artırabilme için selüloz enzim kompleksini bisimidoesterler grubunda çapraz bağlayıcılar kullanarak çapraz bağlamak ve çapraz bağlanmış enzim sisteminin ısıl inaktivasyonunu doğal enzimin ısıl inaktivasyonu ile karşılaştırarak incelemektir.</p> <p>Selüloz, selülozu önce oligosakkaritlere ve en sonunda da glikoza parçalayan, farklı bileşene sahip kompleks bir enzim sistemidir. Bu bileşenler endoglukanaz (EC 3.2.1.4), sellobiyohidrolaz (EC 3.2.1.91) ve B-glukosidaz (EC 3.2.1.21) olarak tanımlanır. Selüloz enzimleri <u>Aspergillus</u>, <u>Fusarium</u> ve <u>Trichoderma</u> gibi mikroorganizmalar tarafından üretilirler.</p> <p>Araştırmada <u>Trichoderma reesei</u> selüloz ve çapraz bağlayıcı olarak bisimidoester grubunda değişik çapraz bağlama boylarına sahip üç değişik çapraz bağlayıcı dimetil suberimidat (DMS), dimetil adipimidat (DMA) ve dimetil-3,3'-dithiobispropionimidat (DTBP) kullanıldı. Serbest amino gruplarını birbirine bağlayan bisimidoesterlerin çapraz bağlayıcı olarak seçilmesinin nedeni, selülozların aktif bölgelerine katalitik fonksiyonu olan ve amino grubu içeren bazik amino asitlerden bulunmamasıdır.</p> <p>Çapraz bağlama reaksiyonlarından hemen sonra yapılan aktivite testleri, aktiviteelerde önemli bir değişiklik olmadığı için, bisimidoesterlerin selülozları çapraz bağlamak için uygun çapraz bağlayıcılar olduğunu gösterdi. Ancak yapılan detaylı .. / 2.</p> <p>Anahtar Kelimeler: Selüloz, Sellobiyohidrolaz, endoglukanaz, B-glukosidaz, çapraz bağlama, ısıl dayanıklılık ve</p>	
<p>Proje ile ilgili ^{bisimidoester} Yayın/Bilgilerde ilgili Bilgiler Stability and stabilization of Biocatalysts adlı kongrede "The effect of crosslinking on thermal inactivation of cellulases" adlı bildiri (19-21 Nisan 1998 tarihleri arasında, İspanya) sunulacak ve Elsevier tarafından tam metin basılacaktır. İkinci makalede hazırlanmaktadır.</p>	
Bilim Dalı:	
Doçentlik B. Dalı Kodu: Biyoteknoloji	ISIC Kodu:
Uzmanlık Alanı Kodu:	
Dağıtım (*): <input type="checkbox"/> Sınırlı <input checked="" type="checkbox"/> Sınırsız	
Raporun Gizlilik Durumu : <input type="checkbox"/> Gizli <input checked="" type="checkbox"/> Gizli Değil	

Enizin Sonuç Raporunun ulaştırılmasını istediğiniz kurum ve kuruluşları ayrıca belirtiniz