

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SELÜLAZ-DEKSTRAN KONJUGATLARININ SENTEZİ
VE KARAKTERİZASYONU**

Biyokimyager Aslı ARSLAN

**FBE Biyokimya Anabilim Dalından
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Huriye KUZU (YTÜ)

İSTANBUL, 2007

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KISALTMA LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
ÇİZELGE LİSTESİ	vi
ÖNSÖZ	vii
ÖZET	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Selüloz:	2
2.2 Bitki Biyokütlesinin Enzimatik Parçalanması:	6
2.3 Selülozların Substratları:	9
2.3.1 Suda Çözünen Substratlar:	9
2.3.2 Suda Çözünmeyen Substratlar:	11
2.4 Aktivite Tayini:	13
2.5 Selülozlar ve Domainleri:	15
2.6 Fungal Selülozlar:	20
2.7 Bakteriyal Selülozlar:	23
2.8 Selülozom Yapısı:	24
2.9 Selülozun Hidroliz Mekanizması:	25
2.9.1 Sürekli (retaining) Mekanizma:	28
2.9.2 Kesikli (inverting) Mekanizma:	28
2.10 Aspergillus niger Selülozının Özellikleri:	29
2.11 Selülozın Endüstriyel Uygulamaları:	30
2.12 Enzim Stabilizasyonu:	34
2.12.1 Protein Mühendisliği:	36
2.12.2 Kimyasal Modifikasyon:	36
2.12.3 Çapraz Bağlı Enzim Kristalleri:	36
2.12.4 Polimere Kovalent Olarak Bağlama:	36
2.13 Dekstran:	37
2.13.1 Dekstranın Fiziksel Özellikleri:	38
2.13.2 Dekstranın Biyo-uyumluluğu:	39
2.13.3 Dekstranın Kullanım Alanları:	40
3. MATERYALLER:	42
3.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler:	42
3.2 Kullanılan HPLC Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri:	42
3.3 Kullanılan Viscotek Marka GPC Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri:	43
3.4 Kullanılan UV-Vis Spektrofotometresinin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri:	44
3.5 Kullanılan Protein Ayırıştırma Cihazının Teçhizat ve Çalışma Parametreleri:	44
3.6 Kullanılan Kimyasal Maddeler:	45
4. DENEYSEL ÇALIŞMA.....	46
4.1 Dekstran Sülfatın Aldehit Türevinin Eldesi.....	46
4.2 Dekstranın FTIR Spekturumlarının Alınması:	46
4.3 Enzim (Selüloz) Aktivitesi Tayini:	46
4.4 Saflaştırma İşlemleri:	51
4.5 Enzim-Polimer Konjugatlarının Sentezi:	52
5. SONUÇLAR	55
KAYNAKLAR:	70
ÖZGEÇMİŞ.....	1

SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
g	gram
L	litre
ml	mililitre
μ	mikro
μl	mikrolitre
M	Molar
nm	nanometre

KISALTMA LİSTESİ

NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrate
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Disodyum hidrojen fosfat heptahidrate
K-Na tartarat	Potasyum-Sodyum Tartarat
CMC	Karboksimetilselüloz
DNS	Dinitrosalisilik asid
D	Dekstran
DCHO	Dekstran-Aldehit
U	Unite
SnCl ₂ .2H ₂ O	Kalay (II) klorür dihidrat
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
NaOH	Sodyum hidroksid
NaIO ₄	Sodyum periyodat
KBr	Potasyum Bromür
NaBH ₄	Sodyum borhidrür
CBM	Selüloz bağlama modülü
EGaz	Endoglukanaz
CBH	Selobiyohidrolaz

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	Selüloz monomeri 3
Şekil 2.2	Selüloz ve Ksiloglukanın Moleküler Yapıları 4
Şekil 2.3	Selülozun Fibril Yapısı..... 6
Şekil 2.4	Selülozun glukoza hidrolizi 8
Şekil 2.5	Selülozun glukoza parçalanmasında enzimlerin etki mekanizması..... 9
Şekil 2.6	CBM ve selüloz mikrofibrillerinin etkileşimi..... 16
Şekil 2.7	Fungal selülazın şematik gösterimi..... 21
Şekil 2.8	Fungal selülazın üç boyutlu yapı modeli..... 22
Şekil 2.9	(a) CBHII ve (b) E2 yapıları..... 23
Şekil 2.10	Selülozom yapısının şematik gösterimi..... 24
Şekil 2.11	Kompleks olmayan sistemde selüloz hidrolizinin mekanistik şeması 27
Şekil 2.12	Glikozidik bağın hidroliz mekanizmaları 28
Şekil 2.13	Aspergillus niger 29
Şekil 2.14	Kimyasal madde (solda) ve selülaz (sağda) ile muamele görmüş pamuk ipliği 32
Şekil 2.15	Dekstran molekülünün yapısı 37
Şekil 2.16	Dekstran 10'a ait molekül ağırlığı dağılımı..... 38
Şekil 2.17	Dekstranın konsatrasyona bağlı vizkozite değişim grafiği..... 39
Şekil 4.1	Dekstranın aldehitlenme reaksiyonu 46
Şekil 4.2	DNS metodu ile glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen kalibrasyon grafiği 50
Şekil 5.1	Selülazın jel filtrasyon kolon kromatogramı 55
Şekil 5.2	Dekstran ve dekstran aldehite ait FTIR spektrumları 55
Şekil 5.3	0. dakika saf enzim ve konjugatlara ait aktivite grafiği 58
Şekil 5.4	30. dakika saf enzim ve konjugatlara ait aktivite grafiği 58
Şekil 5.5	60. dakika saf enzim ve konjugatlara ait aktivite grafiği 59
Şekil 5.6	Konjugatlar, Selülaz ve Dekstran Aldehitin Viscotek Marka Cihaz İle Kırılma İndisi Dedektör Kromatogramları 59
Şekil 5.7	Konjugatlar, Selülaz ve Dekstran Aldehitin Viscotek Marka Cihaz İle UV Dedektör Kromatogramları..... 60
Şekil 5.8	Konjugatlar, Selülaz ve Dekstran Aldehitin Viscotek Marka Cihaz İle Işık Saçılması Dedektör Kromatogramları..... 61
Şekil 5.9	Konjugatlar, Selülaz ve Dekstran Aldehitin Viscotek Marka Cihaz İle Vizkozimetre Dedektör Kromatogramları..... 62
Şekil 5.10	İşlem Görmemiş Enzim, Havuz1 ve Havuz2'nin HPLC Cihazı ile Alınan Kromatogramları..... 63
Şekil 5.11	Havuz1'in HPLC Cihazı ile Alınan Kromatogramı..... 64
Şekil 5.12	Dekstran Aldehitin HPLC Cihazı ile Alınan Kromatogramı..... 65
Şekil 5.13	Farklı oranlarda hazırlanan konjugatların HPLC Cihazı ile Alınan Kromatogramları..... 66
Şekil 5.14	Farklı oranlarda hazırlanan konjugatlar ve Havuz1 saflaştırılmış selülazın HPLC Cihazı ile Alınan Kromatogramları..... 67
Şekil 5.15	Konjugasyon oranına bağlı parçacık boyut dağılımı grafiği 68

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 3.1	Kullanılan Kimyasal Maddeler	45
Çizelge 4.1	Glukoz Standartlarının Hazırlanması	48
Çizelge 4.2	Glukoz Standartları	50
Çizelge 5.1	0. Dakikada Saf Enzim ve Konjugatlara Ait Aktivite Değerleri	56
Çizelge 5.2	30. Dakikada Saf Enzim ve Konjugatlara Ait Aktivite Değerleri	57
Çizelge 5.3	60. Dakikada Saf Enzim ve Konjugatlara Ait Aktivite Değerleri	57
Çizelge 5.4	Saf Enzim ve Konjugatlara Ait Boyut Dağılımı	68

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın yanında Y.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren her türlü yardımı sağlayan tezin deney ve yazım aşamalarında her an yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen tez yöneticim Sayın Prof. Dr. Huriye KUZU'ya ;

Derin bilgi birikimi ve yenilikçi fikirleri ile bana yol gösteren, Biyomühendislik laboratuvarlarında her türlü imkânı bize sunarak bu tezin ortaya çıkmasında büyük katkıları olan Biyomühendislik A.B.D. Başkanı Prof. Dr. Mustafa AKDESTE'ye;

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Y.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı Nanoteknoloji ve Biyosensörler Laboratuvar çalışanlarından GPC ölçümlemlerimi alan Araş. Gör. Yunus SARIÇAY'a, HPLC ölçümlemlerimi alan Araş. Gör. Namık AKKILIÇ'a, Biyosensörler ve Yapay Dokular Laboratuvarında görevli Araş. Gör. Özlem ÖZTOLAN'a,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca her türlü yardım ve desteği sağlayan, Y.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. İnci ATAÇ'a

Ayrıca eğitim ve öğretimimde hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan maddi ve manevi desteklerinden dolayı sevgili aileme; Yüksek Lisans eğitimim sırasında pek çok fedakârlıkta bulunan ve her zaman yanımda olan sevgili eşim Selim ARSLAN'a

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Selülaazlar başlıca tekstil, kâğıt, deterjan ve gıda endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Endüstriyel proseslerin uygulama koşullarında çalışma ortamının pH, sıcaklık gibi değerleri enzimin fizyolojik optimum değerlerinden oldukça farklı olabilmektedir. Bu nedenle, gen teknolojisi ve kimyasal modifikasyonlar ile enzimleri endüstriyel uygulama koşullarına dirençli duruma getirmek amacıyla yapılan çalışmalar önemli hale gelmektedir.

Geleneksel olarak selülaazlar etki mekanizmalarına göre sınıflandırılırlar. Ekzo-enzimler polisakkarid zincirini uçlarından hidrolizlerler. Endo-enzimler ise zincire rasgele bölgelerden saldırarak zinciri parçalarlar. Ekzo- ve endo selülaazlar selüloza sineristik ve kooperatif olarak etki ederler. Enzimlerin endo-ekzo sinerjistik etkisini açıklayan en geçerli hipotez endo-selülaazların, ekzo-selülaazlar için serbest uçlar oluşturmalarıdır. Selülozun glukozu kadar olan hidrolizi ekzoglukanazlar, (selobiyohidrolaz) endoglukanazlar ve β -glukozidazlar tarafından tamamlanır.

Bu çalışmada, ticari önemi olan *Aspergillus niger*'den elde edilen selülaaz kullanıldı. Satın alınan enzim Sephadex G- 50 kolonundan geçirilerek saflaştırıldı. Mol tartısı 75 000 olan dekstran sodyum periyodat ile aldehit türevine yükseltgendikten sonra saflaştırılan enzime kovalent olarak bağlandı. Farklı mol oranlarında sentezlenen konjugatlar UV dedektörlü HPLC, dört dedektörlü (UV, ışık saçılması, vizkozite, kırılma indisi)HPLC (Viscotek) ve Zetasizer sistemlerinde incelendi.

Saf enzim ve konjugatların pH 5'te farklı sıcaklıklarda, farklı bekleme süreleri ile aktiviteleri tayin edildi ve sonuçlar kıyaslandı. Selülaaz/dekstran mol oranı 1/5 ve 1/1 olan konjugatlar çalışılan 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C sıcaklıklarda 0, 30, 60 dakika bekleme süreleri ile yapılan tayinlerde saf enzimden daha yüksek; 5/1 ve 10/1 oranlı konjugatlar ise saf enzime yakın aktivite değerleri gösterdi. 1/10 oranlı konjugatta ise aktivite değeri gözlenmedi.

Anahtar kelimeler: *Aspergillus niger* selülaaz, Selülaaz-Dekstran konjugatları, aktivite, GPC, FTIR, HPLC.

ABSTRACT

Cellulases are most commonly used in textile, paper, detergent and food industries. The conditions used in biotechnical processes (temperature, pH) may be different from the physiological conditions in which enzymes operate optimally. Hence, the studies which aim to increase the stability of enzymes by gene technology and/or chemical modification are becoming important. The traditional division of cellulase is based on its mode of action. Exo-enzymes cleave sugar units from the ends of polysaccharide chain, whereas endo-enzymes make more random cuts along the chain. Exo and endo enzymes act cooperatively, or synergistically on crystalline substrates. The current hypothesis to explain endo-exo synergism of cellulase is that endo-acting enzymes provide new chain ends for the exo-acting enzymes.

In this study, cellulase from *Aspergillus niger* was examined. The purchased cellulase was purified by using size exclusion column chromatography with Sephadex G- 50, and PBS buffer, pH 7.2. Dekstran (Mw 75 000) was covalently bound to enzyme after oxidation to its aldehyde derivative by using NaIO₄. Dekstran-cellulase covalent conjugates were synthesized in different ratio. Conjugates were analysed with HPLC and GPC (4 detectors UV, light scattering, refractive index, viscosity) systems.

The activities of the pure enzymes and conjugates have been measured after 0, 30, 60 minutes waiting at 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C for pH 5. The obtained results showed that the activities of two conjugates (Molar ratio 1/5, 1/1) were higher than pure enzyme, whereas the other two conjugates have similar activities with enzyme.

Key words: *Aspergillus niger* cellulase, Cellulase-Dextran conjugates, activity, GPC, HPLC, Zeta-sizer

1. GİRİŞ

Doğada en fazla bulunan polimer olan selüloz, düz poli -1,4- β - glukoz zincirlerinden oluşmaktadır. Selüloz en fazla bitkilerin hücre duvarlarında yapıyı oluşturan başlıca bileşen olarak bulunmaktadır. Bitki hücre duvarlarının oldukça kompleks yapısı, selüloz ile birlikte ksiloglukanlar, hemiselüloz, pektin ve proteinleri de içermektedir.

Selülozu parçalayan enzimler selülazlar olarak isimlendirilmektedir ki bu enzimler üç tür aktivite göstermektedir. (1) endoglukanaz (1,4- β -D- 4-glukanohidrolaz, E.C. 3.2.1.4) selüloz molekülünün iç kısmında yer alan bağları hidrolizler. (2) Sellobiyohidrolaz (1,4- β -D- 4-glukan sellobiyohidrolaz, E.C. 3.2.1.91) selüloz zincirinde uçlarda yer alan bağları kırar ve (3) β -glukosidaz (β -D- glukosid glukohidrolaz, E.C. 3.2.1.21) sellobiyoz ve diğer ufak oligosakkaridleri D-glukoza hidrolizler.

Aspergillus türlerinin β -glukosidazlar için iyi bir kaynak olduğu ve *Aspergillus niger*'in mikroorganizmalar içinde bugüne kadar bilinen en etkili β -glukosidaz üreticisi olduğu belirtilmektedir. Shoseyov ve çalışma arkadaşlarının *A. niger*'den tanımladıkları β -glukosidaz B1 (CMI CC324626) düşük pH'da ve yüksek konsantrasyonda alkol içeren ortamda çalışmaktadır. *A.niger*'den molekül tartısı (116-137 kDa), izoelektrik noktası (pI 3.8-4) ve optimum pH aralığı (3.4-4.5) farklı bir diğer β -glukosidaz da saflaştırılmıştır. pH aktivite profilinin kesin pH optimumları enzim kaynağına göre değişmektedir. Glukosidazlar için, amino asid dizilimlerindeki benzerlikler dikkate alınarak 2000'in üzerinde farklı enzim içeren 77 farklı enzim ailesi (grup) belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

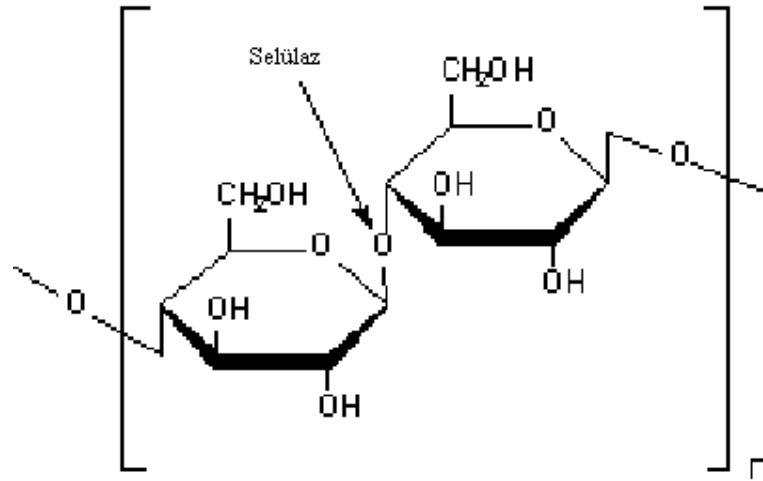
Doğada bitki biyokütlesinin üretimi ve geri dönüşümü gigantik bölünme sürecidir. Bitkiler tarafından yılda kullanılan CO₂ miktarı atmosferdeki tüm karbonun %15'i kadardır. Bu karbon miktarının yarısı yapısal polisakkaritler ve lignin içinde kullanılır. Bunlara toplu olarak ligno-selüloz adı verilir ve bitkilerde hücre duvarının ve odunsu maddenin yapımında kullanılırlar. Yılda tahmin edilen 40 milyon ton ligno-selülozun fotosentez ile sentezlendiğidir. Bitkiler enerji ve karbonu kendileri yaratamazlar ancak hücre duvarlarında depolayabilirler ve bunu yapraklarını dökerek bırakırlar. Biyosferde büyük miktarda bitki biyokütlesi olması nedeniyle selüloz ve hemiselülozu karbon ve enerji kaynağı olarak kullanan çok miktarda bitkileri parçalayan mikro organizma gelişmiştir. Karbonun atmosfere geri dönüşümünün sağlanması ile karbon döngüsü korunmuş olur. Bitkisel biyokütle degradasyonunun büyük çoğunluğu mikrobiyal organizmalar fungi ve bakteriler tarafından ekstraselular enzimler aracılığı ile gerçekleştirilir. Bu degradasyonun gerçekleşmesi için selülazlar adı verilen bir grup enzimin birlikte çalışmasına ihtiyaç vardır. Biyokütle parçalayan bu organizmaların yüksek kristalize selülozu tamamen parçalayan selülotitik enzim salgılayan yüksek spesifik türlerden (*Trichoderma reesei*), yalnızca birkaç enzim sentezleyebilen oportunistik türlere kadar geniş bir dağılımı vardır.

2.1 Selüloz:

Selüloz bitki biyokütlesinin ana bileşenidir dünyada en yüksek oranda bulunan organik polimerdir. Dünyadaki selülozun toplam miktarı $7 \cdot 10^{11}$ tondur.(Coughlan, 1985).

Fotosentez sırasında karbondioksit ve su D-glukoza dönüşür. D-glukoz 2 anomerik formda bulunur, α -D-glukoz ve β -D-glukoz. α -D-glukoz ve β -D-glukoz (D-glukopiranozil) açık zincirli aldehit formu ile denge halinde bulunur. D-glukoz selülozun ana bileşenidir. Anomerik karbon C1 üzerindeki aldehid grubu gümüş ya da bakır gibi metal iyonlarını indirgeme özelliğine sahiptir. Bu aldehid grubu metal iyonlarını indirgerken karboksilik asite yükseltgenir. Serbest C1 karbonuna sahip olan glukoz ve diğer karbohidratlar indirgen şeker olarak isimlendirilir. D-glukoz selülazun ana bileşenidir selülozun büyük kısmı yüksek bitkilerde hücre duvarı bileşeni olarak sentezlenir. En önemli fonksiyonu yüksek bitkilerde yapısal bileşen olmasıdır. Selüloz β -D-glukoz birimlerinden oluşmaktadır.

Selüloz



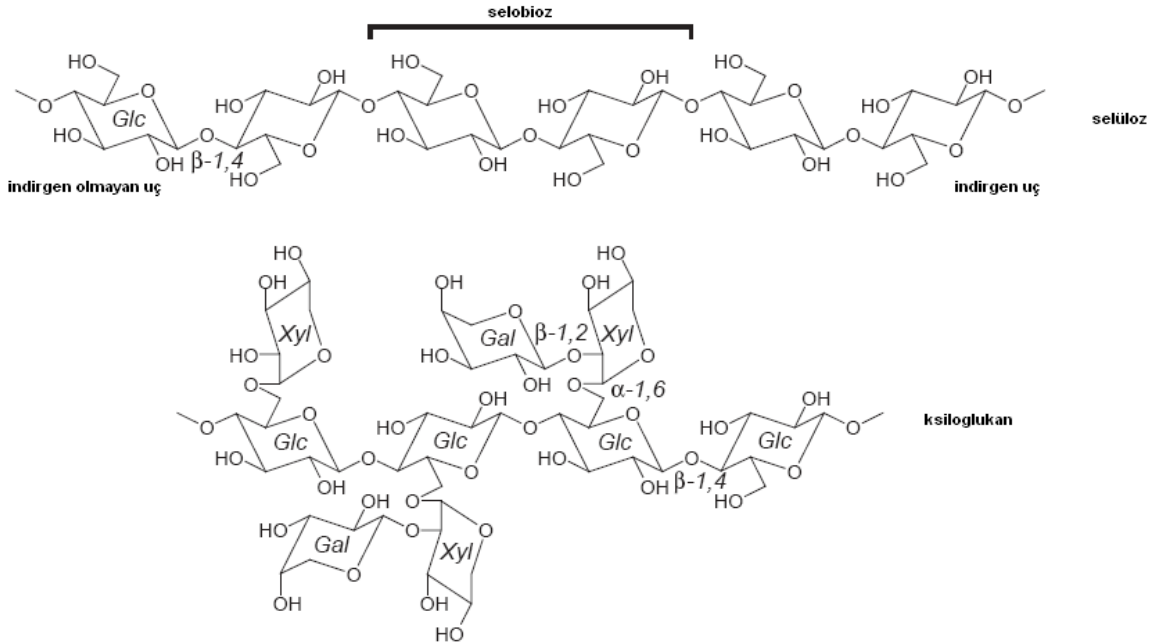
Şekil 2.1 Selüloz monomeri

Hücre duvarında hemiselüloz ve lignin bir arada kompleks bir yapı oluşturur. Bu yapıda lignin, hemiselüloz ve selüloz arasında kovalent bağ oluşumu gözlenir.(Scalbert et al.,1985; Higuchi, 1990) Hemiselüloz da selüloz gibi β -1,4 bağlı glukoz iskelete sahiptir ancak başka şeker gruplarının da bulunduğu heterojen bölgelere de sahiptir.(Wong et al.,1988) Hemiselülozlar genellikle yapısında en çok bulunan şeker grubuna göre isimlendirilir. Örneğin ksilans D-ksilan, mannans ise D-mannoz alt birimlerinden oluşur. Lignin ise hücre duvarını oluşturan diğer bileşenlerden daha farklı bir yapıya sahiptir. Lignin farklı ve rasgele bağlar içeren aromatik alkol birimlerinden oluşan bir polimer kompleksidir.(Crawford ve Crawford, 1984; Higuchi, 1990) Bu kompleks yapı fiziksel bir bariyer oluşturarak selülozik bileşenlerin mikroorganizmalara karşı dirençli olmasını sağlar. (Crawford ve Crawford, 1984)

Selüloz β -1,4 glikozidik bağ ile bağlı glukoz birimlerinden oluşan lineer homo-polisakkarittir. Glukoz halkası sandalye konformasyonundadır. Selülozun tekrarlayan en küçük alt birimi bir disakkarid olan selobiozdur. Glukozun selobioz şeklindeki bu düzenlenmesi selüloz zincirinin karşılıklı oksijen grupları üzerinden uzamasına olanak sağlar. Glukoz birimlerinin sayısı yani selülozun polimerleşme derecesi (DP) elde edildiği kaynağa bağlı olarak 100-1400 arasında değişir. Hücre duvarında selüloz, selüloz zincirlerinin inter ve intra H- bağları ile bir araya gelmesiyle oluşan kristalize selüloz fibrilleri şeklinde bulunur. Selüloz-I adı verilen doğal selülozda glukoz zincirleri paralel düzendedir. Tüm indirgen uçlar ve indirgen olmayan uçlar fibrilin aynı tarafında bulunur. Son dönemde gerçekleştirilen yapı çalışmaları doğal selülozun 2 farklı kristal yapıda bulunduğunu göstermiştir. Bu yapılar iki zincirli monoklinik faz I β ve

tek zincirli triklinik faz Ia'dır. (Atalla, 1993; Heiner et al., 1995). Selülozun elde edildiği kaynağa göre I β ve Ia yapılarının oranları değişiklik gösterir. *Acetobacter xylinum* ve *Valonia ventricosa*'dan elde edilen Algal ve bakteriyel selüloz Ia'ca zengindir. Buna karşın yüksek bitkilerde baskın olan form I β yapısıdır. Ayrıca fibrillein kalınlığı da elde edildiği kaynağa bağlı olarak değişiklik gösterir. (Atalla, 1993; Sugiyama et al., 1991; 1993). Algal Valonia selülozunun kalınlığı 20nm iken yüksek yapılı bitkilerde hücre duvarında yer alan selüloz fibrillerinin kalınlığı 2nm olabilir.(Chanzy, 1990) Selüloz fibrilleri yalnızca kristal yapıda değildir, daha düzensiz amorf bölgeler de içerirler. Kristalizasyon düzeyi de selülozun elde edildiği kaynağa göre değişiklikler gösterir. Selülozun kristalizasyon indeksi göreceli bir özelliktir, X-ray ve katı faz NMR yöntemi ile ölçülebilir. Valonia'dan izole edilen selüloz %100 kristalize olarak kabul edilir.(Kulshreshta ve Dwelz, 1973).

Daha önce de belirtildiği üzere, glukoz zincirinin sonunda yer alan başka bir glukoz artığına bağlı olmayan anomerik karbon polimerin indirgen ucu olarak ifade edilir. Polimerin diğer ucu ise indirgen olmayan uçtur. Sentezden hemen sonra selüloz zinciri, selüloz mikrofibrillerinin H-bağı, hidrofobik etkileşimler ve van der Waals kuvvetleri etkisi ile katlanması sonucu yüksek kristalize selüloza dönüşür. Bu yüksek yapılı organizasyon selüloz zincirinin hidrolize olan dayanıklılığını arttırır, mikrofibrillerin kalınlığı selülozun kaynağına bağlıdır (Nieduszynski ve Preston, 1970).



Şekil 2.2 Selüloz ve Ksiloglukanın Moleküler Yapıları

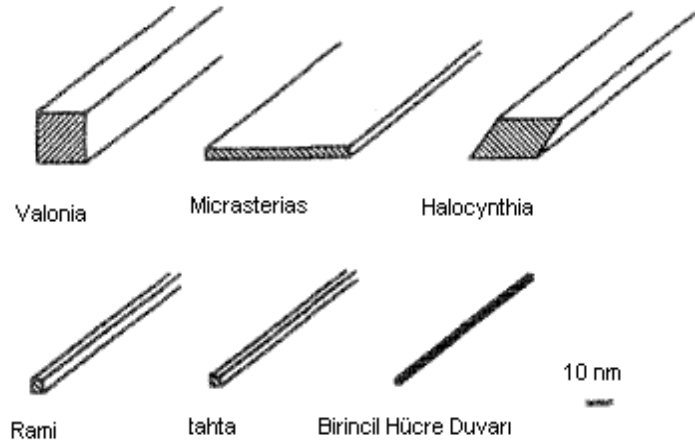
Selüloz mikrofibrilleri bitki hücresinin yapısını kuvvetlendirir. Yapı oluşurken selüloz mikrofibrilleri diğer polisakkaritler olan hemiselülozlarca sarılır. Bitki hücreleri lignin ve pektin içeren bir tabaka ile bir arada tutulurlar. Hücre duvarının diğer bir bileşeni olan hemiselüloz ise alkali ile ekstrakte edilebilen fraksiyon olarak tanımlanır. Hemi-selüloz farklı polisakkaritlerin heterojen bir karışımıdır. Ksiloglukan en sık karşılaşılan hemi-selülozdur. Selülozda olduğu gibi β -1,4 glukan iskeletine sahiptir ancak her 4 glukoz biriminin 3'ünde sübstitüye halde β -ksiloz vardır. Selüloz doğada ilk sentezlendiği andan itibaren asla tek zincirli olarak bulunmaz birçok zincirin bir araya gelmesi ile oluşan mikrofibril yapılarını oluşturur. (Delmer, 1995)

Selüloz β -1,4 bağlı D-glukoz artıkları içeren basit kimyasal kompozisyonuna karşın kompleks ve heterojen bir yapıya sahiptir. 10000'den fazla glukoz artığı içeren lineer polimerik zincir suda çözünabilir özellikte değildir. Her bir zincir birbirinden izole halde bulunmaz, paralel halde dizilerek mikrofibril yapılarını oluştururlar. Elde edildikleri kaynağa bağlı olarak mikrofibrillerin boyu ve kristalizasyon özellikleri farklıdır. (Chanzy, 1990). Selülozun saflaştırılması ve kurutulmasındaki fiziksel koşullar kristalizasyon ve polimerizasyon derecesini etkileyebilir. Kristalizasyon mikrofibril boyunca tek bir formda değildir. Mikrofibriller hem yüksek kristalize hem de amorf bölgeleri bir arada içerirler. Ancak selülozun özel bir kaynağı olan alg ve bakterilerden elde edilen selüloz yüksek kristalize formdadır. Bu yüksek kalite selüloz farklı tipte farklı tipte selülozların karakterizasyonunda model substrat olarak kullanılırlar. (Boisset, 2000) Selüloz I olarak isimlendirilen doğal selüloz, polimer bilimlerinde en çok çalışılan konulardan biridir. Çok sayıda rapor ve yayına rağmen selülozun yapısı hala tam olarak çözülememiştir. Selülozun biyosentezi selüloz mikrofibrillerinin oluşumu ile takip edilen enzimatik polimerizasyonun sonucudur. Bu olayın sonucunda selüloz zincirleri paralel şekilde bir araya gelerek kristalize mikrofibril yapılarını oluştururlar. (Hieta, 1984; Chanzy, 1985) Mikrofibriller daha sonra hücre duvarı ve fibriller gibi yapıları oluşturmak üzere bir araya gelirler. Selülozun yapısı ve ultrastructural düzeyde gelişebilir. Temel düzeyde birçok bilgi spektroskopik ve kristalografik yöntemler ile elde edilebilmiştir. Selüloz ile ilgili ilk kristalografik tanımlama 1974 yılında Sarko-Muggli (Sarko ve Muggli, 1974) ve Gardner-Blackwell (Gardner, Blackwell, 1974) tarafından bağımsız olarak gerçekleştirilen, "Algae Valonia" den elde edilen selüloz I' in kristal yapısı olmuştur. Hücrelerdeki yapı aynı geometrideki iki paralel selüloz zinciri içermektedir. Sarko ve Muggli'nin "paralel up" düzenlenmeyi içeren yapısına karşın, Gardner ve Blackwell "paralel down" düzenlenmeyi içeren yapılar sunmuşlardır. Ancak her iki çalışmanın da sonuçları son olarak ortaya atılan modelde olduğu gibi X-ışını kırılma

verilerini içermemektedir.

Selülozun yapı aydınlatması ile ilgili diğer bir kilometre taşı 1984 de Atalla ve VanderHart'ın. (Atalla ve VanderHart, 1984) Valovia selülozu üzerinde yaptıkları yüksek çözünürlüklü NMR spektroskopisi çalışmalarıdır. Bu çalışmalar Valovia selülozunun baskın olan $I\alpha$ fazı ve daha az olarak görülen $I\beta$ bileşeni olmak üzere 2 farklı kristalografik faz içerdiğini göstermiştir.

Selülozun ultrastructural seviyede incelenmesinde "Transmission electron microscopy" (TEM) pek çok avantajlar sağlamıştır. Bu teknik selüloz zincirin kafes yapısının doğrudan görüntülenebilmesini sağlamıştır. (Sugiyama, 1984) Bu veriler monokristalize bölgelerin selüloz mikrofibrillerini tamamen sardığını göstermiştir. (Revo, 1983) Mikrofibriller elde edildikleri kaynağa bağlı olarak farklı kalınlıklarda olabilirler. Mikrofibriller bazı bitkilerin birincil hücre duvarlarında 2 nm'den daha küçük yarıçaplarda olabildikleri gibi bazı deniz yosunu ve deniz hayvanlarının hücre duvarlarında bunun 10 katı kadar büyük çaplara sahip olabilirler. İç kısımda yer almasına rağmen selülozun amorf yapısı mikrofibrillerin yüzeyini saran zincirlerle benzerlik göstermektedir. (Larsson, 1997)



Şekil 2.3 Selülozun Fibril Yapısı

2.2 Bitki Biyokütlesinin Enzimatik Parçalanması:

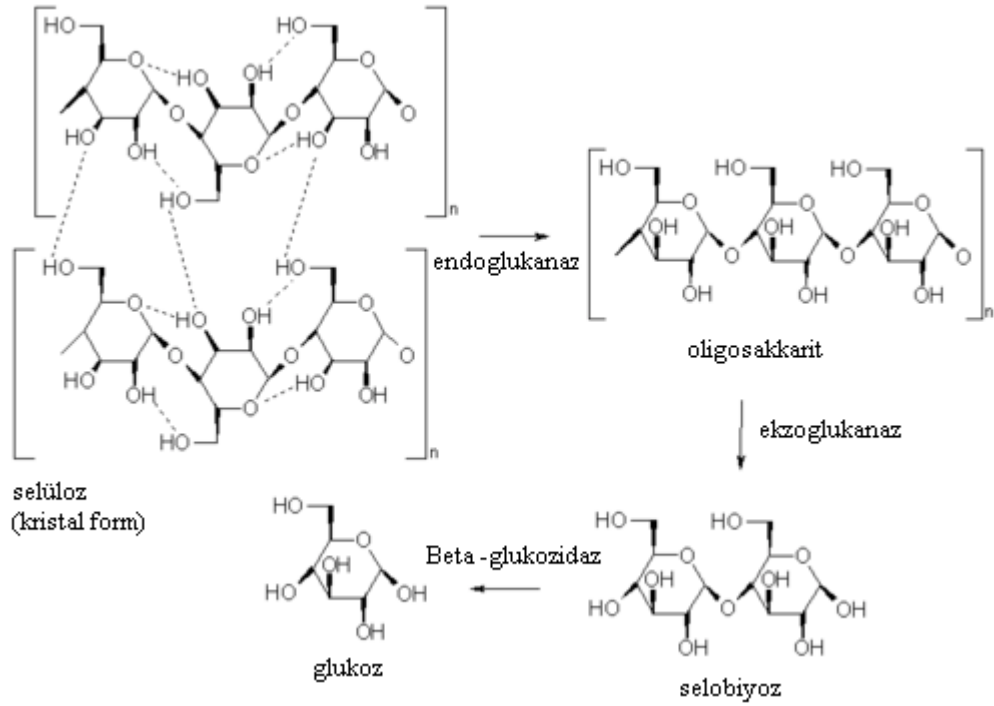
Bitki biyokütlesinin enzimatik parçalanması selüloz ve hemiselülozlardan oluşan bir kompleks tarafından gerçekleştirilir. Bu enzimler polimeri α - ve β -Glikozidazlarca metabolize olabilen daha küçük fragmetlere parçalarlar. Ligno-selülozik biyokütlenin karmaşık yapısı bunları parçalayan organizmaların da karmaşık yapıları enzim sistemleri sentezlemelerini zorunlu kılmıştır. Selülozun parçalanması bitki artıkları ve toprakta yaşayan

mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilir. Doğal selüloz suda çözünmediği için hücre içine giremez, bu nedenle selülozun biyolojik olarak parçalanması hücre dışında gerçekleştirilir. Selülaz hücre yüzeyini saran bir tabaka oluşturarak ya da ekstraselüler olarak selüloz ile etkileşime girer. Çok az mikroorganizma hidroliz için gerekli tüm enzimleri sentezleyebilme kapasitesine sahiptir

Mikrobiyal selüloz degradasyonu doğada, iki farklı çevrede gerçekleşir. Anaerobik ortamda selülitik işleyiş mikroorganizmanın hücre duvarı yüzeyinde bulunan kompleks bir sistem tarafından gerçekleştirilir. Anaerobik çevre toprak ve çamur olduğu gibi sürüngen ve gevişgetiren hayvanların bağırsaklarının arkaduvârını da kapsar. (Troyer, 1991) Aerobik çevrede ise pek çok mikroorganizma tek başına selülazı sentezleyerek doğrudan hücre dışına salarlar. Her iki durumda da hidroliz ürünleri hücre içine alınarak metabolize edilirler.

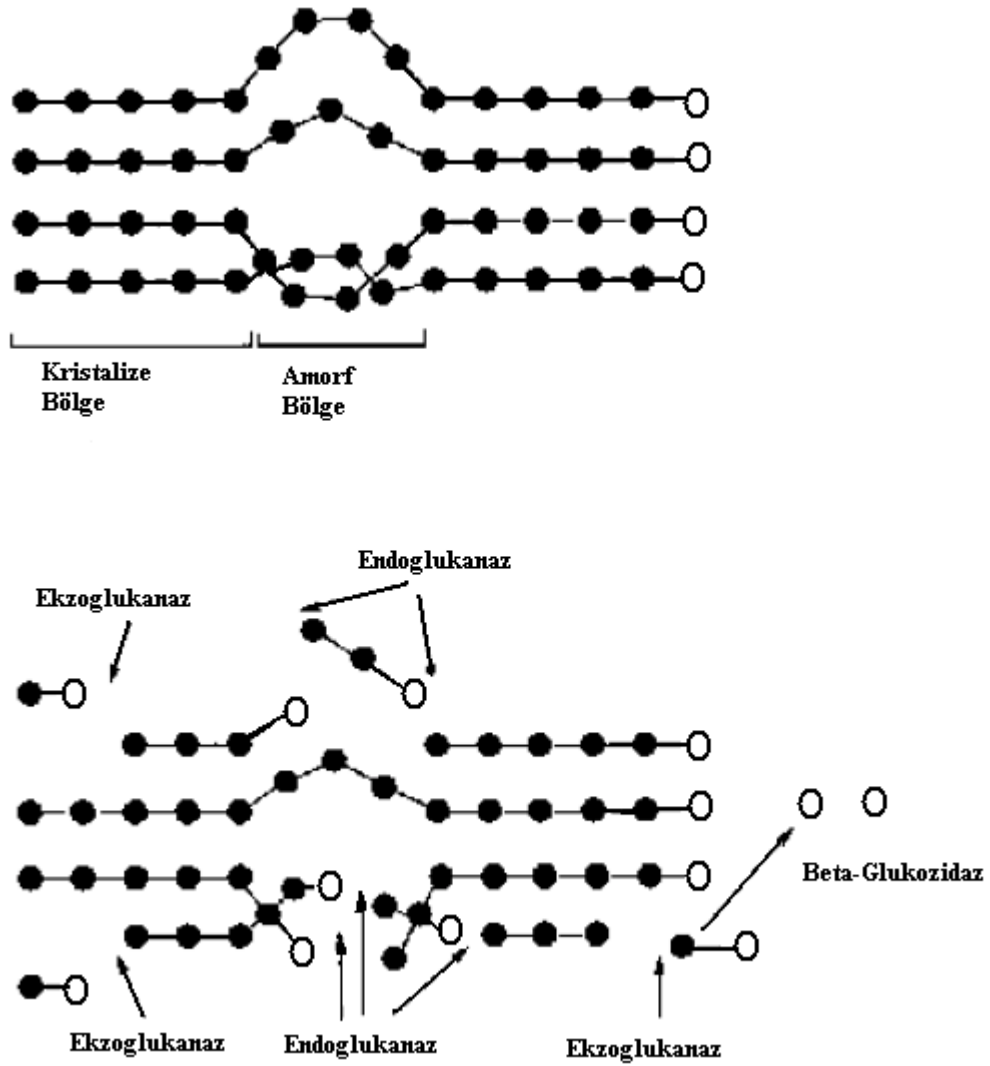
Selülozun doğada en çok bulunan polimerdir ve birçok hayvan türü içinde önemli bir besin kaynağıdır. Ancak selülozu enerji kaynağı olarak kullanan birçok otobur ve karışık beslenen hayvan kendi selülazını sentezleyemez. Örneğin geviş getiren hayvanlar selülozu anaerobik koşullarda sindirebilmek için bakteri, fungi, protozoalardan oluşan bir karışıma gereksinim duyarlar. (Dehority, 1991)

Geleneksel olarak selülazlar etki mekanizmalarına göre sınıflandırılırlar. Ekzoenzimler polisakkarid zincirini uçlarından hidrolizlerler. Endo enzimler ise zincire rasgele bölgelerden saldırarak zinciri parçalarlar. Ekzo- ve endo selülazlar selüloza sineristik ve kooperatif olarak etki ederler.(Nidetzky, 1993; Irwin et al.,1993; Beguin ve Aubert, 1994) enzimlerin endo-ekzo sinerjistik etkisini açıklayan en geçerli hipotez endo-selülazların, ekzo-selülazlar için serbest uçlar oluşturmalarıdır.



Şekil 2.4 Selülozun glukoz hidrolizi

Selülozun glukoz kadar olan hidrolizi ekzoglukanazlar, (selobiyohidrolaz) endoglukanaz ve β -glukozidazlar tarafından tamamlanır. Selobiyohidrolaz (1,4- β -D-glukan E.C 3.2.1.91) genellikle kristalize selüloz üzerinde etkilidir. Endoglukanaz 1,4- β -D-glukan -4-glukano hidrolaz EC. 3.2.1.4) daha çok selülozun amorf bölgeleri üzerinde etkilidir ayrıca karboksimetilselüloz (CMC) ve hidroksietil-selüloz (HEC) gibi süstitüye formdaki selüloza karşı da aktivite gösterir. Selobiyohidrolaz selobiyozu indirgen olan ya da olmayan uçlardan kırabilir. Ancak endoglukanazlar zinciri yalnızca internal olarak kırarlar. β -glukozidazlar (EC 3.2.1.21) selobiyoz ve diğer suda çözünür oligosakkaritleri glukoz parçalar. (Beguin, 1990) Glukoz parçanmayı sağlayan bu son adım çok önemlidir çünkü selobiyoz selülazlar için son ürün inhibitörü olarak etki gösterir.



Şekil 2.5 Selülozun glukoza parçalanmasında enzimlerin etki mekanizması

2.3 Selülazların Substratları:

Selülaz aktivitesinin ölçülmesi için kullanılan substratlar suda çözünürlüklerine göre iki gruba ayrılırlar.

2.3.1 Suda Çözünen Substratlar:

Çözünebilir substratlar 2- 6 arasında düşük polimerleşme derecesine (DP) sahip sellodekstrinlerini ve DP değeri yaklaşık birkaç yüz olan selülozları içerirler. Bu substratlar genellikle sellülaz bileşenlerinin tek tek aktivitelerinin ölçülmesinde kullanılırlar.

Sellodekstrinler DP değerinin 6'dan küçük olduğu durumlarda kolayca çözülebilirler. DP değeri 6- 12 arasında ise çözünürlüğü biraz daha zorlaşır. (Zhang ve Lynd; 2003, 2005)

DP değerindeki artışla beraber sistemin entropik etkisine ve intermoleküler hidrojen bağlarına bağlı olarak molekülün çözünürlüğü dramatik olarak azalır. Sellodekstrinler genellikle

selülozun HCl, (Miller; 1960,1963) sulfirik asit ya da bu asitlerin karışımı (HCl ve H₂SO₄) (Zhang, Lynd 2003) ile hidrolizi sonucu elde edilir.

Bunun yanında sellodekstrinler *C. thermocellum*'dan elde edilen sellobiaz ve sellodekstrin fosforilaz ya da *T. reesei*'den elde edilen β -glukozidaz kullanılarak biyolojik olarak sentezlenebilir. (Strobel, 1995) sellodekstrin karışımında bulunan farklı DP'ye sahip yani farklı zincir uzunluğunda bulunan polimerler ince tabaka, katyon değişim ya da moleküler eleme gibi kromatografik yöntemler kullanılarak ayrılabilir. (Shintate, 2003) (Schmid, 1988) (Voloch, 1984)

Suda çözünebilir sellodekstrinden türevlendirilen, kromojenik p-nitrofenil glikozid ve fluorojenik metilumbelliferil-D-glikozid selülazın kinetik özellikleri, reaksiyon spesifikliğı ve bağlanma bölgesinin termodinamiğinin belirlenmesi ile ilgili araştırmalarda oldukça kullanışlıdır. (Tuohy, 2002) (Barr, 2002)

Bu substratlar, kromoforların substütiye glukozidden salınmaları sonucu şekerden bağımsız olarak kolayca ölçülebilmeleri nedeniyle artan selobiyoz ve glukoz varlığında inhibisyon katsayısının belirlenmesi amacıyla da kullanılmaktadırlar.

Uzun zincirli selüloz türevleri de kimyasal yapıları nedeniyle suda çözünebilirler. İyonik yapıli karboksi metil selülaz (CMC) endoglukanaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılabilir. Endoglukanazın moleküller arasındaki β -glukozitik bağları rastgele kırması sonucunda DP değeriinde dramatik bir azalma görölür. Söz konusu reaksiyon CMC'deki β -glukozitik bağların kırılması olduğunda endoglukanaz CMCaz adını alır. CMC 2 önemli fiziksel parametreye sahiptir DS süstitüsyon derecesi ve DP polimerizasyon derecesi. CMC'nin çözünebilirliğı maksimum stökiyometrik değeri 3 olan DS değeriyle yakından ilişkilidir. CMC, DS değeri 0,3-0,7'den büyük olduğunda suda çözünebilirdir. (Karlsson, 2001)

Ticari olarak satılan CMC'leri DS değeri 1,5'den küçüktür. CMC indirgen şeker ve viskozite ölçümünde substrat olarak kullanılacak ise bu değeri şiddetle tavsiye edilmektedir. Çünkü DS değeri 0,7'ye eşit ise hidroliz %2 ile sınırlanmaktadır. (Wood, 1988) Bu değeri selülazın yalnızca non-substütiye glukozu etki edebilmesi ve hidroliz reaksiyonun en az 2 veya 3 komşu non-substütiye glukoz artığına ihtiyacı olması nedeniyle önemlidir. CMC'nin DP değeri indirgen şeker ölçümünde önemli değildir. Ancak vizkozite azalmasının ölçülmesinde büyük önem taşır. CMC su içerisinde çözölürken DP değeriini düşmesinden kaçınmak amacıyla yavaşça döndürerek karıştırılmalıdır. (Sharrock, 1988) Bununla beraber

iyonik CMC'nin vizkozitesi pH, iyonik şiddet ve polivalent katyon konsantrasyonundan da etkilenir.

Bu nedenle endo-glukanaz aktivitesinin belirlenmesinde hidroksetil selüloz (HEC) gibi iyonik olmayan selülozlar önerilmektedir. (Wood, 1988a) Boyanmış çözünür CMC'ler remazol brillant Blue R ya da Ruthenium Red gibi boyalarla CMC'nin karıştırılması ile elde edilirler. (Fülöp, 1994) (Rescigno, 1994)

Supernatant içindeki çözünebilir selüloz türevinden salınan renk substratın çöktürülmesinden sonra ölçülebilir.

2.3.2 Suda Çözünmeyen Substratlar:

Selülaz aktivitesinde kullanılan ve suda çözünmeyen substratlar oldukça saf selüloz (Whatman No1 filtre kâğıdı, bakteriyel selüloz, mikrokristalize selüloz ve amorf selüloz) ve saf olmayan selüloz (boyanmış selüloz, α -selüloz, ligno-selüloz) olarak sınıflandırılabilir. Doğal selüloz selüloz I olarak isimlendirilir. İki farklı kristal formu vardır. I_a bakteri ve alglerde bulunur, I_b yüksek bitkilerde bulunur. (Atalla, 1984) Doğal selüloz çeşitli işlemler ile diğer kristal formlara (II-IV) dönüştürülebilir. (Klein, 1993)

Selülazın kristalizasyon derecesi (CrI) X-ışını difraksiyon modeli ile kantitatif olarak ölçülebilir. (Krassig 1993) Kristalizasyon derecesi hidroliz düzeyi ile yakından ilişkilidir. (Converse, 1993) Buna rağmen, kristalizasyon derecesi selülazın çeşitli muameleler öncesi ve sonrasında karakteristiğindeki değişimleri göstermek amacıyla kullanılan uygun bir belirteçtir. Yüksek kristalize selüloza örnek olarak pamuk, bakteriyel selüloz *Valonia ventricosa* algal selülozu verilebilir. (Fierobe, 2002) Mikrokristalize selüloz, α -selüloz, ve işlem görmemiş selülozik substratlar ortalama CrI değerine sahiptirler ve kristalize fraksiyon ile amorf fraksiyonun birleşimi olarak kabul edilebilirler. Ancak yine de iki fraksiyon arasında kesin bir sınır çizgisi yoktur.

Pamuk ipliği doğal pamuktan mum, pektin, renkli maddeler gibi safsızlıklar uzaklaştırıldıktan sonra elde edilir. (Wood, 1988b) Whatman No1 filtre kâğıdı uzun pamuk ipliği hamurundan düşük kristalizasyon derecesi (yaklaşık %45) ile üretilir. Hidroselülaz ya da ticari adıyla "avicel" çeşitli firmalar tarafından aşağıdaki adımlar izlenerek üretilmektedir. Birinci adım ağaç hamurunun seyreltilmiş hidroklorik asit ile hidrolizi ile amorf selüloz fraksiyonunun uzaklaştırılmasıdır. Bu adımı hamurun yıkanması ve kurutulması takip eder. (Fleming 2001) ancak bu işlemler sonucunda mikrokristalize selüloz hala amorf bölgeler içermektedir. Avicel düşük DP değeri nedeniyle ekzoglukanaz aktivitesi için iyi bir substrattır.

Bakteriyal selüloz (BC) *Acetobacter xylinum* tarafından üretilen pelikülden hazırlanır. (Hestrin, 1963) Bakteriyal mikrokristalize selüloz (BMCC) amorf fraksiyonları uzaklaştırmak için uygulanan asit hidrolizi ile DP'nin düşmesi sağlanarak bakteriyal selülozdan üretilebilir. (Valjamae, 1999)

Amorf selüloz kristalize fraksiyonların mekanik ya da kimyasal yöntemlerle amorf forma dönüştürülmesi ile elde edilir. Bu selülozlar mekanik olarak amorf hale getirilmiş selülozlar, alkali ile şişirilmiş selülozlar, fosforik asit ile şişirilmiş selülozlar olabilir. Mekanik olarak amorf selüloz hazırlamak için kürelerle öğütme ya da parçalama yöntemleri kullanılır. (Fan, 1980)

Alkali ile şişirilmiş amorf selüloz ise selüloz tozunun yüksek konsantrasyonda NaOH ile muamelesi sonucunda elde edilir. Fosforik asit ile şişirilmiş selüloz (PASC) kuru selüloz tozunun %85'lik o-fosforik asit ile muamelesiyle üretilir. (Wood, 1988b)

Öğütme, NaOH, H_3PO_4 ile üretilen amorf selülozun özellikleri selülozun elde edildiği kaynağa, reaksiyon sıcaklığına, süreye, reaktif tipine ve konsantrasyonuna büyük oranda bağlıdır. Buna bağlı olarak da çeşitli tipteki amorf selülozun hidroliz düzeylerinin farklı laboratuvarlar arasında karşılaştırılması neredeyse imkânsızdır. Amorf selüloz sulu ortamda saklanmalıdır. Amorf selülozun kurumması substratın reaktivitesinin kaybı ile sonuçlanır. (Zhang ve Lynd 2004) Substratın reaktivite kaybını önlemek için dondurarak kurutma ya da çözücü değişimini takiben kurutma işlemi uygulanabilir. (Fan ve Lee 1981)

Geri-dönüştürülmüş (rejenere) selüloz çözünmeyen selülozun, nitrik asit, sülfirik asit, N,N-dimetil aset amid, (Striegel, 1997) 1-bütil-3-metilimidazolyum klorür (Swatloski, 2002) gibi selüloz çözücülerini ile çözünür hale getirilmesi ile üretilir. Geri dönüşümü yapılan selülozun en önemli ticari ürünü suni ipektir. Suni ipek tekrar kristallendirme işlemine tabi tutulduğundan yalnızca amorf bölgeler içermez. Geri-dönüştürülmüş selüloz %85'lik soğuk H_3PO_4 kullanılarak da üretilebilir. Selüloz hamuru %85'lik soğuk H_3PO_4 ile çözüldükten sonra soğuk su ile çöktürülür. RAC homojen olması nedeniyle selüloz aktivitesi ölçümü için oldukça iyi bir substrattır. (Zhang, 2006) RAC aktivite ölçümlerinde daha uygun ve tekrarlanabilir sonuçlar vermektedir bununla beraber çok düşük selüloz aktivitelerinin ölçülmesinde kullanılabilen çözünebilir non-substitüe ideal bir substrattır.

α -selüloz ağırlıklı olarak selüloz ve az miktarda hemiselüloz içermektedir. Holoselüloz lignoselülozdan ligninin uzaklaştırmasından sonra kalan katı yoğun kısımdır, α -selüloz ise holoselülozdan alkali ekstraksiyonu ile hemiselülozun uzaklaştırılması sonucunda kalan katı

yoğun kısımdır. (Gren, 1963)

Lignoselüloza bazı ön işlemler yapılarak inert yapısı bozulur bunun sonucunda selüloz tarafından daha hızlı ve etkin olarak hidrolize edilmesi sağlanır. Bu ön işlemlere örnek olarak seyreltilmiş asit ile muamele, sıcak su, amonyak ile süzme verilebilir. (Mosier, 2005).

Substratın özellikleri (DP, selüloz tarafından ulaşılabilirliği, lignin içeriği gibi) yukarıda belirtilen bu ön işlemlere ve bunun yanında lignoselülazın kaynağına bağlıdır.

2.4 Aktivite Tayini:

Selüloz aktivite tayin yöntemleri 3 gruba ayrılabilir.

- (1) hidroliz sonrası ürünlerin ölçümü
- (2) substrat miktarındaki azalmanın ölçümü
- (3) substratın fiziksel özelliklerindeki değişimin ölçülmesi

Hidroliz ürünlerinin ölçümünde indirgen şeker miktarı, toplam şeker miktarı ve kromofor madde miktarının ölçülmesi yer almaktadır. İndirgen şeker ölçümünde en yaygın kullanılan metodlar dinitroselisilik asit (DNS) metodu, Somogyi-Nelson metodu, 2,2-bicinchroninat (BCA), 4-hidroksibenzoilhidrazin (PAHBAH) metodu, ferrisiyanid metodudur. (Miller, 1959) (Waffenschmidt, 1987) (Lever, 1972) (Kidby, 1973)

Toplam şeker miktarı zincir uzunluğuna bakılmaksızın fenol-H₂SO₄ metodu ile doğrudan ölçülebilir. (Dubois, 1956)

Glukoz heksokinaz ve glukoz -6-fosfat dehidrojenaz enzim çiftinden oluşan enzimatik glukoz kiti yardımıyla ya da hidroliz sonrası HPLC ile ölçülebilir. (Zhang, Lynd 2004a)

Pek çok şeker tayini yönteminin dedeksiyon aralıkları şu iki stratejinin kullanılması yoluyla geliştirilmiştir. (1) renk reaksiyonundan sonra daha fazla seyreltme yapılması (2) reaksiyon öncesinde örnek başına düşen şeker hacmini değiştirmek. Örneğin DNS metodunun ilk hali her bir örnek için 20- 600µg aralığında indirgen şeker tayini yapmak için tasarlanmıştır. Ancak bu metodun dedeksiyon aralığı dilüsyon yapılarak 100- 2500 µg aralığına genişletilmiştir. (Ghose, 1987)

Aynı durum Somogyi-Nelson metodu için de geçerlidir. Sigma enzimatik glukoz tayin kiti reaksiyon karışımı 10µL örnek + 1000 µL enzim çözeltisi olacak şekilde şeker miktarını 200- 5000 µg/L aralığında ölçebilmektedir. Bununla beraber dedeksiyon limiti, reaksiyon karışımı 500µL örnek ve 500µL enzim çözeltisi olarak alındığında 4- 100µg/L düzeyine

düşürülebilmektedir. (Zhang, Lynd 2004b) İndirgen şeker yöntemi Cu^{2+} ya da ferrisiyanat gibi inorganik yükseltgenlerin indirgenmesi temeline dayanır. Bu yükseltgenler selüloz zincirinin indirgen ucundaki aldehit grubundan elektron alarak indirgenirler. İndirgen şeker yönteminin dedeksiyon aralıkları 1- 2500 μg /örnek aralığındadır. Somogyi metodu, görece yüksek şeker tayin aralığı ve selülazın girişim etkisinin düşük olması nedeniyle selülaz aktivitesinde en sık kullanılan 2 yöntemden biridir.

Bununla beraber bu metodun dezavantajı sellodekstrin ve glukoz standardı arasındaki zayıf stökiyometrik ilişkidir. (Coward-Kelly, 2003).Örneğin glukozun standart olarak kullanıldığı ve β -glukozidazın fazla olmadığı durumlarda selülaz aktivitesi olduğundan daha düşük olarak ölçülebilir.

Ferrisiyanat, PAHBAH ve BCA metotları yüksek duyarlılığa sahip olmalarına karşın dezavantajları protein ile spesifik olmayan girişim etkisi oluşturmalarıdır.

Fenol- H_2SO_4 ve antron- H_2SO_4 metotlarını kapsayan toplam karbohidrat tayini indirgen şeker tayin yöntemleri ile kıyaslandığında iki önemli avantaja sahiptirler. Bu yöntemde sellodekstrin ve glukoz standardı arasında sıkı bir ilişki vardır. Ayrıca proteinin girişim etkisi çok azdır ya da hiç yoktur. Buna rağmen diğer karbohidrat ve türevlerinin güçlü girişim etkisi yöntemin saf selüloza uygulanmasında sınırlayıcı olmaktadır. Enzimatik analiz kiti ya da HPLC kullanımı diğer şekerlerden kaynaklanan girişim etkisinin yok edilmesini sağlar ancak bu da sellodekstrinin glukozla dönüşümünü sağlayan ekstra bir adımın ortaya çıkmasına sebep olur. Substrattaki azalmayı ölçmek için kullanılan gravimetrik ve kimyasal pek çok yöntem vardır. Ancak bu metotlar kurutma işlemi ile son bulan santrifuj ve filtrasyon gibi sürekli tekrarlayan işlemleri gerektirmeleri nedeniyle oluşan üründeki artışı ölçen metotlar kadar ilgi görmezler. Gravimetri yöntemi standart sapmasının örnek ağırlığına bağlı olması nedeniyle çok dikkat gerektirmektedir. Örneğin ağırlıkları 1 mg ve 100 mg olan iki örnekte 0,1mg'lık bir sapma birinci örnek için %10 ikinci örnek için %0,1 hata anlamına gelmektedir.

Selülozun ölçülebilir fiziksel özellikleri, şişme faktörü, yapı şekillenmesi, türbidite ve viskozitedir. Vizikozimetrik olarak aktivite tayini çözünebilir selüloz türevleri kullanılarak tek başına endoglukanaz aktivitesinin ölçülmesi amacıyla kullanılmaktadır. (Manning,1981) Bu metot işlem süresince molekülün viskozite değeri ortalamasının molekül sayısı ortalamasına olan oranının sabit olduğu durumlar için uygundur. (Hulme, 1988) Bunun yanında bu metodun uygulanması ve otomasyonu zordur.

2.5 Selülaazlar ve Domainleri:

Selülaazlar domain adı verilen bağımsız katlanmalara, yapıya ve fonksiyona sahip alt birimlerin bir araya gelmesi ile oluşurlar. Bu karmaşık enzim sistemi genellikle bir katalitik birim, bir veya daha fazla substrat bağlayıcı ya da kompleksi oluşturmada görevli yardımcı birimlerden oluşur. Bunlara ek olarak henüz fonksiyonu bilinmeyen bazı birimlerde bu kompleksin yapısında bulunmaktadır. Her bir domain birbirine bağlayıcı peptid ile bağlanmış durumdadır. (Gilkens ve Henrissat, 1991)

Bu bağlayıcılar genellikle glisin, prolin, serin ve treonince zengin O-glikozillenmiş peptidlerdir. (Williamson, 1992)

Katalitik birimler glikozil hidrolazlardır. 500 farklı dizinin incelenmesi sonucunda, amino asit dizilerindeki benzerlikler ve hidrofobik grup analizi yöntemi (HCA) kullanılarak yapılan ikincil yapı aydınlatmaları temel alınarak 82 aileye ayrılmışlardır. (Henrissat ve Bairoch 1993) Bu sınıflandırma hem yapısal katlanmayı hem de katalitik mekanizmayı temel almaktadır. Bazı aileler amino asit dizilimlerindeki farklılığa rağmen küresel yapıyı oluşturan benzer katlanmalara ve katalitik merkez yapısına sahip olduklarından ‘‘klan’’ formundadır. En büyük klan olan GH-A, 6 farklı aileler içerir ve farklı amino asit dizilimlerine sahip olmalarına karşı bu ailelerin tümü benzer katlanmalara ve katalitik aktiviteye sahiptir. Ters şekilde amino asit dizilimleri çok benzer olan aile 8 ve 9 katalitik aktiviteleri ve yapısal katlanmaları açısından farklıdır. Farklı selülaazlar bu ailelerden 11’ i (aile 5-10, 12, 26, 44, 45, 48) arasında dağılır. Katalitik birimlerin üç boyutlu yapılarının belirlenmiş olmasına bağlı olarak aynı aileye üye olan enzimlerde amino asit dizisinde olan farklılıklara karşı katlanma şeklinin korunduğu görülmüştür. Aile yapılandırması, enzim sınıflandırma sisteminden (EC sınıflandırması) oldukça farklıdır. EC sınıflandırması substrat spesifikliğini temel alarak yapılan bir sınıflandırmadır. Buna bağlı olarak bir aile içinde hem ekzoglukanazlar, hem de endoglukanazlar bulunabilir. Bununla beraber aile- 5 çoğunlukla selülaazlardan oluşmaktadır ancak β -mannaz, ekzo- 1,3- β -glukanaz ve selodekstrinaz da bu ailenin üyesidir. (Henrissat, 1994)

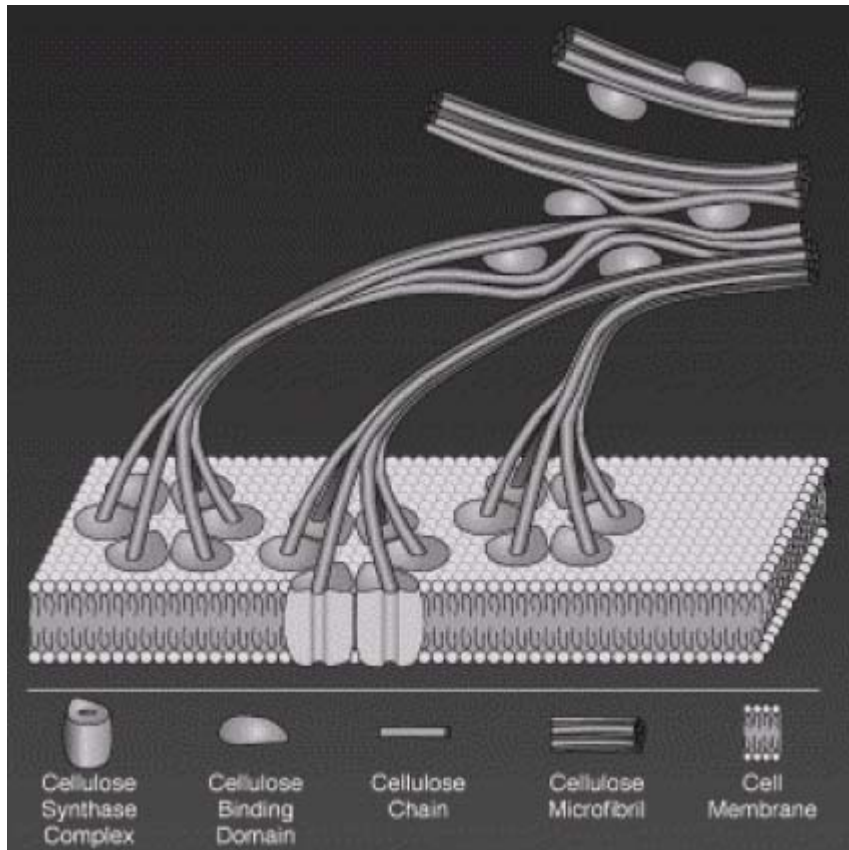
Son yıllarda selülaazların atomik yapısı ve katalitik merkezlerinin yapı aydınlatması ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Hidrolizlenemeyen oligosakkarit türevlerinin geliştirilmesi ve enzimin aktif bölgesini kapatan substrat analoglarının tasarımı ile aktif bölgenin yapı analizleri sağlanmaktadır. (Driguez, 1997) (Notenboom, 1998) (Klarskov, 1997)

Ek olarak biflurojenik substratların tasarımı selülaazların kinetik özelliklerinin incelenmesinde kullanılmaktadır. (Armand, 1997)

Aktif bölgenin yapısının anlaşılması selülozun nasıl aktif bölgeye girdiğinin ve selülazın nasıl çalıştığının gösterilmesi için yeterli değildir. Katalitik bölge ve sahip olduğu katalitik aktivite enzimin tüm özelliklerini değiştiren ya da yeni özellikler ekleyen aksesuar modüllerle modifiye edilir. Günümüze kadar çalışılmış pek çok selülaz ikinci bir bağlayıcı alt birime sahiptir. Selüloz bağlayıcı modül ya da domain (cellulase binding module/ domain “CBM” “CBD”) olarak isimlendirilen bu altbirim substratı bağlamasına karşın onu hidrolizleyemez. Farklı ailelerin bir çoğunda bulunan CBM için amino asit dizi homolojisinin varlığı gösterilmiştir. (Temme, 1995)

Katalitik bölgelerde olduğu gibi her bir CBM ailesinin yapısı kristalografik ve NMR yöntemleri ile aydınlatılmaya başlanmıştır. (Tormo, 1996) (Brun, 1997)

CBM’ün en önemli fonksiyonu kristalize selülozu katalitik bölgeye ulaştırmaktır. Enzim substrat yüzeyinde difüzyona maruz kaldığı halde bağlanma oldukça stabildir. (Jervis ve Haynes, 1997) Bazı CBM’ler kristalize substrat zincirleri arasındaki kovalent olmayan etkileşimleri bozma işleminde katalizör görevi üstlenmektedirler. (Din, 1991)



Şekil 2.6 CBM ve selüloz mikrofibrillerinin etkileşimi

CBM'ün hücre duvarının sentezi sırasında da bazı fonksiyonlara sahip olduğu belirlenmiştir. Şekilde selüloz sentezi sırasında CBM ile selüloz fibrillerinin etkileşimi gösterilmiştir. CBM selüloz mikrofibrilleri ile farklı safhalarda etkileşime giriyor olabilir. Kristalizasyonun başlangıcındaki etkileşim sentez hızındaki artış ve fibrillerin uzaması ile sonuçlanırken sentez sonrasındaki etkileşim hidrolize olmamış fibrillerin kopması ile sonuçlanır. Shpigel (Shpigel 1998) CBM'ün selüloz biyosentezini düzenlediğini göstermiştir. CBM'nin *A.xylinum*'da selüloz sentez hızını 5 kat arttırdığını göstermiştir. CBM varlığında selüloz biyosentezinin elektron mikroskobu ile incelenmesi sonucunda ince kontrol fibrillerine oranla daha kalın yeni fibrillerin oluştuğu gösterilmiştir.

Substrat spesifikliğini temel alan sınıflandırmaya göre:

Selülaz terimi 3 farklı enzim ve 3 farklı katalitik reaksiyonu içeren hidrolitik enzim sistemini ifade etmektedir.

1.Endoglukanazlar: (EGs, EC 3.2.1.4) suda çözünmeyen selüloz zincirini rastgele olarak β -1,4 glikozidik bağını kırarak hidrolizlerler.

2.Ekzoglukanazlar ya da selobiyohidrolazlar: (CBHs, EC 3.2.1.19) glikozidik bağını indirgen ya da indirgen olmayan uç üzerinden hidrolizlerler diğer bir deyişle zincirin uçları üzerinden aktivite gösterirler. Hidroliz sonucunda ortaya çıkan ürün iki glukoz biriminden oluşan selobiyozdur.

3.Glukozidaz ya da selobiaz : (EC 3.2.1.21) suda çözülebilir özellikteki selobiyozu 2 glukoz artığına hidrolizlerler.

Mikroorganizmalar özellikle de funguslar bu enzimlerin bir karışımını sentezlerler. Selülolitik sistemi oluşturan bu enzimler etkin ve sinerjistik bir şekilde selülozu hidrolizlerler (Singh ve Hayashi, 1995). Diğer taraftan bu sistemi oluşturan enzimler tek başlarına selülozu ya hiç hidrolizleyemezler ya da çok az miktarda hidrolizleyebilirler. Bu sinerjistik işbirliğinde en iyi anlaşılan β -glukozidazın fonksiyonu olmuştur. CBH ve EG'nin kataliz sonucunda oluşan ürün olan selobioz tarafından inhibe edildikleri bilinmektedir (Holtzapfel, 1984) (Gusakov ve Sinitsyn, 1992). Bu işbirliğinde β -glukozidazın rolü çok önemlidir. β -glukozidaz diğer iki enzim üzerine selobiozun inhibitör etkisini azaltır. EG ve CBH'nin bu işbirliğindeki rolü halen araştırılmaktadır. Genel olarak EG selüloz zincirine rastgele etki eder ve serbest uç sayısını artırır, CBH de bu serbest uçlara saldırır. (Kumar, 1996) Diğer taraftan CBH'in aktivitesinde EG'nin saldırabileceği altta kalan selüloz zincirlerinin açığa çıkmasına neden olur. Selülolitik sistemdeki bu kooperatif etki enzimlerin tek tek verdiği aktiviteden daha

yüksek bir aktivite oluşmasına neden olur. Pek çok endo ve egzo-glukanaz katalitik domain ve ona peptid ile bağlanmış bir veya daha fazla yardımcı domainden oluşmuştur. (Gilkes et al., 1991) yalnızca bir mikrobiyal selüloz ve yüksek bitkiler tarafından sentezlenen selüloz belirtilen yardımcı domainleri içermez. Bu selülozlara örnek olarak *T.reesei*'den elde edilen EG ve EG3 verilebilir. Buna benzer şekildeki moleküler organizasyon polimerik karbohidratlara spesifik diğer enzimler olan amilaz ve kitinazda da görülebilir. (Tomme, 1995) ve büyük olasılıkla bu organizasyon heterojen karbohidratların biyodegradasyonu için gereklidir. Adı geçen bu yardımcı domainlerden biri de CBM (cellulose binding module) 'dır ve selülozun enzimatik parçalanmasında kritik bir öneme sahiptir. *T.reesei*'den elde edilen CBH I'in CBM olmadan selülozu hidrolizleyebildiği ancak kinetiğinde bazı değişiklikler olduğuna dair kanıtlar vardır (Srisodsuk, 1994). Buna ek olarak EG5 *Humicola insolens*'den izole edilen EG5 ve *Cellulomonas fimi* 'den izole edilen CenA EG, ile yapılan deneyler CBM varlığının EG aktivitesi için zorunlu olmadığını göstermiştir (Azevedo et al., 2000). Endo ve ekzo glukanazların moleküler organizasyonunda tüm modüller birbirine proteolize duyarlı bağlayıcı bir peptid aracılığı ile bağlanırlar. Olasılıkla proteolize olan bu duyarlılık bağlanmanın sulu fazda gerçekleşmesi nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Proteolize dayanıklılığın sağlanabilmesi amacıyla genellikle bağlayıcı peptidler O-glikozillenmiş durumdadırlar. Fungal bağlayıcı peptidler prolin, treonin ve serince zengindirler. Bakterilerde bulunan yaklaşık 100 amino asitlik peptidlere göre fungal peptidler daha kısadırlar. (30- 40 aa)

CBM'nin bakteriyal ve fungal selülozlardaki rolü oldukça net bir şekilde anlaşılabilmiştir. (Teeri, 1995) (Din, 1995) Çeşitli çalışmalar, katalitik birimin kristalize substrata olan afinitesinin çok düşük olduğunu göstermiştir. Buna karşın izole edilmiş CBM, selülozun tüm bağlanma özelliğine tek başına sahiptir. CBM'nin proteolitik olarak uzaklaştırılması enzimin küçük çözünebilir substratlar üzerindeki aktivitesini etkilemez, ancak suda çözünmeyen selülozun hidrolizi belirgin olarak azalır. (vanTilbeurgh, 1986) (Tomme, 1988) (Kleman-Leyer, 1994)

Bazı bakteriyal CBM'ler pamuk fibrillerini parçalayarak substrattan küçük parçalar kopartabilme özelliğine sahiptir. Bu fonksiyon yalnızca substrata bağlanma özelliğinden çok daha aktif bir fonksiyondur. (Din, 1991) (Kilburn, 1993). CBM'ler proteinin N- ya da C-terminalinde bulunur, bunun dışında proteinde internal olarak yerleşmiş CBM'lerin de varlığı da gözlenmiştir.

100'den fazla CBM'ün amino asit dizisinin aydınlatılması özelliklerinin karşılaştırılmasına ve aileler halinde sınıflandırılmasına olanak sağlamıştır. CBM'lerin pek çoğu amino asit

dizilerindeki benzerliklere göre 10 aileye ayrılmışlardır. (Tomme, 1995)

Pek çok CBM 1,2 ve 3. ailelerde bulunur geri kalan ailelerde yalnızca birkaç üye vardır. *T. reesei*,’den elde edilen CBH I-CBM’nin 3 boyutlu yapısı nükleer manyetik rezonans (NMR) yöntemi ile aydınlatılmıştır. (Kraulis et al., 1989) ikincil yapısı kama şekilli ve düzensiz bölgelerden oluşur. Molekülün bir yüzeyi hidrofobik yüzey oluşturan tirozine zengindir ve selülozun bağlanma yüzeyini oluşturur. (Linder, 1995)

Temel fonksiyonuna ek olarak CBM’nin katı substrat yüzeyine etkiyen etkin enzim konsantrasyonunu arttırdığı düşünülmektedir. Diğer bir düşünce ise CBM’nin kristalize selülozdan tek bir selüloz zincirinin kopartılmasını sağladığı yönündedir. (Tomme, 1995) (Linder, 1996) Bu da katalitik merkezin substrata olan aktivitesini mümkün kılmaktadır.

Bilinen tüm ksilanaz ve selülazların katalitik domainleri amino asit dizilerindeki benzerlikler temel alınarak sınıflandırılabilmişlerdir. (Henrissat ve Davies, 1997) tüm ailerin katlanma modelleri ve yüzey yapılarında benzerlikler vardır. Bu durum tüm aile üyelerinin aynı reaksiyon mekanizmasını kullandıklarını ve benzer substrat spesifikliğine sahip olduklarını göstermektedir. (Tomme, 1995) Bu durum 6 aileye ait 15 farklı selülaz için doğrulanmıştır. İlk katalitik domain yapısı 1990 yılında çözümlenmiştir. (Rouvinen,1990)

T. reesei’den elde edilen CBH II katalitik domaininde α ve β yapıları dönüşümlü olarak bir arada bulunur. Yapıda 5 adet α heliks, 7 adet β katlanmış yaprak zinciri bulunmaktadır.

Aktif bölge tünel oluşturmak üzere uzamış 2 kol ile kapatılmıştır bu tünelin uzunluğu 2nm kadardır ve glikozidil artıklarını bağlayabilmek için 4 adet bağlanma bölgesi içerir. Glikozidik bağın hidrolizi glikozidil artıklarının 2 ve 3. bağlanma bölgeleri arasına bağlanması ile gerçekleşmektedir. *Thermomonospora fusca*’dan elde edilen ve CBH II ile aynı aileden gelen E2 katalitik domaininin üç boyutlu yapısı CBH II’ye çok benzer ancak aktif bölgenin düzenlenmesinde çok önemli farklılıklar vardır. E2 katalitik domainin aktif bölgesi kapatılmamıştır ve tünelden çok oyuga benzer yapıdadır. (Spezio, 1993)

Tüm EG’lar bu aileye mensuptur ve tümünde tünel yapısı bulunmamaktadır. Buna karşın bilinen tüm CBH’larda tünel yapısı vardır. CBH’nin tünel şekilli aktif bölge yapısı EG’lerin aksine enzim substrat kompleksi ayrılmadan önce çok sayıda bağın kırılmasını katalizlediğini düşündürmektedir. (Teeri et al., 1998). Bu aynı zamanda CBH’lerin EG’lara göre kristalize selülozun polimerizasyon derecesini azaltmada neden yavaş olduğunu da açıklar. (Kleman-Leyer, 1996)

Fungal CBM’in boyutları Tormo ve arkadaşları tarafından 1996 yılında verilmiştir.

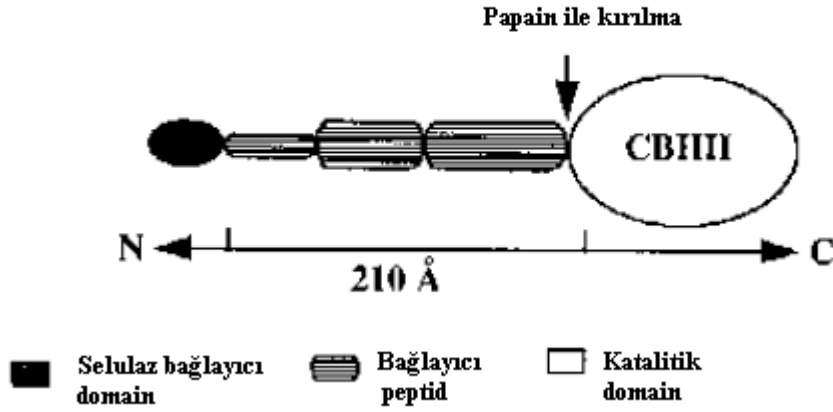
Clostridium thermocellum'dan elde edilen 155 amino asitlik CBM kompakt bir yapı oluşturmak üzere katlanır ve prizma şeklini alır. Bu prizma şekilli yapının boyutları 3x3x4.5 nm kadardır. Tormo ve arkadaşları *C. fimi*'den elde edilen CBM'ler ve *T. reesei*'den elde edilen CBH I ile de çalışmışlar ve bunların 3 selüloz zincirini arka arkaya bağladıkları ve bu durumun tüm CBM'ler için geçerli olabileceği sonucuna varmışlardır. CBM'in selüloz zinciri ile etkileşimi selülozun internal hidrojen bağlarının ayrılmasına neden olur bu durum katalitik domain üzerinden gerçekleşen glikozidik bağın kırılmasını kolaylaştırır.

2.6 Fungal Selülazlar:

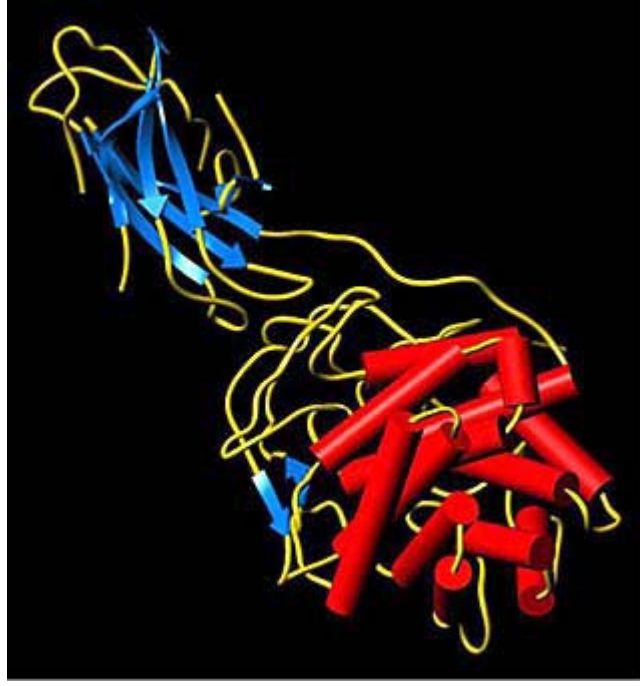
Selüloolitik funguslar özellikle aerobik soft-rot türler (*Trichoderma Humicola* ve *Penicillium* türleri) ve white-rot fungi (*Phanerochaete*) en çok çalışılan türlerdir. Bu organizmalar doğal selülozu tamamen hidrolizleyebilme kapasitesine sahiptirler. Genellikle bir ya da iki ekzoglukanaz, birkaç endoglukanaz ve en az bir β -glukozidaz sentezlerler. Tüm bu sentez ürünlerini kültür ortamına salgırlar.(Wood, 1989) (Wood ve Garcia-Campayo, 1990); (Covert,1992) (Schülein, 1993) Bu kadar farklı yapıda enzimin sentezlenmesi belki de substratın fiziksel heterojenliği ile başa çıkabilmek amacıyla gereklidir. Buna ek olarak selülozun yapısı parçalanma süresince değişime uğramaktadır buna bağlı olarak farklı safhalarda farklı enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır. Rapor edilen enzim sayısı değişkenlik göstermektedir bu da selülazların saflaştırma işleminin güç olmasından kaynaklanmaktadır. (Wood,1989) (Reinikainen, 1995) Proteoliz ve glikozilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar selülazın elde edildiği kaynağa bağlı olarak farklılıklar gösterir. (Beguın, 1990); (Srisodsuk,1993) Bunun yanında protein-protein etkileşimlerinin de saflaştırma sırasında sorunlar çıkmasına neden olduğu belirtilmiştir. (Sprey ve Bochem, 1993)(Wood, 1989) Bazı fungal selülaz genleri kopyalanmıştır. Bu çalışmaların sonuçları fungal enzim dizilerinin diğer glikozil hidrolazlarla karşılaştırılmasına olanak sağlamıştır. Fungal selülozlara ait tüm domain yapıları ekzoglukanaz, selobiyohidrolaz (CBH) ve endoglukanazlarda genellikle aynıdır. Tüm bu enzimler büyük bir katalitik birim ve küçük bağlayıcı birim içerirler. Bu iki alt birim birbirine glikozillenmiş bir peptid ile bağlıdır. Bunun yanında yalnızca katalitik birimden oluşan ekzoglukanaz ve birkaç endoglukanaz varlığı bildirilmiştir. (Covert, 1992) (Ward, 1993) (Schülein, 1993) Bazı anaerobik funguslar (*Neocallimastix* sp.) daha karmaşık bir domain yapısına ve çoklu katalitik domain yapısına sahiptirler. Bununla beraber katalitik aktivite göstermeyen domain yapısına sahip fungal selülazlarda vardır. Bazı selülazlar ise diğer polimerik substratlara karşı da aktivite gösterebilirler. Örneğin *Trichoderma reesei*'den elde edilen endoglukanaz I (EG I) hem ksilani

hem de selülozu parçalayabilir. (Biely,1991)

Fungal selülazın bütün olarak kristalizasyonu da oldukça zordur. Bunun sebebi bağlayıcı peptidin esnek ve/veya glikozillenmiş olması nedeniyle heterojen yapılı olmasıdır. Altbirimler arasındaki uzaysal ilişkiyi belirlemede kullanılan iki yöntem vardır. Bunlar X-ışını (Abuja, 1988) saçılması ve dinamik ışık saçılması (Boisset, 1995) yöntemleridir. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar *Trichoderma reesei*'den elde edilen selobiyohidrolaz ve *Humicola insolens*'den elde edilen endoglukanazın şekillerinin uzamış iribaş benzeri yapıda olduğunu göstermiştir.



Şekil 2.7 Fungal selülazın şematik gösterimi



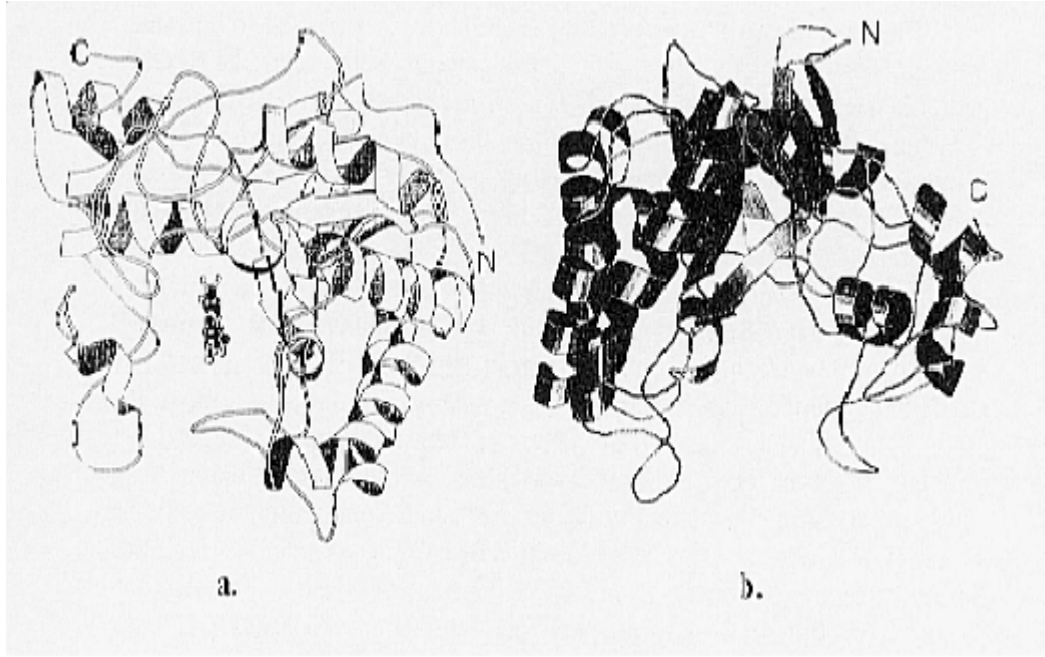
Şekil 2.8 Fungal selülaazın üç boyutlu yapı modeli

Bu yapıda katalitik alt birim elipsoidal şekilli baş kısmını oluştururken bağlayıcı peptid ise katalitik alt birim ile CBM arasındaki bağlantıyı sağlar. Bağlayıcı peptid, prolin ve glisinçe zengindir ve menteşe benzeri bir görev yapar. Peptidteki amino asitler O-glikozillenmiş durumdadır ve bu da yapıyı daha rijid bir hale getirir.(Srisodruk, 1993) Peptidteki glikan gruplarının katalitik aktiviteye bir etkisi yoktur. (Johansson, 1989)

Katalitik altbirimin amino asit dizisi fungal selülaazlarda türden türe çok büyük farklılıklar gösterir.(Penttilä, 1986) HCA metodu ile 11 sınıfa ayrılmış olan selülaaz ailelerinin 6 tanesinde fungal selülaazlar vardır.

Aile 6'nın üyesi olan *T.reesei*'den elde edilen CBHII katalitik altbirimi atomik düzeyde kristal yapısı çözümlenmiş ilk selülaazdır. Polipeptid trioz fosfat izomeraz benzeri α/β yapısına sahiptir. Ancak trioz fosfat izomerazdan farklı olarak 7 yerine 8 β -zinciri vardır. Aktif bölge tünel benzeri bir yapıdadır. Bu yapı CBHII'nin ekzo-enzim olarak aktivite göstermesini açıklar. Uzun selüloz zinciri tünel boyunca uzanarak yalnızca bir uçtan aktif bölgeye kadar ulaşabilir. Benzer yapıya sahip aynı aileye ait endo-glukanazlarda ise bu tünel yapısı yoktur buna bağlı olarak da endo-glukanazlarda selüloza herhangi bir bölgeden bağlanma gerçekleşir. Dizi ve katlanmaları benzer olsa da aynı aileye ait selülaazlar farklı mekanizmalarla substrata etki edebilirler. (Rouvinen, 1990) Aynı aileye ait olan *Thermomonospora fusca* endoglukanazı E2'nin 3 boyutlu yapısı bu hipotezi destekler. E2'de tünel yapısı daha kısadır ve selülaazın aktif bölgeye bağlanması uç bölgelerden değil zincir

arasından rasgele gerçekleşir. (Spezio, 1993) Buna karşın, CBHI farklı bir aileye mensuptur (aile 7) ve tamamen farklı bir katlanmaya sahiptir ancak tünel yapısı aynen korunmuştur. (Divne, 1994)



Şekil 2.9 (a) CBHII ve (b) E2 yapıları

Fungal selüloz bağlayıcı modüller CBM 36 amino asit içerirler ve yüksek düzeyde dizi benzerliğine sahiptirler. Bu durum benzer katlanmalara sahip oldukları sonucunu doğurur. (Hoffren, 1995) tamamı CBM aile I'de yer alan (Tomme, 1995) T.reesei'ye ait CBHI CBM'lerinin tümünün 3 boyutlu yapısı NMR çalışmaları ile aydınlatılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda molekülün şeklinin kama benzeri bir yapıda olduğu 3 anti-paralel zincirin 2 disülfid köprüsü ile bağlanarak stabil hale gelmiş olduğu açığa çıkmıştır. Kamanın bir yüzeyi düzdür ve bu yüzde çok küçük bir alana sıkıştırılmış halde bulunan 3 aromatik amino asit artığı bulunur. (Kralius, 1989) Site-directed mutagenesis çalışmaları ve sentetik CBM peptidleri ile yapılan çalışmalar göstermiştir ki bu üç aromatik halka yapısı selülozla ilk olarak etkileşime giren yüzeyi oluşturmaktadır. (Reinikainen, 1992) (Linder, 1995) (Mattinen, 1995)

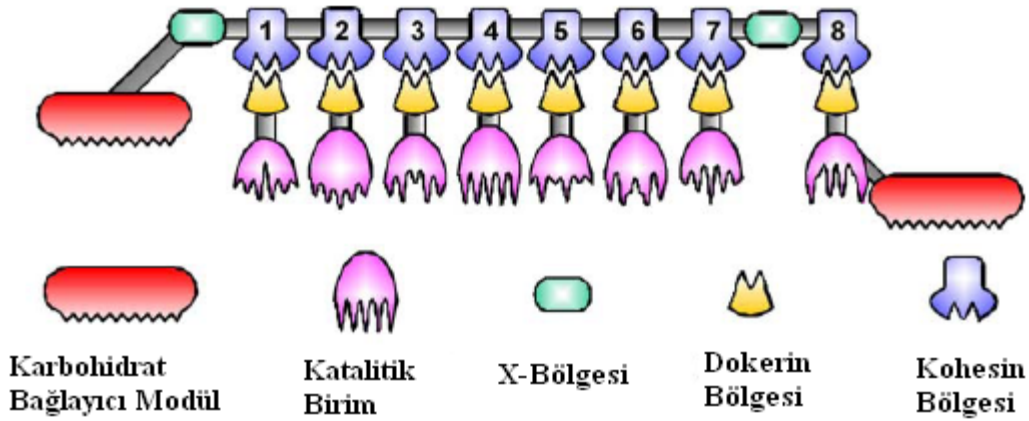
2.7 Bakteriyal Selülazlar:

Bakteriyal selülazlar fungallere göre modüler yapılanmada farklılıklar gösterirler. En iyi karakterize edilen bakteriyal selülazlardan biri olan anaerobik bakteri *Clostridium thermocellum*'dan elde edilen selülazdır. Karmaşık yapısı nedeniyle selülozom ismini alır. Selülozom yapısının kristalize selüloza olan aktivitesi oldukça yüksektir. Selülozomların

molekül ağırlığı 2 000 kDa'a yakındır ve yaklaşık 20 polipeptid zincirinden oluşurlar.(Beguin ve Aubert, 1994)

Selülozomlar bir araya gelerek poliselülozom yapılarını oluştururlar. Poliselülozomlar hücre yüzeyinde yer alan organel benzeri yapılardır. (Bayer,1994) En büyük alt birim katalitik olmayan altbirim scaffoldindir (S1 ya da CipA) selülozom yapısının çekirdeğini oluşturur.

2.8 Selülozom Yapısı:



Şekil 2.10 Selülozom yapısının şematik gösterimi

Selülozom çeşitli bileşenlerinin etkisi ile selülozun etkin olarak degradasyonunu sağlayan bir makinedir. Selülozom kompleksi birkaç farklı selülaz ve yardımcı proteinin scaffoldin alt birimi yardımı ile bir araya gelmesi sonucunda oluşur. Her bir selülozomal altbirim birçok modülün bir araya gelmesi ile oluşur bunlardan 2 tanesi (enzim üzerindeki dockerin domaini ve scaffoldin üzerindeki kohez domainleri) enzimatik alt birimlerin bir araya gelmesini sağlar. Bir diğer scaffoldin modülü selülaz bağlayıcı modül (CBM) substratın bağlanmasından sorumludur. Bazı selülozomlar hücre zarına bağlanmış olarak bulunmaktadır. Bu bir araya gelme sonucu oluşan selülozomlar da bir araya gelerek hücre yüzeyini süsleyen dinamik poliselülozomal organelleri oluştururlar. Selülozomlar hem hücrenin substrata bağlanmasını hem de hücre içinde şekerlerin yeniden yapılandırılmasını yönetirler.

Son yıllarda pek çok makromoleküler makine ve multienzim kompleksi tanımlandı, sınıflandırıldı ve hücresel aktivitesi incelendi. (Alberts, 1998)

Uzun zamandır pek çok bakteri ve funginin kristal formdaki selülozu parçalamak için farklı tipte selülaz sentezlediği bilinmektedir. (Be'guin ve Aubert, 1994) (Tomme, 1995a). Kısa bir

süredir ise mikrobiyal selüloz sistemlerinin suda çözünmeyen selülozu parçalayabilmek için sinerjistik olarak etki eden farklı tipte selülozlar içerdiği düşünülmektedir. Gerçekte ise pek çok selüloz sistemi özellikle de aerobik mikro organizmalara ait olanlar, serbest enzimler olarak karakterize edilmişlerdir. Ancak multi kompleks enzim kompleksi selülozom anaerobik, termofilik, selulolitik bir bakteri olan *Clostridium thermocellum*'da ilk olarak belirlenmiş ve tanımlanmıştır. (Lamed,1983)

Bu bakteriden elde edilen bilgiler selülozomlar ile ilgili olarak pek çok yeni keşfin ortaya çıkmasını sağlamıştır. (Belaich,1997); (Tamaru, 2000- 2001)

C. thermocellum 'a ait olan selülozomun keşfi biyokimyasal, immunolojik, yapısal ve genetik tekniklerin bir birleşimi sonucu ortaya çıkmıştır. (Kenig, 1983)

Biyokimyasal veriler bu organizmaya ait olan majör selulolitik aktivitenin büyük ve ekstraselular bir kompleks tarafından gerçekleştirildiğini ortaya koymuştur. Yapısal kanıtlar selülozomun çok bileşenli yapısını boyutlarını ve hücre yüzeyinde oluşturdıkları polisülozom organellerinin yapısını ortaya koymuştur. Geleneksel biyolojik uygulamalar ise selülozom yapısını oluşturan bazı selülozlara ait klonlama, dizi analizi ve ekspresyon çalışmaları sonuçlarını ortaya koymuştur. (Be'guin, 1990) (Hazlewood,1988) Farklı organizmalardan elde edilmiş selülozlarla yapılan karşılaştırmalı analizlere göre, selülozlar fonksiyonları biyokimyasal kanıtlarla doğrulanmış modül ya da domainlere ayrılır. (Gilkes, 1991)

Son zamanlarda seçilen selülozomal protein domainleri ile yapılan üç boyutlu kristal yapı çalışmaları selülozom kompleksinin tüm parçaların yavaş yavaş bir araya gelmesi ile oluştuğunu açıklamıştır. (Bayer, 1998)

2.9 Selülozun Hidroliz Mekanizması:

Selüloz D-anhidroglukopiranoz birimlerinin β -1,4-glikozidik bağ ile bir araya gelmesi sonucu oluşan, 100- 20 000 polimerizasyon dercesine sahip lineer bir polimerdir.(Krassig, 1993) Anhidroselobioz selülozun tekrarlayan birimidir. Komşu selüloz zincirleri arasındaki H-bağları ve van der Waals kuvvetleri paralel düzenlenme ve kristal yapının oluşmasını sağlar. Kristal yapı ve fibrillerin düzenlenmesi moleküle esneklik ve sağlamlık katar. (Demain, 2005) (O'Sullivan,1997) (Nishiyama, 2003)

Selüloz molekülü çok karardır. B-glukozidik bağın 25°C'de yarılanma ömrü 5-8 milyon yıldır. (Wolfenden, 2001) Ancak selülozun enzimatik olarak parçalanması çok daha hızlı

olarak gerçekleşir. Bu parçalanma karbonun tekrar atmosfere dönebilmesi açısından hayati önem taşır. (Berner, 2003) (Falkowski, 2000)

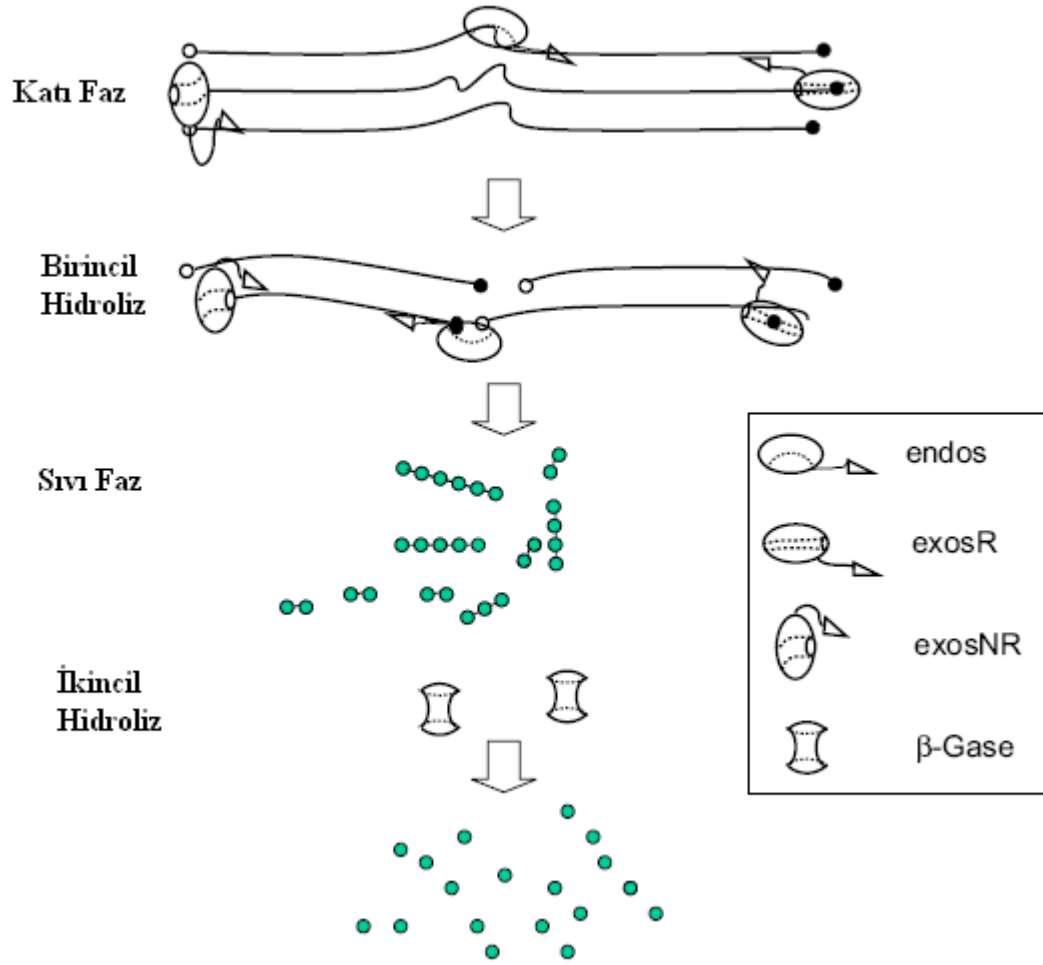
Endoglukanazlar, ulaşılabilir olan intramoleküler β -1,4-glukozidik bağları rastgele hidrolizleyerek, yeni zincir uçlarının oluşmasını sağlarlar. Selülozun enzimatik olarak hidrolizinde en çok kabul edilen mekanizma endo-glukanaz (EC 3.2.1.4), ekzo-glukanaz ya da diğer adıyla selobiyohidrolaz (EC 3.2.1.91) ve β -glukozidazın sinerjik etkisi ile selülozu parçaladıklarıdır. (Henrissat, 1994) Endoglukanaz selüloz zincirinin ulaşılabilir olan β -1,4-glukozidik bağlarını kırarak yeni zincir uçları oluşmasını sağlar, ekzo-glukanazlar selüloza bu serbest uçlardan etki ederek suda çözünebilir selobiyoz ve glukozun açığa çıkmasına neden olur. Son olarak da β -glukozidazlar selobiyoz inhibisyonunu önlemek amacıyla selobiyozu glukozu parçalar. Katı substrat yüzeyinde gerçekleşen ilk hidroliz polimerizasyon derecesi en fazla 6 olan suda çözünebilir, endo- ve ekzo-glukanazlarca hidrolizlenebilen şeker oligomerlerinin açığa çıkmasına olanak sağlar. Endo- ve ekzo-glukanazlarca gerçekleştirilen depolimerizasyon adımı tüm selüloz hidroliz sürecinin hızını belirleyen adımdır. Sıvı fazda gerçekleşen ikincil hidroliz adımı selobiyozun ve daha uzun zincirli olan sellodekstrinin β -glukozidazlarca glukozu hidrolizini içerir. (Zhang ve Lynd, 2004)

Selüloz hidrolizi sürecinde substratın karakteristiği sürekli değişir. Örneğin endoglukanazlarca oluşturulan ve ekzoglukanazlarca tüketilen selüloz zincirinin uçlarının sayısı sürekli olarak değişim gösterir. (Kongruang, 2004) Bunun yanında selüloz fragmentasyonu ve substratın tüketimi sonucunda katı fazdaki selüloza enzimlerin ulaşabilirliği artar. (Lee, 1996- 2000)

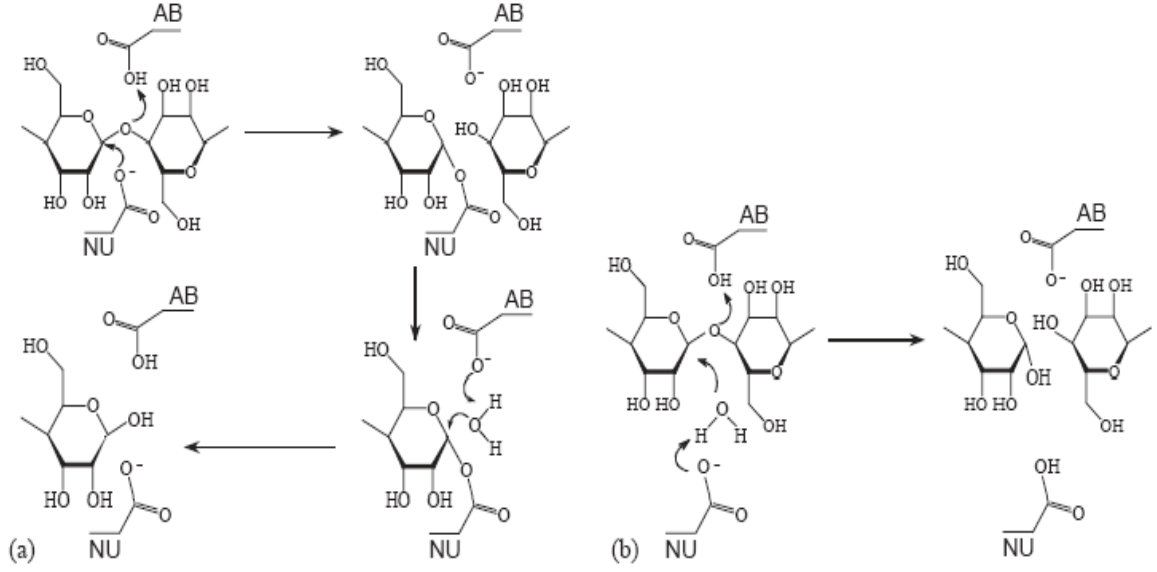
Endo- ve ekzo-glukanazların birlikte etkisi sonucu selüloz yüzeyinde meydana gelen değişimler hidroliz hızını büyük oranda farklılaştırır.

Selüloz hidrolizi yapısındaki anomerik karbon atomunun yapılandırılmasındaki değişim ile birlikte gerçekleşir. Bu değişim enzimin aktif bölgesindeki iki karboksil grubu tarafından sağlanır.

Glikozidik bağın hidrolizinde kullanılan 2 farklı katalitik mekanizma vardır. Retaining (sürekli) ve inverting (ters) mekanizmalar (Davies ve Henrissat, 1995)



Şekil 2.11 Kompleks olmayan sistemde selüloz hidrolizinin mekanistik şeması



Şekil 2.12 Glikozidik bağın hidroliz mekanizmaları

2.9.1 Sürekli (retaining) Mekanizma:

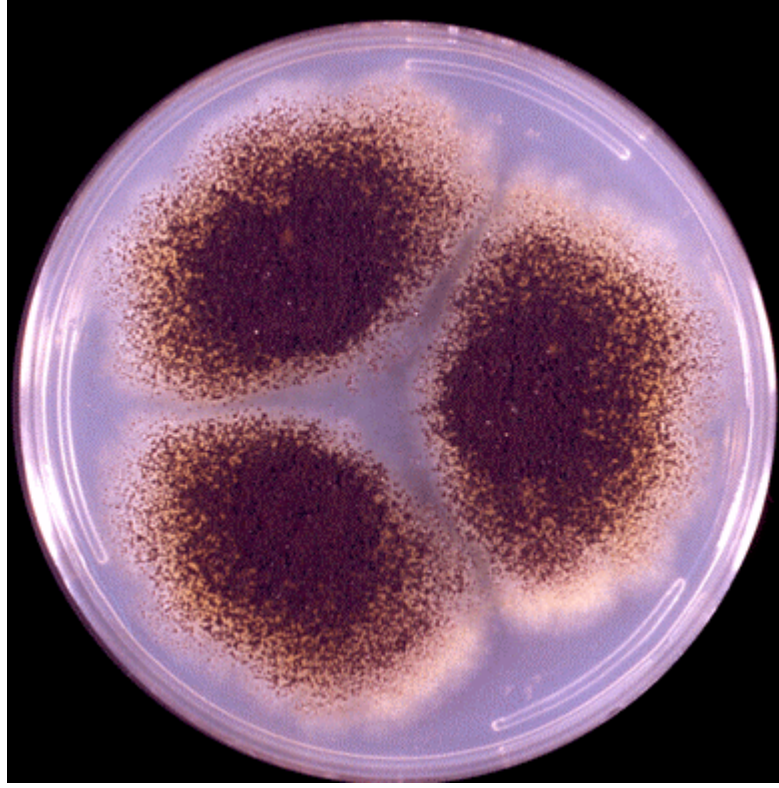
Sürekli mekanizmada, substratın anomerik karbonu C1'in konfigürasyonu karşılıklı yer değiştirme mekanizması ile kırılmadan sonra tamamen korunur. İki katalitik karboksil artığı şeker düzleminin yaklaşık 5.5 Å yakınına karşılıklı olarak yerleşir. İlk olarak glikozilasyon çifte yer değiştirme adımı gerçekleşir. Retaining mekanizması çifte yer değiştirme mekanizması ile kırılmadan sonra substratın C1 anomerik karbonunun konfigürasyonunu korur. 2 Katalitik karboksil artığı şeker düzleminin yaklaşık 5.5 Å karşısında yer alır. İlk adım glikozilasyon adımı 2 karboksilik artığının birindeki çifte yer değiştirme mekanizması ayrılan grubun uzaklaşması ile asit katalizini sağlar. 2.karboksil grubunun anomerik karbona saldırması ile glikozil-enzim ara ürünü oluşur. 2. adım deglikozilasyon bu adımda ilk karboksil artığı baz olarak fonksiyon gösterir oluşan nükleofilik gruptan proton alarak onu aktive eder. Bu adımda bir su molekülü hidrolize olur.

2.9.2 Kesikli (inverting) Mekanizma:

Inverting mekanizmada kırılmadan sonra substratın C1 anomerik karbonunda tam bir dönme gerçekleşir.β- glikozidik bağın hidrolizi α-konfigürasyonunda bir ürün oluşturur. Bağın kırılması tek bir nükleofilik yer değiştirmesi mekanizması üzerinden gerçekleşir. Bu enzimin katalitik kısmı aynı zamanda iki katalitik karboksilat içerir. Bu iki karboksilat artığı asit katalizi ile ayrılan grubu uzaklaştırır. Şeker halkasının karşı tarafından su molekülü

nükleofilik atak gerçekleştirir.

2.10 Aspergillus niger Selülazının Özellikleri:



Şekil 2.13 Aspergillus niger

Aspergillus türleri enzim kompleksinde yer alan üç enzimi de üretebilme kapasitesine sahiptir (Hosnino,1997) ve selüloz üzerine güçlü hidrolitik aktivite gösterir. Aspergillus niger temel olarak β -glukozidaz ve endoglukanazların üretiminde kullanılır ancak β -selobiyohidrolazın endüstriyel boyutta üretimi ile ilgili olarak sınırlı sayıda bilgi vardır. Selülaz sentezi oligomerik ve dimerik birçok şeker ile indüklenebilir. (Magnelli ve Forchiassin, 1999) Enzimin üretimi kullanılan karbon kaynağına göre değişiklik gösterir. Glukozun çok düşük konsantrasyonlarında bile β -selobiyohidrolaz (CBH) düzeyi minimumdur. Enzim üretimi diğer karbohidratlarla stimüle edilebilir. Buğday kepeği ve selüloz β -selobiyohidrolaz ativitesi üzerine promotör etkisi gösterir.

Selülaz pek çok endüstriyel süreçte uygulama alanı bulan önemli bir endüstriyel enzimdir.(Esterbauer ve ark. 1991)

Selülaz kompleksi içinde yer alan selobiyohidrolaz, endoglukanaz ve β -glukozidaz lignoselüloolitik biyokütle üzerine sinerjistik olarak etki ederler. Hidroliz sonucunda açığa çıkan glukoz fermentasyon işlemi ile etanol, bütanol, aseton ya da 2,3 bütandiole; bütandiol

ise biyolojik yakıtlara dönüştürülebilir(Gadgil ve ark.1995) .

Lignoselülotik substratlar içinde bulunan selüloz ve selülozik bileşenler transkripsiyon seviyesinde selülazın sentezini kontrol eden mRNA'nın oluşumunda gereklidir. Diğer taraftan glukoz katabolik baskılama metabolizması yoluyla selülaz sentezini translasyon aşamasında baskılar.(Beguin 1990)

A.niger yüksek aktivitede β -glukozidaz üretir. Yüksek aktiviteli β -glukozidaz ise substratın glikozilasyonu sonucunda selülaz için indükleyici olan gentiobiozun oluşmasına sebep olur. (Suto ve Tomita, 2001)

Son zamanlarda bakteri ve mantar gibi çeşitli organizmalarda selülozun moleküler biyolojisiyle ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır. Pek çok araştırmacının da belirttiği gibi selülaz çok geniş dağılımdaki mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilmektedir. (Kubicek, 1993)

2.11 Selülazın Endüstriyel Uygulamaları:

Selülaz ile ilgili uygulama ve araştırmalar II. Dünya savaşı sırasında Amerikan ordusunun çadırlarındaki çabuk yıpranmanın önlenmesi amacıyla başlamıştır. 1960'larda Mandels ve Reese Trichoderma mutantlarından elde edilen selülaz ile ilgili ilk raporu sunmuşlardır. (Mandels ve Reese, 1960) 1970'lerde ortaya çıkan petrol sıkıntısı ile birlikte selülozdan glukoz eldesi, glukozun da etanole fermentasyonu ve alternatif yakıta dönüştürülebilmesi nedeniyle selülaza olan ilgi hızla artmıştır. (Lynd, 1991). Ancak 1980'lerin ortalarında tekstil endüstrisinde kullanılmak üzere büyük ölçekli selülaz üretimi gerçekleştirilebilmiştir. Günümüzde selülazdan fırıncılık, meyve suyu üretimi, tekstil, deterjan ve kâğıt endüstrisinde yararlanılmaktadır. (Tolan ve Foody 1999)

CBM de selülazdan ayrılarak çeşitli uygulamalarda kullanılabilir. CBM afinite özelliğine bağlı olarak saflaştırma, biyoprosesler, biyosensör, çeşitli protein ve hücrelerin immobilizasyonu amacıyla bağlayıcı molekül olarak kullanılmaktadır. (Ross, Mayer 1991)

Endüstriyel enzimlerin son yıllarda gıda, ilaç, tıp, tekstil, deterjan sanayi gibi alanlarda uygulama alanları oldukça gelişmiştir ve gelişmeye devam etmektedir. Bu enzimlerden biri olan selülaz da tekstil endüstrisinde iplik ve kumaşın işlenmesi sırasında çok kullanılan bir ajan olmuştur. Selülaz aynı zamanda kâğıt endüstrisinde işlem görmemiş ve geri-dönüştürülmüş olan kâğıtların düzleştirilmesinde de kullanılmaktadır. (Sarkar ve ark. 1995)

Selülaz gıda endüstrisinde tohumların yağlarının çıkartılması işleminde yardımcı olmaktadır.

(Che Man, 1996)

Etanol, yanması sonucunda fosil yakıtlara göre daha düşük CO₂ salınımına sebep olur. Bu nedenle fosil yakıtlar yerine kullanımı istenilen bir durumdur. Selüloz etanole dönüştürülebilen glukozun en önemli kaynağıdır. Biliminsanlarının amacı bu işlemi mümkün olan en ekonomik yolla gerçekleştirebilmektir. Selülozun etanole dönüştürülmesi, selülozdan glukoz üretimi ve mayalar yardımı ile glukozun etanole fermentasyonu adımlarını içerir. İlk aşama odun ve saman fibrillerinden oluşan bir hamur hazırlamaktır. Bunun sonucunda selüloz ulaşılabilir hale gelir. Bu hamura çeşitli selülazlardan oluşan bir karışım eklenir glukozun ortaya çıkması için 4-7 gün beklenir. Bu işleyiş enzimin yüksek maliyeti nedeniyle ekonomik değildir ve enzimatik performans sınırlıdır. (Mansfield, 1999)

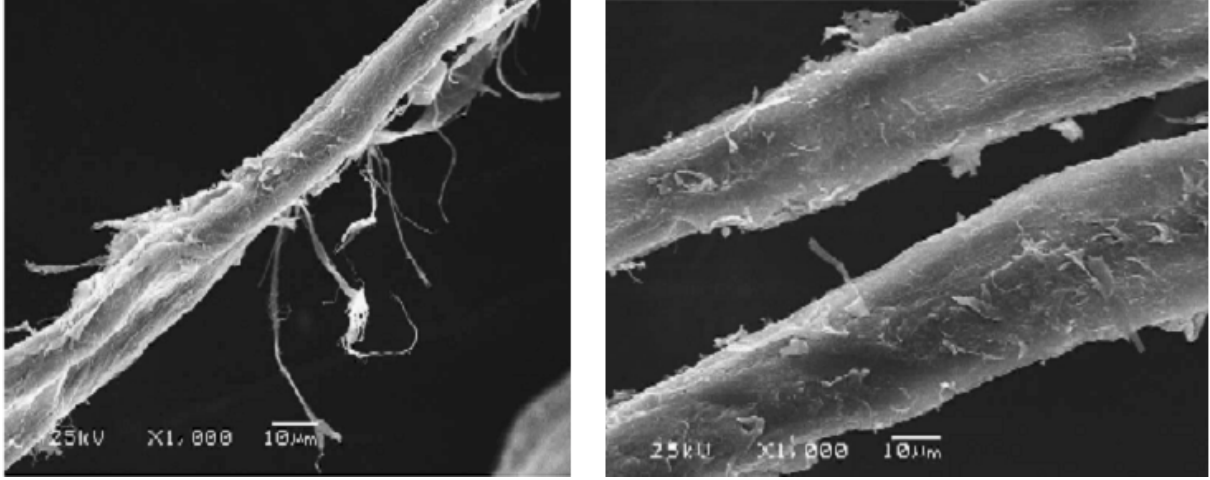
Etkin selülaz üretimi için kullanılan diğer bir yöntem Arabidopsis bitkisinde yüksek konsantrasyonda eksprese olan, termostabil EGaz kullanmaktır. Bu enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklık 81° C'dir. Bununla birlikte bu işlem duyarlı çalışmalarla geliştirilmeye devam etmekte maliyet ve etkinliği dengeli olan yeni metotlar denenmektedir. (Boisset,1999)

Selülazların tekstil endüstrisinde kullanım amaçları kumaşların taşlanması (eskilmesi) işlemidir. 80'lerin sonlarında selülazlar gerçek taşlara bir alternatif olarak kullanılmaya başlandı. Kullanılan ilk selülazlar *Trichoderma* ve *Humicola* türlerinden elde edilen ham enzimlerdi. Bu enzim karışımının kullanılması ipliklerin sağlamlığını azalttığı için sorunluydu. (Cavaco-Paulo,1998).

Tekstil endüstrisinde karşılaşılan bir diğer sorun, pamuk ve pamuk olmayan materyallerin karıştırılması sırasında uygulanan işlemler ve sonrasında yapılan yıkamalarla kumaşlarda oluşan parlaklık kaybı ve eski görünümüdür. Selülazın tekstil endüstrisindeki ana kullanım alanı taşlama (eskime) ve kumaş üzerindeki liflerin uzaklaştırılması işlemleridir. Bu süreçte kumaşlar selülazla birlikte ve mekanik olarak çalkalanır, bu şekilde kumaş üzerindeki lifler uzaklaştırılır. İşlem sonucunda kumaş orijinal parlak görünümüne döner. Selülaz ile yapılan muamele sonunda kumaşın yumuşaklığı azalabilir bu durumda katyonik yumuşatıcılar kullanılır. Protein mühendisliği selülazın ortamda anyonik surfaktans, proteaz, beyazlatıcı madde bulunan yıkama aşamasında kullanılabilmesini ve kumaşın dayanıklılığında en az azalma olmasını amaçlamaktadır. (Hakamada, 2001)

Selülazın selüloza olan fiziksel etkisini görüntülemek ve anlamak için transmisyon elektron mikroskobu ile çalışmalar yapılmıştır. *Humicola insolens*' den elde edilen EG5 ile yapılan

Çalışmalarda iplik yüzeylerinde kaybın ve iplik içindeki hasarın en az olduğu görülmüştür. (Boisset, 1997)



şekil 2.14 Kimyasal madde (solda) ve selülaz (sağda) ile muamele görmüş pamuk ipliği

şekilde kimyasal işlem görmüş pamuk ipliği (solda) ve selülaz ile işlem görmüş pamuk ipliği (sağda) gösterilmiştir.

EGaz'ların gıda endüstrisinde birincil kullanım alanı arpa ve buğday ürünlerinin işlenmesi süreçleridir. Selülaz uygulamaları hayvanların bağırsağında gıdanın viskozitesini azaltarak, vitaminlerin barsaklarda emilimini ve karbohidratların sindirilebilirliğini arttırmaktır. (Cowan, 1996) Meyve suyu üretim sürecinde selülazlar oldukça faydalı olmaktadır. Selülaz aktivitesi meyve püresinin viskozitesini azaltır bu da meyve suyunun geri alımını kolaylaştırır. Polisakkaritlerin şekere dönüşümü, ürünün sıvı hale gelmesini, berraklığını ve lezzetini arttırır. (Grassin, 1993)

Ekmek yapımında selülazlar, hamurun yapısındaki macunumsu kıvamın azaltılması amacıyla kullanılır. Selülazlar bu amaç için kullanıldığında, yüksek aktivitenin hamurun yapısına zarar vermesinin önlenmesi ve ekmeğin kalitesinin düşmemesi için, aktiviteleri yumuşatılmalıdır. *Trichoderma* sellazlarının aktiviteleri oldukça agresiftir bu nedenle ekmek yapımında daha çok *Aspergillus* sellazları kullanılır. (Godfrey, 1996)

Kğit hamuru ve kğit endüstrisinde nişastanın modifikasyonu amacıyla enzimler geniş kullanım alanı bulurlar. Bununla beraber ekonomik ve teknik nedenlerle az sayıda enzimin kullanımı mümkün olmaktadır. Enzimlerin kğit sanayindeki en önemli uygulama alanı ksilanazların kğit hamurunun beyazlatılmasında kullanımıdır. (Viikari, 1994)

Endoglukanazların kğit endüstrisinde iki önemli kullanım alanı vardır; suyun ve mürekkebin

uzaklaştırılması.

Suyun uzaklaştırılması kâğıt üretimindeki en önemli adımlardan biridir. Su basınç, sıcaklık ve vakum yardımı ile yeni üretilmiş olan kâğıt yaprağından uzaklaştırılır. Selüloz güçlü su tutucu özelliğe sahip küçük parçacıkların çözünmesini sağlayarak bu adıma yardımcı olur. (Bhardwaj, 1996)

Mürekkebin uzaklaştırılması kâğıdın geri-dönüştürülmesinde kullanılan bir diğer önemli adımdır. Mürekkebin uzaklaştırılması kâğıdın ıslatılıp hamurlaşmasını takiben kimyasal beyazlatma işlemleri adımlarını içerir. Mürekkebin enzimatik yolla uzaklaştırılması ikinci kez kullanılan kâğıdın kaliteli bir ürüne dönüşmesi için yeni bir yaklaşım getirmektedir. Selülazın tekrar hamurlaştırma işleminde kullanımı ekonomik olarak ve etkinlik bakımından birçok fayda sağlamaktadır. Mürekkebin enzimatik olarak uzaklaştırılması kimyasal uzaklaştırmaya göre yüksek parlaklık, düşük mürekkep kalıntısı gibi üstün fiziksel özellikler sağlamaktadır. Ayrıca mürekkebin enzimatik olarak uzaklaştırılması kimyasal beyazlatma işleminde daha az kimyasal ve surfaktan kullanımına sebep olur. (İlan, 2002)

Son zamanlarda yapılan çalışmalar CBM'ün tek başına kâğıdın özelliklerinin değiştirilmesi amacıyla kâğıt endüstrisinde kullanılabileceğini göstermiştir. *C. cellulovorans*' dan elde edilen aile III CBM'ün iki tanesinin birleştirilmesi ve kâğıt üzerinde kullanılması gerilme gücünde artış ve parlaklık gibi mekanik özelliklerde artışa sebep olmuştur. CBM'ün tek başına kullanımı da bazı mekanik özelliklerin artışına sebep olmuştur ancak bu özellikler iki CBM'nin füzyonunda olduğundan daha düşük düzeyde olmuştur. Ayrıca CBM'nin kâğıtla olan muamelesi kâğıda daha hidrofobik ve suyu uzaklaştırıcı özellik kazandırmıştır. (Levy, 2002)

Pseudomonas fluorescense'den elde edilen aile II CBM ile yapılan bir diğer çalışmada, CBM'nin kâğıdın hiçbir mekanik özelliğine etki etmediği gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, EGaz, selobiyohidrolaz ve onların çekirdek proteinlerinin kâğıt hamurunun beyazlatılması işlemine olan etkileri ile ilgilidir. CBM varlığının EGaz aktivitesine olan etkisinin kâğıt hamurunun özelliklerini olumlu yönde arttırdığı gösterilmiştir. (David, 1998) (Suurnakki, 2000)

Selülazın yüksek spesifikliği, toksisitesinin olmaması, biyobozunur olması ve optimum pH, sıcaklık, basınç gibi özelliklerinin ılımlı aralıklarda olması selülazın inorganik katalizörlere göre daha avantajlı olmasını sağlamaktadır. (Taylor, 1991)

Tüm avantajlarının tersine enzimlerin endüstriyel uygulamaları bazı nedenlerle

sınırlanmaktadır.

- (1) Birçok enzim çok düşük stabiliteye sahiptir
- (2) Enzimin izolasyon ve saflaştırma işlemleri çok maliyetlidir.
- (3) Katalitik reaksiyon sonunda enzimi reaksiyon karışımı içinden alarak tekrar kullanmak yüksek maliyet getirir.

Tüm bu problemleri aşmak için enzim immobilizasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Immobilizasyon işlemi için kullanılacak yöntemin iyi belirlenmesi gereklidir. Heterojen reaksiyon sistemlerinde, substrat ile enzim arasındaki zayıf etkileşim kadar, immobilize enzimin reaksiyona girmemiş substrattan ayrılması da önemli sorunlara neden olabilir. Bu nedenle kullanılan enzimin substratı makromoleküler ya da çözünmeyen özellikte olacak ise enzimin katı yüzey yerine çözülebilir matriks ile immobilizasyonu daha uygundur. (Fujimura,1987).

2.12 Enzim Stabilizasyonu:

Enzim ve proteinlerin stabilizasyonu biyoteknolojik uygulamalarda büyük bir öneme sahiptir. Uygulama ve depolama sırasındaki stabilizasyon özellikleri enzim yapılı ürünlerin kullanılabilirliğini etkilemektedir. Depolamadaki stabilite ya da diğer adıyla raf ömrü, enzimin üretimi ile kullanımı arasındaki sürede katalitik özelliğini ne kadar koruduğu anlamına gelmektedir. Operasyonel stabilite ise kullanım koşullarına bağlı olarak uygulama sırasında katalitik özelliklerini ne kadar koruduğunu ifade eder. Genel uygulama şeması uygulama sırasında, enzimin performansını ve inaktivasyon koşullarını tanımlar. Kimyasal modifikasyon stabilizatör katkı maddelerinin eklenmesi ile sağlanır. Termofilik ve ekstremofilik proteinlerin anlaşılması ve karakterizasyonu protein stabilizasyonun sağlanmasında önemli bilgilerin elde edilmesini sağlamıştır. Proteinlerin stabilizasyonunun sağlanması amacıyla protein mühendisliği ve kimyasal modifikasyon tekniklerinden yararlanılır. Örneğin immobilizasyon işlemi önemli oranda protein stabilizasyonu sağlamaktadır.

Yüksek basınç altında, yüksek veya düşük sıcaklıkta fizyolojik pH dışında pH değerine sahip ortamlarda, yüksek tuz konsantrasyonunda sonuç olarak normal dışı koşullarda yaşayan organizmalar ve bulundurdıkları proteinlerin bu koşullarda stabil olması insanların dikkatini çekmiştir. Özellikle termofilik proteinler, bu proteinlerde katlanma ve buna dayalı fizikokimyasal özellikler, stabilite ve yüksek sıcaklıkta çalışan enzimleri tasarlamada önemli

olmuştur. Yüksek sıcaklıkta çalışan enzimler deterjan, gıda v.b, endüstrinin çeşitli alanlarında çok yararlı olmaktadır. Termofilik enzimlerin mezofilik homologlarına göre proteolize daha dayanıklı olduğu da belirlenmiştir (Kamalakkannan, 2004) (Roy, 2005) (Balabuchevich, 2004).

Suda çözünen globular proteinler sıkıca paketlenmiş gibi bir yapı göstermektedirler ve bunların iç kısmı çoğunlukla katıya benzer bir hal almıştır. Proteinlerde sıkıştırılmış gibi bir yapı bulunması stabilite açısından önemlidir. Bu nedenle, doğal olarak amino asid dizilimi ile protein üç boyutlu yapısı arasındaki bağlantı önem taşımaktadır. Genetik mühendisliği tekniklerinden faydalanarak amino asid dizisi değiştirilmiş, dolayısıyla fizikokimyasal özellikleri farklı modifiye enzimler elde edilmektedir (Kamalakkannan, 2004) (Roy, 2005) (Balabuchevich, 2004) (Collen, 2001) (Hakamada, 2001) (Vogt, 1997)

Ufak moleküllü kimyasal maddeler veya suda çözünen polimerler kullanılarak yapılan kimyasal modifikasyon işlemleri ile özellikleri değiştirilmiş enzimler elde edilebilmektedir (Fuentes, 2004) (Abian, 2002). Bu şekilde üretilen optimum sıcaklığı ve pH aralığı farklı, ortamda bulunan kimyasal maddelere dirençli enzimler çeşitli uygulamalar için yararlı olmaktadır. Enzimlerin immobilizasyonu da genel olarak stabilitelerinde artma sağlamaktadır. Doğal ve sentetik makromoleküllerin antijenler, antikolar, ilaç aktif maddeleri ve enzimler ile oluşturduğu konjugatlar tıpta ve biyoteknolojinin çeşitli dallarında kapsamlı uygulama alanları bulmaktadır (Mustafaev, 1996) (Mustafaev, 1998) (Mustafaev, 1996) (Salman, 2001) (Karşıl原因, 1997)

Endüstriyel enzimlerin stabilitesinin korunması biyoteknolojik uygulamalarda kritik bir öneme sahiptir. Protein mühendisliği, immobilizasyon teknikleri, stabilatör maddelerin eklenmesi ya da kimyasal modifikasyon endüstriyel uygulamalarda pek çok avantaj sağlar. (Brannigan, 2002)

Endüstriyel uygulama sırasında enzimin inaktivasyonuna sebep olan birçok faktör vardır. Çift fazlı sistemlerde suda çözünebilir özellikteki enzim ile organik çözücü yüzeyi arasındaki etkileşim ya da karıştırılabilir sistemlerde gaz kabarcıkları ile enzim yüzeyi arasındaki etkileşim çok önemli olabilir. Bu ara yüzeyler proteindeki elektrostatik, hidrofobik ya da H-bağı etkileşimlerini bozarak enzimin geri-dönüşsüz denaturasyonuna sebep olabilir. (Wu, 1993) Ara yüzeyden kaynaklanan inaktivasyon poröz yapılara immobilizasyon yöntemi ile çözülebilir. Ancak bu yöntem bazı durumlar için uygun olmayabilir. Bu durumda çözünebilir enzimin inaktivasyona karşı stabilitesini sağlayan yeni araçların geliştirilmesi gerekir. Enzim yüzeyinin hidrofobik yüzey ile etkileşimini kesen hidrofobik bir polimer ile kaplanması iyi bir

stratejidir. Modifikasyon sonrasında polimer enzimin küçük moleküllü substrat ile etkileşimini kesmemeli ve enzimin hidrofobik yüzey ile etkileşimine engel oluşturmamalıdır. Buna ek olarak seçilen polimer enzim yüzeyi ile reaksiyona girebilecek gruplar içermelidir.

Dekstran aldehit tüm bu gereksinimleri karşılayabilen esnek bir polimerdir ve multimerik enzimlerin çapraz bağlı immobilizasyonunda kullanılabilir. (Hidalgo, 2003) Bu enzimlere hidrofilik bir çevre sağlar, kullanılan destek materyali ile makromolekül arasındaki etkileşimi azaltır.

2.12.1 Protein Mühendisliği:

Protein mühendisliğinin kullandığı yöntemlerden bazıları; yönlendirilmiş değişim, polipeptid zincirinin uzatılması ile stabilizasyonun artırılması, site-spesifik mutajenez ve antikor ile türevlendirmedir.

2.12.2 Kimyasal Modifikasyon:

Polipeptid zincirinin R-gruplarının kimyasal modifikasyonu son yıllardaki genetik stratejilere rağmen yaygın olarak kullanılmaktadır. Kimyasal ve genetik teknikler birbirinin tamamlayıcısı olabilir. Genetik olarak ısıya dayanıklılığı artırılmış olan bir enzim kimyasal modifikasyonlarla ısıya karşı daha da dayanıklı hale getirilebilir. (Lehmann,2000)

2.12.3 Çapraz Bağlı Enzim Kristalleri:

Yapay çapraz bağlar polipeptid zinciri içinde (intramoleküler) oluşturulabilir. Molekül içi çapraz bağlar şiddetli koşullarda proteinin açılmasını ve üç boyutlu yapının bozulmasını önleyerek proteinin dayanıklılığını sağlar. Aynı zamanda iki polipeptid zincirini de çapraz bağlayıcılarla bağlamak mümkündür. İki enzim kristali bifonksiyonel çapraz bağlayıcı reaktif glutaraldehit ile bağlanabilir. Bu şekilde bağlanmış olan enzim kristalleri (CLEC's crosslinked enzyme crystals) hiçbir işlem görmemiş enzim ile kıyaslandığında depo ve uygulama koşullarında önemli miktarda dayanıklılığın artmasını sağlarlar. Enzim, dayanıklı partiküler yapıda olduğu için reaksiyon karışımından tekrar kullanılmak üzere kolayca ayrılabilir. Çapraz bağlı kristaller difüzyon ile substrat ve reaksiyon ürününden kolayca ayrılabilir. Bu yöntemle dayanıklılığı artırılmış enzimlere örnek olarak lipaz, penisilin akrilaz, subtilisin ve termolizin verilebilir. (Govardhan, 1999)

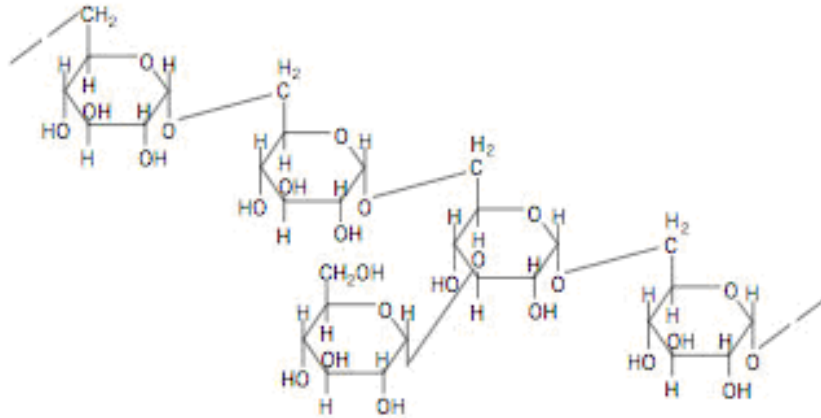
2.12.4 Polimere Kovalent Olarak Bağlama:

Çapraz bağlamaya alternatif olabilecek bir diğer uygulama ise proteinin suda çözünür özellikteki polimere birden fazla noktadan bağlanmasıdır. Bieniarz ve arkadaşları protein

stabilizasyonu için bir protokol geliştirmişlerdir. (Bieniarz, 1998) Metod (SPO_3^{2-}) yan zinciri içeren polifosfotioat polimeri kullanımını gerektirir. Alkalın fosfataz (ALP) polimer ile kimyasal olarak türevlendirilmiş protein arasındaki çapraz bağ oluşumunu sağlar. İlk olarak istenilen protein heterobifonksiyonel suksinimid-maleimid ile muamele edilir. Suksinimid protein yüzeyindeki serbest amino grupları ile reaksiyona girer. Bu bağlanma sonunda protein serbest maleimid grubuna sahip olur. Maleimid grubu tiolat ile reaksiyona girme özelliğine sahiptir. Lineer polifosfotioat polimeri çok sayıda (SPO_3^{2-}) grubuna sahiptir. Hedef protein, ALP ve polimer bir arada kullanılır. ALP fosfotioat grubundaki ortofosfatı uzaklaştırarak polimer iskeleti üzerinde reaktif tiyol grupları oluşmasını sağlar. Yeni oluşan bu tiol grupları modifiye edilmiş protein yüzeyindeki maleimid grupları reaksiyona girerek polimer ile hedef protein arasında birçok noktadan bağlanmayı sağlar.

2.13 Dekstran:

Dekstran fraksiyonları ortalama molekül ağırlığı ve molekül ağırlığı dağılımı ile karakterize edilir. Dekstran farmakoloji, gıda endüstrisi, tarım gibi pek çok alanda kullanılmaktadır.



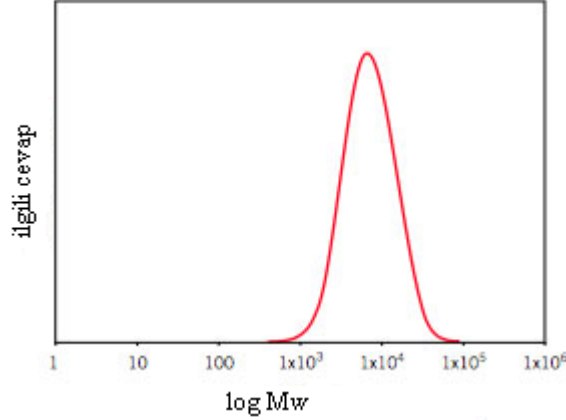
Şekil 2.15 Dekstran molekülünün yapısı

Dekstran aşağıda sayılan özellikleri nedeniyle pek çok kullanım alanı bulmuştur

- (1) Dekstran doğal ve su da çözünebilirdir.
- (2) Kolayca filtre edilebilir
- (3) Biyouyumludur
- (4) Biyolojik olarak parçalanabilir (biodegradable)
- (5) 5 yıldan daha uzun süre stabilitesini korur

2.13.1 Dekstranın Fiziksel Özellikleri:

Dekstran fraksiyonlarının moleküler ağırlıkları 1 000- 2 000 000 Da arasında değişebilir. Molekül ağırlığı pek çok uygulama için anahtar role sahiptir. Molekül ağırlığı ile tanımlanan molekül ağırlığı ortalaması (M_w) ve ortalama molekül ağırlığındaki moleküllerin sayısıdır (M_n). Aşağıdaki şekilde Dekstran 10'un molekül ağırlığı dağılımı verilmiştir.



Şekil 2.16 Dekstran 10'a ait molekül ağırlığı dağılımı

Dekstrana verilen numaralar dekstranın molekül ağırlığını belirtmek amacıyla kullanılmaktadır. Örneğin dekstran 10'un molekül ağırlığı $10 \times 1000 = 10\,000$ Dalton'dur.

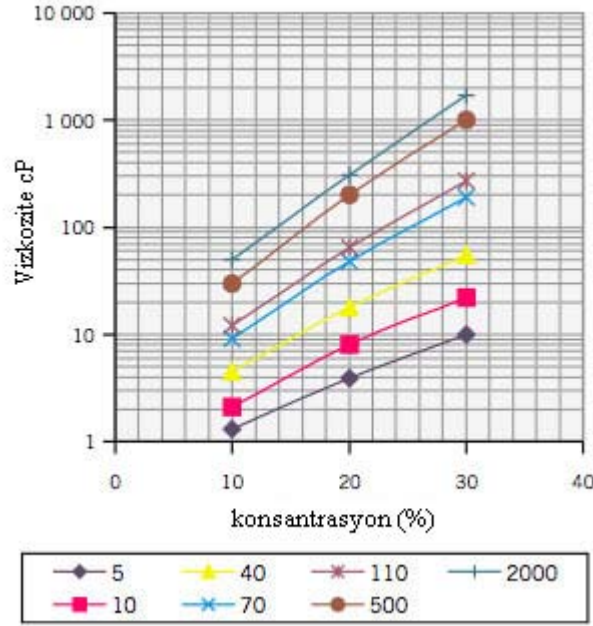
Dekstran esnek ve genişleyebilir bir polimerdir ve çözeltide şişerek yumak şeklini alır.

Dekstran su ve elektrolit çözeltilerinde stabil olarak çözünebilir. pH çözünürlük üzerine etki etmez. Dekstran aynı zamanda gliserol, etilen glikol, formamid, metil sülfid gibi diğer çözügenlerde de çözünme özelliğine sahiptir. Dekstran metanol, etanol gibi monohidrik alkollerde ve aseton, 2-propanon gibi pek çok ketonda çözünmez.

Dekstranın berrak çözeltiler oluşturmaya rağmen, yüksek konsantrasyonda 5-10 gibi düşük molekül ağırlıklı dekstranların bulanık çözeltiler oluşturduğu da rapor edilmiştir.

Dekstran kolayca filtre edilebilir. Konsantre dekstran çözeltileri daha büyük filtre ya da filtre serileri kullanımını gerektirebilir. Filtrasyon işlemi sırasında yüksek basınç kullanılması da filtrasyon hızını artırır. Filtrasyon hızını artırmak için sıcaklık da artırılabilir. Kullanılacak filtrenin seçimi dekstran çözeltisinin hacmine ve konsantrasyonuna göre farklıdır.

Dekstran çözeltileri Newtonian akış karakteristiği gösterir buna göre akış hızı makaslama gerilmesinden bağımsızdır.



Şekil 2.17 Dekstranın konsantrasyona bağlı vizkozite değişim grafiği

Dekstranın doğal bir polisakkarit olması nedeniyle vizkozitesi, pH ya da tuz konsantrasyonundan etkilenmez.

Dekstranın pek çok kullanım alanında kolloid osmotik basınç büyük bir öneme sahiptir. Molekülün etkileşimde olduğu membranı geçebilmesi osmotik basıncına bağlıdır. Aynı konsantrasyondaki iki çözünen maddenin osmotik basınçları büyük oranda molekül ağırlıklarına bağlıdır. Dekstran büyük boyutlu doğal bir polimer olduğu için tuz gibi dokulardan kolayca difüzlenebilen maddelerin tersine pek çok insan dokusundan geçemez ve uygun osmatik çevreyi sürdürür.

Dekstran kuru olarak depolandığında 5 yıldan daha uzun süre stabilitesini korur. Dekstran hava ile temas ettiğinde yavaşça nemçeker. Dekstran çözeltileri otoklavlanabilir. Bu çözeltiler uzun yıllar sabit sıcaklıkta saklanabilirler. Depolama için çözeltinin optimal pH'sı 6-7 olmalıdır.

2.13.2 Dekstranın Biyo-uyumluluğu:

Dekstranın 50 yılı aşkın süredir klinik kullanımda olması onun güvenliğini ve kalitesini kanıtlamıştır. Dekstranın ağız dışı yollarla (damar içi uygulamalar gibi) uygulandığı pek çok güvenlik çalışmasında dekstranın 40 000- 70 000 molekül ağırlıklı formları kullanılmıştır. İntravenöz yolla alınan dekstran 70'in ölümcül dozu farelerde 55g/kg vücut ağırlığı, insanlarda 18g/kg vücut ağırlığı, köpeklerde 10g/kg vücut ağırlığı olarak bulunmuştur.

Dekstran ağız yoluyla da alınabilir ve tolere edilebilir. Dekstranın ağız yoluyla alınmasını takiben kan şekeri ve karaciğer glikojeni artmış ve dekstran kolayca sindirilebilmiştir. Dekstranın tıpta pek çok kullanım alanı mevcuttur. Dekstran içeren çözeltiler oftalmik uygulamalarda, intrauterin muayenelerde, krem ve merhem yapımında kullanılmaktadır. Tüm bu uygulamalar dekstranın biyo-uyumluluğunu destekleyen kanıtlardır. *Verticillium* *Penicillium*'dan elde edilen dekstranaz dekstranı parçalama özelliğine sahiptir. Bu enzim reaksiyonu sonunda ortaya çıkan ürünler glukoz ve izomaltos gibi düşük molekül ağırlıklı şekerlerdir. *Lactobacillus*, *Cellvibrio*, *Cytophaga*, ve *Bacillus* gibi bakteriler ekstraselüler olarak dekstranaz üretirler ve dekstranı parçalayabilirler. Bu nedenle dekstran biyobozunurdur ve doğal çevre tarafından tamamen absorblanır.

2.13.3 Dekstranın Kullanım Alanları:

Dekstran 40-60-70 çözeltileri aşağıdaki amaçlarla klinik uygulama alanı bulmaktadırlar.

- (1) Kan kaybı durumunda kan yerine kullanılır
- (2) Plazma yerine kullanılırlar
- (3) Pıhtılaşmanın önlenmesi amacıyla
- (4) Hacim arttırma
- (5) Akışın düzenlenmesi

Dekstran glukoz birimlerinden oluşan kolay çözünebilir, biyobozunur ve biyouyumlu bir polimerdir. Bu özellikleri nedeniyle 1 000-2 000 000 arasında değişen molekül ağırlığında ve yüksek saflıkta olan dekstran geniş çaplı biyoteknolojik ve teknik uygulamalarda arabulucu (linker) reaktif olarak görev almaktadır. Yüksek saflıktaki bu dekstran T-dekstran adını alır. T-dekstran fotoğraf endüstrisinde fotoğrafın gümüş emülsiyon kalitesini arttırması amacıyla kullanılır.

Dekstran demir-dekstran sentezinde önemli bir başlangıç molekülüdür. Demir-dekstran hayvan ve insanlarda demir eksikliğinden kaynaklanan anemilerin tedvai edilmesinde kullanılır.

DEAE dekstran (dietilaminoetil dekstran), dietilaminoetil klorür ile dekstrandan sentezlenir. Dekstran 500'den hazırlanan DEAE dekstran polikasyonunun serum kolesterol ve trigliserid değerini düşürdüğü gösterilmiştir. Sentezlenen dekstran türevinin kalitesi ve yeniden üretilebilirliği, sentezlendiği dekstranın saflığına ve kalitesine bağlıdır.

Dekstran sülfat, (dekstran hidrojen sülfat Na tuzu) polianyonik dekstran türevidir. Yüksek

kalitede ve iyi karakterize edilmiş çeşitli dekstranlardan sentezlenir. Dekstran sülfat klinikte heparin gibi antikoagülant amaçlı olarak kullanılabilir. Dekstran sülfatın diğer bir etkisi bazı biyolojik sistemlerde enzim inhibisyonuna sebep olmasıdır [1]

3. MATERYALLER:

3.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler:

Kaba terazi	: Precise BJ 6100D
Hassas terazi	: Precise XB 220A
Manyetik karıştırıcı	: Heidolph MR 3001
Vorteks	: Heidolph Type REAX top
Su banyosu	: GFL 1086
Liyofilizatör	: Telstar Cryodos
Saf su cihazı	: Millipore F4SN77678
pH metre cihazı	: Inolab
HPLC sistemi	: Shimadzu Program Class VP.
GPC sistemi	: Viscotek 4 detektörlü SEC-HPLC-GPC
Protein ayrıştırma cihazı	: Model 2110 fraction collector
U.V. Visible Spektrofotometre	: Model V-530 JASCO Program
Kullanılan malzemeler	:
• Otomatik pipet	: Finn timer 0-50 µl, 100-1000 µl
• Beher	: 50ml, 100 ml, 500 ml, 1 L
• Penisilin şişeleri	

3.2 Kullanılan HPLC Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri:

Kolon	: Silika jel kolon (LC column Shim Pack Diol-300)
Boyut	: 7,9mm x 50cm
Akış hızı	: 1 ml/dak
Dedektör	: UV-VIS detektör (SPD-10AV)
Mobil faz	: PBS; pH= 7,0; %0,05 NaN ₃
Akış hızı	: 1ml / dakika

Kolon sıcaklığı	: 25 °C
Dalga boyu	: 280 nm

3.3 Kullanılan Viscotek Marka GPC Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri:

Viscotek cihazı dolgulu kolon kullanan bir kolon sıvı kromatografisidir. Viscotek cihazında sıvı hareketli faz yüksek basınçta ufak tanecikli hareketli faz üzerinde hareket ettirilmektedir. Bu tekniğe yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) adı verilmektedir.

Viscotek cihazı üç bölümden oluşur:

1. Numune hazırlama ve pompa bölümü

Viscotek GPCmax VE2001 GPC SOLVENT / SAMPLE MODULE

2. Kolon ve dedektör kısmı

Viscotek TDA 302 Triple Detector Array

3. Bilgisayar kısmı

Yazılım adı: Omnisec 3.1 programı.

Viscotek cihazında poröz tipli kolon dolgu maddesi kullanılmaktadır. Poröz kolonlar içindeki dolgu maddesinin taneciklerinin çapı 3-10 µm arasında değişmektedir.

Kolon 1 : TOSOH G 5000 PWXL

Polimer dolgulu kolon

Akış hızı : 0,8ml/dak

Boyut : 7,8mm x 30 cm

Kolon 2 : Shim-Pack Diol 300

Silika dolgulu kolon

Akış hızı : 1ml/dak

Boyut : 7,9mm x 50 cm

Kolon 3 : TOSOH G 3000 SWXL

Silikon dolgulu kolon

Akış hızı : 0,8ml/dak

Boyut : 7,8 mm x 30cm

Mobil faz : PBS; pH= 7,0; %0,05 NaN₃

Kolon sıcaklığı	: 25 °C
Dalga boyu	: 280 nm

3.4 Kullanılan UV-Vis Spektrofotometresinin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri:

Optical System	: Single monochromator
Detektör	: Silikon fotodiod (S1337)
Işık kaynağı	: Deuterium lamp : 190 to 350 nm Halogen lamp : 390 to 1100 nm

3.5 Kullanılan Protein Ayırıştırma Cihazının Teçhizat ve Çalışma Parametreleri:

U.V. monitör	: Biorad Econo (model EM-1)
Fraksiyon toplayıcı	: Biorad model 2110 fraction collector
Kayıt edici	: Biorad chart recorder model 1327
Pompa	: Biorad Econo pump (model EP-1)

3.6 Kullanılan Kimyasal Maddeler:

Çizelge 3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Maddeler	Üretici Firma	Lot No.
Cellulase from Aspergillus niger	Fluka	22178
CMC	Fluka	21902
DNS	Fluka	42260
K-Na Tartarat	Fluka	60413
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Riedel-de Haen	04269
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Fluka	71647
NaCl	Riedel-de Haen	13423
Citric acid monohydrate	Riedel-deHaen	22102
Dextran Mw=75.000	Pharmacia Fine Chemilab.	
Sephadex G50	Fluka	84946
Acetic acid solution	Fluka	45754
Phenol	Merck	822296
Sodium metabisulfite	Fluka	71928
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fluka	96528
D-(+)-Glukoz	Sigma	G7528-250G
NaOH	Riedel-de Haen	06203
NaIO_4	Fluka	71862
KBr	Fluka	60089
NaBH_4	Merck	S3912873 403
Dialysis Tubing Cellulose Membrane	Sigma	D9777-BULK

4. DENEYSEL ÇALIŞMA

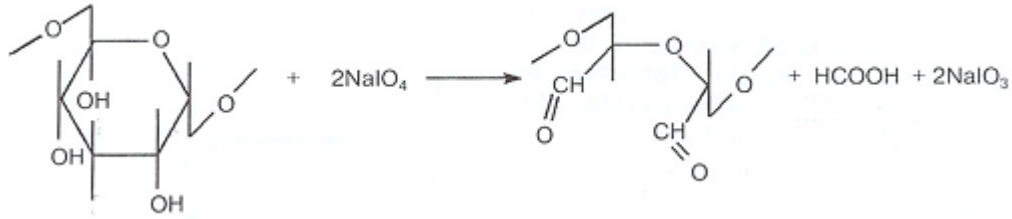
4.1 Dekstranın Aldehit Türevinin Eldesi

Kullanılan Çözeltiler

- 1) 3,33g Dekstran 30ml destile suda çözüldü.
- 2) 8 g NaIO_4 70ml destile suda çözüldü.

Deneyin Yapılışı

- 1) Dekstran çözeltisinin üzerine NaIO_4 yavaş yavaş karıştırılarak eklendi.
- 2) Bu çözelti karanlıkta, oda sıcaklığında 24 saat süreyle karıştırıldı.
- 3) Elde edilen yükseltgenmiş dekstran ile birlikte ortamda bulunan fazla iyonları uzaklaştırmak için ürün 24 saat karanlık ortamda, oda sıcaklığında destile suya karşı diyalize bırakıldı.
- 4) Soğutarak kurutma ile (liyofilizatörde) aldehid grupları bulunduran dekstran elde edildi (Sacco, D., 1988, Betancor, L., 2004, Dobrenchenko, S., 1993).



Şekil 4.1 Dekstranın aldehitlenme reaksiyonu

4.2 Dekstranın FTIR Spekturumlarının Alınması:

Örneklerin her biri için madde miktarı %1 olacak şekilde saf KBr ile karıştırılıp preste 10 ton basınç altında tablet haline getirilir. Aletin havaya karşı baseline'ı alındı. Daha sonra hazırlanan tablet alete yerleştirilerek örneğin spektrumu alındı.

4.3 Enzim (Selülaz) Aktivitesi Tayini:

Kullanılan Çözeltiler

- A) Sitrat tamponu 0,05M, pH 5
- B) Enzim çözeltisi: sitrat tamponunda (pH 5), 1 ml'de 2mg protein ($A_{280/1,34}$) olacak şekilde hazırlandı.

C) Sitrat tamponunda (pH 5), %2'lik CMC (carboxymethyle cellulose) olacak şekilde hazırlandı.

D) DNS renk reaktifi çözeltisi:

10,6g 3,5-Dinitrosalisilik asid ile 19,8g NaOH 1416ml destile suda karıştırılarak çözüldü ve üzerine 306g Na-K tartarat, 50°C de eritilen 7,6ml Fenol, 8,3g Na metabisülfite eklendi.

E) Konsantrasyonu 2mg/ml olan glukoz standart çözeltisi hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

I. Deney 50ml'lik erlenlerde yapıldı.	BLANK	TEST
1. Sitrat tamponu (50°C'deki su banyosunda beklemekte olan)	9ml	9ml
2. CMC çözeltisi eklendi.	0,5ml	0,5ml
3. Selüloz enzimi çözeltisi eklendi ve karıştırılarak 50°C su banyosunda 30 dakika bekletildi.	0,5ml	----
4. 30 dakika süre sonunda selüloz enzim çözeltisinden blank'e de eklendi	----	0,5ml
5. 50 ml'lik şilifli kapaklı erlenlere bu çözeltilerden 2ml alınıp üzerine DNS çözeltisi eklendi. Her iki erlen kapakları kapatılmış halde 100°C'da kaynamakta olan su banyosunda 15 dakika bekletildi. Bu süre sonunda her iki erlen buzlu su bulunduran ortama alınarak hızla soğutuldu.	3ml	3ml
6. UV-Vis spektrofotometrede test çözeltisinin 540nm'deki absorbansı blank'e karşı okundu.		

II. Aktivite tayini için glukoz çözeltisi ile standart eğrinin hazırlanması.

1. 50 ml'lik şilifli kapaklı erlenlere aşağıdaki tabloda verilen glukoz çözeltileri ve blank alındı.

Çizelge 4.1 Glukoz Standartlarının Hazırlanması

	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4
Glukoz çözeltisi	0,05 ml	0,06 ml	0,07 ml	0,08 ml
Destile su	1,95 ml	1,94 ml	1,93 ml	1,92 ml
DNS	3ml	3ml	3ml	3ml

	Std 5	Std 6	Std 7	Std 8
Glukoz çözeltisi	0,09 ml	0,1 ml	0,11 ml	0,12 ml
Destile su	1,91 ml	1,90 ml	1,89 ml	1,88 ml
DNS	3ml	3ml	3ml	3ml

	Std 9	Std 10	Std 11	Blank
Glukoz çözeltisi	0,13 ml	0,14 ml	0,15 ml	----
Destile su	1,87 ml	1,86 ml	1,85 ml	2ml
DNS	3ml	3ml	3ml	3ml

2. Kapakları kapatılmış halde, erlenler 100⁰C’da kaynamakta olan su banyosunda 15 dakika bekletildi. Bu süre sonunda erlenler buzlu su bulunduran ortama alınarak hızla soğutuldu.

3. UV-Vis spektrofotometrede standart çözeltilerinin 540nm’deki absorbansı blank’e karşı okundu (Ghose, T., K., 1987).

Hesaplamalar

Glukoz çözeltisi:

Konsantrasyonu 2mg/ml olacak şekilde hazırlanan 10ml stok glukoz çözeltisinden çıkılarak;

Std 1.

1ml'de	2 mg glukoz
0,05 ml'de	y

$$Y = 0,1 \text{ mg}/5\text{ml} = 0.02 \text{ mg/ml glukoz}$$

Std 2. $y=0,024 \text{ mg/ml glukoz}$

Std 3. $y=0,028 \text{ mg/ml glukoz}$

Std 4. $y=0,032 \text{ mg/ml glukoz}$

Std 5. $y=0,036 \text{ mg/ml glukoz}$

Std 6. $y=0,040 \text{ mg/ml glukoz}$

Std 7. $y=0,044 \text{ mg/ml glukoz}$

Std 8. $y=0,048 \text{ mg/ml glukoz}$

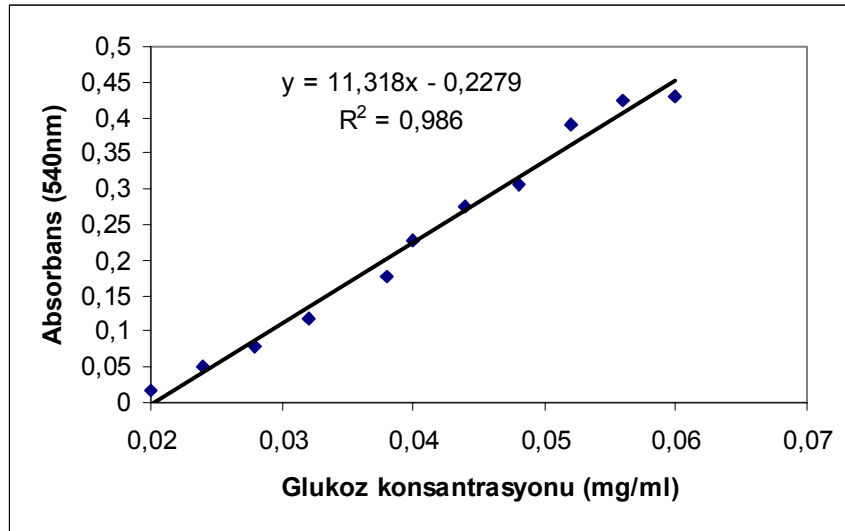
Std 9. $y=0,052 \text{ mg/ml glukoz}$

Std10. $y=0,056 \text{ mg/ml glukoz}$

Std11. $y=0,060 \text{ mg/ml glukoz}$

Çizelge 4.2 Glukoz Standartları

STANDARTLAR (glukoz)	ABSORBANS (540 nm)
Std 1. (0,02 mg/ml)	0,01760
Std 2. (0,024 mg/ml)	0,04981
Std 3. (0,028 mg/ml)	0,07902
Std 4. (0,032 mg/ml)	0,11922
Std 5. (0,036 mg/ml)	0,17644
Std 6. (0,040 mg/ml)	0,22635
Std 7. (0,044mg/ml)	0,27575
Std 8. (0,048 mg/ml)	0,30533
Std 9. (0,052 mg/ml)	0,39069
Std10.(0,056 mg/ml)	0,42421
Std11.(0,060 mg/ml)	0,43082



Şekil 4.2 DNS metodu ile glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen kalibrasyon grafiği

$$Y = 11,318 X - 0,2279$$

$$R^2 = 0,986$$

Selüloz enziminin katalizi ile CMC'den glukoz oluşmasını sağlayan reaksiyon 50°C'da, 10 ml sitrat tamponu (pH 5) çözeltisinde gerçekleştirildi. Bu 10 ml çözeltiden alınan 2 ml örnek üzerine 3 ml DNS çözeltisi eklendi ve böylece renk reaksiyonu 5 ml hacimde gerçekleştirilmiş oldu. Bu işlemten sonra, satın alınan (herhangi saflaştırma işlemi görmemiş) enzim kullanılarak yapılan denemede 540 nm'de absorbans değeri 0,2619 olarak okundu.

DNS renk reaktifi ile glukozun reaksiyonundan sonra 540 nm'de okunan absorbans değeri ile glukoz konsantrasyonu (mg/ml) arasında çizilen kalibrasyon eğrisinin denklemi:

$$Y = 4,5184 X - 0,225$$

$m_{\text{glukoz (mg)}} = (A_{540} + 0,2279)/11,318$ formülünden, oluşan glukozun konsantrasyonu 0.04mg/ml olarak bulundu.

5 ml olan renk reaksiyonu çözeltisindeki glukoz konsantrasyonu = $0,04 \times 5/2 = 0,1 \text{ mg/ml}$

10 ml toplam hacimdeki glukoz miktarı = $0,1 \text{ mg/ml} \times 10 \text{ ml} = 1 \text{ mg}$

1 U, 1 daikada CMC'den 1 μmol glukoz açığa çıkaran enzim miktarı. (U/mg enzim)

$$1U = [\text{-----} \times 1000] / \text{mg protein}$$

$$180,2 \times 30$$

$$[1 \text{ mg} \times 1000]$$

$$U = \text{-----} / 0,25 \text{ mg protein}$$

$$180,2 \times 30$$

Yukarıdaki eşitlikten satın alınan enzimin aktivitesi 0,74 U olarak bulundu.

Glukoz $M_w=180.2 \text{ Da}$

1000 : mmol'ü μmol 'e çevirmek için kullanılan değer

30 : Reaksiyon süresi (30 dak)

4.4 Saflaştırma İşlemleri:

Satın alınan selüloz enziminin (Fluka 22178) %28 protein içerdiği belirlendi ($A_{280} / 1,34$). Bu enzim örneğinin Viscotek cihazında alınan kromatogramları da değerlendirilerek, dekstran - selüloz konjugatlarını elde etmek için yapılacak çalışmada kullanmak üzere, daha saf enzim örneği kullanmanın yararlı olacağına karar verildi. Jel filtrasyon işlemleri uygulandı.

Jel Filtrasyon ile (Sephadex G-50) Saflaştırma

2 g enzim tartılarak 5ml PBS’de (pH 7,3) çözüldü. Örnek tamponla yıkanarak kolona verildi. PBS tamponu kullanılarak her bir tüpte 30 damla olacak şekilde fraksiyonlar toplandı.

Bu maksatla Bio –Rad marka protein saflaştırma sistemi 5cm x 30cm kolon ile kullanılarak jel filtrasyon işlemi uygulandı. Akma hızı 0,35 ml/dakika olacak şekilde ayarlandı. Kolon dolgu maddesi olarak sephadex G-50 kullanıldı. Eluasyon işlemi UV monitör vasıtasıyla izlendi. Alınan fraksiyonların 280 nm’de okunan absorbans değerlerinden yararlanarak protein konsantrasyonları ($A_{280} / 1,34$) ve aktiviteleri tayin edildi.

PBS ile alınan fraksiyonlardan havuzlar oluşturup aktiviteleri hesaplandı. Havuz 1’de aktivite olmadığı görüldü. Konjugasyon işleminin Havuz 2 ile yapılmasına karar verildi.

4.5 Enzim-Polimer Konjugatlarının Sentezi:

Aldehid grupları bulunduran dekstran ile konjugat oluşturmak üzere enzim/polimer mol oranı 1, 1/5, 1/10, 5 ve 10 olarak alındı. Bu işlem için gerekli enzim miktarı aşağıdaki gibi hesaplandı.

$$\frac{n_{\text{protein}}}{\text{-----}} = \frac{C_{\text{prot}} \cdot M_{\text{A pol}}}{\text{-----}}$$

$$n_{\text{polimer}} \quad C_{\text{pol}} \cdot M_{\text{A prot}}$$

$$C_{\text{prot}} = 2 \text{ mg/ml}$$

$$M_{\text{A pol}} = 75.000$$

$$M_{\text{A prot}} = 31.000$$

$$\frac{n_{\text{protein}}}{\text{-----}} = \frac{2 \text{ mg/ml} \cdot 75.000}{\text{-----}} = 1$$

$$n_{\text{polimer}} \quad C_{\text{pol}} \cdot 31.000$$

$$C_{\text{pol}} = 4,84 \text{ mg/ml}$$

$$\frac{n_{\text{protein}}}{\text{-----}} = \frac{2 \text{ mg/ml} \cdot 75.000}{\text{-----}} = 5$$

$$n_{\text{polimer}} \quad C_{\text{pol}} \cdot 31.000$$

$$C_{\text{pol}} = 0,96 \text{ mg/ml}$$

$$\frac{n_{\text{protein}}}{\text{-----}} = \frac{2 \text{ mg/ml} \cdot 75.000}{\text{-----}} = 10$$

$$n_{\text{polimer}} \quad C_{\text{pol}} \cdot 31.000$$

$$C_{\text{pol}} = 0,48 \text{ mg/ml}$$

$$\frac{n_{\text{protein}}}{\text{-----}} = \frac{2 \text{ mg/ml} \cdot 75.000}{\text{-----}} = 1/5$$

$$n_{\text{polimer}} \quad C_{\text{pol}} \cdot 31.000$$

$$C_{\text{pol}} = 24,19 \text{ mg/ml}$$

$$\frac{n_{\text{protein}}}{\text{-----}} = \frac{2 \text{ mg/ml} \cdot 75.000}{\text{-----}} = 1/10$$

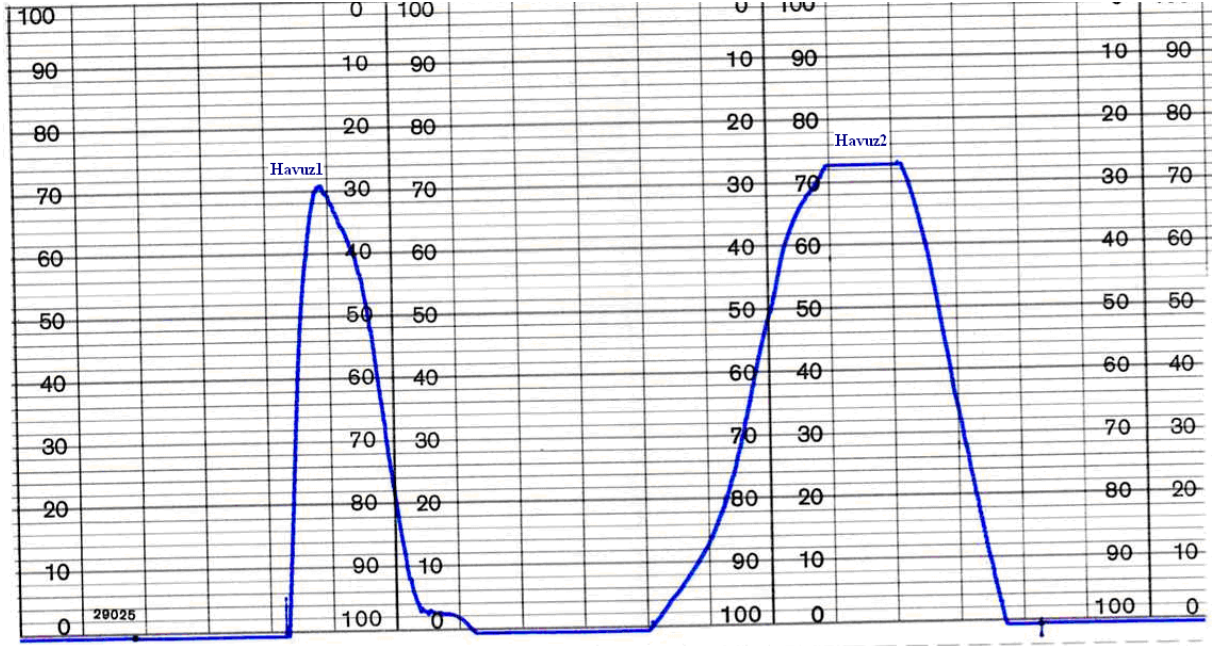
$$n_{\text{polimer}} \quad C_{\text{pol}} \cdot 31.000$$

$$C_{\text{pol}} = 48,38 \text{ mg/ml}$$

Enzim ve polimer çözeltileri toplam hacim 5ml olacak şekilde karıştırılarak 16 saat 25 °C’de PBS (pH7.3) tamponu içerisinde reaksiyona sokuldu. Daha sonra pH değerini arttırmak için 8,75 ml soğuk (4°C) 100 mM sodyum bikarbonat (pH 8,5) eklendi. Kalan aldehit gruplarını indirgemek ve aminoaldehit bağı oluşturmak amacıyla konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde sodyum borhidrür eklendi.(Guisan, 1997) Bu çözelti 15 dakika boyunca 4°C’ de karıştırıldı. 15 dakika sonunda 1mg/ml olacak şekilde sodyum bor hidrür tekrar eklenerek 15 dakika 4°C’de karıştırıldı. Bu işlem sonunda pH 7’ye ayarlandı. Aldehidin karbonil grubu ile proteinin amin grubu arasında kondensasyon reaksiyonu gerçekleşmesi sonucu, bir schiff bazı olan enzim-polimer konjugatı elde edildi.

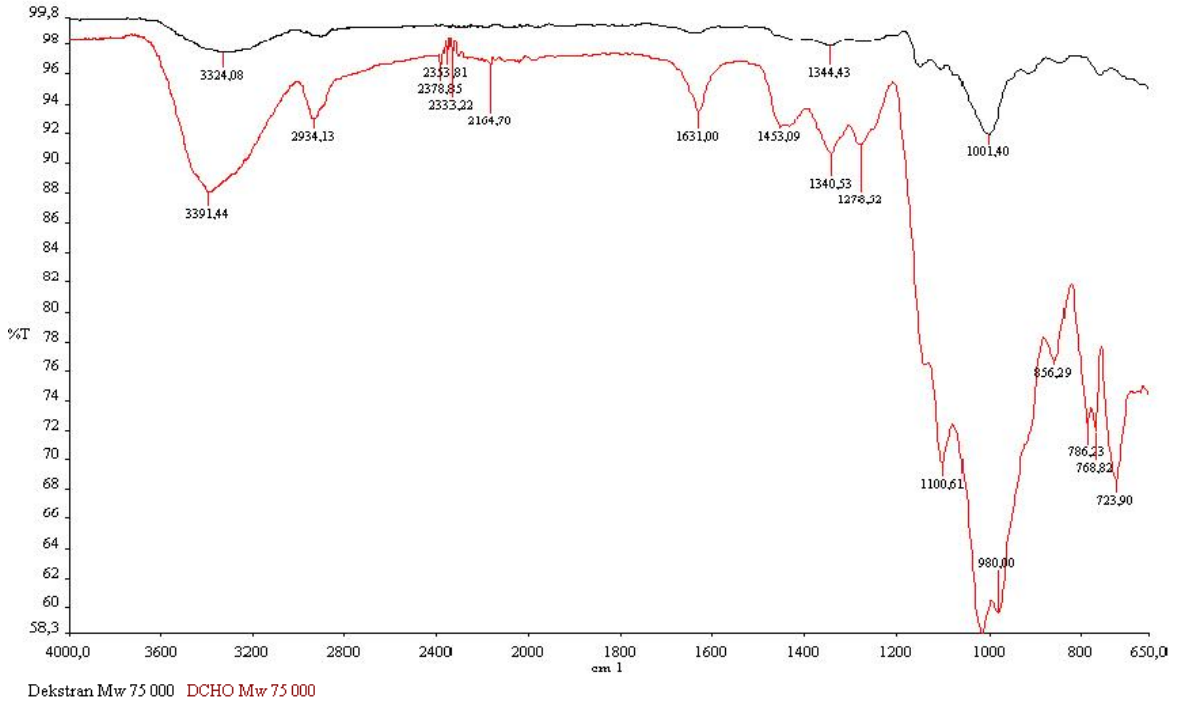
Enzim-polimer konjugatlarının, daha önce satın alınan enzim için uygulanan yöntemde olduğu gibi farklı sıcaklıklardaki aktiviteleri tayin edildi. Sentezlenen konjugatlar viskoteck, HPLC ve Zeta-sizer cihazları ile karakterize edildi.

5. SONUÇLAR



Şekil 5.1 Selülazın jel filtrasyon kolon kromatogramı

Satın alınan selülaz enzimi sephadeks G-50 kolondan geçirilerek iki fraksiyona ayrıldı. Havuz-I adı verilen 1. fraksiyonda enziematik aktivite gözlenirken, arkadan gelen Havuz-II adı verilen farksiyonda aktivite olmadığı görüldü.



Şekil 5.2 Dekstran ve dekstran aldehite ait FTIR spektrumları

Dekstran deneysel kısımda anlatıldığı şekilde aldehit türevine yükseltgendi. Alınan FTIR spektrumu ile aldehit grubu olduğu gösterildi.

Farklı Sıcaklıklarda Elde Edilen Aktivite Değerleri:

Saf enzim ve hazırlanan konjugatların aktivite değerleri pH 5’de farklı sıcaklıklarda 0, 30, 60 dakika bekleme süreleri ile ölçüldü. Bu sıcaklıklarda 0 dakika ve 30 dakika bekleme süreleri ile ölçülen aktivite değerleri 1/5 ve 1/1 oranlı konjugatlar için saf enzimden daha yüksek değerde, 10 ve 5/1 oranlı konjugatlar için enzime yakın değerde elde edildi. 60 dakika bekleme süresi ile yapılan tayinlerde ise, 1/5 ve 1/1 oranlı konjugatlar yine enzimden yüksek, 5/1 ve 10/1 oranlı konjugatlar enzimden düşük aktivite değerleri gösterdi. Oran 1/10’da ise aktivite görülmedi. Bu durum dekstranın enzimin substratla olan etkileşimine bu oranda engel olduğu ile açıklandı. Dekstran bu oranda sterik engel oluşturarak substratın enzim aktif merkezine ulaşmasını engellemiştir.

Çizelge 5.1 0. Dakikada Saf Enzim ve Konjugatlara Ait Aktivite Değerleri

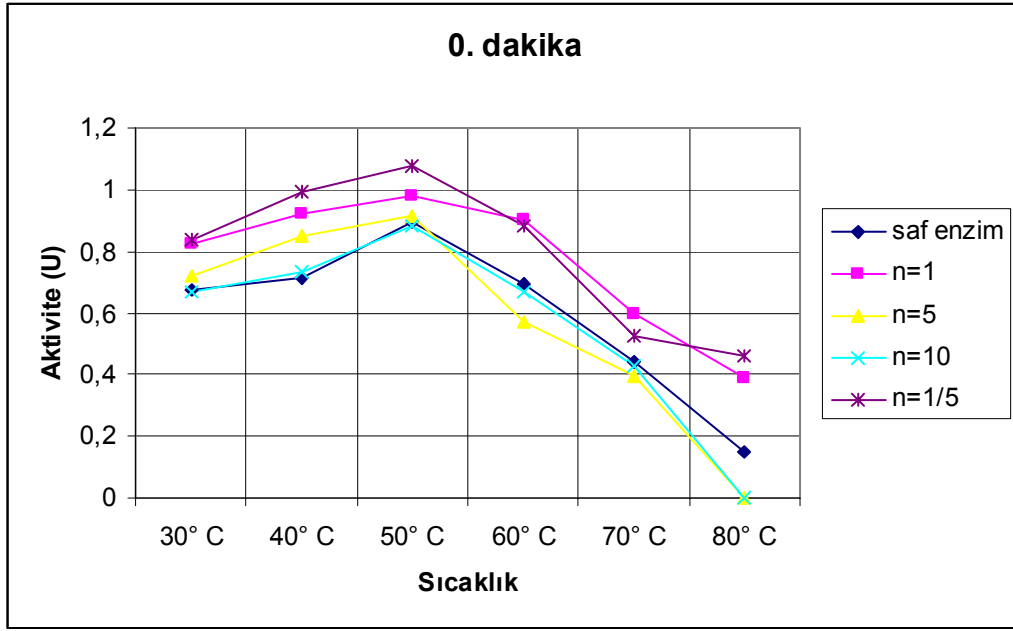
0.dk	saf enzim	n=1	n=5	n=10	n=1/5
30° C	0,675	0,824	0,717	0,67	0,834
40° C	0,712	0,921	0,852	0,73	0,992
50° C	0,892	0,981	0,912	0,882	1,074
60° C	0,697	0,901	0,572	0,669	0,882
70° C	0,441	0,597	0,397	0,425	0,524
80° C	0,148	0,387	0	0	0,459

Çizelge 5.2 30. Dakikada Saf Enzim ve Konjugatlara Ait Aktivite Değerleri

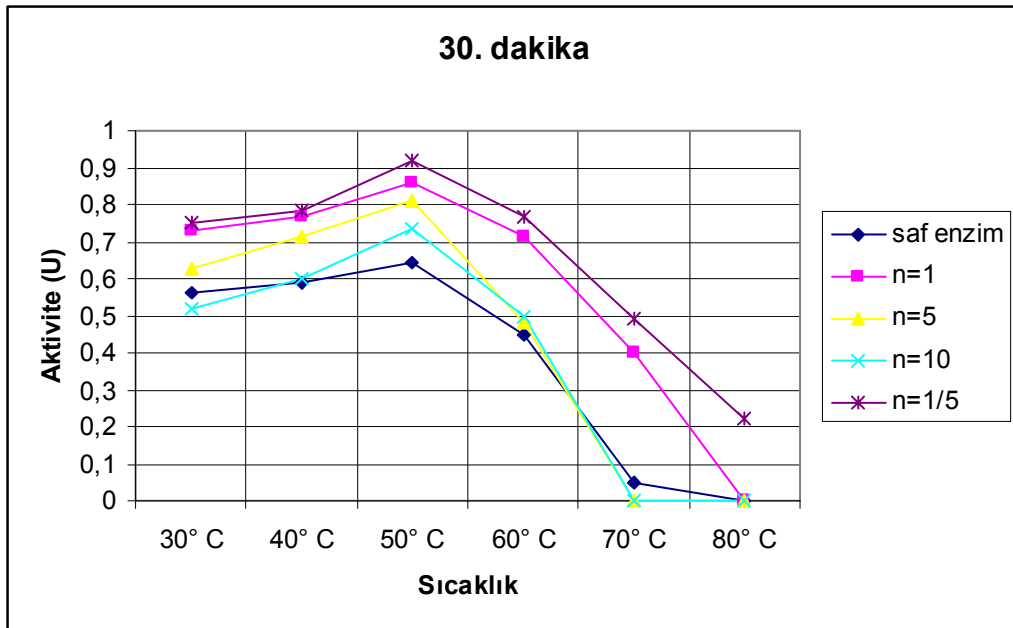
30.dk	saf enzim	n=1	n=5	n=10	n=1/5
30° C	0,563	0,732	0,626	0,521	0,751
40° C	0,589	0,769	0,715	0,601	0,784
50° C	0,642	0,861	0,809	0,733	0,918
60° C	0,448	0,716	0,482	0,495	0,768
70° C	0,046	0,399	0	0	0,49
80° C	0	0	0	0	0,221

Çizelge 5.3 60. Dakikada Saf Enzim ve Konjugatlara Ait Aktivite Değerleri

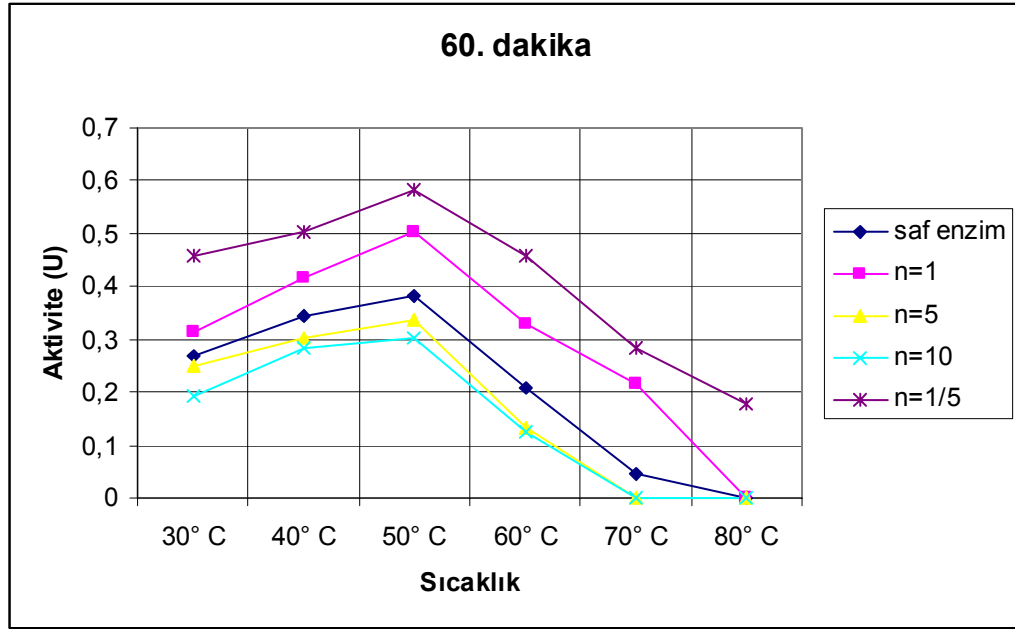
60.dk	saf enzim	n=1	n=5	n=10	n=1/5
30° C	0,267	0,315	0,251	0,192	0,457
40° C	0,346	0,418	0,303	0,284	0,505
50° C	0,384	0,503	0,335	0,302	0,582
60° C	0,209	0,331	0,132	0,125	0,458
70° C	0,045	0,214	0	0	0,282
80° C	0	0	0	0	0,179



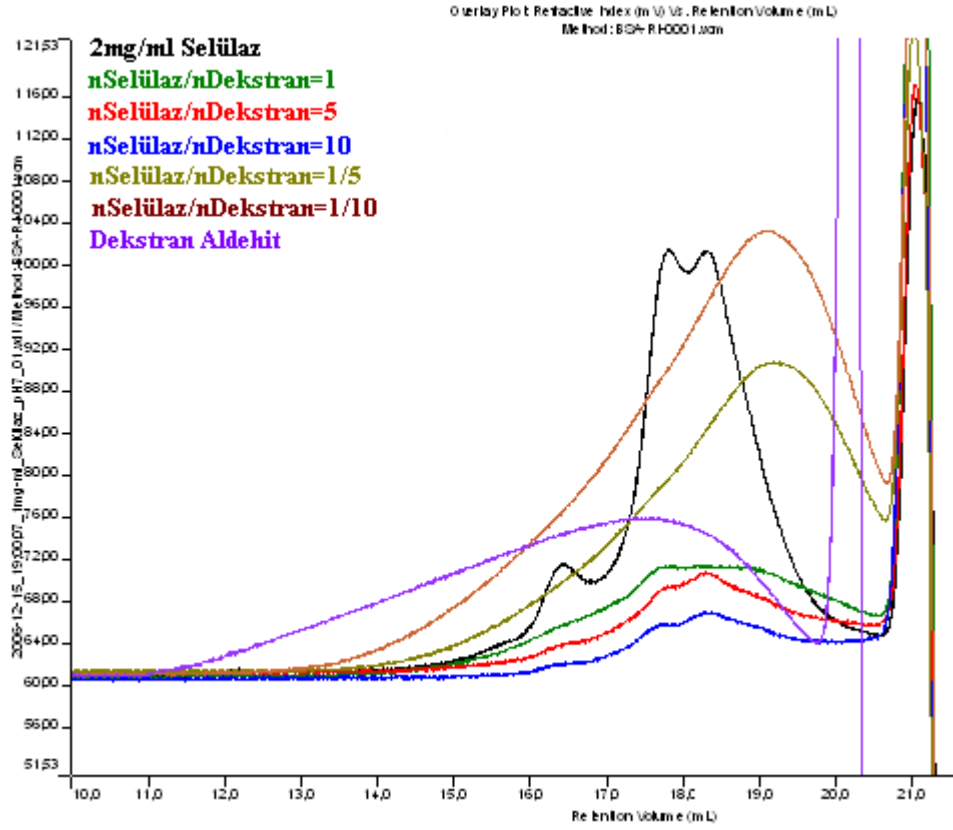
Şekil 5.3 0. dakika saf enzim ve konjugatlara ait aktivite grafiği



Şekil 5.4 30. dakika saf enzim ve konjugatlara ait aktivite grafiği



Şekil 5.5 60. dakika saf enzim ve konjugatlara ait aktivite grafiği



Şekil 5.6 Konjugatlar, Selülaz ve Dekstran Aldehitin Viscotek Marka Cihaz İle Kırılma İndisi Dedektör Kromatogramları

Kolon : Tosoh G 3000 SWXL

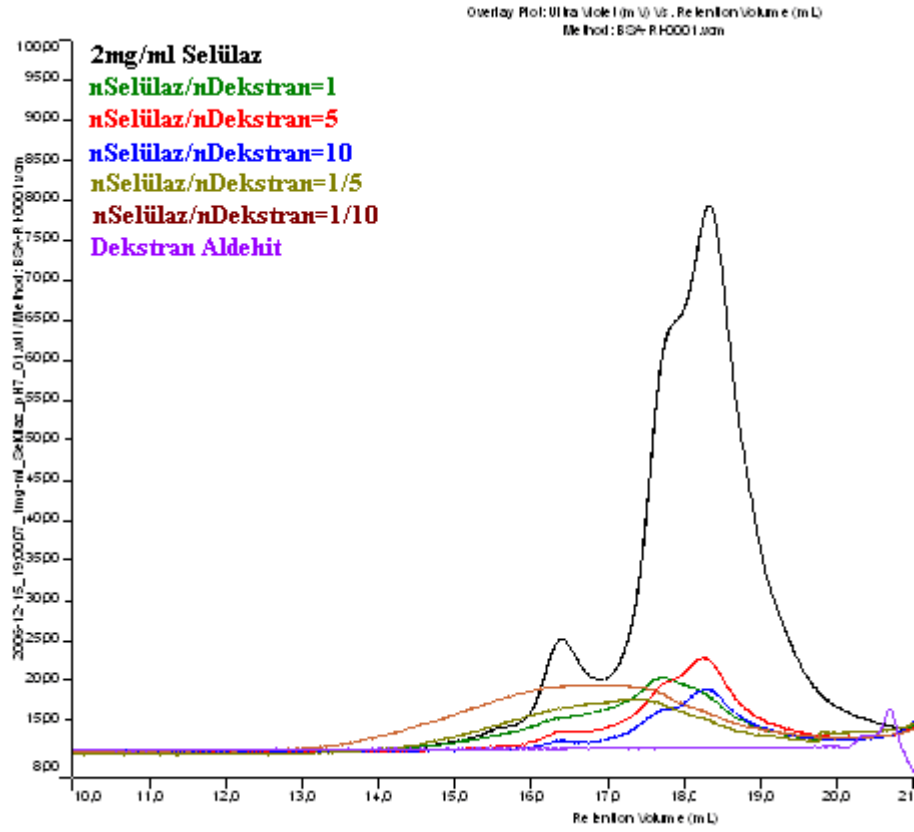
Numuneler : Selülaz, Dekstran Aldehit, 1, 5, 10, 1/5, 1/10 Konjugatlar

Akış hızı : 0,8 ml/dak

Mobil faz : PBS

Dedektör adı : Kırılma İndisi

Sıcaklık : 25 °C



Şekil 5.7 Konjugatlar, Selülaz ve Dekstran Aldehitin Viscotek Marka Cihaz İle UV Dedektör Kromatogramları

Kolon : Tosoh G 3000 SWXL

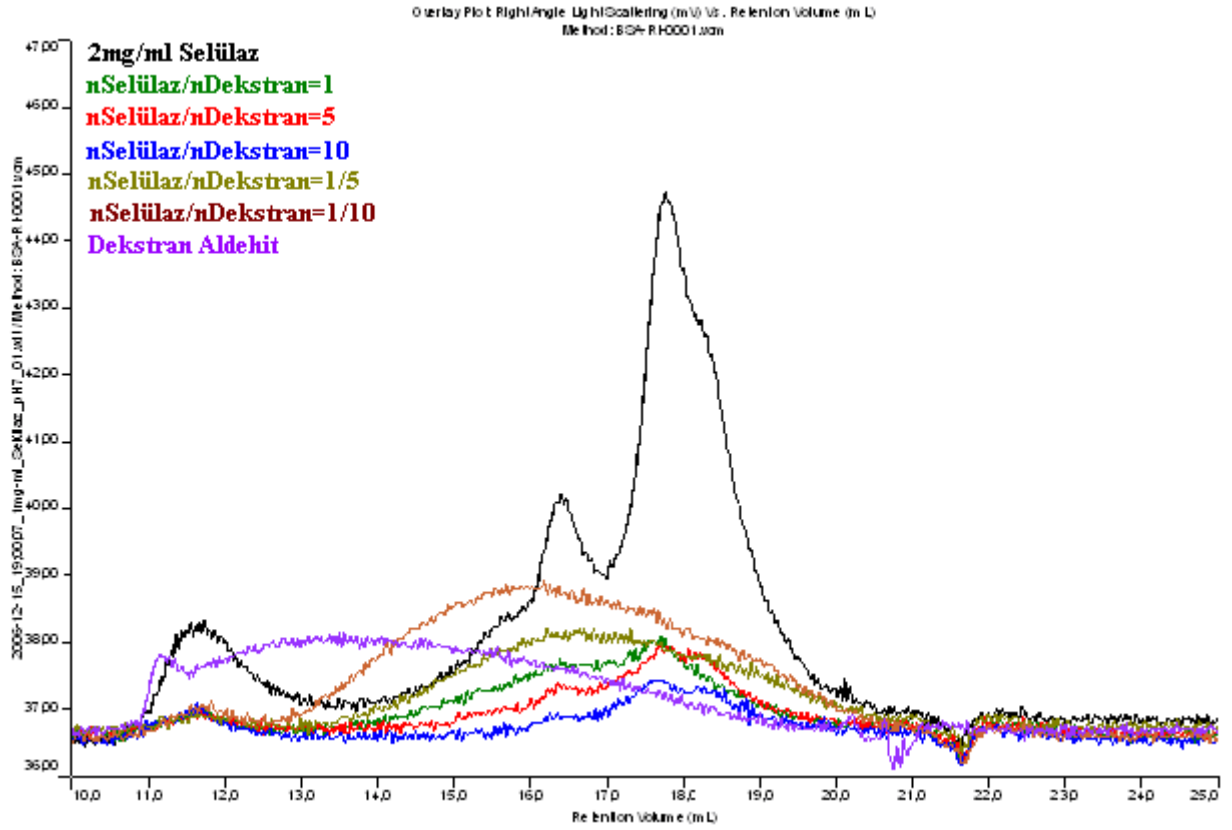
Numuneler : Selülaz, Dekstran Aldehit, 1, 5, 10, 1/5, 1/10 Konjugatlar

Akış hızı : 0,8 ml/dak

Mobil faz : PBS

Dedektör adı : UV

Sıcaklık : 25 °C



Şekil 5.8 Konjugatlar, Selulaz ve Dekstran Aldehitin Viscotek Marka Cihaz İle Işık Saçılması Dedektör Kromatogramları

Kolon : Tosoh G 3000 SWXL

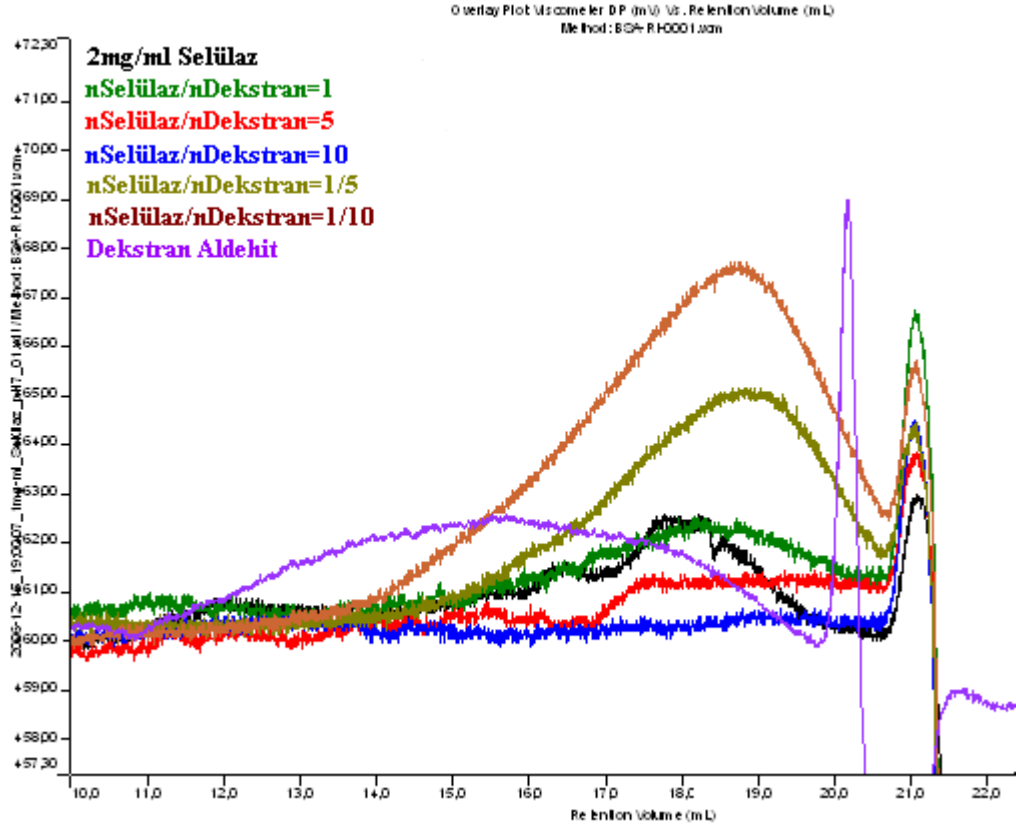
Numuneler : Selulaz, Dekstran Aldehit, 1, 5, 10, 1/5, 1/10 Konjugatlar

Akış hızı : 0,8 ml/dak

Mobil faz : PBS

Dedektör adı : Işık Saçılması

Sıcaklık : 25 °C



Şekil 5.9 Konjugatlar, Selülaz ve Dekstran Aldehitin Viscotek Marka Cihaz İle Vizkozimetre Dedektör Kromatogramları

Kolon : Tosoh G 3000 SWXL

Numuneler : Selülaz, Dekstran Aldehit, 1, 5, 10, 1/5, 1/10 Konjugatlar

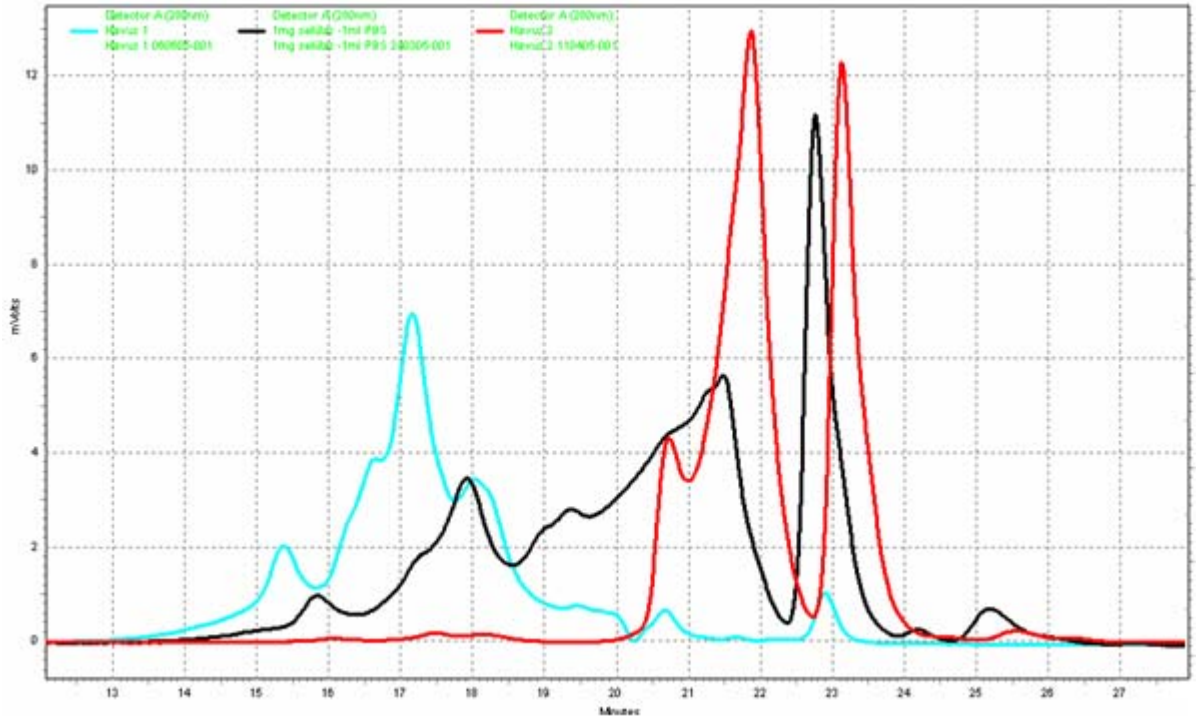
Akış hızı : 0,8 ml/dak

Mobil faz : PBS

Dedektör adı : Viskozite

Sıcaklık : 25 °C

GPC (4 dedektör) ile yapılan analizler sonucunda oran 1/5 ve 1/10'da konjugatın oluştuğu selülazdan farklı zamanda çıkan ve farklı karakteristiğe sahip piklerin varlığı ile gösterilmiş oldu.



Şekil 5.10 İşlem Görmemiş Enzim, Havuz1 ve Havuz2'nin HPLC Cihazı ile Alınan Kromatogramları

(-----havuz 1, ----- işlem görmemiş enzim, ----- havuz 2)

Kolon : Shim-Pack Diol 300

Numuneler : İşlem görmemiş enzim, havuz 1 ve havuz 2

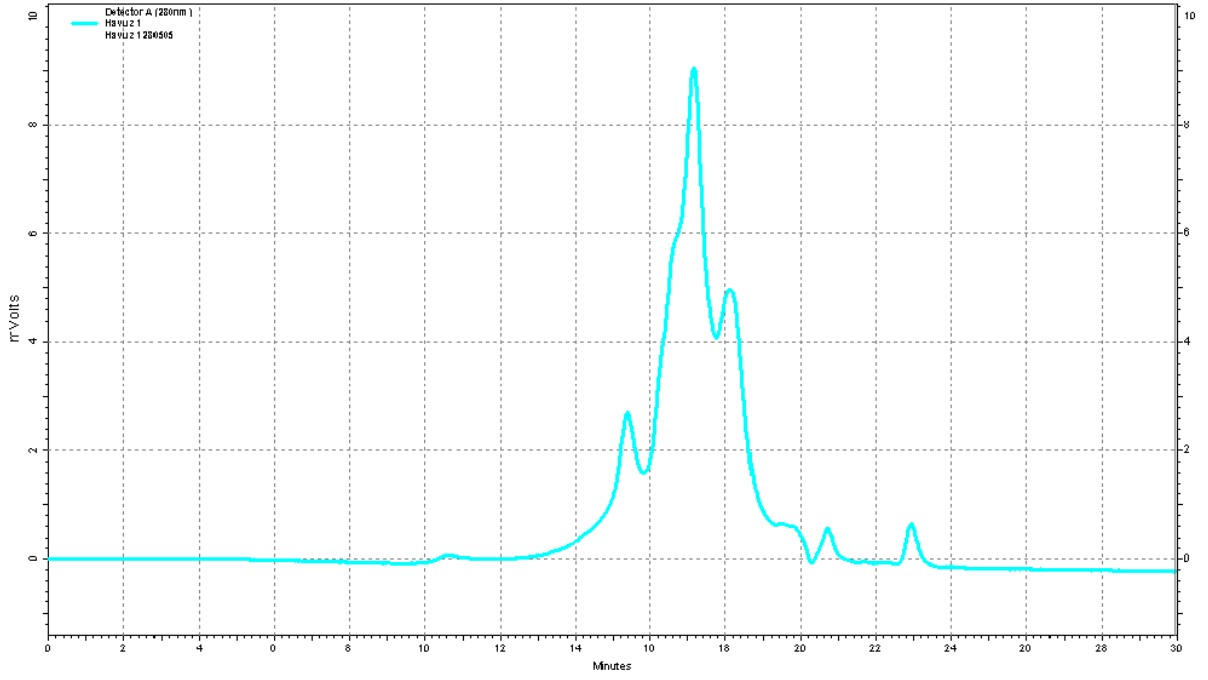
Akış hızı : 1 ml/dak

Mobil faz : PBS

Dedektör adı : UV

Sıcaklık : 25 °C

HPLC cihazı ile yapılan analizlerde ticari olarak alınan enzim ile sephadeks G- 50 kolondan geçirilen saf enzim arasındaki fark ortaya konmuştur. Satın alınan enzim Sephadexs G- 50 kolondan geçirilerek safsızlık oluşturan ikinci pik uzaklaştırılmıştır.



Şekil 5.11 Havuz1'in HPLC Cihazı ile Alınan Kromatogramı

Kolon : Shim-Pack Diol 300

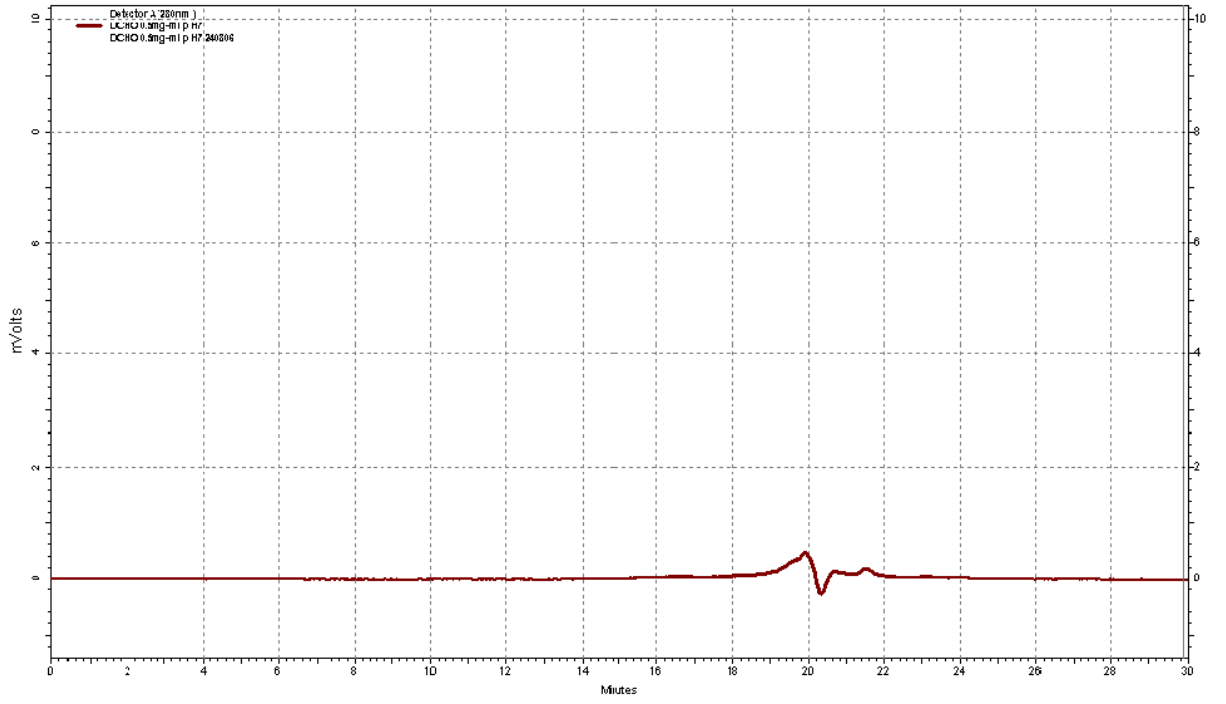
Numuneler : Havuz 1

Akış hızı : 1 ml/dak

Mobil faz : PBS

Dedektör adı : UV

Sıcaklık : 25 °C



Şekil 5.12 Dekstran Aldehitin HPLC Cihazı ile Alınan Kromatogramı

Kolon : Shim-Pack Diol 300

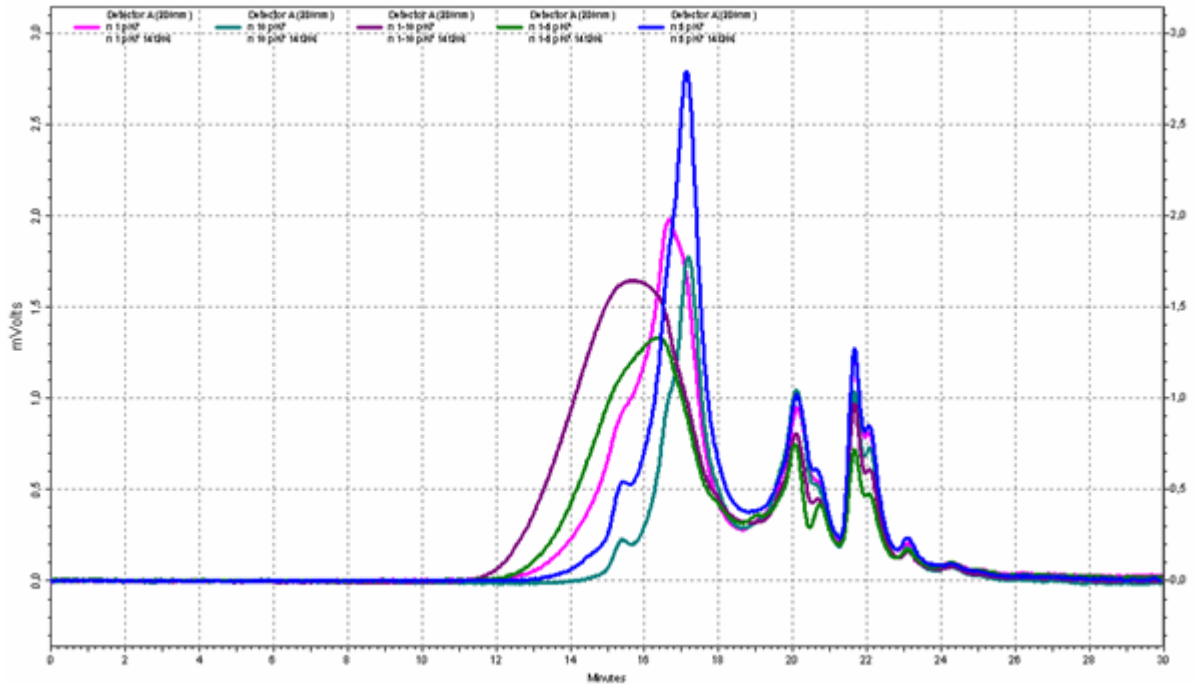
Numuneler : Havuz 1

Akış hızı : 1 ml/dak

Mobil faz : PBS

Dedektör adı : UV

Sıcaklık : 25 °C



Şekil 5.13 Farklı oranlarda hazırlanan konjugatların HPLC Cihazı ile Alınan Kromatogramları

(---n=1, ---n=5, ---n=10, ---n=1/5, ---n=1/10)

Kolon : Shim-Pack Diol 300

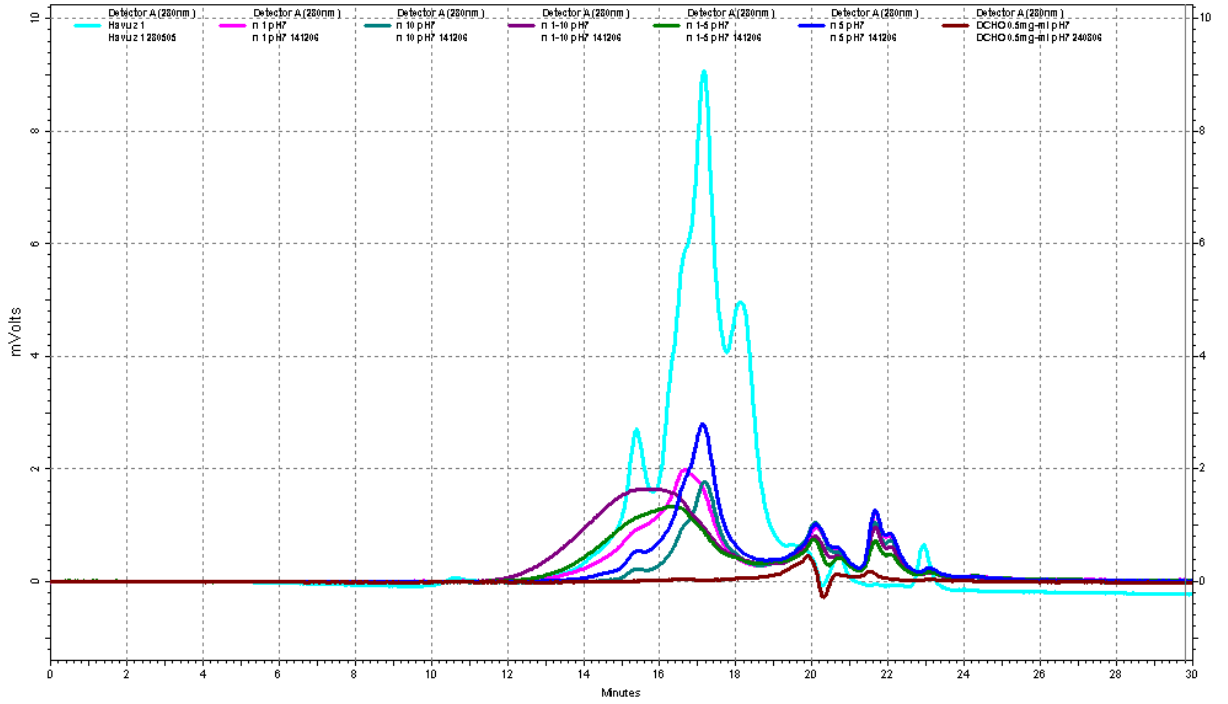
Numuneler : n=1, 5, 10, 1/5, 1/10 konjugatlar

Akış hızı : 1 ml/dak

Mobil faz : PBS

Dedektör adı : UV

Sıcaklık : 25 °C



Şekil 5.14 Farklı oranlarda hazırlanan konjugatlar ve Havuz1 saflaştırılmış selülaazın HPLC Cihazı ile Alınan Kromatogramları

(-----n=1, -----n=5, -----n=10, -----n=1/5, -----n=1/10, -----Havuz 1)

Kolon : Shim-Pack Diol 300

Numuneler : n=1, 5, 10, 1/5, 1/10 konjugatlar ve saflaştırılmış selülaaz

Akış hızı : 1 ml/dak

Mobil faz : PBS

Dedektör adı : UV

Sıcaklık : 25 °C

HPLC cihazına hazırlanan konjugatlar ve saf enzim verilmiş, elde edilen sonuçlar GPC (4 dedektör) ile alınan sonuçları desteklemiştir. Bu cihazda da 1/5 ve 1/10 oranlarında saf selülaazın verdiği pikten önce gelen ve farklı karakteristikteki piklerin varlığı gösterilerek konjugasyon oluşumu kanıtlanmıştır.

Zeta-sizer cihazı ile yapılan analizler sonucunda alınan konjugat oranlarına bağlı boyut değişim grafiği aşağıda verilmiştir. Grafikten de anlaşılacağı üzere oran 1 için saf enzimin yaklaşık iki katı boyutunda yeni bir yapı oluşmuştur.

Çizelge 5.4 Saf Enzim ve Konjugatlara Ait Boyut Dağılımı

Oran	Boyut
0	8,98
0,1	11,7
0,2	9,23
1	16,7
5	10,4
10	9,42



Şekil 5.15 Konjugasyon oranına bağlı parçacık boyut dağılımı grafiği

Sonuçların değerlendirilmesi;

Konjugasyon işleminde ilk olarak dekstran aldehit türevine yükseltgendi. FTIR spektrumunda 1632 nm’de oluşan pik Dekstran sülfat’ta C=O bağı oluştuğunu, dolayısı ile D-CHO türevinin sentezlendiğini gösterdi.

Satın alınan enzim sephadeks G- 50 kolondan geçirilerek iki fraksiyona ayrıldı. Havuz1 adı verilen ilk fraksiyonda enzim aktivitesi belirlendi ve Havuz 2 adı verilen ikinci fraksiyonda ise enzim aktivitesi olmadığı, dolayısıyla safsızlıklardan oluştuğu belirlendi. Havuz 1’in saf enzimden oluştuğu HPLC ve viscotek cihazları ile de kanıtlandı.

n= 1, 5, 10, 1/5, 1/10 oranlarında Selüloz-Dekstran konjugatları sentezlendi. Elde edilen konjugatlar, GPC, HPLC ve Zeta-sizer ile karakterize edildi.

Konjugatların ve saf enzimin pH 5’de farklı sıcaklıklarda, farklı bekleme süreleri ile aktivite tayinleri yapıldı. Buna göre 0, 30 ve 60 dakika bekleme süreleri ile yapılan tayinlerde enzim/dekstran oranı 1/5 ve 1/1 ola konjugatlar enzimden daha yüksek; 5/1 ve 10/1 oranlı konjugatlar enzime yakın ya da daha düşük aktivite değerleri gösterdi. 1/10 oranlı konjugat aktivite göstermedi.

KAYNAKLAR:

Abian, O., Wilson, L., Mateo, C., et al., (2002) Preparation of artificial hyper-hydrophilic micro-environments (polymeric salts) surrounding enzyme molecules new enzyme derivatives to be used in any reaction medium, *J. Molecular Catalysis B*, , 19-20, 295-303.

Abuja, PM; Pilz, I; Claeysens, M; Tomme, P. (1988): Domain structure of cellobiohydrolase II as studied by small angle X-ray scattering: close(resemblance to cellobiohydrolase I. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 156(1):180-185
Boisset C. ; Borsali R. ; Schulein M. ; Henrissat B. ; Dynamic light scattering study of the two-domain structure of *Humicola insolens* endoglucanase V *FEBS Letters* 1995, Vol. 376, pp. 49-52

Alberts, B. (1998) The cell as a collection of protein machines: Preparing the next generation of molecular biologists, *Cell* **92**, 291–294.

Armand S, Drouillard S, Schulein M, Henrissat B, Driguez H: (1997) A bifunctionalized fluorogenic tetrasaccharide as a substrate to study cellulases. *J Bio/Chem*, 272: 2709-2713

Atalla RH, Vanderhart DL. (1984) Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science* 223:283–5.

Atalla RH, VanderHart DL. (1984). Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science*, 223:283-285.

Atalla, R. H. (1993) in *Trichoderma reesei Cellulases and Other Hydrolases* (Suominen, P. , and Reinikainen, T., eds) , Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation, Helsinki pp. 25-39.

Azevedo H.; Bishop D.; Cavaco-Paulo A. (2000) Effects of agitation level on the adsorption, desorption, and activities on cotton fabrics of full length and core domains of EGV (*Humicola insolens*) and CenA (*Cellulomonas fimi*) *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 27, Number 3, August, pp. 325-329(5)

Balabuchevich, N., G., Zimina, E.,P., Larionova, N., I., (2004) Encapsulation of catalase in polyelectrolyte microspheres composed of melamine formaldehyde, dextran sulfate, and protamine, *Biochemistry*, 69, 763-769.

Barr BK, Holewinski RJ. (2002) 4-Methyl-7-thioubelliferyl-beta-D-cellobioside:a fluorescent, nonhydrolyzable substrate analogue for cellulases. *Biochemistry*; 41:4447–52

Bayer, E. A., Chanzy, H., Lamed, R., and Shoham, Y. (1998) Cellulose, cellulases and cellulosomes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 548–557.

Bayer, E. A., Morag, E., and Lamed, R. (1994) The cellulosome A treasure-trove for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 12, 378-386.

Be'guin, P. (1990) Molecular biology of cellulose degradation, *Annu. Rev. Microbiol.* 44, 219–248.

Be'guin, P. (1990) Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.* 44:219–248.

Be'guin, P., and Aubert, J.-P. (1994) The biological degradation of cellulose, *FEMS Microbiol. Lett.* 13, 25–58.

Beguin, P. (1990) Molecular biology of cellulose degradation. *Ann Rev. Microbiol.* 44, pp. 219- 248.

- Béguin, P. (1990) Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.* 44:219-248
- Béguin, P., and Aubert, J.P. (1994) The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13:25-58
- Belarich JP, Tardif C, B'elaïch A, Gaudin C. (1997) The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum*. *J Biotechnol*;57:3-14
- Berner RA. (2003) The long-term carbon cycle, fossil fuels and atmospheric composition. *Nature*;426:323-6.
- Bhardwaj N K., Baipai P. K., Baipai P K (1996) Use of enzymes in modification of fibres for improved beatability *Journal Of Biotechnology* 51: 21-26
- Biely, P., Vrsanská, M., Claeysens, M. (1991) The endo-1,4--glucanase I from *Trichoderma reesei* action on -1,4-oligomers and polymers derived from d-glucose and d-xylose. *Eur. J. Biochem.* 501, 157- 163
- Bieniarz C, Cornwell MJ, Young DF. (1998) Alkaline phosphatase activatable polymeric crosslinkers and their use in the stabilization of proteins. *Bioconjugate Chem* 9:390-8.
- Boisset C, Chanzy H, Henrissat B , Lamed R, Soham Y, Bayer EA (1999) Digestion of crystalline cellulose substrates by the *Clostridium thermocellum* cellulosome: structural and morphological aspects *Biochem J* 340 829-835
- Boisset C., Chanzy H., Schulein M., Henrissat B. (1997) An ultrastructural study of the interaction of an endoglucanase from *Humicola insolens* with cotton fibres *Cellulose* 4 7-20
- Boisset, C., Fraschini, C., Schulein, M., Henrissat, B., Chanzy, H., (2000). Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1444-1452.
- Brannigan, J.A., Wilkinson, A.J., (2002) Protein engineering 20 years on. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3(12), 964-970.
- Brun E, Moriaud F, Gans P, Blackledge M, Barras F, Marion D. (1997) Solution structure of the cellulose-binding domain of the endoglucanase Z secreted by *Erwinia chrysanthemi*. *Biochemistry*, 36:16074- 16086.
- Cavaco-Paulo A., (1998) Processing Textile Fibers with Enzymes: An Overview, in "Enzyme Applications For Fiber Processing," K. E. Eriksson, A. Cavaco-Paulo , Eds.. ACS Symposium Series Book, vol. 687, pp. 180-186
- Chanzy H, Henrissat B. (1985) Unidirectional degradation of *Valonia* cellulose microcrystals subjected to cellulase action. *FEBS Lett*, 184:285 -288.
- Chanzy H., Kennedy J.F., Phillips G.D., Williamson P.A, (1990). Cellulose Sources and Exploitation, Ellis Horward, New York, 1990, pp. 3 -12.)
- Che Man, Y.B., Suhardiyono, A.B., Asbi, A.B., Azudin, M.N., Wei, L.S., (1996) Aqueous enzymatic extraction of coconut oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73 (6), 683_/686.
- Collen, A., Ward, M., Tjerneld, F., et all. (2001) Genetically engineered peptide fusion for improved protein partitioning in aqueous two-phase system Effect of fusion localization on endogluconase I of *Trichhdermia reesei*, *J. Chromatography A*, 910, 275-284.
- Converse AO. (1993) Substrate factors limiting enzymatic hydrolysis. In: Saddler JN, editor. *Bioconversion of forest and agricultural plant residues*. CAB International;. p. 93-106.

- Coughlan, M., (1985). Cellulases: production, properties and applications. *Biochem. Soc. Trans.* 13, 405–406.
- Covert SF, Vanden Wymelenberg A, Cullen D. (1992) Structure, organization, and transcription of a cellobiohydrolase gene cluster from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 58(7):2168–2175
- Cowan WD (1996) Commercial production of cellulase enzymes by submerged culture chap 2.4 *Industrial Enzymology* 2nd edition, MacMillan Press, London
- Coward-Kelly G, Aiello-Mazzari C, Kim S, Granda C, Holtzapple M. (2003) Suggested improvements to the standard filter paper assay used to measure cellulase activity. *Biotechnol Bioeng*; 82:745–9
- Crawford, D. L. (1984). Recent advances in studies of the mechanisms of microbial degradation of lignins. *Enzyme Microbiology and Technology* 6, 434-442.
- David N. Bolam, Antonio Ciruela, Simon Mcqueen-Mason, Peter Simpson, Michael P. Williamson, Jane E. Rixon, Alisdair Boraston, Geoffrey P. Hazlewood And Harry J. Gilbert (1998) Pseudomonas Cellulose-Binding Domains Mediate Their Effects By Increasing Enzyme Substrate Proximity *Biochem. J.* 331 (775–781)
- Davies G, Henrissat B. (1995) Structure and mechanism of glycosyl hydrolases. *Structure*;3: 853–9.
- Dehority, B. A. (1991) Cellulose digestion in ruminants. Pages 327–354 in *Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*. C. H. Haigle and P. J. Weimer, ed. Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- Delmer D.P., Amor Y. (1995) *Plant Cell* 7 (7): 987-1000
- Demain AL, Newcomb M, Wu JHD. (2005) Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiol Mol Biol Rev*;69:124–54.
- Din N, Gilkes NR, Tekant B, Miller RC, Anthony JR, Warren RAJ, et al. (1991) Non-hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulase. *Bio/Technology*;9: 1096–9.
- Din N, Gilkes NR, Tekant B, Miller RCJ, Warren RAJ, Kilburn DG. (1991) Non-hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulase. *Bio/Technology*;9: 1096- 1099.
- Din, N., Coutinho, J.B., Gilkens, N.R., Jervis, E., Kilburn, D.G., Miller, R.C. Jr., Ong, E., Tomme, P. and Warren, R.A.J. (1995a) Interactions of cellulose from *Cellulomonas fimi* with cellulose. In: Petersen, S.B., Svensson, B., and Pedersen, S. *Carbohydrate bioengineering. Progress in biotechnology*. Elsevier, The Netherlands. Vol 10., pp. 261- 270.
- Divne, C., Ståhlberg, J., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Pettersson, G., Knowles, J.K.C., Teeri, T.T., Jones, T.A. (1994) The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Science* 265, 524-528
- Driguez H: (1997) Thiooligosaccharides in glycobiology. *Topics Curt Chem*, 187:85-116.
- Dubois B, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and relative substances. *Anal Chem*;28:350–6
- Falkowski P, Scholes RJ, Boyle E, Canadell J, Canfield D, Elser J, et al. (2000) The global carbon cycle: a test of our knowledge of earth as a system. *Science* 290:291–6.
- Fan LT, Lee Y-H, Beardmore DH. (1980) Mechanism of the enzymatic hydrolysis of

cellulose: effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Bioeng*;22: 177–99.

Fan LT, Lee Y-H, Beardmore DR. (1981) The influence of major structural features of cellulose on rate of enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Bioeng* 23 : 419-424

Fierobe HP, Bayer EA, Tardif C, Czjzek M, Mechaly A, Belaich A, et al. (2002) Degradation of cellulose substrates by cellulosome chimeras. Substrate targeting versus proximity of enzyme components. *J Biol Chem*;277:49621–30.

Fleming K, Gray DG, Matthews S. (2001) Cellulose crystallites. *Chemistry* 7:1831–5.

Fuentes, M., Segura, L., R., Abian, O., et all. (2004) Determination of protein-protein interaction through aldehyde-dextran intermolecular cross-linking, *Proteomics*4, 2602-2607.

Fujimura M., Mori T., Tosa T., (1987) Preparation and properties of soluble_/insoluble immobilized proteases. *Biotechnol. Bioeng.* 29, 747_/752

Fülöp L, Ponyi T. (1997) Rapid screening for endo-b-1,4-glucanase and endo-b-1,4-mannanase activities and specific measurement using soluble dye-labelled substrates. *J Microbiol Methods* 29: 1

Gardner KH, Blackwell J. (1974). The structure of native cellulose. *Biopolymers*, 13:1975 - 2001.

Ghose TK. (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem*;59:257–68.

Gilkens, N.R., Henrissat, B., Kilburn, D.G., Miller, R.C. Jr. And Warren, R.A.J.(1991) Domains in microbial β -1,4-glycanase: sequence conservation. *Microbiol. Rev.* 55,pp.303-315

Gilkes N. R. , Henrissat B. , Kilburn D G, Miller R. C. Jr and Warren R. A. (1991) Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol Mol Biol Rev.* 55(2): 303- 315.

Gilkes, N. R., Henrissat, B., Kilburn, D. G., Miller, R. C. J., and Warren, R. A. J. (1991) Domains in microbial b-1,4-glycanases: Sequence conservation, function, and enzyme families, *Microbiol. Rev.* 55, 303–315.

Godfrey T. and West S. 1996. (Eds.) *Industrial enzymology*, Macmillan Press Ltd. London.

Govardhan CP. (1999) Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. *Curr Opin Biotechnol*;10: 331–5.

Grassin C. (1993) Enzymic liquefaction of apples. *Fruit Process* 7:242-245.

Green JW. (1963) Wood cellulose. *Methods Carbohydr Chem*;3:9–21.

Guisan J.M., Rodriguez, V., Rossel, C.M., Soler, G., Bastida, A., Blanco., R.M., Fernandez-Lafuente, R., Garcia-Junceda, E., (1997) Stabilization of immobilized enzymes by chemical modification with polyfunctional macromolecules.

Gusakov, A. V., and A. P. Sinitsyn. (1992) A theoretical analysis of cellulase product inhibition: effect of cellulase binding constant, enzyme/substrate ratio, and glucosidase activity on the inhibition pattern. *Biotechnol. Bioeng* 40: 663–671.

Hakamada Y, Hatada Y, Ozawa T, Ozaki K, Kobayashi (2001) Identification of thermostabilizing residues T, Ito S. *FEMS Microbiol Lett.* Feb 5;195(1):67-72.

Hakamada, Y., Hatada, Y., Ozawa, T., et all. (2001) Identification of thermostabilizing residues in a *Bacillus* alkaline cellulase by construction of chimeras from monophilic and

- thermostable enzymes and site-directed mutagenesis, *FEMS Microbiol. Letters*, 195, 67-72.
- Hazlewood, G. P., Romaniec, M. P. M., Davidson, K., Gre'pinet, O., Be'guin, P., Millet, J., Raynaud, O., and Aubert, J.-P. (1988) A catalogue of *Clostridium thermocellum* endoglucanase, b-glucosidase and xylanase genes cloned in *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Lett.* 51, 231–236.
- Heiner A.P., Sugiyama J., Teleman O. (1995). Crystalline cellulose Ia and I studied by molecular dynamics simulation *Carbohydrate Research*, Volume 273, Number 2, 25 August, pp. 207-223(17)
- Henrissat B. (1994) Cellulases and their interaction with cellulose. *Cellulose*;1:169–96.
- Henrissat, B. (1994) Cellulase and their interaction with cellulose. *Cellulose* 1, pp 169-196.
- Henrissat, B. Bairoch, A. (1993) Glikoside hydrolase Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases. Families, Modules, and Implications for Genomics.
- Henrissat, B., Davies, G., (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 637–644.
- Hestrin S. (1963) Bacterial cellulose. *Methods Carbohydr. Chem.* Academic Press;. p. 4–9.
- Hidalgo, A., Betancor, L., Lopez-Gallego, F., Moreno, R., (2003) Desing of an immobilized preparation of catalase from thermus thermophilus to be used in wide range of conditions structural stabilisation of multimeric enzyme. *Enzym Microbiol. Technol.* 33 (2/3), 278- 285.
- Hieta K, Kuga S, Usuda M.(1984) Electron staining of reducing ends evidences a parallel-chain structure in *Valonia* cellulose. *Biopolymers*, 23: 1807 -1810
- Higuchi T., (1990) Lignin chemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24 pp. 23–63. 11.
- Hoffren A.M., Teeri, T.T., Teleman, O.(1995) Molecular dynamics simulation of fungal cellulose-binding domains: differences in molecular rigidity but a preserved cellulose binding surface. *Protein Eng.* 5, 443-450.
- Holtzapple, M. T., and A. E. Humphrey. (1984) The effect of organosolv pretreatment on the enzymatic hydrolysis of poplar. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 670–676.
- Hosnino, E., Shiroishi, M.,Amano, Y., Nomura, M., Kanda, T., 1997 Synergistic action of exo-type cellulase in the hydrolyse of cellulose with different cristllites. *J. Ferment. Bioeng.* 484, 300-306
- Hulme MA. (1988) Viscosimetric determination of carboxymethylcellulase activity. *Methods Enzymol*;160:130–5.)
- Irwin, D. C., M. Spezio, L. P. Walker, and D. B. Wilson. (1993) Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism, and binding domain effects. *Biotechnol. Bioeng.* 42:1002-1013
- Jervis E, Haynes C, Kilburn D. (1997) Surface diffusion of cellulases and their isolated binding domains on cellulose. *J Biol Chem*, 272:24016- 24023.
- Johansson, G. Ståhlberg, J. Lindeberg, G.. Engström Å and Pettersson, G. (1989) Isolated fungal cellulase terminal domains and a synthetic minimum analogue bind to cellulose. *FEBS letters* 243 389-393.
- Kamalakkannan S., Murugan, V., Jagannadham, M., V., et all (2004) Bacterial lipid modification of proteins for novel protein engineering application, *Prot.Eng.*, 17, 721-729.

- Karlsson J, Momcilovic D, Wittgren B, Schulein M, Tjerneld F, Brinkmalm G. (2001) Enzymatic degradation of carboxymethyl cellulose hydrolyzed by the endoglucanases Cel5A, Cel7B, and Cel45A from *Humicola insolens* and Cel7B, Cel12A and Cel45Acore from *Trichoderma reesei*. *Biopolymers* 63:32–40.
- Karşılayan, H., Hemmilä, I., Takalo, H., Toivonen, A., Petterson, K., Lövgren, T., Mukkala, V.-M. (1997) Influence of Coupling Method on the Luminescence Properties, Coupling Efficiency, and Binding Affinity of Antibodies Labelled with Europium(III) Chelates, *Bioconjugate Chem.* 8(1), 71-75.
- Kenig, R., and Lamed, R. (1983) Studies on the adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose, *J. Bacteriol.* 156, 818–827.
- Kennedy, J. F., Cabalda, V. M. & White, C. A. (1988). Enzymic starch utilization and genetic engineering. *Trends in Biotechnology*, 6, 184-9.
- Kidby DK, Davidson DJ. (1973) A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. *Anal Biochem*; 55:321–5.
- Kilburn DG, Assouline Z, Din N, Gilkes NR, Ong E, Tomrøne P, Warren RAJ. 1993. Cellulose-binding domains: Properties and applications. In: Suominen P, Reinikainen T, *Trichoderma reesei* cellulases and other hydrolases. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research. Helsinki. Vol. 8, pp 281-290.
- Klarskov K, Piens K, Stahlberg J, Hoj P, Beeumen J, Claeysens M: (1997) Cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*: identification of an active-site nucleophile and additional information on sequence including the glycosylation pattern of the core protein. *Carbohydr Res* 304:143-154.
- Klein GL, Snodgrass WR. (1993) Cellulose. In: Macrae R, Robinson RK, Saddler MJ, editors. *Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. London: Academic Press; p. 758–67.
- Kleman-Leyer, K.M., Gilkes, N.R., Miller Jr, R.C., Kirk. T.K., (1994) Changes in the molecular size distribution of insoluble celluloses by the action of recombinant *Cellulomonas fimi* cellulases. *Biochem. J.* 302, 463 –469.
- Kleman-Leyer, K.M., Siika-aho, M., Teeri, T.T., Kirk, T.K.. 1996. The cellulases Endoglucanase I and Cellobiohydrolase II act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its molecular size. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2883-2887.
- Kongruang S, Han MJ, Breton CIG, Penner MH. (2004) Quantitative analysis of cellulose-reducing ends. *Appl Biochem Biotechnol*; 113- 116:213–31.
- Kralius, P., Clore, M., Nilges, M., Jones, T.A., Pettersson, G., Knowles, J., Gronenborn, A., 1989. Determination of the three-dimensional solution structure of the C-terminal domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Biochemistry* 28, 7241-7257.
- Krassig HA. (1993) Cellulose: structure, accessibility, and reactivity. Yverdon, Switzerland: Gordon and Breach Sci. Publishers;
- Krassig HA. (1993) Cellulose: structure, accessibility, and reactivity. Yverdon, Switzerland: Gordon and Breach Sci. Publishers.
- Kraulis, P., Clore, M., Nilges, M., Jones, T.A., Pettersson, G., Knowles, J., Gronenborn, A., (1989) Determination of the three-dimensional solution structure of the C-terminal domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Biochemistry* 28, 7241- 7257.
- Kubicek, C.P.; Messner, R.; Guber, F.; Mach, R.L. And Kubicek-Pranz, E.M. (1993) The

Trichoderma cellulase regulatory puzzle: From the interior life of a secretory fungus. *Enzyme Microbial Technology*, February vol. 15, no. 2, p. 90-99.

Kulshreshta, A. K. and Dweltz, N. E., (1973). Paracrystalline lattice disorder in cellulose I. Reappraisal of application of 2-phase hypothesis to analysis of powder X-ray diffractograms of native and hydrolyzed cellulosic materials. *J. Polymer Sci.: Polymer Physics Edition* 11, 487-497.

Kumar, S., Tsai, C.J., Nussinov, R., (2000) Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng.* 13, 179–191.

Lamed, R., Setter, E., and Bayer, E.A. (1983) Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*, *J. Bacteriol.* 156, 828–836.

Lange, N.K. (1993), "Application of cellulase in the textile industry," Proc. Second TRICEL Symp. On *Trichoderma reesei* Cellulases and Other Hydrolases, Espoo Finland,. P. Suominen et al. ed., Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research 8 (1993):263-272.

Lee I, Evans BR, Lane LM, Woodward J (1996) Substrate-enzyme interactions in cellulase systems. *Bioresour Technol*;58: 163–9.

Lee I, Evans BR, Woodward J. (2000) The mechanism of cellulase action on cotton fibers: evidence from atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*; 82: 213–21.

Lehmann M, Kostrewa D, Wyss M, Brugger R, D'Arcy A, Pasamontes L, et al. (2000) From DNA sequence to improved functionality: using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase. *Protein Eng* 13 :49–57

Lehmann M, Pasamontes L, Lassen SF, Wyss M. (2000) The consensus concept for thermostability of proteins. *Biochim Biophys Acta* 1543:408–15.

Lever M. (1972) A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates next term. *Anal Biochem*;47:273–9.

Levy I., Shani Z., Shoseyov O. (2002) Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4-beta-glucanase and cellulose-binding domains. *Biomol Eng.* Jun ;19 (1):17-30 12103362

Levy, A. Nussinovitch, E. Shpigel and O. Shoseyov (2002). Recombinant cellulose cross-linking protein: a novel paper modification biomaterial. *Cellulose*, 9, 91-98.

Linder, M., Lindeberg, G., Reinikainen. T., Teeri, T., Pettersson, G. (1995). The difference in affinity between two fungal cellulose-binding domains is dominated by a single amino acid substitution. *FEBS Lett.* 372, 96698.

Linder, M., Lindeberg, G., Reinikainen. T., Teeri, T., Pettersson, G.. (1995). The difference in affinity between two fungal cellulose-binding domains is dominated by a single amino acid substitution. *FEBS Lett.* 372, 96698

Linder. M., Teeri, T.T. (1996) The cellulose-binding domain of the major cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on crystalline cellulose. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93, 12251- 12255

Lynd LR, Cushman JH, Nichols RJ, Wyman CE: (1991) Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science* 251:1318- 1323

M Srisodsuk, T Reinikainen, M Penttila and TT Teeri (1993) Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose *J. Biol. Chem.*, Vol. 268, Issue 28, 20756-20761, 10.

- M., Mattinen, M.L., Kontteli, M., Lindeberg, G., Stahlberg, J., Drakenberg, T., Reinikainen, T., Pettersson, G., Annala, A., (1995). Identification of functionally important amino acids in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. *Protein Sci.* 4, 1056-1064.
- Magnelli, P., F. Forchiassin (1999) Regulation of the cellulase complex production by *Saccobolus saccoboloides*. Induction and repression by carbohydrates. *Mycologia* 91:359-364
- Esterbauer H, Steiner W, Labudova I, et al. (1991). Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. *Biores. Technol.* 36:51-65
- Mandels, M. and Reese, E. T. (1960), Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J. Bacteriol.*, 79, 816-826
- Manning K. (1981) Improved viscometric assay for cellulase. *J Biochem Biophys Methods*; 5:189-202.
- Mansfield, S. D., Mooney, C., and Saddler, J. N. (1999), *Biotechnol. Prog.* 15, 804-816.
- Miller GL, Blum R, Glennon WE, Burton AL. (1960) Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal Biochem*; 1:127-32
- Miller GL. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*; 31:426-8.
- Miller GL. (1963) Cellodextrins. *Methods Carbohydr Chem*; 3:134-9
- Mosier N, Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Lee YY, Holtzapple M, et al. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 96:673-86
- Mustafaev, M., Osada, Y., Matsukata, M., Basalp, A., Çirakoğlu, B., Bermek, E., (1996) New Amphiphilic Immunogens by Poly(N-Isopropylacrylamide)-Modified Bovine Serum Albumin, *Polymer Gels and Networks.*, 4, 363-372.
- Mustafaev, M., Yücel, F., Çirakoğlu, B., Bermek, E., (1996) Immuno Response to Progesterone Involved in Cu^{2+} -Mediated Polyanion-Protein Complex – Antigen Specificity and Affinity of Hybridoma Clones, *Immunology letters*, 52, 63-68.
- Mustafaev, M.I., Mustafaeva, Z., Bermek, E., Osada, Y., (1998) New Amphiphilic Immunogens by Cu^{2+} -Mediated Complexes of Water-Born Poly(N-isopropylacrylamide) and Bovine Serum Albumin, *J. Bioact Compet. Polym.*, 13, 33-49.
- N.J. Gadgil, H.F. Dagainwala, T. Chakrabarti, P. Khanna, (1995) Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma reesei*, *Enzyme Microb. Technol.* 17 942-946.
- Nidetzky B, Hayn M, Macarron R, Steiner W. (1993) Synergism of *Trichoderma reesei* cellulases while degrading different celluloses. *Biotechnology Letters* 15: 71-76
- Nieduszynski, I.A., Preston, R.D., (1970). Crystallite size in natural cellulose. *Nature* 225, 273-274.
- Nishiyama Y, Sugiyama J, Chanzy H, Langan P. (2003) Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose Ia from a synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *J Am Chem Soc*; 125(47): 14300-6
- Notenboom V, Birsan C, Warren RAJ, Withers SG, Rose DR (1998) Exploring the cellulose/xylan specificity of the ~1,4-glycanase Cex from *Cellulomonas fimi* through crystallography and mutation. *Biochemistry*, 37:4751-4758.
- O'Sullivan AC. (1997) Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*; 4:173-207.

- Penttilä, M., Lehtovaara, P., Nevalainen, H., Bhikhabhai, R., Knowles, J. (1986) Homology between cellulase genes of *Trichoderma reesei*: complete nucleotide sequence of the endoglucanase I gene. *Gene* 45, 253-263
- Pommier Jean - Claude, Goma Gerard, Fuentes Jean - Luc et al.(1990). Using enzymes to improve the process and the product quality in the recycled paper industry. Part 2: Industrial applications. *Tappi J*, 73 (2): 197
- Prasad, D.Y. et al. (1993) Enzymatic Deinking of Colored Offset Newsprint"Nord, Pulp Pap. Res. J. 8(2):284-286.)
- Reinikainen, T., Henriksson, K., Siika-aho, M., Teleman, O., Poutanen, K. (1995) Low-level endoglucanase contamination in a *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II preparation affects its enzymatic activity on -glucan. *Enzyme Microb. Technol.* 17, 888-892
- Reinikainen, T., Ruohonen, L., Nevanen, T., Laaksonen, L., Kraulis, P., Jones, T.A., Knowles, J.K.C., Teeri, T.T., 1992. Investigation of the function of mutated cellulosebinding domains of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. *Proteins* 14, 475-482.
- Rescigno A, Rinaldi AC, Curreli N, Olianias A, Sanjust E. (1994) A dyed substrate for the assay of endo-1,4-beta-glucanases. *J Biochem Biophys Methods* 28:123-9.
- Revo JF, Goring DAI. (1983) Directionality of the fibre c-axis of cellulose crystallites in microfibrils of *Valonia ventricosa*. *Polymer* 24:1547-1550.
- Ross, P. Mayer R. and Benziman, M. (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* March; 55(1): 35-58
- Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T.T., Knowles, J.K.C., Jones, T.A., 1990. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science* 249, 380-386.
- Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T.T., Knowles, J.K.C., Jones, T.A. (1990) Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science* 249, 380-386
- Roy, J.J., Sumi, S., Sangeetha, K., Abraham,T., E., (2005) Chemical modification and immobilization of papin, *J. Chemical Tech. Biotech.*, 80, 184-188
- Salman Dilgimen, A., Mustafaeva, Z., Demchenko, M. Kaneko, T., Osada, Y., Mustafaev, M., (2001) Water-Soluble Covalent Conjugates of Bovine Serum Albumin with Anionic Poly(N-isopropyl-acrylamide) and Their Immunogenicity, *Biomaterials*, 22, 2383-2392.
- Sarkar J W, Cosper D R and Hartig E J. (1995) Applying enzymes and polymers to enhance the freeness of recycled fiber[J].*Tappi J.*, 78(2):89-95.
- Sarko A, Muggli R. (1974) Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides. III. *Valonia* cellulose and cellulose II. *Macromolecules* 7: 486 -494.
- Scalbert A, Monties B, Lallemand J-Y, Guittet E, Roland0 C. (1985) Ether linkage between phenolic acids and lignin frac-. tions from wheat straw. *Phytochemistry* 24, 1359-1362 .
- Schmid G, Bisell M, Wandrey C. (1988) Preparation of cellodextrins and isolation of oligomeric side components and their characterization *Anal Biochem*;175:573-83.
- Schülein, M., Tikhomirov, D. & Schou, C. (1993) in *Trichoderma reesei* cellulases and other hydrolases, eds. Suominen, P. & Reinikainen, T. (Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, Espoo), Vol. 8, pp. 109-116.
- Sharrock KR. (1988) Cellulase assay methods: a review. *J Biochem Biophys Methods* 17:81-105.
- Shintate K, Kitaoka M, Kim YK, Hayashi K. (2003) Enzymatic synthesis of a library of beta-

- (1->4) hetero-D-glucose and D-xylose-based oligosaccharides employing cellodextrin phosphorylase. *Carbohydr Res* 338:1981–90.
- Shpigel E, Roiz L, Goren R, and Shoseyov O. (1998) Bacterial cellulose-binding domain modulates in vitro elongation of different plant cells. *Plant Physiol* 117:1185- 1194
- Singh, A., and K. Hayashi. (1995) Microbial cellulases: protein architecture, molecular properties and biosynthesis. *Adv. Appl. Microbiol.* 40: 1–44.
- Somogyi M. (1952) Notes on sugar determination. *J Biol Chem*;195:19–23.
- Spezio et al. (1993), Crystal structure of the catalytic domain of a thermophilic endocellulase. *Biochemistry* 32:9906-9916
- Spezio, M., Wilson, D.B., Karplus, P.A., (1993). Crystal structure of the catalytic domain of a thermophilic endocellulase. *Biochemistry* 32, 9906- 9916.
- Sprey B., Bochem H.P. (1993) Formation of cross-fractures in cellulose microfibril structure by an endoglucanase-cellobiohydrolase complex from *Trichoderma reesei* FEMS Microbiology Letters 106 (3), 239–243.
- Covert S. F., Vanden Wymelenberg A. and Cullen D. (1992) Structure, organization, and transcription of a cellobiohydrolase gene cluster from *Phanerochaete chrysosporium* *Appl Environ Microbiol.* July; 58(7): 2168- 2175
- Srisodsuk, M. (1994) Mode of action of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I on crystalline cellulose. Ph.D. Thesis. University of Helsinki. VTT publications 188. Technical Research Centre of Finland, Espoo, Finland. 107 p
- Striegel AM. (1997) Theory and applications of DMAc/LiCl in the analysis of polysaccharides. *Carbohydr Polym*; 34:267–74
- Strobel HJ, Caldwell FC, Dawson KA. (1995) Carbohydrate transport by the anaerobic thermophilic *Clostridium thermocellum* LQRI. *Appl Environ Microbiol*;61:4012–5
- Sugiyama J, Harada H, Fujiyoshi Y, Uyeda N. (1984) High resolution observations of cellulose microfibrils. *Mokuzai Gakkaishi*, 30:98-99.
- Sugiyama, J., Hayashi, N., Wada, M and Okano, T., (1993). Morphology and structure of crystalline cellulose. In Suominen, P. and Reinikainen, T. *Trichoderma reesei* cellulases and other hydrolases. Foundation for biotechnical and industrial fermentation research. Helsinki. Vol 8, pp. 15-23
- Sugiyama, J., Persson, J. & Chanzy, H. (1991) Combined Infrared and Electron Diffraction Study of the Polymorphism of Native Cellulose. *Macromolecules* 24, 2461-2466.
- Suto M, Tomita F (2001). Induction and Catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *J. Biosci. Bioeng.* 92(4):305-311.
- Suurnakki, A. et al.(2000) *Cellulose* 7:189-209,
- Swatloski RP, Spear SK, Holbrey JD, Rogers RD. (2002) Dissolution of cellulose with ionic liquids. *J Am Chem Soc*;124:4974–5.
- T M Wood, S I McCrae and K M Bhat (1989) The mechanism of fungal cellulase action. Synergism between enzyme components of *Penicillium pinophilum* cellulase in solubilizing hydrogen bond-ordered cellulose *Biochem. J.* 260 (37–43)
- Tamaru Y, Doi RH. (2001) Pectate lyase A, an enzymatic subunit of the *Clostridium cellulovorans* cellulosome. *Proc Natl Acad Sci USA*;98:4125–9.
- Tamaru Y, Karita A, Ibrahim H, Chan H, Doi RH. (2000) A large gene cluster for the

Clostridium cellulovorans cellosome. J Bacteriol;182:5906–10.

Taylor R.E., (1991) Protein Immobilization. Fundamentals and Applications. Marcel Dekker, New York, p. 2.

Teeri TT, Koivula A, Linder M, Wohlfahrt G, Divne C, Jones TA. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose Biochem Soc Trans 1998;26:173–8.

Teeri, T. T., Koivula, A., Linder, M., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Srisodsuk, M., Claeyssens, M., and Jones, T.A.(1995) Modes of action of two *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases. In: Petersen, S.B., Svensson, B., and Pedersen, S. Carbohydrate bioengineering. Progress in biotechnology. Elsevier, The Netherlands. Vol 10., pp. 211- 224.

Temme P, Warren RAJ, Miller RC, Kilburn DG, Gilkes NR (1995) Cellulosebinding domains - classification and properties. In Enzymatic Degradation of Insoluble Polysaccharides. Edited by Saddler JM, Penner MH. Washington, DC: American Chemical Society;:142-161.

Tolan, J. S. Foody, B. (1999) Cellulase from submerged fermentation[J].Adv Biochem Engin Biotech, ,65:41-67.

Tomme, P. , R. A. J. Warren, and N. R. Gilkes (1995) Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. Adv. Microb. Physiol. 37: 1–81.

Tomme, P., Driver, D., Amandoron, E., Miller, R.C., Warren, R.A.J., Kilburn, D.G., (1995b). Comparison of a fungal(family I) and bacterial (family II) cellulose-binding domain. J. Bacteriol. 177, 435664363

Tomme, P., van Tilbeurgh, H., Pettersson, G., Van Damme, J., Vandekerckhove, J., Knowles, J., Teeri, T.T., Claeyssens, M., (1988) Studies on the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. Eur. J. Biochem. 170, 5755581.

Tomme, P., Warren, R.A.J., Miller, R.C., Kilburn, D.G., Gilkes, N.R., (1995a). Cellulose-binding domains: Classification and properties. ACS Symp. Ser. 618, 143- 163.

Tormo J, Lamed R, Chirino A J, Morag E, Bayer EA, Shoham Y, Steitz TA. (1996) Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose. EMBO J, 15:5739- 5751.

Troyer, K. (1991) *Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*, eds. Haigler, C. H. & Wimer, P. J. (Dekker, New York), pp. 311–325.

Tuohy MG, Walsh DJ, Murray PG, Claeyssens M, Cuffe MM, Savage AV, et al. (2002) Kinetic parameters and mode of action of the cellobiohydrolases produced by *Talaromyces emersonii*. Biochim Biophys Acta 1596:366–80.

Valjamae P, Sild V, Pettersson G, Johansson G. (1999) Acid hydrolysis of bacterial cellulose reveals different modes of synergistic action between cellobiohydrolase I and endoglucanase I. Eur J Biochem;266:327–34.

van Tilbeurgh, H., Tomme, P., Claeyssens, M., Bhikhabhai, R., Pettersson, G., (1986) Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. FEBS Lett. 204, 223-227

Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J. and Linko, M., (1994) Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. FEMS Microbiol. Rev. 13, pp. 335–350

Vogt, G., Woell, S., Argos, P. (1997) Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs, J. Mol. Biol., , 269, 631-643.

- Voloch M, Ladisch MR, Cantarilla M, Tsao GT. (1984) ;Preparation of cellodextrins using sulfuric acid. *Biotechnol Bioeng* 26: 557–9
- Waffenschmidt S, Janeicke L. Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2,2-bicinchoninate. *Anal Biochem* 1987;165: 337–40.
- Ward, M., S. Wu, J. Dauberman, G. Weiss, E. Larenas, B. Bower, M. Rey, K. Clarkson, and R. Bott. (1993) Cloning, sequence and preliminary structural analysis of a small, high pI endoglucanase (EGIII) from *Trichoderma reesei*, p. 153-158. In P. Suominen, and T. Reinikainen (ed.), *Proceedings of the Second Tricel Symposium on Trichoderma Cellulases and Other Hydrolases*, Espoo, vol. 8. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, Helsinki, Finland.
- Williamson, G., Belshaw, N.J. and Williamson, M.P. (1992) O-glycosylation in *Aspergillus glucoamylase*. Conformation and role in binding. *Biochem. J.* 287 pp. 423-428.
- Wolfenden R, Snider MJ. (2001) The depth of chemical time and the powder of enzyme as catalysts. *Acc Chem Res* 34:938–45.
- Wood TM, Bhat KM. (1988)Methods for measuring cellulase activities. *Methods Enzymol* 160:87–117.
- Wood TM, Bhat KM. (1988a) Methods for measuring cellulase activities. *Methods Enzymol*;160:87–117.
- Wood TM, Garica-Campayo V. *Enzymology of cellulose degradation*. *Biodegradation* 1990;1:147–61.
- Wood TM. (1988b) Preparation of crystalline, amorphous and dyed cellulase substrate. *Methods Enzymol* 166:19–45.
- Wu, H., Fan, Y., Sheng, J., Sui., S.F. (1993) Induction of changes in the secondary structure of globular proteins by a hydrophobic surface. *Eur. Biophys. J.* 22(3), 201- 205.
- Zhang Y-HP, Cui J-B, Lynd LR, Kuang LR. (2006) A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: evidences from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure. *Biomacromolecules*;7(2):644–8.
- Zhang Y-HP, Lynd LR. (2003) Cellodextrin preparation by mixed-acid hydrolysis and chromatographic separation. *Anal Biochem*;322:225–
- Zhang Y-HP, Lynd LR. (2004) Kinetics and relative importance of phosphorolytic and hydrolytic cleavage of cellodextrins and cellobiose in cell extracts of *Clostridium thermocellum*. *Appl Environ Microbiol*; 70: 1563–9)
- Zhang Y-HP, Lynd LR. (2004a) Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng*; 88:797–824.
- Zhang Y-HP, Lynd LR. (2004b) Kinetics and relative importance of phosphorolytic and hydrolytic cleavage of cellodextrins and cellobiose in cell extracts of *Clostridium thermocellum*. *Appl Environ Microbiol*; 70:1563–9.
- Zhang Y-HP, Lynd LR. (2005) Determination of the number-average degree of polymerization of cellodextrins and cellulose with application to enzymatic hydrolysis. *Biomacromolecules*;6:1510–5.

İNTERNET KAYNAKLARI

1. <http://www.dextran.net/>

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	12.09.1979
Doğum yeri	Karşıyaka/İZMİR
Lise	1993-1996 Karşıyaka Gazi Lisesi
Lisans	1997-2002 Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü
Yüksek Lisans	2004- Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı