**T.C.**

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# FİTAZIN İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE NANOFİBERE İMMOBİLİZASYONU

**Ümran DURU KAMACI**

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Danışman

Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL

Mart, 2022

**T.C.**

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# FİTAZIN İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE NANOFİBERE İMMOBİLİZASYONU

Ümran DURU KAMACI tarafından hazırlanan tez çalışması 03.03.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL
Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışman

**Jüri Üyeleri**

Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Belma KIN ÖZBEK, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Özlem SAÇAN, Üye
İstanbul Üniversitesi _____

Prof. Dr. Sevim TUNALI, Üye
İstanbul Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Fitazın İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Nanofibere İmmobilizasyonu başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Ümran DURU KAMACI

İmza

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün 2015-01-02-DOP06 (839) numaralı projesi ile desteklenmiştir.

*Biricik eşime,*

*canım kızıma*

*ve*

*aileme*

# TEŞEKKÜR

Akademik hayatım boyunca hiçbir desteğini esirgemeyen ömür boyu hakkını üzerimde taşıyacağım çok değerli canım hocam Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL'e,

Tez çalışmalarım esnasında benimle bilgi ve deneyimlerini paylaşarak çalışmalarıma destek olan tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Belma KIN ÖZBEK ve Doç. Dr. Mesut KARAHAN'a,

Tez savunma jürilerim Prof. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ, Prof. Dr. Özlem SAÇAN ve Prof. Dr. Sevim TUNALI'ya,

Akademik hayatım boyunca her zaman her konuda desteğini esirgemeyen canım arkadaşım Arş. Gör. Süreyya DEDE'ye,

Sevgili çalışma arkadaşlarım Dr. İbrahim Ethem ÖZYİĞİT, Arş. Gör. Ümmügülsüm POLAT KORKUNÇ ve Arş. Gör. Mesut BİLGİ'ye,

2015-01-02-DOP06 (839) numaralı proje kapsamında doktora tez çalışmama destek sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'ne,

Beni büyük fedakârlıklarla yetiştiren, hiçbir zaman desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen sevgili annem, babam ve kardeşlerime,

Tez çalışmam boyunca tezimin her aşamasında yardımını esirgemeyen, her zaman desteğini yanımda hissettiğim ve hayatımı paylaştığım canım eşime,

Ve canım kızım Ayşe Berin'ime

teşekkür ediyorum, iyi ki varsınız...

Ümran DURU KAMACI

# İÇİNDEKİLER

**SİMGE LİSTESİ** ix
**KISALTMA LİSTESİ** x
**ŞEKİL LİSTESİ** xi
**TABLO LİSTESİ** xv
**ÖZET** xvi
**ABSTRACT** xviii
**1 GİRİŞ** 1
1.1 Literatür Özeti ... 1
1.2 Tezin Amacı ... 2
1.3 Hipotez ... 3
**2 GENEL BİLGİLER** 4
2.1 Enzimler ... 4
2.1.1 Enzimlerin Sınıflandırılması ... 4
2.1.2 Enzimlerin Kullanım Alanları ... 6
2.2 Fitaz ... 7
2.2.1 Fitaz Kaynakları ... 8
2.2.2 Fitazın Üretim Sınıflandırılması ... 9
2.2.3 Fitazın Kullanım Alanları ... 10
2.3 Fitik Asit ... 12
2.4 Fitat ... 13
2.5 İmmobilizasyon ... 15
2.5.1 İmmobilize Enzimlerin Performansını Etkileyen Faktörler ... 17
2.5.2 Enzim İmmobilizasyonu İçin Kullanılan Destek Malzemeleri ... 18
2.6 Elektro-Eğirme (Electrospinning) Yöntemi ... 21
2.6.1 Nanofiberler ... 22
**3 MATERYAL VE METOT** 24
3.1 Kullanılan Malzeme ve Kimyasallar ... 24
3.2 Kullanılan Cihazlar ... 24
3.3 Ham Özüt Hazırlama ... 26
3.4 Börülceden Fitazın İzole Edilmesi ... 26
3.5 İnorganik Fosfat Miktarının Hesaplanması ... 26
3.6 Protein Miktarının Belirlenmesi ... 28

3.7 Serbest ve İmmobilize Fitazın Aktivitesinin Ölçülmesi ..... 29
3.8 Serbest ve İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu ..... 31
3.8.1 Fitaz Aktivitesine pH Etkisinin İncelenmesi ..... 31
3.8.2 Fitaz Aktivitesine Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi ..... 31
3.8.3 Serbest ve İmmobilize Fitazın Termal Kararlılığının ve Kinetik Sabitlerinin Tayini ..... 32
3.8.4 Serbest ve İmmobilize Fitazın Aktivitesi Üzerine Metal İyonları Etkisinin İncelenmesi ..... 32
3.8.5 Serbest ve İmmobilize Fitazın Aktivitesi Üzerine Organik Bileşen Etkisinin İncelenmesi ..... 32
3.8.6 Serbest ve İmmobilize Fitazın Aktivitesi Üzerine Organik Çözücü Etkisinin İncelenmesi ..... 33
3.8.7 Serbest ve İmmobilize Fitazın Aktivitesi Üzerine Asit ve Baz Etkisinin İncelenmesi ..... 33
3.8.8. Serbest ve İmmobilize Fitazın Aktivitesi Üzerine Deterjan Etkisinin İncelenmesi ..... 33
3.8.9. Serbest ve İmmobilize Fitazın Depo Kararlılığının Belirlenmesi ..... 34
3.9 Elektrospinning Yöntemi ile Nanofiberlerin Hazırlanması ..... 34
3.9.1 Polivinil Alkol (PVA) İçeren Nanofiberlerin Üretimi ..... 34
3.9.2 PVA ve Kitosan (CS) İçeren Nanofiberlerin Üretimi ..... 35
3.9.3 PVA ve Sodyum Aljinat (SA) İçeren Nanofiberlerin Üretimi ..... 36
**4 DENEYSEL BULGULAR 38**
4.1 Uygun Fitaz Kaynağının Saptanması ..... 38
4.2 Börülceden Fitazın İzolasyonu ..... 41
4.3 Elde Edilen Fiberlerin Optimizasyonu ..... 42
4.3.1 Akış Hızına Göre Nanofiberlerin Optimizasyonu ..... 42
4.3.2 Enzim Miktarına Göre Nanofiberlerin Optimizasyonu ..... 44
4.4 Elde Edilen Nanofiberlerin Morfolojik Özellikleri ..... 47
4.4.1 PVA İçeren Nanofiberin Morfolojik Özellikleri ..... 47
4.4.2 PVA-CS İçeren Nanofiberin Morfolojik Özellikleri ..... 49
4.4.3. PVA-SA İçeren Nanofiberin Morfolojik Özellikleri ..... 50
4.5 Elde Edilen Nanofiberlerin XRD Desenleri ..... 51
4.5.1 PVA İçeren Nanofiberin XRD Deseni ..... 51
4.5.2 PVA-CS İçeren Nanofiberin XRD Deseni ..... 51
4.5.3 PVA-SA İçeren Nanofiberin XRD Deseni ..... 52
4.6 Elde Edilen Nanofiberlerin FT-IR Spektrumları ..... 53
4.6.1 PVA İçeren Nanofiberin FT-IR Spekrumları ..... 53

4.6.2 PVA-CS İçeren Nanofiberin FT-IR Spekrumları ..... 54
4.6.3 PVA-SA İçeren Nanofiberin FT-IR Spekrumları ..... 56
4.7 Elde Edilen Nanofiberlerin Termal Özellikleri ..... 57
4.7.1 PVA İçeren Nanofiberin TGA ve DSC Eğrileri ..... 57
4.7.2 PVA-CS İçeren Nanofiberin TGA ve DSC Eğrileri ..... 59
4.7.3 PVA-SA İçeren Nanofiberin TGA ve DSC Eğrileri ..... 60
4.8 Serbest ve İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu ..... 62
4.8.1 Serbest ve İmmobilize Enzimin Katalitik Aktivitesi Üzerine pH Etkisi ... 62
4.8.2 Serbest ve İmmobilize Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi ..... 66
4.8.3 Serbest ve İmmobilize Fitazın Termal Kararlılığının ve Kinetik Sabitlerinin Tayini ..... 69
4.8.4 Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Metal İyonları Etkisinin İncelenmesi 75
4.8.5 Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Organik Bileşen Etkisi ..... 78
4.8.6 Serbest ve İmmobilize Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Organik Çözücü Etkisi ..... 81
4.8.7 Serbest ve İmmobilize Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Asit Etkisi .... 82
4.8.8 Serbest ve İmmobilize Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Baz Etkisi..... 83
4.8.9 Serbest ve İmmobilize Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Deterjan Etkisi ..... 84
4.8.10 Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Depo Kararlılığı ..... 85
**5 SONUÇ VE ÖNERİLER** **86**
**KAYNAKÇA** **88**
**TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR** **94**

# SİMGE LİSTESİ

| | |
|---|---|
| α | Alfa |
| β | Beta |
| rpm | Bir dakikadaki dönüş sayısı (Revolutions per Minute) |
| g | Gram |
| v/v | Hacim/hacimce çözelti |
| kDa | Kilo dalton |
| kV | Kilovolt |
| w/v | Kütle/hacimce çözelti |
| µL | Mikrolitre |
| µM | Mikromolar |
| mg | Miligram |
| mL | Mililitre |
| mm | Milimetre |
| mM | Milimolar |
| M | Molekül ağırlığı |
| nm | Nanometre |
| $R^2$ | Regresyon katsayısı |
| $^oC$ | Santigrat derece |
| cm | Santimetre |
| % | Yüzde |

# KISALTMA LİSTESİ

| | |
|---|---|
| ATP | Adenozin trifosfat |
| FE-SEM | Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu |
| $NH_3$ | Amonyak |
| $(NH_4)_2SO_4$ | Amonyum sülfat |
| $CH_3COOH$ | Asetik asit |
| DSC | Diferansiyel Taramalı Kalorimetre |
| DMF | Dimetil formamid |
| EtOH | Etanol |
| EDTA | Etilendiamin tetra asetat |
| $CH_2O$ | Formaldehit |
| FT-IR | Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi |
| Gly | Glisin |
| HCl | Hidroklorik asit |
| HAP | Histidin asit fosfatı |
| CS | Kitosan |
| Ala | L-alanin |
| Arg | L-arjinin |
| Phe | L-fenil alanin |
| His | L-histidin |
| Cys | L-sistein |
| Tyr | L-tirozin |
| Trp | L-triptofan |
| MeOH | Metanol |
| PEG | Polietilen glikol |
| PS | Polistiren |
| PVA | Polivinil alkol |
| P | Serbest inorganik fosfat |
| BSA | Sığır serum albümin |
| SA | Sodyum aljinat |
| NaOAc | Sodyum asetat |
| Na-fitat | Sodyum fitat |
| NaOH | Sodyum hidroksit |

| | |
|---|---|
| $H_2SO_4$ | Sülfürik asit |
| TGA | Termogravimetrik Analiz |
| TCA | Trikloro asetik asit |
| Tris | Tris(hidroksi metil)amino metan |
| XRD | X-Işınları Kırınımı |

# ŞEKİL LİSTESİ

**Şekil 2.1** Kataliz ettikleri reaksiyonlar ve bazı özelliklerine göre enzimlerin sınıflandırılması .....5
**Şekil 2.2** Fitazın eylem şeması .....7
**Şekil 2.3** Fitazın sınıflandırılması.....10
**Şekil 2.4** Temel enzim immobilizasyon yöntemleri .....16
**Şekil 2.5** Enzim immobilizasyonu için kullanılan destek malzemeleri.....18
**Şekil 2.6** Aljinik asidin yapısı.....19
**Şekil 2.7** Kitosanın yapısı .....20
**Şekil 2.8** Polivinil alkolün yapısı.....21
**Şekil 3.1** Nanofiberlerin hazırlanması için kullanılan elektrospinning cihazı.....25
**Şekil 3.2** İnorganik fosfat miktarının hesaplanması için elde edilen standart eğri .....27
**Şekil 3.3** Protein miktarının hesaplanması için elde edilen standart eğri .....29
**Şekil 3.4** Fitaz içeren ve içermeyen fiberlerin üretimi. .....34
**Şekil 3.5** Enzim içeren/içermeyen PVA nanofiberlerin eldesi .....35
**Şekil 3.6** Enzim içeren/içermeyen PVA-CS nanofiberlerin eldesi.....36
**Şekil 3.7** Enzim içeren/içermeyen PVA-SA nanofiberlerin üretimi. .....37
**Şekil 4.1** PVA nanofibere immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi üzerine akış hızının etkisi.....42
**Şekil 4.2** PVA-CS nanofibere immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi üzerine akış hızının etkisi.....43
**Şekil 4.3** PVA-SA nanofibere immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi üzerine akış hızının etkisi.....44
**Şekil 4.4** PVA nanofibere immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi üzerine enzim miktarının etkisi .....45
**Şekil 4.5** PVA-CS nanofibere immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi üzerine enzim miktarının etkisi .....46
**Şekil 4.6** PVA-SA nanofibere immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi üzerine enzim miktarının etkisi .....47
**Şekil 4.7** PVA (a, c) ve PVA-fitaz (b, d) nanofiberlerin SEM ve boyut dağılım grafikleri .....48
**Şekil 4.8** PVA-CS (a, c) ve fitaz-PVA-CS (b, d) nanofiberlerinin SEM ve boyut dağılım grafikleri.....49
**Şekil 4.9** PVA-SA (a, c) ve fitaz-PVA-SA (b, d) nanofiberlerinin SEM ve boyut dağılım grafikleri.....50
**Şekil 4.10** Hazırlanan PVA ve fitaz içeren PVA nanofiberlerin XRD deseni .....51

**Şekil 4.11** PVA-CS ve fitaz-PVA-CS nanofiberlerinin XRD deseni .....52
**Şekil 4.12** PVA-SA ve fitaz-PVA-SA nanofiberlerinin XRD deseni .....53
**Şekil 4.13** PVA, fitaz ve %0,1 ile %0,3 oranında fitaz içeren fiberlerin FT-IR spektrumları.. .....54
**Şekil 4.14** CS, PVA, PVA-CS nanofiber, subtrat (sodyum fitat) ve enzim içeren nanofiberin FT-IR spektrumları. .....55
**Şekil 4.15** PVA, SA, PVA-SA nanofiber, subtrat (sodyum fitat) ve enzim içeren nanofiberin FT-IR spektrumları. .....57
**Şekil 4.16** Fitaz içeren ve içermeyen PVA nanofiberlerin TGA (a) ve DSC eğrileri (b).....58
**Şekil 4.17** PVA-CS ve fitaz-PVA-CS nanofiberlerinin TGA (a) ve DSC (b) eğrileri. .....60
**Şekil 4.18** PVA-SA ve fitaz-PVA-SA nanofiberlerinin TGA (a) ve DSC (b) eğrileri.....62
**Şekil 4.19** PVA nanofibere immobilize edilen fitaz aktivitesi üzerine pH etkisi.....64
**Şekil 4.20** PVA-CS nanofibere immobilize edilen fitaz aktivitesi üzerine pH etkisi.....64
**Şekil 4.21** PVA-SA nanofibere immobilize edilen fitaz aktivitesi üzerine pH etkisi .....66
**Şekil 4.22** PVA nanofibere immobilize edilen fitaz aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi .....67
**Şekil 4.23** PVA-CS nanofibere immobilize edilen fitaz aktivitesi üzerine sıcakılık etkisi .....68
**Şekil 4.24** PVA-SA nanofibere immobilize edilen fitaz aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi.....69
**Şekil 4.25** Serbest ve PVA nanofibere immobilize edilen fitazın termal kararlılığı .....70
**Şekil 4.26** İnkübasyon zamanına bağlı serbest ve PVA nanofibere immobilize edilen fitazın termal kararlılığı .....71
**Şekil 4.27** PVA-CS nanofibere immobilize edilen fitazın termal kararlılığı.....72
**Şekil 4.28** İnkübasyon zamanına bağlı PVA-CS nanofibere immobilize edilen fitazın termal kararlılığı.....73
**Şekil 4.29** PVA-SA nanofibere immobilize edilen fitazın termal kararlılığı .....74
**Şekil 4.30** İnkübasyon zamanına bağlı PVA-SA nanofibere immobilize edilen fitazın termal kararlılığı.....75
**Şekil 4.31** Serbest ve PVA nanofibere immobilize edilen enzimin aktivitesi üzerine iyon etkisi.....76
**Şekil 4.32** Serbest ve PVA-CS nanofibere immobilize edilen enzimin aktivitesi üzerine iyon etkisi.....77
**Şekil 4.33** Serbest ve PVA-SA nanofibere immobilize edilen enzimin aktivitesi üzerine iyon etkisi.....78
**Şekil 4.34** Serbest ve PVA nanofibere immobilize enzimin aktivitesi üzerine organik bileşen etkisi.....79
**Şekil 4.35** Serbest ve PVA-CS nanofibere immobilize enzimin aktivitesi üzerine organik bileşen etkisi .....80
**Şekil 4.36** Serbest ve PVA-SA nanofibere immobilize enzimin aktivitesi üzerine organik bileşen etkisi .....81

**Şekil 4.37** Serbest ve nanofiberlere immobilize enzimin aktivitesi üzerine organik çözücü etkisi.....82

**Şekil 4.38** Serbest ve nanofiberlere immobilize enzimin aktivitesi üzerine asit etkisi .....83

**Şekil 4.39** Serbest ve nanofiberlere immobilize enzimin aktivitesi üzerine baz etkisi .....84

**Şekil 4.40** Serbest ve nanofiberlere immobilize enzimin aktivitesi üzerine deterjan etkisi.....84

# TABLO LİSTESİ

**Tablo 2.1** Enzimlerin katalize ettiği reaksiyonlar .....5
**Tablo 2.2** Gıdalardaki besin ve fitazın olumsuz etkileşimleri.....14
**Tablo 2.3** İmmobilize enzimlerin perfromansını etkileyen faktörler .....17
**Tablo 3.1** İnorganik fosfat miktarının ölçümü .....27
**Tablo 3.2** İnorganik fosfat miktarının ölçümü .....28
**Tablo 3.3** Fitaz aktivite tayini için standart deney bileşenleri .....30
**Tablo 4.1** Uygun fitaz kaynağının belirlenmesi için kullanılan bitki kaynakları.....38
**Tablo 4.2** Farklı doygunluk oranlarında ham özütten fitaz çöktürmesi .....41
**Tablo 4.3** Serbest ve nanofiberlere immobilize edilen fitazın depo kararlılığı.....85
**Tablo 5.1** Serbest ve nanofiberlere immobilize enzim için optimum immobilizasyon şartları ve kinetik parametreleri .....86
**Tablo 5.2** Elde edilen sonuçların literatür ile kıyaslanması .....87

# ÖZET

## Fitazın İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Nanofibere İmmobilizasyonu

Ümran DURU KAMACI

Kimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL

Bu çalışma kapsamında fitazın kararlılığını arttırmak amacıyla farklı destek malzemelerine immobilizasyonu gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle uygun fitaz kaynağının belirlemek amacıyla farklı tahıl, kuruyemiş ve baklagil çeşitlerindeki fitaz miktarları araştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre en fazla enzim miktarına sahip bitkisel fitaz kaynağının börülce olduğu belirlendi ve fitaz izolasyonu için börülce bitkisi kullanıldı. Bitkiden izole edilen fitazın, daha sonra elektro-eğirme (electrospinning) yöntemi kullanılarak üretilen polivinil alkol (PVA), polivinil alkol-kitosan (PVA-CS) ve polivinil alkol-sodyum aljinat (PVA-SA) nanofiberlerine immobilizasyonu gerçekleştirildi.

Hazırlanan nanofiberlerin karakterizasyonu için Fourier Dönüşümlü-Infrared Spektroskopisi (FT-IR), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), X-Işını Kırınımı (XRD), Termogravimetrik Analiz (TGA) ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) teknikleri kullanıldı. Ayrıca, hazırlanan fiberlerin optimizasyonu; akış hızı ve enzim miktarı gibi elektrospinning parametreleri kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçları karşılaştırabilmek amacıyla nanofiberlerin üretimi enzim içerecek ve içermeyecek şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen boyut dağılımı sonuçlarına göre nanofiberlerin yarıçapı enzim ilavesi sonrasında artmıştır.

Fitazın karakterizasyonu için serbest ve immobilize enzimin katalitik aktivitesi üzerine pH, sıcaklık, metal iyonu, asit, baz, organik bileşen, organik çözücü ve deterjan etkisi incelenerek gerçekleştirildi. Ayrıca, serbest ve nanofiberlere immobilize edilen fitazın termal kararlılığı incelendi ve kinetik sabitleri (Km ve Vmax) hesaplandı. Nanofiberlere (PVA (pH 5,0, T= 65$^{o}$C), PVA-CS (pH 6,0, T= 65$^{o}$C) ve PVA-SA (pH 6,0, T= 55$^{o}$C)) immobilize edilen fitazın optimum pH ve sıcaklık değerleri serbest enzim (pH 5,0, T= 45$^{o}$C) ile kıyaslandığında immobilizasyon sonrasında artmıştır. Serbest enzim, PVA, PVA-CS ve PVA-SA nanofiberlerine immobilize edilen enzimin Km değeri sırasıyla 0,46, 1,17, 13,43 ve 4,66 mM olarak belirlenirken Vmax değerleri ise sırasıyla 53,6, 5,67, 31,25 ve 18,38 U/mg protein olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre nanofibere immobilize edilen enzim daha fazla kararlılık göstermektedir ve bu özelliklerinden dolayı immobilize enzim hayvan yemi, tarım, ilaç ve gıda endüstrisi gibi farklı alanlarda kullanılabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Fitaz, polivinil alkol, kitosan, sodyum aljinat, nanofiber, börülce.

# ABSTRACT

## Isolation of the Phytase, Its Characterization and Immobilization into Nanofiber

Ümran DURU KAMACI

Department of Chemistry

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL

Within the scope of this study, immobilization of phytase on different support materials was carried out to increase its stability. For this purpose, firstly, phytase amounts in different cereals, nuts, and legumes were investigated in order to determine the appropriate phytase source. According to the obtained results, it was determined that the vegetable phytase source with the highest amount of phytase was cowpea seeds, and cowpea seeds were used for phytase isolation. Then, the obtained phytase was immobilized into nanofibers obtained by using polyvinyl alcohol (PVA), polyvinyl alcohol-chitosan (PVA-CS), and polyvinyl alcohol-sodium alginate (PVA-SA) via the electrospinning method.

Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FT-IR), Scanning Electron Microscopy (SEM), X-Ray Diffraction (XRD), thermogravimetric analysis (TGA), and Differential Scanning Calorimetry (DSC) techniques were used for the characterization of the fabricated nanofibers. In addition, the optimization of the fabricated nanofibers was performed using electrospinning parameters such as flow rate and enzyme amount. The prepared nanofibers were produced with/without enzymes in order to compare the obtained results. According to the obtained size distribution results, the radius of the nanofibers increased after the enzyme addition.

The characterization of phytase was carried out by examining the effects of pH, temperature, metal ions, acid, base, organic component, organic solvent, and detergent on the catalytic activity of the free and immobilized enzyme. In addition, the thermal stability of free and immobilized phytase into nanofibers was investigated and their kinetic constants (Km and Vmax) were calculated. The optimum pH and temperature values of immobilized enzyme into the PVA (pH 5, T= 65 $^{o}$C), PVA-CS (pH 6, T= 65 $^{o}$C) and PVA-SA (pH 6, T= 55 $^{o}$C) nanofibers were increased after immobilization compared to the free enzyme (pH 5, T= 45 $^{o}$C). The Km value of the free enzyme, and immobilized enzymes into the PVA, PVA-CS, and PVA-SA nanofibers was determined as 0.46, 1.17, 13.43, and 4.66 mM, respectively, while Vmax values were also calculated as 53.6, 5.67, 31.25, and 18.38 U/mg protein, respectively. These results revealed that the immobilized enzymes into the nanofibers were exhibited more stable performance and it was thought that the immobilized enzyme could be used in different fields such as animal feed, agriculture, medicine, and food industry due to these properties.

**Keywords:** Phytase, polyvinyl alcohol, chitosan, sodium alginate, nanofiber, cowpea seeds.

# 1
# GİRİŞ

## 1.1 Literatür Özeti

Enzimler, gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde katalizör olarak kullanılan ve güçlü substrat özgüllüklerinden dolayı birçok önemli süreçte etkin bir rol oynayan biyomakromoleküllerdir. Enzimlerin endüstriyel katalizörler olarak kullanımını önleyen en büyük engel, çalışma koşulları altındaki zayıf kararlılıklarıdır. Bu dezavantajı önleyebilmek için yeni enzimler aramak veya enzim iyileştirme gibi stratejiler geliştirmek için uzun yıllar boyunca büyük çabalar harcanmaktadır. Enzimlerin çalışma koşulları altındaki kararlılıklarını arttırmak için kullanılan en basit ve güçlü yöntemlerden birisi enzimin bir destek malzemesine immobilize edilmesidir. Bununla birlikte, enzim immobilizasyonu endüstriyel çalışma koşullarındaki kararlılığı arttırmanın yanında heterojen kataliz, sürekli çalışma, kolay kullanım, reaksiyon ortamında kolaylıkla geri kazanım, katalizör içermeyen ve sürekli ürün akışı gibi farklı avantajlar da sağlamaktadır [1].

Fitaz, gıda ve hayvan yemi sanayinde oldukça yaygın bir şekilde kullanılan ve endüstriyel açıdan ticari bir öneme sahip olan enzimdir. Fitat ise çeşitli yem ve gıda bileşenlerinde bulunur ve fitaz varlığında bu bileşiğin hidrolizi fitat kompleksli protein, metal ve diğer moleküllerle birlikte myo-inozitol fosfatları ve inorganik fosforu serbest bırakır. Bu nedenle, tek mideli hayvanlar enzimlerden ve/veya bu elementi yem içeriğindeki fitattan özümsemek için uygun mikrobiyotadan yoksun olduğundan, fitazın hayvan yemlerinde kullanılması fosfor mevcudiyetini arttırmak için önemlidir. Fitazın hayvan yemi ve gıda endüstrisindeki önemine rağmen, serbest biçimde kullanımı, olumsuz sindirim koşulları, düşük çalışma kararlılığı ve yüksek maliyet altında aktivitesinin kaybolması gibi dezavantajlarından dolayı sınırlıdır. Bu dezavantajları önlemek için fitazın bir destek malzemesine immobilize edilerek kullanılması gerekmektedir [2].

Fitaz immobilizasyonu için farklı destek malzemeleri kullanılmaktadır. Bu malzemelerden bir tanesi de elektro-eğirme (elektrospinning) yöntemi ile üretilen nanofiberlerdir. Nanofiber üretimi için kullanılan yöntem çok yönlü bir metot olup

kontrol edilebilir gözenekli yapı ve boyut, verimlilik, nanofiberlerin homojen bir şekilde elde edilmesi, düşük maliyet, basit olması ve tekrarlanabilirlik gibi üstün avantajlara sahiptir. Ayrıca, son yıllarda nanofiberler, biyomalzeme bilimi için umut verici aday haline gelmiş ve biyotıp, biyoalgılama, biyoteknoloji, ilaç salınımı, enerji depolama, çevre mühendisliği, filtrasyon, sağlık, nano-kataliz, optik elektronik, ilaç, koruyucu giysiler, doku mühendisliği iskeleleri ve yara pansumanı gibi farklı uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, nanofiberler enzim immobilizasyonunda da kullanılmaktadır ve bu nano temelli destek malzemeleri yüksek yüzey alanı, biyouyumluluk ve fizikokimyasal özellikleri nedeniyle günümüzde diğer destek malzemelere göre daha fazla talep görmektedir. Ayrıca, enzimin nano yapılı malzemeler üzerine immobilizasyonu ile birlikte üretim, tekrar kullanılabilirlik ve stabilite gibi bazı zorlukların üstesinden de gelinmiştir [3].

## 1.2 Tezin Amacı

Fitazlar kimyasal olarak myo-inozitol (1,2,3,4,5,6)-hekzakisfosfat fosfohidrolaz olarak bilinen fosfohidrolitik enzimlerdir. Bu enzimler, kademeli bir hidroliz reaksiyonu sonucunda myo-inozitol hekzakisfosfattan fitat ve fosfat gruplarının ayrışmasını katalizler. Fitik asidin tuz formu olarak da bilinen fitat, bitkilerde depolanan fosforun ana formu olarak kabul edilir. Hayvan yemlerinde kullanılan tohumlar yüksek miktarda fitat içerdiklerinden dolayı yüksek bir ticari öneme sahiptir [4]. Fosfor, hayvan kemiğinin oluşumu ve mineralizasyonu, hücresel metabolizma ve protein sentezi gibi çeşitli metabolik süreçlerde çok önemli bir rol oynar. Bununla birlikte, kümes hayvanları, domuzlar, insanlar ve balıklar gibi tek mideli hayvanlar, fitatı tamamen emmek için sindirim kanallarında çok az fitaz aktivitesine sahiptir. Ayrıca fitat, demir ($Fe^{2+}$), kalsiyum ($Ca^{2+}$) ve çinko ($Zn^{2+}$) gibi çeşitli metalleri şelatlayabilir, amino asitlerin ve beslenme açısından önemli minerallerin biyoyararlanımını azaltan proteinleri bağlayabilir. Bazı önemli besin maddelerinin biyoyararlanımını artırma ve fosfor birikiminin neden olduğu çevresel etkileri azaltma yeteneğinden dolayı, hayvan yemine fitaz takviyesi umut verici bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır [5].

Bu tez çalışması kapsamında da hayvan yemi endüstrisinde büyük bir öneme sahip olan fitazın kararlılığını arttırmak amacıyla farklı destek malzemelerine immobilizasyonu gerçekleştirildi.

## 1.3 Hipotez

Çalışmada öncelikle uygun fitaz kaynağı belirlemek ve fitazın izolasyonu için kullanılmak üzere bitki kaynağı olarak farklı tahıl, kuruyemiş ve baklagil çeşitlerindeki enzimin spesifik aktivitesi hesaplandı. Elde edilen spesifik aktivite değerlerine göre en yüksek spesifik aktivite değeri börülcenin kullanılması ile elde edildi ve uygun fitaz kaynağı olarak kullanıldı. Börülceden izole edilen fitaz kararlılığını arttırmak için nanofiberlere immobilizasyonu gerçekleştirildi. Fitazın nanofibere immobilizasyonu için elektro-eğirme (electrospinning) yöntemi kullanıldı ve fitaz immobilizasyonu için farklı destek malzemeleri olarak polivinil alkol (PVA), polivinil alkol-kitosan (PVA-CS) ve polivinil alkol-sodyum aljinat (PVA-SA) içeren nanofiberler hazırlandı. Hazırlanan nanofiberlerin karakterizasyonu için Fourier Dönüşümlü-Infrared Spektroskopisi (FT-IR), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), X-Işını Kırınımı (XRD), Termogravimetrik analiz (TGA) ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) teknikleri kullanıldı. Fitazın karakterizasyonu için serbest ve immobilize enzimin katalitik aktivitesi üzerine pH, sıcaklık, metal iyonu, asit, baz, organik bileşen, organik çözücü ve deterjan etkisi incelenerek gerçekleştirildi. Ayrıca, serbest ve nanofiberlere immobilize edilen fitazın termal kararlılığı incelendi ve kinetik sabitleri (Km ve Vmax) hesaplandı.

Elde edilen deneysel sonuçlara göre genel olarak nanofibere immobilize edilen fitazın optimum pH ve sıcaklık değerleri daha yüksek değerlere kaydığı belirlendi. Bu özelliklerinden dolayı nanofibere immobilize edilen fitazın artan kararlılığından dolayı hayvan yemi, tarım, ilaç ve gıda endüstrisi gibi farklı alanlarda kullanılabileceği düşünülmektedir.

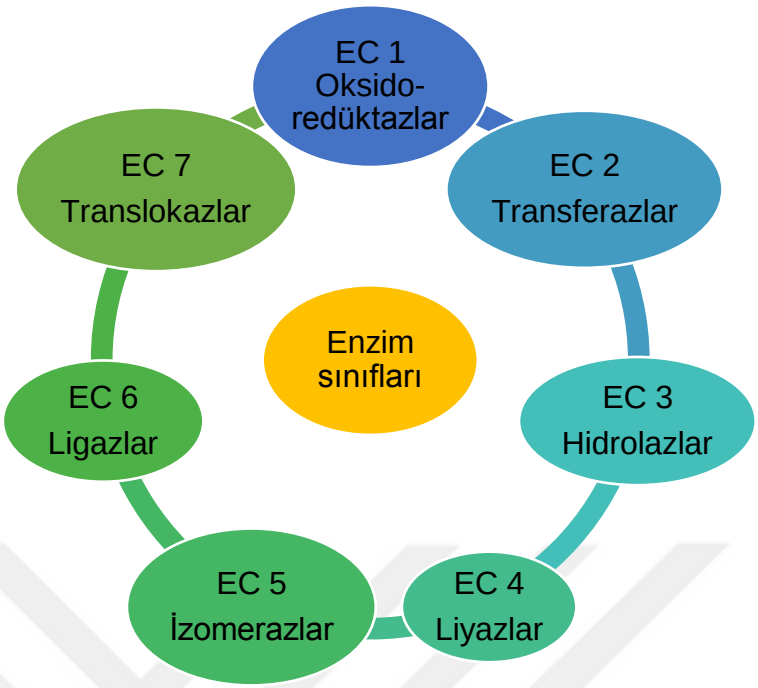
# 2
# GENEL BİLGİLER

## 2.1 Enzimler

Enzimler, en büyük protein grubunu oluşturan ve metabolizma, gen ekspresyonu, hücre bölünmesi ve bağışıklık sisteminin önemli reaksiyonlarındaki değişik süreçlerde etkin bir role sahip olan biyomakromoleküllerdir [6]. Biyolojik bir katalizör olarak enzimler reaksiyon hızı, reaksiyon koşulları ve güçlü substrat özgüllüğü gibi birçok üstün özelliğe sahip olup mikroorganizmalar tarafından bozunabildiklerinden dolayı yeşil kimyanın gereksinimlerini karşılarlar [7]. Ayrıca, doğal kaynakların korunmasına ve kullanımının arttırılmasına, su israf ve kirliliğinin önlenmesine katkı da bulunduklarından dolayı da yeşil kimya için oldukça önemli moleküllerdir [8]. Bu ilgi çekici ve üstün özelliklerinden dolayı enzimler; gıda, ilaç sanayi, tarım ve endüstri gibi farklı alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [7].

### 2.1.1 Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler kataliz ettikleri reaksiyonlar ve bazı özelliklerine göre aşağıda Şekil 2.1'de belirtildiği gibi yedi enzim sınıfına göre sınıflandırılmaktadır.




**Şekil 2.1** Kataliz ettikleri reaksiyonlar ve bazı özelliklerine göre enzimlerin sınıflandırılması [6]

Yedi sınıfa ayrılan enzimlerin katalize ettikleri reaksiyonlar ve enzim türlerine örnekler Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.1** Enzimlerin katalize ettiği reaksiyonlar [9]

| Enzim sınıfı | Katalize ettiği reaksiyon | Örnek |
|---|---|---|
| Oksidoredüktazlar | İndirgenme-yükseltgenme reaksiyonlarını katalize eder. | Dehidrojenaz, oksidaz, peroksidaz |
| Transferazlar | Atom grupları bir gruptan diğerine aktarılır. | Asiltransferaz, transketolaz |
| Hidrolazlar | C-C, C-O, C-N, P-O bağlarının ve asit anhidrit bağlarının hidrolitik olarak bölünmesini katalize eder. | Proteaz, lipaz, amilaz, kutinaz, fosfataz |

**Tablo 2.1** Enzimlerin katalize ettiği reaksiyonlar [9] (devamı)

| Enzim sınıfı | Katalize ettiği reaksiyon | Örnek |
|---|---|---|
| Liyazlar | Hidrolitik olmayan bağların ayrılmasını katalize eder. | Liyaz, hidrataz, dekarboksilaz, fumaraz |
| İzomerazlar | Tek bir moleküldeki yapısal veya geometrik değişikliği katalize eder. | İzomeraz, rasemaz, epimeraz |
| Ligazlar | ATP veya benzer nükleosit trifosfatta bir pirofosforil grubunun hidrolizi ile iki molekülün kovalent bağlanmasını katalize eder. | Ligaz, sentaz |
| Translokazlar | İyon veya moleküllerin hücre boyunca yer değiştirmesini ve bunların membran içerisinde ayrılmasını katalize eder. | Transhidrojenaz |

### 2.1.2 Enzimlerin Kullanım Alanları

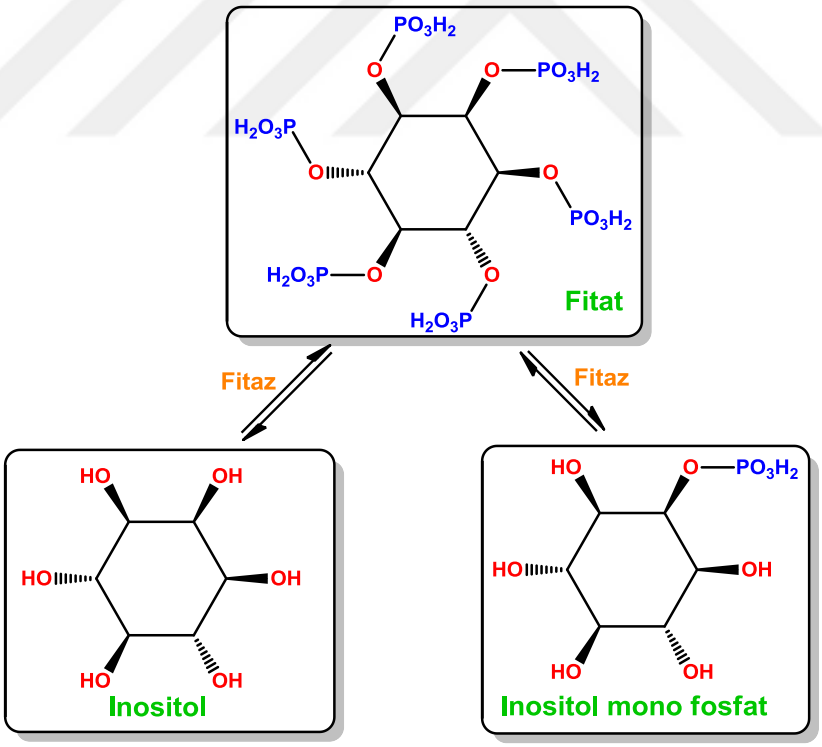
Son yıllarda, enzimlerin farklı endüstrilerdeki uygulamaları sürekli olarak artmaktadır. Bu özelliğinden dolayı enzimler; gıda sanayi, tekstil endüstrisi, kâğıt hamuru işleme, deterjan sanayi, biyosensör, sağlık ve ilaç sektörü ile katı maddelerin ve atık suların arıtılması gibi birçok uygulama alanında kullanılmaktadır.

Enzimlerin gıda endüstrilerindeki uygulamaları arasında süt ürünleri pişirme, nişasta dönüştürme ve içecek işleme (meyve ve sebze suları) yer alır. Tekstil endüstrilerinde enzimler, son ürünler üzerindeki etkileri nedeniyle özel bir yer bulmuştur. Kâğıt hamuru, kâğıt yapımı ve deterjanlar gibi endüstrilerde mükemmel bir son ürün istendiğinde enzimlerin kullanımı kaçınılmaz bir işleme stratejisi haline gelmiştir. Biyosensörlerde birincil öneme sahip olan enzimlerin özgüllüğü nedeniyle daha modern endüstrilerde enzimlerin kullanılması hızla gelişmektedir. Sağlık, ilaç ve kimya imalatı da dahil olmak üzere diğer birçok önemli endüstri, bu doğal şaşırtıcı katalizörlerin avantajlarından giderek daha fazla yararlanmaktadır. Son birkaç yılda enzimler; biyodizel ve etanol gibi biyoyakıtların elde edilmesinde de yaygın olarak

kullanılmaktadır. Enzimlerin modern yaşamdaki en iyi kullanım alanlarından birisi de, genel olarak katı maddelerin ve atık suların arıtılmasındaki uygulamalarıdır [10].

## 2.2 Fitaz

Fitazlar, kimyasal olarak myo-inozitol (1,2,3,4,5,6)-hegzakisfosfat fosfohidrolaz olarak bilinen fosfohidrolitik enzimlerdir. Fitazlar, myo-inozitol hegzakisfosfattan fosfat gruplarının aşamalı olarak çıkarılmasını başlatır. Enzim, ara ürünler olarak bir alt fosforik ester zinciri (inozitol pentafosfattan inozitol monofosfata) ile serbest inorganik fosfor (P) üretmek için fitik asidin inozitol halkasından *orto*-fosfat gruplarını ayırır (Şekil 2.2). Böylece fitaz, bitki kaynaklı gıda/yem bileşenlerinde bağlı fosforu serbest bırakarak kemik oluşumları ve membran stabilitesi gibi biyolojik süreç talebini beslemek için daha fazla fosfor sağlar. Bununla birlikte fitaz sadece fosforu bitki bazlı diyetlerden ayırmakla kalmaz, aynı zamanda protein ve lipidin yanı sıra kalsiyum ve magnezyumun biyoyararlanımını da arttırır [11].




**Şekil 2.2** Fitazın eylem şeması [11]

### 2.2.1 Fitaz Kaynakları

Fitazlar, çeşitli yaşam formları arasında yaygın olarak dağılmıştır. Mikroorganizmalar, fitazın en büyük potansiyel kaynağıdır ve onu bitkiler takip eder.

Genel olarak, dört fitaz kaynağı vardır. Bunlar [11]:

a) Bitkisel fitazlar

b) Mikrobiyal fitazlar (mantar ve bakteriyel fitazlar)

c) Küçük bağırsak mukozası tarafından üretilen fitazlar

d) Bağırsak ile ilgili mikro floral fitazlar

Bilimsel çalışmaların çoğu özellikle *Aspergillus ficuum, Mucor piriformis* ve *Cladosporium* türleri gibi filamentli mantar kökenli olan mikrobiyal fitaz üzerine yoğunlaşmıştır. Bununla birlikte, arpa ve buğday gibi bazı bitkilerde fitaz açısından zengindir. Ancak, dar bir pH spektrum aralığı ve düşük ısı kararlılığı gibi etkenlerden dolayı bitkisel kökenli fitazın aktivitesi mikrobiyal fitazdan daha az etkilidir. Buna ek olarak, bitkisel fitazların biyoetkinliği, mikrobiyal fitazlar ile karşılaştırıldığında sadece 40%'tır.

#### 2.2.1.1 Bitkisel Fitazlar

Bitkisel fitazlar; arpa, buğday, çavdar, pirinç, kolza tohumu, soya fasulyesi, bezelye, fasulye, patates, turp ve ıspanak gibi çeşitli bitki kaynağından izole ve karakterize edilmiştir [12]. Bitki kaynaklarından izole edilen fitazların çoğu myo-inozitol hegzafosfat halkasının altıncı karbon pozisyonundaki hidrolizini başlatır, bu nedenle tip 6-fitazlar olarak kabul edilir. Bununla birlikte, soya fasulyesi fitazı bir 3-fitazdır [13]. Bitkisel fitazlar pH 4,0'ün altında ve pH 7,0'nin üzerinde katalitik aktivitelerini kaybetmektedir.

#### 2.2.1.2 Mikrobiyal Fitazlar

Mikrobiyal fitazlar olarak bakteriler ve mantarlar en önemli fitaz kaynaklarını oluşturmakta olup bakteri, mantar ve maya türlerinden izole ve karakterize edilmektedir. Mayalar arasında *Aspergillus niger*, *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus fumigatus* ve *Saccharomyces cerevisiae* fitazların ticari üretimi için yaygın olarak

kullanılan suşlardır [14]. Mikrobiyal fitazlar; yüksek sıcaklık ve geniş bir pH aralığında kararlı olduğu için gıda işlemede de potansiyel uygulamalara sahiptir [15]. Biyoteknolojideki uygulamalar göz önüne alındığında, mikrobiyal fitazlar, ticari düzeyde fosfat kirliliğini iyileştirmek için umut verici bir çözüm olmuştur.

#### 2.2.1.3 Küçük Bağırsak Mukozası Tarafından Üretilen Fitazlar

Domuzlarda, jejunum bağırsak mukozal fitaz aktivitesinin ana bölgesidir. Fitaz aktivitesi ayrıca insanların ince bağırsağında da varlığı rapor edilmiştir, ancak fitat yıkımı için çok sınırlı bir yeteneğe sahiptir [16]. İlginç bir şekilde, fosfor açısından yetersiz diyetlerle sunulduğunda, insanlar dahil birçok hayvanın bağırsak fitaz ve fosfataz aktivitelerini yükseltebildiği bildirilmiştir [17].

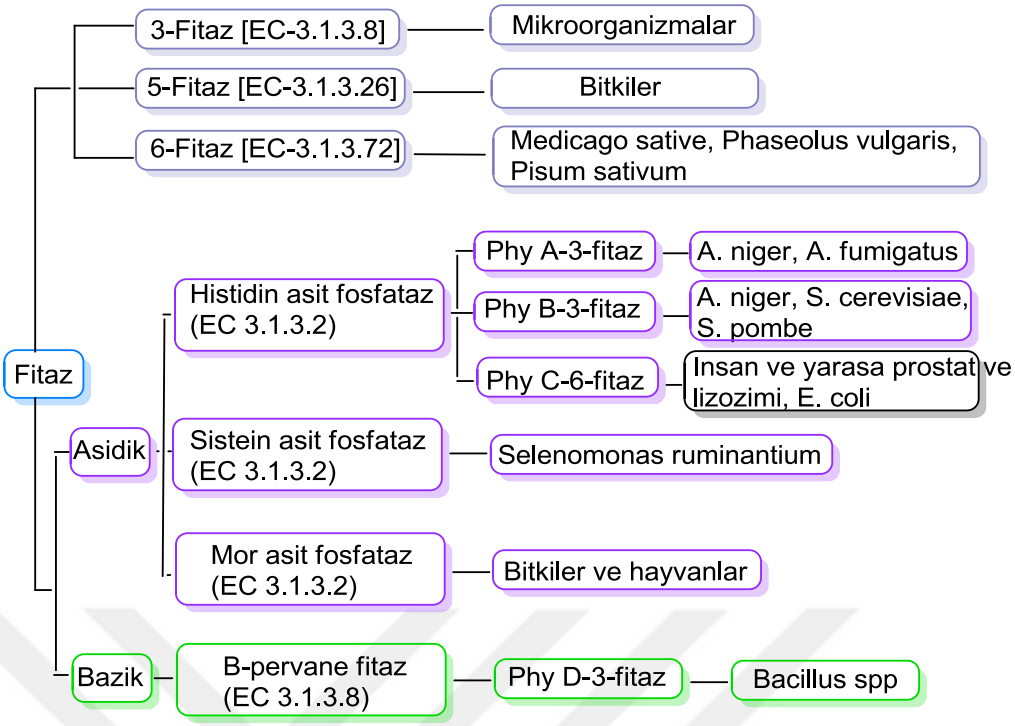
#### 2.2.1.4 Bağırsak ile İlgili Mikro Floral Fitazlar

Bağırsak mikrofloral fitazları öncelikle domuzların kalın bağırsağından elde edilmiş, daha sonra birçok tatlı su balığının mide-bağırsak yollarının ön ve arka bağırsak bölgelerindeki fitaz üreten bakteri florasından izole edilmiştir. Son yıllarda, yeni bir fitaz geni, appA, *Buttiauxella agretis*'den dejenere polimeraz zincir reaksiyonu ve genomik kütüphane taraması ile izole edildi.

Bugüne kadar, gıda katkı maddesi olarak bağırsak mikrofloral kaynaklı fitazların takviyesi çok sınırlıdır [18].

### 2.2.2 Fitazların Üretim Sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya Birliği inozitol halkası üzerindeki (3, 5 ya da 6) yerine bağlı olarak fitazları üç sınıfa ayırmıştır (Şekil 2.3).




**Şekil 2.3** Fitazın sınıflandırılması [19]

Bununla birlikte pH cevabına göre asidik ve bazik olarak da sınıflandırılmaktadır. Histidin asit fosfatı (HAP) geniş bir substrat özgüllüğü gösterir ve asidik pH'larda metal içermeyen fitatı hidrolizler ve son ürün olarak myo-inozitol monofosfat üretir. Bazik fitaz ise katı bir substrat özgüllüğü gösterir son ürün olarak myo-inozitol trifosfat üretir. Bazik fosfatlar HAP'ın bir alt sınıfı olmayıp yeni fitaz türleridir. Bazik fitazlar ile HAP arasında önemli farklılıklar olmasına rağmen günümüzde sadece bazik fitazların biyokimyasal ve katalitik özellikleri bilinmektedir. Bazik fitazlardan daha geniş substrat özgüllüğüne sahip olmalarından ve hayvan yemlerinde uygulanabilirliğinden dolayı asidik fitazlar daha çok çalışılmıştır. Asidik fitazların katalitik aktiviteleri baz alındığında β-pervane fitaz ve mor asit fitaz olmak üzere iki şekilde sınıflandırılmaktadır [20]. Hayvanlarda ve mikroplar ile karşılaştırıldığında, bitki fitazlarının fitat kullanım için ayrı bir mekanizmasının olduğu bulunmuştur [21].

### 2.2.3 Fitazların Kullanım Alanları

Fitazlar; tarım, gıda endüstrisi, ilaç sektörü, kâğıt eldesi gibi alanlarda uygulamalarda kullanılmaktadır. Bununla birlikte, fitazın en önemli endüstriyel uygulama alanlarından

birisi de gastrointestinal kanallarında çok düşük seviyelerde fitaz bulunan domuzlar, balıklar ve kümes hayvanları için bir yem takviyesi olarak kullanılmasıdır [22].

Hayvan yemi endüstrisindeki uygulanmalarında istenilen fitazların özellikleri;

- Midede aktif olması,
- Hayvan yemi işlenmesi ve depolanması süresince kararlı olması
- Hayvan yemi katkı maddesi olarak hayvan yemi üreticileri tarafından kolaylıkla işlenebilmesidir.

Ayrıca, ideal fitaz aşağıdaki etmenleri de sağlamalıdır:

i) Genetik olarak değişmemiş fitazın çevreye bırakılmaması için fitaz ince bağırsağın sonunda belirlenmemelidir.
ii) Sindirim yollarında serbest fitat-fosfor salınımında etkili olmalıdır.
iii) Proteazlara (tripsin ve pepsin) karşı kararlı olmalıdır.
iv) Yemin depolanması esnasında ısı ile etkisini yitirmemelidir.
v) Üretimi düşük maliyetli olmalıdır.

Sonuç olarak, göreceli olarak pahalı olmayan bir sistemle yüksek verim ve saflıkta üretilen fitaz dünya çapında yem üreticilerinin ilgisini çekmektedir. Kümes hayvanları ve balık yetiştiriciliği gibi çok geniş bir aralıkta kullanım alanı olan fitazın üretimi için birtakım tasarım ve geliştirme stratejileri de kullanılmaktadır.

Bu stratejiler:

- Gıda, besin, ilaç endüstrisi ve biyosensör uygulamaları için fitazın immobilizasyonu
- Peroksidaz aktivitesi için aktif ucun vanadyum ile bağlanmasıyla fitazın termal kararlılığının ve kataliz etkisinin geliştirilmesi için aktif ucun modifikasyonu
- Fitazın termal karalılığın ve proteaz kararlılığının geliştirilmesi için aktif uca yönelik mutajenez
- Bitki ve hayvanların transgenik ifadesi için beslenme ve büyümesinin geliştirmesi
- Fitazın protein mühendisliği için termal ve pH kararlılığının arttırılması
- Ekonomik ve büyük ölçek için fitaz üretimi arttırılması
- Fitaz kararlılığındaki glikosilasyon rolünün anlaşılması [23-25].

## 2.3 Fitik asit

Özellikle gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere yetersiz mikrobesin beslenmesi dünya nüfusunun yarısından fazlasını etkilemektedir. Demir, çinko ve A vitamini eksiklikleri dünya çapındaki en ciddi sağlık sorunları arasında yer almaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde bitkiler en önemli besin kaynağıdır. Rafine edilmemiş tahıl ve bakliyat gıdalarında demir ve çinkonun düşük biyoyararlanımı bu beslenme faktörlerine bağlı metabolik bozukluğa neden olur. Dolayısıyla, bu tür gıdaların besin değerini iyileştirmek, tüm nüfusun beslenme durumunu iyileştirecektir. Gıda zenginleştirme programları endüstriyel olarak işlenmiş gıda maddelerine dayanır ve genellikle dünya nüfusunun yarısı için uygun değildir.

Dünya nüfusunun üçte birinden fazlası anemiden muzdarip olup bunun yarısı demir eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Demir eksikliği bilişsel gelişimi, enfeksiyona karşı direnci, iş kapasitesini, üretkenliği ve hamileliği olumsuz etkiler.

Çinko, hücresel büyüme ve farklılaşmada rol oynar. Hafif ile orta derecede çinko eksikliği dünya genelinde yaygın olmakla birlikte, yüksek risk altındaki dünya nüfusunun üçte biri düşük gelirli ülkelerde yaşamaktadır. Çinko eksikliği, büyümenin bozulmasına, bağışıklık sisteminin bozulması, artan hastalıklı ve ölümle sonuçlanan olumsuz gebeliklere ve anormal nörodavranışsal gelişime neden olur.

Minerallerin in vitro biyoerişilebilirliği, minerale ve gıda matrisinin tipine bağlı olarak önemli ölçüde değişmiştir. Genel olarak, biyolojik olarak erişilebilen en iyi demir ve çinko kaynaklarının bakliyat ve fındık olduğu bulundu. Nispeten düşük mineral seviyeleri nedeniyle tahılların mineral içeriğinin sınırlı biyoyararlanımını düşüren fitik asit ve diğer antibesinsel faktörlerin varlığı beslenme açısından sorun teşkil etmektedir [30].

Fitik asit (tuz halindeyken fitat olarak da bilinir) kimyasal olarak myo-inozitol (1,2,3,4,5,6) hegzakisfosfat olarak bilinir, bitki tohumlarında ve polenlerde fosforun ana depolama şeklidir [11]. Fitik asit benzersiz bir kimyasal yapıya sahip olan doğal bir bitkisel bileşiktir. Bu benzersiz özelliğinden dolayı çok değerli katyonlar ve pozitif yüklü proteinler ile kolaylıkla kompleks oluşturabilir ve bu özelliğinden dolayı da birçok formda bulunabilir. Fitat ise fitik asidin kalsiyum tuzu olup fitin ise fitik asidin kalsiyum/magnezyum tuzudur. Fitik asit, fizyolojik pH ve mevcut metal iyonlarına göre serbest asit, fitat veya fitin olarak bulunabilir. Bu formların tümü, fitik asit sistemleriyle

bağlantılı literatürün çoğunda birbirinin yerine kullanılmıştır. Fitik asidin tam hidrolizi, inozitol ve inorganik fosfatlar ile sonuçlanır [30].

Fitik asit bitkilerde en bol bulunan fosfor şekli olup fitik asit tahıl, baklagiller, yağlı tohumlar ve sert kabuklu yemişlerde ağırlıkça %1-5 oranında fosforun ana depolama şeklidir. Bitkilerdeki toplam fosforun %50-85'ini temsil eder. Fitat, olgunlaşma döneminde tohumlarda hızla birikir. Baklagil tohumlarında ve yağlı tohumlarda protein gövdeleri içindeki globoid kristalde depolanır. Tahıl taneleri, pirinç ve buğdayda aleurone tabakası ve perikart gibi kepek fraksiyonunda bulunur, mısırda endospermde görülür.

Kümes hayvanları ve insanlar dahil tek mideli hayvanlar, yeterli düzeyde fitat eksikliği nedeniyle fitik asidi metabolize edemezler. Fitik asit parçalayıcı enzimlerin sindirim sistemlerindeki aktivitesi ve büyük ölçüde gübreleriyle atılır. Bu nedenle, gıda ürünleri fosfor ihtiyacını karşılamak için inorganik fosfat ile takviye edilmelidir. Tek mideli hayvanlar tarafından yetersiz fosfor alımı nedeniyle yemdeki toplam fosforun yaklaşık %70'i dışkıyla atılır. Bu nedenle, tavuklar ve domuzlar için hayvan yeminde fitik asidin varlığı istenmeyen bir durumdur. Sızma veya yüzey akışı yoluyla bu kadar yüksek fitat ve inorganik fosfat seviyeleri, yüzey sularının ötrofikasyonuna ve alg patlamalarına, hipoksiye, balıkların ve suda yaşayan hayvanların ölümüne ve güçlü bir sera gazı olan nitröz oksit üretimine yol açabilir. Bununla birlikte, hayvan yemlerine fitaz eklenmesi fosforun biyoyararlanımını artırır ve fosfor atılımını %30 ile %50 oranında azaltır. Böylece hem endüstriyel hem de ekolojik nedenlerle fitaz ve fitaz üreten mikroplar büyük ilgi görmüştür. Ayrıca fitik asit, demir (Fe), çinko (Zn) ve kalsiyum (Ca) gibi minerallerin emilimini engelleyerek anti-besleyici ajan görevi görür. Bağlanma, minerallerin zayıf biyoyararlanımına sahip çözünmeyen tuzla sonuçlanır [31].

## 2.4 Fitat

Fitat fosfor elementinin (P, inozitol) başlıca depolama şeklidir ve bitki tohumlarında toplam fosfatın yaklaşık olarak %75-80'ini içeren bitkilerdeki minerallerin bir çeşididir. Fitik asit, yapısında altı fosfat grubu barındırır ve düşük molekül ağırlığına sahip (M= 660 g $mol^{-1}$) olup kimyasal formülü $C_6H_{18}O_{24}P_6$'dır. Fitazın sistematik adı myo-inozitol-1,2,3,4,5,6-hegzakisfosfattır [26]. Bununla birlikte, tahıl ve yağlı tohum bitkilerinde toplam fitat miktarı %50-82 aralığındadır [27].

Fitat ortam şartlarına bağlı olarak asidik ve nötr ortamda metal içermeyen ve metal atomu içeren metal-fitat kompleksi şeklinde olmak üzere iki formda bulunabilir. Metal-fitat kompleksi genellikle iki değerlikli katyonlar olan magnezyum ($Mg^{2+}$) ve kalsiyum ($Ca^{2+}$) katyonlarını içerir. Tablo 2.2'de bitkiler ile fitaz etkileşiminin olumsuz etkileri verilmiştir [28].

**Tablo 2.2** Gıdalardaki besin ve fitazın olumsuz etkileşimleri [29]

| Besinler | Etki şekli |
|---|---|
| Mineral iyonları (Mg, Ca, Fe, Zn, Mn ve Cu) | Çözünmeyen fitat-mineral kompleksleri oluşumu mineral varlığını azaltır. |
| Protein | Spesifik olmayan fitat-protein kompleksinin oluşumu, proteolitik enzimler tarafından kolaylıkla hidroliz edilemez. |
| Karbonhidrat | Fitat-karbonhidrat kompleksinin oluşumu daha az bozunur yapar. Kalsiyum ($Ca^{2+}$) ile kompleks oluşturması ile amilaz aktivitesi engellenir ve karbonhidrat bozunumu azalır. |
| Yağ | Lipofitin komplekslerinin oluşumu bağırsak lümenlerinde metalik sabunların oluşumuna yol açar ve yağların varlığı azalır. |

Fitatın hidrolizi enzimatik ve enzimatik olmayan olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. Enzimatik olmayan hidrolizde yüksek sıcaklık şartları altında gerçekleşir. Enzimatik fitat hidrolizi sonucunda ise serbest inorganik fosfatın oluşması için fitik asidin inozitol halkasından *o*-fosfat gruplarının ardışık salınımı ile fitaz oluşur. Fitaz sadece bitkisel kökenli besinlerden değil aynı zamanda kalsiyum, magnezyum, protein ve lipitlerde de bulunur. Böylece, bitkisel kökenli besinlerin içinde bulunan fosfor serbest bırakılarak kemik büyümesi için daha fazla fosfor kullanılabilir hale getirilir ve fosfor kirliliğine karşı çevreyi korur.

## 2.5 İmmobilizasyon

Sayısız üstün özelliklerine ve uygulama alanlarına rağmen, endüstriyel uygulamalarda çalışılan zor koşullardan dolayı enzimlerin üçüncül yapılarının (denatürasyon) kaybı ve uzun süreli çalışma sonucunda aktivitelerini yitirmeleri gibi bazı dezavantajları da vardır. Ayrıca, serbest enzimler suda çözünebilen homojen katalizörlerdir, bu da pahalı membran sistemleri kullanılmadıkça geri kazanılmalarını zorlaştırır ve buna bağlı olarak da sürekli işlemlerde kullanımlarını sınırlar. Serbest bir enzim hidrofobik ortamda veya sulu çözeltilerde izoelektrik noktasına yakın bir pH'da toplanabilir, bu da difüzyon sınırlamaları ve azalan enzim aktivitesi ile sonuçlanır [32].

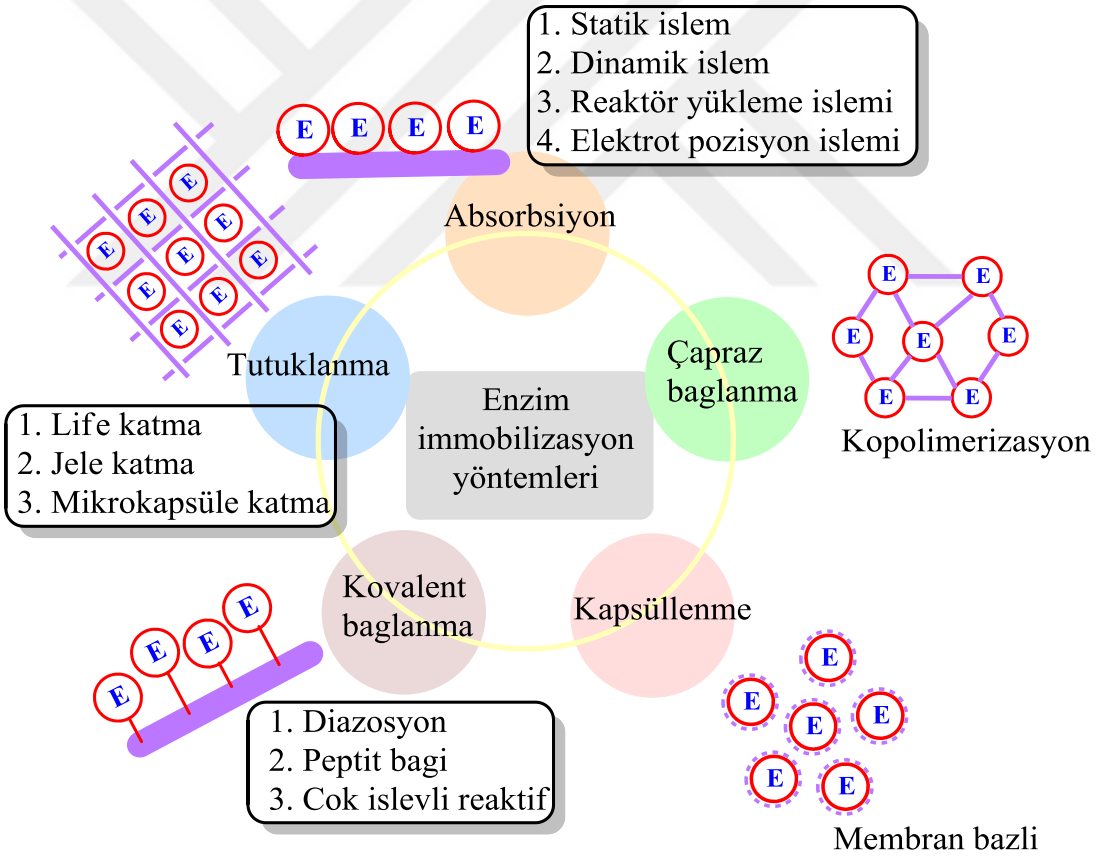
Enzimler için bahsedilen bu dezavantajlar, enzimin suda çözünmeyen katı bir heterojen katalizör olarak immobilize edilmesi (immobilizasyon, hareketsizleştirme) ile çözülebilir. Enzim filtrasyon veya santrifüj ile kolayca geri kazanılır, böylece sonraki işlemlerde yeniden kullanımı ve ürün ayrımı kolaylaştırılır. Ayrıca, immobilizasyon; enzimin üçüncül yapısının (denatürasyon) bozulmasını engeller ve böylece, suyla karışmayan organik çözücüler de dahil olmak üzere çok geniş bir reaksiyon koşulları aralığında kullanılabilen daha kararlı bir biyokatalizör olmasını sağlar. Enzim immobilizasyonun bir diğer avantajı ise immobilizasyon ile enzimin çevresel değişikliklere karşı kararlılığının artmasıdır. İmmobilizasyon, ürünün kirlenmesini en aza indirir veya önler ve enzim inhibisyonunu azaltır. Ayrıca immobilize enzimler reaksiyon bileşiklerinden ayrılabilir ve tekrar kullanılabilir, bu nedenle enzimlerin maliyetinin uygun şekilde kullanımı mümkündür [33].

Enzim immobilizasyonu; enzimin aktivitesini, denatürasyon ve tekrar kullanılabilirliği gibi azalma eğiliminde olan özelliklerini korumak, biyoteknoloji endüstrilerini büyük ölçekli ve ekonomik olarak kolaylaştırılmak için kullanılan tekniklerden biridir. İmmobilizasyon, enzimlerin geri kazanılmasını ve potansiyel olarak yeniden kullanılmasını kolaylaştırıp katalitik süreçleri uygun maliyetli hale getirir. Ayrıca, immobilizasyon; enzimler için aşağıda belirtilen avantajlara da sahiptir.

- Enzimin kolay ayrılması
- Enzimin reaksiyonun herhangi bir noktasında sistemden çıkarılması
- Enzim kaybının önlenmesi
- Geliştirilmiş kataliz içermesi

Bu avantajlarının yanı sıra, eğer uygun şekilde kullanılırsa enzim immobilizasyonu; enzim aktivitesi ve enzim stabilizasyonu üzerinde olumlu etkide de bulunabilir [34].

Enzimlerin bir destek materyaline immobilizasyonu için aşağıda Şekil 2.4'de belirtilen absorpsiyon, çapraz bağlanma, tutuklanma, kapsüllenme ve kovalent bağlanma gibi mekanizmaya dayalı olarak farklı tipte immobilizasyon teknikleri kullanılabilir. Bu metotların her birinin avantaj ve dezavantajları vardır, bu da söz konusu metotların birbiriyle karşılaştırılmasını zorlaştırır. Örneğin, absorpsiyon yöntemi, diğer immobilizasyon yöntemlerinden daha basit ve uygun maliyetlidir. Enzimde herhangi bir kimyasal değişikliğe neden olmaz. Ancak bu yöntemin dezavantajı ise enzim ve substrat arasındaki hidrojen bağı ya da Van der Waals ve elektrostatik etkileşimler gibi zayıf bağlardır. Benzer sıkıntılar yem endüstrisinde yoğunca kullanılan enzimlerde de görülmektedir [35].




**Şekil 2.4** Temel enzim immobilizasyon yöntemleri [36]

### 2.5.1 İmmobilize Enzimlerin Performansını Etkileyen Faktörler

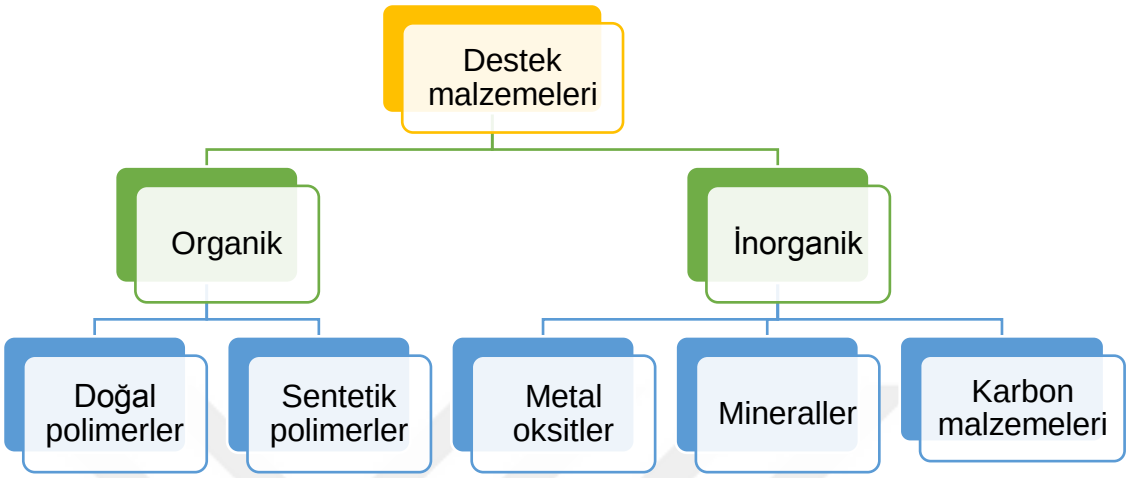
Yukarıda da belirtildiği gibi enzim immobilizasyonu için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır ve aşağıda Tablo 2.3'te belirtilen faktörler immobilize enzimlerin performansını etkilemektedir.

**Tablo 2.3** İmmobilize enzimlerin performansını etkileyen faktörler [37]

| Faktör | İmmobilizasyon etkisi |
|---|---|
| Hidrofobik bölünme | Hidrofobik substratın reaksiyon hızını arttırır. |
| Taşıyıcının mikro ortamı | Hidrofobik yapı enzimi stabilize eder. |
| Taşıyıcının çoklu bağlanması | Enzimin termal stabilitesinin geliştirir. |
| İmmobilize enzimlerin çeşitli türlerinin ara parçası veya kolu | Enzim deaktivasyonunu önler. |
| Difüzyon kısıtlamaları | Enzim aktivitesi azalır ve stabilite artar. |
| Substratların veya inhibitörlerin varlığı | Daha yüksek aktivite elde edilir. |
| Fiziksel tedavi sonrası | Enzim performansı iyileşir. |
| Farklı bağlama modu | Aktivite ve stabilite etkilenebilir. |
| Gözenek boyutu gibi taşıyıcının fiziksel yapısı | Aktivite tutma genellikle gözenek boyutuna bağlıdır. |
| Taşıyıcının fiziksel yapısı | Büyük gözenek boyutuna sahip taşıyıcılar, daha yüksek aktivite tutulmasına yol açan difüzyon sınırlamasını azaltır. |

### 2.5.2 Enzim İmmobilizasyonu İçin Kullanılan Destek Malzemeleri

Enzim immobilizasyonu için Şekil 2.5'te gösterilen farklı destek malzemeleri kullanılmaktadır [38, 39].



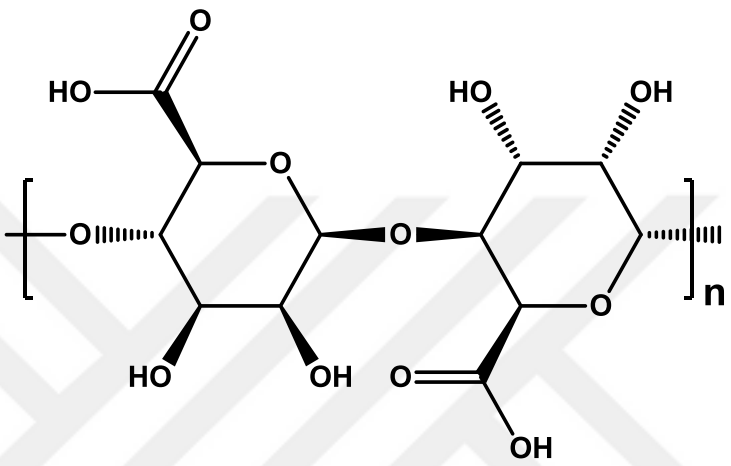

**Şekil 2.5** Enzim immobilizasyonu için kullanılan destek malzemeleri

Yukarıdaki şekilden de görüldüğü gibi enzim immobilizasyonu için kullanılan destek malzemeleri genel olarak organik ve inorganik olmak üzere başlıca iki grupta sınıflandırılmaktadır. Organik destek malzemeleri de kendi arasında doğal polimerler ve sentetik polimerler olmak üzere iki alt grupta sınıflandırılmaktadır. Destek malzemesi olarak kullanılan doğal sentetik polimerler arasında aljinat, kitosan, kitin, kollajen, jelatin, karagenan, selüloz, dekstran, nişasta ve sefaroz gibi doğada bulunan polimerler kullanılmakta iken sentetik polimer olarak kullanılan ve genellikle biyobozunur özelliğe sahip destek polimerleri arasında ise polivinil alkol (PVA), polietilen glikol (PEG), poliamid, polistiren (PS) ve poliakril amid yer almaktadır [40].

Enzim immobilizasyonu için kullanılan inorganik malzemeler ise kendi arasında metal oksitler, mineraller ve karbon malzemeleri olmak üzere üç alt gruba ayrılmaktadır. Destek malzemesi olarak kullanılan metal oksitler arasında titanyum oksit, alüminyum oksit ve zirkonyum oksit yer alırken, mineral olarak kullanılan destek malzemelerinin arasında bentonit, halloysit, kaolinit, montmorillonit ve sepiyolit bulunmaktadır. Enzim immobilizasyonu için karbon malzemesi olarak ise aktif karbon, modifiye edilmiş ve edilmemiş kömür kullanılmaktadır [38].

### 2.5.2.1 Aljinat

Kahverengi algler ve mikroorganizmalar (*Pseudomonas* ve *Azotobacter* gibi) tarafından üretilen aljinatlar, esas olarak α-L-guluronik ve β-D-manuronik asitlerden oluşan lineer kopolimerlerdir (Şekil 2.6). Bu polimer, manuronik ve guluronik asit oranlarında geniş bir çeşitlilik gösterir. Gıda, tekstil ve kâğıt endüstrisinde yaygın olarak kullanılan aljinat heterojen katalizörlerin oluşumu için bir biyomalzeme olarak büyük ilgi uyandıran özelliklere sahiptir [40].



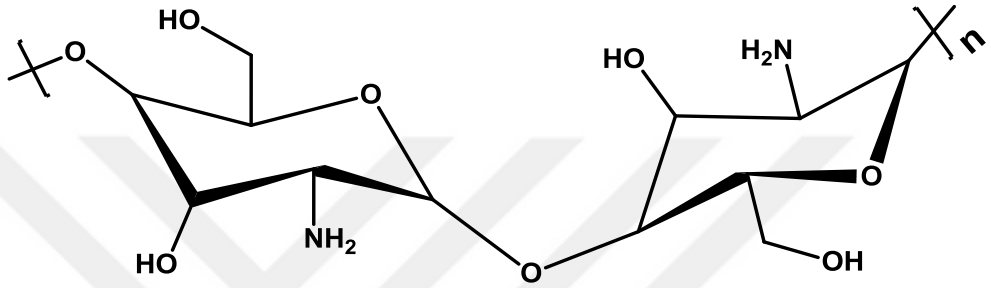

**Şekil 2.6** Aljinik asidin yapısı

Aljinatın sodyum tuzu olan sodyum aljinat (SA) ise deniz yosunlarından ekstrakte edilen doğal bir lineer anyonik polimerdir. Düşük toksisitesi, biyouyumluluğu, biyolojik bozunması ve yenilenebilirliği nedeniyle selüloz, kitosan, protein ve nişastanın yanı sıra doğal hammadde olarak da kullanılmaktadır. Bu doğal polimerler arasında sodyum aljinat, suda çözünür yapısı, pH'a karşı duyarlı değişikliliği ve sıcaklıktan dolayı biyolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu doğal polisakkarit, toksik olmaması ve yenilenebilir olması nedeniyle kozmetik, ilaç dağıtımı, tekstil, doku mühendisliği ve yara örtü malzemesi gibi biyomalzeme uygulamalarında çokça tercih edilmektedir [3].

### 2.5.2.2 Kitosan (CS)

Kitosan, kitinden deasetilasyon yoluyla elde edilen ve amino ($-NH_2$) gruplarından oluşan bir polikatyonik polisakkarittir (Şekil 2.7). Kitosan, selüloza benzer bir moleküler yapıya sahip olup iki biyopolimer sadece fonksiyonel gruplarında farklılık gösterir. Selülozda olduğu gibi kitosanın genel yapısında hidroksil grupları bulunur,

ancak amino gruplarının varlığı aralarındaki temel fark olarak ortaya çıkar. Yapısında amino gruplarının varlığı ve kolay protonlanma özelliği kitosanı bitkisel liflerden ayırır. Doğrusal zincirleri boyunca bu amino grupları üzerindeki pozitif yükler, negatif yüklü gruplar içeren moleküllerle elektrostatik etkileşimlerin gelişmesine olanak sağlar. Kitosan, antimikrobiyal özelliği, biyouyumluluğu, biyolojik olarak parçalanabilirliliği ve düşük toksisitesi gibi özelliklerinden dolayı kozmetik, ilaç, gıda endüstrilerinde ve biyomalzemelerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [40].




**Şekil 2.7** Kitosanın yapısı

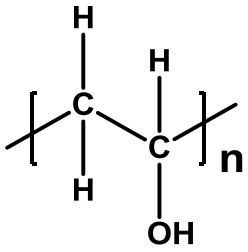
Kitosan, enzim immobilizasyonu için de en sık kullanılan biyopolimerden birisidir. Enzim immobilizasyonu için kitosan mikroküre, makrogözenekli yapı, hidrojeller, membranlar, nanokristal ve nanofiber gibi çeşitli form ve şekillerde kullanılabilmektedir [38].

Kitosan, yapısındaki katyonik amino gruplarının varlığından dolayı zayıf asit çözeltisinde çözünmesi ve kolay topaklaşması nedeniyle elektro-eğirme için uygun bir doğal polimer değildir. Bu dezavantajı gidermek amacıyla, kitosan polietilen oksit (PEO) ve polivinil alkol (PVA) gibi yüksek elektro-eğirme özelliğine sahip sentetik polimer ile harmanlanarak kullanılır. Kitosan içeren nanofiberler daha fazla ilgi görmüş ve ilaç salınımı, yara örtü malzemesi, doku mühendisliği iskeleleri, enzim immobilizasyonu ve filtrasyon gibi uygulamalarda kullanılmaktadır [41].

### 2.5.2.3 Polivinil alkol (PVA)

Polivinil alkol (PVA) polar, suda çözünür, hidrofilik özelliklerine sahip biyolojik olarak parçalanabilen sentetik bir polimerdir. PVA, esnek bir polimerdir ve büyük ölçüde

biyolojik olarak parçalanabilen –OH bağlarından oluşan bir omurgaya sahiptir (Şekil 2.8).




**Şekil 2.8** Polivinil alkolün yapısı

PVA'nın biyolojik olarak bozunabilirliği, nihai olarak, biyolojik uygulamalar için potansiyel olarak kullanılan hidroliz derecesi ve moleküler ağırlığı ile belirlenir. Ayrıca, PVA; iyi film oluşturma kabiliyetine, katı yapışmaya ve mükemmel termal stabiliteye sahiptir. PVA, çözünürlük eğilimi ve bozunma kolaylığı nedeniyle "yeşil polimer" olarak da bilinir. PVA, yaşlanma etkisinin üstesinden gelmek için tıbbi ve farmasötik uygulamalarda kullanılmak amacıyla kimyasal olarak çapraz bağlanabilir veya stabilize edilebilir. Bunun dışında PVA, hidrofilik özellikleri ve uyumlu yapısı nedeniyle mekanik özelliklerin geliştirilmesine yardımcı olmak için yaygın olarak diğer bileşiklerle karıştırılır [42].

Polivinil alkol de; boncuk, mikroküreler, nanofiber ve filmler şeklindeki gözenekli PVA matrisi, düzenli muntazam gözenek yapısı, büyük gözenek boyutu, büyük yüzey alanı ve iyi biyouyumlulukları nedeniyle enzim immobilizasyonu için destek malzemesi olarak kullanılabilir. PVA, zayıf mekanik özelliklere sahip olup sudaki çözünürlüğü de düşük bir polimerdir. Buna bağlı olarak, PVA; hücre ve enzimlerin sızmasına yol açar, böylece enzim aktivitesini ve immobilizasyon etkinliğini azaltır [43].

## 2.6 Elektro-Eğirme (Elektrospinning) Yöntemi

Elektro-eğirme yöntemi, enzimlerin immobilizasyonu için umut verici bir teknoloji olarak ortaya çıkmaktadır. Bu teknik, bir malzeme çözeltisinin yüksek voltajlı bir elektrik alanına maruz bırakılmasını içeren sıvıların elektrodinamik işlenmesine dayanmaktadır. Akışkanda üretilen elektrostatik kuvvetler nedeniyle malzeme, mikro veya nanofiberlerin kuru formunda toplayıcıda biriktirilmeden önce çözücü buharlaşır.

Elektro-eğirme metodu, nanofiberli membranların yüksek yüzey alanı ve gözenekli yapısından dolayı diğer immobilizasyon tekniklerine kıyasla çeşitli avantajlar sunar. Bu özellikler, immobilize enzimlerin katalitik kapasitesini büyük ölçüde artırabilir. Bununla birlikte, elektro-eğirme metodu oda sıcaklığında tek adımlı immobilizasyonu mümkün kılar. Böylece enzimi, denatürasyon şansını artırabilecek birkaç immobilizasyon aşamasına maruz bırakmaktan kaçınır. Elektro-eğirme tekniğinin çok yönlülüğü nedeniyle, birçok çalışma, farklı enzimlerin immobilize edilmiş formdaki aktivitesini iyileştiren farklı malzeme matrisleri ile elektro-eğirme yönteminin kullanıldığı bildirmiştir [44].

Elektro-eğirme yöntemi ile üretilen polimerik, kompozit ve seramik kompozit esaslı nanofiberler çok iyi mekanik özellik göstermesinin yanında çok geniş bir kullanım alanına sahiptirler. Nanofiberler; doku mühendisliği, katalizör, batarya, elektronik sensor, filtre membran, tıbbi implant, yara örtü malzemesi, tıbbi kumaşlar, gıda katkı maddesi, antimikrobiyal paketleme ve enzim immobilizasyonu gibi farklı alanlarda potansiyel uygulamalara sahiptir [45, 46].

Son yıllarda, nanomalzemelerin ve elektro-eğirme teknolojisinin gelişmesiyle, nanofiberler üzerinde enzimlerin immobilizasyonu üzerine araştırmalar büyük ilerleme kaydetmiştir. Lipaz, proteaz ve fitaz gibi nanofiberlere immobilize edilen ve enzim içeren nanofiber membranlar, elektro-eğirme ile başarılı bir şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan enzim içeren nanofiberler ise kirletici maddelerin bozunması, biyoreaktörler ve biyosensörler gibi birçok alandaki uygulamalarda kullanılmıştır [47].

### 2.6.1 Nanofiberler

Enzim immobilizasyonu için destek olarak kullanılan diğer nanomalzemelerle karşılaştırıldığında, nanofiberler; yüzey alanı/hacim oranı, kütle transfer direnci, etkili yükleme ve geri dönüşüm kolaylığı gibi immobilize enzimlerin katalitik performansını yöneten kilit faktörleri dengelemede umut verici bir gelişme sağlar. Sentetik ve doğal polimerler, elektro-eğirme adı verilen fiziksel bir işlemle nanofiberler halinde üretilebilir. İşlemin çalışması için sadece basit bir aparat gerekir. Ancak, besleme stoku malzemelerinin seçiminde çok esnek olduğu ve ayrıca enzim immobilizasyonu için tipik olarak önemli parametreler olan boyut ve yüzey morfolojisi gibi nanofiberlerin özelliklerini kontrol etmek ve işlemek için etkili olduğu kanıtlanmıştır [47].

Enzim immobilizasyonu için kullanılan çeşitli nanomalzeme türleri arasındaki nanofiberler; ara bağlantı konfigürasyonu nedeniyle kütle transferi sınırlamasını ve sensör ve filtre imalatlarında kullanımını en aza indirmek için özel bir öneme sahiptir. Elektrik alanında fiber oluşum mekanizması oldukça karmaşık olmasına rağmen çok basit bir kurulumu vardır. Bir yüksek voltajlı güç kaynağı, iğne ve iletken toplayıcıdan oluşan elektro-eğirme yöntemi ile çeşitli polimerik nanofiberler hazırlanabilmektedir.

Elektron eğirme, çok çeşitli sentetik ve doğal polimerlerin yanı sıra kompozit malzemelere uyan çok yönlü bir teknolojidir. Boyut, yüzey morfolojisi ve fiber hizalaması dahil olmak üzere elde edilen nanofiberlerin özellikleri, besleme stoku malzemeleri ve eğirme koşulları manipüle edilerek kontrol edilebilir [3].

# 3
# MATERYAL VE METOT

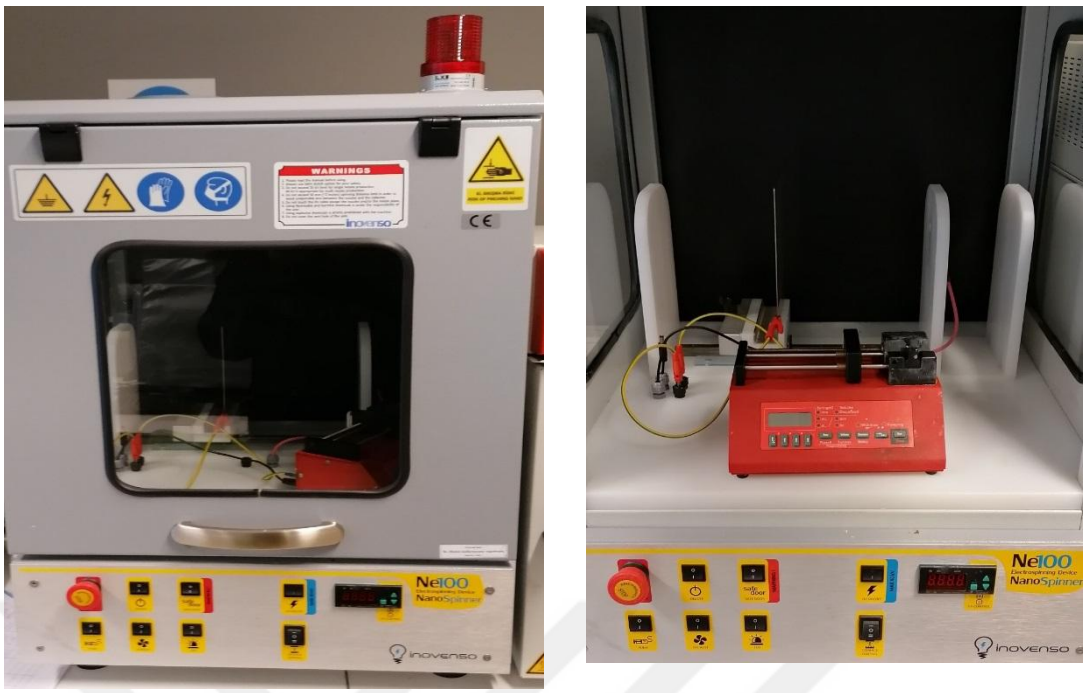
## 3.1 Kullanılan Malzeme ve Kimyasallar

Antep fıstığı, asma yaprağı, ayçiçeği çekirdeği, badem, barbunya, bezelye, börülce, buğday, bulgur, ceviz, fasulye, fındık, kabuklu ve kabuksuz iç bakla, kırmızı mercimek, kabuklu ve kabuksuz kabak çekirdeği, kavun çekirdeği, Meksika fasulyesi, menengiç kahvesi, mısır, nohut, pirinç, soya fasulyesi, susam, yeşil mercimek, yer fıstığı ve yulaf uygun fitaz kaynağının belirlenmesi için yerel marketlerden temin edildi.

Polivinil alkol (PVA, molekül ağırlığı= 60 kDa), kitosan (CS, orta molekül ağırlıklı), sodyum aljinat (SA), amonyak ($NH_3$), amonyum molibdat ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$), amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$), asetik asit ($CH_3COOH$), askorbik asit, sığır serum albümin (BSA), dimetil formamid (DMF), formaldehit ($CH_2O$), L-fenil alanin (Phe), glisin (Gly), hidroklorik asit (HCl), metanol (MeOH), n-heksan, L-sistein (Cys), sodyum asetat (NaOAc), sodyum fitat (Na-fitat), sodyum hidroksit (NaOH), sülfürik asit ($H_2SO_4$), L-tirozin (Tyr), trikloro asetik asit (TCA), L-triptofan (Trp), L-alanin (Ala), L-arjinin (Arg), L-histidin (His), üre, EDTA, gliserol, tris(hidroksi metil)amino metan (Tris) ve Triton X-100 ticari olarak Sigma Aldrich firmasından temin edildi ve hiçbir saflaştırma işlemi uygulanmadan kullanıldı.

## 3.2 Kullanılan Cihazlar

Nanofiberlerin hazırlanması için Invenso Ne100 Nanospinner Elektrospinning cihazı kullanıldı. Nanofiber hazırlanması için kullanılan elektrospinning cihazı Şekil 3.1'de gösterildi.




**Şekil 3.1** Nanofiberlerin hazırlanması için kullanılan elektrospinning cihazı

Elde edilen nanofiberlerin kristalin yapıları hakkında bilgi edinmek ve XRD desenlerinin aydınlatılması için Panalytical X'Pert PRO X-Işınları Kırınımı (XRD) cihazı kullanıldı. Elde edilen fiberlerin nanoyapılarının, boyut, şekil ve dağılım durumlarının aydınlatılması Zeiss EVO LS 10 Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) kullanılarak gerçekleştirildi. Nanofiberlerin moleküler yapılarının ve kimyasal bağlarının aydınlatılması amacıyla ATR üniteli Thermo Scientific (Nicolet iS10) Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) kullanıldı. Hazırlanan fiberlerin termal kararlılıklarını belirlemek amacıyla Perkin-Elmer Pyris Sapphire Termogravimetrik Analiz (TGA) cihazı, nanofiberlerin termal geçiş sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla ise Perkin-Elmer Pyris Sapphire Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) cihazı kullanıldı.

Enzim aktivitesinin ve protein miktarının belirlenmesi için Perkin-Elmer UV-Vis spektrofotometresi kullanıldı. Enzim aktivitesi tayinlerinde enzimin farklı sıcaklıklarda inkübasyonu ve fitaz aktivitesinin belirlenmesi için GFL 1086 çalkalamalı su banyosu kullanıldı. Tampon çözeltilerin hazırlanması için Sartorius Basic Meter PB-11 pH metre cihazı kullanılırken maddelerin çöktürülmesi için ise Sigma 3K30 ve Hettich EBA-20 santrifüjleri kullanıldı.

## 3.3 Ham Özüt Hazırlama

Yerel marketlerden tedarik edilen ve uygun fitaz kaynağını belirlemek amacıyla kullanılacak olan bitki kaynaklarından (Antep fıstığı, asma yaprağı, ayçiçeği çekirdeği, badem, barbunya, bezelye, börülce, buğday, bulgur, ceviz, fasulye, fındık, kabuklu ve kabuksuz iç bakla, kırmızı mercimek, kabuklu ve kabuksuz kabak çekirdeği, kavun çekirdeği, Meksika fasulyesi, menengiç kahvesi, mısır, nohut, pirinç, soya fasulyesi, susam, yeşil mercimek, yer fıstığı ve yulaf) 10 g tartılarak 100 mL 0,1 M sodyum asetat tamponu (pH 5,0) içerisinde eklendi ve kütlece %10'luk (w/v) çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözelti +4$^{o}$C'de bir gece buzdolabında bekletildi ve sonraki gün bir karıştırıcı (Waring) yardımıyla homojenizasyon için mekanik olarak belirtilen sıcaklıkta parçalandı. Daha sonra, parçalanan bitki kaynakları iki kat bez tülbentten süzüldü. Süzme işlemi sonrasında elde edilen homojenatlar 10 dakika boyunca 10000 rpm'de +4$^{o}$C'de santrifüjlendi. Santrifüj işlemi sonrasında elde edilen üstteki kısım ham özüt olarak adlandırılarak alındı. Elde edilen ham özütün enzimatik aktivitesi ve protein miktarları hesaplanarak sonuçlar total ünite ve spesifik aktivite olarak hesaplandı.

## 3.4 Börülceden Fitazın İzole Edilmesi

Elde edilen ham özütten fitazın izolasyonu için, ham özüt öncelikle kütlece yüzde farklı konsantrasyonlarda (%10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90) amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$) ile doyuruldu ve en fazla enzimatik aktivitenin olduğu amonyum sülfat doyurma yüzdesi belirlendi. Daha sonra, amonyum sülfat ile doyurulan çözelti diyaliz kesesi yardımıyla diyaliz edildi. Diyalize edilen fitaz daha sonraki enzimatik aktivite belirleme çalışmalarında kullanılmak üzere -20$^{o}$C'de saklandı.

## 3.5 İnorganik Fosfat Miktarının Hesaplanması

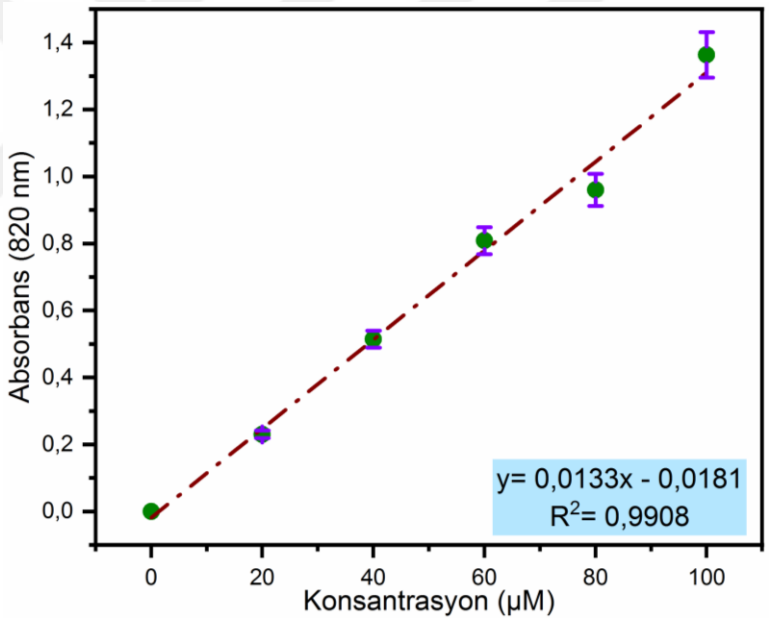
Fitaz sodyum fitatın hidrolizlenmesi sonucunda açığa çıkan inorganik fosfat askorbik asit metodu kullanılarak belirlendi [48].

İnorganik fosfat miktarının hesaplanması için öncelikle farklı konsantrasyonlarda (20, 40, 60, 80 ve 100 μM) potasyum dihidrojen fosfat ($KH_2PO_4$) çözeltileri hazırlandı ve hazırlanan çözeltilerin absorbans değerleri askorbik asit metoduna göre Tablo 3.1'deki gibi spektroskopik olarak 820 nm'de ölçüldü.

**Tablo 3.1** İnorganik fosfat miktarının ölçümü

| Reaksiyon Bileşenleri | Örnek | Kör |
|---|---|---|
| Standart çözelti | 2 mL | - |
| Distile su | - | 2 mL |
| Renk çözeltisi | 2 mL | 2 mL |
| Karıştırma | | |
| 50°C'de 15 dakika inkübasyon | | |
| Oda sıcaklığına soğutma ve 820 nm'de spektrofotometrik ölçüm | | |

Bu ölçümlerde renk çözeltisi olarak yeni hazırlanan ve sırasıyla 3:1:1 oranında karıştırılan 1,0 M sülfürik asit ($H_2SO_4$), %2,5 (w/v) amonyum molibdat ($(NH_2)_4MoO_4$) ve %10 (w/v) askorbik asit çözeltileri kullanıldı. Elde edilen absorbans değerlerinin fosfat derişimine karşılık grafiği çizilerek standart grafik elde edildi (Şekil 3.2).




**Şekil 3.2** İnorganik fosfat miktarının hesaplanması için elde edilen standart eğri (n= 3)

Elde edilen grafikten de görülebileceği gibi doğru denklemi y= 0,0133x – 0,0181, regresyon katsayısı ($R^2$) ise 0,9908 olarak hesaplandı. Uygun fitaz kaynağının saptanması için kullanılan bitki kaynaklarının inorganik fosfat miktarları bu denklem kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar total ünite olarak verildi.

## 3.6 Protein Miktarının Belirlenmesi

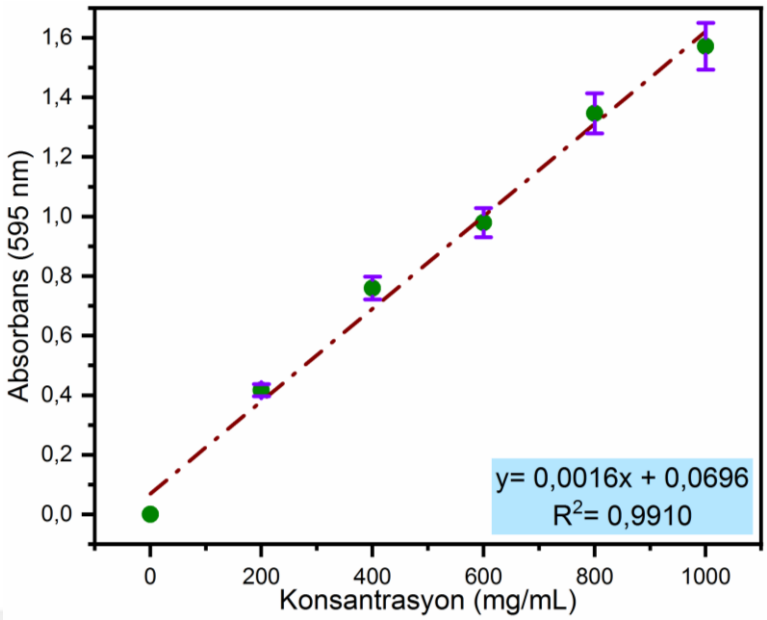
Protein miktarının belirlenmesi Bradford metoduna göre sığır serum albümini (BSA) kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle farklı konsantrasyonlarda (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1,0 mg/mL) BSA çözeltileri hazırlandı ve hazırlanan çözeltilerin 595 nm'deki absorbans değerleri Bradford metoduna göre Tablo 3.2'ye göre spektroskopik olarak ölçüldü [49].

**Tablo 3.2** İnorganik fosfat miktarının ölçümü

| **Reaksiyon Bileşenleri** | **Örnek** | **Kör** |
|---|---|---|
| Standart çözelti | 100 µL | - |
| Distile su | - | 100 µL |
| Renk çözeltisi | 5 mL | 5 mL |
| Karıştırma | | |
| 5 dakika oda sıcaklığında bekletme | | |
| 595 nm'de spektrofotometrik ölçüm | | |

Bu ölçümlerde kullanılan renk çözeltisi aşağıdaki gibi hazırlandı:

0,1 g Coomassie Blue G-250 50 mL etanol içerisinde çözüldü ve üzerine 100 mL hacimce %85'lik (*v/v*) *o*-fosforik asit eklendi ve çözelti hacmi 1000 mL'ye tamamlandı. Daha sonra hazırlanan çözelti süzülerek koyu renkli bir şişe içerisinde depo edildi. Elde edilen absorbans değerlerinin BSA derişimine karşılık grafiği çizilerek standart grafik elde edildi (Şekil 3.3) [49].




**Şekil 3.3** Protein miktarının hesaplanması için elde edilen standart eğri (n= 3)

Elde edilen grafikten de görülebileceği gibi doğru denklemi y= 0,0016x + 0,0696, regresyon katsayısı ($R^2$) ise 0,9910 olarak hesaplandı. Uygun fitaz kaynağının saptanması için kullanılan bitki kaynaklarının protein miktarları bu denklem kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar total protein olarak verildi.

## 3.7 Serbest ve İmmobilize Fitazın Aktivitesinin Ölçülmesi

Serbest enzim ve börülceden kısmi saflaştırılmış fitaz içeren nanofiberlerin enzimatik aktivitesinin kantitatif tayini için sodyum fitatın substrat olarak kullanıldı ve aktivite tayini belirtilen standart deney koşullarında aşağıdaki prosedüre göre gerçekleştirildi (Tablo 3.3):

Hem örnek hem de kör çözeltisi olarak bir deney tüpü içerisine 350 µL 0,1 M sodyum asetat (NaOAc, pH 5,0) tamponu alındı ve üzerine 0,1 M NaOAc (pH 5,0) içerinde çözülerek hazırlanan 2 mM sodyum fitat çözeltisi eklendi. Her iki deney tüpü içerisindeki çözelti 50$^{o}$C'de 10 dakika boyunca su banyosu içerisinde inkübe edildi. Daha sonra inkübasyon ortamından alınan çözeltilerden örnek çözeltisi içerisine 150 µL fitaz, kör çözeltisi içerisine ise aynı miktarda 0,1 M NaOAc tamponu (pH 5,0) eklenerek 50$^{o}$C'de 30 dakika boyunca su banyosu içerisinde tekrar inkübe edildi. Fitazın substratla inkübasyonu sonunda, her iki deney tüpündeki reaksiyon ortamına

400 µL %15 (*w/v*) trikloroasetik asit (TCA) eklenmesi ile reaksiyon durduruldu. Karışım 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Fitaz aktivitesini belirlemek için 0,2 mL fitaz içeren çözeltiden alınarak üzerine 1,8 mL distile su eklendi. Karışıma 2 mL renk reaktifi (3:1:1; $H_2SO_4$ (1,0 M): askorbik asit (%10,0; *w:v*): amonyum molibdat (%2,5; w:v)) eklendi ve karışım 50°C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra ortam sıcaklığına kadar soğutuldu. Daha sonra, soğutulan örneklerin absorbans değerleri kör çözeltisine karşı UV-Vis spektrofotometre kullanılarak 820 nm'de ölçüldü [50].

**Tablo 3.3** Fitaz aktivite tayini için standart deney bileşenleri

| Reaksiyon Bileşenleri | Örnek | Kör |
|---|---|---|
| 0,1 M Sodyum Asetat Tamponu (pH 5,0) | 350 µL | 350 µL |
| 2 mM Sodyum Fitat (0,1 M Sodyum Asetat Tampon) | 100 µL | 100 µL |
| 50°C'de 10 dakika inkübasyon | | |
| Enzim Çözeltisi | 150 µL | - |
| 0,1 M Sodyum Asetat Tamponu (pH 5,0) | - | 150 µL |
| 50°C'de 30 dakika inkübasyon | | |
| %15 TCA (w/v) | 400 µL | 400 µL |
| 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj | | |
| 0,2 mL süpernatant + 1,8 mL distile su + 2,0 mL renk çözeltisi | | |
| 50°C'de 15 dakika inkübasyon | | |
| 820 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümü | | |

Fitaz aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Hacimsel aktivite (U/mL)} = \frac{P_i \, x \, V_T}{t \, x \, V_E} \tag{4.1}$$

$$\text{Spesifik aktivite (U/mg protein)} = \frac{Hacimsel\ aktivite}{mg\ protein/mL} \tag{4.2}$$

$P_i$: İnorganik fosfat konsantrasyonu (µM)

$V_T$: Toplam reaksiyon hacmi (mL)

t: İnkübasyon süresi (dakika)

$V_E$: Reaksiyon karışımındaki fitaz hacmi (mL)

## 3.8 Serbest ve İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu

### 3.8.1 Fitaz Aktivitesine pH Etkisinin İncelenmesi

Börülceden izole edilen enzimin optimum pH değerini belirlemek amacıyla pH 2 ile 9 aralığında serbest ve immobilize fitazın katalitik aktivite değerleri belirlendi. pH 2 ve pH 3 aralığında glisin-HCl tamponu, pH 4-6 aralığında sodyum asetat (NaOAc) tamponu, pH 7-9 aralığında ise Tris-HCl tamponu kullanıldı. Serbest ve immobilize fitazın optimum pH değeri 2 mM sodyum fitat substrat çözeltisi kullanılarak aktivite tayin yöntemine göre belirlendi.

### 3.8.2 Fitaz Aktivitesine Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi

Börülceden kısmi saflaştırılmış fitazın en yüksek aktivite gösterdiği pH (pH 5) değerindeki tamponda substrat çözeltisi hazırlandı. Serbest ve immobilize fitazın optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 25-95°C aralığındaki sıcaklıklarda enzimin aktivitesi 2 mM sodyum fitat varlığında aktivite tayin yöntemine göre belirlendi.

### 3.8.3 Serbest ve İmmobilize Fitazın Termal Kararlılığı ve Kinetik Sabitlerin Tayini

Börülceden kısmi saflaştırılmış serbest ve immobilize fitazın termal kararlılık özelliğini belirlemek amacıyla enzim, 30-90°C arasında 10, 20 ve 30 dakika boyunca inkübe edildi ve fitaz aktivite tayin yöntemine göre enzimin aktivitesi belirlendi. Standart aktivite ölçüm koşullarına göre her bir sıcaklıktaki bekleme süresi sonunda yapılan ölçümlerden elde edilen aktivite değerleri % bağıl aktivite olarak hesaplandı.

1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2 ve 2.4 mM konsantrasyonlarda hazırlanmış olan sodyum fitat substrat çözeltilerine karşı aktivite tayin yöntemine göre serbest ve immobilize fitazın aktivitesi belirlendi. Serbest ve immobilize fitazın kinetik sabitleri (Km ve Vmax) ise Lineweaver-Burk denklemi kullanılarak hesaplandı.

### 3.8.4 Serbest ve İmmobilize Fitazın Aktivitesi Üzerine Metal İyonları Etkisinin İncelenmesi

Farklı metal iyonlarının serbest ve immobilize fitazın aktivitesi üzerine etkisi 20 mM metal katyonu kullanılarak serbest ve immobilize fitazın aktivitesi 2 mM sodyum fitat varlığında aktivite tayin yöntemine göre belirlendi. Fitazın katalitik aktivitesi üzerine metal iyonunu belirlemek amacıyla demir (II) klorür ($FeCl_2$, $Fe^{2+}$), gümüş nitrat ($AgNO_3$, $Ag^+$), alüminyum klorür ($AlCl_3$, $Al^{3+}$), bakır (II) klorür ($CuCl_2$, $Cu^{2+}$), lityum sülfat ($Li_2SO_4$, $Li^+$), çinko klorür ($ZnCl_2$, $Zn^{2+}$), kobalt (II) klorür ($CoCl_2$, $Co^{2+}$), mangan sülfat ($MnSO_4$, $Mn^{2+}$), sodyum klorür (NaCl, $Na^+$), baryum klorür ($BaCl_2$, $Ba^{2+}$), nikel (II) klorür ($NiCl_2$, $Ni^{2+}$), kalsiyum klorür ($CaCl_2$, $Ca^{2+}$), potasyum klorür (KCl, $K^+$) ve magnezyum sülfat ($MgSO_4$, $Mg^{2+}$) kullanıldı.

### 3.8.5 Serbest ve İmmobilize Fitazın Aktivitesi Üzerine Organik Bileşen Etkisinin İncelenmesi

Organik bileşen etkisinin serbest ve immobilize fitazın aktivitesi üzerine etkisi %1'lik (*v/v*) organik bileşen çözeltisi kullanılarak enzimin aktivitesi 2 mM sodyum fitat varlığında aktivite tayin yöntemine göre belirlendi. Fitazın katalitik aktivitesi üzerine çeşitli organik bileşen etkisini incelemek amacıyla L-alanin (Ala), L-arjinin (Arg), L-

sistein (Cys), glisin (Gly), L-histidin (His), L-fenilalanin (Phe), L-tirozin (Tyr), L-triptofan (Trp), sığır serum albümin (BSA), üre, EDTA ve gliserol kullanıldı.

### 3.8.6 Serbest ve İmmobilize Fitazın Aktivitesi Üzerine Organik Çözücülerin Etkisinin İncelenmesi

Organik çözücü etkisinin serbest ve immobilize fitazın aktivitesi üzerine etkisi %1'lik (*v/v*) organik çözücü çözeltisi kullanılarak enzimin aktivitesi 2 mM sodyum fitat varlığında aktivite tayin yöntemine göre belirlendi. Serbest ve nanofibere immobilize edilen fitazın katalitik aktivite etkisini incelemek amacıyla aseton, dimetil formamid (DMF), formaldehit, etanol (EtOH), n-heksan ve metanol (MeOH) kullanıldı.

### 3.8.7 Serbest ve İmmobilize Fitazın Aktivitesi Üzerine Asit ve Bazların Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve PVA, PVA-CS ile PVA-SA nanofiberlerine immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi üzerine asit ve baz etkisi %1'lik (*v/v*) asit ve baz çözeltisi kullanılarak enzimin aktivitesi 2 mM sodyum fitat varlığında aktivite tayin yöntemine göre belirlendi. Enzimin katalitik aktivitesi üzerine asit etkisini incelemek için asetik asit ($CH_3COOH$), hidroklorik asit (HCl) ve sitrik asit ($C_6H_8O_7$) kullanılırken baz etkisini incelemek amacıyla amonyak ($NH_3$), sodyum hidroksit (NaOH) ve potasyum hidroksit (KOH) kullanıldı.

### 3.8.8 Serbest ve İmmobilize Fitazın Aktivitesi Üzerine Deterjanların Etkisinin İncelenmesi

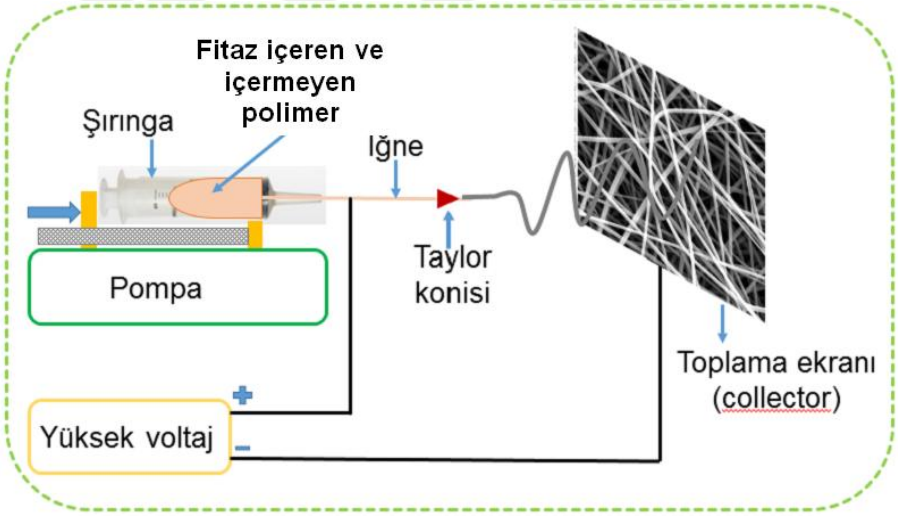
Serbest ve PVA, PVA-CS ile PVA-SA nanofiberlerine immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi üzerine deterjan etkisi %1'lik (*v/v*) deterjan çözeltisi kullanılarak enzimin aktivitesi 2 mM sodyum fitat varlığında aktivite tayin yöntemine göre belirlendi. Enzimin katalitik aktivitesi üzerine deterjan etkisini incelemek için deterjan olarak sodyum dodesil sülfat (SDS), Tween-80 ve Triton X-100 kullanıldı.

### 3.8.9 Serbest ve İmmobilize Fitazın Depo Kararlılığının Belirlenmesi

Serbest ve nanofiberlere immobilize edilen fitazın depo kararlılığını belirlemek amacıyla numuneler amonyum fosfat tamponu içerisinde -20$^{o}$C'de buzdolabında saklandı. 120 gün boyunca belirli zaman aralıklarında enzimin katalitik aktivitesi, fitaz aktivitesi belirleme yöntemine göre hesaplandı. İlk olarak ölçülen fitaz aktivitesi değeri 100 olarak kabul edilerek aktivite zamana karşı % bağıl aktivite olarak hesaplandı.

## 3.9 Elektrospinning Yöntemi ile Fiberlerin Hazırlanması

Fitaz immobilizasyonu için kullanacak olan fiberler laboratuar ölçekli elektro-eğirme (elektrospinning) cihazı kullanılarak üretildi (Şekil 3.4). Fiber üretimi için uygun elektrospinning ortam şartları sağlandıktan sonra (uygulanan voltaj, şırınga ile toplama ekranı arasındaki mesafe, akış hızı gibi) farklı fitaz ile polimer çözelti ve karışımları kullanılarak fiber üretimi gerçekleştirildi.

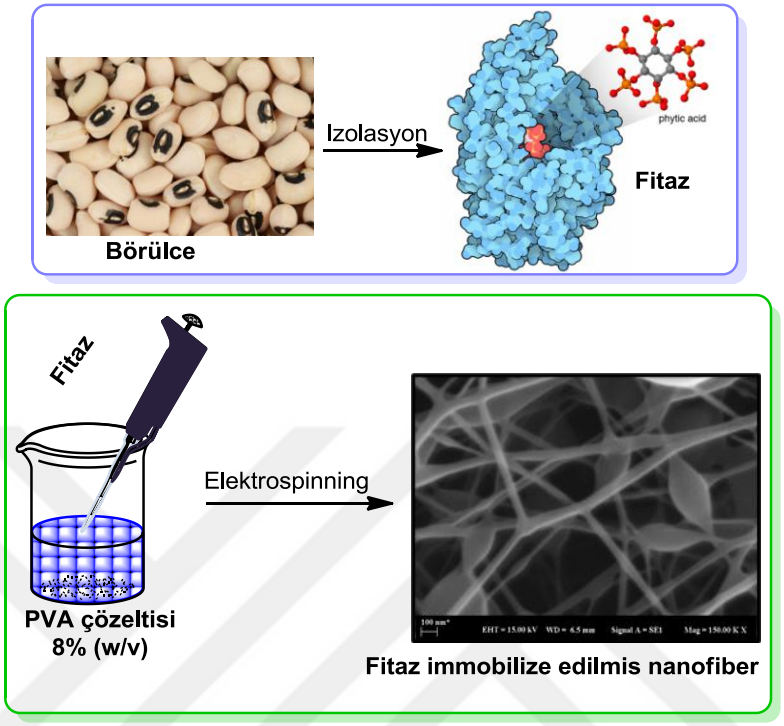



**Şekil 3.4** Fitaz içeren ve içermeyen fiberlerin üretimi

### 3.9.1 Polivinil alkol (PVA) İçeren Nanofiberlerin Üretimi

PVA içeren fiberlerin elde edilmesi için öncelikle 8 g PVA 100 mL 0,1 M sodyum asetat (NaOAc, pH 5,0) içerisinde çözülerek %8 (*w/v*)'lik çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan PVA çözeltisi içerisine farklı derişimlerde fitaz (%0,5, 1,0, 1,5 ve 2,0; *v/v*) eklendi ve çözelti karışımı 2 saat oda sıcaklığında düşük rpm'de manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra iç çapı 0,07 mm olan 5 mL'lik bir şırınga içerisine alınan PVA

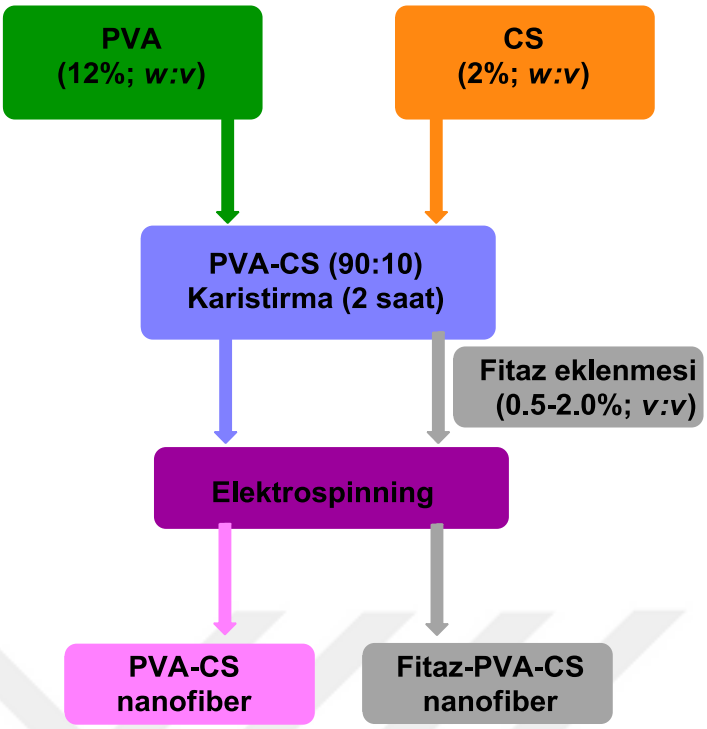
çözeltisi 23 kV, 1,5 mL/saat çözelti akış hızında ve iğne ile toplama ekranı arasındaki mesafe 13 cm olan elektrospinning parametreleri kullanılarak nanofiberler enzim içerecek ve içermeyecek şekilde üretildi (Şekil 3.5) [51].




**Şekil 3.5** Enzim içeren/içermeyen PVA nanofiberlerin eldesi

### 3.9.2 PVA ve Kitosan (CS) İçeren Nanofiberlerin Üretimi

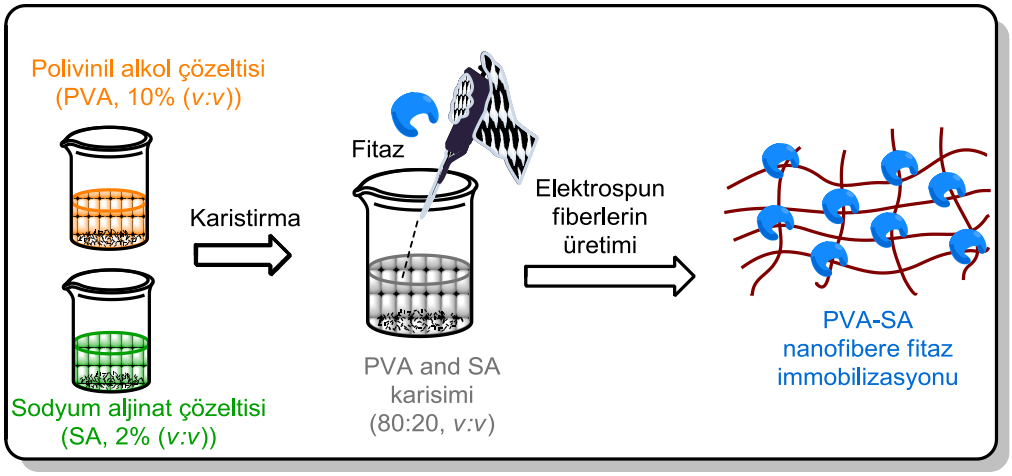
Polivinil alkol (PVA) ve kitosan (CS) içeren fiberlerin üretimi için öncelikle 12 g PVA ve 2 g CS 100 mL 0,1 M sodyum asetat (pH 5,0) içerisinde ayrı beherlerde çözülerek sırasıyla %12'lik (*w/v*) PVA ve %2'lik (*w/v*) CS çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerden 90 mL PVA ve 10 mL CS alınarak (*v/v*) bu iki çözelti bir beher içerisinde homojen bir çözelti elde edinceye kadar oda sıcaklığında karıştırıldı. Hazırlanan PVA-CS çözeltisi içerisine farklı derişimlerde (%0,5, 1,0, 1,5 ve 2,0; *v/v*) fitaz eklendi ve çözelti karışımı 2 saat oda sıcaklığında düşük rpm'de manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra iç çapı 0,07 mm olan 5 mL'lik bir şırınga içerisine alınan PVA-CS çözeltisi 23 kV, 0,5 mL/saat çözelti akış hızında ve iğne ile toplama ekranı arasındaki mesafe 12 cm olan elektrospinning parametreleri kullanılarak nanofiberler enzim içerecek ve içermeyecek şekilde üretildi (Şekil 3.6) [41].




**Şekil 3.6** Enzim içeren/içermeyen PVA-CS nanofiberlerin eldesi

### 3.9.3 PVA ve Sodyum Aljinat (SA) İçeren Nanofiberlerin Üretimi

Polivinil alkol (PVA) ve sodyum aljinat (SA) içeren fiberlerin elde edilmesi için öncelikle 10 g PVA ve 2 g SA 100 mL 0,1 M sodyum asetat (pH= 5.0) içerisinde ayrı beherlerde çözülerek sırasıyla %10'luk (*w/v*) PVA ve %2'lik (*w/v*) SA çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerden 80 mL PVA ve 20 mL SA alınarak (*v/v*) bu iki çözelti bir beher içerisinde homojen bir çözelti elde edinceye kadar oda sıcaklığında karıştırıldı. Hazırlanan PVA-SA çözeltisi içerisine farklı derişimlerde (%0,5, 1,0, 1,5 ve 2,0; *v/v*) fitaz eklendi ve çözelti karışımı 2 saat oda sıcaklığında düşük rpm'de manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra iç çapı 0,07 mm olan 5 mL'lik bir şırınga içerisine alınan PVA-SA çözeltisi 23 kV, 0,3 mL/saat çözelti akış hızında ve iğne ile toplama ekranı arasındaki mesafe 14 cm olan elektrospinning parametreleri kullanılarak nanofiberler enzim içerecek ve içermeyecek şekilde üretildi [3] (Şekil 3.7).




**Şekil 3.7** Enzim içeren/içermeyen PVA-SA nanofiberlerin üretimi

# 4
# DENEYSEL BULGULAR

## 4.1 Uygun Fitaz Kaynağının Saptanması

Çalışmanın ilk aşamasında uygun fitaz kaynağını belirlemek ve fitaz izolasyonunda kullanılmak üzere yerel marketlerden temin edilen 28 adet tahıl, kuruyemiş ve baklagil çeşidi bitki kaynağı olarak kullanıldı. Fitaz eldesi için kullanılan bitki kaynaklarının total ünite, total protein ve spesifik aktivite değerleri Tablo 4.1'de özetlendi.

**Tablo 4.1** Uygun fitaz kaynağının belirlenmesi için kullanılan bitki kaynakları

| Bitki kaynağı | Aile | Total ünite (U/mL) | Total protein (mg/mL) | Spesifik aktivite (U/mg protein) |
|---|---|---|---|---|
| Börülce | Fabaceae | 70,70±0,82 | 15,89±0,62 | 4,45±0,88 |
| Kabuklu iç bakla | Fabaceae | 35,98±0,10 | 15,04±0,08 | 2,39±0,07 |
| Kabuksuz iç bakla | Fabaceae | 16,35±0,13 | 26,33±0,33 | 0,61±0,02 |
| Buğday | Poaceae | 24,53±1,63 | 34,58±0,42 | 0,71±0,05 |
| Kabak çekirdeği içi | Cucurbitaceae | 16,60±4,68 | 49,84±4,35 | 0,33±0,20 |
| Kırmızı mercimek | Fabaceae | 45,69±2,46 | 80,84±0,45 | 0,57±0,05 |
| Yeşil mercimek | Fabaceae | 37,55±3,27 | 68,92±3,62 | 0,55±0,02 |
| Fasulye | Fabaceae | 7,74±0,08 | 15,11±0,32 | 0,51±0,03 |
| Nohut | Fabaceae | 3,97±1,44 | 83,08±3,10 | 0,05±0,02 |
| Meksika fasulyesi | Fabaceae | 25,55±0,33 | 65,98±0,20 | 0,34±0,05 |

**Tablo 4.1** Uygun fitaz kaynağının belirlenmesi için kullanılan bitki kaynakları (devamı)

| Bitki kaynağı | Aile | Total ünite (U/mL) | Total protein (mg/mL) | Spesifik aktivite (U/mg protein) |
|---|---|---|---|---|
| Barbunya | Fabaceae | 20,90±0,22 | 75,22±0,82 | 0,28±0,08 |
| Kavun çekirdeği | Cucurbitaceae | 5,68±0,07 | 39,39±0,12 | 0,14±0,02 |
| Yulaf | Poaceae | 37,36±0,16 | 40,62±0,10 | 0,92±0,05 |
| Antep fıstığı | Anacardiaceae | -* | 0,49±0,09 | - |
| Ayçiçeği çekirdeği | Asteraceae | - | 53,52±0,21 | - |
| Badem | Rosaceae | - | 77,13 ± 3,98 | - |
| Bulgur | Poaceae | - | 4,18±0,06 | - |
| Ceviz | Juglandaceae | - | 29,29±0,57 | - |
| Fındık | Betulaceae | - | 42,92±0,20 | - |
| Kabak çekirdeği kabuğu | Cucurbitaceae | - | 9,7±0,12 | - |
| Menengiç | Anacardiaceae | - | 15,10±0,17 | - |
| Mısır | Poaceae | - | 15,01±0,12 | - |
| Pirinç | Poaceae | - | 16,02±0,89 | - |
| Soya fasulyesi | Fabaceae | - | 4,93±0,11 | - |
| Susam | Pedeliaceae | - | 4,99±0,15 | - |
| Yer fıstığı | Fabaceae | - | 29,99±0,14 | - |
| Bezelye | Fabaceae | - | 65,14±0,14 | - |
| Asma yaprağı | Vitaceae | - | 21,38±0,38 | - |

* **-:** Total ünite ve spesifik aktivite gözlenmedi.

Reddy ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da belirtildiği üzere fitaz aktivitesi üzerine birkaç etmen etki etmektedir. Bunlardan ilki bitkilerin çimlenme süresidir. Çimlenme süresince bitkiler bakteriyel fitazlar tarafından hidrolizlenir ve bunun sonucunda da bitkideki fitaz aktivitesi düşmektedir. Bunun dışında çevresel değişiklikler, bitkinin yetiştirildiği coğrafi konum, göç şartları, toprak türü, kullanılan gübre türleri gibi çevresel etmenlerde bitkilerde bulunan fitaz miktarını etkilemektedir [52].

Elde edilen sonuçlardan ve Tablo 4.1'den de görüldüğü gibi uygun fitaz kaynağını saptamak amacıyla test edilen bitki kaynaklarından börülce (total ünite: 70,70±0,82 U/mL ve spesifik aktivite: 4,45±0,88 U/mg protein), kabuklu iç bakla (total ünite: 35,98±0,10 U/mL ve spesifik aktivite: 2,39±0,07 U/mg protein), kabuksuz iç bakla (total ünite: 16,35±0,13 U/mL ve spesifik aktivite: 0,61±0,02 U/mg protein), buğday (total ünite: 24,53±1,63 U/mL ve spesifik aktivite: 0,71±0,05 U/mg protein), kabak çekirdeği içi (total ünite: 16,60±4,68 U/mL ve spesifik aktivite: 0,33±0,20 U/mg protein), kırmızı mercimek (total ünite: 45,69±2,46 U/mL ve spesifik aktivite: 0,57±0,05 U/mg protein), yeşil mercimek (total ünite: 37,55±3,27 U/mL ve spesifik aktivite: 0,55±0,02 U/mg protein), fasulye (total ünite: 7,74±0,08 U/mL ve spesifik aktivite: 0,51±0,03 U/mg protein), nohut (total ünite: 3,97±1,44 U/mL ve spesifik aktivite: 0,05±0,02 U/mg protein), Meksika fasulyesi (total ünite: 25,55±0,33 U/mL ve spesifik aktivite: 0,34±0,05 U/mg protein), barbunya (total ünite: 20,90±0,22 U/mL ve spesifik aktivite: 0,28±0,08 U/mg protein), kavun çekirdeği (total ünite: 5,68±0,07 U/mL ve spesifik aktivite: 0,14±0,02 U/mg protein) ve yulaf (total ünite: 37,36±0,16 U/mL ve spesifik aktivite: 0,92±0,05 U/mg protein) için total ünite, total protein ve spesifik aktivite değerleri hesaplandı. Diğer bitki kaynakları (Antep fıstığı, ayçiçeği çekirdeği, badem, bulgur, ceviz, fındık, kabak çekirdeği kabuğu, menengiç, mısır, pirinç, soya fasulyesi, susam, bezelye, asma yaprağı ve yer fıstığı) için ise total ünite belirlenemediği için spesifik aktivite değerleri de hesaplanamadı.

Elde edilen sonuçlara göre en fazla total ünite ve spesifik aktivite değerleri börülce bitkisinden elde edildi. Bu yüzden, çalışma kapsamında uygun fitaz kaynağı olarak börülce bitkisi kullanıldı.

## 4.2 Börülceden Fitazın İzolasyonu

Börülce bitkisinden elde edilen fitazın izolasyonu ve kısmi saflaştırılması için öncelikle börülce homojenizasyonu sağlamak amacıyla mekanik olarak +4$^{o}$C'de parçalandı. Daha sonra, parçalanan bitki kaynakları iki kat bez tülbentten süzüldü. Süzme işlemi sonrasında elde edilen homojenatlar 10 dakika boyunca 10000 rpm'de +4$^{o}$C'de santrifüjlendi. Santrifüj işlemi sonrasında elde edilen üstteki kısım ham özüt olarak elde edildi. Elde edilen ham özütten fitazın saflaştırılması için farklı oranlarda amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$) kullanılarak ham özüt ile çöktürme işlemi uygulandı. Elde edilen total ünite ve spesifik aktivite değerleri Tablo 4.2'de gösterildi.

**Tablo 4.2** Farklı doygunluk oranlarında ham özütten fitaz çöktürmesi

| Amonyum sülfat yüzdesi | Total ünite (U/mL) | Total protein (mg/mL) | Spesifik aktivite (U/mg protein) |
|---|---|---|---|
| Ham özüt | 45,410 | 1,944 | 23,362 |
| %10 | 1,113 | 0,121 | 9,205 |
| %20 | 2,385 | 0,123 | 19,404 |
| %30 | 3,205 | 0,141 | 22,717 |
| %40 | 4,779 | 0,099 | 48,136 |
| %50 | 11,533 | 0,082 | 140,494 |
| %60 | 15,487 | 0,047 | 327,485 |
| %70 | 15,026 | 0,052 | 291,244 |
| %80 | 14,487 | 0,056 | 257,819 |
| %90 | 13,651 | 0,072 | 190,152 |

Elde edilen sonuçlara göre en fazla fitaz total ünitesinin (15,487 U/mL) ve spesifik aktivitenin (327,485 U/mg protein) %60 amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edildiği

belirlendi. Daha sonra, amonyum sülfat (%60) ile doyurulan çözelti diyaliz kesesi yardımıyla diyaliz edildi. Diyalize edilen fitaz daha sonraki enzimatik aktivite belirleme çalışmalarında kullanılmak üzere -20$^{o}$C'de saklandı.

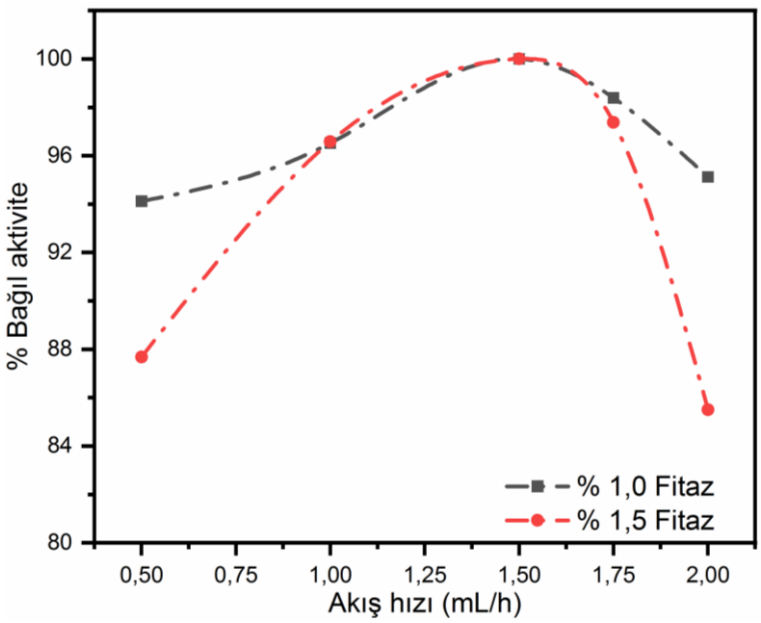
## 4.3 Elde Edilen Fiberlerin Optimizasyonu

Fitaz içeren ve içermeyen polivinil alkol, polivinil alkol-kitosan ve polivinil alkol-sodyum aljinat nanofiberler farklı akış hızlarına ve enzim miktarlarına (%0,50, 1,00, 1,50, 1,75 ve 2,00) bağlı olarak optimize edildi.

### 4.3.1 Akış Hızına Göre Nanofiberlerin Optimizasyonu

#### 4.3.1.1 PVA İçeren Nanofiberinin Akış Hızına Göre Optimizasyonu

Polivinil alkol (PVA) kullanılarak elde edilen ve fitaz içeren nanofiberler optimizasyonu farklı akış hızının katalitik aktivite üzerine etkisi sabit voltaj (+23 kV) ve iğne ile toplama ekranı arasındaki mesafe (13 cm) kullanılarak incelendi. Şekil 4.1 katalitik aktivite üzerine akış hızı etkisini göstermektedir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek fitaz aktivitesinin 1,5 mL/h akış hızında elde edildiği belirlendi ve bu akış hızı değeri sonraki çalışmalar için optimum akış hızı değeri olarak kullanıldı.

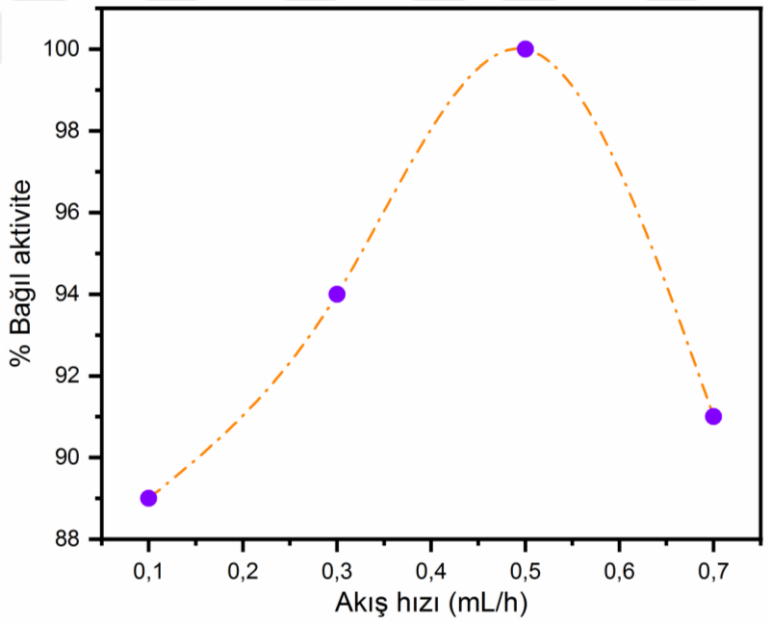



**Şekil 4.1** PVA nanofibere immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi üzerine akış hızının etkisi

#### 4.3.1.2 PVA-CS Nanofiberinin Akış Hızına Göre Optimizasyonu

Üretilen polivinil alkol-kitosan (PVA-CS) içeren nanofiberler üzerine fitazın katalitik aktivitesine akış hızı etkisi 0,1 ile 0,7 mL/h aralığında çalışıldı ve boncuk (bead) oluşumu nedeniyle fiber 0,7 mL/h akış hızı değerinin (Şekil 4.2) üzerinde PVA-CS içeren nanofiberler üretilemedi. Şekil 4.2'den görüldüğü gibi bağıl fitaz aktivitesinin en yüksek olduğu akış hızı 0,5 mL/h olarak bulundu ve bu akış hızı değeri diğer çalışmalarda optimum değer olarak kullanıldı.

Serbest ve immobilize enzimlerin katalitik aktivitesi; enzim konsantrasyonu, pH ve sıcaklık gibi farklı faktörlerden etkilenir. Destek materyalinde enzim için yeterli substrat yüzey alanı olduğu sürece enzimin katalitik aktivitesi artar. Teepoo ve arkadaşları yaptıkları bir çalışma da farklı enzim konsantrasyonlarındaki bir enzimin katalitik aktivitesini belirlemek için deneyler yapmıştır. Belirli bir enzim derişimi aralığında artan enzim derişimi ile katalitik aktivitenin arttığını, bu değerden sonra ise sterik engel nedeniyle katalitik aktivitenin azaldığını ve bu enzim konsantrasyonundan sonra destek materyali ile enzim arasında elektron transferinin zor olduğunu belirtmişlerdir [53].

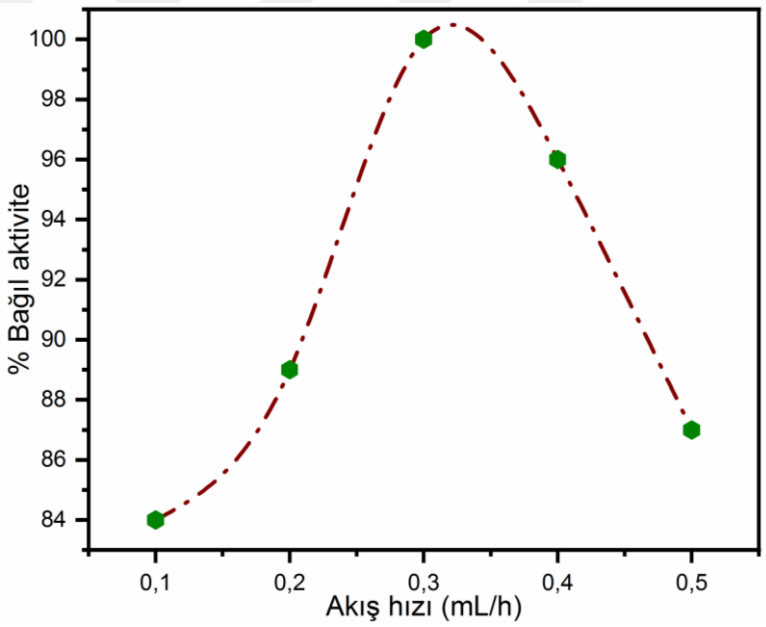



**Şekil 4.2** PVA-CS nanofibere immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi üzerine akış hızının etkisi

#### 4.3.1.3 PVA-SA Nanofiberinin Akış Hızına Göre Optimizasyonu

Üretilen polivinil alkol ve sodyum aljinat (PVA-SA) içeren nanofiberler, akış hızı ve enzim konsantrasyonu gibi bazı elektrospinning çalışma parametreleri sabit voltaj (+ 23 kV) ve iğne ile toplama ekranı arasındaki mesafe (14 cm) kullanılarak optimize edildi. Bilindiği gibi, akış hızı üretilen nanofiber çapını etkileyen en önemli parametrelerden biridir ve boncuk içeren nanofiber elde edilmesinde kritik bir role sahiptir.

Enzimin katalitik aktivitesi üzerindeki akış hızı etkisi 0,1 ile 0,5 mL/h aralığında çalışıldı ve boncuk (bead) oluşumu nedeniyle 0,7 mL/h akış hızı değerinin (Şekil 4.3) üzerinde PVA-SA nanofiberleri üretilemedi. PVA-SA nanofibere immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 ve 0,5 mL $h^{-1}$ akış hızları için sırasıyla %84, 89, 100, 96 ve 87 olarak hesaplandı. Bu sonuçlar maksimum katalitik aktivitenin 0,3 mL $h^{-1}$ akış hızında elde edildiğini gösterdi ve bu akış hızı diğer deneyler için optimum akış hızı değeri olarak seçildi.



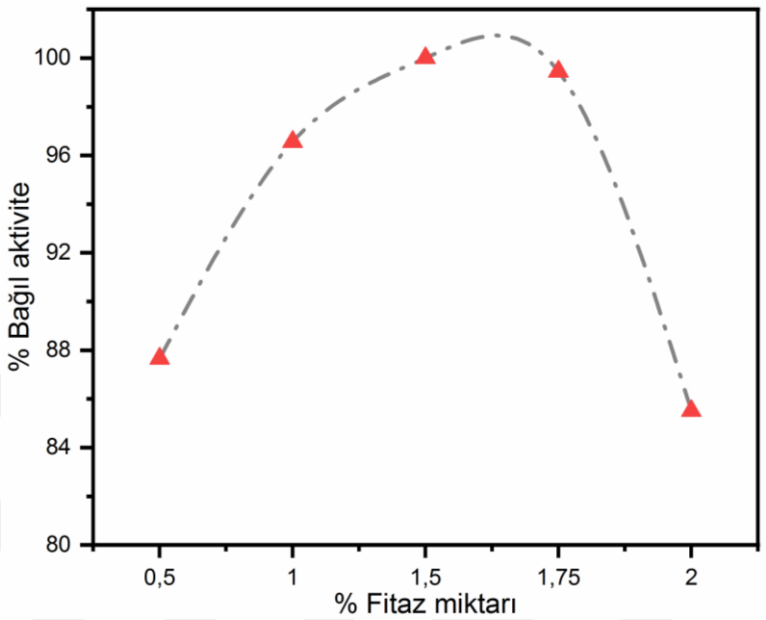

**Şekil 4.3** PVA-SA nanofibere immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi üzerine akış hızının etkisi

### 4.3.2 Enzim Miktarına Göre Nanofiberlerin Optimizasyonu

#### 4.3.2.1 PVA Nanofiberinin Enzim Miktarına Göre Optimizasyonu

Polivinil alkol (PVA) kullanılarak elde edilen ve farklı miktarlarda fitaz içeren nanofiberler üzerine katalitik aktivitesi belirlemek amacıyla % enzim miktarını 1,5

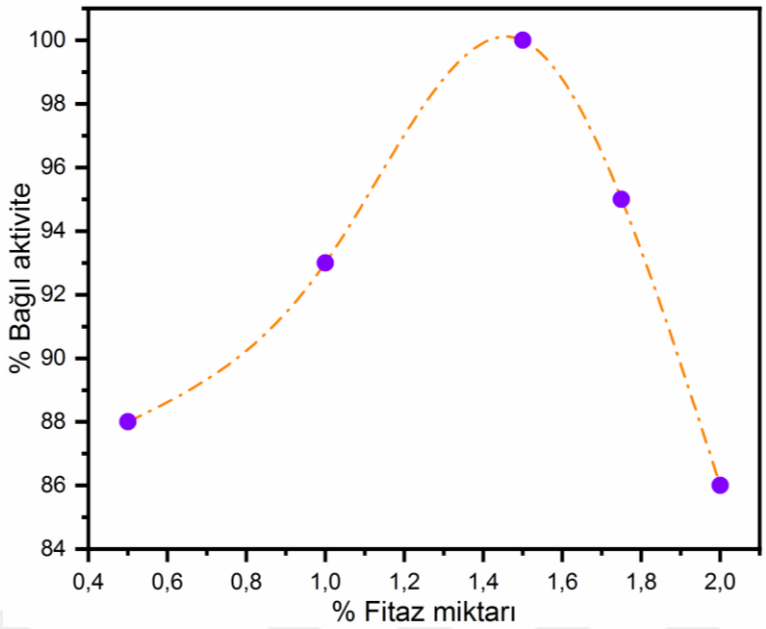
mL/h akış hızında nanofiberler üretildi (Şekil 4.4). Şekil 4.4'ten görüldüğü gibi katalitik aktivite %0,50, 1,00 ve 1,50 enzim miktarı varlığında arttığı belirlendi ve %1,75 ile 2,00 fitaz varlığında katalitik aktivite azalmıştır. Elde edilen bu sonuçlara göre üretilen nanofiberler için optimum enzim konsantrasyonu %1,5 fitaz olarak bulundu.




**Şekil 4.4** PVA nanofibere immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi üzerine enzim miktarının etkisi

### 4.3.2.2 PVA-CS Nanofiberinin Enzim Miktarına Göre Optimizasyonu

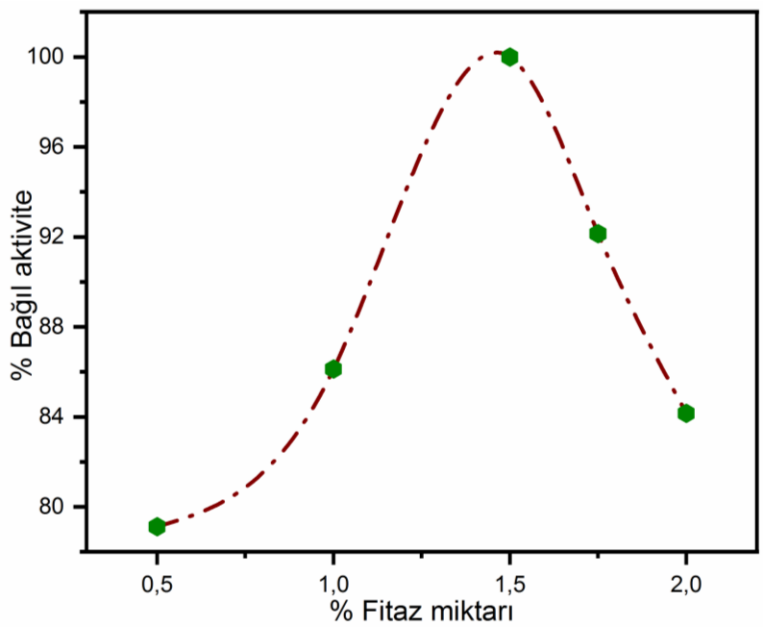
Polivinil alkol-kitosan (PVA-CS) kullanılarak elde edilen ve farklı miktarlarda fitaz içeren nanofiberler üzerine katalitik aktivitesi belirlemek amacıyla % enzim miktarını 0,5 mL/h akış hızında nanofiberler üretildi. Şekil 4.5'te farklı enzim konsantrasyonlarının bağıl fitaz aktivitesi üzerine % fitaz miktarı etkisi gösterildi. Fitaz içeren PVA-CS nanofiberinin bağıl fitaz aktivitesi değerinin %0,50 ile %1,50 arasında artarken, %1,75 ve %2,00 fitaz varlığında azaldığı belirlendi. Bu sonuçlar, destek materyalinin fitaz etkileşimine yetersiz bağlanma alanı nedeniyle çözeltide %1,50 fitaz varlığında maksimum enzimatik aktivitenin elde edildiğini gösterdi. Bu enzim konsantrasyonu (%1,5 fitaz miktarı) üretilen nanofiberler için optimum enzim konsantrasyonu olarak seçildi.




**Şekil 4.5** PVA-CS nanofibere immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi üzerine enzim miktarının etkisi

#### 4.3.2.3 PVA-SA Nanofiberinin Enzim Miktarına Göre Optimizasyonu

İmmobilize fitazın katalitik aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonu etkisi 0,5 mL/h akış hızı, sabit voltaj (+23 kV) ve iğne ile toplama ekranı arasındaki mesafe (14 cm) kullanılarak incelendi ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.6'da gösterildi. Fitazın enzimatik aktivitesi, polivinil alkol-sodyum aljinat (PVA-SA) nanofiberlerinde %0,50, 1,00, 1,50, 1,75 ve %2,00 fitaz çözeltisi varlığında %79, 86, 100, 92 ve %84 olarak belirlendi. Maksimum katalitik aktivite %1,50 enzim konsantrasyonu için hesaplandı ve bu konsantrasyon değeri sonraki çalışmalar için optimum değer olarak kullanıldı.



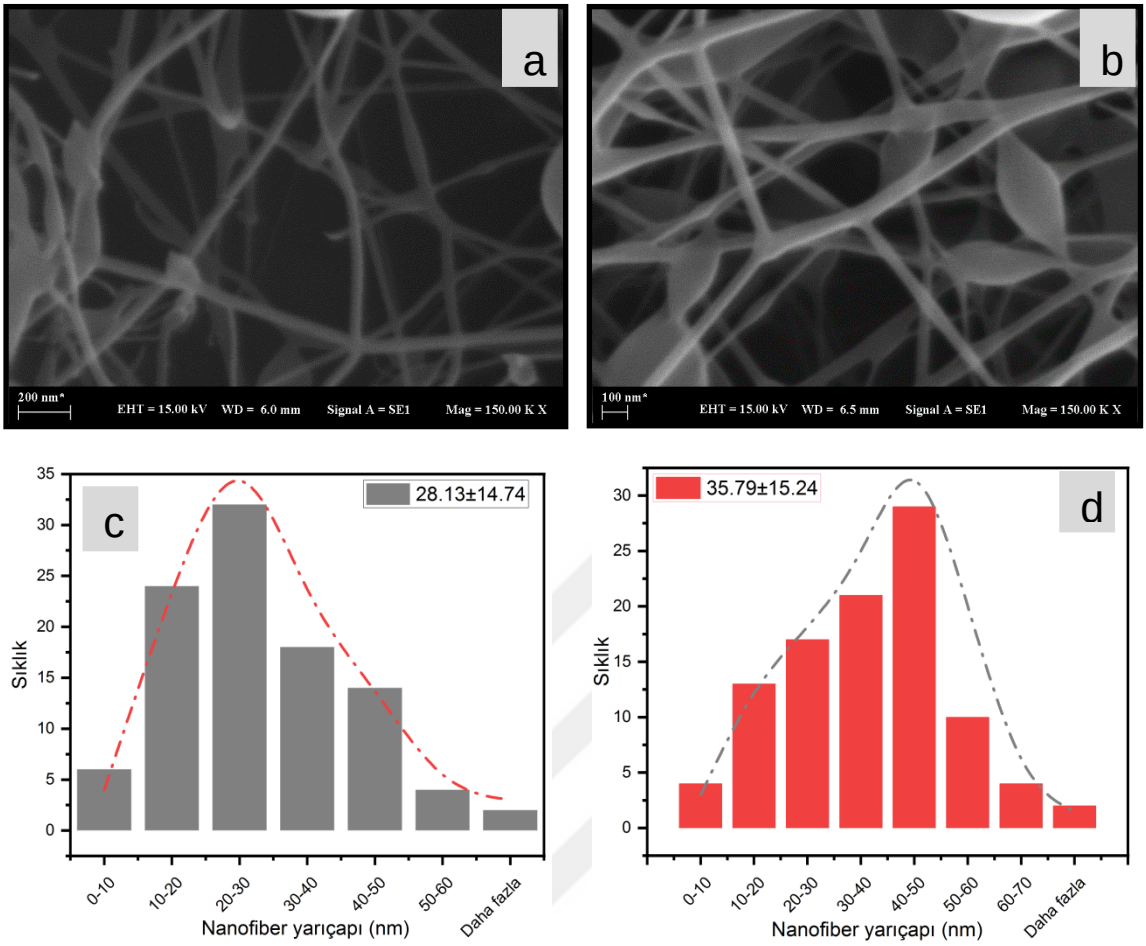

**Şekil 4.6** PVA-SA nanofibere immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi üzerine enzim miktarının etkisi

## 4.4 Elde Edilen Nanofiberlerin Morfolojik Özellikleri

Polivinil alkol (PVA), polivinil alkol-kitosan (PVA-CS) ve polivinil alkol-sodyum aljinat (PVA-SA) içeren nanofiberler fitaz içeren ve içermeyen şekilde elde edildi ve karakterizasyonu gerçekleştirildi.

### 4.4.1 PVA İçeren Nanofiberin Morfolojik Özellikleri

Elde edilen nanofiberlerin SEM görüntüleri Şekil 4.7'de gösterildi. SEM görüntülerine göre elde edilen PVA ve fitaz içeren PVA nanofiberleri yapısında pürüzsüz ve gözenekli bir yapıya sahip oldukları belirlendi.



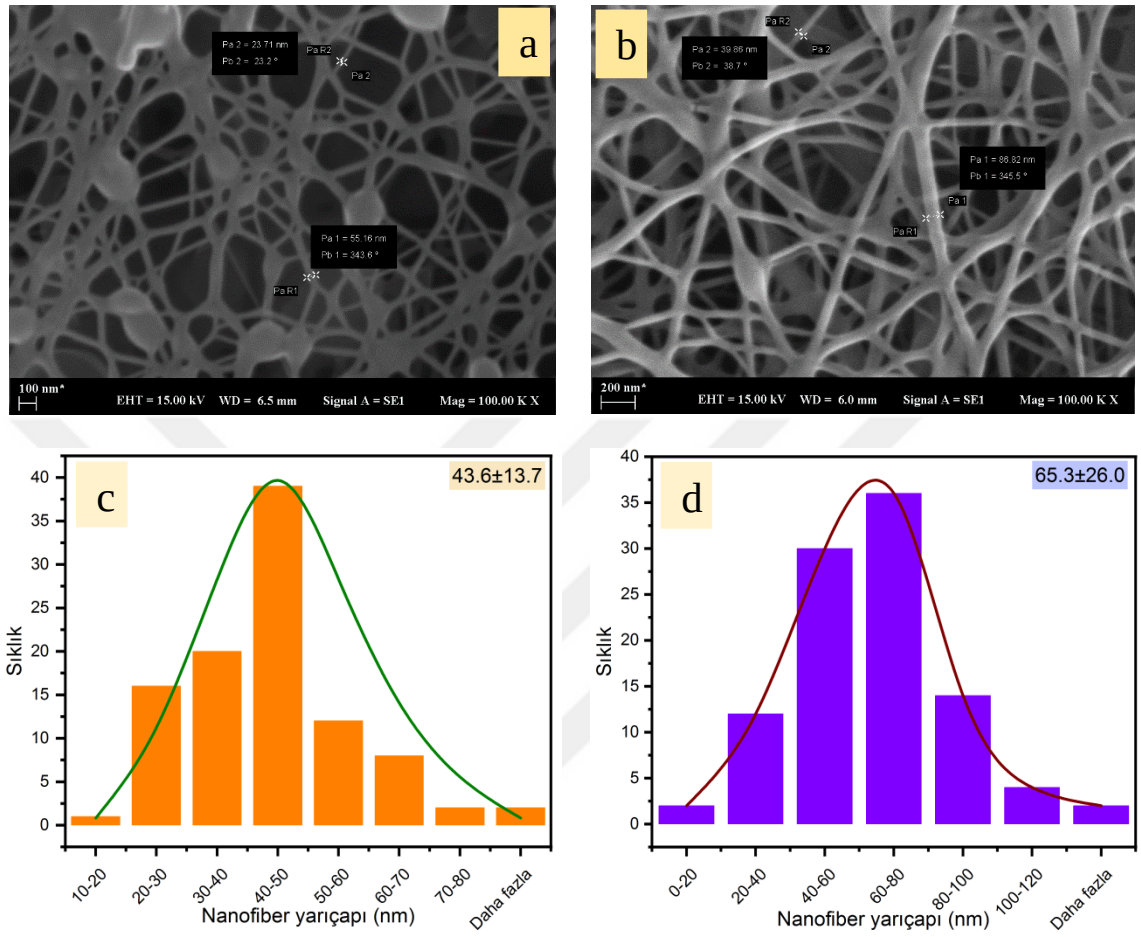

**Şekil 4.7** PVA (a, c) ve PVA-fitaz (b, d) nanofiberlerin SEM ve boyut dağılım grafikleri

PVA çözeltisi içerisine fitaz eklenmesi ile fiber kalitesi artmıştır. Ayrıca, elde edilen fitaz içeren nanofiberlerin SEM görüntülerine göre fitaz-PVA nanofiberleri boncuklu (bead) bir yapıya sahiptir ve bu boncukların fiber yarıçaplarının 94 ile 197 nm aralığında değiştiği belirlendi. Rathnayake ve arkadaşlarının bildirdiğine göre bu boncuklu yapı immobilize enzime ekstra bir kararlılık kazandırmakta ve bu yapı enzimi dış etkilere karşı korumaktadır [54].

Hazırlanan nanofiberlerin boyut dağılımı Image J programı kullanılarak ve 100 farklı fiber yarıçapı ölçülerek belirlendi (Şekil 4.7c ve d). PVA nanofiberin fiber yarıçapı 0-60 nm aralığında ve ortalama yarıçapı ise 28,13±14,74 nm olarak belirlendi. Fitaz-PVA fiber yarıçapının ise 0-70 nm aralığında ve ortalama yarıçapı da 35,79±15,24 nm olarak hesaplandı.

### 4.4.2 PVA-CS İçeren Fiberlerin Morfolojik Özellikleri

Polivinil alkol-kitosan (PVA-CS) ve fitaz-PVA-CS nanofiberlerinin FE-SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.8a ve b'de gösterildi.



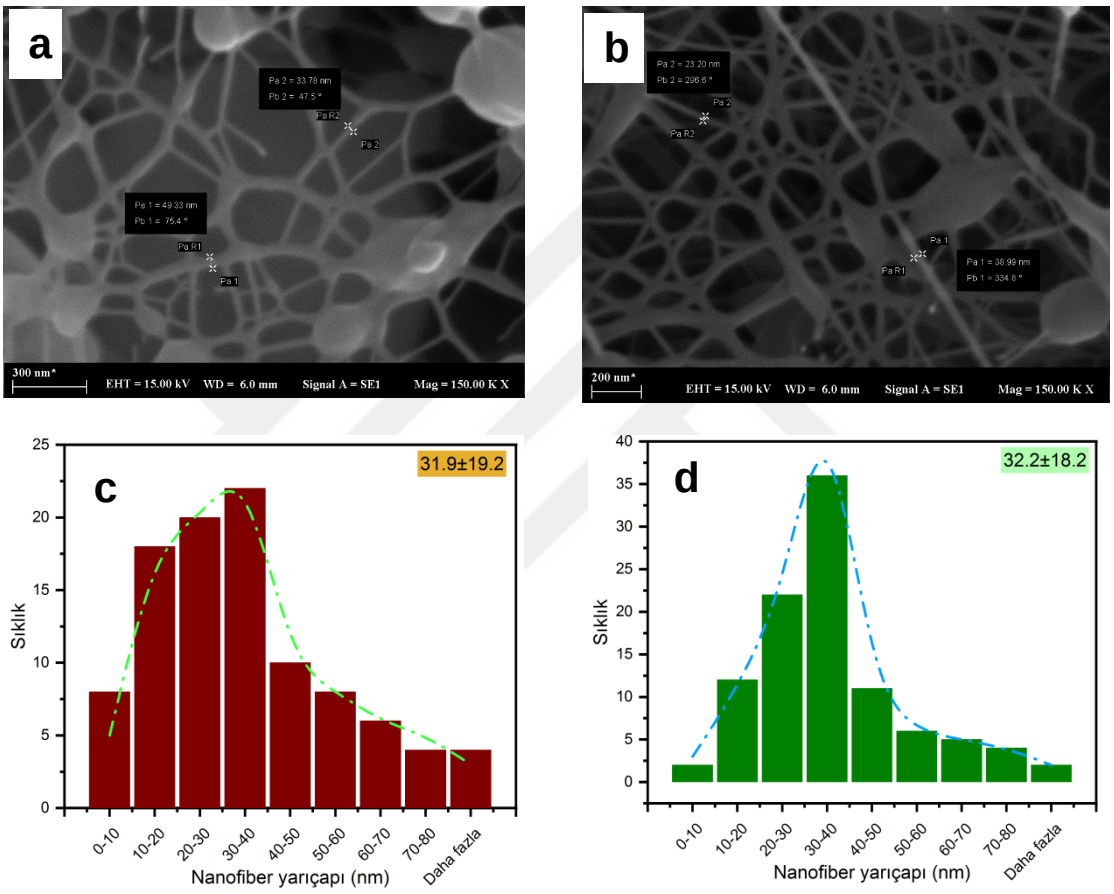

**Şekil 4.8** PVA-CS (a, c) ve fitaz-PVA-CS (b, d) nanofiberlerinin SEM ve boyut dağılım grafikleri

Şekil 4.8a'dan görüldüğü gibi, PVA-CS nanofiberi boncuklardan (beads) oluşan homojen ve ince bir yapıya sahiptir (nanofiber çapı: 157-243 nm). Fitaz içeren PVA-CS nanofiberin SEM görüntüsüne (Şekil 4.8b) göre, fitaz-PVA-CS nanofiberi rastgele yönlendirilmiş, ince, homojen (boncuksuz), ve sürekli nanofiber yapısından oluşmuştur.

Fitaz içeren ve içermeyen PVA-CS nanofiberlerin boyut dağılımı ise sırasıyla Şekil 4.8c ve d'de verildi. Nanofiberlerin ortalama çapları sırasıyla PVA-CS için 43,6±13,7 nm ve fitaz-PVA-CS için ise 65,3±26,0 nm olarak belirlendi. Bu ortalama çap sonuçları, fitazın destek materyaline immobilizasyonundan sonra PVA-CS nanofiberin ortalama çapına göre önemli ölçüde arttığını göstermektedir.

### 4.4.3 PVA-SA İçeren Fiberlerin Morfolojik Özellikleri

Polivinil alkol-sodyum aljinat (PVA-SA) ve fitaz-PVA-SA nanofiberlerinin FE-SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.9a ve b'de gösterildi. Şekil 4.9a ve b'den görüldüğü gibi, PVA-SA ve fitaz-PVA-SA üretilen nanofiberlerin homojen, rastgele yönlendirilmiş, boncuklu (beads) bir yapıya sahiptir. Boncuk yarıçapları ise PVA-SA nanofiberi için 167 ile 231 nm arasında, fitaz-PVA-SA nanofiberi içinse 147 ile 219 nm arasında olduğu belirlendi.



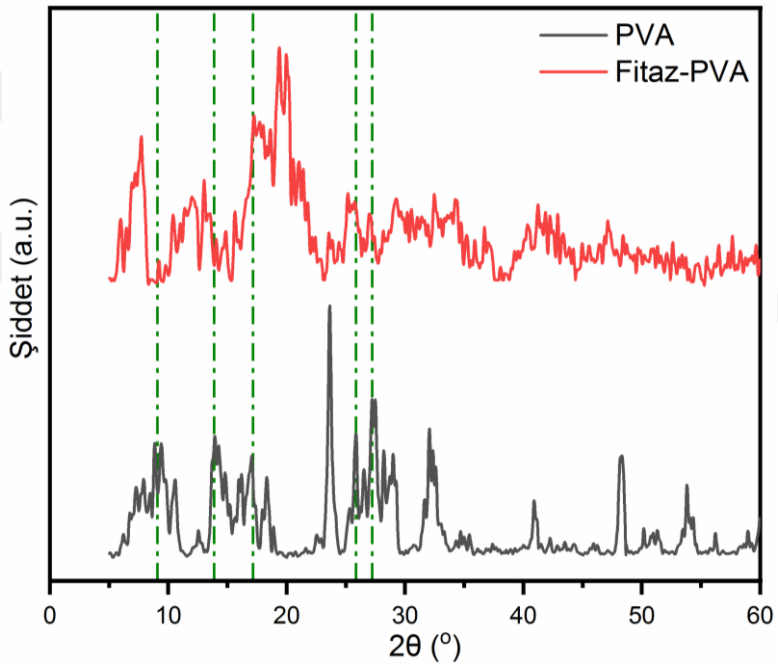

**Şekil 4.9** PVA-SA (a, c) ve fitaz-PVA-SA (b, d) nanofiberlerinin SEM ve boyut dağılım grafikleri

PVA-SA ve fitaz-PVA-SA nanofiberlerin boyut dağılımı ise sırasıyla Şekil 4.9c ve d'de verildi. Nanofiberlerin ortalama çapları sırasıyla PVA-SA için 31,9±19,2 nm ve fitaz-PVA-SA için ise 32,2±18,2 nm olarak belirlendi. Bu ortalama çap sonuçları, fitazın destek materyaline immobilizasyonundan sonra PVA-SA nanofiberin ortalama çapının önemli ölçüde değişmediği saptandı.

## 4.5 Elde Edilen Nanofiberlerin XRD Desenleri

### 4.5.1 PVA İçeren Nanofiberlerin XRD Deseni

Hazırlanan fiberlerin kristal yapısını belirlemek amacı ile XRD analizleri gerçekleştirildi ve elde edilen XRD deseni Şekil 4.10'de verildi. PVA nanofiberin 2θ= 9,08, 13,89, 17,6, 23,58, 25,86 ve 27,22$^{o}$ XRD piklerine sahip olduğu belirlendi [55]. Fitaz içeren PVA nanofiberin XRD pikleri ise 2θ= 7,73, 13,02, 17,16, 19,59, 25,50 ve 27,22$^{o}$ gözlendi [56]. Elde edilen pik değerlerine göre PVA çözeltisi içerisine fitaz ilave edilmesi sonrası XRD pikleri daha düşük açılı 2θ değerlerine kaymıştır. Bununla birlikte, 2θ= 35-60 $^{o}$ aralığında PVA nanofiber de gözlenen XRD piklerinin fitaz içeren nanofiberde gözlenmemesi enzimin PVA çözeltisi içerisine homojen bir şekilde dağıldığını göstermektedir [57].

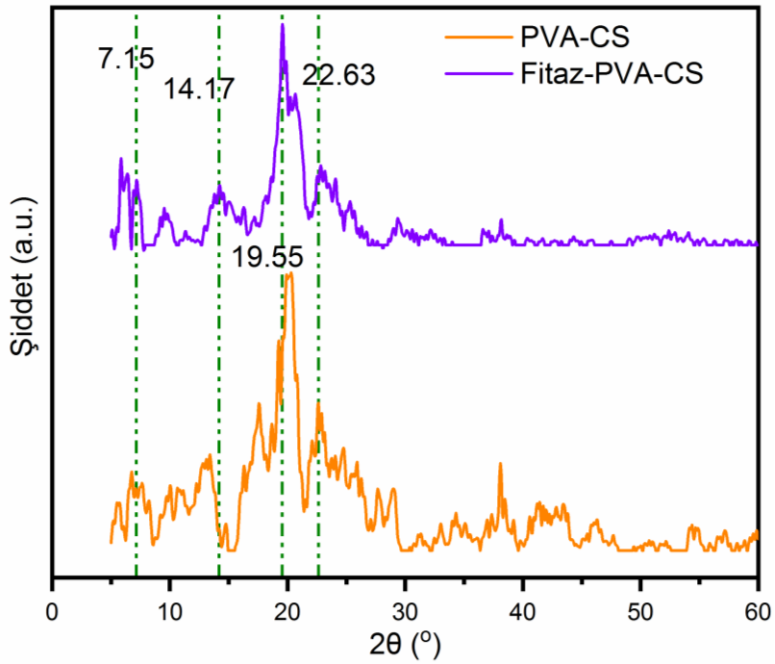



**Şekil 4.10** Hazırlanan PVA ve fitaz içeren PVA nanofiberlerin XRD deseni

### 4.5.2 PVA-CS İçeren Nanofiberin XRD Desenleri

Şekil 4.11 PVA-CS ve fitaz-PVA-CS nanofiberlerin X-Işını Kırınım (XRD) modelini göstermektedir. Şekil 4.11'den görüldüğü gibi, PVA-CS nanofiberi 2θ= 7,15, 14,17, 19,55 ve 22,63$^{o}$'de XRD pikleri gözlendi. PVA-CS nanofiber çözeltisine fitaz eklendiğinde üretilen nanofiberin (fitaz-PVA-CS) XRD pikleri 2θ= 6,88, 13,43, 20,14 ve 22,56$^{o}$'de gözlendi. Elde edilen XRD sonuçlarına göre, enzimin PVA-CS nanofiber

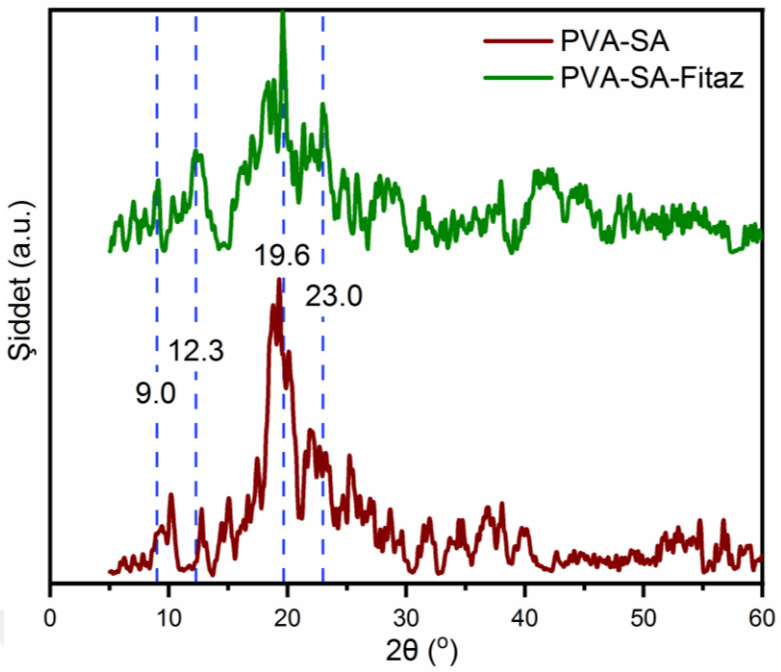
çözeltisine homojen dağılması nedeniyle XRD pikleri daha düşük 2θ değerlerine kaydı. Ayrıca, 2θ= 30$^{o}$ civarında görülen pik, fitaz ve destek malzemesi (PVA-CS elektrospun fiber) arasındaki güçlü etkileşimden kaynaklanmaktadır [58].




**Şekil 4.11** PVA-CS ve fitaz-PVA-CS nanofiberlerinin XRD deseni

### 4.5.3 PVA-SA İçeren Nanofiberin XRD Desenleri

Şekil 4.12 PVA-SA ve fitaz-PVA-SA nanofiberlerin X-Işını Kırınım (XRD) desenini göstermektedir. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi, PVA-SA nanofiberi 2θ= 9,00°, 12,20° ve 22,97° zayıf XRD pikleri gözlendi. PVA-SA nanofiber çözeltisine fitaz eklendiğinde üretilen nanofiberin (fitaz-PVA-SA) zayıf XRD pikleri 2θ= 10,10°, 12,82° ve 21,98°'de gözlendi. PVA-SA ve fitaz-PVA-SA nanofiberleri ayrıca güçlü hidrojen-bağ etkileşimlerinden dolayı sırasıyla 2θ= 19,69° ve 19,19°'de güçlü bir XRD pikleri gözlenmiştir [59]. Elde edilen bu sonuçlara göre enzimin nanofiber içerisine immobilizasyonundan sonra fitazın nanofiber içerisinde homojen dağılımı ve elektro-eğirme işlemi sırasında polimerik zincirlerin konformasyonundaki değişiklikler nedeniyle XRD piklerinde farklılar gözlendi. Ayrıca, nanofiberlerin yapısında SA ve PVA varlığından dolayı gözlenen XRD pikleri 2θ= 13° ve 20° civarında görüldü ve 2θ= 30°'den sonra görülen XRD piklerinin, PVA-SA nanofiberleri ile fitaz arasında güçlü bir etkileşim olduğu kanıtlanmıştır [58].

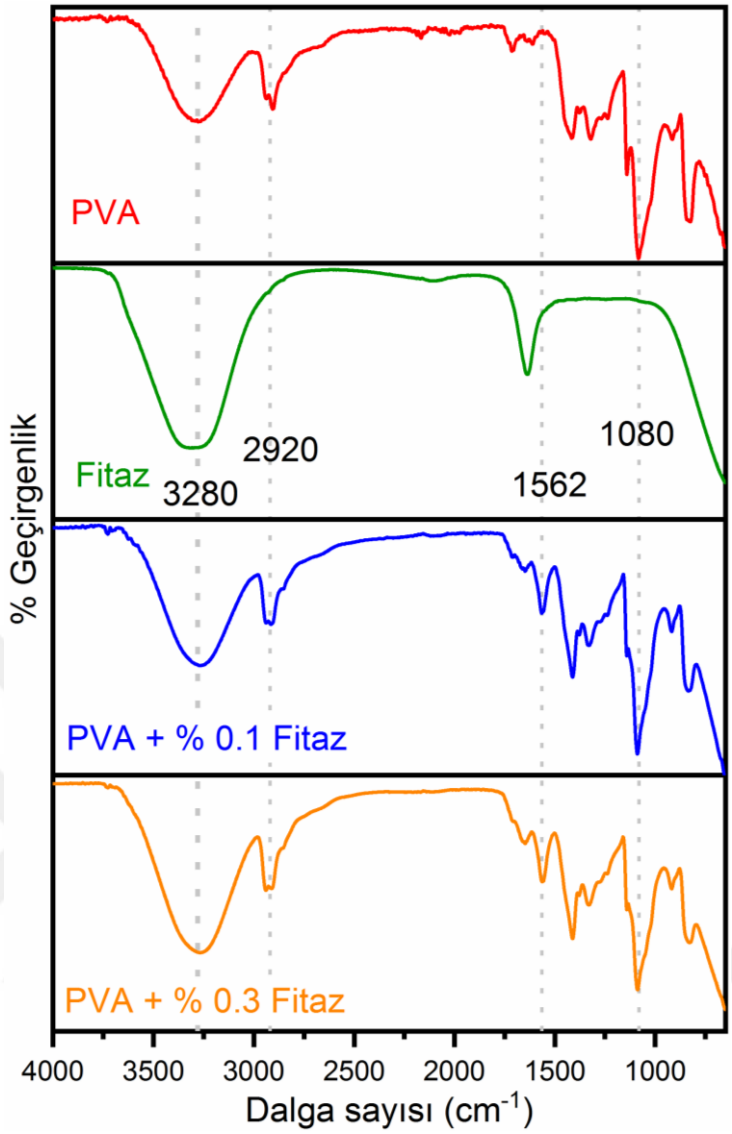



**Şekil 4.12** PVA-SA ve fitaz-PVA-SA nanofiberlerinin XRD deseni

## 4.6 Elde Edilen Nanofiberlerin FT-IR Spektrumları

### 4.6.1 PVA İçeren Nanofiberin FT-IR Spektrumları

Elde edilen fiberlerin yapısındaki karakteristik hidroksil (-OH) gerilme titreşimi 3280 $cm^{-1}$ civarında gözlendi. Fiberlerin yapısındaki alifatik $–CH_2$ gerilme titreşimi 2920 $cm^{-1}$ civarında, PVA'nın yapısındaki asetil grubunun –C-O titreşimi ise 1080 $cm^{-1}$ civarında gözlendi [56]. PVA ve fitaz yapısında sırasıyla 1716 ve 1637 $cm^{-1}$'de görülen karbonil titreşimi börülceden kısmi saflaştırılmış fitaz içeren fiberlerin yapısında 1562 $cm^{-1}$ civarında gözlendi (Şekil 4.13) [57].

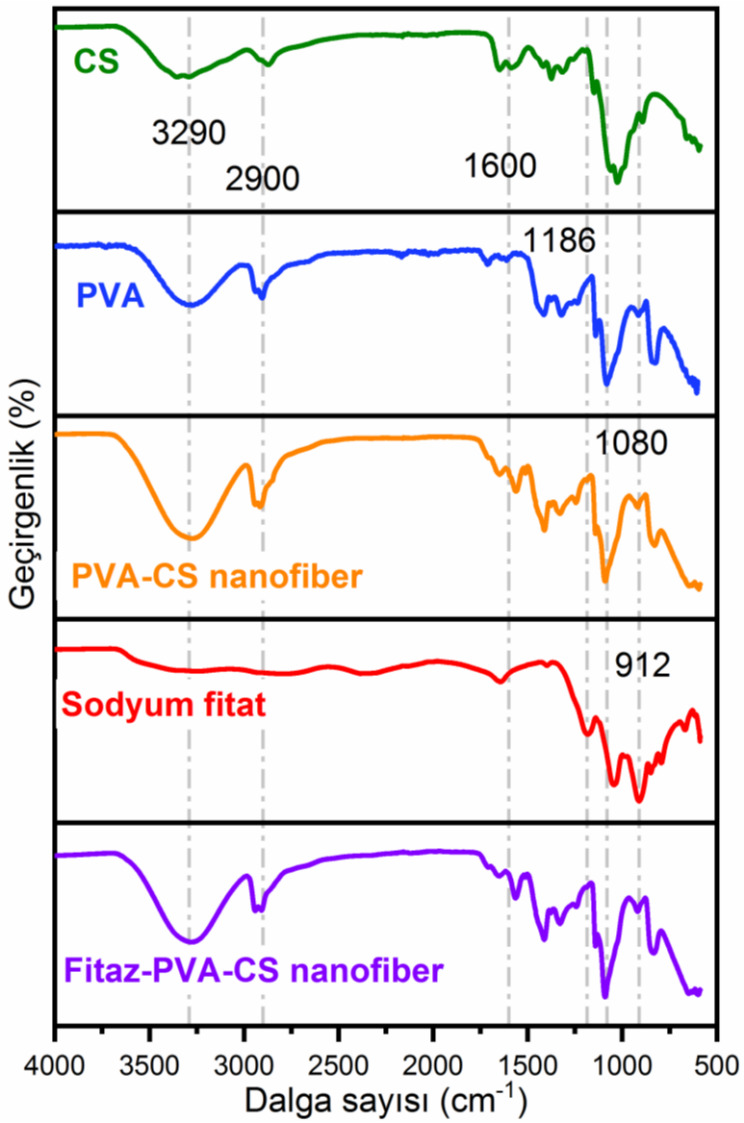



**Şekil 4.13** PVA, fitaz ve %0,1 ile %0,3 oranında fitaz içeren fiberlerin FT-IR spektrumları

### 4.6.2 PVA-CS İçeren Nanofiberin FT-IR Spektrumları

Kitosan (CS), polivinil alkol (PVA), PVA-CS nanofiber, substrat (sodyum fitat) ve enzim içeren nanofiberin (fitaz-PVA-CS) FT-IR spektrumları Şekil 4.14'te verildi. Şekil 4.14'ten görüldüğü gibi PVA'nın yapısındaki hidroksil (-OH) gerilme titreşimi 3290 $cm^{-1}$'de görüldü. Ayrıca, PVA'nın yapısındaki -C-O ve alifatik -CH (Al-CH) gerilme titreşimleri sırasıyla 1087 ve 2909 $cm^{-1}$'de gözlendi. Kitosanın yapısındaki asetil grubunun eter (-C-O-C) ve karbonil (-C=O) gerilme titreşimleri sırasıyla 1032 ve 1647 $cm^{-1}$'de görüldü. Ayrıca, kitosanın FT-IR spektrumunda 3346 $cm^{-1}$'de gözlenen piki yapısındaki hidroksil (-OH) ve amin ($-NH_2$) gerilme titreşimlerinin örtüşmesinden

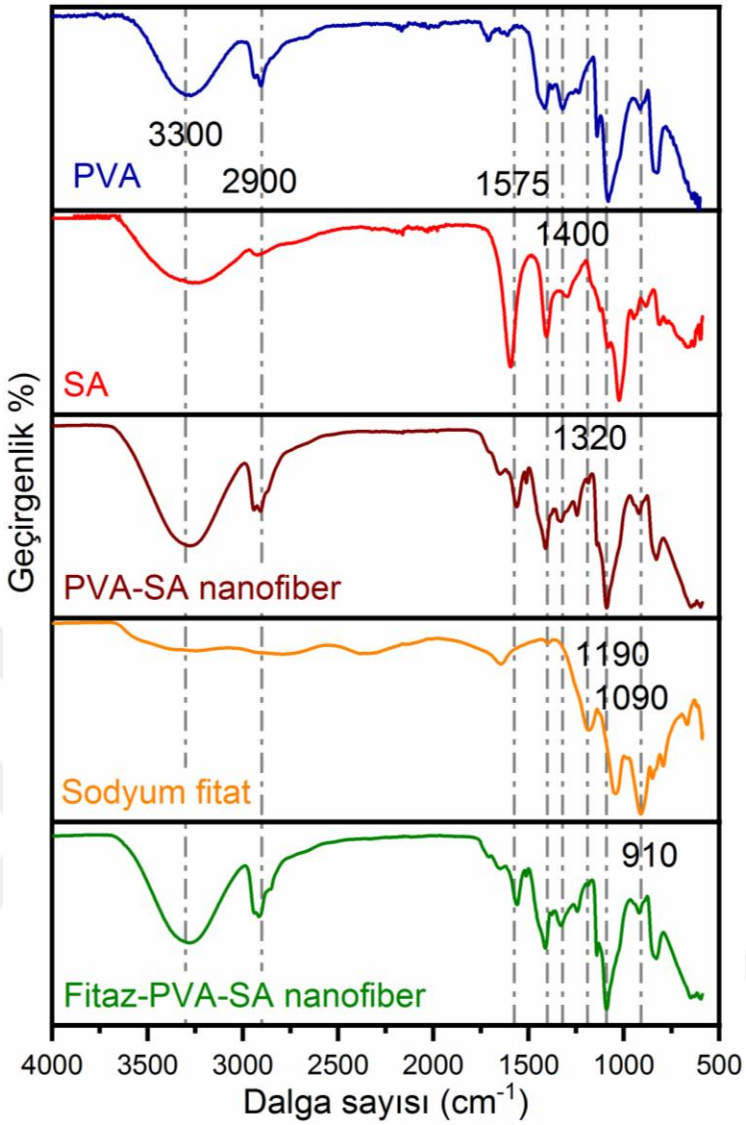
kaynaklanmaktadır [41]. PVA-CS nanofiberinin yapısındaki -OH/$NH_2$, Al-CH, karbonil (-C=O), ve eter (-C-O-C) gerilme titreşimleri sırasıyla 3275, 2920, 1650 ve 1097 $cm^{-1}$'de görüldü. Sodyum fitatın (substrat) yapısındaki fosfat ($PO_4^{3-}$) ve -C-O-P gerilme titreşimleri sırasıyla 1186 ve 912 $cm^{-1}$'de gözlendi [60]. Fitaz içeren PVA-CS nanofiberin (fitaz-PVA-CS) FT-IR spektrumuna göre nanofiberin yapısındaki -OH/$NH_2$, Al-CH, karbonil (-C=O), eter (-C-O-C), fosfat ($PO_4^{3-}$) ve -C-O-P gerilme titreşimleri sırasıyla 3287, 2921, 1670, 1085, 1130 ve 838 $cm^{-1}$'de görüldü.




**Şekil 4.14** CS, PVA, PVA-CS nanofiber, substrat (sodyum fitat) ve enzim içeren nanofiberin FT-IR spektrumları

### 4.6.3 PVA-SA İçeren Nanofiberin FT-IR Spektrumları

Polivinil alkol (PVA), sodyum aljinat (SA), PVA-CS nanofiber, substrat (sodyum fitat) ve enzim içeren nanofiberin (fitaz-PVA-CS) FT-IR spektrumları Şekil 4.15'te verildi. Şekil 4.15'ten görüldüğü gibi PVA'nın yapısındaki hidroksil (-OH) gerilme titreşimi 3290 $cm^{-1}$'de görüldü. Ayrıca, PVA'nın yapısındaki -C-O ve alifatik -CH (Al-CH) gerilme titreşimleri sırasıyla 1087 ve 2909 $cm^{-1}$'de gözlendi. Sodyum aljinatın yapısındaki −OH, Al–CH, karboksilat anyonu (−COO−), simetrik ve anti-simetrik karbonil (−C=O) gerilme titreşimleri sırasıyla 3270, 2916, 1306, 1596ve 1406 $cm^{-1}$'de gözlendi [61]. PVA-SA nanofiberinin yapısındaki -OH, Al–CH, -C–O, −COO−, simetrik ve anti-simetrik karbonil (−C=O) titreşimleri sırasıyla 3305, 2923, 1085, 1339, 1572 ve 1404 $cm^{-1}$'de kaydedildi. Sodyum fitatın (substrat) yapısındaki fosfat ($PO_4^{3-}$) ve -C-O-P gerilme titreşimleri sırasıyla 1186 ve 912 $cm^{-1}$'de gözlendi. Fitaz içeren PVA-CS nanofiberin (fitaz-PVA-CS) FT-IR spektrumuna göre nanofiberin yapısındaki -$OH/NH_2$, Al-CH, karbonil (-C=O), eter (-C-O-C), fosfat ($PO_4^{3-}$) ve -C-O-P gerilme titreşimleri sırasıyla 3287, 2921, 1670, 1085, 1130 ve 838 $cm^{-1}$'de görüldü. Fitaz içeren PVA-SA nanofiberinin yapısındaki −OH, Al–CH, $PO_4^{3-}$, -C-O-P, –COO–, –C–O, simetrik ve anti-simetrik karbonil (−C=O) gerilme titreşimleri sırasıyla 3293, 2919, 1129, 926, 1331, 1091, 1573 ve 1417 $cm^{-1}$'de görüldü. Fitaz içeren PVA-SA nanofiberinin gerilme titreşimleri, PVA-SA nanofiber ve substrat ile karşılaştırıldığında fitaz ve destek malzemesi arasındaki hidrojen bağı etkileşiminden dolayı FT-IR titreşimlerinde küçük değişikler gözlendi. Ayrıca, enzim içeren nanofiberin yapısındaki sodyum fitattan kaynaklanan 1129 ve 926 $cm^{-1}$'de görülen gerilme titreşimleri, enzimin nanofiber içinde iyi bir şekilde dağıldığının kanıtıdır [60].



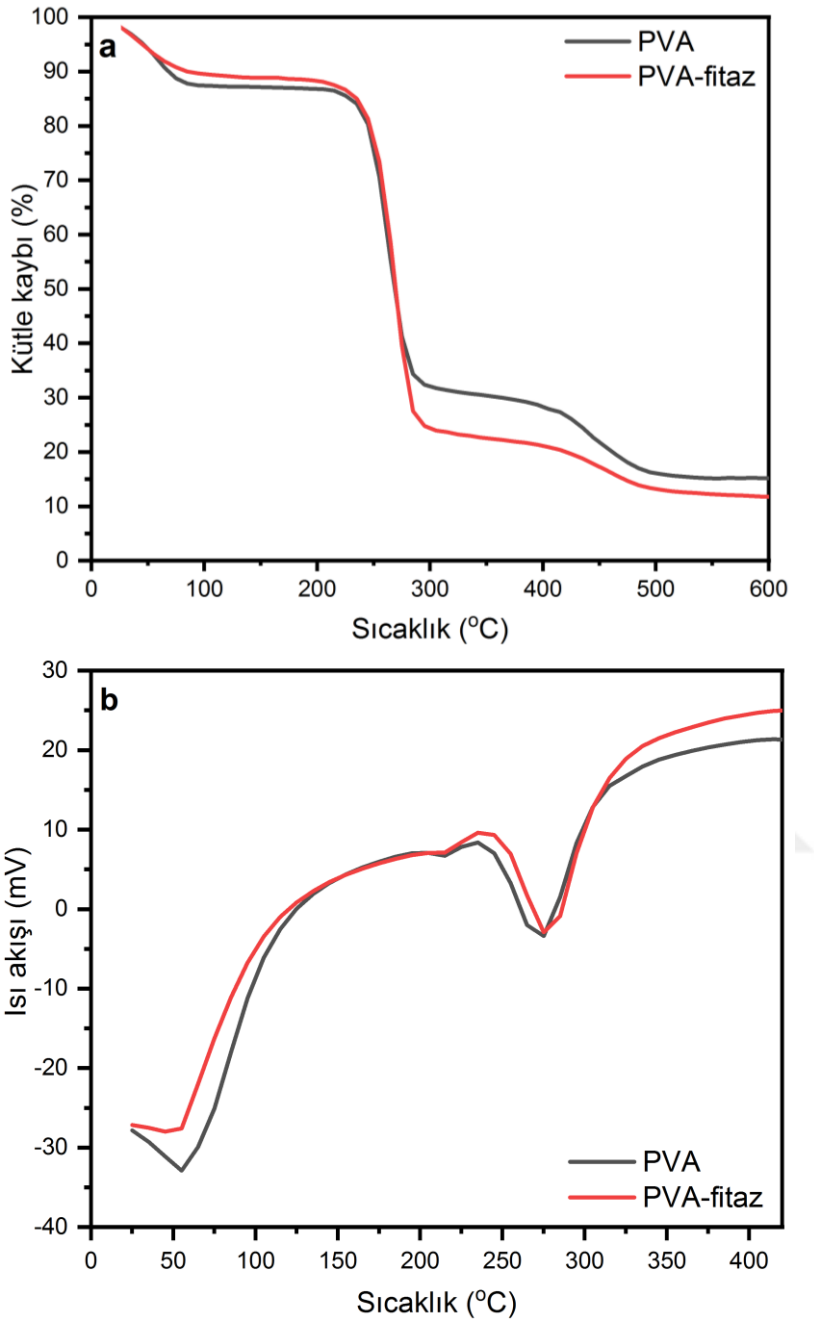

**Şekil 4.15** PVA, SA, PVA-SA nanofiber, substrat (sodyum fitat) ve enzim içeren nanofiberin FT-IR spektrumları

## 4.7 Elde Edilen Nanofiberlerin Termal Özellikleri

### 4.7.1 PVA İçeren Nanofiberin TGA ve DSC Eğrileri

PVA içeren nanofiberlerin (PVA ve PVA-fitaz) termal özellikleri Termogravimetrik analiz (TGA) ve diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ile aydınlatıldı (Şekil 4.16). Nanofiberlerin termal özellikleri, 600°C'de %20 (T20), %50 (T50) ağırlık kaybı sıcaklıkları ve kömür kalıntısı (char) cinsinden değerlendirildi. T20, T50 ve char değerleri PVA nanofiber için sırasıyla 246°C, 258°C ve %15,23 fitaz içeren PVA nanofiber için ise sırasıyla 248°C, 267°C ve %11,10 olarak belirlendi. Bu sonuçlardan da görülebileceği gibi PVA ve enzim içeren PVA nanofiberlerinin T20 ve T50 değerleri

birbirine çok yakındır. Fitaz-PVA nanofiberin char kalıntısı ise PVA nanofiberinden daha düşüktür.




**Şekil 4.16** Fitaz içeren ve içermeyen PVA nanofiberlerin TGA (a) ve DSC eğrileri (b)

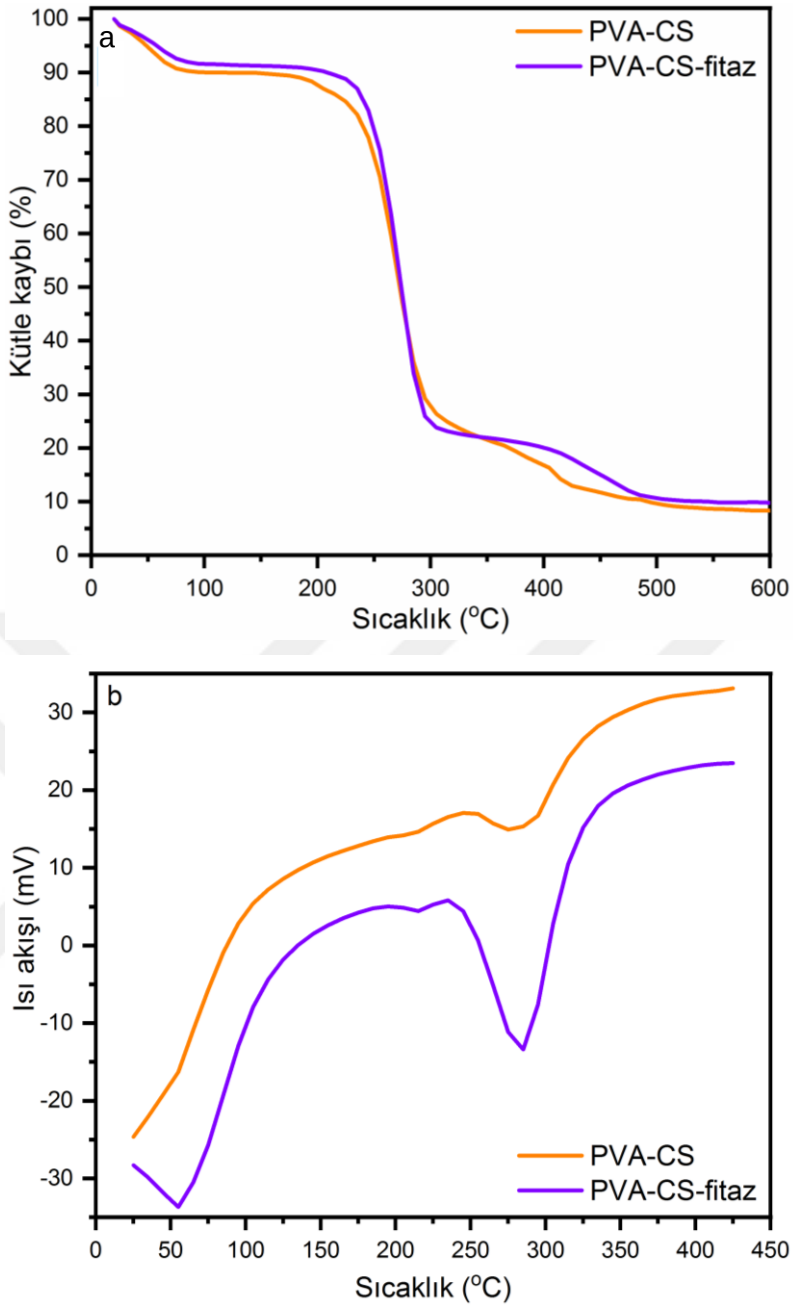
Nanofiberlerin DSC eğrilerinden görülebileceği gibi, nanofiberler 220 ve 300 °C civarında iki endotermik pik gözlendi. İlk gözlenen pik PVA ve fitaz-PVA için sırasıyla 213 ve 215°C'de bir omuz olarak gözlendi. İkinci pik ise PVA ve fitaz-PVA için sırasıyla 275 ve 276 °C olarak belirlendi. Literatüre göre nanofiberlerin yapısında

gözlenen bu piklerin, nanofiberlerin erimesi nedeniyle ilk pikin gözlendiğini ve ikinci pikin ise nanofiber yapının azot atmosferi altında parçalanmasına bağlandığını belirtmiştir. Bu sonuçlar, PVA nanofiber içerisine fitazın eklenmesi DSC piklerinin artmasına neden olmuştur. Bu artmanın sonucu fitaz ile PVA nanofiberinin fonksiyonel grubu arasındaki güçlü etkileşimin kanıtı olduğunu gösterdi [54].

### 4.7.2 PVA-CS İçeren Nanofiberin TGA ve DSC Eğrileri

PVA ve kitosan içeren nanofiberlerin (PVA-CS ve PVA-CS-fitaz) TGA ve DSC eğrileri Şekil 4.17'de gösterildi. Elde edilen nanofiberlerin T20, T50 ve char değerleri PVA-CS nanofiber için sırasıyla 237°C, 278°C ve %8,25, fitaz içeren PVA-CS nanofiber için ise sırasıyla 247°C, 266°C ve %9,85 olarak belirlendi. Bu sonuçlardan da görülebileceği gibi PVA-CS ve enzim içeren PVA-CS nanofiberlerinin T20 ve T50 değerleri birbirine çok yakındır. Fitaz-PVA-CS nanofiberin char kalıntısı ise PVA-CS fiberinden daha yüksek olduğu belirlendi.

PVA-CS ve fitaz-PVA-CS nanofiberlerin Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) eğrileri Şekil 4.17b'de gösterildi. Nanofiberlerin DSC eğrilerinden görülebileceği gibi, nanofiberler 210 ve 330$^{o}$C civarında iki endotermik pik gösterildi. İlk gözlenen pik PVA-CS ve fitaz-PVA-CS için sırasıyla 211 ve 215$^{o}$C'de bir omuz olarak gözlendi. İkinci pik ise PVA-CS ve fitaz-PVA-CS için sırasıyla 330 ve 335$^{o}$C olarak belirlendi. Literatüre göre nanofiberlerin yapısında gözlenen bu piklerin, nanofiberlerin erimesi nedeniyle ilk pikin gözlendiğini ve ikinci pikin ise nanofiber yapının nitrojen atmosferi altında parçalanmasına bağlandığını belirtmiştir. Bu sonuçlar, PVA-CS nanofiber içerisine fitazın eklenmesi DSC piklerinin artmasına neden olmuştur. Bunun artmanın sonucu fitaz ile PVA-CS nanofiberinin fonksiyonel grubu arasındaki güçlü etkileşimin kanıtı olduğunu gösterdi [54].



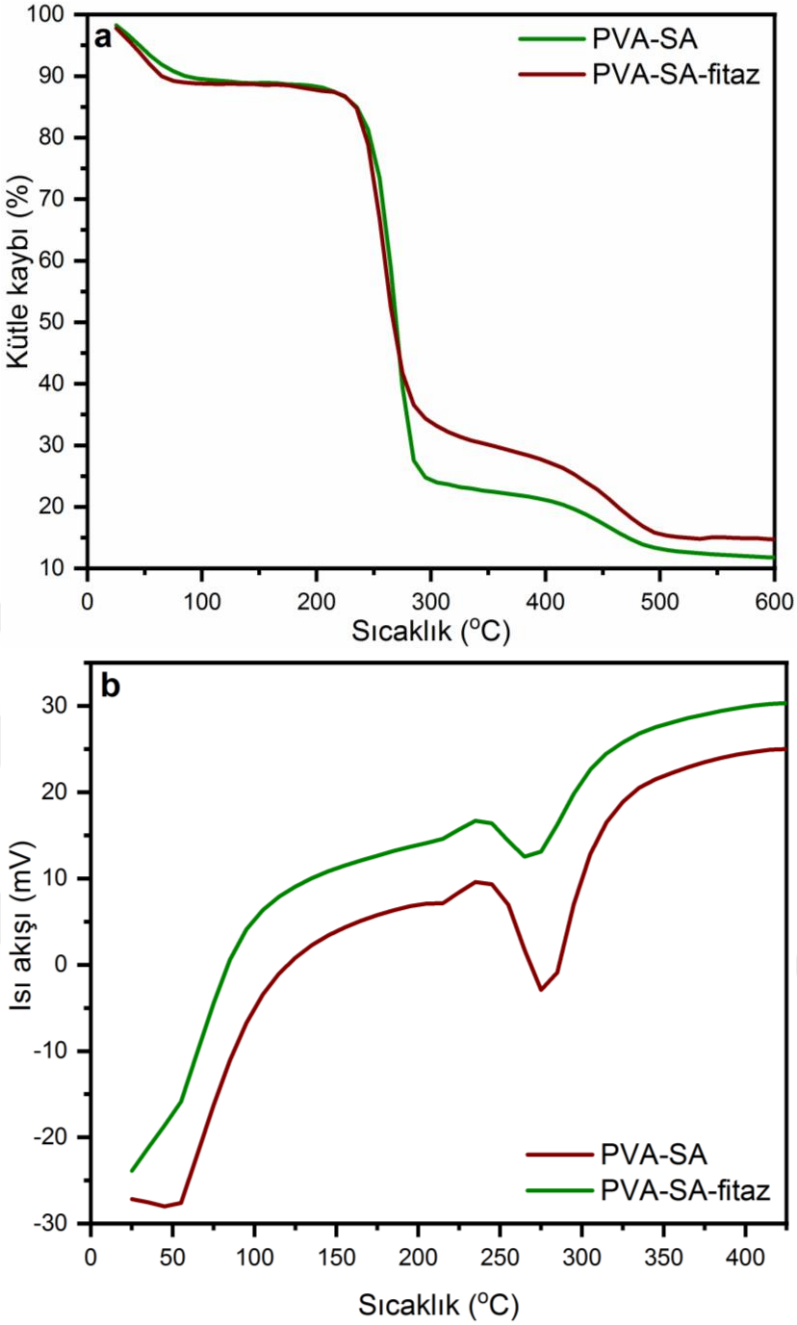

**Şekil 4.17** PVA-CS ve fitaz-PVA-CS nanofiberlerinin TGA (a) ve DSC (b) eğrileri

### 4.7.3 PVA-SA İçeren Nanofiberin TGA ve DSC Eğrileri

PVA-SA ve fitaz-PVA-SA termal kararlılıkları ve termal geçiş sıcaklıkları sırasıyla Termogravimetrik Analiz (TGA) ve nanofiberlerin Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) eğrileri sırasıyla Şekil 4.18a ve b'de gösterildi. Şekil 4.18a'dan görüldüğü gibi nanofiberler üç basamakta bozunmaktadır. İlk basamakta (yaklaşık %10 ağırlık kaybı), fiziksel olarak bağlı su moleküllerinin nanofiber yapısından uzaklaştırılması nedeniyle 0 ile 100 °C arasında gözlendi. İkinci basamak 100 ile 400 °C aralığında (yaklaşık %70

ağırlık kaybı) saptandı ve bu bozunma aşaması, polimer zincirinin bozunması ve su moleküllerinin eliminasyonundan dolayı gözlenmiştir. Son basamakta ise karbonizasyon nedeniyle 400 ve 600°C arasında (yaklaşık %5 ağırlık kaybı) gözlendi [13, 14]. Ayrıca, nanofiberlerin termal özellikleri, 600°C'de %20 (T20), %50 (T50) ağırlık kaybı sıcaklıkları ve kömür kalıntısı (char) cinsinden değerlendirildi. T20, T50 ve char değerleri PVA-SA nanofiber için sırasıyla 247°C, 270°C ve %11,72 fitaz içeren PVA-SA nanofiber içinse sırasıyla 244°C, 267°C ve %14,65 olarak belirlendi. Bu sonuçlardan da görülebileceği gibi PVA-SA ve enzim içeren PVA-SA nanofiberinin T20 ve T50 değerleri birbirine çok yakındır. Fitaz-PVA-SA nanofiberin char kalıntısı ise PVA-SA fiberinden daha yüksektir. Bunun nedeni ise PVA-SA ve fitaz arasındaki güçlü hidrojen bağı etkileşiminden dolayıdır.

Nanofiberlerin DSC eğrileri Şekil 4.18b'de verildi. Nanofiberlerin DSC eğrilerine göre, PVA-SA nanofiberi için sırasıyla 216 ve 278°C'de ve fitaz-PVA-SA nanofiberi için 212 ve 270°C'de bir omuz ve büyük endotermik pik gözlendi. Gözlenen bu pikler, nitrojen atmosferi altında nanofiber yapısının erimesine ve ayrışmasından kaynaklanmaktadır [54]. Elde edilen sonuçlara göre fitaz-PVA-SA nanofiberinin erime ve bozunma sıcaklıkları, enzim immobilizasyonundan sonra PVA-SA'nın kristal yapısının bozulması nedeniyle daha düşük sıcaklığa düştüğü görüldü.




**Şekil 4.18** PVA-SA ve fitaz-PVA-SA nanofiberinin TGA (a) ve DSC (b) eğrisi

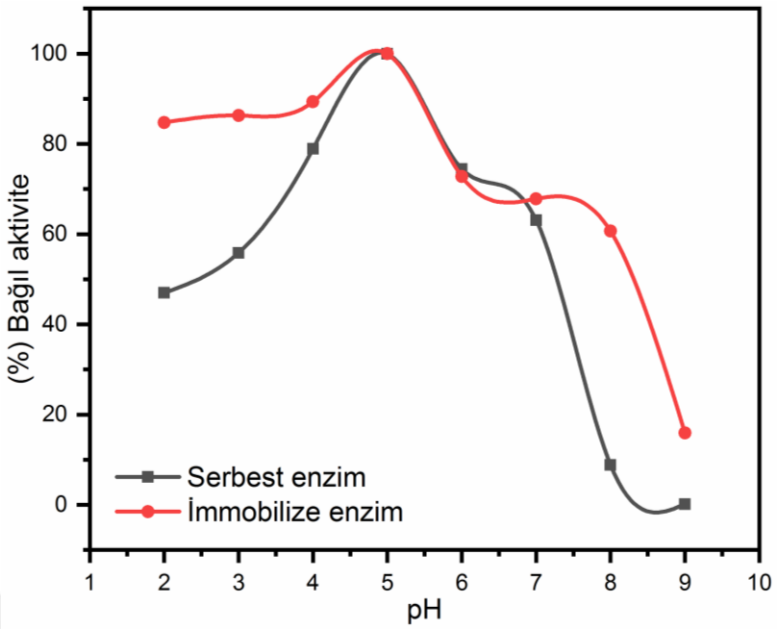
## 4.8 Serbest ve İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu

### 4.8.1 Serbest ve İmmobilize Enzimin Katalitik Aktivitesi Üzerine pH Etkisi

Serbest enzim ve nanofiberlere (PVA, PVA-CS ve PVA-SA) immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi üzerine pH etkisi incelemek amacıyla farklı pH ortamlarında (pH 2 ile 9 aralığında) enzimlerin katalitik aktiviteleri hesaplandı.

#### 4.8.1.1 Serbest ve PVA Nanofibere İmmobilize Edilen Enzimin Katalitik Aktivitesi Üzerine pH Etkisi

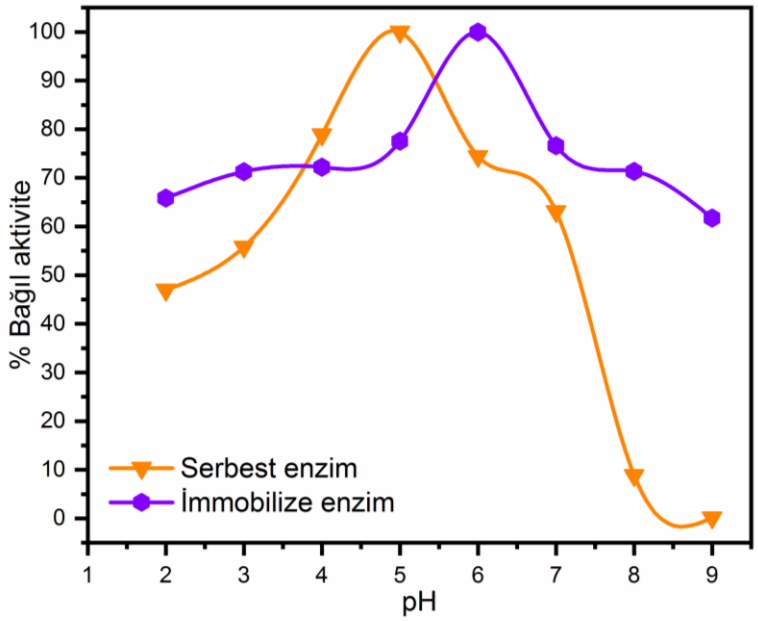
Enzimatik aktivite değeri amino asit yan zincirlerinin protonlanması (protanation) veya hidrojen iyonlarının ayrılmasına (deprotonation) bağlı olarak pH değişimlerinden etkilenir [62]. Şekil 4.19'de, farklı pH tamponlarındaki fitazın enzimatik aktivite değerleri gösterildi. Serbest fitazın % bağıl aktivitesi pH 4,0, 5,0 ve 6,0 için sırasıyla yaklaşık olarak %80, 100 ve 70 bulundu ve pH 8,0 ve 9,0 ise bağıl aktivenin kaybolduğu gözlendi. İmmobilize fitazın % bağıl aktivitesinin pH 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 ve 9,0 için sırasıyla %82, 84, 88, 100, 70, 65, 58 ve 20 olarak belirlendi ve bu sonuçlara göre immobilize fitaz yüksek pH değerlerinde enzimatik aktivitesini korumaktadır. Elde edilen enzimatik aktivite değerlerine göre serbest ve immobilize fitaz için optimum pH değerinin 5,0 olduğu saptandı. Fitazlar farklı pH ortamlarındaki optimum enzimatik aktivite değerlerine göre asidik (pH 5,0), nötr (pH 7,0) ve bazik (pH 8,0) olarak sınıflandırılmaktadır ve bitki kökenli fitazların optimum pH değeri asidiktir (pH 5,0) [63]. Ayrıca, asidik fitazlar, substrat özgüllüğü, sindirilebilirliği ve bu fitaz tipinin uygulanabilirliği nedeniyle endüstriyel uygulamalar için daha fazla tercih edilir [64].




**Şekil 4.19** PVA nanofibere immobilize edilen fitaz aktivitesi üzerine pH etkisi

### 4.8.1.2 PVA-CS Nanofibere İmmobilize Edilen Enzimin Katalitik Aktivitesi Üzerine pH Etkisi

Şekil 4.20 serbest ve immobilize enzimin pH'a bağlı bağıl fitaz aktivitesi profilini göstermektedir. Bilindiği gibi, pH ve sıcaklık, serbest ve immobilize enzimin katalitik aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir [55].

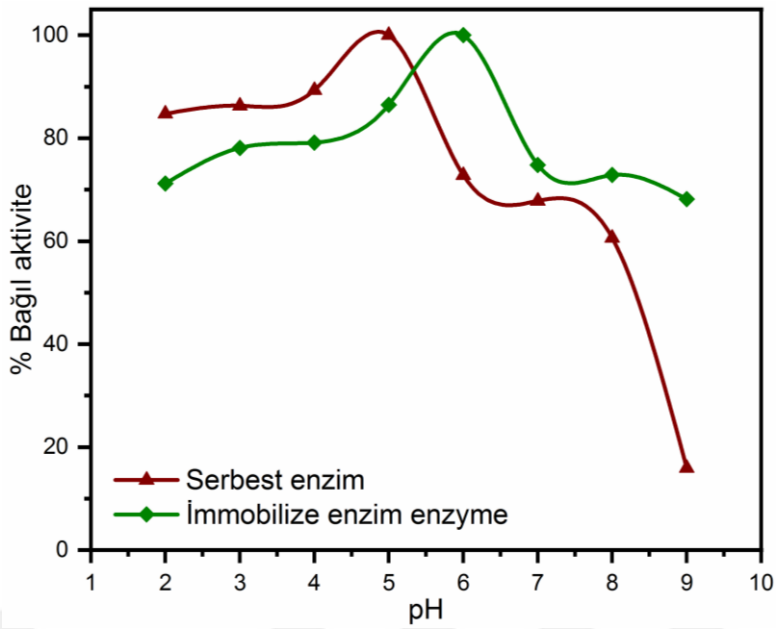



**Şekil 4.20** PVA-CS nanofibere immobilize edilen fitaz aktivitesi üzerine pH etkisi

Serbest fitazın bağıl aktivitesi pH 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 ve 9,0 için sırasıyla 46,96, 55,84, 78,89, 100, 74,44, 63,11, 8,86 ve 0,17 olarak bulundu. Bu sonuçlara göre, serbest enzimin % bağıl fitaz aktivitesi pH 7,0'den sonra keskin bir şekilde azalmıştır. Bu pH değerleri için immobilize enzimin katalitik aktivitesi ise 65,85, 71,30, 72,19, 77,58, 100, 76,61, 71,34 ve 61,75 olarak hesaplandı. Bu sonuçlara göre serbest ve immobilize fitazın optimum pH değeri sırasıyla pH 5,0 ve 6,0 olarak belirlendi ve pH değerinin enzim immobilizasyonundan sonra değiştiğini gözlendi. Börülce tohumlarından elde edilen saflaştırılmış fitaz, immobilize edilmeden önce ve edildikten sonra asidik özelliklere sahiptir. Nunes ve Kumar tarafından yapılan bir çalışmada fitazın optimum pH değerine göre alkali, nötr ve asidik olarak sınıflandırılabileceğini ve bitki kaynaklı fitazın pH 5,0 civarında optimum pH değerine sahip olduğunu belirtildi [63]. Ayrıca, fitaz PVA-CS nanofiberine immobilize edildiğinde pH değişimine karşı bir kararlılık kazanmış ve pH 4,0 ve 5,0 değerleri dışındaki bütün pH değerlerinde serbest enzime göre daha yüksek katalitik aktivite göstermiştir. Bilindiği gibi destek materyalindeki yüklü fonksiyonel grupların (PVA-CS nanofiber) ve fitaz ile nanofiber arasındaki hidrojen bağı gibi ikincil etkileşimin varlığında, immobilize enzimlerin optimum pH değerleri değişebilir [65]. Ayrıca ikincil etkileşimin oluşması fitazın hareketliliğini engellemiş ve enzimin 3 boyutlu yapısını denatürasyondan korumuştur [66].

#### 4.8.1.3 PVA-SA Nanofibere İmmobilize Edilen Enzimin Katalitik Aktivitesi Üzerine pH Etkisi

Şekil 4.21 serbest ve immobilize enzimin pH'a bağlı bağıl fitaz aktivitesi profilini göstermektedir.




**Şekil 4.21** PVA-SA nanofibere immobilize edilen fitaz aktivitesi üzerine pH etkisi

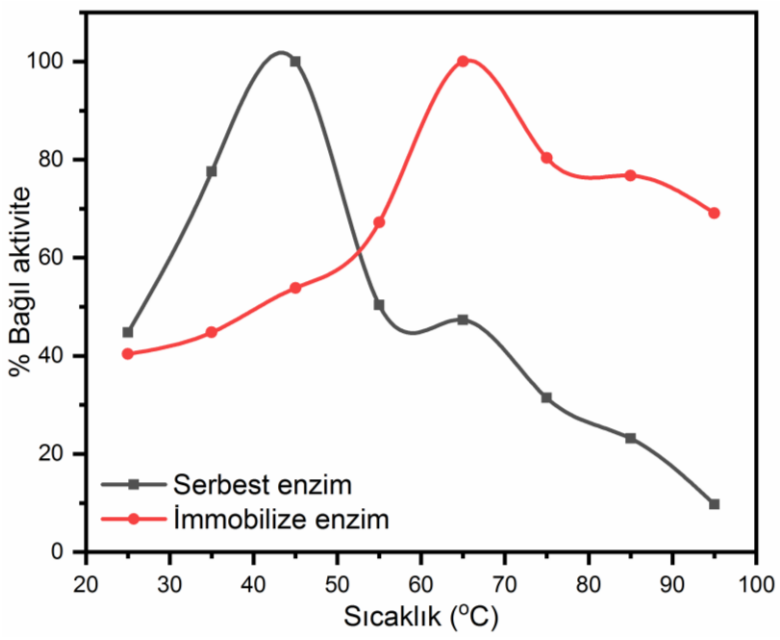
Katalitik aktivite, sırasıyla serbest ve immobilize fitaz için pH 2,0 ile 5,0 ve pH 2,0 ile 6,0 aralığında arttırılmış ve bu değerlerden sonra kademeli olarak azalmıştır. İmmobilize fitazın maksimum katalitik aktivitesi pH 6,0 olarak tespit edilmiş ve fitaz aktif gruplarının iyonizasyon yükü nedeniyle immobilize fitazın pH değeri nötral pH değerine doğru kaymıştır. Bu çalışmada fitaz bir bitkiden (börülce tohumları) izole edilmiş ve bitki bazlı fitazlar genellikle asidik özellikler (pH 5,0 civarında) sergilemektedir. Ayrıca, immobilize fitaz, serbest fitaza kıyasla daha geniş bir pH aralığında daha yüksek pH stabilitesi sergilemiş ve enzimin PVA-SA nanofibere immobilizasyonundan sonra pH kararlılığı artmıştır.

### 4.8.2 Serbest ve İmmobilize Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi

Enzimin katalitik aktivitesi üzerine sıcaklık etkisini araştırmak için serbest ve immobilize fitazın % bağıl aktivitesi 25 ile 95$^{o}$C arasında çalışıldı.

#### 4.8.2.1 Serbest ve PVA Nanofibere İmmobilize Edilen Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi

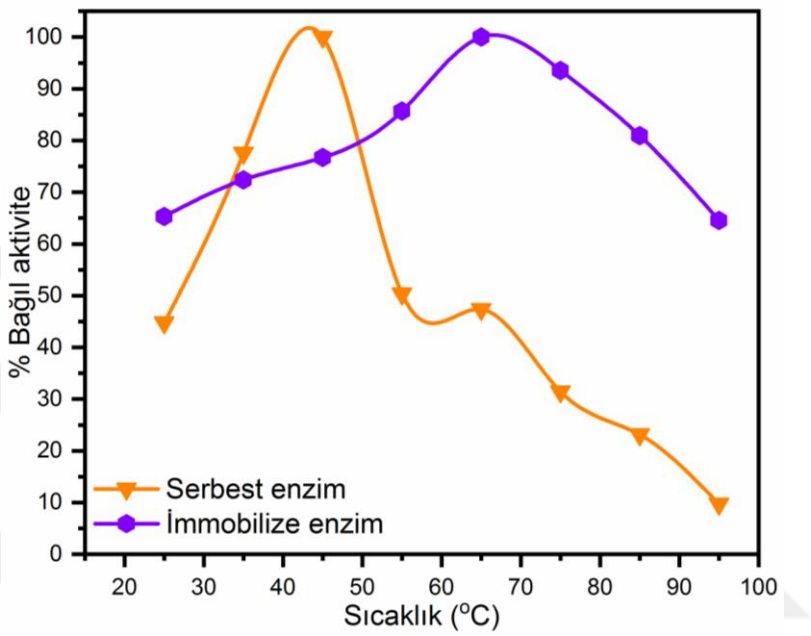
Serbest ve immobilize enzimin sıcaklık etkisi, %1,5 fitaz içeren 2,5 mg PVA nanofiberi kullanılarak optimum koşullar altında incelendi (Şekil 4.22). Serbest enzimin % bağıl aktivitesi 25 ile 45°C arasında artmıştır ve maksimum enzimatik aktivite değeri 45°C'de elde edildi. 45°C'den sonra serbest fitazın enzimatik aktivitesi azalmıştır. İmmobilize fitazın % bağıl aktivitesi 25°C ile 65°C aralığında artmıştır ve immobilize enzimin maksimum enzimatik aktivitesi 65°C'de elde edildi. Bu sıcaklıktan sonra ise immobilize enzimin % bağıl aktivitesi yavaş bir şekilde düşmüştür. Bu sonuçlara göre, immobilize fitazın maksimum % bağıl aktivite gösterdiği sıcaklık 65°C'ye kaymış ve bu enzimin optimum sıcaklığı serbest fitaza kıyasla artmıştır. Bu sıcaklık değerindeki artış muhtemelen iyonik veya hidrofobik etkileşimlerden ve fitaz ile destek materyali arasındaki hidrojen bağları gibi ikincil etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. İmmobilizasyon için destek materyali olarak hidroksil grubu (-OH) bakımından zengin bir polimer olan polivinil alkol (PVA) kullanılmış ve bu polimer, yüksek sıcaklıklara dayanma kabiliyeti nedeniyle immobilize enzimin optimum sıcaklığını değiştirmiştir [67]. Ayrıca, pH ve sıcaklık için enzimatik aktivite sonuçları, immobilize fitazın daha geniş bir pH aralığında enzimatik aktiviteye ve daha yüksek bir sıcaklıkta optimum sıcaklığa sahip olduğunu ve bu özelliklerin endüstriyel uygulamalar için oldukça önemli olduğunu göstermiştir.




**Şekil 4.22** PVA nanofibere immobilize edilen fitaz aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi

### 4.8.2.2 PVA-CS Nanofibere İmmobilize Edilen Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi

Serbest enzim, düşük sıcaklıklarda (45$^{o}$C'ye kadar) daha yüksek katalitik aktivite göstermiş, serbest fitazın % bağıl aktivitesi 60$^{o}$C'den sonra keskin bir şekilde azalmış olup enzimatik aktivitesini neredeyse kaybetmiştir. Serbest enzimin optimum sıcaklığı ise 45$^{o}$C olarak belirlendi (Şekil 4.23).

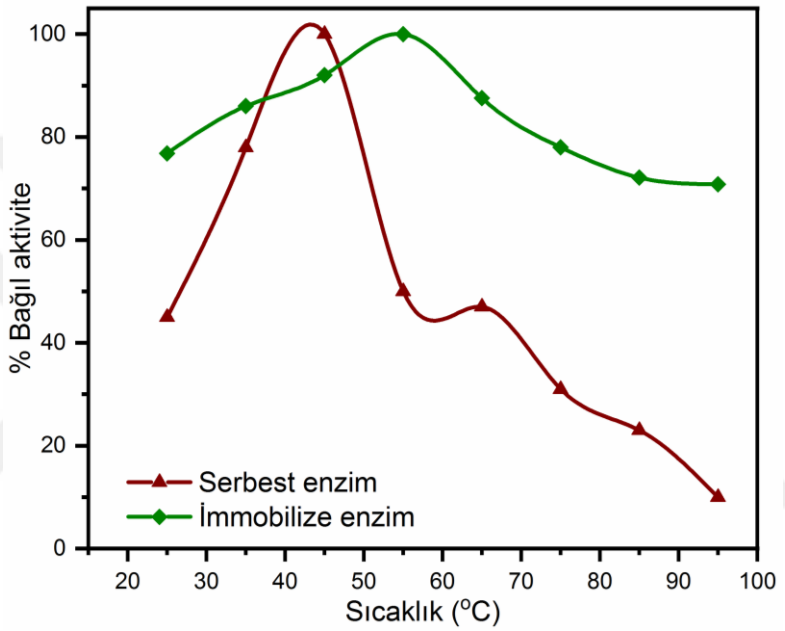



**Şekil 4.23** PVA-CS nanofibere immobilize edilen fitaz aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi

Diğer yandan immobilize enzimin katalitik aktivitesi 25-65$^{o}$C aralığında artmış ve bu sıcaklıktan sonra kademeli olarak azalmıştır. İmmobilize enzimin optimum sıcaklık değeri ise 65$^{o}$C olarak bulunmuştur. İmmobilizasyon fitazın PVA-CS nanofiber içerisine immobilize edilmesi enzime sıcaklığa karşı dayanıklılık kazanmıştır. Destek malzemesi ile fitaz arasındaki ikincil etkileşim, konformasyonel sınırlamalar yoluyla fitaz hareketini azaltmış, fitazın yapısındaki proteinin denatürasyonu engellemiş ve bu faktörlerin bir sonucu olarak, immobilize enzimin optimum sıcaklık değeri artmıştır [68].

#### 4.8.2.3 PVA-SA Nanofibere İmmobilize Edilen Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Sıcaklık Etkisi

Serbest fitaz için enzimatik aktivite 25 ile 45°C arasında ve immobilize fitaz için ise 25 ile 55°C arasında kademeli bir şekilde artmış ve bu sıcaklık değerlerinden sonra azalmıştır. Serbest ve immobilize fitaz için maksimum bağıl aktivite 45 ve 55°C'de elde edildi. Bu sonuçlar, immobilize fitazın serbest fitaza göre daha geniş bir sıcaklık aralığında daha yüksek bir kararlılık gösterdiğini ve sıcaklığa bağlı olarak immobilize fitazın katalitik aktivitesinin arttığını ortaya koymuştur (Şekil 4.24)



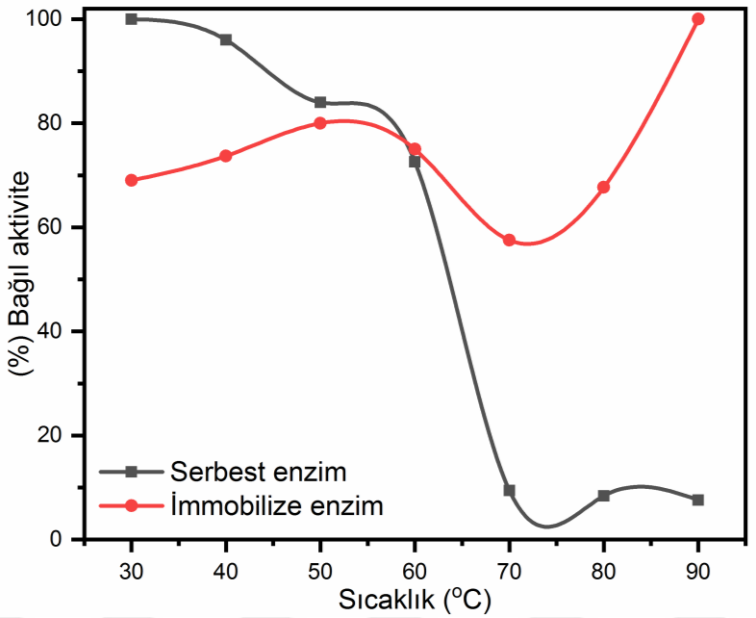

**Şekil 4.24** PVA-SA nanofibere immobilize edilen fitaz aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi

### 4.8.3 Serbest ve İmmobilize Fitazın Termal Kararlılığının ve Kinetik Sabitlerinin Tayini

#### 4.8.3.1 Serbest ve PVA Nanofibere İmmobilize Edilen Fitazın Termal Kararlılığı ve Kinetik Sabitleri

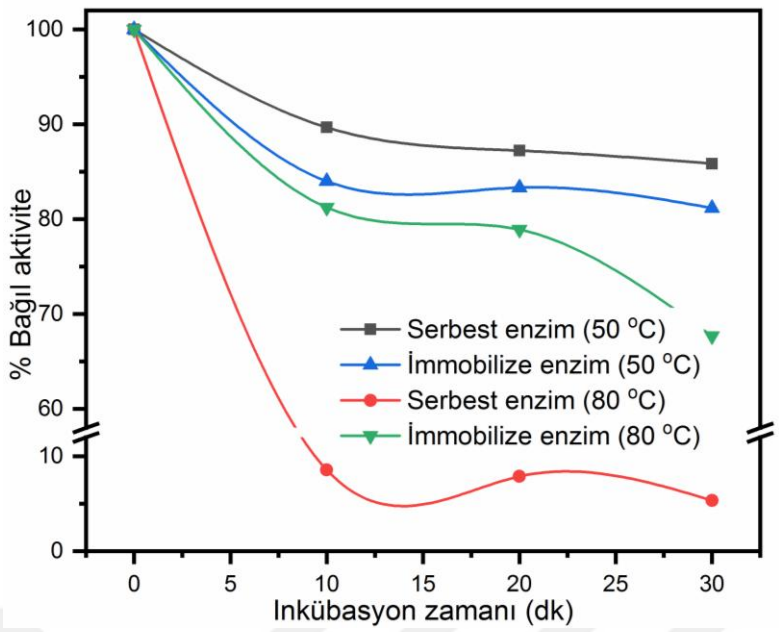
Serbest ve immobilize enzimin termal kararlılığını belirlemek amacı ile farklı sıcaklıklardaki enzimatik aktivite değerleri ölçüldü (Şekil 4.25). Termal kararlılık eğrisine göre serbest fitaz 50°C'de %84,3 enzimatik aktivitesini korumuştur ve bu enzimin % bağıl aktivitesi önemli bir ölçüde azalmıştır. İmmobilize enzimin 30 (%69,4) ile 50°C (%80,3) sıcaklık aralığında bağıl aktivite değerleri artmış ve 60 ile 70°C'de biraz azalmıştır. Bu sıcaklıktan sonra immobilize fitazın aktivitesi artmış ve immobilize

fitaz 80 ve 90°C daha fazla termal kararlılık sergilemiştir. Naghshbandi ve arkadaşlarının ifade ettiğine göre, immobilize fitazın termal kararlılığındaki artışın nedeni destek malzemesinin yapısından, fitaz ile destek malzeme arasındaki moleküler etkileşimin azalmasından ve protein hareketliliğindeki azalmadan kaynaklanmaktadır [69].




**Şekil 4.25** Serbest ve PVA nanofibere immobilize edilen fitazın termal kararlılığı

İmmobilize fitazın termal kararlılığı üzerine inkübasyon etkisi (10, 20 ve 30 dakika) Şekil 4.26'da verildi. 50 ve 80°C'deki % bağıl aktivite değerleri inkübasyon zamanına göre çalışıldı ve elde edilen sonuçlara göre serbest enzim immobilize enzime göre yüksek sıcaklıklarda (50 °C) daha fazla enzimatik aktivite göstermiştir. Artan sıcaklıkla birlikte immobilize enzimin termal kararlılığı artmıştır. Bununla birlikte, serbest ve immobilize enzimin termal kararlılığı inkübasyon zamanına bağlı olarak azalmıştır.



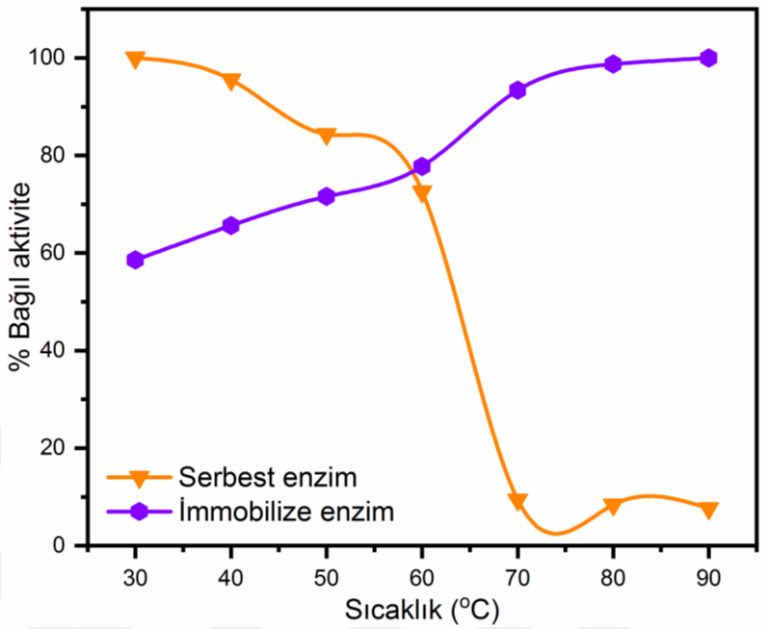

**Şekil 4.26** İnkübasyon zamanına bağlı serbest ve PVA nanofibere immobilize edilen fitazın termal kararlılığı

Serbest ve immobilize fitazın Km ve Vmax değerlerini belirlemek için farklı substrat (sodyum fitat) derişimlerinde incelendi. Km ve Vmax değerleri Lineweaver-Burk denkleminden serbest fitaz için sırasıyla 0.46 mM ve 53.76 U/mg protein ve immobilize fitaz için ise 1.17 mM ve 5.67 U/mg protein olarak hesaplandı. Bu sonuçlara göre immobilize fitazın Michaelis-Menten sabiti (Km) değeri immobilizasyon sonrasında artmıştır. Elde edilen sonuçlara göre enzim-substrat etkileşimi artan Km değeri ile azalmıştır. Bu azalmanın sebebi muhtemelen nanofiberlerin yapısından olabilir. Işık ve arkadaşları immobilize fitazın Km değerinin sodyum fitatın difüzyon problemleri ve sterik engel nedeniyle arttığını belirtmiştir. Bu faktörlerin varlığında, fiberin üretimi esnasında enzimin aktif merkezleri veya fiberin gözenek yapısı tıkanabilir [55].

### 4.8.3.2 PVA-CS Nanofibere İmmobilize Edilen Fitazın Termal Kararlılığı ve Kinetik Sabitleri

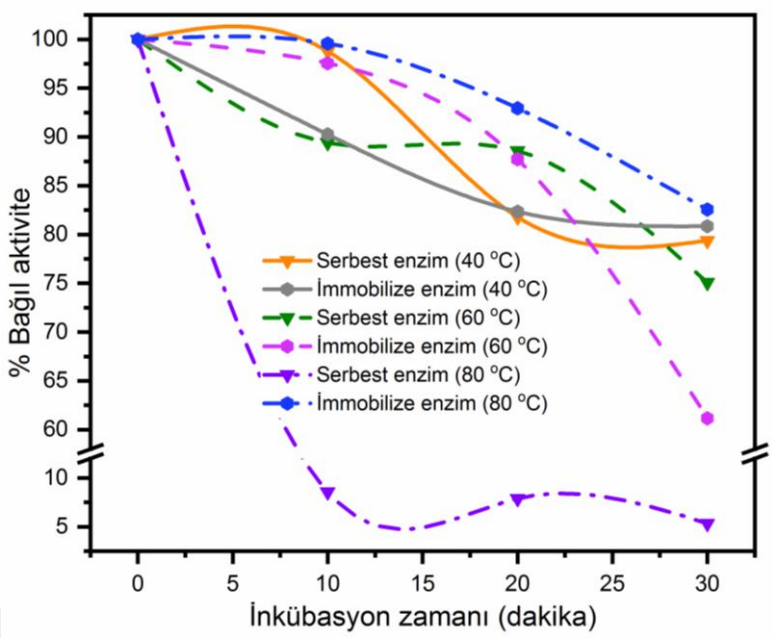
Serbest ve immobilize fitazın termal karalılık çalışmaları 30 ila 90$^{o}$C sıcaklık aralığında ve enzimler bu sıcaklıklarda 10, 20 ve 30 dakika inkübe edilerek gerçekleştirildi. Şekil 4.27'de enzimlerin 30 dakika inkübasyonundan sonra serbest ve immobilize fitazın termal karalılıklarını göstermektedir. Şekil 4.27'de görüldüğü gibi serbest fitazın termal kararlılığı düşük sıcaklıklarda (30-50$^{o}$C aralığında) immobilize fitaza göre daha

yüksektir. Yüksek sıcaklık değerlerinde (60-90°C aralığında) ise immobilize fitazın termal kararlılığı daha fazladır. Enzimin PVA-CS nanofiber içerisine immobilizasyonu fitazı sıcaklığa karşı dayanıklı hale getirmiştir.




**Şekil 4.27** PVA-CS nanofibere immobilize edilen fitazın termal kararlılığı

40, 60 ve 80°C gibi farklı sıcaklıklarda enzimlerin ısıl kararlılığı üzerindeki inkübasyon süresinin etkisi de Şekil 4.28'de verildi. Düşük sıcaklıkta (40°C), serbest fitaz daha fazla termal kararlılık sergilerken, sıcaklığın artmasıyla birlikte serbest enzimin denatürasyonu sonucu 60 ve 80°C'ye termal kararlılık düşmüştür [33]. İmmobilize enzimin termal kararlılık sonuçlarına göre, fitaz ile PVA-CS nanofiberin fonksiyonel grupları arasındaki hidrojen bağı gibi güçlü ikincil bağlanma etkileşimleri nedeniyle artan sıcaklıkla birlikte immobilize enzim sıcaklığa karşı termal dayanım kazanmıştır [68].




**Şekil 4.28** İnkübasyon zamanına bağlı PVA-CS nanofibere immobilize edilen fitazın termal kararlılığı

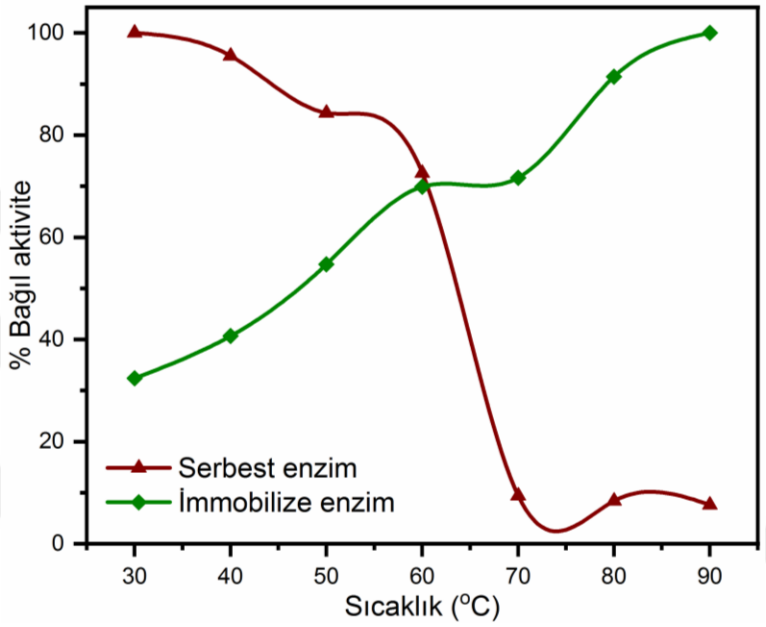
PVA-CS nanofiberine immobilize fitazın kinetik parametreleri (Km ve Vmax değerleri), optimum pH ve sıcaklık değerlerinde farklı substrat konsantrasyonları (1.0-2.4 M) kullanılarak belirlendi ve Lineweaver-Burk denkleminden hesaplandı [70]. İmmobilize fitazın Km ve Vmax değerleri sırasıyla 13.43 mM ve 31.25 U/mg protein olarak bulundu. Elde edilen bu sonuçlara göre immobilize fitazın Km değerinin PVA-CS nanofiber içine immobilizasyondan sonra arttığı saptandı. Bunun nedeni, nanofiberlerin gözenek yapısı ve substrat difüzyonunun direnci nedeniyle Vmax değerinin düşmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, fitazın enzim afinitesi, sterik engelleme ve difüzyon sınırlamalarına bağlı olarak, immobilize fitazın aktif tarafı ile etkileşim substrat miktarını da azalmıştır [71].

### 4.8.3.3 PVA-SA Nanofibere İmmobilize Edilen Fitazın Termal Kararlılığı ve Kinetik Sabitleri

Serbest ve immobilize fitazın termal karalılık çalışmaları 30 ile 90$^{o}$C sıcaklık aralığında ve enzimler bu sıcaklıklarda 10, 20 ve 30 dakika inkübe edilerek gerçekleştirildi (Şekil 4.29). Serbest fitazın termal kararlılığı 30 (%100) ile 60°C (%72,6) arasında kademeli olarak azalırken, 60°C'den sonra enzim yapısının denatürasyonu nedeniyle keskin bir şekilde azalmıştır [72]. Elde edilen sonuçlara göre serbest fitazın düşük sıcaklıklarda

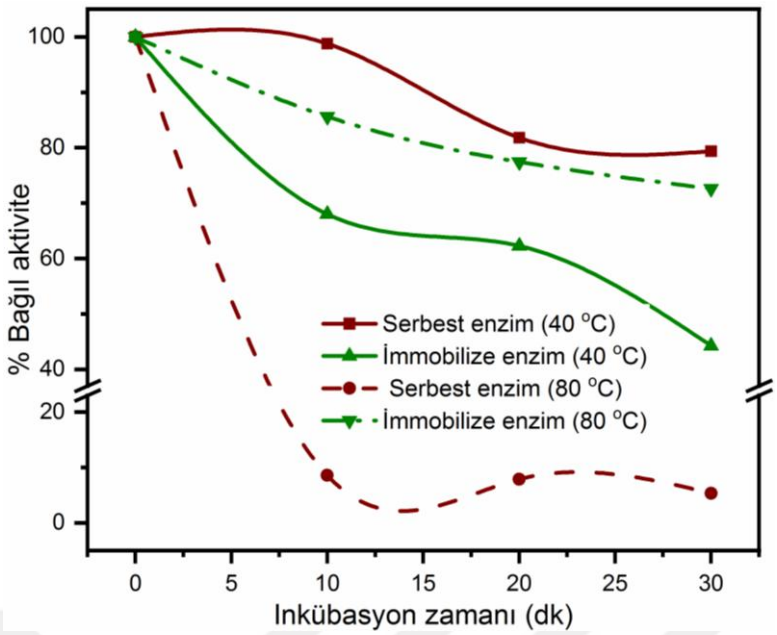
yüksek termal kararlılığa sahip olduğu ve bu enzimin termal kararlılığının yüksek sıcaklıklarda azaldığı bulundu.

PVA-SA nanofibere immobilize fitazın termal kararlılığı çalışılan sıcaklık aralığında sürekli olarak arttığını ve serbest fitaz ile karşılaştırıldığında yüksek sıcaklıklarda daha yüksek termal kararlılık sergilediğini gösterdi. Bunun nedeni, destek malzemesi (PVA-SA nanofiber) ve fitaz arasındaki güçlü hidrojen bağı, PVA-SA nanofiberin yapısı ve protein hareketliliğindeki azalmadan kaynaklanmaktadır [68, 69].




**Şekil 4.29** PVA-SA nanofibere immobilize edilen fitazın termal kararlılığı

Serbest ve immobilize fitazın termal kararlılığı üzerinde inkübasyon süresinin etkisi de enzimlerin farklı sıcaklıklarda (40 ve 80°C) 10, 20 ve 30 dakika inkübe edilerek incelendi (Şekil 4.30). Elde edilen sonuçlar hem serbest fitazın hem de immobilize fitazın termal kararlılığının inkübasyon süresi ile azaldığını gösterdi.




**Şekil 4.30** İnkübasyon zamanına bağlı PVA-SA nanofibere immobilize edilen fitazın termal kararlılığı

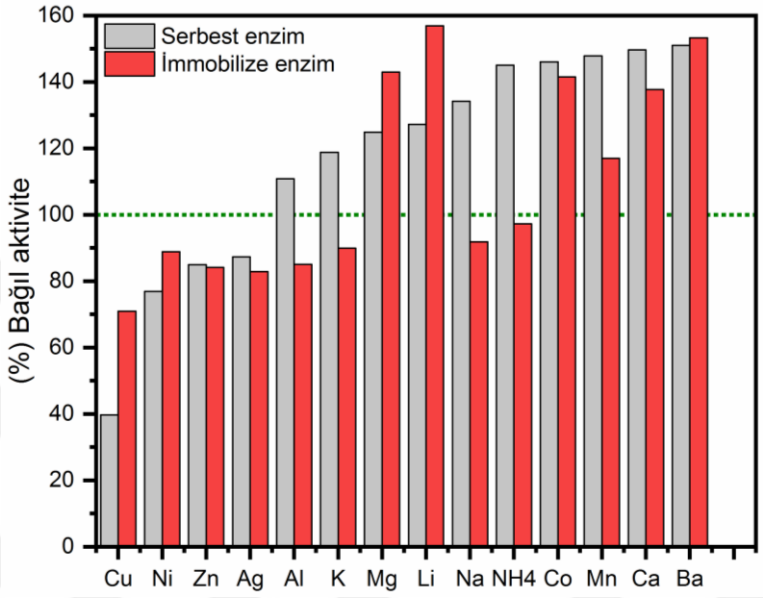
İmmobilize fitazın kinetik parametreleri (Km ve Vmax), Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplandı [70]. İmmobilize fitaz için Km ve Vmax değerleri sırasıyla 4.66 mM ve 18.38 U/mg protein olarak belirlendi. Bu sonuçlar, enzimin PVA-SA nanofibere immobilizasyonundan sonra fitazın Km değerinin arttığını göstermiştir. Bunun nedeni, nanofiberin gözenekli yapısı, enzimin difüzyon sınırlaması ve sterik engelden kaynaklanmaktadır [71]. Ayrıca, elde edilen sonuçlar açıkta göstermektedir ki fitaz, daha geniş bir pH ve sıcaklıkta daha yüksek katalitik aktivite sergilemiştir.

### 4.8.4 Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Metal İyonları Etkisinin İncelenmesi

#### 4.8.4.1 Serbest ve PVA Nanofibere İmmobilize Edilen Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi

Farklı metal iyonlarının serbest ve immobilize fitazın aktivitesi üzerine etkisi 20 mM metal katyonu kullanılarak belirlendi (Şekil 4.31). İyon etkisi belirleme deneyleri 2,5 mg %1,5 fitaz içeren PVA nanofiber kullanılarak çalışıldı. Şekil 4.31'den görüldüğü gibi $Cu^{2+}$, $Ni^{2+}$, $Zn^{2+}$ ve $Ag^{+}$ metal iyonları serbest fitaz aktivitesi üzerine inhibe edici bir etki gösterdiği, $Al^{3+}$, $K^{+}$, $Mg^{2+}$, $Li^{+}$, $Na^{+}$, $NH_4^{+}$, $Co^{2+}$, $Mn^{2+}$, $Ca^{2+}$ ve $Ba^{2+}$ metal iyonları aktive edici bir etki göstermiştir. Bakır ve baryum iyonu, sırasıyla serbest fitaz aktivitesi üzerinde en yüksek inhibe ve aktive edici etkisine sahiptir. Ayrıca, $Cu^{2+}$, $Ni^{2+}$,

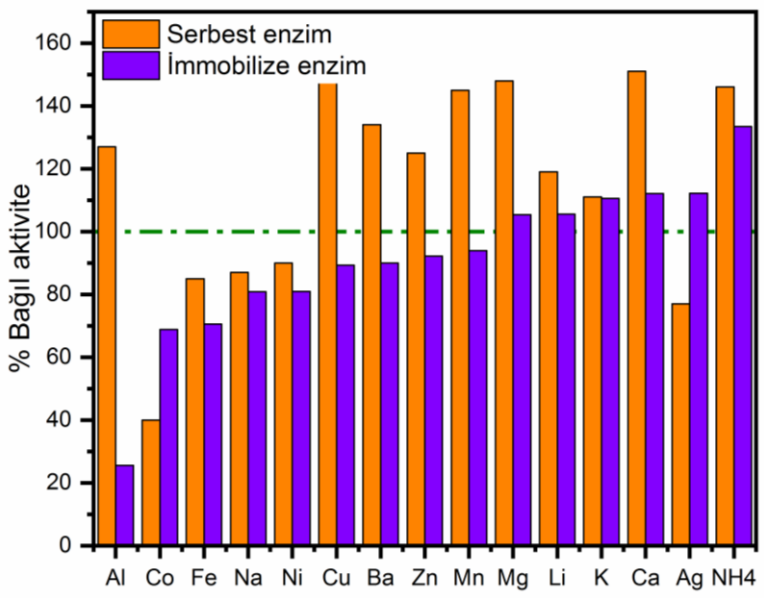
$Zn^{2+}$, $Ag^{2+}$, $Al^{3+}$, $K^{+}$, $Na^{+}$ ve $NH_4^{+}$ immobilize fitazın aktivitesi üzerinde inhibe edici bir etki göstermiştir. Enzim aktivitesi üzerine metal iyonu etkisi sonuçlarına göre; $Mg^{2+}$, $Li^{+}$, $Co^{2+}$, $Mn^{2+}$, $Ca^{2+}$ ve $Ba^{2+}$ katyonları hem serbest hem de immobilize fitazın enzimatik aktivitesi üzerinde bir aktive edici etkisi gösterildi. Ayrıca, bu katyonların fitaz aktivitesi üzerindeki inhibe edici etki göstermesinin nedeni substrat (sodyum fitat)-metal katyon kompleksinin düşük çözünürlüğünden kaynaklanmaktadır [73].




**Şekil 4.31** Serbest ve PVA nanofibere immobilize edilen enzimin aktivitesi üzerine iyon etkisi

### 4.8.4.2 PVA-CS Nanofibere İmmobilize Edilen Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi

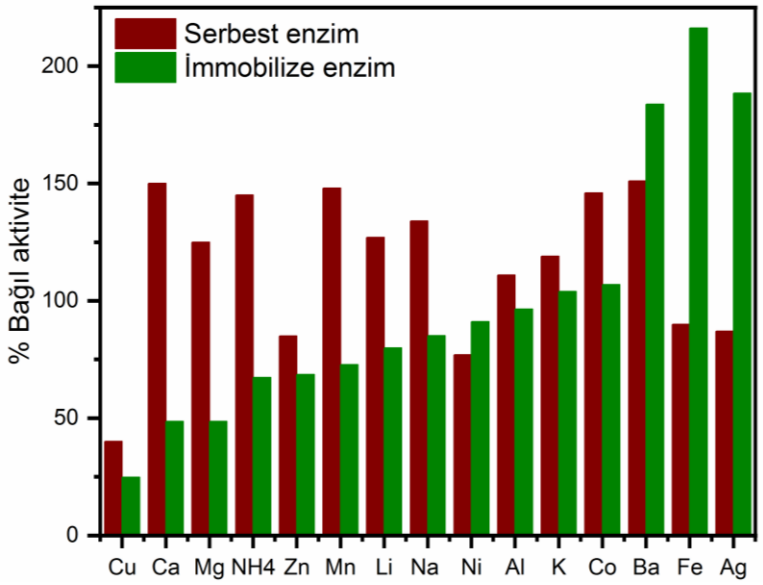
Metal iyonları birçok enzimin biyolojik işlevinde önemli bir role sahiptir ve fitaz, pozitif yüklü iyonlarla güçlü bir şekilde şelatlanma özelliği gösterir [74, 75]. İyonların enzimin katalitik aktivitesi üzerine inhibitör etkilerini araştırmak için 20 mM $K^{+}$, $Ag^{+}$, $NH_4^{+}$, $Li^{+}$, $Na^{+}$, $Ba^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Co^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Ni^{2+}$, $Ca^{2+}$, $Mn^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Fe^{3+}$ ve $Al^{3+}$ gibi farklı metal iyon derişimleri kullanarak incelendi (Şekil 4.32). Serbest enzimin katalitik aktivitesi, $K^{+}$, $NH_4^{+}$, $Li^{+}$, $Ba^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Ca^{2+}$, $Mn^{2+}$, $Cu^{2+}$ ve $Al^{3+}$ varlığında artmış ve test edilen diğer iyonlar ise inhibitör etki sergilemiştir. İmmobilize fitazın katalitik aktivitesi üzerindeki iyon etkisine göre $Mg^{2+}$, $Li^{+}$, $K^{+}$, $Ca^{2+}$, $Ag^{+}$ ve $NH_4^{+}$ aktivatör etkisi gösterirken test edilen diğer iyonların immobilize fitazın katalitik aktivitesini azalmıştır.




**Şekil 4.32** Serbest ve PVA-CS nanofibere immobilize edilen enzimin aktivitesi üzerine iyon etkisi

### 4.8.4.3 PVA-SA Nanofibere İmmobilize Edilen Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi

Polivinil alkol ve sodyum aljinat kullanılarak elde edilen nanofibere immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi üzerine metal iyonu etkisini belirlemek amacıyla, 2,5 mg fitaz içeren nanofiber ve 20 mM farklı metal iyonu ($K^+$, $Ag^+$, $NH_4^+$, $Li^+$, $Na^+$, $Ba^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Co^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Ni^{2+}$, $Ca^{2+}$, $Mn^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Fe^{3+}$ ve $Al^{3+}$) varlığında fitaz aktivitesi belirlendi (Şekil 4.33). Elde edilen sonuçlara göre $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, $NH_4^+$, $Mn^{2+}$, $Li^+$, $Na^+$, $Al^{3+}$, $K^+$, $Co^{2+}$ ve $Ba^{2+}$ iyonları varlığında serbest enzimin katalitik aktivitesi artar iken kullanılan diğer iyonlar fitazın katalitik aktivitesine ise inhibitör etki göstermiştir. Bununla birlikte, PVA-SA nanofibere immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi $K^+$, $Co^{2+}$, $Ba^{2+}$ ve $Ag^+$ iyonları varlığında artarken test edilen diğer metal iyonları katalitik aktiviteye inhibitör etkisi göstermiştir.



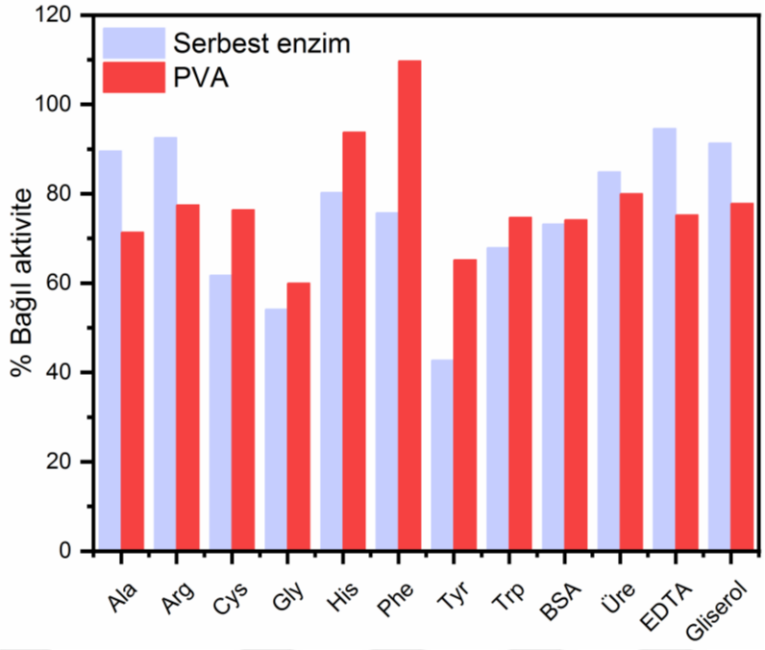

**Şekil 4.33** Serbest ve PVA-SA nanofibere immobilize edilen enzimin aktivitesi üzerine iyon etkisi

### 4.8.5 Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Organik Bileşen Etkisi

Fitazın katalitik aktivitesi üzerine çeşitli organik bileşen (L-alanin (Ala), L-arjinin (Arg), L-sistein (Cys), glisin (Gly), L-histidin (His), L-fenilalanin (Phe), L-tirozin (Tyr), L-triptofan (Trp), sığır serum albümin (BSA), üre, EDTA ve gliserol) etkisini incelemek amacıyla 2,5 mg enzim içeren fiber ve %1'lik organik bileşen varlığında katalitik aktivite hesaplandı.

#### 4.8.5.1 Serbest ve PVA Nanofibere İmmobilize Edilen Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Organik Bileşen Etkisi

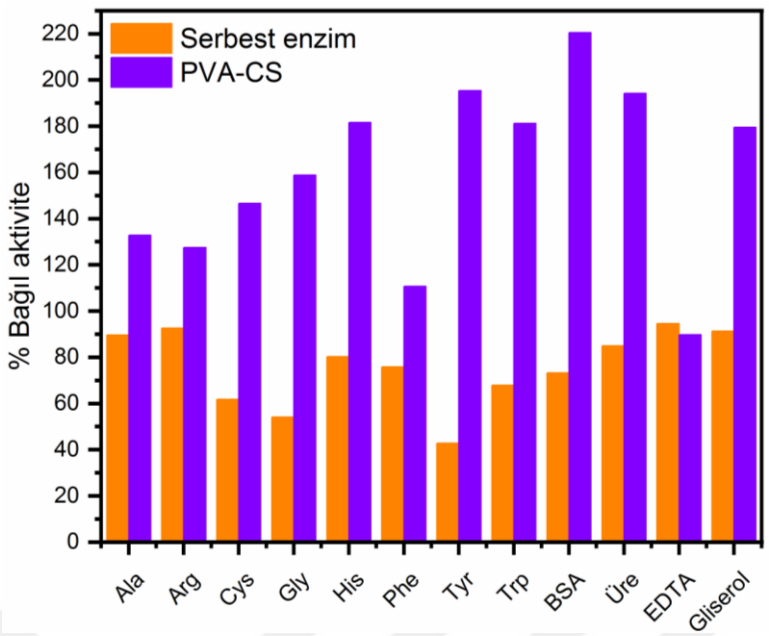
Polivinil alkol kullanılarak elde edilen nanofibere immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi üzerine organik bileşen etkisi Şekil 4.34'te gösterildi. Serbest enzim ile immobilize enzimin bağıl aktiviteleri karşılaştırıldığında test edilen amino asitlerden alanin ve arjinin varlığında immobilize enzimin % bağıl aktivitesi azalırken diğer amino asitlerin (sistein, glisin, histidin, fenilalanin, tirozin ve triptofan) varlığında immobilize enzimin % bağıl aktivitesi artmıştır. Diğer yandan, organik bileşik olarak test edilen üre, EDTA, BSA ve gliserol varlığında ise sadece BSA varlığında immobilize enzimin % bağıl aktivitesi artarken EDTA, üre ve gliserol varlığında ise immobilize enzimin % bağıl aktivitesi serbest enzimin aktivitesine göre azalmıştır.




**Şekil 4.34** Serbest ve PVA nanofibere immobilize enzimin aktivitesi üzerine organik bileşen etkisi

### 4.8.5.2 PVA-CS Nanofibere İmmobilize Edilen Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Organik Bileşen Etkisi

Şekil 4.35 polivinil alkol ve kitosan kullanılarak elde edilen nanofibere immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi üzerine organik bileşen etkisini göstermektedir.

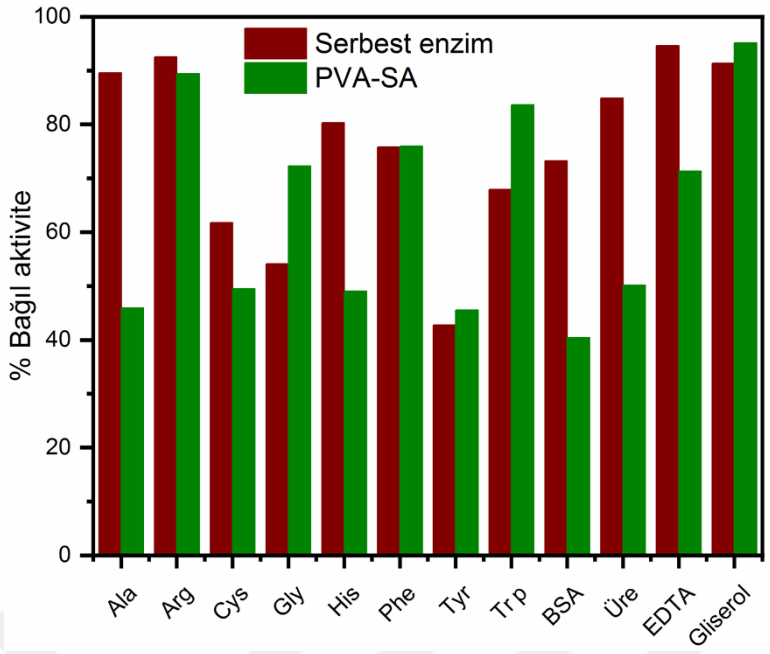



**Şekil 4.35** Serbest ve PVA-CS nanofibere immobilize enzimin aktivitesi üzerine organik bileşen etkisi

Serbest enzim ile immobilize enzimin bağıl aktiviteleri karşılaştırıldığında test edilen amino asitlerden alanin ve arjinin varlığında immobilize enzimin % bağıl aktivitesi azalırken diğer amino asitlerin (sistein, glisin, histidin, fenilalanin, tirozin ve triptofan) varlığında immobilize enzimin % bağıl aktivitesi artmıştır. Diğer yandan, organik bileşik olarak test edilen üre, EDTA, BSA ve gliserol varlığında ise sadece BSA varlığında immobilize enzimin % bağıl aktivitesi artarken EDTA, üre ve gliserol varlığında ise immobilize enzimin % bağıl aktivitesi serbest enzimin aktivitesine göre azalmıştır.

### 4.8.5.3 PVA-SA Nanofibere İmmobilize Edilen Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Organik Bileşen Etkisi

Şekil 4.36 polivinil alkol ve sodyum aljinat kullanılarak elde edilen nanofibere immobilize edilen fitazın katalitik aktivitesi üzerine organik bileşen etkisini göstermektedir.



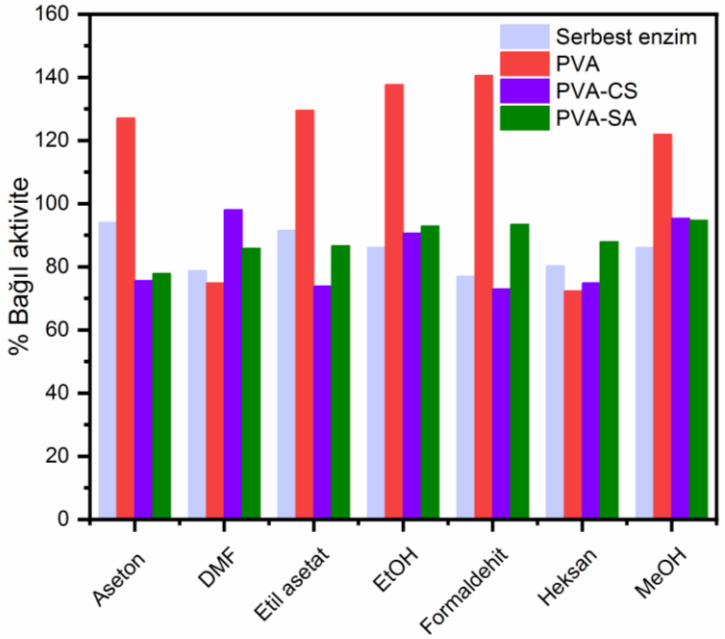

**Şekil 4.36** Serbest ve PVA-SA nanofibere immobilize enzimin aktivitesi üzerine organik bileşen etkisi

Serbest enzim ile immobilize enzimin bağıl aktiviteleri karşılaştırıldığında test edilen amino asitlerden glisin, fenilalanin, tirozin ve triptofan varlığında immobilize enzimin % bağıl aktivitesi artar iken diğer amino asitlerin (alanin, arjinin, sistein ve histidin) varlığında immobilize enzimin % bağıl aktivitesi azalmıştır. Diğer yandan, organik bileşik olarak test edilen üre, EDTA, BSA ve gliserol varlığında ise sadece üre, BSA ve EDTA varlığında immobilize enzimin % bağıl aktivitesi azalırken sadece gliserol varlığında ise immobilize enzimin % bağıl aktivitesi serbest enzimin aktivitesine göre artmıştır.

### 4.8.6 Serbest ve İmmobilize Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Organik Çözücülerin Etkisi

Bilindiği gibi, katkı maddeleri genellikle endüstriyel uygulama veya üretim sırasında enzimatik aktivite üzerinde önleyici bir etki sergiler [75]. Bu yüzden, serbest ve PVA, PVA-CS ile PVA-SA nanofiberlerine immobilize edilen enzimin katalitik aktiviteleri farklı organik çözücülerin (aseton, DMF, etil asetat, etanol (EtOH), formaldehit, heksan ve metanol (MeOH)) varlığında belirlendi (Şekil 4.37). Elde edilen sonuçlara göre polivinil alkol nanofiberine immobilize edilen fitazın % bağıl aktivitesi DMF ve heksan varlığında azalırken test edilen diğer organik çözücüler varlığında önemli miktarda

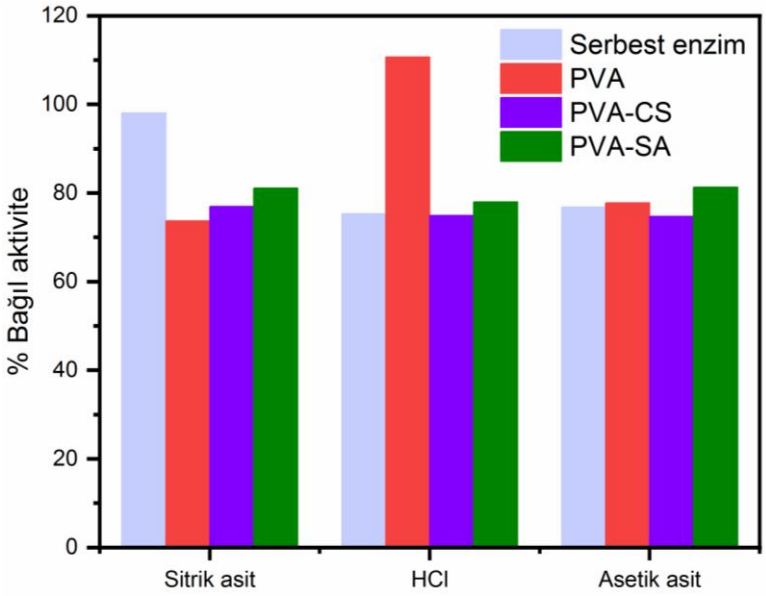
arttığı bulundu. Polivinil alkol ve kitosan (PVA-CS) kullanılarak elde edilen nanofibere immobilize edilen fitazın % bağıl aktivitesi ise aseton, etil asetat, formaldehit ve heksan varlığında azalırken diğer test edilen DMF, EtOH ve MeOH varlığında ise fitazın aktivitesi artmıştır. Bununla birlikte, polivinil alkol ve sodyum aljinat (PVA-SA) kullanılarak elde edilen nanofibere immobilize edilen fitazın % bağıl aktivitesi ise DMF, EtOH, formaldehit, heksan ve MeOH varlığında artar iken sadece aseton ve etil asetat varlığında ise fitazın aktivitesi azaldığı saptandı.




**Şekil 4.37** Serbest ve nanofiberlere immobilize enzimin aktivitesi üzerine organik çözücü etkisi

### 4.8.7 Serbest ve İmmobilize Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Asit Etkisi

Serbest ve PVA, PVA-CS ile PVA-SA nanofiberlerine immobilize edilen enzimin katalitik aktiviteleri üzerine asit etkisini incelemek amacıyla %1'lik (*v/v*) sitrik asit, asetik asit ($CH_3COOH$) ve hidroklorik asit (HCl) varlığında fitazın katalitik aktivitesi hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.38'de gösterildi.



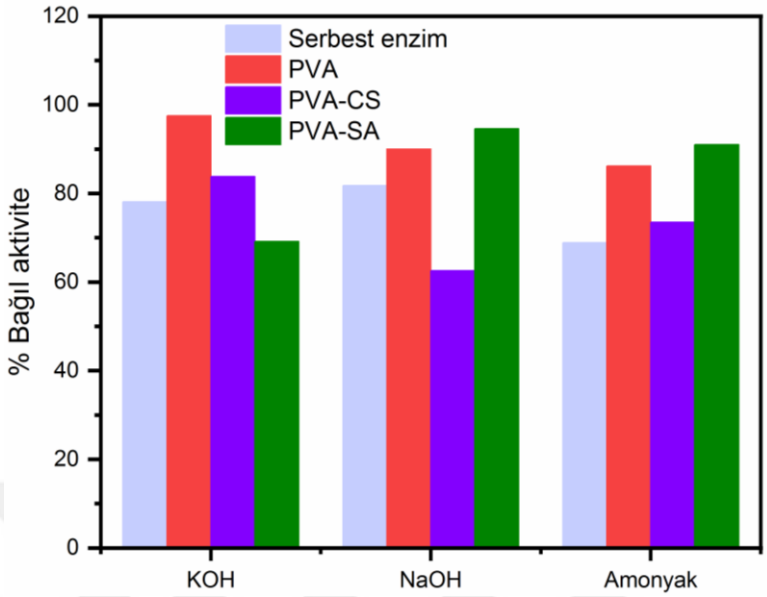

**Şekil 4.38** Serbest ve nanofiberlere immobilize enzimin aktivitesi üzerine asit etkisi

Elde edilen sonuçlara göre PVA, PVA-CS ve PVA-SA nanofiberlerine immobilize edilen fitazın % bağıl aktivitesi sitrik asit varlığında azalmıştır. HCl varlığında ise PVA ve PVA-SA nanofiberlerine immobilize edilen fitazın % bağıl aktivitesi artar iken sadece PVA-CS nanofiberine immobilize edilen fitazın % bağıl aktivitesi ise azaldığı belirlendi. Enzim belirleme çözeltisine %1'lik asetik asit eklendiğinde ise PVA ve PVA-SA nanofiberlerine immobilize edilen fitazın % bağıl aktivitesi artar iken PVA-CS nanofiberine immobilize edilen fitazın % bağıl aktivitesi ise azaldığı saptandı.

### 4.8.8 Serbest ve İmmobilize Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Baz Etkisi

Serbest ve PVA, PVA-CS ile PVA-SA nanofiberlerine immobilize edilen enzimin katalitik aktiviteleri üzerine baz etkisini incelemek amacıyla %1'lik (*v/v*) potasyum hidroksit (KOH), sodyum hidroksit (NaOH) ve amonyak ($NH_3$) varlığında fitazın katalitik aktivitesi hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.39'de gösterildi. Elde edilen sonuçlara göre PVA, PVA-CS ve PVA-SA nanofiberlerine immobilize edilen fitazın % bağıl aktivitesi amonyak varlığında artmıştır. NaOH varlığında ise PVA ve PVA-SA nanofiberlerine immobilize edilen fitazın % bağıl aktivitesi artar iken PVA-CS nanofiberine immobilize edilen fitazın % bağıl aktivitesinin azaldığı belirlendi. Enzim belirleme çözeltisine %1'lik potasyum hidroksit eklendiğinde ise PVA ve PVA-CS

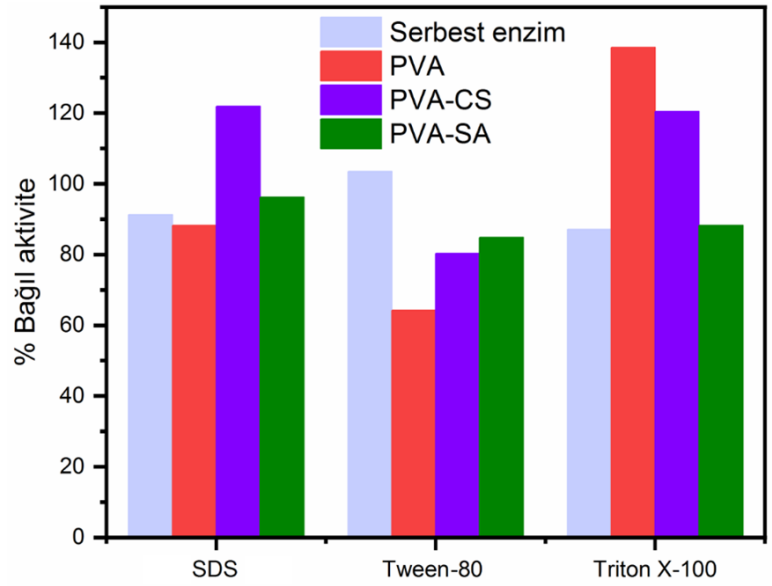
nanofiberlerine immobilize edilen fitazın % bağıl aktivitesi artar iken PVA-SA nanofiberine immobilize edilen fitazın % bağıl aktivitesi ise azaldığı saptandı.




**Şekil 4.39** Serbest ve nanofiberlere immobilize enzimin aktivitesi üzerine baz etkisi

### 4.8.9 Serbest ve İmmobilize Fitazın Katalitik Aktivitesi Üzerine Deterjan Etkisi

Serbest ve PVA, PVA-CS ile PVA-SA nanofiberlerine immobilize edilen enzimin katalitik aktiviteleri üzerine deterjan etkisini incelemek amacıyla %1'lik (*v/v*) sodyum dodesil sülfat (SDS), Tween-80 ve Triton X-100 varlığında fitaz aktivitesi hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.40'ta gösterildi.




**Şekil 4.40** Serbest ve nanofiberlere immobilize enzimin aktivitesi üzerine deterjan etkisi

Elde edilen sonuçlara göre PVA, PVA-CS ve PVA-SA nanofiberlerine immobilize edilen fitazın % bağıl aktivitesi Tween-80 varlığında azalırken Triton X-100 varlığında ise artmıştır. SDS varlığında ise PVA-CS ve PVA-SA nanofiberlerine immobilize edilen fitazın % bağıl aktivitesi artar iken PVA nanofiberine immobilize edilen fitazın % bağıl aktivitesinin azaldığı belirlendi.

### 4.8.10 Serbest ve İmmobilize Enzimlerin Depo Kararlılığı

Serbest ve immobilize enzimlerin depo kararlıkları - 20$^{o}$C'de 120 gün boyunca belirli zaman aralıklarında katalitik aktivitenin ölçülmesi ile belirlendi (Tablo 4.3). Elde edilen sonuçlara göre serbest enzim 120 gün sonunda katalitik aktivitesinin %57.13'ünü koruduğu belirlendi. Nanofiberlere immobilize edilen fitazın depo kararlılıkları ise PVA, PVA-CS ve PVA-SA nanofiberleri için sırasıyla %68,87, %65,07 ve %67,16 olarak hesaplandı. Bu sonuçlardan açıkça görüldüğü gibi fitazın nanofiberlere immobilize edilmesi sonrasında enzimin depo kararlılığı artmıştır.

**Tablo 4.3** Serbest ve nanofiberlere immobilize edilen fitazın depo kararlılığı

| **Depolanma süresi (gün)** | **% Bağıl aktivite** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Serbest enzim | İmmobilize enzim | | |
| | | PVA nanofiber | PVA-CS nanofiber | PVA-SA nanofiber |
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 10 | 99,98 | 99,49 | 98,99 | 99,20 |
| 20 | 98,55 | 98,41 | 97,33 | 98,18 |
| 30 | 97,10 | 96,05 | 91,49 | 95,97 |
| 45 | 86,69 | 94,78 | 86,62 | 89,32 |
| 60 | 86,41 | 92,25 | 81,62 | 79,77 |
| 75 | 82,84 | 90,61 | 72,86 | 76,70 |
| 90 | 72,27 | 76,66 | 70,77 | 70,23 |
| 120 | 57,13 | 68,87 | 65,07 | 67,16 |

# 5
# SONUÇ VE ÖNERİLER

Günlük diyetin en önemli bileşeni olan tahıllar birçok kişi tarafından tüketilmektedir. Son yıllarda kepekli ekmek başta olmak üzere tam buğday ürünleri tüketicilerin ve araştırmacıların önemli ölçüde ilgisini çekmektedir. Yüksek lif, vitamin ve biyoaktif bileşikler içeriği nedeniyle bu ürünlerin tüketimi sağlık açısından oldukça yararlıdır. Bahsedilen bileşiklerin her birinin sağlıkta özel bir rolü vardır ve bu bileşikler çoğu metabolik bozukluk, kolorektal kanser ve kardiyovasküler hastalık riskini azaltır. Tahılların fenolik bileşikleri oksijen türlerine karşı koruyucu etkilere sahiptir.

Bununla birlikte, minerallerin emilimini engellemesi ve beslenme üzerine olumsuz etkilerinden dolayı tam buğday ürünlerinin ve hayvan yemlerinin fitat içeriği endişe kaynağıdır. Fitat (myo-inozitol hegzafosfat) inozitole bağlı altı fosfat grubundan oluşur ve negatif yükü nedeniyle $Mg^{2+}$, $Ca^{2+}$, $Zn^{2+}$ ve $Fe^{3+}$ gibi çok değerlikli katyonları şelatlar oluşturur; böylece minerallerin biyoyararlanımı azalır. Bu dezavantajı ortadan kaldırmak için bu ürünlere fitaz takviyesi umut verici sonuçları ortaya çıkarmıştır.

Bu amaç doğrultusunda tez çalışması kapsamında hayvan yemi, kağıt endüstrisi, tarım, ilaç ve gıda sanayinde uygulama alanları bulunan fitazın kararlılığını arttırmak amacıyla nanofiberlere immobilizasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen optimizasyon şartları ve kinetik parametreler (Km ve Vmax) Tablo 5.1'de verildi.

**Tablo 5.1** Serbest ve immobilize enzim için optimum immobilizasyon şartları ve kinetik parametreler

| **Enzim** | | **Optimum şartlar** | | **Kinetik parametreler** | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | pH | Sıcaklık ($^oC$) | Km (mM) | Vmax (U/mg protein) |
| Serbest enzim | | 5,0 | 45 | 0,46 | 53,76 |
| **İmmobilize enzim** | PVA nanofiber | 5,0 | 65 | 1,17 | 5,67 |
| | PVA-CS nanofiber | 6,0 | 65 | 13,43 | 31,25 |
| | PVA-SA nanofiber | 6,0 | 55 | 4,66 | 18,38 |

Tablo 5.2 polivinil alkol, polivinil alkol-kitosan ve polivinil alkol-sodyum aljinat kullanılarak üretilen nanofibere fitaz immobilizasyonu sonucunda elde edilen sonuçların literatüre bildirilen çalışmalar ile kıyaslanmasını göstermektedir. Fitazın nanofiberlere immobilizasyonu ile ilgili literatüre bildirilen çok fazla çalışma olmadığı için elde edilen sonuçlar farklı destek malzemeleri ile kıyaslandı.

**Tablo 5.2** Elde edilen sonuçların literatür ile kıyaslanması

| Destek malzemesi | Enzim | Optimum pH | Optimum sıcaklık ($^{o}$C) | Km | Kaynak |
|---|---|---|---|---|---|
| Poliakril amid-nişasta nanofiber | Fitaz | 5,5 | 50 | 56 µM | 76 |
| Kitosan | Fitaz | 5,0 | 95 | 2,38 mM | 77 |
| Aljinat | Fitaz | 3,0 | 75 | 7,5 mM | 77 |
| PVA-CS nanofiber | Üreaz | 7,0 | 40 | 0,181 mM | 78 |
| Kitosan mikroküre | Fitaz | 4,0 | 40 | 0,62 mM | 79 |
| PVA nanofiber | Fitaz | 5,0 | 65 | 1,17 mM | Bu tez çalışması |
| PVA-CS nanofiber | Fitaz | 6,0 | 65 | 13,43 mM | Bu tez çalışması |
| PVA-SA nanofiber | Fitaz | 6,0 | 55 | 4,66 mM | Bu tez çalışması |

Tablo 5.2'den görüldüğü gibi PVA-CS ve PVA-SA nanofiberlerine immobilize edilen fitazın kıyaslanan destek materyalleri içinde en fazla optimum pH değerine sahip olan destek malzemeleridir. Ayrıca, optimum sıcaklık değerleri kıyaslandığında iki destek malzemesi (kitosan ve aljinat) dışında fitazın destek malzemesi olarak üretilen PVA ve PVA-CS nanofiberlerine immobilizasyonu sonucu en yüksek optimum sıcaklık değerleri elde edilmiştir. Km değerleri kıyaslandığında ise elde edilen sonuçlar diğer destek malzemeleri ile kullanılarak elde edilen sonuçlar ile uyumludur. Elde edilen bu sonuçlara göre, bu tez çalışması kapsamında üretilen nanofiberlere immobilize edilen fitazın hayvan yemi, kağıt endüstrisi, tarım, ilaç ve gıda sanayinde gibi uygulama alanlarında kullanılabilme potansiyeli vardır.

# KAYNAKÇA


[1] L. Wilson, A. Illanes, C. Ottone, O. Romero, "Co-immobilized carrier-free enzymes for lactose upgrading", Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry vol. 33, 100553, 2022.

[2] M. M. Lopes, T. C. Coutinho, J. O. D. Malafatti, E. C. Paris, C. P. de Sousa, C. S. Farinas, "Immobilization of phytase on zeolite modified with iron(II) for use in the animal feed and food industry sectors" Process Biochemistry vol. 100, pp. 260–271, 2021.

[3] U. Duru Kamacı, A. Peksel, "Enhanced Catalytic Activity of Immobilized Phytase into Polyvinyl Alcohol-Sodium Alginate Based Electrospun Nanofibers", Catalysis Letters vol. 151, pp. 821–831, 2021.

[4] B. Infanzon, K. R. Herrmann, I. Hofmann, S. Willbold, A. J. Ruff, U. Schwaneberg, "Phytase blends for enhanced phosphorous mobilization of deoiled seeds", Enzyme and Microbial Technology vol. 153, 109953, 2022.

[5] N. Sun, C. Liang, Q. Zhang, X. Geng, H. Liu, Y. Feng , H. Yang, Z. Yu, X. Jia, "Safety assessment of phytase transgenic maize 11TPY050 in Sprague-Dawley rats by 90-day feeding study", Regulatory Toxicology and Pharmacology vol. 128, 105091, 2022.

[6] L. P. S. Vandenberghe, S. G. Karp, M. G. B. Pagnoncelli, M. L. Tavares, N. L. Junior, K. V. Diestra, J. A. Viesser, C. R. Socco, "Classification of enzymes and catalytic properties", pp. 11, Elsevier, 2020.

[7] D. Li, Q. Wang, F. Huang, Q. Wei, "Electrospun nanofibers for enzyme immobilization", pp. 765, Elsevier, 2018.

[8] C. S. Nunes, "Intellectual property on selection, expression, and production of enzymes", pp. 38, Elsevier, 2018.

[9] H. Sharma, S. K. Upadhyay, "Enzymes and their production straregies", pp. 33, Elsevier, 2020.

[10] R. A. Wahab, N. Elias, F. Abdullah, S. K. Ghoshal, "On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview", Reactive and Functional Polymers vol.152, 104613, 2020.

[11] V. Kumar, A. K. Sinha, "General aspects of phytases", pp. 54-55, Elsevier, 2018.

[12] I. Balwani, K. Chakravarty, S. Gaur, "Role of phytase producing microorganisms towards agricultural sustainability", Biocatalysis and Agricultural Biotechnology vol. 12, pp. 23–29, 2017.

[13] B. Q. Phillippy, J. M. Bland, "Gradient ion chromatography of inozitol phosphates", Analytical Biochemistry vol. 175, pp. 162-166, 1988.

[14] T. S. Nelson, T. J. Shieh, R. J. Wodzinski, J. H. Ware, "Effect of supplemental phytase on the utilization of phytate phosphorus by chicks", Journal of Nutrition vol. 101, pp. 1289-1293, 1971.

[15] A. Vohra, T. Satyanarayana, "Phytase production by the yeast Pichia anomala", Biotechnology Letters vol. 238, pp. 551-554, 2001.

[16] T. H. Iqbal, K. O. Lewis, B. T. Cooper, "Phytase activity in the human and rat small intestine", Gut vol. 35 (9), pp. 1233-1236, 1994.

[17] W. Zhang, S. E. Aggrey, G. M. Pesti, R. I. Bakalli, H. M. Edwards, "Correlated responses to divergent selection for phytate phosphorus bioavailability in a randombred chicken population", Poultry Science vol. 84, pp. 536-542, 2005.

[18] T. Roy, S. Mondal, A. K. Ray, "Phytase-producing bacteria in the digestive tracts of some freshwater fish", Aquaculture Research vol. 40, pp. 344-353, 2009.

[19] IUB, "In Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry", Academic press, New York, pp. 247, 1979.

[20] E. J. Mullaney, A. H. J. Ullah, "The term phytase comprises several different classes of enzymes", Biochemical and Biophysical Research Communications vol. 312, pp. 179-184, 2003.

[21] C. M. Fam, Y. H. Wang, C. Y. Zheng, Y. F. Fu, "Fingerprint motifs of phytases", African Journal of Biotechnology vol. 12, pp. 1138-1147, 2013.

[22] T. C. Coutinho, P. W. Tardioli, C. S. Farinas, "Phytase immobilization on hydroxyapatite nanoparticles improves its properties for use in animal feed", Applied Biochemistry and Biotechnology vol. 190 (1), pp. 270-292, 2020.

[23] C. S. Quan, W. J. Tian, S. D. Fan, J. Kikuchi," Purification and Properties of a Low-Molecular-Weight Phytase from Cladosporium sp. FP-1", Journal of Bioscience and Bioengineering vol. 97, pp. 260-266, 2004.

[24] W. W. Riley, R. E. Austic, "Influence of Dietary Electrolytes on Digestive Tract pH and Acid-Base Status of Chicks", Poultry Science vol. 63, pp. 2247-251, 1984.

[25] M. Lehmann, L. Pasamontes, S. F. Lassen, M. Wyss, "The consensus concept for thermostability engineering of proteins", Biochimica et Biophysica Acta vol. 1543, pp. 408-15, 2000.

[26] R. J. Anderson, "A contribution to the chemistry of phytin.", Journal of Bioligical Chemistry vol. 17, pp. 171-190, 1914.

[27] R. Kavitha, "Phytate and phytase in broilers-a review" International Journal of Science and Technology vol. 5, pp. 2652 – 2657, 2016.

[28] B. F. Harland, D. Oberleas, Phytase in Animal Nutrition and Waste Management, ed. M. B. Coelho and E. T. Kornegay, BASF, Mexico, rev. 2, p. 69, 1999.

[29] K. Bhavsar, J. M. Khire, "Current research and future perspectives of phytase bioprocessing", RSC Advances vol. 4, pp. 26677-26691, 2014.

[30] R. K. Gupta, S. S. Gangoliya, N. K. Singh, "Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains", Journal of Food Science and Technology vol. 52 (2), pp. 676–684, 2015.

[31] L. Oatway, T. Vasanthan, J.H. Helm, "Phytic acid", Food Reviews International vol. 17, pp. 419-431, 2001.

[32] R. C. Rodrigues, C. Ortiz, A. B. Murcia, R. Torres, R. F. Lafuente, "Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization", Chemical Society Reviews vol. 42, pp. 6290-6307, 2013.

[33] S. Cesarini, P.Diaz, P. M. Nielsen, “Exploring a new, soluble lipase for FAMEs production in water-containing systems using crude soybean oil as a feedstock”, Process Biochemistry vol.48 (3), pp.484-487, 2013.

[34] C. G. Malar, M. Seenuvasan, K. S. Kumar, A. Kumar, R. Parthiban, “Review on surface modification of nanocarriers to overcome diffusion limitations: An enzyme immobilization aspect”, Biochemical Engineering Journal vol.158, 107574, 2020.

[35] Z. Ashkan, R. Hemmati, A. Homaei, J. Dinari, M. Jamlidoost, A. Tashakor, “Immobilization of enzymes on nanoinorganic support materials: An update”, International Journal of Biological Macromolecules vol. 168, pp. 708–721, 2021.

[36] M. Bilal, M. Asgher, R. Parra-Saldivar, H. Hu, W. Wang, X. Zhang, H. M. N. Iqbal, “Immobilized ligninolytic enzymes: An innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants – A review”, Science of the Total Environment vol. 576, pp. 646–659, 2017.

[37] L. Cao, “Immobilized enzymes: past, present and prospects. In: Carrier-bound immobilized enzymes: Principles, application and design”, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006.

[38] J. Zdarta, A. S. Meyer, T. Jesionowski, M. Pinelo, “A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility”, Catalysts vol. 8, pp. 1-27, 2018.

[39] S. Datta, L. R. Christena, Y. R. S. Rajaram, “Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials”, 3 Biotech vol. 3, pp. 1–9, 2013.

[40] C. S. Bezerra, C. M. G. F. Lemos, M. Sousa, L. R. B. Goncalves, “Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends”, Journal of Applied Polymer Science vol. 135, 42125, 2015.

[41] U. Duru Kamaci, A. Peksel, “Fabrication of PVA-chitosan-based nanofibers for phytase immobilization to enhance enzymatic activity”, International Journal of Biological Macromolecules vol. 164, pp. 3315-3322, 2020.

[42] I. Zulkiflee, M. B. Fauzi, “Gelatin-polyvinyl alcohol film for tissue engineering: A concise review”, Biomedicines vol. 9, 979, 2021.

[43] C. Chao, H. Guan, J. Zhang, Y. Liu, Y. Zhao, B. Zhang, “Immobilization of laccase onto porous polyvinyl alcohol/ halloysite hybrid beads for dye removal”, Water Science and Technology vol. 77, pp. 809-818, 2018.

[44] M. D. A. Porto, J. P. dos Santos, H. Hackbart, G. P. Bruni, L. M. Fonseca, E. R. Zavareze, A. R. G. Dias, “Immobilization of α-amylase in ultrafine polyvinyl alcohol (PVA) fibers via electrospinning and their stability on different substrates”, International Journal of Biological Macromolecules, 126:9834-841, 2019.

[45] K. Ghosal, C. Agatemor, Z. Spitalsky, S. Thomas, E. Kny, “Electrospinning tissue engineering and wound dressing scaffolds from polymer-titanium dioxide nanocomposites”, Chemical Engineering Journal vol. 358, pp. 1262–1278, 2019.

[46] R. M. D. Soares, N. M. Siqueira, M. P. Prabhakaram, S. Ramakrishna, “Electrospinning and electrospray of biobased and natural polymers for biomaterials development”, Materials Science and Engineering C vol. 92, pp. 969–982, 2018.

[47] K. Halicka, J. Cabaj, “Electrospun nanofibers for sensing and biosensing applications—a review”, International Journal of Molecular Science vol. 22, 6357, 2021.

[48] T. W. Kim, X. G. Lei, “An improved method for a rapid determination of phytase activity in animal feed”, Journal of Animal Science vol. 83, pp. 1062-1067, 2005.

[49] M. M. Bradford, “A rapid and sensetive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, Analytical Biochemistry vol. 72, pp. 248-254, 1976.

[50] B. F. Harland, J. Harland, “Fermentative reduction of phytate in rye, white, and whole wheat breads”, Cereal Chemistry vol. 57, pp. 226–229, 1980.

[51] U. Duru Kamaci, A. Peksel, “Poly(vinyl alcohol)-based electrospun nanofibers: characterization and phytase immobilization”, Biointerface Research in Applied Chemistry vol. 12 (6), pp. 7573–7583, 2022.

[52] N. R. Reddy, M. D. Pierson, S. K. Sathe, D. K., Salunkhe, “Phytetes in cereals and legumes”, CRC Press, Florida, 1989.

[53] S. Teepoo, P. Dawan, N. Barnthip, “Electrospun chitosan-gelatin biopolymer composite nanofibers for horseradish peroxidase immobilization in a hydrogen peroxide biosensor”, Biosensors vol. 7, pp. 1-11, 2017.

[54] U. A. Rathnayake, T. Senapathi, C. Sandaruwan, S. Gunawardene, V. Karunaratne, N. Kottegoda, “Rice bran nanofiber composites for stabilization of phytase”, Chemistry Central Journal vol. 12, pp. 1–7, 2018.

[55] C. Isik, G. Arabaci, Y. I. Dogac, I. Deveci, M. Teke, “Synthesis and characterization of electrospun PVA/$Zn^{2+}$ metal composite nanofibers for lipase immobilization with effective thermal, pH stabilities and reusability”, Materials Science and Engineering C vol. 99, pp. 1226-1235, 2019.

[56] S. K. Soni, S. Sarkar, P. R. Selvakannan, D. Sarkar, S. K. Bhargava, “Intrinsic therapeutic and biocatalytic roles of ionic liquid mediated self-assembled platinum–phytase nanospheres”, RSC Advances vol. 5, pp. 62871-62881, 2015.

[57] A. Manjunath, M. Irfan, K. P. Anushree, K. M. Vinutha, N. Yamunarani, “Synthesis and characterization of CuO nanoparticles and CuO doped PVA nanocomposites”, Advances in Materials Physics and Chemical vol. 6, pp. 263-273, 2016.

[58] M. Sarathi, N. Doraiswamy, G. Pennathur, “Enhanced stability of immobilized keratinolytic protease on electrospun nanofibers”, Prepative Biochemistry and Biotechnology vol. 49, pp. 695–70, 2019.

[59] M. S. Islam, M. R. Karim, “Fabrication and characterization of poly(vinyl alcohol)/alginate blend nanofibers by electrospinning method”, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects vol. 366, pp. 135–140, 2010.

[60] Q. He, C. E. R. Reis, F. Wang, B. Hu, “Phytate extraction from coproducts of the dry-grind corn ethanol process”, RSC Advances vol. 7, pp. 5466–5472, 2017.

[61] Y. Kusumastuti, N. R. E. Putri, A. R. Dary, “Electrospinning optimization andcharacterization of chitosan/alginate/polyvinyl alcohol nanofibers”, AIP Conference Proceding vol. 1755, 150007, 2016.

[62] D. Nelson, M. Cox, "Lehninger principles of biochemistry", WH Freeman and Company, New York, 2008.

[63] C. S. Nunes, V.Kumar, "Enzymes in human and animal nutrition principles and perspectives", Academic Press, 2018.

[64] Y. Dersjant-Li, A. Awati, H. Schulze, G. Partridge, "Phytase in non-ruminant animal nutrition: A critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors", Journal of the Science of Food and Agriculture vol. 95, pp. 878-896, 2015.

[65] M. Ghollasi, "Electrospun polyethersulfone nanofibers: A novel matrix for alpha-amylase immobilization", Journal of Applied Biotechnology Reports vol. 5, pp. 19-25, 2018.

[66] P. V. Mohanan, V. U. Bindu, "Enhanced stability of α-amylase via immobilization onto chitosan-$TiO_2$ nanocomposite", Nanoscience and Technology vol. 4, pp. 1-9, 2017.

[67] B. M. Bonine, P. P. Polizelli, G. O. B. Rodriguez, "Immobilization of a plant lipase from pachira aquatica in alginate and alginate/PVA Beads", Enzyme Research vol. 738739, pp. 1-7, 2014.

[68] M. Miotto, P. P. Olimpieri, L. D. Rienzo , F. Ambrosetti, P. Corsi, R. Lepore, G. G. Tartaglia, E. Milanetti, "Insights on protein thermal stability: a graph representation of molecular interactions", Bioinformatics vol. 35 (15), pp. 2569-2577, 2019.

[69] M. P. Naghshbandia, H. Moghimia, B. Latif B, "Covalent immobilization of phytase on the multiwalled carbon nanotubes via diimide-activated amidation: structural and stability study", Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology vol. 46, pp. 763-772, 2018.

[70] H. B. Yildiz, M. Kamaci, H. Azak, O. Secgin, O. Suer, "A comparative study: Immobilization of yeast cells and invertase in poly(ethyleneoxide) electrodes", Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic vol. 91, pp. 52-58, 2013.

[71] H. U. Rehman, A. Aman, R. R. Zohra, S. Al. U. Qader, "Immobilization of pectin degrading enzyme from Bacillus licheniformis KIBGE IB-21 using agar-agar as a support", Carbohydrate Polymers vol. 102, pp. 622-626, 2014.

[72] A. C. Sass, H. J. Jordening, "Immobilization of β-galactosidase from *aspergillus oryzae* on electrospun gelatin nanofiber mats for the production of galactooligosaccharides", Applied Biochemistry and Biotechnology vol. 191, pp.1155–1170, 2020.

[73] A. D. Suleimanova, A. Beinhauer, L. R. Valeeva, I. B. Chastukhina, N. P. Balaban, E. V. Shakirov, R. Greiner, M. R. Sharipova, "Novel Glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium Pantoea sp. strain 3.5.1", Applied and Environmental Microbiology vol. 81, pp. 6790-6799, 2015.

[74] L. Bohn, A. S. Meyer, S. K. Rasmussen, "Phytate: impact on environment and human nutrition, A challenge for molecular breeding", Journal of Zhejiang University Science B vol. 9, pp. 165-191, 2008.

[75] B. K. Bajaj, K. Manhas, "Production and characterization of xylanase from Bacillus licheniformis P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry", Biocatalysis and Agricultural Biotechnology vol. 1, pp. 330-337, 2012.

[76] J. Harati, S. O. R. Siadat, H. Taghavian, S. Kaboli, S. Khorshidi, "Improvement in biochemical characteristics of glycosylated phytase through immobilization on nanofibers", Biocatalysis and Agricultural Biotechnology vol. 12, pp. 96-103, 2017.

[77] Y. Sirin, M. Y. Akatin, A. Colak, N. S. Ertunga, "Dephytinization of food stuffs by phytase of Geobacillus sp. TF16 immobilized in chitosan and calcium-alginate", International Journal of Food Properties vol. 20 (12), pp. 2911-2922, 2017.

[78] N. Kutlu, Y. İ. Doğaç, İ. Deveci, M. Teke, "Urease immobilized electrospun PVA/chitosan nanofibers with improved stability and reusability characteristics: an application for removal of urea from artificial blood serum", Preparative Biochemistry and Biotechnology, vol. 50, pp. 425-427, 2020.

[79] K. Belho, P. K. Ambasht, "Immobilization of phytase from rice bean (*Vigna Umbellata Thunb*.) on glutaraldehyde activated chitosan microspheres", Journal of Scientific Research vol. 65 (1), pp. 111-119, 2021.

# TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

**Konferans Bildirileri**

**1**. Duru Kamaci U., Peksel A., Elektrospinning yöntemi ile fitaz immobilizasyonu, 31. Ulusal Kimya Kongresi, Sözlü sunum (S-356), Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, (10 - 13 Eylül 2019)

**Makaleler**

**1.** Duru Kamaci U., Peksel A., Poly(vinyl alcohol)-based electrospun nanofibers: characterization and phytase immobilization, Biointerface Res. Appl. Chem., (2022), Vol. 12, No. 6, pp. 7573–7583.

**2**. Duru Kamaci U., Peksel A., Enhanced catalytic activity of immobilized phytase into polyvinyl alcohol-sodium alginate based electrospun nanofibers, Catal. Lett., (2021), Vol. 151, pp. 821–831.

**3.** Duru Kamaci U., Peksel A., Fabrication of PVA-chitosan-based nanofibers for phytase immobilization to enhance enzymatic activity, Int. J. Biol. Macromol., (2020), Vol. 164, pp. 3315–3322.

**Projeler**

**1**. Fitazın İzolasyonu, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, 2015-01-02-DOP06 (839), Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı, 01.07.2015-01.07.2018.