



T.C.

BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

BİYOTEKNOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

**MODİFİYE DEMİR OKSİT MANYETİK NANOTAŞIYICILARA PEKTİNAZ
ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU, KARAKTERİZASYONU VE MEYVE SUYU
BERRAKLAŞTIRILMASINDA KULLANIMI**

DOKTORA TEZİ

OLGUN ÇIRAK

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. ŞÜKRÜ BEYDEMİR

BİLECİK, 2026

10814370

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
BİYOTEKNOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

**MODİFİYE DEMİR OKSİT MANYETİK NANOTAŞIYICILARA PEKTİNAZ
ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU, KARAKTERİZASYONU VE MEYVE SUYU
BERRAKLAŞTIRILMASINDA KULLANIMI**

DOKTORA TEZİ

OLGUN ÇIRAK

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ŞÜKRÜ BEYDEMİR

BİLECİK, 2026

10814370

BEYAN

“Modifiye Demir Oksit Manyetik Nanotaşıyıcılara Pektinaz Enziminin İmmobilizasyonu, Karakterizasyonu Ve Meyve Suyu Berraklaştırılmasında Kullanımı” başlıklı doktora tezinin hazırlık ve yazım aşamasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, [Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Faaliyetlerinde Üretken Yapay Zekâ Kullanımına Dair Etik Rehberine](#) uygun olarak tez/dönem projemi hazırladığımı, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel etik kurallarına uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, çalışmamın herhangi bir kısmının başka bir tez/dönem projesi olarak sunulmadığımı, aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Olgun Çırak

.../.../2026

İmza:

ÖN SÖZ

Doktora eğitimi ve tez hazırlama süreci, yalnızca bilimsel bir çalışma değil; aynı zamanda sabır, emek, özveri ve kararlılık gerektiren uzun bir yolculuktur. Bu yolculuk boyunca bilgi birikimi, yönlendirmeleri ve kıymetli destekleri ile bana rehberlik ederek akademik bakış açımın gelişmesine büyük katkı sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e en derin şükranlarımı sunarım.

Tezime değerli görüşleri, önerileri ve akademik destekleri ile katkı sağlayan Prof. Dr. Alev AKPINAR BORAZAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca her ihtiyaç duyduğumda ulaşılabilir olması, büyük bir sabırla yardımlarını esirgememesi ve bilimsel yaklaşımlarıyla çalışmamaya önemli katkılar sunan Prof. Dr. Mesut IŞIK'a gönülden teşekkür ederim.

Doktora süreci boyunca yoğun çalışma temposu nedeniyle zaman zaman yeterince vakit ayıramadığım sevgili çocuklarım Yusuf ve Tuba'ya özellikle teşekkür etmek isterim. Gösterdikleri anlayış, sevgi ve sabır, bu sürecin en kıymetli dayanaklarından biri olmuştur. Sizlerin varlığı bana her koşulda güç ve motivasyon vermiştir. Bu tez, sadece benim değil, sizlerin de fedakarlığının bir sonucudur.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu süreçte de maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, varlıklarıyla bana güç veren ve dualarıyla her zaman yanımda hissettiğim kıymetli anneme, babama ve tüm aileme derin şükranlarımı sunarım. Onların sevgisi, inancı ve desteği olmasaydı bu çalışmayı tamamlamak çok daha zor olurdu.

Araştırma ve deneysel çalışmalarım sırasında bilgi, emek ve katkılarıyla bana yardımcı olan Doç. Dr. Rafiğ GURBANOV, Öğr. Gör. Dr. Fatih TOZOĞLU ve Dr. Muhammet FIRAT'a içten teşekkür ederim. Çalışmalarım esnasında karşılaştığım teknik zorlukları aşmamda bana destek olan, bilgi birikimleri ve tecrübelerini benimle paylaşarak araştırma sürecimi büyük ölçüde kolaylaştıran Öğr. Gör. Bilge ÇİFTÇİ ve Semanur BAŞARAN'a özverili yardımlarından ötürü içtenlikle teşekkür ederim.

Bu tezin, bilimsel literatüre yararlı olmasını ve ileride yapılacak çalışmalara katkı sunmasını temenni ederim.

Olgun ÇIRAK

2026

ÖZET

Meyvelerde bulunan pektik maddeler meyve sularının bulanık ve yoğun olmasından sorumludur. Tüketiciler, düşük viskoziteli, berrak ve yüksek besin içeriğine sahip meyve sularını tercih eder. Bu nedenle, pektin bileşiklerinin işlenmesi pazarlama açısından mutlak bir gerekliliktir. Pektinaz enzimi kullanımı, pektin bileşiklerini parçalayarak berrak meyve suyu eldesinde önemli bir rol oynar. Ancak, serbest pektinazın nihai üründen ayrılması zordur. Bu sorunu çözmek için, son ürünün termal inaktivasyonu gerçekleştirilir. Termal inaktivasyon adımının enerji tüketimi yüksektir ve temel doğal bileşiklerin yapısını bozarak ürün kalitesini düşürür. Ayrıca, pahalı pektinaz enziminin geri kazanımı ve tekrar kullanılabilirliğindeki zorluklar, süreci ekonomik olmaktan çıkarır. Bunun yanında enzimlerin çevresel koşullardan (pH ve sıcaklık vb.) etkilendiği unutulmamalıdır. Bütün bunlar stabilitesinin ve yeniden kullanılabilir potansiyelinin artırılmasıyla enzimlerin biyoteknolojik kullanımı açısından önem arz etmektedir. Enzimi bir destek malzemesi üzerinde immobilize etmek bu sorunları aşmaya yardımcı olur. Bu çalışma, pektinaz enzimini modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere (MNP) immobilize ederek stabilitesinin artırılması ve yeniden kullanılabilirliğini sağlayarak daha uygun maliyetli çözüm üretmeyi amaçlamaktadır. Bunun için tetra etil orto silikat (TEOS) ve 3-amino propil tri-etoksi silan (APTES) ile fonksiyonelleştirildikten sonra glutaraldehit ile aktive edilen manyetik nanopartiküller (Fe_3O_4) üzerine pektinaz enzimi kovalent olarak immobilize edildi. Enzim immobilizasyonunu doğrulamak için immobilizasyondan önce ve sonra taramalı elektron mikroskobu (SEM-EDX) ve Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi teknikleri ile karakterizasyonu gerçekleştirildi. Hem serbest hem de immobilize enzim için optimum pH (pH 5.0) ve sıcaklık (50 °C) aynı bulundu. Serbest ve immobilize pektinaz için V_{max} sırasıyla 0.28 ve 0.19 U/ml, K_m değeri ise sırasıyla 3.32 ve 3.94 mg/mL olarak belirlendi. Termal stabilite, pH stabilite ve depolama stabilitesi bakımında immobilize enzim, serbest enzime göre daha iyi bir katalitik performans sergiledi. İmmobilize pektinazın 20 kez yeniden kullanımı sonucunda kalan aktivite %81'in üzerinde tespit edildi. Son olarak, gerçek gıda uygulamasında immobilize pektinazın üzüm suyunu berraklaştırma potansiyeli değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: Pektinaz, Manyetik Nanopartiküller, İmmobilizasyon, Stabilite, Berraklaştırma.

ABSTRACT

The pectic compounds found in fruits are responsible for the cloudy and thick consistency of fruit juices. Consumers prefer fruit juices that are low in viscosity, clear, and high in nutritional content. For this reason, the processing of pectin compounds is an absolute necessity from a marketing perspective. The use of pectinase enzymes plays a significant role in producing clear fruit juice by breaking down pectin compounds. However, separating free pectinase from the final product is difficult. To solve this problem, thermal inactivation of the final product is performed. The thermal inactivation step has high energy consumption and reduces product quality by destroying essential natural compounds. Additionally, the failure to recover and reuse the expensive pectinase enzyme makes the process economically unfeasible. Furthermore, it should not be forgotten that enzymes are affected by environmental conditions (pH and temperature, etc.). All of these factors highlight the need to enhance the enzymatic processing step. Immobilizing the enzyme on a support material helps overcome these issues. This study aims to produce a more cost-effective solution by immobilizing the pectinase enzyme on magnetic nanoparticles (MNP) to enhance its stability and ensure its reusability. To this end, the pectinase enzyme was covalently immobilized onto magnetic nanoparticles (Fe_3O_4) that were functionalized with tetraethyl orthosilicate (TEOS) and 3-aminopropyl triethoxysilane (APTES) and subsequently activated with glutaraldehyde. To verify the success of immobilization, characterization was performed using scanning electron microscopy (SEM-EDX) and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy techniques before and after immobilization. The optimal pH (pH 5.0) and temperature (50 °C) were found to be the same for both the free and immobilized enzymes. The V_{max} values for the free and immobilized pectinase were determined to be 0.28 and 0.19 U/mL, respectively, while the K_m values were 3.32 and 3.94 mg/mL, respectively. In terms of thermal stability, pH stability, and storage stability, the immobilized enzyme exhibited better catalytic performance compared to the free enzyme. Following 20 reuses of the immobilized pectinase, the remaining activity was found to be over 81%. Finally, the potential of the immobilized pectinase to clarify fruit juice was evaluated in a real-food application.

Keywords: Pectinase, Magnetic Nanoparticles, Immobilization, Stability, Clarification.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖN SÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Enzimler	5
2.1.1. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması.....	7
2.1.2. Enzimlerin kimyasal yapısı.....	16
2.1.3. Enzimatik kataliz.....	17
2.1.4. Enzim kinetiği	18
2.1.5. Enzim immobilizasyonu.....	22
2.2. Literatür Özeti.....	41
3. MATERYAL VE YÖNTEM	49
3.1. Materyal	49
3.1.1. Kullanılan kimyasallar.....	49
3.1.2. Kullanılan cihazlar	49
3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	50
3.2. Yöntem	51
3.2.1. Manyetik nanopartiküllerin (MNP) sentezi	51
3.2.2. MNP'lerin fonksiyonelleştirilmesi	52

3.2.3. Pektinaz immobilizasyonu	53
3.2.4. Pektinaz aktivite analizi	53
3.2.5. Karakterizasyon	54
3.2.6. Optimum sıcaklık analizi	54
3.2.7. Optimum pH analizi.....	54
3.2.8. Termal stabilite analizi	54
3.2.9. pH stabilite analizi	55
3.2.10. Kinetik parametreler	55
3.2.11. İmmobilize enzimin yeniden kullanılabilirlik analizi	55
3.2.12. Depolama stabilite analizi	55
3.2.13. Üzüm suyu bulanıklık giderme analizi	55
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	57
4.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	57
4.2. Fourier Dönüştürümlü Kızılötesi Spektrometresi (FT-IR).....	60
4.3. İmmobilizasyon Verimi.....	62
4.4. Optimum Sıcaklık Analizi	64
4.5. Optimum pH Analizi.....	66
4.6. Termal Stabilite Analizi	68
4.7. pH Stabilite Analizi	70
4.8. Kinetik Parametreler	72
4.9. İmmobilize Pektinazın Yeniden Kullanılabilirlik Analizi.....	74
4.10. Depolama Stabilite Analizi	74
4.11. Üzüm Suyunun Berraklaştırılması	77
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	79
KAYNAKÇA.....	80

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Bazı taze meyvelerdeki pektin içeriği (%) (Ramadan, 2019).....	14
Tablo 2.2. Enzim immobilizasyonunun avantaj ve dezavantajları	23
Tablo 2.3. Pektinaz enziminin çeşitli destekler üzerine immobilizasyonunun operasyonel stabilite üzerine etkisi ve meyve suyunda uygulanması.....	47
Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları	49
Tablo 4.1. Pektinaz immobilize MNP@SiO ₂ -NH ₂ -GA'lerin atomik yüzde dağılımları.....	59
Tablo 4.2. BSA standart kalibrasyon eğrisi	62
Tablo 4.3. D-Galakturonik asit konsantrasyona karşı absorban değerleri.....	63
Tablo 4.4. Serbest ve immobilize enzimin kinetik parametreleri (K _m ve V _{max})	72

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Enzim ve enzim olmadan gerçekleşen reaksiyonun enerji diyagramı	6
Şekil 2.2. Pektinaz enzimlerinin etkilerine göre sınıflandırılmaları	9
Şekil 2.3. Pektinazlar tarafından pektin maddelerinin enzimatik katalizinin hiyerarşik gösterimi (Patel vd., 2022)	9
Şekil 2.4. Enzimlerin kimyasal yapısı.....	17
Şekil 2.5. Enzimatik kataliz gösterimi	17
Şekil 2.6. Anahtar - kilit modeli	18
Şekil 2.7. İndüklenmiş uyum modeli	18
Şekil 2.8. Zamana bağlı olarak substrat ve ürün konsantrasyonunun değişimi	20
Şekil 2.9. Substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi	21
Şekil 2.10. Lineweaver-Burk grafiği.....	22
Şekil 2.11. Enzim immobilizasyon metotları	25
Şekil 2.12. Adsorpsiyon metodu	27
Şekil 2.13. Hapsetme metodu	28
Şekil 2.14. Enkapsülasyon metodu	29
Şekil 2.15. Kovalent bağlama metodu	30
Şekil 2.16. Çapraz bağlama metodu.....	31
Şekil 2.17. Enzim immobilizasyonu için kullanılan destek malzemelerinin ana özellikleri ...	34
Şekil 3.1. Çalışmanın içeriği hakkında genel bilgiler	51
Şekil 3.2. Manyetik nanopartikül sentezi ve immobilizasyon süreci.....	52
Şekil 3.3. Üzüm suyu berraklaştırma işlemine ait akış diyagramı.....	56
Şekil 4.1. Pektinaz immobilize edilmeden önce MNP@SiO ₂ -NH ₂ -GA taramalı elektron mikroskobu görüntüsü.....	57

Şekil 4.2. Pektinaz immobilize edildikten sonra MNP@SiO ₂ -NH ₂ -GA taramalı elektron mikroskobu görüntüsü.....	58
Şekil 4.3. Pektinaz immobilize MNP@SiO ₂ -NH ₂ -GA'lerin enerji dağılımlı X-ışını (EDX) spektrumu	59
Şekil 4.4. İmmobilizasyon öncesi MNP@SiO ₂ -NH ₂ -GA'ların FTIR spektrumu	60
Şekil 4.5. İmmobilizasyon sonrası MNP@SiO ₂ -NH ₂ -GA'ların FTIR spektrumları.....	61
Şekil 4.6. Sığır serum albümin standart kalibrasyon eğrisi.....	62
Şekil 4.7. D- Galakturonik asit kalibrasyon eğrisi	63
Şekil 4.8. Hem serbest pektinaz hem de immobilize edilmiş pektinaz için optimum sıcaklık grafiği	65
Şekil 4.9. Hem serbest pektinaz hem de immobilize edilmiş pektinaz için optimum pH grafiği	67
Şekil 4.10. Serbest ve immobilize pektinazın termal stabilitesi	69
Şekil 4.11. Serbest ve immobilize pektinazın pH kararlılığı.....	71
Şekil 4.12. Yeniden kullanılabilirlik çalışması.....	77
Şekil 4.13. Serbest ve immobilize pektinazın depolama stabilitesi.	75
Şekil 4.14. (a) Üzüm suyunun zamana bağlı bulanıklık gösterimi, Enzim ile işlenmemiş üzüm suyu (solda) ve (b) immobilize enzimle işlenmiş üzüm suyu (sağda).	78

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

APTES	: 3-amino propil tri-etoksi silan
Arg	: Arjinin
Asp	: Aspartat
AuNP	: Altın nanopartikül
BSA	: Sığır serum albumin
CLE	: Çapraz bağlı enzim
CLEA	: Çapraz bağlı enzim agregatı
CLEC	: Çapraz bağlı enzim kristali
Cys	: Sistein
DA	: Asetilasyon derecesi
DM	: Metilasyon derecesi
DNS	: Dinitrosalisilik asit
EDX	: Enerji Dağılımlı X-ışını
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi
GalA	: α -D galakturonik asit
Glu	: Glutamat
HCl	: Hidroklorik asit
HG	: Homogalakturonan,
His	: Histidin
HRP	: Horseradish peroksidaz
IUBMB	: Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
Lys	: Lisin
MNP	: Manyetik nanopartikül
MOF	: Metal organik çerçeve
NaOH	: Sodyum hidroksit

PAE	: Pektin asetilesteraz
PE	: Pektin esteraz
PG	: Poli galakturonaz
PGA	: Poligalakturonik asit
PGL	: Poli galakturonat liyaz
PL	: Pektat liyaz
PME	: Pektin metilesteraz
PMG	: Poli metil galakturonaz
PMG	: Polimetilgalakturonazlar
PMGL	: Poli metil galakturonat liyaz
PNL	: Pektin liyaz
PP	: Protopektinaz
PtNP	: Platin nanopartikül
RG I	: Ramnogalakturonan I
RG II	: Ramnogalakturonan II
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
Ser	: Serin
SNP	: Silika nanopartiküller
TEOS	: Tetra-etil ortosilikat
Thr	: Treonin
TSS	: Toplam çözünmüş katı madde

1. GİRİŞ

Günümüzde sürdürülebilir üretim teknolojilerinin geliştirilmesine yönelik artan talep biyokataliz proseslerini çevre dostu ve ekonomik alternatifler arasında ön plana çıkarmaktadır. Bu bağlamda enzimlerin biyokatalizör olarak kullanımı; yüksek katalitik aktivite, üstün substrat özgüllüğü, yüksek seçicilik ve düşük toksisite gibi avantajlarının yanı sıra hafif reaksiyon koşullarında çalışabilmeleri ve minimum yan ürün oluşumu sağlamaları nedeniyle büyük önem taşımaktadır (Bommarius & Paye, 2013; A. Kumar & Venkatesu, 2012). Bu özellikler, enzimleri geleneksel kimyasal katalizörlere kıyasla sürdürülebilir üretim süreçlerinin temel bileşenlerinden biri haline getirmiştir (Sánchez-Morán, 2023).

Enzimlerin katalitik etkinliği büyük ölçüde özgül üç boyutlu konformasyonlarına bağlıdır ve bu yapının bozulması durumunda katalitik aktiviteleri önemli ölçüde azalabilmektedir. Özellikle yüksek sıcaklık, ekstrem pH koşulları ve organik çözücü varlığı gibi olumsuz çevresel faktörler enzim stabilitesini sınırlayan temel parametreler arasında yer almaktadır (Al-Maqdi vd., 2021; Burek vd., 2022; Fasim vd., 2021; Shivaprasad & Carolina Emanuelsson, 2018). Bu durum uzun süreli ve sürekli çalışan biyoproses sistemlerinde önemli bir uygulama kısıtı oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra enzim üretimi, saflaştırılması ve stabilizasyonuna ilişkin maliyetler biyokatalitik proseslerin endüstriyel ölçekte uygulanabilirliğini etkileyen önemli faktörler arasında yer almaktadır. Ayrıca kütle transferi sınırlamaları, reaktör tasarımına bağlı performans kısıtları ve reaksiyon ortamından enzimin ayrılması gerekliliği gibi mühendislik temelli problemler de biyokatalitik sistemlerin ölçeklendirilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle enzimlerin operasyonel stabilitesinin artırılması ve tekrar kullanılabilirliğinin sağlanması biyokatalitik süreçlerin ekonomik sürdürülebilirliği açısından kritik öneme sahiptir (Dwevedi, 2016; Maghraby vd., 2023; Sneha vd., 2019).

Biyokatalitik sistemlerin geliştirilmesinde enzim immobilizasyonu hem katalitik verimliliğin artırılması hem de proses sürdürülebilirliğinin sağlanması açısından etkili bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır. Enzim immobilizasyonu, enzimin uygun bir destek materyaline bağlanarak yapısal stabilitesinin artırılmasını ve katalitik performansının korunmasını mümkün kılmaktadır. İmmobilizasyon sayesinde enzimlerin geri kazanılabilirliği arttırılmakta, operasyonel stabilitesi iyileştirilmekte ve tekrar kullanılabilirliği mümkün hale gelmektedir (Bilal vd., 2019; Bolivar vd., 2022; De Santis vd., 2020; Menegatti & Žnidaršič-Plazl, 2021; Paradisi & Poppe, 2021). Bu doğrultuda geliştirilen immobilizasyon stratejileri ve

destek materyalleri, biyokatalitik proseslerin endüstriyel ölçekte uygulanabilirliğini artıran temel parametreler arasında yer almakta ve ileri katalitik teknolojilerin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır (Fehér vd., 2021). Ancak, immobilizasyon sürecinde kullanılacak biyouyumlu, ekonomik ve yüksek performanslı destek materyallerinin geliştirilmesi halen önemli bir araştırma alanı olarak güncelliğini korumaktadır.

Son yıllarda nanoteknoloji alanındaki gelişmeler, enzim bazlı biyotransformasyon süreçlerinde nano boyutlu destek materyallerinin kullanımına önemli ölçüde artırmıştır. Karbon nanotüpler, grafen ve grafen oksit yapıları, elektroğrılmış nanofiberler, metal organik kafes yapılar, manyetik nanopartiküller, silika nanopartiküller ve çeşitli nanohibrit sistemler enzim immobilizasyonunda katalitik performansı arttırmak amacıyla yaygın olarak kullanılan ileri destek materyalleri arasında yer almaktadır (Hussain vd., 2021; Razzaghi vd., 2022). Öte yandan immobilizasyon sırasında enzim-destek materyali etkileşim mekanizmalarının tam olarak aydınlatılamamış olması immobilizasyon sonrası aktivite değişimlerinin ön görülmesini zorlaştırmaktadır. Ayrıca yüksek verimli immobilizasyon optimizasyon stratejilerin sınırlı olması bu alandaki araştırma gereksinimini daha da arttırmaktadır.

Gıda biyoteknolojisinde ve özellikle meyve suyu endüstrisinde pektinaz enzimleri, bitki hücre duvarının temel bileşenlerinden biri olan pektin polimerlerin parçalanmasında kritik bir rol oynamaktadır. Pektinin varlığı, meyve sularında istenmeyen bulanıklığa (turbidite) ve yüksek viskoziteye neden olarak ekstraksiyon verimini düşürmekte ve filtrasyon aşamalarının zorlaştırmaktadır (Alkorta vd., 1996; Kuddus, 2019). Bu problemin aşılabilmesi amacıyla endüstride ticari serbest pektinaz preparatları yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak serbest enzimlerin endüstriyel proseslerdeki kullanımı; reaksiyon ortamındaki dar pH ve sıcaklık çalışma aralıklarına olan hassasiyetleri, operasyonel süreçlerin sonunda ürün karışımından geri kazanılamamaları ve nihai üründe kontaminasyon riski oluşturmaları gibi temel sorunlar barındırmaktadır (Robescu & Bavaro, 2025). Serbest enzimlerin reaksiyon sonrası kaybedilmesi, proste sürekli taze enzim ilavesini gerektirmekte ve endüstriyel ölçekteki maliyetleri dramatik biçimde arttırmaktadır (Katchalski-Katzir, 1993). İlgili operasyonel kısıtlılıkları aşmak için enzim immobilizasyonu stratejileri literatürde yoğun olarak çalışılmış olsa da geleneksel fiziksel immobilizasyon materyalleri (makro boyuttaki jeller, reçineler veya boncuklar), kütle transferi dirençleri ve düşük enzim yükleme kapasiteleri nedeniyle reaksiyon verimliliğini istenilen seviyelere taşıyamamaktadır (Datta vd., 2013). Dolayısıyla, pektinaz enziminin yüksek stabilite ile çalışabileceği, reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılacak

olması ve aktivite kaybı yaşamadan ardışık döngülerde kullanılabilmesi özgün, dayanıklı ve yeni nesil taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi bu tezin araştırma konusunu oluşturmaktadır.

Çalışmanın kapsamı şu aşamalardan oluşmaktadır:

1. Birlikte çöktürme (co-precipitation) yöntemiyle süper paramanyetik karakterde demir oksit (Fe_3O_4) nanopartiküllerin sentezlenmesi,
2. Sentezlenen taşıyıcıların yüzeylerinin aminosilan ajanlarla fonksiyonelleştirilmesi ve çift fonksiyonlu (bifunctional) glutaraldehit çapraz bağlayıcısı ile aktive edilmesi,
3. Pektinaz enziminin yüzeye kovalent bağlanması ve sentezlenen nanobiyokatalizörün karakterize edilmesi,
4. Serbest ve immobilize pektinazın K_m ve V_{max} gibi kinetik parametrelerinin incelenmesi
5. Termal stabilite, pH stabilite, depolama stabilite ve operasyonel stabilite (reusability) kapasitelerinin tespit edilerek endüstriyel koşullara uygunluğunun değerlendirilmesi,
6. Geliştirilen manyetik nanobiyokatalizörün uygulamalı bir model olarak gerçek meyve suyunda bulanıklık giderimi potansiyelinin test edilmesidir.

Bu araştırmanın bilimsel ve özgün değeri, gıda biyokataliz süreçlerinde yüksek performanslı, ekonomik olarak sürdürülebilir ve akıllı ayrılma özelliklerine sahip bir nano taşıyıcı sistemin rasyonel tasarımıdır.

İmmobilizasyon taşıyıcısı olarak manyetik nanopartiküllerin seçilmesi, sahip oldukları yüksek yüzey alanı/hacim oranı neticesinde difüzyon sınırlandırmalarını minimize ederek yüksek enzim yükleme verimi sağlamasıdır. Buna ek olarak partiküllerin süper paramanyetik yapıları sayesinde reaksiyon sonrasında herhangi bir santrifuj, dekantasyon veya filtrasyon maliyetine gerek kalmaksızın harici bir manyetik alan (mıknatıs) kullanılarak reaksiyon ortamından ayrılabilmesidir (Adeel vd., 2018; Vaghari vd., 2016).

Diğer taraftan immobilizasyon metodolojisi olarak glutaraldehit aracılı kovalent çapraz bağlamanın kullanılması, enzim ile taşıyıcı destek yüzeyi arasında çok noktali kovalent bağlantıların kurulmasını sağlamaktadır (Barbosa vd., 2013). Bu güçlü kimyasal bağlar, pektinaz enziminin üç boyutlu yapısına konformasyonel bir rijitlik kazandırarak; enzimi yüksek sıcaklık, uç pH değerleri ve sızıntı (leaching) problemlerine karşı koruyan üstün bir stabilizasyon mekanizması oluşturur (Sheldon, 2007).

Sonuç olarak; kovalent bağın yapısal kararlılığı ile manyetik nanopartiküllerin operasyonel pratikliğini tek bir sistemde birleştiren bu nanobiyokatalizör, serbest enzim kaynaklı işlem maliyetlerini dūřürecek yeşil kimya odaklı bir proses sunmaktadır. Geliřtirilen bu entegre modelin hem enzim immobilizasyon literatürüne hem de yüksek verimli, endüstriyel gıda prosesi tasarımlarına özgün bir katkı sağlaması öngörülmektedir.

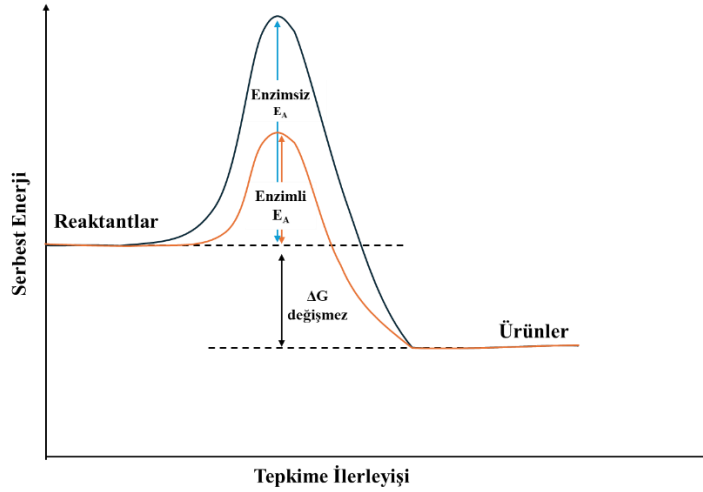
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Hammurabi Kanunları (Eski Babil, yaklaşık M.Ö. 2100), enzimlerin ticari amaçlarla kullanımına dair en eski belgelenmiş referansı içerir. Fermantasyon için gerekli enzimlerin kaynağı olarak sıklıkla mikroorganizmalar kullanılırdı. Babil yazıtları dışında, aynı zamanda Roma, Yunanistan, Mısır, Çin ve Hindistan gibi en eski medeniyetlere ait yazıtlar da bu süreçlere atıflar içerir. Alkolün enzimatik olarak asetik aside dönüştürülmesine dayanan benzer bir sirke yapım sürecine dair çok sayıda referans da eski yazıtlarda bulunabilir. Sirke, antik çağlarda popüler bir malzeme olarak kullanılıyordu. Sadece yiyecekleri korumak ve hazırlamak için değil, aynı zamanda tedavi amaçlı da kullanılıyordu (Copeland, 2023). “Enzim” kelimesi ilk olarak 1878'de Alman fizyolog Wilhelm Kühne tarafından kullanılmış, mayanın şekerlerden alkol üretme yeteneğini tanımlamış ve Yunanca en (“içeride” anlamına gelir) ve zume (“maya” anlamına gelir) kelimelerinden türetilmiştir (Robinson, 2015).

19. yüzyıldan beri fermantasyon sürecinin geliştirilmesi, büyük ölçekte saf enzimler üretmeyi hedeflemiştir (Mannaa vd., 2021). Yaygın olarak protein olarak bilinen enzimler, peptit bağlarıyla (üç boyutlu bir yapıdaki polipeptit zincirleri) bağlı amino asitler içeren katalitik makromoleküllerdir (Faber, 2018). Amino asit dizisi, proteinin birincil yapısını belirler. Enzimler, substratları katalizör görevi yaparak ürünlere dönüştürür (Díaz & Martinez, 2013). Enzimler birçok olağanüstü özelliğe sahiptir; son derece seçicidirler, yakından ilişkili substratlar arasında ayırım yapabilir ve tek bir ürün elde etmek için reaksiyonları kontrol edebilirler. Ayrıca, bazı kimyasal reaksiyonların hızını 10^{17} kata kadar önemli ölçüde artırabilir ve böylece nötr pH ve ortam sıcaklıklarında suda çalışan bir biyokatalizör görevi görebilirler (Bilal vd., 2019; Hedstrom, 2010). Enzimler, çoğu inorganik katalizörden daha etkilidir. Dahası, daha fazla özgüllük gösterirler. Genellikle inorganik katalizörler çeşitli kimyasal reaksiyonları hızlandırarak işlev görürken, enzimler yalnızca belirli bir kimyasal reaksiyonu katalize eder. Bazı enzimler farklı maddeler üzerinde etki gösterir, ancak genellikle bunlar benzer yapısal özelliklere sahip bileşiklerdir ve katalize edilen reaksiyon her zaman aynı tiptedir (Blanco & Blanco, 2017). Enzimler, substratın çözeltiden tutulduğu bir katalitik bölgeye sahiptir. Şekli, substratın şekline bağlı olarak değişebilir, bu da enzimlerin çok az sayıda bileşikle sınırlı olarak reaksiyona girebildiği anlamına gelir.

Son yirmi yılda, enzim endüstrisi uygulamaları ilaç endüstrisinde, özellikle kiral ilaçların hazırlanmasında kullanılmıştır (Solano vd., 2012; S. Wu vd., 2021). İlaç endüstrisinin gelişimi, modern biyoteknolojik gelişmelerle hızla ivme kazanmıştır (Kirk vd., 2002). En önemlisi, enzimler substratlar ve ürünler arasındaki denge konumunu değiştirmez ve reaksiyon sonunda değişmeden kalır (Mannaa vd., 2021). Şekil 2.1, enzimli ve enzimsiz bir reaksiyonun enerji diyagramı arasındaki farkı göstermektedir.



Şekil 2.1. Enzim ve enzim olmadan gerçekleşen reaksiyonun enerji diyagramı

Geniş tanımıyla enzimler, canlı organizmalar tarafından üretilen proteinleri ve ribonükleik asitleri (RNA'ları) içerir. Çeşitli biyolojik süreçlerde önemli roller oynarlar. Sindirim, enerji üretimi, deoksiribonükleik asit (DNA) replikasyonu ve hücre sinyalizasyonu dahil olmak üzere neredeyse tüm metabolik aktiviteler, enzimlerin düzenlenmiş etkinliklerine büyük ölçüde bağlıdır (Leznicki & Kulathu, 2017; Martínez Cuesta vd., 2015; Nelson vd., 2021). Biyokatalizörler olarak enzimler, reaksiyonlar için gereken aktivasyon enerjisini düşürerek kimyasal reaksiyonları kolaylaştırır. Enzimler, her biri belirli fonksiyonel grup türleriyle etkileşim yoluyla belirli reaksiyonu/reaksiyonları katalize etmek üzere tasarlanmış oldukça spesifiktir. Birçok enzim, benzersiz bir üç boyutlu enzim-substrat kompleks yapısı oluşturarak, verimli bir kataliz için bir substrat molekülüyle tam olarak eşleşen aktif bir bölge içerir. Bazı enzimler, çeşitli şekil ve yüzey özelliklerine sahip substratların bağlanabilmesi için aktif bölgelerinde belirli bir esnekliği sahiptir. Enzimler, belirli substrat moleküllerine bağlanır ve kendileri değişmeden onları ürünlere dönüştürür. Bazı enzimler, genellikle kolayca biyolojik olarak parçalanabilen yan ürünler üretir (Nelson vd., 2021). Bu nedenle, enzimler biyoteknoloji, ilaçlar, gıda işleme, çevre koruma, enerji üretimi gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılır

ve böylece reaksiyon verimliliğini artırır, atık oluşumunu ve enerji tüketimini azaltır (Beilen & Li, 2002; Kaushal vd., 2018; Kirk vd., 2002; Martínez Cuesta vd., 2015).

Enzimler, moleküler biyoloji, genetik ve ilaç keşfini destekleyen önemli araştırma araçlarıdır. Ayrıca DNA manipülasyonu ve protein mühendisliğinde de kullanılırlar. Enzimlerin uygulamaları genişlemeye devam etmekte ve araştırmacılar, çeşitli alanlardaki zorlukların üstesinden gelmek için benzersiz özelliklerinden yararlanmanın yeni yollarını keşfetmeye devam etmektedir (Hanefeld vd., 2013; S. Li vd., 2012; Min & Yoo, 2014).

2.1.1. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması

Enzimler genellikle etki ettikleri substratın ismine -az eki eklenerek adlandırılır. Örneğin, tirozinazlar tirozin içeren reaksiyonları katalize eden enzimlerdir. Enzimler ayrıca katalize ettikleri reaksiyon türüne göre de adlandırılırlar. Örneğin, dehidrojenazlar farklı substratlardan hidrojen giderimini katalize eder. Bazı enzimlerin isimlendirilmesi bunların dışında kalır. Bunlar arasında gastrik pepsin, pankreatik tripsin ve kimotripsin bulunur. Her enzime tanımlayıcı bir isim ve kesin olarak tanımlanmasını sağlayan bir numara atamak için Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB), enzimleri katalize ettikleri reaksiyon türüne göre yedi ana gruba ayırmıştır (McDonald & Tipton, 2023). Uluslararası sınıflandırmanın yedi ana grubu şunlardır:

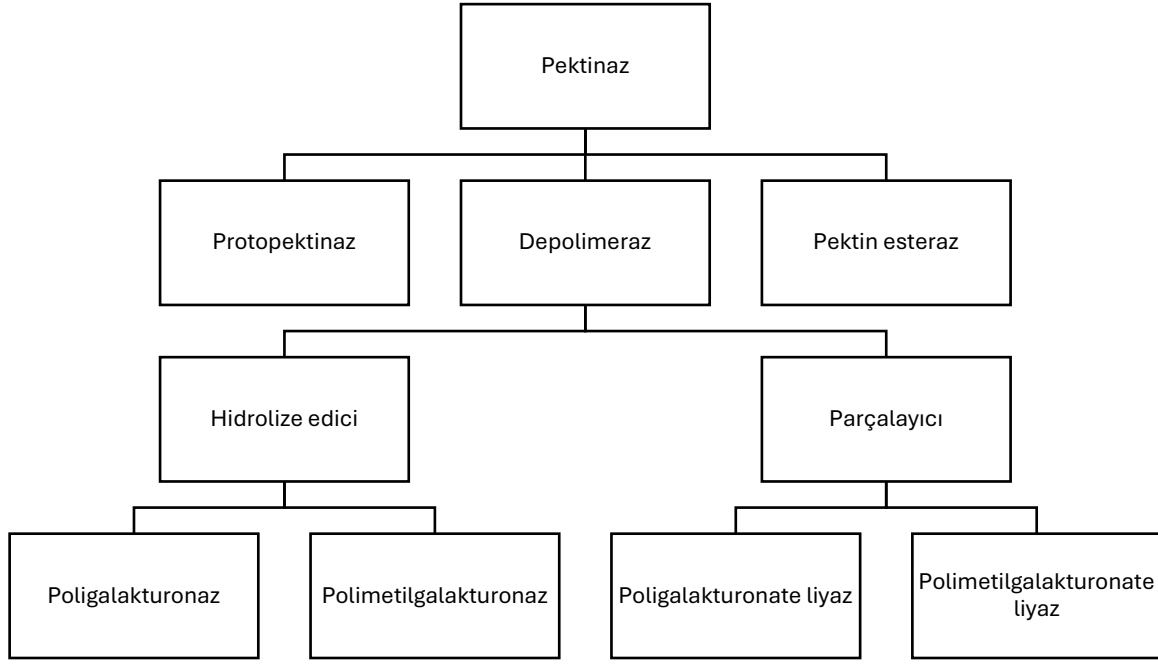
1. Oksidoredüktazlar, oksidasyonları ve redüksiyonları katalize eder. Koenzimlerle ilişkilidirler ve dehidrojenazlar, oksidazlar, peroksidazlar ve oksijenazları içerirler.
2. Transferazlar, amin, karboksil, karbonil, metil, açıl, glikozil ve fosforil gibi bir grup atomun bir molekülden diğerine transferini katalizlerler.
3. Hidrolazlar, su ilavesiyle C—O, C—N, C—S ve O—P bağlarının hidrolizini katalizler.
4. Liyazlar, hidrolizden farklı bir işlemle bir substrattaki C—C, C—S ve C—N bağlarının (peptit bağları hariç) kopmasını katalizler. Bazıları substrattan grupları uzaklaştırarak çift bağlar veya döngüler oluştururken, diğerleri çift bağlara gruplar ekler.
5. İzomerazlar, herhangi bir türdeki (optik, geometrik veya pozisyonel) bir izomerin diğerine dönüşümünü katalizler.
6. Ligazlar, iki molekülü kovalent bağlarla birleştirir.
7. Translokazlar, iyonların veya moleküllerin zarlar boyunca hareketini veya zarlar içinde ayrılmasını katalizler.

2.1.1.1. Pektinazlar

Pektinazlar, hücre büyümesi, meyve olgunlaşması, yaprak dökülmesi, yaşlanma ve bitkilerin patojenitesinde önemli bir rol oynar. Pektinaz, pektin maddeleri üzerinde etkili olan karmaşık ve heterojen bir enzim grubudur. Pektin içeriği, bitkilerde ve meyvelerde yaygın olarak bulunan, asidik yapıda doğal bir heteropolimer bileşiğin genel adıdır (Picot-Allain vd., 2022; Satapathy vd., 2020). Pektinazların ilk ticari kullanımına 1930'da meyve suyunu berraklaştırmak için başlanmıştır (Bhardwaj vd., 2017; Tapre & Jain, 2014). 1960'tan sonra diğer enzimler kaydedilmiş, bitki dokularının kimyasal yapısı belirginleşmiş ve araştırmacılar daha fazla enzimi verimli bir şekilde kullanmaya başlamıştır. Kullanılan enzimler arasında pektinazlar, stabil ve berraklaştırılmış meyve sularının maksimum verimi için ticari sektörün temel katalizörleridir (Tapre & Jain, 2014). Pektinazların uygulama alanları sürekli artmaktadır ve dünya çapındaki gıda enzim pazarının %25'ini oluşturmaktadır (Amin vd., 2017b; Shrestha vd., 2021). Pektinaz üretimi için farklı doğal kaynaklar arasında maya, bakteri, mantar ve bitkiler yer almaktadır. Mikrobiyal enzimler, kimyasal katalizörlerin yerini almaktadır çünkü enzimatik katalizörler daha spesifik, daha az agresif, çevre dostu ve enerji tasarrufu sağlamaktadır (Amin vd., 2019; Garg vd., 2016).

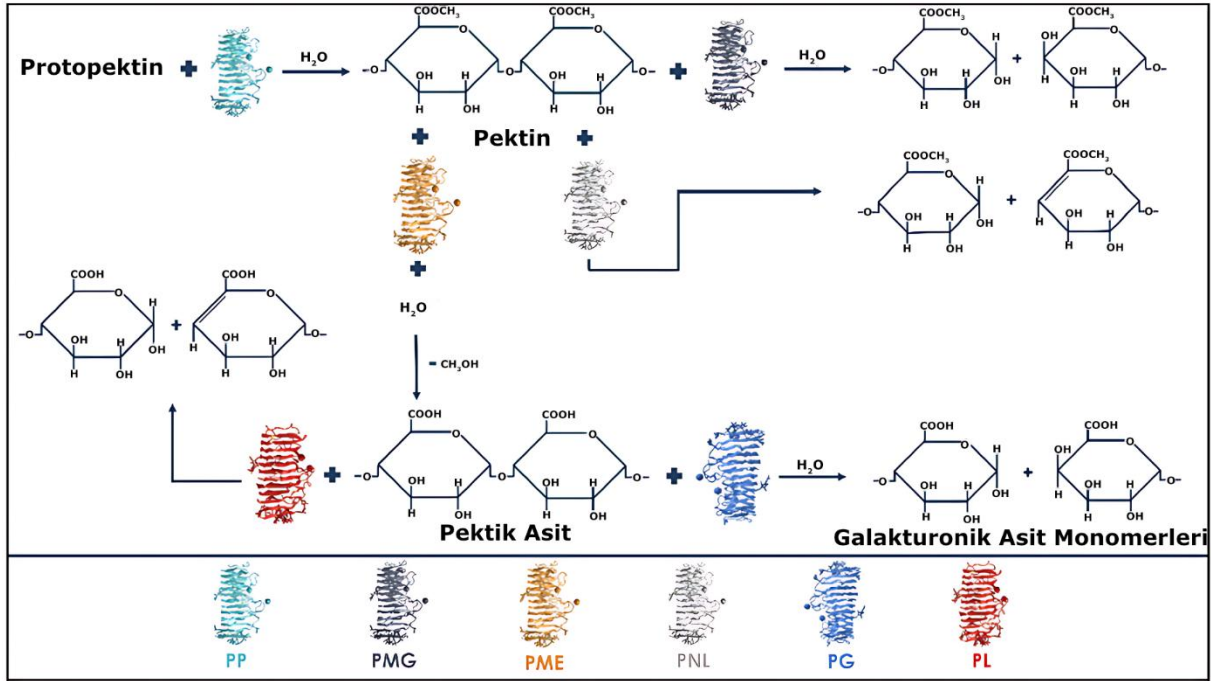
Pektinazların Sınıflandırılması

Pektinaz enzimleri, substrat üzerindeki etkisine göre üç gruba ayrılabilir. Şekil 2.2, protopektinaz, pektinesteraz ve depolimeraz (hidrolaz ve transeliminaz) olmak üzere pektinaz enzimleri gösterilmiştir (Garg vd., 2016; Oumer, 2017; Patidar vd., 2018).



Şekil 2.2. Pektinaz enzimlerinin etkilerine göre sınıflandırılmaları

Pektin maddelerinin hiyerarşik katalizi Şekil 2.3’de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Pektinazlar tarafından pektin maddelerinin enzimatik katalizinin hiyerarşik gösterimi (Patel vd., 2022)

PP: Protopektinaz, PMG: Polimetilgalakturonazlar, PME: Pektin metilesteraz, PNL: Pektin liyaz, PG: Poligalakturonaz, PL: Pektat liyaz

Pektinazların optimum pH'ya bağılı olarak, alkali veya asidik gruplara ayrılırlar. Asidik pektinazlar, pektin maddelerini parçalamak için meyve suyu işleme ve şarap yapım endüstrilerinde kullanılır. Buna karşılık, alkali pektinazlar kağıt üretimi, bitkisel yağ ekstraksiyonu, tekstil işleme, çay ve kahve işleme ve atık su arıtımında uygulama alanı bulmaktadır (Patel vd., 2022). Aşağıda farklı pektinaz türleri ayrıntılı olarak ele alınmaktadır.

a) Protopektinaz

Protopektinazlar (3.2.1.99), suda çözünmeyen protopektinin karmaşık yapısını pektine parçalayan hidrolaz enzimleridir. Bitki hücre duvarının ayrılması işlemi olan maserasyon, hücre duvarlarının protopektinine uygulanan pektosinaj aktivitesinden kaynaklanır. Protopektinazlar, A tipi ve B tipi protopektinazlar olarak sınıflandırılır (Jayani vd., 2005). A tipi protopektinaz, kısmen metillenmiş galakturonik asitten oluşan protopektinin iç bölgesine saldırır. B tipi protopektinaz ise protopektinin tüylü ve yan zincir bölgesine saldırır (Zhang vd., 2018) Protopektinaz kullanılarak yapılan enzimatik ekstraksiyon, endüstrilerde pektinin yüksek sıcaklık ve çevre dostu olmayan asit bazlı ekstraksiyonunun yerini almıştır. Protopektinaz, protoplast ve tek hücreli protein üretiminde uygulama alanı bulmuştur. Bununla birlikte, ekstrakte edilmiş meyve suyunun enzimatik işleminde kullanılmamaktadır. Bu tip pektinaz genellikle olgunlaşmamış meyvelerde bulunur ve çözünmeyen protopektini çözünebilir bir pektin formuna dönüştürür. Bu nedenle, protopektinazın pektin parçalanması için gerekli olan ilk enzim olduğu düşünülmektedir (Patidar vd., 2018; Tapre & Jain, 2014).

b) Pektin Esteraz (PE, de-esteraz)

Esterazlar, meyve suyunun viskozitesini veya bulanıklığını değiştirmez. Bunun yerine, pektini pektat liyazlar (PL) ve poligalakturonazlar (PG) tarafından depolimerize edilen bir substrat olan pektik aside dönüştürürler. Bitkilerde bulunan esterazlar tek zincirli mekanizma ile çalışır. Polimer zincirindeki esterlenmemiş galakturonik asit ünitesine bitişik esterlenmiş ünite üzerinde etki ederler ve ardından doğrusal olarak ilerlerler. Buna karşılık, mikrobiyal olarak izole edilen esterazlar, çok zincirli bir mekanizmayı izleyerek esterlenmiş grubu rastgele ortadan kaldırır (Kotnala vd., 2018). Esterazlar, pektin metilesteraz (PME) (3.1.1.11) ve pektin asetilesteraz (PAE) (3.1.1.6) olarak sınıflandırılır. PME, pektinin esterlenmiş galakturonik asit ünitesinden metil grubunu uzaklaştırarak poligalakturonik asit (PGA) ve yan ürün olarak metanol oluşturur. Bunun aksine, PAE, pektinin yan zincirlerinden asetil grubunu uzaklaştırarak pektini deasetile eder. PAE'nin etkisi, yan zincirlerde bulunan asetil gruplarının sterik engelini azaltarak diğer pektinazların işlevini iyileştirir. Pektindeki ramnogalakturonan I

(RG I)'in deasetilasyonunu gerçekleştiren bir enzim olan RG asetil esteraz (3.1.1.86) da rapor edilmiştir (Ahmed ve ark., 2021).

Bu pektinaz, pektin metil hidrolaz, pektin metilesteraz ve pektaz olarak da bilinir. PE, pektinin galakturonan omurgasının metil ester bağının de-esterifikasyonunu katalize ederek pektik asit ve metanol üreten bir karboksilik asit esterazıdır (Garg vd., 2016; Jayani vd., 2005). PE'nin etkisinden sonra oluşan pektinin daha sonra poligalakturonaz (PG) ve liyazlar tarafından işlendiği bildirilmiştir. PE'ler, yüksek bitkilerin meyvelerinde, yapraklarında, çiçeklerinde, gövdelerinde ve köklerinde bulunur. pH'ı asidik koşullardan alkali koşullara kaydırdıkları düşünülmektedir (Kavuthodi & Sebastian, 2018; Nighojkar vd., 2019).

c) Depolimerize Edici Enzim

Bu enzimler pektinli maddeleri daha kısa zincirli bileşiklere depolimerize eder. Meyve suyunun viskozitesi, mevcut pektinli maddelerin zincir uzunluğuna bağlıdır. Dolayısıyla, meyve suyu berraklaştırmasında performansları çok önemlidir. Bu nedenle, pektin enzimleri kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve endüstriyel olarak kullanılan enzimlerdir. Glikozidik bağ kırılma mekanizmasına bağlı olarak, depolimerazlar hidrolazlar ve liyazlar olarak gruplandırılır (Patel vd., 2022).

Hidrolazlar, oksijen köprüsü boyunca su molekülü ekleyerek pektinli bileşiklerin glikozidik bağını kırar. Enzimlerin saldırdığı substratı dikkate alarak, hidrolazlar poligalakturonazlar (PG) ve polimetilgalakturonazlar (PMG) olarak sınıflandırılır. PG'ler ve PMG'ler sırasıyla pektik asidini ve pektini depolimerize eder. PG'ler, substratı katalize etmek için belirli bir deseni izler. Pektik asidi zincirinin terminal kısmını hedefleyen enzimlere ekzopoligalakturonaz denir. İki tip ekzopoligalakturonaz bildirilmiştir. Ekzopoligalakturonaz I (3.2.1.67), pektik asidi indirgenmeyen uçtan kırarak monogalakturonatlar üretir (Kant vd., 2013). Buna karşılık, ekzopoligalakturonaz II (3.2.1.82), poligalakturonik asidin (PGA) sondan bir önceki parçalanmasını gerçekleştirerek, polimer zincirinin ucundan digalakturonat molekülünü uzaklaştırır (Anand vd., 2017). Buna karşılık, zincir üzerinde rastgele etki eden PG'ye endopoligalakturonaz (3.2.1.15) adı verilir. PG'ler, özellikle *Aspergillus niger* olmak üzere mikrobiyal suşlardan elde edilir (Jayani vd., 2005). Benzer şekilde, PMG'ler endoPMG'ler ve ekzoPMG'ler olarak ayrılır. Şimdiye kadar PMG'lerin üretimi, karakterizasyonu ve uygulamasıyla ilgili kapsamlı çalışmalar bildirilmemiştir. Endoarabinaz (3.2.1.99), α -arabinofuranosidaz (3.2.1.55), β -galaktosidaz (3.2.1.23), endoglukanaz (3.2.1.89), EndoRG-I hidrolaz (3.2.1.171), RG-I galakturonohidrolazlar (3.2.1.173), RG-I ramnohidrolazlar

(3.2.1.174) ve doymamış ramnogalakturonil hidrolazlar (3.2.1.172) gibi diğer yardımcı hidrolazlar da pektin polimerinin parçalanmasına, özellikle pektinin dallanmış kısımlarının uzaklaştırılmasına yardımcı olur (Yadav vd., 2009).

Liyazlar, C4'teki (galakturonik asit birimindeki dördüncü karbon) glikozidik bağı kırar ve C5'ten hidrojen atomunu uzaklaştırarak doymamış bir ürün oluşturur (Yadav vd., 2013). Pektin molekülünü katalize eden liyazlar pektin liyazları (PNL'ler) olarak bilinir. Buna karşılık, pektat liyaz (PL) pektik asidi trans-eliminasyona uğratar (Hamdy, 2005). PG'ler ve PMG'lere benzer şekilde, PNL ve PL endo ve ekzoenzimler olarak sınıflandırılır. EndoPNL (4.2.2.10) ve endoPL (4.2.2.2), pektin ve pektik asit moleküllerini rastgele bölerek moleküllerin zincir uzunluğunu azaltır. Buna karşılık, ekzoPNL ve PL (4.2.2.9), reaksiyon sırasında substratlardaki galakturonik asidin terminal birimlerini uzaklaştırır. EkzoPNL, izolasyon kaynağına bakılmaksızın liyazların ham maddelerinde neredeyse hiç bulunmaz ve bu nedenle ekzoPL'lerle ilgili çok az araştırma mevcuttur. Liyazlar ayrıca pektin bileşiklerinin RG kısımları üzerinde etkili olan endorhamnogalakturonan I (4.2.2.23) ve exorhamnogalakturonan I'i (4.2.2.24) de içerir (Yadav vd., 2009).

Sıcaklığa bağlı olarak pektinazlar psikrofilik, termofilik ve mezofilik pektinaz olarak sınıflandırılır. Genellikle endüstrilerde kullanılan pektinazların çoğu, 20 ile 50 °C arasında geniş bir sıcaklık aralığında çalışan mezofilik pektinazlardır. Bununla birlikte, 37 °C'de aktivite gösteren pektinazlar, düşük veya yüksek sıcaklık işlemleri kullanan endüstrilerde uygun değildir. Ayrıca, ekstremofiller en iyi alternatifler olabilir (John vd., 2020). Çeşitli endüstrilerde pektinaza olan talebin artması nedeniyle geniş bir pH aralığına dayanıklı ve termostabil özelliklere sahip pektinaz üretme ihtiyacı vardır.

Pektinazların Meyve Suyu Endüstrisinde Kullanımı

Meyve suyu endüstrileri, meyveleri yumuşatmak, ekstraksiyonu kolaylaştırmak, meyve suyu verimini artırmak ve meyve suyunu berraklaştırmak için pektinazlar, selülazlar ve proteazlar gibi diğer hücre duvarı parçalayıcı enzimleri kullanmaktadır (Jadaun, 2018; Nighojkar vd., 2019; Patidar vd., 2018). Meyveler, özellikle tropikal meyveler, daha fazla pektin içerir ve posalıdır (Tapre & Jain, 2014). Meyve suyu ekstraksiyonunda meyvelerin mekanik olarak parçalanması, negatif yüklü pektin tarafından kaplanan pozitif yüklü protein nedeniyle jöle kıvamında, viskoz ve bulut benzeri görünümlü ürünlere neden olabilmektedir. Meyve suyuna pektinaz eklenmesi, pektini parçalayarak pozitif yüklü proteini açığa çıkarır. Pozitif yüklü proteinin açığa çıkması, bulut parçacıkları arasındaki elektrostatik itmeyi azaltır

ve daha büyük bir parçacık oluşumuna yol açar. Bu da daha sonra çökerek berrak bir meyve suyu elde edilmesini sağlar (Tapre & Jain, 2014). Bununla birlikte, pektinaz takviyesi, meyve suyu verimini artırmak için galakturonik asit monomerleri arasında bulunan glikozidik bağları kırar. Ek olarak, pektinazlar pektinin su tutma kapasitesini azaltır ve viskoziteyi ve bulanıklığı düşürür (Nighojkar vd., 2019; Shrestha vd., 2021; Tapre & Jain, 2014). Dahası, enzimatik işlem, pektini parçalayarak meyve suyunu berraklaştırır, askıda kalan parçacıkların çökmesine yardımcı olur ve renk, koku ve stabilitedeki istenmeyen değişiklikleri ortadan kaldırır. Pektinazlar, meyve püresi üretiminde, meyve dilimlerinin soyulmasında ve şarap berraklaştırmasında uygulanabilir. Biyokatalizör kullanımı, maliyeti düşürür ve ürün verimini artırır ve diğer farklı yerleşik süreçlere göre oldukça rekabetçidir. Bu, özellikle tropikal meyve suyu üretiminde çeşitlendirme ve pazar payını artırma konusunda basit bir alternatif yöntem sunmaktadır (Jadaun, 2018; Tapre & Jain, 2014).

Pektin

Pektin maddeleri, α -(1-4) bağlantısıyla birbirine bağlanmış galakturonik asit kalıntılarından oluşan bir omurgaya sahip, koloidal asit polisakkaritlerinin kompleksidir. Galakturonik asidin karboksil grupları, potasyum, sodyum veya amonyum iyonları tarafından kısmen veya tamamen nötralize edilir ve metil grupları tarafından kısmen esterleştirilir (Caffall & Mohnen, 2009; Sieiro vd., 2012). Pektinin yan zincirleri arabinoz, galaktoz, L-ramnoz ve ksilozdan oluşur. Pektin maddeleri dört moleküle ayrılabilir: protopektin (sağlam dokudaki pektin maddesi), pektin asitleri (poligalakturonan ihmal edilebilir miktarda metoksil grubu içerir), pektinik asitler (>0-75 metillenmiş galakturonat birimi içeren poligalakturonan) ve pektinler (yaklaşık 75 metillenmiş galakturonat birimi içeren pektinik asit). Protopektinler suda çözünmezken, diğer pektin türleri kısmen veya tamamen suda çözünür (Alkorta vd., 1996; Ramadan, 2019; Tapre & Jain, 2014). Pektin hücre duvarında bulunur ve protopektin oluşturmak için polisakkaritler veya proteinlerle bağlanabilir. Meyvelerin hücre duvarında pektin ana bileşendir (Anuradha vd., 2010; Kohli & Gupta, 2015). Bazı taze meyvelerin pektin içeriği (%) Tablo 2.1'de verilmiştir. Taze meyveler arasında kuş üzümü en yüksek pektin yüzdesini (0,9-1,5) içerir (Ramadan, 2019).

Tablo 2.1. Bazı taze meyvelerdeki pektin içeriği (%) (Ramadan, 2019)

Meyve	Pektin İçeriği (%)
Muz	0.7–1.3
Kayısı	0.7–1.3
Elma	0.5–1.6
Kuş Üzümü	0.9–1.5
Üzüm	0.2–1.0
Domates	0.2–0.5
Guava	0.7–1.5
Çilek	0.6–0.7
Şeftali	0.3–1.2
Ananas	0.3–0.6

Pektin, doğal olarak oluşan bir biyopolimer olup, tüm yüksek bitkilerin hücre duvarının ana bileşenlerinden biridir. Hücre yapışmasından sorumlu olan orta lamellada bulunan tek polisakkarittir. Doğası gereği toksik olmayan, anyonik bir heteropolisakkarittir ve bitkinin taze ağırlığının %0,5 ila %4,0'ını oluşturur (Jayani vd., 2005; Picot-Allain vd., 2022). Bitkilerde ve meyvelerde pektin, hücrenin sertliğini ve yapısını sağlar. Pektin türü, sebze ve meyvelerin büyüme, olgunlaşma ve depolama sırasında dokusunda önemli bir rol oynar. Ayrıca pektin, bitki büyümesi ve gelişmesinin yanı sıra morfojeniz, savunma, hücreler arası yapışma, duvar yapısı, sinyal iletimi, hücre genişlemesi, duvar gözenekliliği, iyonların, büyüme faktörlerinin ve enzimlerin bağlanması, polen tüpü büyümesi, tohum hidrasyonu, yaprak dökülmesi ve meyve gelişiminde önemli bir rol oynar (J. Chen vd., 2015; M. Khan vd., 2013; Yamada vd., 2015). Enzimatik ve kimyasal modifikasyonlar, meyvelerde bulunan pektini etkiler. Meyvelerin olgunlaşması sırasında, pektinaz nedeniyle pektinin çözünmesi ve meyvelerin yumuşaması gerçekleşir (Paniagua vd., 2014). Pektinin moleküler ağırlığı 60.000 ila 318.000 g/mol arasında

değişir ve bitki kaynağına, meyve/bitki aşamasına, ekstraksiyon koşullarına ve yöntemlere göre farklılık gösterir (Sayah vd., 2016; Yang vd., 2018).

Pektin polisakkaritlerinin ana bileşeni, α (1 \rightarrow 4) glikozidik bağlarla birleştirilmiş D-galakturonik asittir. Riboz, galaktoz, arabinoz ve sükroz dahil olmak üzere diğer şeker birimleri de polimerlere eklenmiş olarak bulunur ve hücre duvarında yaklaşık %70 galakturonik asit bulunur (Harholt vd., 2010; Picot-Allain vd., 2022; Shrestha vd., 2021). Pektinin yapısal bileşenleri ve moleküler kütlesi, kökenlerine, hücre tiplerine, hücre gelişiminin farklı aşamalarına, ekstraksiyon koşullarına, ekstraksiyon yöntemlerine ve belirli bir hücre duvarının kalınlığına göre farklılık gösterir (Harholt vd., 2010; Pancercz vd., 2021). Bununla birlikte, aynı molar kütleyle sahip pektin molekülü, metilasyon derecesindeki (DM), dallanmadaki ve nötr şeker içeriğindeki farklılık nedeniyle farklı hidrodinamik özelliklere sahip olabilir. Pektinin en yaygın polisakkarit yapısal bileşenleri homogalakturonan (HG), ramnogalakturonan I (RG I) ve ramnogalakturonan II'dir (RG II) (Lara-Espinoza vd., 2018; Picot-Allain vd., 2022; Ropartz & Ralet, 2020).

a) Homogalakturonan

Bu, pektinde en basit ve en bol bulunan bileşiktir ve pektinin yaklaşık %75-100'ünü oluşturur. Homogalakturonan (HG), pektin molekülünün omurga zincirini temsil eder ve α (1 \rightarrow 4) glikozidik bağlarla birbirine bağlanmış α -D galakturonik asit (GalA) kalıntılarının doğrusal polimerlerini içerir. HG'nin minimum uzunluğunun 100 GalA kalıntısı olduğu tahmin edilmektedir. GalA kalıntıları asetillenmiş ve/veya metil esterlenmiş olabilir. 100 GalA kalıntısındaki asetil esterlenmiş GalA ve metil esterlenmiş GalA sayısı sırasıyla asetilasyon derecesi (DA) ve metilasyon derecesi (DM) olarak bilinir. Hem DA hem de DM, pektinin fonksiyonel özellikleri üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Bu HG bölgesi aynı zamanda pektinin pürüzsüz bir bölgesi olarak da kabul edilir (Lara-Espinoza vd., 2018; Ropartz & Ralet, 2020).

b) Ramnogalakturonan I

Ramnogalakturonan I (RG I), L-ramnopiranozun α -1, iki bağlantılı kalıntılarının yan zincirleri olarak arabinoz, galaktoz ve mannoz gibi birçok nötr şekeri içeren yüksek oranda dallanmış bölgede bulunur. Ayrıca, RG I'in omurgası ramnoz ve galakturonik asidin tekrarlanan disakkarit yapısı tarafından oluşturulur. Galakturonik kalıntı asetilasyona uğrayabilir ve diğer nötr şekerlerle (galaktoz, arabinoz ve ksiloz) bağlanabilir. Bu nedenle, RG I pektinin yaklaşık %10-25'ini oluşturur (Lara-Espinoza vd., 2018).

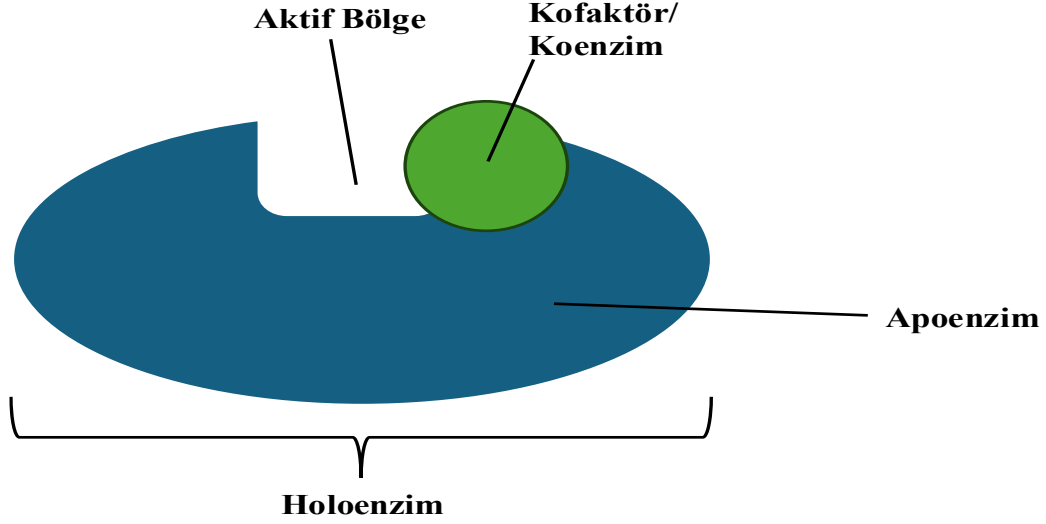
c) Rhamnogalakturonan II

Rhamnogalakturonan II (RG II), bir homogalakturonan (HG) omurgası içeren pektin alanının en karmaşık dalıdır ve bitkinin en korunmuş ve yaygın alanıdır. RG II, pektinin %0-10'unu oluşturur. RG II'nin kısa bir HG'si, birkaç sıra dışı şeker kalıntısının dört yan zinciriyle ikame edilmiştir. Pektinin RG I ve RG II bölgeleri, pektinin tüylü bölgeleri olarak bilinir (Lara-Espinoza vd., 2018; Mellinas vd., 2020).

Pektin bakımından zengin meyvelerin ezilmesi, jelatinimsi ve yüksek viskoziteli meyve suları ve bulanıklığı artan meyve posaları ile sonuçlanır (Suryawanshi vd., 2019). Bulanıklık veya pusluluk, meyve sularında pektin, selüloz ve hemiselüloz gibi polisakkarit bileşenlerinin kolloidal dağılımından kaynaklanır. Bu, yalnızca işleme ve depolama sırasında ürün kalitesini tehlikeye atmakla kalmaz, aynı zamanda tüketici kabul düzeyini de olumsuz etkiler (Kharazmi, Taheri-Kafrani, Soozanipour, vd., 2020).

2.1.2. Enzimlerin kimyasal yapısı

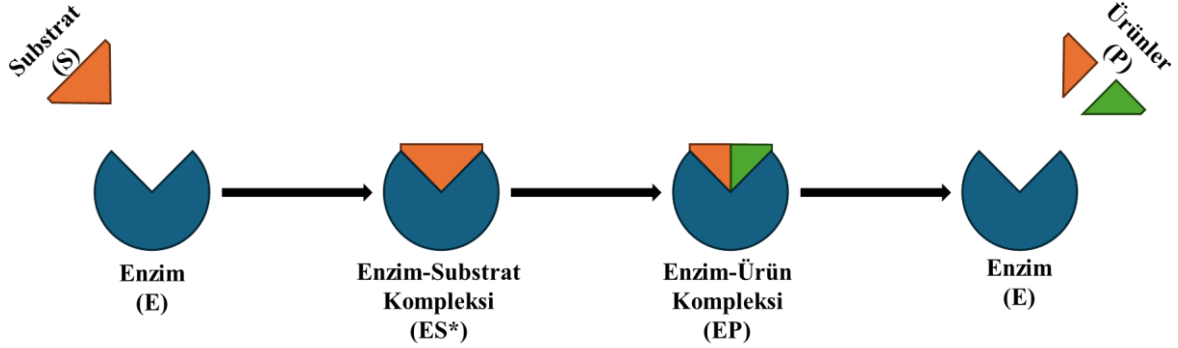
Tüm enzimler protein veya konjuge proteinlerdir, ancak bazı katalitik olarak aktif RNA'lar tanımlanmıştır. Bazı enzimler yalnızca amino asitlerden oluşur. Diğer enzimler ise çeşitli alt birimlerin veya polipeptit zincirlerinin birleşmesiyle oligomerler oluşturur. Birçok enzim katalitik rolünü yalnızca kofaktör/koenzim adı verilen nispeten küçük boyutlu başka bir protein olmayan molekülle birleştğinde gerçekleştirir. Hem protein hem de protein olmayan kısımlar enzim aktivitesi için gereklidir. İnaktif protein yapısı olan apoenzimin, kendisi için spesifik olan kofaktörüyle birleşmesi sonucu oluşturduğu aktif enzimatik komplekse holoenzim denir (Şekil 2.4) ve protein veya apoenzim ile kofaktör/koenzimden (protein olmayan molekül) oluşur. İzoenzimler (izozimler), aynı reaksiyonu katalize eden, ancak fiziksel ve kinetik parametreleri farklı olan farklı enzim formlarıdır (Rodrigues vd., 2013).



Şekil 2.4. Enzimlerin kimyasal yapısı

2.1.3. Enzimatik kataliz

Enzimler reaksiyon hızını artırır ve diğer katalizörler gibi reaksiyonun denge sabitini değiştirmezler. Bir E enzimi, substrat S'nin ürün P'ye dönüşümünü katalize ederse, enzim ve substrat kompleks bir ES^* oluşturur ve bu da daha sonra enzim ve ürünlere ayrışır (Şekil 2.5):

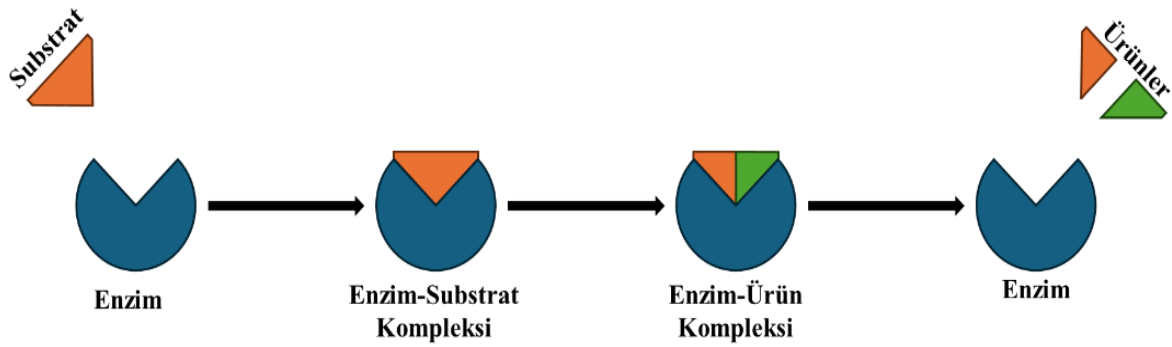


Şekil 2.5. Enzimatik kataliz gösterimi

Reaksiyon sırasında enzim, substrata etkili bir şekilde bağlanır. Son olarak, enzim değişmeden kalır ve başka bir substrat molekülüne tekrar bağlanabilir. ES kompleksinin oluşumu için substrat, enzim üzerinde iyi tanımlanmış bir yere bağlanır. Molekülün bu bölgesine aktif bölge, aktif merkez, katalitik bölge veya substrat bölgesi denir. Enzimin katalitik etkisi burada gerçekleşir. Aktif bölgede bağlanma ve katalitik bölgeler bulunur. Hem bağlanma hem de katalitik etkiler, aminoasit kalıntılarının yan zincirlerinin önemli bir rol oynadığı aktif bölge seviyesinde oldukça spesifik bir üç boyutlu konformasyon gerektirir. Örneğin, Sistein (Cys), Glutamat (Glu), Aspartat (Asp), Lisin (Lys), Arjinin (Arg), Histidin (His), Serin (Ser),

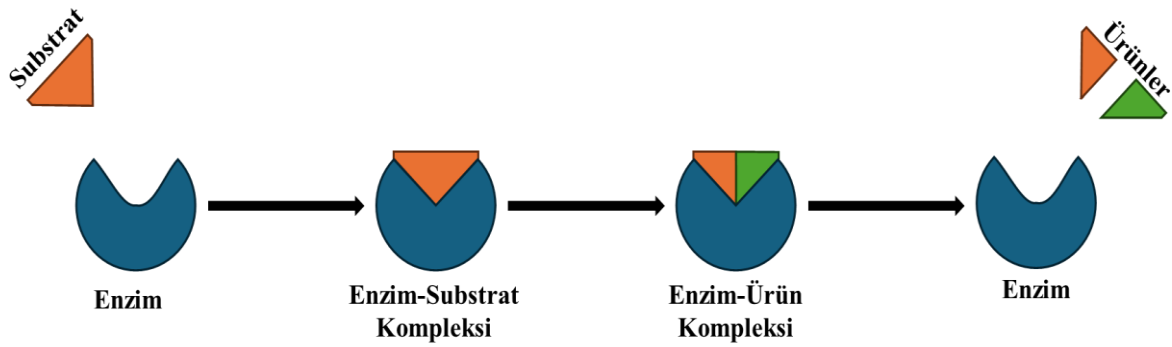
Treonin (Thr) ve hidrofobik kalıntıların reaktif yan zincirleri, substrat bağlanmasında önemli bir role sahiptir. Substratın enzime bağlanması, hidrojen bağları, iyonik çekimler, hidrofobik bağlar ve Van der Waals etkileşimleri gibi kovalent olmayan bağları içerir. Tepkime sırasında enzim ve substrat arasında geçici kovalent bağlar da oluşmaktadır.

Enzimatik reaksiyonların mekanizması üzerine birçok çalışma yapılmış olup, bunlardan en yaygın olanı aşağıda açıklanmıştır (Ako & Nip, 2006). Anahtar ve kilit teorisi (Şekil 2.6), aktif bölgesine yalnızca substratın bağlanabileceğini belirten ilk modeldir.



Şekil 2.6. Anahtar - kilit modeli

İndüklenmiş uyum teorisi (Şekil 2.7), enzimlerin, bağlı substratın enzim konformasyonunda bir değişikliğe neden olacak kadar esnek olduğunu ve böylece bir reaksiyonun meydana gelebileceğini göstermektedir (Robinson, 2015).



Şekil 2.7. İndüklenmiş uyum modeli

2.1.4. Enzim kinetiği

Pratik çalışmalarda, enzim katalizli reaksiyonları (reaksiyon hızı, zaman çizelgesi) karakterize etmek ve karşılaştırmak için uygun matematiksel ilişkileri bilmek önemlidir.

Dolayısıyla, reaksiyon sistemlerinin kinetik modellerinin oluşturulması, deneysel verilerin matematiksel bir ifade şeklinde açıklanabilmesi için kritik bir araç görevi görmektedir.

Her metabolik süreç bir kimyasal reaksiyonun çekirdeğini oluşturur. Biyolojik sistemlerde, reaksiyonların büyük bir kısmında katalizörler rol oynar. Karmaşık metabolik ağ, enzimler sayesinde mümkün olmaktadır. Kimyasal kinetiğin temel prensipleri, ister enzim katalizli ister enzim katalizsiz olsun, kimyasal reaksiyonlar hakkında önemli bilgiler sunmaktadır (Punekar, 2018). T. 1’de görüldüğü gibi Michaelis-Menten denklemi, enzim substrat etkileşimi hakkında bir ilişki olduğunu kanıtlamıştır. Örnekler arasında, parçalanma reaksiyonları (peptidazlar, nükleazlar, amilazlar) veya izomerizasyonlar (sadece ileri reaksiyon dikkate alındığında) bulunur. Geri dönüşümsüz reaksiyon için, bir veya daha fazla ürünün oluşup oluşmadığına bakılmaksızın geçerlidir.



Burada (E) enzim, (S) substrat, (ES) enzim-substrat kompleksi olarak formlarıdır, (P) üründür. Bireysel reaktanların zamana bağlı değişimleri aşağıdaki diferansiyel denklemlerle ifade edilir (Punekar, 2025).

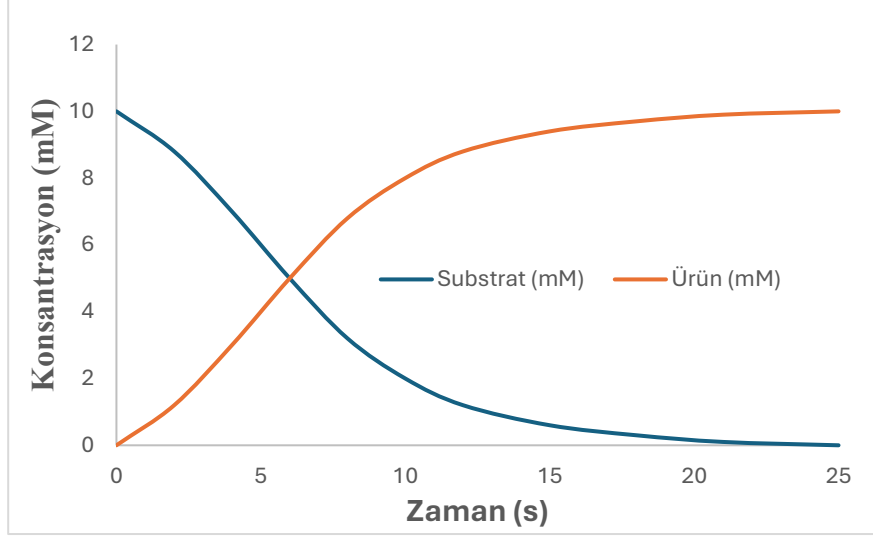
$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] \quad (\text{D. 1})$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] \quad (\text{D. 2})$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = -k_1[S][E] - k_{-1}[ES] \quad (\text{D. 3})$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = V \quad (\text{D. 4})$$

D. 5’te görüldüğü gibi reaksiyon hızı, enzim-substrat kompleksine bağlıdır. Enzimatik bir reaksiyonda, ürün ve substrat konsantrasyonu buna göre değişir (Şekil 2.8).

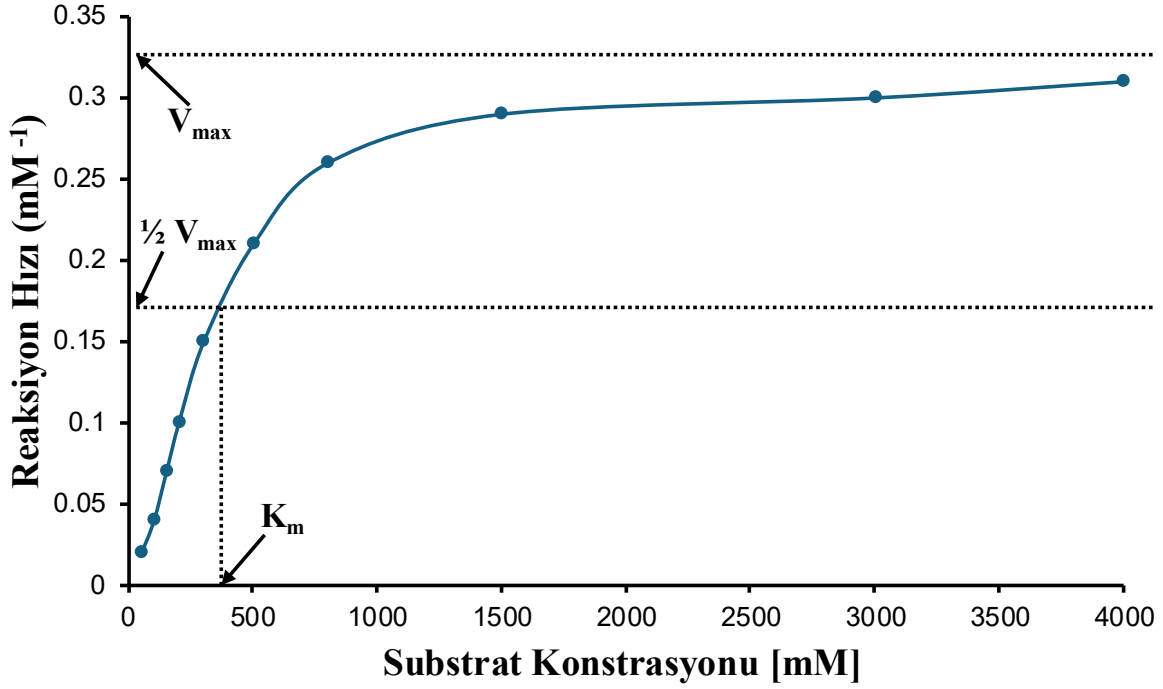


Şekil 2.8. Zamana bağlı olarak substrat ve ürün konsantrasyonunun değişimi

Michaelis-Menten kinetik modeli, reaktanlar (E ve S) ile ES kompleksi arasında hızlı bir denge olduğunu varsayar. D. 2'de görüldüğü gibi maksimum reaksiyon hızının enzim konsantrasyonuna $[E]$ ve devir sayısına (k_{cat}) bağlı olduğu gösterilebilir. Farklı substrat konsantrasyonlarında enzim katalizli reaksiyonların başlangıç hız ölçümü için çeşitli enzimatik testler mevcuttur (Lütz, 2013).

$$V_{max} = k_{cat}[E] \quad (D. 5)$$

Şekil 2.9, artan substrat konsantrasyonlarında enzim katalizli reaksiyonların başlangıç hızını göstermektedir. Başlangıçta, enzimin aktif bölgesi ile substrat molekülleri arasında reaksiyon meydana gelir. Reaksiyon hızı, artan substrat konsantrasyonuyla doğrusal olarak artar. Belirli bir süre sonra, enzim moleküllerinin aktif bölgeleri substrat molekülleriyle doymuş hale gelir ve maksimum reaksiyon hızına (V_{max}) ulaşır.



Şekil 2.9. Substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi

D. 6'da görüldüğü gibi Michaelis-Menten Denklemi, enzimatik reaksiyonun substrat konsantrasyonuna bağımlılığını göstermektedir. Michaelis sabiti (K_m),

Şekil 2.9'de gösterildiği gibi maksimum reaksiyon hızının yarısındaki substrat konsantrasyonunu tanımlar. Kinetik sabitler k_{cat}/K_m oranı, farklı enzimlerin substratlar üzerindeki verimliliğini veya tam tersini karşılaştırmak için kullanılır.

$$V = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (D. 6)$$

Enzim katalizli reaksiyon (yani,

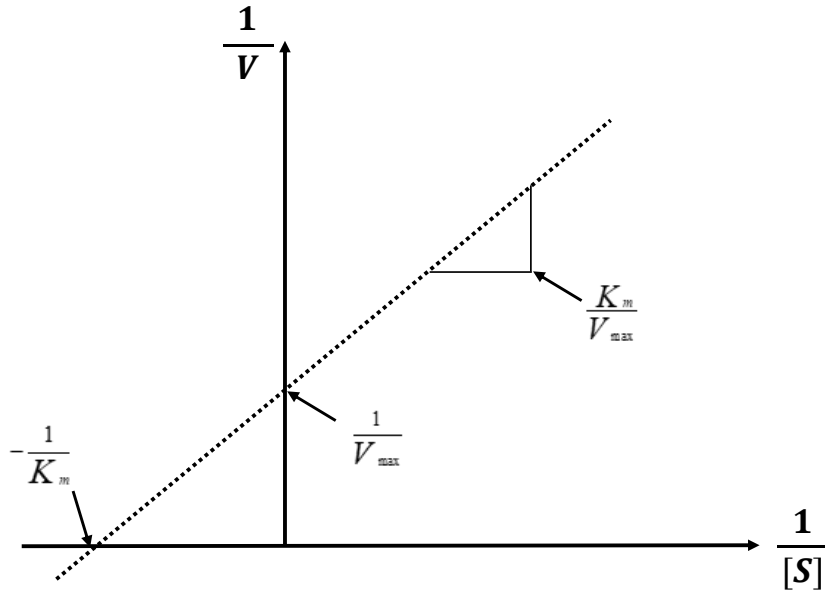
Şekil 2.9'deki eğrinin eğimi) zamanla azalır. Bu düşüşün bazı nedenleri şunlardır:

- Tepkime sırasında enzim kararsız hale gelir.
- Substrat tükendikçe enzimin substratla doygunluk derecesi azalır.
- Ürün biriktikçe ters tepkime daha yaygın hale gelir.
- Tepkime ürünleri enzimi inhibe eder.

Yukarıdaki faktörlerin herhangi bir düzenlemesi düşüşe neden olur (Marangoni, 2003).

Michaelis-Menten kinetiğinin doğrusallaştırılması, verilerin görselleştirilmesine yardımcı olur. Doğrusallaştırmayı yapmak için çift yönlü bir ters Lineweaver-Burk grafiği

(Şekil 2.10) kullanılır. Bu grafiğin eğimi K_m ile V_{max} arasındaki orandır, x-kesişimi K_m 'nin negatif tersidir ve y-kesişimi V_{max} 'ın tersidir (Lütz, 2013).



Şekil 2.10. Lineweaver-Burk grafiği (Lütz, 2013)

2.1.5. Enzim immobilizasyonu

Biyokatalizör görevi gören enzimler, çeşitli uygulamalar için sayısız avantaja sahiptir. Ancak, belirli sınırlamalar ve dezavantajlarla da birlikte gelirler. Enzim aktivitesi, sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu ve düzenleyici moleküllerin varlığı dahil olmak üzere çeşitli faktörlerin etkisine duyarlıdır (Bisswanger, 2014; Nelson vd., 2021). Belirli koşullar altında, bazı enzimler inaktif hale gelebilir veya bozunabilir, bu da uzun vadeli kararlılıklarını zayıflatır. pH ve sıcaklığa duyarlılık, enzimlerin tanımlayıcı bir özelliğidir ve optimum aktivite genellikle belirli sıcaklık ve pH aralıklarıyla sınırlıdır. Bu aralıklardan sapmalar, enzimin deaktivasyonuna ve hatta denatürasyonuna yol açabilir (Weijers & Van't Riet, 1992). Birçok enzimle ilişkili üretim ve saflaştırma maliyetleri önemli olabilir ve bu da büyük ölçekli endüstriyel uygulamalar için ekonomik uygulanabilirliklerini etkiler (Sirisha vd., 2016). Ayrıca, bir enzim tarafından katalize edilen ürünü enzimin kendisinden ayırmaya çalışırken zorluklar ortaya çıkar ve bu da ayırma ve saflaştırma süreçlerini karmaşıklaştırır. Enzimlerin kendine özgü özellikleri ve sınırlamaları nedeniyle, enzimlerin araştırma ve endüstride uygulanmasında genellikle özel dikkat gerekir. Araştırmacılar, uygulama alanlarını genişletmek ve uygulama verimliliklerini artırmak için sürekli olarak enzimlerin eksikliklerini gidermeye çalışmaktadır.

Enzimleri immobilize etmek, serbest enzimlerin bazı sınırlamalarının üstesinden gelmek için önemli bir stratejidir. Bunu yaparken, enzimler genellikle katı taşıyıcılara immobilize edilir ve bu da stabilitelerini artıracak bir ortam oluşturur (M. R. Khan, 2021). Burada, enzimin konformasyonu taşıyıcı ile etkileşim yoluyla stabilize edilebilir ve böylece dış ortamdaki değişikliklere daha az duyarlı hale gelerek sıcaklık ve pH gibi çevre koşullarındaki değişikliklere karşı daha dirençli hale gelir. Bu, enzimin ömrünü uzatmaya yardımcı olur ve daha geniş bir koşul aralığında aktif kalmasını sağlar (Hanefeld vd., 2013; Min & Yoo, 2014; Weijers & Van't Riet, 1992). Genel olarak, enzimleri immobilize etmek, aynı katalitik etkileri elde etmeye çalışırken enzimleri kurtarmanın etkili bir yoludur. Çünkü geri dönüştürülemeyen enzimlerle (serbest enzim) karşılaştırıldığında, aynı immobilize edilmiş enzim partisi birden fazla döngü için yeniden kullanılabilir. Ayrıca, katalitik verimliliği artıran daha sert koşulların immobilize edilmiş enzimlere büyük enzim hasarına neden olmadan (korumasız serbest enzime kıyasla) uygulanabilmesi için reaksiyon koşullarının ayarlanması da mümkün olabilir. Böylece, enzim aktivitesi ve reaksiyon hızları immobilizasyon yoluyla daha kontrol edilebilir hale gelir. Bu, reaksiyon koşullarının ve ürün üretim hızlarının ayarlanmasını gerektiren uygulamalar için önemlidir. Bazı durumlarda, immobilize edilmiş enzimin ürünü destekten kolayca ayrılabilir. Böylece saflaştırma adımları basitleştirilir ve ürüne ve çevreye bulaşma azaltılır. İmmobilize edilmiş enzimler genellikle tekrar kullanılabilir. Çünkü enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlantı, kataliz sırasında enzim kaybını azaltır. Sonuç olarak, enzimleri katı destekler üzerinde immobilize etmek, enzim katalizli reaksiyonları desteklemenin etkili bir yoludur. Bu da belirli enzimler için stabiliteyi, tekrar kullanılabilirliği ve hatta aktiviteyi artırarak çeşitli uygulamalarda birçok pratik fayda sağlar (A. Sheldon & Pelt, 2013; Brady & Jordaan, 2009; Cao, 2005; Hartmann & Kostrov, 2013; Zdarta vd., 2018).

Tablo 2.2, immobilize edilmiş bir biyokatalizörün kullanımıyla ilgili hem yaygın avantajları hem de dezavantajları göstermektedir.

Tablo 2.2. Enzim immobilizasyonunun avantaj ve dezavantajları

Avantajlar	Dezavantajlar
Daha geniş çalışma koşulları aralığında (sıcaklık, pH gibi) gelişmiş stabilite	Enzim aktivitesinin kaybı
Enzimin tekrar kullanılabilirliği	Taşıyıcı ve ek hazırlık malzemeleri maliyeti

Enzimin üründen kolay ayrılması

Zahmetli ve zaman alıcı immobilizasyon süreçleri

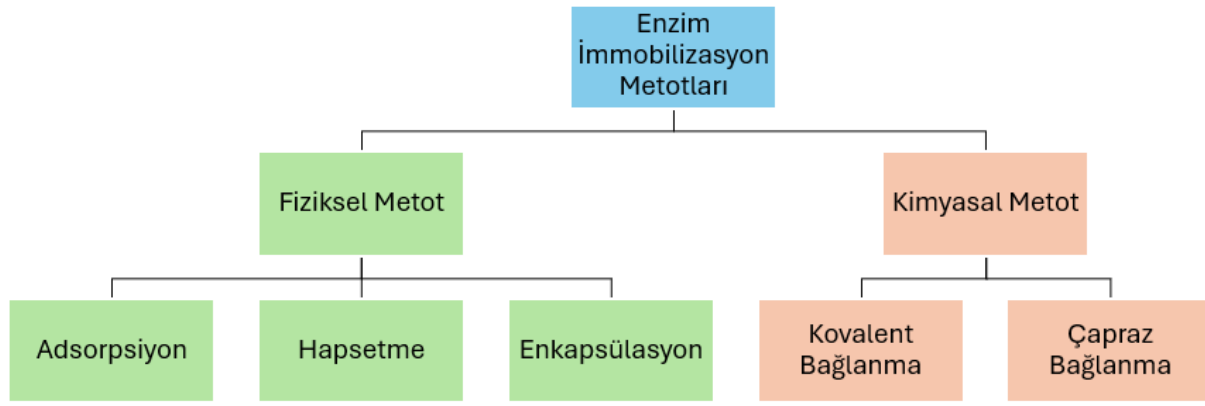
Sürekli proseslerde kullanım özelliği

Kütle transfer sınırlamaları

Bir enzimin immobilizasyon sırasında, immobilizasyon yönteminin seçimine bağlı olarak kimyasal ve fiziksel özelliklerinde değişiklikler meydana geleceğini bilmek önemlidir. Evrensel bir enzim immobilizasyon yöntemi yoktur. Optimal immobilizasyon yöntemi enzime, substrata ve istenen işleme bağlıdır (A. Sheldon & Pelt, 2013; Datta vd., 2013; Garcia-Galan vd., 2011; Hanefeld vd., 2009; Liese & Hilterhaus, 2013; Sheldon, 2007).

İmmobilizasyon tekniği, enzimlerin hızlı inaktivasyon ve düşük geri kazanım oranı gibi dezavantajlarını en aza indirmek için kullanılır (A. A. Homaei vd., 2013). İmmobilizasyon, enzimi stabilize ederek sistemin kararlılığını ve saf ürünler üretme yeteneğini artırabilir. Ayrıca, biyokatalizörün ayrılmasını ve geri kazanımını sağlayarak depolama kararlılığını iyileştirebilir ve çevresel yükü azaltabilir, böylece işletme giderlerini önemli ölçüde düşürebilir (Coşkun vd., 2021; Zaitsev vd., 2019).

Enzimler, immobilizasyon yöntemine bağlı olarak kimyasal veya fiziksel özelliklerini değiştirir. Fiziksel değişiklikler, enzim adsorpsiyon, kapsülleme ve hapsedme teknikleriyle immobilize edildiğinde meydana gelirken, kimyasal değişiklikler desteğe bağlanma ve çapraz bağlama teknikleri uygulandığında meydana gelir (Şekil 2.11) (Nicoletti vd., 2015; Sigurdardóttir vd., 2018). Bir enzim immobilizasyon stratejisi seçerken dikkate alınması gereken birkaç husus vardır. Bunlar arasında enzimin kimyasal ve fiziksel ortama toleransı, enzimin boyutu, protein/pI yükü, protein üzerindeki yüzey fonksiyonel grupları, proteinin polaritesi (hidrofobik/hidrofilik bölgeler) ve substrat/ürün taşıma ihtiyaçları yer alır (Milosavić vd., 2017).



Şekil 2.11. Enzim immobilizasyon metotları

İmmobilize bir enzim sisteminin temel bileşenleri enzim, matris/destek materyali ve bağlanma biçimidir (Mohamad vd., 2015). Proteinler, farklı özelliklere sahip amino asitlere sahiptir. Bu amino asitlerin yan zincirlerindeki fonksiyonel gruplar, çeşitli bağlantı ve etkileşim türleri aracılığıyla desteğe bağlanmada rol oynayabilir.

Enzimlerin endüstriyel prosesler için biyokatalizör olarak sahip olduğu muazzam potansiyelin bir sonucu olarak, kimyasal proseslere dayanan çok çeşitli endüstrilerde katalitik aktivitelerini ve ömürlerini iyileştirmeyi amaçlayan bir alan ortaya çıkmıştır. Enzimleri stabilize etme arayışında, malzemelerle birleşmeleri önemli fırsatlar sunmaktadır. Daha spesifik olarak, enzimlerin katı malzeme arayüzlerine immobilizasyonu, enzimlere dikkate değer ve benzersiz avantajlar sağlayacaktır. İmmobilizasyon yalnızca termal özelliklerini artırmakla kalmaz, aynı zamanda geri dönüştürülebilirlik veya yeniden kullanılabilirlik potansiyeli de sağlar ve enzim agregasyonunu engeller (Carballares vd., 2022; Goldhahn vd., 2019; C. Lee vd., 2017; C. H. Lee vd., 2020; Skoronski vd., 2014; Yushkova vd., 2019). Termodinamik açıdan immobilizasyon, stabilize edici etkileşimler yoluyla enzimlerin katlanmış halinin enerjisini önemli ölçüde değiştirebilir, enzim açılımını etkili bir şekilde yavaşlatabilir ve hatta yeniden katlanmayı teşvik ederek sonuçta operasyonel ömrünün artmasını sağlar (Chaparro Sosa vd., 2018; C. Lee vd., 2017; Rueda vd., 2015; Weltz vd., 2019). Ek olarak, bazı immobilizasyon biçimleri kinetik yönleri de destekler, çünkü immobilizasyon enzim-substrat etkileşimlerini önemli ölçüde değiştirebilir ve sonuç olarak substratın enzimlerin aktif bölgesine ulaşılabilirliğini artırarak katalitik hızları yükseltir (Bailey & Cho, 1983; Mathesh vd., 2016; X. Sun vd., 2018). İmmobilizasyonun faydaları, enzim biyokatalizörlerinin kararlılığı veya kinetiğiyle ilgili hususların ötesine geçer. Örneğin, enzim immobilizasyonunun endüstriyel biyoproseslerin optimizasyonu üzerinde önemli etkileri vardır. Genellikle enzimler çözelti

içinde çalışır ve istenen üründen akış aşağısında ayrılma gerektirirler. Bu da üretim süreçlerine karmaşıklık katmanları ekler. Enzimlerin immobilizasyonu, katı bir arayüze immobilize edildikleri için bu sorunu etkili bir şekilde çözer. Böylece enzim reaksiyon ürünleri daha kolay ayrılır, atıkları azaltır ve daha akıcı bir ürün geri kazanımı sağlar (Bolivar vd., 2019; Hickey vd., 2007). Özetle, enzim immobilizasyonu, enzim biyokatalizini endüstriyel sürekli üretime getirmeye ilgili çok sayıda zorluğun üstesinden gelmek için önemli fırsatlar sunar.

2.1.5.1. Enzim İmmobilizasyon Teknikleri

I. Fiziksel Yöntemler

Enzimlerin çeşitli matrislere bağlanması, Van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağı gibi fiziksel kuvvetler aracılığıyla gerçekleşir. Bu süreç, fizikokimyasal parametrelerin kontrol edilmesiyle geri dönüşümlüdür (Guisan, 2016).

a) Adsorpsiyon

Fiziksel adsorpsiyon yönteminde enzim ve taşıyıcı arasındaki etkileşim, enzimin aktivitesini önemli ölçüde etkilemeyen kimyasal bağlanmaya kıyasla genellikle zayıftır. Bu nedenle, immobilize edilmiş enzimin doğal yapısını ve işlevini koruması, kimyasal immobilizasyona kıyasla nispeten yüksektir (Jesionowski vd., 2014; Nguyen & Kim, 2017). Adsorpsiyon, karmaşık kimyasal işlem veya ilgili enzimde modifikasyon gerektirmeyen en basit fiziksel immobilizasyon yöntemidir (Şekil 2.12). Tersinir immobilizasyon için basit tekniklerden biri olan adsorpsiyon yöntemi, enzimlerin destek malzemesine fiziksel olarak bağlanması veya yapışmasıdır. Adsorpsiyon, Van der Waals, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları gibi zayıf, spesifik olmayan kuvvetler aracılığıyla gerçekleşebilir. Hidrofobik etkileşimler, enzimleri destek yüzeyine bağlamak için kullanılır. Etkileşimlerin gücü hem desteğin hem de proteinin hidrofobisitesine bağlıdır ve hidrofobik fonksiyonel ajanın boyutu ve desteğin fonksiyonellik derecesi tarafından düzenlenir. Enzim ve destek arasındaki hidrofobik etkileşimlerin daha fazla modülasyonu, enzim immobilizasyonu sırasında pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonunun ayarlanmasıyla sağlanır (Mohamad vd., 2015). Fiziksel adsorpsiyon, farklı enzim türleri ve farklı destek türleri ile çalışır. Bu nedenle bu yaklaşım belirli uygulama ihtiyaçlarına göre ayarlanabilir ve optimize edilebilir. Enzimler, tersinir immobilizasyonla yumuşak koşullar altında destek malzemesinden uzaklaştırılabilir. Fiziksel adsorpsiyonla immobilizasyon ve ayırma işlemi genellikle basittir ve karmaşık adımlar veya özel ekipman gerektirmez. Bu da immobilize edilmiş enzimin maliyetini düşürür ve işlemi

kolaylaştırır. Bu yöntemin avantajı, immobilizasyon işleminin geri dönüşümlü olması, dolayısıyla reaksiyondan sonra desteğin geri kazanılabilmesidir. Destek malzemesinin pahalı olması durumunda destek malzemesine yeni enzim yüklenebildiği için bu yöntem oldukça cazip olabilir. Bu nedenle immobilizasyon desteği, immobilize edilmiş katalizörlerin toplam maliyetinde genellikle birincil faktördür (Mohamad vd., 2015).



Şekil 2.12. Adsorpsiyon metodu

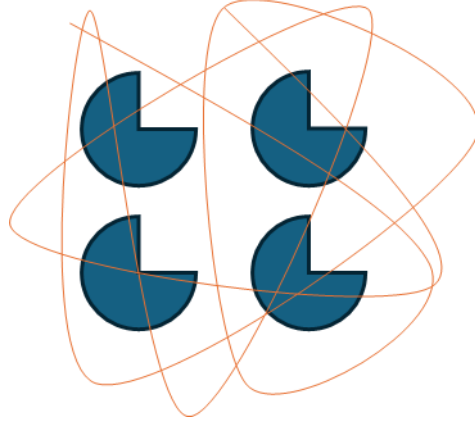
Enzimlerin fiziksel adsorpsiyonla immobilizasyonunun birçok avantajı olmasına rağmen, bazı dezavantajları ve sınırlamaları da vardır. Fiziksel adsorpsiyon, diğer immobilizasyon yöntemlerine göre daha az kararlı olabilir ve özellikle adsorpsiyon veya katalitik bir reaksiyon sırasında oluşabilecek olumsuz koşullar altında, sızıntı yoluyla (kısmi) enzim kaybına neden olabilir. Normalde, nispeten hafif reaksiyon koşulları altında orta derecede kararlı enzimleri immobilize etmek için fiziksel adsorpsiyon seçilir. Bu enzimler ile taşıyıcı arasındaki nispeten zayıf etkileşimler, kullanım sırasında veya belirli ortamlarda enzim elüsyonuna/sızmasına neden olarak aktivite kaybına yol açabilir (Datta vd., 2013; A. A. Homaei vd., 2013; Jesionowski vd., 2014; Zdarta vd., 2018). Daha kararlı enzimler veya zorlu reaksiyon koşulları gerektiren uygulamalar için fiziksel adsorpsiyon en iyi seçenek olmayabilir.

b) Hapsetme / Tuzaklama

Hapsetme yönteminde, enzim malzeme ağında tutulurken substratların ve ürünlerin geçmesine izin verilir. Bu da enzim sızıntısını azaltır ve stabiliteyi artırarak enzimatik reaksiyonların gerçekleşmesini sağlar. Enzim ve destekleyici taşıyıcı arasında kovalent bağların bulunmaması nedeniyle, hapsedilen enzimin konformasyonundaki değişim nispeten düşüktür ve bu da nispeten yüksek katalitik aktiviteye (kovalent bağlamaya kıyasla) yol açar. Bu immobilizasyon yöntemi genellikle yüksek bir immobilizasyon oranına sahiptir ve çeşitli hedef enzimlerin birlikte immobilizasyonu için kullanılabilir.

Bununla birlikte, yüksek difüzyon bariyerleri makromoleküler substratların ağdan geçmesini engelleyebilir. Bu nedenle, bu yöntem yalnızca moleküler boyutu gözenek boyutundan küçük olan substratlar ve ürünler için geçerlidir. Bu durum, hapsetme tekniğinin

temel sınırlamasıdır. Bir diğer dezavantajı ise, katalitik reaksiyon hızlı gerçekleşirse, biriken reaksiyon ürünlerinin gözenekli malzemelerin genellikle yapışkan olan matris/iskelesinden reaksiyon ortamına salınmasının zor olmasıdır. Dolayısıyla reaksiyon hızının düşmesine ve hatta katı desteklerin yırtılmasına neden olmasıdır (Q. Li, 2023).

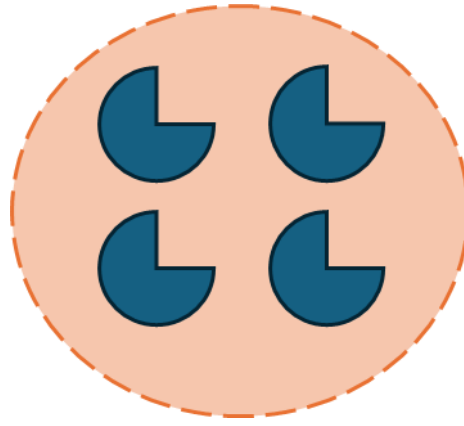


Şekil 2.13. Hapsetme metodu

c) Enkapsülasyon / Mikrokapsülleme

Kapsülleme, hem enzimlerin hem de hücrelerin çözeltilerde süspansiyon halinde tutulması bakımından hapsedilme metoduna benzemektedir ancak kontrollü bir ortamda gerçekleşir (Şekil 2.14). Kapsülleme tekniği, özellikle hassas enzimler ve hücreler için tasarlanmıştır ve onları gözenekli zarlara sahip küçük veziküller içinde hapseder (Guisan vd., 2020). Son zamanlarda, tiramin-aljinat boncuklarına kapsüllenmiş yaban turpu peroksidazı, atık su arıtımında fenol bozunumu için kullanılmıştır. Dört döngüden sonra, immobilize edilmiş yaban turpu peroksidazı %60'ın üzerinde aktiviteyi korumuş ve fenol giderme verimliliği %96 olarak bildirilmiştir (Pantić vd., 2021). α -Laktalbumin nanotüpleri, lipaz immobilizasyonu için taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Bu türev, çözünür lipazlara kıyasla %50 daha fazla serbest yağ asidi salmıştır. Düşük yağlı peynirlerde, bu nanotüpler, aynı yağ içeriğine sahip normal peynirlere kıyasla serbest yağ asitlerinin salınımını iki katına çıkararak düşük yağlı peynirin lezzetini artırmıştır (Guan vd., 2021). Bununla birlikte, bu teknik bazı kısıtlamalarla birlikte gelir. Başlıca sorunlardan biri, özellikle şiddetli olabilen ve reaksiyon ürünleri çok hızlı bir şekilde birikirse membran yırtılmasına neden olabilen difüzyon problemidir (Rother & Nidetzky, 2014).

Mikrokapsülleme, enzimler kontrollü gözenekliliğe (1–100 µm) sahip küresel, yarı geçirgen polimer membranlar içine yerleştirilerek immobilize edilir (Rother & Nidetzky, 2014). Yarı geçirgen membranlar, bileşenlerine bağlı olarak kalıcı veya kalıcı olmayan membranlar olabilir. Kalıcı olmayan membranlar sıvı yüzey aktif maddeden, kalıcı membranlar ise selüloz nitrat ve polistiren yüzey aktif maddeden yapılır. Bu membranlar ayrıca boyaların, ilaçların ve diğer kimyasalların kapsüllemesinde de kullanılır. Kapsülleme yoluyla immobilize edilen enzimler son derece geniş yüzey alanlarına sahiptir ve bu sayede daha yüksek katalitik verimliliğe sahiptirler. Bununla birlikte, yüksek enzim konsantrasyonuna rağmen enzimin ara sıra inaktivasyonuna dair birçok rapor mevcuttur (Dwevedi, 2016).



Şekil 2.14. Enkapsülasyon metodu

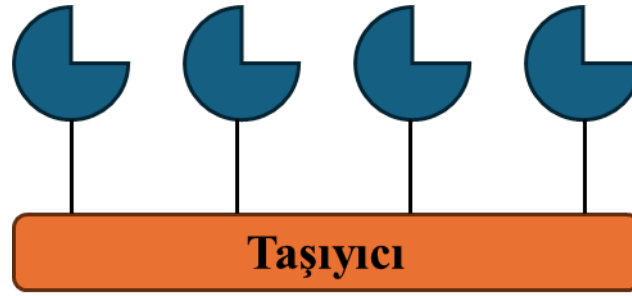
II. Kimyasal Yöntemler

Bu, enzimlerin kovalent bağlar kullanarak farklı matrislere bağlanmasını içerir ve işlem geri döndürülemezdir. Kovalent bağlanma ve çapraz bağlanma teknikleri kimyasal yöntemlerdir.

a) Kovalent Bağlanma

Proteinleri immobilize etmenin en popüler yollarından biri olan kovalent bağlanma yöntemi, bir enzimin yüzeyindeki amino asit kalıntılarını taşıyıcının belirli fonksiyonel gruplarıyla kovalent bağlar aracılığıyla bağlayarak kararlı bir immobilizasyon stratejisi olan geleneksel bir enzim immobilizasyon yöntemidir (Şekil 2.15) (Datta vd., 2013; Wong vd., 2009). Bu yöntemin avantajı enzim ve matris arasında oluşan bağların kararlı yapısı sayesinde enzimin kullanım sırasında çözeltiye salınmamasıdır. Ancak, katalitik aktivite için gerekli amino asit kalıntılarının, yüksek düzeyde bağlı aktivite üretmek için desteğe kovalent

bağlanmada yer almaması gerekir. Bu koşulun karşılanması bazı durumlarda zor olabilir (Guisan, 2016). Bağlanma reaksiyonunun koşulları enzimatik aktivite kaybını önlemeli ve enzimin aktif bölgesi kullanılan reaktiflerden etkilenmemelidir. Enzimlerin desteklere kovalent bağlanması, arginin, aspartik asit, histidin gibi yan zincir amino asitleri ve imidazol, indol, fenolik hidroksil gibi farklı fonksiyonel gruplara dayanan reaktivite derecesi nedeniyle gerçekleşir (Datta vd., 2013).



Şekil 2.15. Kovalent bağlama metodu

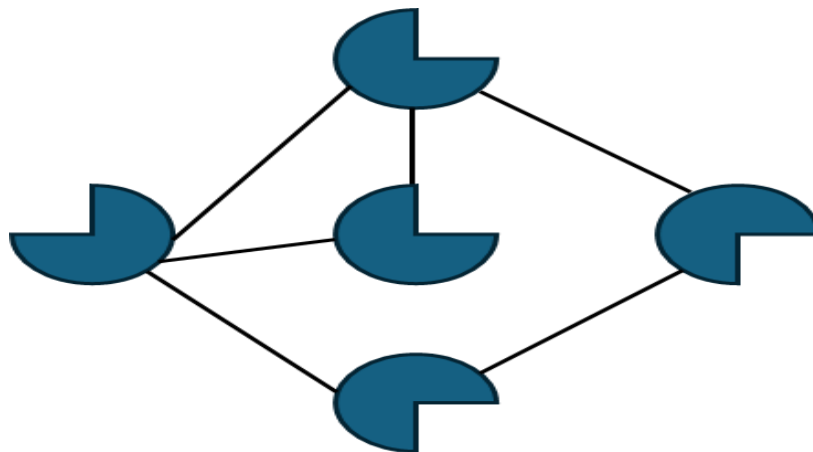
Kovalent olarak immobilize edilmiş enzimin aktivitesi, destek malzemesinin boyutuna ve şekline, bağlayıcı ajanın türüne, destek malzemesinin bileşimine ve immobilizasyon koşullarına bağlıdır. Enzim ve destek arasındaki kovalent bağlanma için, enzim bağlanmasının yönü, stabilitesini belirleyen kritik bir konudur (Mohamad vd., 2015). En yüksek enzim aktivite seviyesi, aktif merkezdeki amino asitler destekle bağlanmada yer almadığında elde edilebilir. Immobilizasyon iki şekilde yapılabilir: İlk olarak, aktive edici ajan herhangi bir değişiklik yapılmadan desteğe eklenebilir veya destek materyali aktive edilmiş gruplar oluşturmak üzere fonksiyonelleştirilebilir. Her iki durumda da, destek üzerinde oluşturulan elektrofilik gruplar protein üzerindeki güçlü nükleofillerle reaksiyona girecektir (Mohamad vd., 2015). Glutaraldehit (GA), en sık kullanılan aktive edici ajandır (Abaházi vd., 2016; Barbosa vd., 2012). Proteinlerin birincil amino gruplarını modifiye edebilir ve ayrıca çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) üretmek için kullanılan etkili bir çapraz bağlayıcıdır (A. Sheldon & Pelt, 2013; Brady & Jordaan, 2009). Konsantre glutaraldehit sulu çözeltileri (%25 veya %50) kolayca temin edilebilir ve ucuzdur (Zucca & Sanjust, 2014). Oluşan bağ genellikle geri döndürülemezdir. Aktivasyon derecesinin yarı-kantitatif bir değerlendirmesi, desteğin sarıya (düşük aktivasyon), turuncuya (orta) ve kırmızımsı kahverengiye (güçlü) renk değişiminin gözlemlenmesiyle tahmin edilebilir. Ardından, aktive edilmiş destek pH 6.0–8.0'de protein bağlanması için hazırdır (Zucca & Sanjust, 2014). Bu yöntemin avantajı, destek ve enzim

arasına uzun bir moleküler aralayıcı kolun yerleştirilmesi ve sterik sınırlama sorunlarının en aza indirilmesidir.

Kovalent yöntemdeki bağ genellikle güçlüdür ve adsorpsiyon yöntemine kıyasla neredeyse hiç enzim sızması olmamaktadır. Bu yöntem daha karardır ve immobilize edilmiş enzimin kararlılığını ve dayanıklılığını önemli ölçüde artırabilir. Bu da genellikle gelişmiş termostabiliteyle sonuçlanır. Temel sınırlama, taşıyıcı aktivasyon ve immobilizasyon prosedürünün nispeten karmaşık olmasıdır. Ayrıca, bir enzimi kimyasal olarak modifiye etmek için kararlı enzimler gerekir. Son olarak, reaksiyonun gerçekleşmesi için gereken ortamın sert olması enzim konformasyonel değişikliklerine ve aktivite kaybına neden olabilir (Wong vd., 2009).

b) Çapraz Bağlama

Çapraz bağlama, destek gerektirmeyen geri döndürülemez bir enzim immobilizasyon yöntemidir. Bu nedenle yönteme taşıyıcısız immobilizasyon adı verilir (Şekil 2.16). 1960'ların başlarında, katı faz protein kimyası üzerine yapılan çalışmalar, çözülmüş enzimlerin glutaraldehit (GA) gibi iki veya çok işlevli bir çapraz bağlayıcı ajan aracılığıyla yüzey NH₂ gruplarının reaksiyonu yoluyla çapraz bağlanmasının, çözünmeyen çapraz bağlı enzimler (CLE) ile sonuçlandığının keşfine yol açmıştır (Sheldon vd., 2005). GA, komşu enzim moleküllerinin yüzeyindeki lizin kalıntılarının serbest amino gruplarının reaksiyonu yoluyla proteinleri çapraz bağlamak için kullanılmış ve moleküller arası ve molekül içi aldol kondensasyonları ile sonuçlanmıştır.



Şekil 2.16. Çapraz bağlama metodu

Çapraz bağlı enzim agregatlarının hazırlanması, nispeten basit ve ucuz bir alternatiftir. Proteinlerin sulu çözeltilerine tuzların, suda çözünebilen organik çözücülerin veya iyonik

olmayan polimerlerin eklenmesinin, bunların kovalent olmayan bağlarla bir arada tutulan fiziksel agregatlar olarak çökmesine yol açtığı iyi bilinmektedir. Bu çökeltiye su eklenmesi, enzimin çözünmesine neden olur (Sheldon, 2011; Talekar vd., 2014). Buna karşılık, bu fiziksel agregatların çapraz bağlanması, önceden organize olmuş üst yapılarını ve dolayısıyla katalitik aktivitelerini korurken onları kalıcı olarak çözünmez hale getirecektir. Bu, çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) adı verilen yeni bir immobilize enzim sınıfının geliştirilmesine yol açmaktadır (Sheldon, 2011; Talekar vd., 2014). CLEA'ların genel hazırlanması, amonyum sülfat, aseton, etanol veya t-bütanol gibi bir çöktürme reaktifi kullanıldığında belirli çözünür enzimlerin agregasyonu yoluyla gerçekleştirilir. Bunu, enzim agregatlarının, çoğunlukla glutaraldehit olmak üzere bir çapraz bağlayıcı ajanla, üçüncül yapılarını bozmadan, yani denatürasyon olmadan kopolimerizasyonu izler. Amonyum sülfat veya polietilen glikol ilavesiyle sulu ortamdan çöktürme genellikle enzim saflaştırması için kullanıldığından, CLEA yöntemi temel olarak saflaştırma ve immobilizasyonu, yüksek derecede saf bir enzim gerektirmeyen tek bir birim işlemden birleştirir.

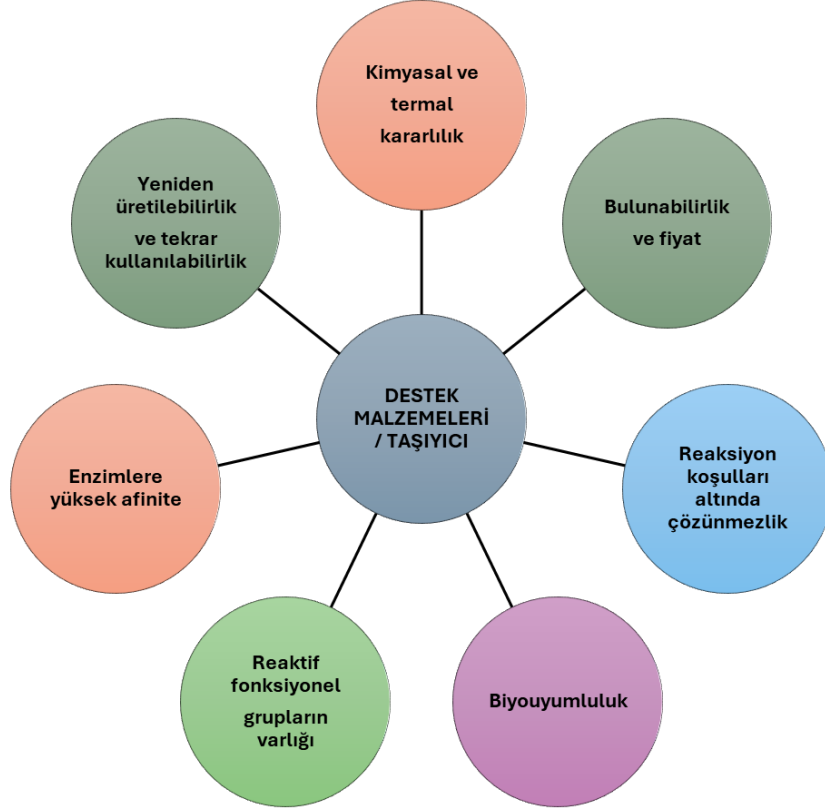
CLEA'lar, sulu ortamda immobilize edilmiş biyokatalizörün sızmasına karşı gelişmiş operasyonel kararlılık, yeniden kullanılabilirlik ve olağanüstü direnç sunarken, katalitik aktiviteyi potansiyel olarak azaltabilecek substrat difüzyon sınırlamalarından etkilenmezler. Bazı durumlarda, CLEA'ların karşılık gelen serbest enzimlerden daha yüksek katalitik aktivitelere sahip olduğu gösterilmiş ve hiperaktivasyon olarak bilinen bu olgu, enzimin önceden organize edilmiş bir üçüncül yapıda toplanmasına bağlanmıştır (Sheldon, 2007). Bu nedenle, CLEA'lar yüksek katalitik verimlilik ve ucuz immobilizasyon yöntemleri nedeniyle endüstriyel ölçekli proseslerde uygulama için büyük bir potansiyel göstermiştir.

Bu yöntemin dezavantajı, CLEA'ların endüstriyel uygulamaların ölçeklendirilmesi için çok yumuşak malzeme olarak kabul edilmesidir. Küçük CLEA'lar, santrifüjleme ve filtrasyon işlemleri sırasında kümeler oluşturabilir. Bu da CLEA'ların çözeltide tekrar dağılmasını engelleyerek düşük katalitik verimliliğe yol açabilir (Cui vd., 2015; Talekar vd., 2014). CLEA'ların endüstriyel uygulamalarındaki bu dezavantajlar göz önüne alındığında, yenilikçi bir yaklaşım gereklidir.

2.1.5.2. Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Destek Malzemeleri

İmmobilizasyon için malzeme seçimi, immobilize edilmiş enzimlerin özelliklerini etkilemektedir. Bu da biyokatalizörün tüm endüstriyel uygulanabilirliğini etkiler (C Rodrigues vd., 2015; Cosimo vd., 2013). İdeal bir destek, hidrofilisite, biyouyumluluk, mikrobiyal saldırıya ve fiziksel basınca karşı direnç gösterir ve düşük maliyetlidir (Mohamad vd., 2015; Sirisha vd., 2016; Zucca & Sanjust, 2014). İmmobilizasyondan sonra inert olmalı ve istenen reaksiyonu engellememelidir (Şekil 2.17). Morfolojik ve fiziksel özelliklerdeki farklılıklar, destek doğrudan enzimle temas ettiğinden enzim immobilizasyonunu ve katalitik özelliklerini etkileyebilir. Destek, birim ağırlık başına önemli miktarda enzim yükleyebilmelidir. Bu nedenle, gözeneklilik faydalı bir özellik olabilir, ancak gözeneklerin çapı uygun bir aralıkta kalmalıdır (ortalama protein çapından daha geniş). Daha küçük gözenekler enzimi dışarıda bırakırken büyük gözenekler ise yüzey alanında önemli bir düşüşe neden olur. Her iki durumda da yükleme kapasitesi olumsuz etkilenir. Yüksek yüzey alanı ve uygun parçacık boyutu da dikkate alınmalıdır (Sirisha vd., 2016).

Enzim immobilizasyonu, bir enzimin fiziksel (fiziksel adsorpsiyon) veya kimyasal (kimyasal adsorpsiyon) etkileşimler yoluyla katı bir arayüze fiziksel olarak immobilize edilmesi işlemidir. Enzimleri stabilize etmeye yönelik geleneksel yaklaşımlar, büyük ölçüde biyolojik olarak türetilmiş ve sentetik olmak üzere farklı yapıdaki malzemelerle birleştirilmesini gerektirmiştir. Destek malzemesinin/taşıyıcının kimyasal ve termal olarak kararlı olması, kolay bulunabilir olması, fiyatının uygun olması, reaksiyon koşulları altında çözünmez olması, biyouyumlu olması, fonksiyonel gruplara sahip olması, enzimlere yüksek afinite göstermesi, yeniden üretilebilir olması ve tekrar kullanılabilir olması gibi özelliklere sahip olması beklenmektedir (Zdarta vd., 2018).



Şekil 2.17. Enzim immobilizasyonu için kullanılan destek malzemelerinin ana özellikleri

III. Enzim İmmobilizasyonu İçin Geleneksel Destek Malzemeleri

a) İnorganik Malzemeler

Silika, zengin bir tarihe sahip enzim immobilizasyonu için en çok araştırılan geleneksel malzemedir (Popat vd., 2011; Tu vd., 2016). 1950'li ve 1960'lı yıllarda, selüloz, jelatin ve agar gibi doğal malzemelerde enzimler immobilize edildi (A. A. Homaei vd., 2013; Ouyang vd., 2020). Ancak, bu malzemelerin performansları sınırlıdır ve endüstriyel uygulamalar için yeterli değildir. Araştırmaların derinleşmesiyle inorganik taşıyıcılar dikkat çekmeye başladı. Kimyasal kararlılığı ve gözenekli yapısı nedeniyle dikkat çeken silika, enzim immobilizasyonu için destek malzemelerinden biri olarak kullanılır. Fiziksel adsorpsiyon, kovalent immobilizasyon ve hapsetme dahil olmak üzere silika yüzeylerde enzimleri immobilize etmek için çeşitli yöntemler araştırılmıştır (Hartmann & Kostrov, 2013; Popat vd., 2011; Tu vd., 2016). Her yöntemin avantajları ve dezavantajları vardır. Nanoteknoloji ve malzeme biliminin gelişmesiyle birlikte, mezogözenekli ve nano-silika gibi yeni silika malzemeleri de geliştirilmekte ve enzim immobilizasyonunda uygulanmaktadır. Bu yeni malzemeler daha geniş bir yüzey alanına ve geliştirilmiş gözenek yapısına sahiptir, bu da daha kararlı bir immobilizasyon ortamı sağlayabilir. Silika sentez teknolojisi yüksek bir olgunluk seviyesine ulaşmıştır. Hem morfolojik

hem de yapısal özellikleri kontrol edilebilir. Gözenek boyutunu kontrol etmek, belirli enzimlerin boyutunu eşleştirmek, fonksiyonel grupları ayarlamak ve yüksek yüzey alanlarına ulaşmak silika malzemelerin kontrol edilebilir özellikleri arasındadır (Hyde vd., 2016). Stober yöntemi, silika nanopartikül sentezine yönelik klasik yaklaşımdır. Etanol çözeltisinde, amonyak kataliziyle, siloksan öncülleri tetraetoksi silan (TEOS) ile yoğunlaşma yoluyla monodispers silika mikroküreler üretmiştir (İbrahim vd., 2010; Stöber vd., 1968). Stober yönteminin temel avantajı, geniş bir boyut aralığında (50 ila 2000 nm) monodispers küresel silika nanopartikülleri üretme kapasitesinde yatmaktadır. Ters misel veya su-yağ mikroemülsiyon sistemleri, su, yağ ve yüzey aktif madde moleküllerinin homojen bir karışımından oluşur (Yao vd., 2008). Tek fazlı mikroemülsiyon sistemleri izotropik ve termodinamik olarak kararlıdır. Su nanodamları, dökme yağ fazı içinde ortaya çıkar ve daha sonra nanoreaktör içinde farklı parçacıklar üretmek için sınırlı bir ortam görevi görür. Silika bazlı enzim immobilizasyonu çeşitli alanlarda yaygın olarak uygulanır. Silika üzerinde immobilize edilen enzimler biyosensörlerde, gıda endüstrisinde, biyokatalizde, kanalizasyon arıtımında ve tıpta kullanılabilir (Carlsson vd., 2014). Bai ve arkadaşları, glikoz oksidazı bir altın nanopartikül/silika kompleksi modifiye edilmiş altın elektroda bağlayarak bir glikoz biyosensörü oluşturdu (Bai vd., 2007). Glikoz oksidasyonunun katalizi döngüsel voltametri (CV) ile izlenebilir. Gonzalez-Delgado ve arkadaşları, prebiyotik fonksiyonel gıdalar olarak galaktooligosakkaritler üretmek için gliksil modifiye silika üzerinde β -galaktozidazı immobilize ettiler (González-Delgado vd., 2018). Aynı reaksiyon koşulları altında, serbest enzimle karşılaştırıldığında enzim aktivitesi artar ve galaktooligosakkarit üretimi artar. Song ve arkadaşları, atık sudaki levofloksasin ve rifaksimisin antibiyotiklerinin parçalanmasında etkili olan kloroperoksidazı dendritik silika parçacıklarına hapsedtiler (Song vd., 2019). Bu kompleks ısı ve organik çözücüler altında kararlıdır. Genel olarak, silikanın enzim immobilizasyonu için taşıyıcı malzeme olarak kullanımı ilk keşiflerden günümüze kadar malzeme geliştirme ve inovasyon aşamasına kadar ilerlemiştir. Teknoloji gelişmeye devam ettikçe, silika üzerine immobilize edilmiş enzimlerin uygulanması kapsamını genişletmeye ve biyomühendislik, tıp, gıda işleme ve çevre koruma alanlarında önemli bir rol oynamaya devam edecektir. Silikanın yanı sıra, titanyum (L. Wu vd., 2016), alüminyum (Z. Chen vd., 2014) ve zirkonyum oksitler (Reshmi vd., 2007) dahil olmak üzere çeşitli diğer metal oksitler de enzim immobilizasyonunda uygulama alanı bulmuştur. Metal oksitler, kimyasal stabilite, yüksek mekanik mukavemet, iyi yüksek sıcaklık toleransı sunar ve çeşitli koşullar altında inert kalır. Bu özellikler, aşırı ortamlarda bile enzim yapısının ve işlevselliğinin

korunmasını sağlar. Özellikle, bu malzemelerdeki hidroksil gruplarının bolluğu, onları oldukça hidrofilik hale getirerek enzim bağlantı kararlılığını önemli ölçüde artırır.

b) Polimerler

Enzimleri polimerler üzerinde immobilize etmenin tarihi, insanların biyopolimerler üzerinde enzimleri immobilize etmenin yollarını keşfetmeye başladığı 1950'lere kadar uzanır (Dwevedi, 2016; A. A. Homaei vd., 2013; Intisar vd., 2023). Bu süreçte aljinat (Weng vd., 2022), kitosan (Biró vd., 2008) ve agaroz (Weng vd., 2022) dahil olmak üzere çok çeşitli biyopolimerler yer alır. Organizmalardan veya doğal kaynaklardan elde edilen biyopolimerler, biyolojik sistemlerle dikkate değer bir uyumluluk gösterir ve bağışıklık tepkileri veya toksisiteyle ilgili endişeleri tetikleme olasılığını önemli ölçüde azaltır. Vücutta veya çevrede parçalanabilirler. Böylece kirliliğin ve çevresel streslerin azaltılmasına katkıda bulunurlar. Biyopolimerlerin yüzeyi genellikle enzim immobilizasyonunu ve enzim aktivitesinin modülasyonunu kolaylaştırmak için kimyasal olarak değiştirilebilen hidroksil, amin ve karbonil gibi çeşitli fonksiyonel gruplara sahiptir. Ayrıca, doğal kaynaklardan elde edilebilir veya sentezlenebilirler. Bu da hazırlanmalarını nispeten uygun maliyetli hale getirir. Ancak bazı biyopolimerler belirli koşullar altında kararsız olabilir. Bu nedenler immobilizasyondan sonra enzim aktivitesinin kaybına veya azalmasına neden olabilir (Vasudevan vd., 2024). Bu sınırlamalara rağmen, biyopolimerler çok sayıda enzim immobilizasyon uygulamasında kritik öneme sahip olmaya devam etmektedir. Devam eden araştırmalar, bu zorlukları ele almayı ve enzim immobilizasyonu alanındaki kullanımlarını artırmayı amaçlamaktadır. Sentetik polimerler, monomer moleküllerinin polimerizasyon reaksiyonları yoluyla birbirine bağlanmasıyla oluşan uzun zincirli moleküllerdir. Monomerlerin türü ve sayısı, polimerin kimyasal yapısını ve özelliklerini belirler. Polimerlerin çözünürlüğü, gözenekliliği, stabilitesi ve mekanik özellikleri, farklı enzimlerin özelliklerine ve uygulama senaryolarına uyum sağlayacak şekilde monomerlerin hassas ayarlanmasıyla ayarlanabilir (Hamid vd., 2022; Rodriguez-Abetxuko vd., 2020). Polimerler, fonksiyonel grup açısından zengindir. Polimer üzerindeki fonksiyonel gruplar çoğunlukla karbonil, karboksil, hidroksil, epoksi, amin ve diol gruplarını içerir. Polimerlerin hidrofilikliği, enzim ile enzim arasındaki bağın polar adsorpsiyon mu yoksa hidrofobik etkileşim mi olduğunu belirleyen bu fonksiyonel grupların türü ve sayısı tarafından belirlenir (Cantone vd., 2013). Bazı sentetik polimerler yüksek kimyasal ve fiziksel kararlılığa sahiptir ve çeşitli koşullar altında enzim aktivitesini koruyabilir. Ayrıca, bazı sentetik polimerler yüksek mekanik mukavemete sahip olduğundan, yüksek kesme kuvvetlerine direnç

gerektiren uygulamalar için uygundur. Ancak sentetik polimerlerin, enzim immobilizasyon taşıyıcıları olarak yüksek maliyetleri ve karmaşık hazırlama süreçleri gibi sınırlamaları da vardır. Bu nedenle, bir enzim immobilizasyon taşıyıcısı olarak sentetik bir polimer seçerken, avantajlarını ve dezavantajlarını ve ayrıca belirli uygulama gereksinimlerini kapsamlı bir şekilde değerlendirmek gerekir.

c) Yapay Olmayan Malzemeler

Yapay olmayan malzemelerin temel gücü, doğal bolluklarında, kolay elde edilmelerinde ve güçlü biyouyumluluklarında yatmaktadır. Karmaşık bir işleme gerek kalmadan kolayca kullanılabilirler ve bu sayede uygun maliyetli bir çözüm sunarlar. Taşıyıcı olarak enzim immobilizasyonu için uygun yapay olmayan malzemeler öncelikle mineralleri ve belirli karbon malzemelerini kapsar. Bu amaçla kullanılan mineraller arasında bentonit, halloysit, kaolinit, montmorillonit ve sepiyolit gibi çeşitli kil malzemeleri bulunur (An vd., 2015; Sanjay & Sugunan, 2008). Bu malzemeler, çok çeşitli gözenek sayıları, boyutları ve hacimleri sergiler ve bu da enzim immobilizasyonu için zengin bir karbon yüzeyi sağlar. Yüzeylerinde çok sayıda fonksiyonel grup bulunduğundan, enzim immobilizasyonunu destekleyen güçlü adsorpsiyon özelliklerine sahiptirler.

IV. Enzim İmmobilizasyonu için Yeni Destek Malzemeleri

Bilim ve teknoloji gelişmeye devam ettikçe, çeşitli alanlar giderek artan bir şekilde enzim immobilizasyonu için yeni malzemelere odaklanmaktadır. Bu artan ilgi, bu alandaki araştırmaların gelişmesine yol açmış ve mevcut enzim immobilize malzeme kütüphanesini önemli ölçüde zenginleştirmiştir. Taşıyıcı ve enzim arasındaki afinitenin yanı sıra enzimin aktivitesi, kararlılığı, yeniden kullanılabilirliği ve geri dönüştürülebilirliği de çeşitli faktörlerden etkilenir. Bu faktörler arasında taşıyıcı malzemede bulunan aktif gruplar, oluşturdukları mikro ortam ve taşıyıcının genel şekli yer alır. Enzim immobilizasyonunun geniş yelpazedeki hedeflerini karşılamak için çeşitli malzemeler mevcuttur. Bu bölüm, nanomalzemeler, karbon nanotüpler, grafen, polimer membran ve manyetik malzemeler dahil olmak üzere temsili sınır organik ve inorganik seçeneklere odaklanacaktır.

a) Metal Nanomalzemeler

Metal nanomalzemeler, 1 ila 100 nanometre arasında değişen boyutlarda nanoskalada metalik özelliklere sahip malzemelerdir. Metal nanomalzemeler, nanoskala ve yüzey etkilerinden kaynaklanan çok sayıda ayırt edici özelliğe sahiptir (Huang vd., 2015). Metal

nanopartiküllerin optik özellikleri, boyutları, şekilleri ve elementleriyle yakından ilişkilidir. Metal nanopartiküller, belirli dalga boylarında güçlü emilim ve saçılmaya neden olan Yüzeysel Plazmon Rezonansı etkileri gösterir (Huang vd., 2015; Jain vd., 2007). Örneğin, 20 nm altın nanopartiküllerinin (AuNP'ler) rengi kırmızımsı iken, 100 nm altıninkisi mavidir (Njoki vd., 2007). Metal nanomalzemeler, eşdeğer kütleyle sahip makroskobik malzemelerle karşılaştırıldığında daha büyük bir özgül yüzey alanına sahiptir. Bu özellik, metal nanopartiküllerin daha reaktif bölgelere sahip olmasını sağlar ve sonuç olarak katalitik aktivitelerini ve adsorpsiyon kapasitelerini artırır (N. Sharma vd., 2015; Yetter vd., 2009). Hem Pandey hem de Lan, altın nanopartiküllerinin elektron transferine yardımcı olabileceğini ve böylece elektron transferiyle ilişkili glikoz oksidaz aktivitesini iyileştirebileceğini kanıtlamıştır (Lan vd., 2008; Pandey vd., 2007). Yüksek özgül yüzey ve boyut etkisi nedeniyle, bazı metal nanopartiküller üstün katalitik performans sergiler. Çeşitli kimyasal reaksiyonları kolaylaştırmak için katalizör olarak kullanılabilirler. Örneğin, platin nanopartikülleri Horseradish peroksidaz (HRP) benzeri katalitik özelliklere sahiptir (Ma vd., 2011; Y. Wang vd., 2014). Zhang ve arkadaşları, pankreas kanseri biyobelirteci tespiti için biyosensörler oluşturmak üzere taşıyıcı olarak platin nanopartikülleri (PtNP'ler) modifiye edilmiş AuNP'leri kullandılar (Zhang vd., 2021). PtNP'ler burada ayrıca platin nanometrelerin peroksidasyon reaksiyonuyla üretilen renkli maddeleri katalize ederek biyosensörlerin hassasiyetini artırdı. Bu özel özellikler nedeniyle, metal nanopartiküller terapötik alanda, biyoteknolojide ve ayrıca gen ve ilaç dağıtımında geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. Altın nanopartikülleri, büyük özgül yüzey alanları, iyi termal ve mekanik kararlılıkları, kolay fonksiyonelleştirilmeleri ve iyi biyouyumlulukları nedeniyle enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan metal nanomalzemelerdir (Golchin vd., 2018; Zeng vd., 2011). Altın nanomalzemelerin sentetik yöntemleri arasında sitrat indirgeme yöntemi, iki fazlı indirgeme yöntemi ve tohum aracılı büyüme yöntemi bulunur (Herizchi vd., 2016). Sadece küresel altın nanopartikülleri değil, aynı zamanda diğer altın nanomalzeme morfolojileri de sentezlenmiş ve enzimlerin immobilizasyonunda uygulanmıştır. Örneğin, Homaei ve arkadaşları, α -amilazın termostabilitesini altın nanoçubuklar üzerinde immobilize ederek arttırmıştır (A. Homaei & Saberi, 2015). Enzim, yalın halde veya fonksiyonelleştirilmiş altın nanoçubuklar üzerinde kemisorpsiyon, fiziksel adsorpsiyon, çapraz bağlama veya kovalent bağ yoluyla immobilize edilmiştir. Altın nanopartiküllerine ek olarak, metal nanomalzemeler gümüş (H. Wei vd., 2008), bakır (N. Kumar & Upadhyay, 2020), ve platin (Liu vd., 2013) gibi diğer metaller de olabilir.

Bunlar küre, çubuk, levha ve çok yüzlü gibi farklı şekillere sahip olabilir ve sentetik yöntemlerle ayarlanabilir (Demir, 2021).

b) Karbon Bazlı Nanomalzemeler

Karbon bazlı nanomalzeme, esas olarak karbon nanotüpler ve grafeni içeren nanoskaladaki karbon elementlerini ifade eden bir malzeme türüdür. Karbon nanotüpler, tek katmanlı ve çok katmanlı karbon nanotüpleri içerir. Karbon nanotüpler genellikle ark deşarj yöntemi, kimyasal buhar biriktirme yöntemi ve lazer buharlaştırma yöntemi kullanılarak sentezlenir (Dai, 2002; Prasek vd., 2011). Ancak, bu yaklaşımlar genellikle yüksek safsızlık içeren karbon nanotüpler üretir. Bu sorunu çözmek için, safsızlığı gidermek amacıyla nanotüpler oksidasyon için güçlü asitlerle işlenir. Aynı zamanda, güçlü asit oksidasyonu karbon nanotüplere karboksil ve hidroksil grupları gibi fonksiyonel gruplar kazandırır. Bu da karbon nanotüp yüzeyinin hidrofobitesini değiştirir, çözücüde agregasyonlarını önler ve dağılılıklarını ve çözünürlüklerini artırır (Rai vd., 2006). Bu nedenle, konsantre asit oksidasyonu karbon nanotüpler için en çok kullanılan modifikasyondur. Karbon nanotüpler mükemmel kimyasal kararlılığa, yüksek mekanik mukavemete, büyük tokluğa, iyi elektriksel iletkenliğe ve iyi biyouyumluluğa sahiptir ve en çok bildirilen nanotaşıyıcı malzemeler haline gelmiştir. Grafen, tek bir karbon atomu katmanının iki boyutlu bir petek yapısı halinde düzenlendiği bir malzemedir ve karbon nanomalzemeler ailesinin bir üyesidir. Bilinen en ince, en güçlü ve son derece iletken malzemelerden biridir (Adeel vd., 2018). Grafendeki karbon atomlarının düzenlenmesi, yüksek elektriksel iletkenlik, yüksek termal iletkenlik, mükemmel mekanik mukavemet ve mükemmel optik özellikler dahil olmak üzere birçok özel özellik kazandırır. Bu özelliklerden dolayı, enzimleri grafen üzerinde immobilize etmek, enzimlerin kararlılığını ve aktivitesini artırabilir ve böylece biyosensör, kataliz ve biyomedikal uygulamalar gibi alanlarda önemli bir rol oynar.

c) Seramik malzemeler

Seramik nanomalzemeler, yüksek sıcaklıkta sinterleme yöntemleriyle sentezlenen bir metal olmayan inorganik malzeme sınıfıdır (Kujawa vd., 2021; Mulinari vd., 2020). Yüksek sıcaklık ve basınca karşı olağanüstü direnç göstermenin yanı sıra organik çözücülere, alkalilere ve asidik kimyasallara karşı iyi bir tolerans gösterirler. Bu özellikler, onları yüksek sıcaklık ve güçlü asit-baz koşulları altında reaksiyonları katalize edebilen immobilize enzimlerin endüstriyel uygulamalarına destek olarak kullanılmak üzere umut verici malzemeler haline

getirir. Alümina, zirkonyum, titanyum, silika, demir oksit ve kalsiyum fosfat gibi seramik malzemeler biyomoleküler taşıyıcı olarak kullanılmıştır (Mulinari vd., 2020).

d) Manyetik Nanopartiküller

Neel'in 1950'lerde manyetik nanopartiküllerin (MNP) manyetik davranışları üzerine yaptığı çığır açıcı çalışmanın ardından, özellikle 20. yüzyılın başlarından itibaren manyetoaktif nano yapılar araştırma ve teknoloji için temel malzemeler haline gelmiştir (Martins vd., 2021). Manyetik nanopartiküller çoğunlukla çeşitli şekillere ve yaklaşık 1 ila ~500 nm çapında demir oksit partikülleridir (Pálovics vd., 2020). Süperparamagnetik demir oksidin iki ana formu manyetit (Fe_3O_4) ve oksitlenmiş hali maghemittir ($\gamma-Fe_2O_3$). Farklı sentetik koşullar altında elde edilen manyetit nanopartikülleri, manyetik özellikleri açısından büyük farklılıklar gösterebilir. Bu farklılıklar yapısal düzensizlikteki değişikliklere atfedilir (Gupta & Gupta, 2005). Özel özellikleri nedeniyle yaygın ilgi uyandırmış ve birçok alanda çeşitli şekillerde uygulanmıştır. MNP'ler, manyetik polarizasyon ve hareketlilik özellikleri nedeniyle biyolojik ve biyokimyasal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (S. Sharma vd., 2018). Manyetik nanopartiküller, moleküler ve hücre görüntüleme için manyetik rezonans görüntüleme kontrast maddeleri olarak *in vivo* kullanılmıştır (Teja & Koh, 2009). Bu tür Fe_3O_4 nanopartiküllerini sentezlemek için bugüne kadar katı, sıvı ve gaz faz reaksiyonlarını kullanan yöntemler geliştirilmiştir. Sentez teknikleri arasında, su sisteminde demir ve ferrik hidroksitlerin birlikte çöktürülmesi, sürecin basitliği ve nispeten düşük çevresel etkisi nedeniyle faydalıdır (Iwasaki vd., 2012).

MNP yüzeyinin modifikasyonu, hangi kaplama malzemesinin kullanıldığına ve bu malzemelerin manyetik çekirdek yüzeyine nasıl bağlandığına bağlı olarak MNP'nin biyomedikal uygulamadaki performansını ve dolayısıyla manyetik özelliklerini önemli ölçüde değiştirebilir (Umut, 2013). Manyetik sistemlerin performansı, manyetik kuvvet, Stokesdrag ve difüzyon hareketleriyle ilişkili bir manyetik alan altındaki MNP'ye bağlıdır (F. Li vd., 2015). Nanopartiküllerin manyetik yetenekleri ve düşük toksisiteleri, enzim immobilizasyonuna odaklanarak biyoteknolojinin birçok disiplinde kullanımına dikkat çekmiştir. Geniş yüzey alanı, düşük kütle transfer direnci ve reaksiyon karışımından enzim ekstraksiyonunun kolaylığı, bu malzemelerin enzim immobilizasyonu için kullanılan geleneksel desteklere göre bazı avantajlarıdır (Matveeva & Bronstein, 2021; W. Wei & Wang, 2018). Parçacığın sınır yüzeyindeki kütle transfer direnci, heterojen kataliz ve çok seyreltilmiş çözeltilerden sorpsiyon dahil olmak üzere çeşitli uygulamalarda önemlidir. Çünkü sıklıkla tüm

reaksiyon hızını kısıtlayabilir (Reichert vd., 2004). Bu nedenle, bu tür sistemlerde kütle transferini hızlandırmak oldukça önemlidir. MNP'nin kolay manyetik geri kazanımı nedeniyle çok daha fazla kullanım alanı araştırılmaktadır (Decsi vd., 2019; Ender vd., 2016; Weiser vd., 2015).

MNP'nin yüzey modifikasyonunun dört ana amacı vardır:

- 1- MNP'nin dispersiyonunu iyileştirmek veya değiştirmek.
- 2- MNP'nin yüzey aktivitesini iyileştirmek.
- 3- MNP'nin fizikokimyasal ve mekanik özelliklerini artırmak.
- 4- MNP'nin biyouyumluluğunu iyileştirmek. (Matveeva & Bronstein, 2021)

Manyetik nanopartiküller (MNP'ler), manyetik özelliklere sahip nanometre boyutundaki partikülleri ifade eder. MNP'ler, demir, manganez, kobalt ve bunların oksitleri gibi metaller ve oksit bileşikleri tarafından sentezlenir (Kudr vd., 2017; Majidi vd., 2016). Tek bir malzemedan oluşan bir nanopartikül veya birden fazla malzemedan oluşan bir kompozit nanopartikül olabilir. MNP'lerin en yaygın sentetik yöntemi solvotermal yöntemdir (Majidi vd., 2016; J. Wang vd., 2009; Xu vd., 2014). Yüksek sıcaklık ve yüksek basınç altında, metal tuzları organik veya inorganik çözücülerde çözülür ve nanopartiküller indirgeme reaksiyonları yoluyla üretilir. Bu yöntemde MNP'lerin boyutu ve şekli kontrol edilebilir. MNP'leri sentezlemenin bir diğer yolu da, metal oksit nanopartiküller üretmek için yüksek sıcaklık koşulları altında metal organik bileşiklerini parçalayan termal ayrıştırma yöntemidir. Bu yöntem genellikle daha küçük nanopartiküller üretmek için kullanılır. Bu iki yönteme ek olarak, MNP'ler eş çöktürme, elektrokimya, mikroemülsiyon ve manyetik sıvı faz çöktürmesiyle de hazırlanabilir. MNP'ler, geniş yüzey alanları ve yüzeyde bol miktarda bulunan hidroksil gruplarıyla bilinirler. Bu da enzimlere güçlü kovalent bağlanma sağlayacak şekilde kolayca modifiye edilmelerini sağlar. En büyük avantajlarından biri, immobilize edilmiş enzimin manyetik kuvvetlerle hızla ayrılabilmesidir.

2.2. Literatür Özeti

Meyve suyu berraklaştırılmasında enzimlerin kullanımı ilk olarak 1930'ların başlarında Almanya ve ABD'de tanıtılmıştır (Neubeck, 1959). Enzimatik destekli berraklaştırma, enzim konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve sıcaklık dahil olmak üzere birçok faktörden etkilenir (Tapre & Jain, 2014). Pektinazlar pektini hidrolize eder ve protein-pektin komplekslerini dağıtırlar (Baumann, 1981). Elde edilen meyve suyu, çok daha düşük bir pektin seviyesine ve

düşük viskoziteye sahiptir. Bu da sonraki filtrasyonu kolaylaştırır. Pektinazların uygulanması, meyve suyu berraklığını ve verimini arttırmanın yanı sıra meyve suyunun besin değerini, rengini ve aromasını da korur. Geleneksel berraklaştırma yöntemleri, pektinazların pektin hidrolizine ve amilazlarla nişasta hidrolizine dayanmaktadır. Jelatin, bentonit veya silikasol gibi berraklaştırıcı maddeler, tortuları veya bulanıklığa neden olan aktif bileşenlerin fiziksel ve kimyasal çökmesi sağlar (Cerreti, Markošová, vd., 2017; Mirsaeedghazi vd., 2010; Rinaldi vd., 2013). Pektin giderme işlemleri, bulut parçacıklarının agregasyonunu oluşturmak ve viskoz-çözünür pektini parçalamaktan oluşur. Pektin, asidik ortamlarda negatif yüke sahiptir ve askıda bulunan proteinlerin etrafında bir kaplama oluşturarak birbirlerini itmelerine neden olur. Pektinazlar, pektin zincirini parçalayarak pozitif yüklü proteinleri açığa çıkarır. Bulut parçacıkları arasındaki elektrostatik itme azalır, böylece bir araya toplanırlar (Sorrivas vd., 2006). Berraklaştırılmış meyve suyu hazırlanmasında, selüloz, hemiselüloz ve pektinaz, viskoziteyi azaltmada ve filtrelenebilirliği arttırmada etkilidir (Tapre & Jain, 2014). Pektinazlar, elma meyve suyunun berraklaştırılmasında viskozitede %35'lik düşüşle (Girard & Fukumoto, 1999; Mondor vd., 2000) ananas meyve suyunda (Carneiro vd., 2002), mandalina meyve suyunda (Chamchong & Noomhorm, 1991) ve ayrıca şeftali erik armut ve kayısı meyve suyunda ultrafiltrasyon ondan önce iyileştirmeler sağlanmıştır (Ramadan, 2019).

Clarex-L konsantresi kullanıldığında guava meyve suyunun viskozitesinde önemli bir azalma (yaklaşık %63) olduğu bildirilmiştir (Brasil vd., 1995). Ayrıca, Pectinex Smash XXL uygulandığında enzim konsantrasyonunun, sıcaklığın ve inkübasyon süresinin havuç meyve suyunun viskozitesini (%41 azalma) etkilediği belirtildi (Y. Sun vd., 2006). Enzimatik işlemin ananas suyu berraklığı, verimi ve viskozitesi üzerindeki etkisi incelemiş ve optimize edilmiş enzimatik işlem koşulları, inkübasyon süresi (446 dakika), inkübasyon sıcaklığı (47°C) ve enzim konsantrasyonu (0,14 ml/50 g posa) olarak belirlenmiştir (A. Kumar & Sharma, 2012). Enzimler polisakkaritleri parçalayarak bulanıklık, viskozite ve absorbans değerlerinde azalmaya, buna karşılık meyve suyu verimi, toplam çözülmüş katı madde (TSS) ve parlaklıkta artışa neden olmuştur. Farklı sıcaklıklarda (10°C ila 85°C) ve TSS içeriğinde (10°brix - 55°brix) enzimatik olarak berraklaştırılmış *Achras sapota* meyve suyunun reolojik özelliklerini, su aktivitesine (0,865 - 0,986) karşılık gelen bir değerde incelenmiştir (Deshmukh vd., 2015). TSS içeriğinin enzimatik olarak berraklaştırılmış özsuynun viskozitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. *Achras sapota* meyve suyu, ikinci dereceden üstel tipte bir ilişki bulundu ($r > 0,99$). Enzimatik olarak berraklaştırılmış *Achras sapota* meyve suyu, viskozite (η) değerlerinin sıcaklık ve konsantrasyona bağlı olarak 4,34 ile 56,41 mPa arasında değiştiği bir Newton tipi

sıvı gibi davrandı. Toplam çözünmüş katı madde (TSS) içeriğinin akış aktivasyon enerjisi üzerindeki etkisi üstel bir ilişki ($r > 0,95$) ve su aktivitesinin etkisi ise üslü bir ilişki ($r > 0,99$) kullanılarak tanımlandı. Enzimatik olarak berraklaştırılmış *A. sapota* meyve suyunun viskozitesi üzerindeki TSS içeriği/su aktivitesi ve sıcaklığın birleşik etkisini temsil eden bir denklem oluşturuldu.

Narın meyve suyuna dönüştürülmesinin geleneksel yöntemi zaman alıcıdır ve yıkama, presleme, berraklaştırma, pastörizasyon ve filtrasyon dahil olmak üzere çeşitli adımlar gerektirir (Cerreti, Liburdi, vd., 2017). Berraklaştırma, nar meyve suyu işleminde, meyve suyunun bulanıklığına neden olan maddeleri engellemek ve meyve suyunun depolanması sırasında bulanıklık oluşumunu (pus oluşumu olarak bilinir) önlemek için temel bir adımdır. Bu partiküllerin uzaklaştırılması, berraklığı ve renk stabilitesini iyileştiren endüstriyel bir sorundur. Meyve suyu endüstrisi, tüketici ilgisinin meyve suyu kalitesi ve görünümüne bağlı olması nedeniyle bu sorunları çözmek için çeşitli teknikler geliştirmiştir. Pektinolitik ve/veya proteolitik berraklaştırmanın nar meyve suyundaki aktif maddelerden kaynaklanan bulanıklık ve pus üzerindeki etkilerini test etmiştir. Proteaz ve pektinaz uygulamasının sinerjik bir etkisi olduğu ve meyve suyu bulanıklığı ve potansiyel pus oluşumu açısından çok iyi sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Cerreti vd., 2016). Pektin enzimleri ve proteolitik enzimlerle yapılan enzimatik işlemler protein, pektin ve fenolik madde miktarlarını değiştirmese de bulanıklık oluşturan moleküllerin bulanıklık oluşturma aktivitesini etkiledi. Ayrıca, bu tür enzimatik işlemler, portakal suyu rengini ve antosiyanin seviyelerini etkilemedi. Pektin esterazların bulunduğu portakal suyunda, pektinler kısmen metillenmiştir. Bu tür portakal suyu için genellikle poligalakturonazlar kullanılır. Portakal suyu ekstraksiyonu sırasında, portakal suyu viskozitesini azaltmak için posa yıkamasının sonunda pektinazlar eklenebilir. Bu, yüksek portakal suyu verimi, daha iyi TSS ekstraksiyonu ve daha düşük viskoziteye yol açar. Pektinazlar, bulanıklık stabilitesini koruyan çözünmeyen pektine saldırmadan portakal suyu viskozitesini azaltır (Ramadan, 2019).

Meyve sularındaki bulanıklığı azaltmak ve üretim verimini artırmak için pektinaz, lakkaz, ksilanaz, poli-galakturonaz, β -glukozidaz ve pektin metilesteraz dahil olmak üzere çeşitli enzimler araştırılmıştır. Serbest ve immobilize enzimleri karşılaştıran birçok çalışma, bulanıklık ve viskozitede önemli azalmalar göstermiştir (Magro vd., 2019; Zimmermann vd., 2024). Bu iyileştirmeler, immobilize enzimlerin artan stabilitesine bağlanabilir; bu da düşük pH seviyeleri gibi meyve suyuna özgü zorlu koşullar altında daha iyi katalitik performansa yol açar.

Bulanıklık ve viskozitedeki azalmalara ek olarak, daha önce yürütülen bir çalışmada portakal suyu berraklaştırması için kitosan-pektinaz veya silika-pektinaz immobilizasyon sistemleri kullanıldığında, meyve sularındaki toplam çözünür katı madde içeriğinde, indirgeyici şeker içeriğinde ve pH değerlerinde nispeten küçük değişiklikler gözlemlenmiştir (da Silva vd., 2023). Ayrıca, optimize edilmiş berraklaştırma işleminin, istenen canlı ve parlak sarı görünümü koruyarak, bulanıklığın azalması nedeniyle portakal suyunun rengini önemli ölçüde iyileştirdiğini fark etmişlerdir. Literatürde meyve suyu berraklaştırması için proteazlar da araştırılmıştır. Yavaşer ve Karagozler, polifenoller ve bulanıklığı aktif hale getiren proteinler arasındaki etkileşimleri önlemek için immobilize edilmiş proteaz kullanarak tek aşamalı bir berraklaştırma işlemi geliştirmiştir (Yavaşer & Karagözler, 2020). Jelatin ve silika, polifenol-protein kompleks oluşumunu engellemek için yaygın olarak kullanılırken, bu malzemelerin polifenol seviyelerini düşürme, uzun çalışma süreleri gerektirme ve yoğun filtrasyon işlemlerini içermeye gibi dezavantajları vardır. Ancak Yavaşer ve Karagozler, tek aşamalı berraklaştırma süreçleriyle toplam fenolik içeriğinde sadece %8,2'lik bir azalma gözlemlenildi (Yavaşer & Karagözler, 2020). Başka bir çalışmada, işlevselleştirilmiş kitosan boncukları üzerinde hem proteaz hem de pektinaz içeren çoklu enzimatik bir immobilizasyon sistemi geliştirildi ve nar suyu berraklaştırması için uygulandı. Sistem, 21 gün sonra sırasıyla %49 ve %70 oranında anlık ve potansiyel bulanıklık azalmasına neden oldu. Bulanıklığı artıran moleküllerdeki önemli azalmaya ek olarak, enzimatik olarak işlenmiş sular, zaman içinde işlenmemiş suya kıyasla antosiyanin yapısını daha iyi korudu (Benucci vd., 2019). Naringinaz gibi immobilize edilmiş enzimler, meyve sularının acılığını azaltmak için de kullanıldı ve diğer biyoaktif bileşiklerin seviyelerini korurken acılığı etkili bir şekilde azaltmada klasik reçine işlemine göre üstün olduğu kanıtlandı (Gupta vd., 2021; Magro vd., 2019; Zimmermann vd., 2024). Immobilize edilmiş naringinaz ve reçine kullanılarak pomelo suyunun acılığının giderilmesinin fizikokimyasal ve fitokimyasal özellikler üzerindeki etkisine ilişkin karşılaştırmalı bir çalışma yapıldı. Enzimle işlenmiş meyve suyu, reçineyle işlenmiş meyve suyuna kıyasla çözünür katı madde içeriği, asitlik, askorbik asit içeriği ve fenolik içeriği üzerinde daha az etki gösterirken, etkili bir acılık giderme etkisine de sahip olarak fizikokimyasal ve biyoaktif bileşiklerin daha yüksek yüzdelerini korudu (Gupta vd., 2021). Başka bir çalışmada da, hareketsizleştirilmiş naringinaz kullanılarak acı giderme sürecinde olumlu bir etki gözlemlenmiştir; bu çalışmada naringinin %73'ü polieter sülfon ultrafiltrasyon membranları üzerinde hareketsizleştirilmiş naringinaz tarafından hidrolize edilmiştir (González-Temiño vd., 2021).

Pektinaz enzimi, kitin, naylon, ipek, iyon değişim reğineleri, aljinat, poliakrilamid mikroküreler, silika jel, polietilen ve manyetik parçacıklar dahil olmak üzere çeşitli destekler üzerine farklı yöntemler kullanılarak immobilize edilmiştir. Bazı immobilize enzimlerin meyve suyu endüstrisindeki uygulamaları incelenmiştir (Adalberto vd., 2012; Lei & Jiang, 2011; Martín vd., 2019). Tablo 2.3, immobilize pektinaz enziminin çeşitli çalışmalarda uygulamalarını özetlemektedir. Fonksiyonelleştirilmiş poliakrilonitril (PAN) üzerine immobilize edilmiş ve paketlenmiş yataklı bir reaktöre yüklenmiş ticari bir pektinaz, elma suyundaki pektinin depolimerizasyonunda kullanılmıştır. Pektinaz immobilize sistemi, elma suyunun başarılı bir şekilde depektinasyonu için kullanılmıştır (Echavarría vd., 2011). Pektinazların polivinil alkole immobilizasyonu, meyve suyu gibi asidik bir ortamda iyi esneklik, iyi tekrar kullanılabilirlik ve üç ardışık döngüde %80 bulanıklık azalması sağlayan immobilize enzimi ortaya çıkardı (Cerreti, Markošová, vd., 2017). Ticari bir pektinaz, geri dönüştürülebilir polimer matrisine başarıyla immobilize edildi. İmmobilize ve serbest enzimlerin termal stabilitesi ortam sıcaklığında benzer olmasına rağmen, immobilize enzim, elma suyu berraklaştırması sırasında %5'ten daha az katalitik aktivite kaybıyla 10 kereden fazla geri dönüştürülebildi (Rajdeo vd., 2016). Pektinaz, makromoleküler çapraz bağlama ajanı olarak dekstran polialdehit kullanılarak kitosan manyetik nanopartiküllere immobilize edildi. Termal kinetik çalışmalara göre, immobilize pektinazın termal stabilitesi, serbest forma kıyasla iki katına çıktı. Pektinazın konformasyonel esnekliği immobilizasyon sonrasında korunmuş ve elma suyunda %74'e varan bir bulanıklık azalması gözlemlenmiştir (Sojitra vd., 2017). Başka bir çalışmada, pektinazın silika kaplı manyetit nanopartikül yüzeyine kovalent bağlanma yoluyla immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. İmmobilize pektinaz, serbest pektinaza kıyasla artırılmış enzim aktivitesi, pH ve sıcaklık değişimlerine karşı geliştirilmiş direnç ve artırılmış depolama stabilitesi sergilemiştir. Elma suyu viskozitesi hem serbest hem de immobilize enzimler tarafından azaltılmıştır. Bununla birlikte, immobilize enzim yalnızca altı ardışık döngüde yeniden kullanılabilmiş ve viskozitede yalnızca %8,16'lık bir azalma göstermiştir (Mosafa vd., 2014). Son zamanlarda, hücre dışı bir mantar ekzo-poligalakturonazın sodyum aljinata immobilizasyonu için adsorpsiyon immobilizasyon prosedürü gösterilmiş ve bu da termal direnç profilini önemli ölçüde iyileştirmiştir. İmmobilize enzim, 60 °C'de 1 saat ısıtıldıktan sonra orijinal aktivitesinin %90'ından fazlasını korurken, immobilize edilmemiş enzim bu koşullar altında devre dışı kalmaktadır (Amin vd., 2017a). İmmobilize enzim, yedi ardışık parti reaksiyonundan sonra bile %41 oranında kalıntı aktiviteyi korumuştur. Son olarak, farklı test edilen meyve sularında viskozite ve bulanıklık azalmasının yanı sıra berraklığın

artması, immobilize ekzo-poligalakturonazın gıda endüstrisinde büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (Amin vd., 2017a). Daha yakın zamanda, ticari bir enolojik pektinazın, bir tuzaklama tekniği kullanılarak çözünmeyen kalsiyum aljinat boncukları içine immobilize edilmesiyle toksik olmayan ve düşük maliyetli bir biyokatalizör geliştirilmiştir. Sabitleme prosedürü pektinaz aktivitesi için optimum pH ve sıcaklığı değiştirmese de, tuzaklanmış enzim, %40 kalıntı aktivite ile altı reaksiyon döngüsüne kadar katalitik aktivite göstermiştir; Islak ortamda hapsedilmiş enzim, 11 haftaya kadar orijinal aktivitesini korurken, liyofilize hidrojeller 8 aylık depolamadan sonra bile başlangıç aktivitesini korumuştur. Ayrıca, immobilize edilmiş pektinaz, 20 °C'de 120 dakika içinde üzüm suyunun bulanıklığını önemli ölçüde azaltmıştır (Martín vd., 2019). Meyve suyu berraklaştırması için formüle edilmiş pektinolitik ve selüloolitik enzimleri içeren ticari bir enzim kokteyli, glutaraldehit ile aktive edilmiş kitosan boncuklarına immobilize edilmiş ve sürekli paketlenmiş yataklı ve akışkan yataklı reaktörler de dahil olmak üzere iki farklı biyokatalitik reaktör sistemi kurmak için kullanılmıştır. Immobilize edilmiş enzim kokteyli, 90 °C ve pH 4,8'de başlangıç aktivitesinin %80'ini korurken, serbest enzim sadece %35'ini korumuştur. Hareketsizleştirilmiş biyokatalizörün berraklaştırma analizi, akışkan yataklı reaktörde yapıldığında daha berrak meyve suları elde edilmesini sağlamıştır (Magro vd., 2021). Grubumuz, triklorotriazin yoluyla polietilen glikol aşılınmış manyetik nanopartiküllere kovalent olarak hareketsizleştirilmesi yoluyla pektinazın gıda endüstrisinde kullanılmasını sağlayacak etkili bir strateji geliştirmiştir. Hareketsizleştirilmiş pektinaz, 10 geri dönüşümden sonra başlangıç aktivitesinin %55'ini ve 25 °C'de 125 gün depolamadan sonra %94'ünü koruyarak artırılmış katalitik aktivite, iyileştirilmiş operasyonel stabilite, mükemmel yeniden kullanılabilirlik ve depolama stabilitesi göstermiştir. Ayrıca, bu taktiğin meyve suyu ve gıda işleme endüstrilerindeki uygulanabilirliği, hareketsizleştirilmiş pektinaz ile işlenmiş ananas suyunda bulanıklığın %59'a kadar azaltılmasıyla gösterilmiştir (Kharazmi, Taheri-Kafrani, & Soozanipour, 2020).

Yürütülen başka bir çalışmada, 30-40 nm çapında ve amonyaklı silikon dioksit ile kaplanmış Fe₃O₄ manyetik nanoparçacıkları (MNP) ve pektinazın manyetik destek üzerine immobilizasyon süreciyle ilgili ana faktörler, çok faktörlü ortogonal deneylerle optimize edilmiş ve önerilen kombinasyon %3 glutaraldehit (bağlayıcı madde), pH = 8.0, 50 °C ve çapraz bağlama süresi 8 saat olarak belirlenmiştir (Fang vd., 2016). Pektinazın depolama stabilitesi ve yeniden kullanılabilirliği, immobilizasyon sayesinde artırılmıştır. 7 geri dönüşüm partisinden sonra toplam başlangıç aktivitesinin %64,4'ü geri kazanılmış ve 30 günlük depolama sonrasında

toplam aktivitenin yalnızca yaklaşık %21,1'i kaybolmuştur. İmmobilize pektinazın uygulaması için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 8.5 ve 55 °C olarak tespit edilmiştir.

Tablo 2.3. Pektinaz enziminin çeşitli destekler üzerine immobilizasyonunun operasyonel stabilite üzerine etkisi ve meyve suyunda uygulanması

Destek Malzemesi	Operasyonel Stabilite		Meyve Suyu Bulanıklık Testi	Kaynak
	Tekrar Kullanım Sayısı	Kalan Aktivite		
Manyetik nanopartikül (Fe ₃ O ₄)	15	%90	-	(Behram vd., 2023)
Manyetik nanopartikül (Fe ₃ O ₄)	7	%64,4	-	(Fang vd., 2016)
Kitosan manyetik nanopartikül	7	%85	Elma suyunda %74'lük bir azalma	(Sojitra vd., 2017)
Grafen oksit/kitosan kompoziti	10	%92	Guava suyunda %81'lik bir azalma	(Kamal vd., 2022)
Kitosan -Fe ₃ O ₄ mikro-parçacıkları	10	%57,11	Elma suyunda %75'lük bir azalma	(Nouri & Khodaiyan, 2020)
Sodyum aljinat	7	%50	Üzüm suyunda %71,10'lük bir azalma	(Amin vd., 2017a)
Manyetik nanopartikül (Fe ₃ O ₄)	10	%55	Ananas suyunda %59'lük bir azalma	(Kharazmi, Taheri-Kafrani, & Soozanipour, 2020)
Agaroz Boncuklar	10	%70	-	(Rehman vd., 2024)

Hidroksiapatit/ kalsiyum aljinat kompozit boncuklar	10	%40	-	(Qi vd., 2020)
---	----	-----	---	-------------------

Sojitra ve arkadaşlarının yürüttüğü bir çalışmada pektinaz, makromoleküler çapraz bağlama ajanı olarak dekstran polialdehit kullanılarak kitosan manyetik nanopartiküllere (CMNP'ler) immobilize edildi (Sojitra vd., 2017). İmmobilize pektinaz için yapılan termal kinetik çalışmalar, serbest forma kıyasla 55-75 °C aralığında iki kat daha yüksek termal stabilite gösterdi. İmmobilize pektinazın V_{max} ve K_m değerlerinin, doğal forma neredeyse eşit olduğu bulundu. İmmobilize pektinazın kalıntı aktivitesi, yedi ardışık yeniden kullanım döngüsünden sonra %85 iken, on beş günlük depolamada %89'a kadar kalıntı aktivitesini koruyarak mükemmel stabilite ve dayanıklılık sergiledi. Son olarak, manyetik pektinaz nanobiyokatalizörü, elma suyu berraklaştırmasında kullanıldı ve 150 dakikalık işlemde sonra bulanıklıkta %74'e varan bir azalma gösterdi.

Pektinaz, geri dönüşüm ve operasyonel kararlılık özelliklerini artırmak amacıyla başka bir çalışmada kovalent bağlama yoluyla grafen oksit/kitosan kompozitine (GO/CS) immobilize edildi (Kamal vd., 2022). GO/CS-pektinazın V_{max} ve K_m değerlerinin serbest pektinaza neredeyse eşit olduğu bulunmuştur. 10 ardışık reaksiyon döngüsünden sonra orijinal katalitik aktivitesinin yaklaşık %92'sini koruduğu bildirilmiştir. Son olarak, GO/CS-pektinaz, guava suyu berraklaştırmasında kullanıldı ve 75 dakikalık işlemde sonra bulanıklıkta %81'e varan bir azalma gösterdi.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Aspergillus niger'den elde edilen ticari pektinaz (3.2.1.15), pektin ve α -D-galakturonik asit TCI şirketinden alındı. Dinitrosalisik asit (DNS), Coomassie brilliant blue G-250, Amonyum çözültüsü (NH_3 , %25), Sodyum potasyum tartarat, Glutaraldehit (%25), Tetra-etil ortosilikat (TEOS), 3-amino propil tri-etoksi silan (APTES), Sığır serum albumin (BSA), Potasyum fosfat monobazik, Sodyum asetat, Asetik asit, Tris, demir(III) klorür heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), demir klorür tetrahidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ve sodyum asetat Merck şirketinden satın alındı.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Kullanılan Cihazlar	Marka	Kullanım Amacı
Hassas terazi	Radwag/AS 220	Kimyasal maddelerin ağırlığının ölçümü
Çalkalayıcı	Daihan Scientific/SHO-1D	Çözeltilerin hazırlanması
Isıticılı manyetik karıştırıcı	Daihan Scientific/MSH-20D	Çözeltilerin hazırlanması ve ısıtılması
Su banyosu	Nüve/BM 30	DNS yöntemi ile aktivite tayini
pH metre	Hanna Instruments	pH ölçümleri
Spektrofotometre	Thermoscientific/Genesys150	Aktivite tayini
Vorteks	Isolab	Karışımların homojenizasyonu
Etüv	Nüve/EN 120	İnkübasyon
Hassas otomatik pipet	Isolab	Hassas miktarda sıvı kullanımı
EDX özellikli taramalı elektron mikroskopu (SEM-EDX)	Zeiss / Supra 40 VP	Morfolojik özelliklerin belirlenmesi
Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi	Perkin Elmer / Spectrum 100	Fonksiyonel grupların belirlenmesi
Ultrasonik su banyosu	Nüve BM30	Çözelti homojenizasyonu
Santrifüj	Hermle / Z306	Karışımdan kaba partiküllerin uzaklaştırılması

3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

3.1.3.1. Tampon Hazırlama

pH 4 Tamponu (100 mM) Hazırlanması

0.82 g sodyum asetat 80 ml saf suda çözüldü. pH metre yardımı ile 1 N HCl kullanılarak pH 4'e ayarlandı. Son olarak hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

pH 5 Tamponu (100 mM) Hazırlanması

0.82 g sodyum asetat 80 ml saf suda çözüldü. pH metre yardımı ile 1 N HCl kullanılarak pH 5'e ayarlandı. Son olarak hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

pH 6 Tamponu (100 mM) Hazırlanması

1.36 g potasyum fosfat monobazik 80 ml saf suda çözüldü. pH metre yardımı ile 1 N NaOH kullanılarak pH 6'e ayarlandı. Son olarak hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

pH 7 Tamponu (100 mM) Hazırlanması

1.36 g potasyum fosfat monobazik 80 ml saf suda çözüldü. pH metre yardımı ile 1 N NaOH kullanılarak pH 7'e ayarlandı. Son olarak hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

pH 8 Tamponu (100 mM) Hazırlanması

1.21 g Tris 80 ml saf suda çözüldü. pH metre yardımı ile 1 N HCl kullanılarak pH 8'e ayarlandı. Son olarak hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

pH 9 Tamponu (100 mM) Hazırlanması

1.21 g Tris 80 ml saf suda çözüldü. pH metre yardımı ile 1 N HCl kullanılarak pH 9'e ayarlandı. Son olarak hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.2. DNS Reaktifi Hazırlanması

75 ml saf su içerisinde 1.6 g katı NaOH çözüldü. Sonra üzerine 1 g 3,5-dinitrosalisilik asit konuldu. Berrak bir sarı çözelti elde edilene kadar karıştırıldı. Ardından 30 g potasyum sodyum tartarat katıldı ve karıştırılmaya devam edildi. Son olarak hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Karışım kehribar rengi şişe içerisinde saklandı.

3.1.3.3. Bradford Reaktifi Hazırlanması

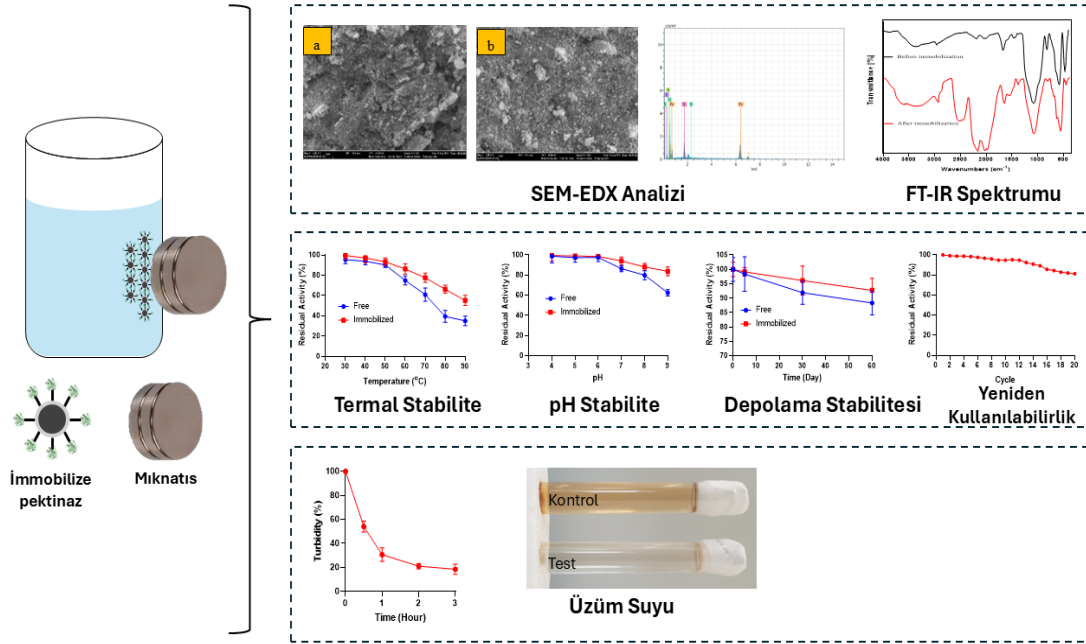
10 mg Comossie Blue Birillant, 5 mL etanol (%95)'de çözüldükten sonra 10 mL fosforik asit (%85) ilave edildi. Boya iyice çözüldükten sonra 85 mL saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.4. α -D Galakturonik Asit Çözeltisinin Hazırlanması

2 mg α -D galakturonik asit 2 ml saf su içerisinde çözünerek hazırlandı. Standart kalibrasyon eğrisi hazırlanmasında kullanıldı.

3.2. Yöntem

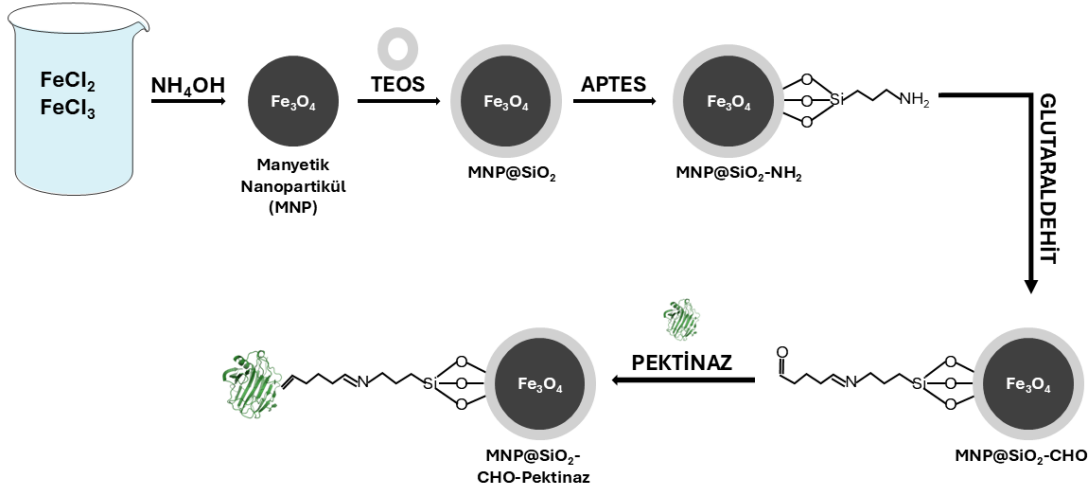
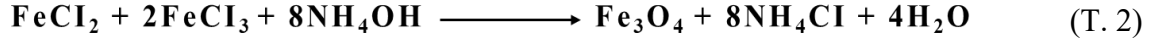
Çalışmanın içeriği hakkında genel bilgiler Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmanın içeriği hakkında genel bilgiler

3.2.1. Manyetik nanopartiküllerin (MNP) sentezi

Manyetik nanopartiküller (MNP), literatürde açıklanan geleneksel eş-çöktürme yönteminde bazı modifikasyonlar yapılarak sentezlendi (Başaran & Işık, 2025; Mariño vd., 2023; Rusu vd., 2022). 4 gram Fe(II) ve 10,82 gram Fe(III) 50 ml suda çözüldü (Molar oranı 1:2). MNP'leri (Fe_3O_4) çöktürmek için 25 ml amonyum hidroksit (NH_4OH , %25) solüsyonu damla damla eklenerek reaksiyon ortamı alkali hale getirildi ve karıştırıcıda 30 dakika karıştırıldı. Tepkime denklemi T. 2’de gösterilmiştir. Elde edilen MNP’ler (Fe_3O_4), güçlü neodyum mıknatıs ile tutuldu ve üsteki sıvı pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Ardından MNP’ler su ve etanol ile yıkandıktan sonra $50^\circ C$ ’de etüvde kurutuldu. Manyetik nanopartikül sentezi ve immobilizasyon süreci Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Manyetik nanopartikül sentezi ve immobilizasyon süreci

3.2.2. MNP'lerin fonksiyonelleştirilmesi

MNP'lerin yüzeylerini fonksiyonelleştirmek için daha önce açıklanan yöntemde bazı değişiklikler yapılarak yürütüldü (Başaran & Işık, 2025; Mariño vd., 2023; Rusu vd., 2022). 2 gram MNP, 150 ml etanol ve 50 ml distile su ile karıştırıldıktan sonra 30 dakika sonikasyon yapıldı. Daha sonra 15 ml amonyum hidroksit (NH_4OH , %25) karışımın üzerine yavaşça eklendi. Üzerine 3 ml tetra-etil ortosilikat (TEOS) damla damla eklendikten sonra tekrar 30 dakika sonikasyon yapıldı. Elde edilen silika kaplı MNP'ler etanol ve saf su ile yıkandıktan sonra mıknatis yardımıyla toplandı. Daha sonra silika kaplı MNP'ler üzerine 50 ml etanol eklenerek 30 dk sonikasyon yapıldı. Ardından 1 ml APTES eklendi ve 30 dakika daha sonikasyona devam edildi. Mıknatis yardımıyla MNP'ler ayrılarak etanol ve saf su ile yıkandı.

Fonksiyonelleştirilmiş MNP'ler, pektinaz immobilizasyonu için fosfat tamponunda (pH 7) oda sıcaklığında 3 saat boyunca sürekli çalkalanarak %2,5 glutaraldehit ile aktive edildi. Burada, MNP'lerin glutaraldehit ile aktivasyonu, destek malzemesi üzerine enzim (pektinaz)

moleküllerinin bağlanmasını kolaylaştırmaktadır. Bağlanmayan glutaraldehiti uzaklaştırmak için saf su ile yıkama yapıldı.

3.2.3. Pektinaz immobilizasyonu

Glutaraldehit ile aktive edilmiş 1 g MNP ve 5 mg/ml pektinaz tozu fosfat tamponunda (pH 6.0) +4°C'de bir gece boyunca bekletildi. Daha sonra MNP'ler, reaksiyon karışımından mıknatısla ayrıldı ve tampon ile yıkandıktan sonra kurutuldu.

İmmobilizasyon verimi Bradford yöntemi kullanılarak hesaplandı (Bradford, 1976). D. 7'deki eşitlik kullanılarak hesaplama gerçekleştirildi. Hesaplama, temel olarak immobilizasyon işlemi öncesindeki protein miktarı ile immobilizasyon sonrasında destek malzemesine/taşıyıcıya bağlanmayarak çözeltide kalan serbest protein miktarının karşılaştırılması ile yürütüldü. Bu işlem standart bovine serum albümin (BSA) kalibrasyon eğrisinin oluşturulması, başlangıç protein miktarının belirlenmesi, bağlanmamış (süpernatant) ve yıkama sonrası kalan protein miktarının belirlenmesi ile yapıldı.

$$Verim (\%) = \frac{[P_0 - (P_1 + P_2)]}{P_0} \times 100 \quad (D. 7)$$

Burada, P_0 başlangıçtaki protein miktarını, P_1 süpernatanttaki protein miktarını ve P_2 ise yıkama sonrası kalan protein miktarını temsil etmektedir.

3.2.4. Pektinaz aktivite analizi

Hem serbest hem de immobilize edilmiş pektinaz aktivitesi, spektrofotometrik olarak ölçülen DNS yöntemi ile belirlendi (Miller, 1959). Substrat olarak elma pektini (%1) çözeltisi kullanıldı. Bu yöntem, DNS ile enzim aktivitesi yoluyla açığa çıkan indirgeyici şekerler arasındaki reaksiyon sonrası renk değişimine dayanır. Enzim aktivitesi, 200 µl serbest enzim veya 5 mg immobilize enzim ve 300 µl substrat çözeltisi (%1) ile 20 dakika inkübe edildi ve 500 µl DNS reaktifi eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Karışım bir su banyosunda 10 dakika ısıtıldı ve ardından oda sıcaklığına soğutuldu. 540 nm'deki absorbans spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kalibrasyon eğrisi 0-500 µg/ml konsantrasyon aralığında, D-galakturonik asit kullanılarak oluşturuldu.

3.2.5. Karakterizasyon

İmmobilizasyon öncesi ve sonrası yüzey fonksiyonel grup dönüşümlerini moleküler düzeyde doğrulamak amacıyla Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) analizi gerçekleştirildi. Silika kaplama (SiO_2), aminosilanizasyon (APTES) ve glutaraldehit aktivasyonu gerçekleştirilen manyetik demir oksit (Fe_3O_4) nanopartiküllerin pektinaz immobilizasyonu öncesi ve sonrası FT-IR spektrumu, 400 ile 4000 cm^{-1} arasındaki dalga sayılarını kapsayan bir Perkin Elmer/Spectrum 100 spektrometresi kullanılarak elde edildi.

Sentezlenen taşıyıcı nanoyapının ve geliştirilen nanobiyokatalizörün yüzey morfolojileri, topografik değişimleri ve elementel kompozisyonları bir EDX cihazı ile donatılmış ZEISS/Supra 40 VP taramalı elektron mikroskobu (SEM-EDX) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.6. Optimum sıcaklık analizi

Pektinaz aktivitesindeki optimum sıcaklık, serbest pektinaz ve immobilize edilmiş pektinazın aktivitesinin 30-90°C aralığında pH 5.0'da (asetat tamponu) ölçülmesiyle değerlendirildi. Diğer reaksiyon koşulları ve enzim aktivitesi izlemesi yukarıda açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Daha iyi karşılaştırma için, optimum sıcaklıktaki enzim aktivitesi %100 olarak kabul edildi. Karşılaştırma için bağıl aktivite (diğer sıcaklık test değerinin optimum sıcaklık test değerine yüzdesi) kullanıldı. Sonuçlar, üç tekrarın ortalaması \pm SD'sine karşılık gelmektedir.

3.2.7. Optimum pH analizi

Pektinaz aktivitesindeki optimum pH, asetat tamponu (pH 4.0–5.0) veya fosfat tamponu (pH 6.0–7.0) veya tris tamponu (pH 8.0–9.0) kullanılarak 50°C'de serbest pektinaz ve immobilize pektinaz aktivitesi ölçülerek değerlendirildi. Diğer reaksiyon koşulları ve enzim aktivitesi izlemesi yukarıda açıklandığı gibi gerçekleştirildi. Daha iyi karşılaştırma için, optimum pH'taki enzim aktivitesi %100 olarak kabul edildi ve karşılaştırma için bağıl aktivite (gözlem değerinin optimum değere yüzdesi) kullanıldı. Sonuçlar, üç tekrarın ortalaması \pm SD'sine karşılık gelmektedir.

3.2.8. Termal stabilite analizi

Aktivite testi, serbest ve immobilize edilmiş enzimlerin termal davranışlarını karşılaştırmak için substrat olmadan seçili sıcaklıklarda (30–90°C) 3 saatlik bir inkübasyondan sonra kalan aktivite ölçülerek belirlendi. Kalan aktivite, yukarıda açıklanan teste göre (pH 5.0

ve 50°C) ölçüldü. Daha iyi karşılaştırma için, optimum şartlarda ölçülen ilk enzim aktivitesi %100 olarak kabul edildi ve karşılaştırma için bağıl aktivite (gözlem değerinin optimum değere yüzdesi) kullanıldı. Sonuçlar, üç tekrarın ortalaması \pm SD'sine karşılık gelmektedir.

3.2.9. pH stabilite analizi

Enzimatik aktiviteler farklı pH değerleri (pH 4–9) için 3 saatlik bir inkübasyondan sonra kalan aktivite ölçülerek belirlendi. Kalan aktiviteler, yukarıda açıklanan teste göre (pH 5.0 ve 50°C) ölçüldü. Daha iyi karşılaştırma için, optimum şartlarda ölçülen ilk enzim aktivitesi %100 olarak kabul edildi ve karşılaştırma için bağıl aktivite (gözlem değerinin optimum değere yüzdesi) kullanıldı. Sonuçlar, üç tekrarın ortalaması \pm SD'sine karşılık gelmektedir.

3.2.10. Kinetik parametreler

Yukarıda açıklandığı gibi optimum deney koşulları (pH 5.0 ve 50°C) altında çeşitli pektin çözeltisi konsantrasyonları (0,25–5,0 mg/ml) kullanılarak hem immobilize hem de serbest enzimin kinetik parametreleri belirlendi. Serbest ve immobilize pektinazın K_m ve V_{max} değerleri, farklı pektin konsantrasyonlarına karşılık gelen başlangıç reaksiyon hızlarının GraphPad Prism programı ile doğrusal olmayan regresyon uyumundan hesaplandı.

3.2.11. İmmobilize enzimin yeniden kullanılabilirlik analizi

İmmobilize edilmiş pektinazın tekrar kullanılabilirliği, pH 5.0 ve 50°C'de substrat olarak ticari elma pektininin kullanıldığı hidroliz döngülerinde çalıştırıldı. Üstteki sıvı, DNS metodu ile galakturonik asit konsantrasyonunu belirlemek için kullanılırken, immobilize pektinaz yeni bir tampon çözeltide yeniden süspanse edildi ve ardından pektin eklendi. İmmobilize enzimin başlangıç aktivitesinin %100 olduğu varsayıldı. Sonraki ölçümler kalan aktivite şeklinde hesaplandı.

3.2.12. Depolama stabilite analizi

Hem serbest hem de immobilize edilmiş pektinaz için depolama süreleri, 4°C ve fosfat tamponunda sırasıyla 5. gün, 30. gün ve 60. gün sonunda ölçülmesiyle değerlendirildi. Depolama süresi sonunda kalan aktiviteler başlangıç aktivitesinin yüzdesi olarak hesaplandı. Sonuçlar, üç tekrarın ortalaması \pm SD'sine karşılık gelmektedir.

3.2.13. Üzüm suyu bulanıklık giderme analizi

İmmobilize pektinazın üzüm suyundaki berraklaştırma potansiyelini incelemek için yerel pazardan taze olarak alınan üzümler musluk suyu ile yıkandıktan sonra saf su ile

durulandı. Daha sonra bir tülbent içerisinde alınan üzümler sıkılarak suyu çıkarıldı (Şekil 3.3). Taze üzüm suyu 20 dakika boyunca 4500 rpm'de santrifüjlendi ve ardından üstteki sıvı berraklaştırma işlemi için kullanıldı. İmmobilize pektinaz üzüm suyu ile karıştırıldı ve 50 °C'de 3 saat boyunca işlendi. Enzimatik işleminden sonra, meyve suyunun berraklığı bulanıklık açısından spektrofotometrik (660 nm) yöntemle belirlendi (Dal Magro vd., 2016).

Üzüm Suyu Berraklaştırma İşlemi

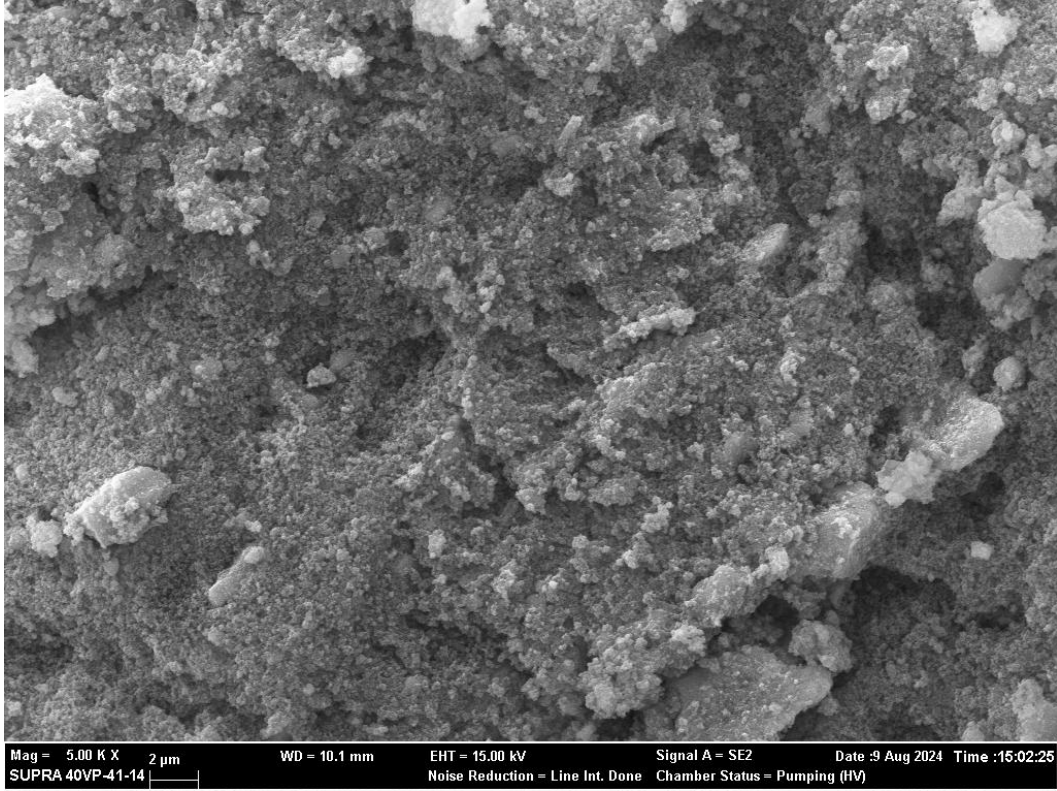


Şekil 3.3. Üzüm suyu berraklaştırma işlemine ait akış diyagramı

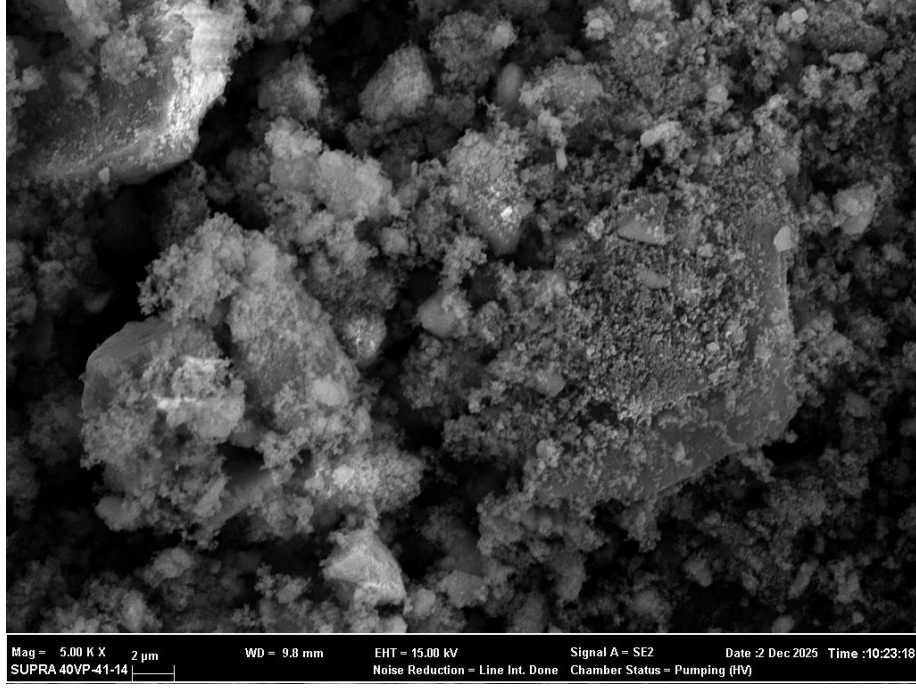
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Manyetik nanopartiküller (MNP) üzerine pektinaz enzimi, immobilize edilmeden ve immobilize edildikten sonraki morfolojileri taramalı elektron mikroskobu ile (SEM) ile görüntülendi (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Şekil 4.1, MNP'lerin TEOS aracılığıyla silika kaplanması ve APTES ile amin gruplarıyla fonksiyonelleştirilmesi sonrasında glutaraldehit ile aktive edilmiş durumunu göstermektedir. İmmobilizasyon öncesi görselde boşluklar ve gözenekler olduğu görülmektedir. Yüzey pürüzlülüğü ve gözenekler, daha fazla bağlanma noktası sağlayarak enzim immobilizasyonu için faydalı olan yüksek bir yüzey alanına işaret etmektedir. Şekil 4.2, glutaraldehit ile aktive edilmiş manyetik nanopartiküllerin yüzeyine pektinaz enziminin bağlanmasından sonraki morfolojik yapıyı temsil etmektedir. Pektinaz immobilizasyonu sonrası partikül yüzeyinde organik tabaka yoğunluğunun arttığı ve yüzey topografisinin belirgin şekilde değişerek daha pürüzsüz ve düz bir görünüm kazandığı gözlemlendi. Bu durum, enzimin yüzeye başarıyla bağlandığını gösteren tipik bir morfolojik göstergedir.



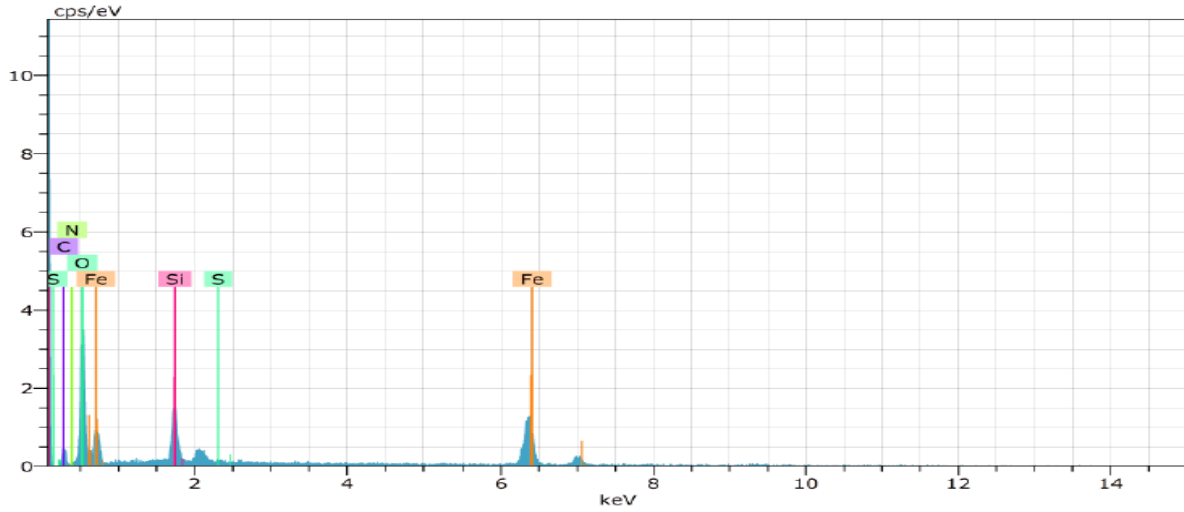
Şekil 4.1. Pektinaz immobilize edilmeden önce MNP@SiO₂-NH₂-GA taramalı elektron mikroskobu görüntüsü



Şekil 4.2. Pektinaz immobilize edildikten sonra MNP@SiO₂-NH₂-GA taramalı elektron mikroskobu görüntüsü

Pektinaz immobilize edildikten sonra manyetik nanopartiküllerin elementel kompozisyonu enerji dağılımlı X-ışını (EDX) spektroskopisi ile incelendi (Şekil 4.3 ve Tablo 4.1). Analiz sonuçları Fe, O, Si, N ve S elementlerinin karakteristik sinyallerini açıkça göstermektedir. Nicel değerlendirme, demirin en yüksek kütle yüzdesine sahip olduğunu (38.51 wt.%), bunun oksijen (29.34 wt.%) ve karbon (8.05 wt.%) tarafından takip edildiğini ortaya koymuştur. Fe'e ait güçlü piki (~6.4 keV civarı), manyetik çekirdeğin varlığını doğrularken, oksijen ve karbon sinyalleri yüzeyde organik ve fonksiyonel grupların varlığını desteklemektedir. Silisyumun 6.12 wt.% düzeyinde belirlenmesi manyetik nanopartiküllerin yüzeyinin TEOS kaynaklı SiO₂ tabakası ile başarılı bir şekilde kaplandığını göstermektedir. APTES modifikasyonunu işaret eden azot sinyalinin (0.12 wt.%) tespiti, yüzeyde -NH₂ fonksiyonel grupların bulunduğunu doğrulamaktadır. Kükürt elementinin 0.08 wt.% düzeyinde gözlenmesi, sistemde mevcut enzimatik yapıların yüzeye tutunduğunu destekleyen bir göstergedir.

EDX spektrumunda yer alan C, N ve S elementlerine ait sinyaller, özellikle glutaraldehit üzerinden gerçekleşen kovalent bağlanma mekanizmasını ve immobilize enzim tabakasının organik doğasını yansıtmaktadır. Atomik yüzde dağılımında oksijenin yüksekliği (53.58 wt.%), silika ve metal oksit yapısının etkin biçimde oluştuğunu göstermektedir. Buna karşılık karbon ve azot atom yüzdeleri (sırasıyla 19.58 wt.% ve 0.25 wt.%) yüzeydeki organik componentlerin varlığını desteklemektedir.



Şekil 4.3. Pektinaz immobilize $MNP@SiO_2-NH_2-GA$ 'lerin enerji dağılımlı X-ışını (EDX) spektrumu

Tablo 4.1. Pektinaz immobilize $MNP@SiO_2-NH_2-GA$ 'lerin atomik yüzde dağılımları

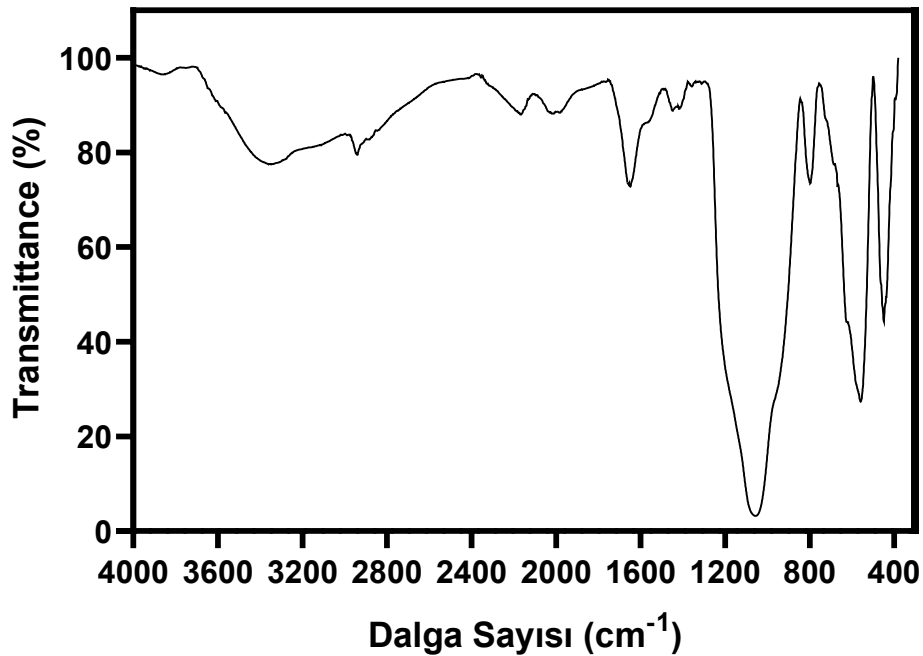
Element	Series	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Error (1 Sigma) [wt.%]
Iron	K-series	38.51	46.84	20.15	1.42
Oxygen	K-series	29.34	35.69	53.58	4.83
Carbon	K-series	8.05	9.79	19.58	2.42
Silicon	K-series	6.12	7.44	6.36	0.33
Nitrogen	K-series	0.12	0.14	0.25	0.22
Sulfur	K-series	0.08	0.10	0.08	0.04
Total:		82.22	100.00	100.00	

Genel olarak EDX sonuçları; manyetik çekirdeğin varlığını, silika kaplamanın başarıyla gerçekleştiğini, APTES kaynaklı amin fonksiyonlarının yüzeye bağlandığını ve enzim immobilizasyonu sonrası organik tabakanın belirginleştiğini doğrulamaktadır. Elde edilen

elementel profil, immobilizasyon sürecinin her aşamasını kimyasal olarak desteklemekte ve fonksiyonelleştirilmiş immobilize MNP yapısının başarılı bir şekilde oluştuğunu göstermektedir.

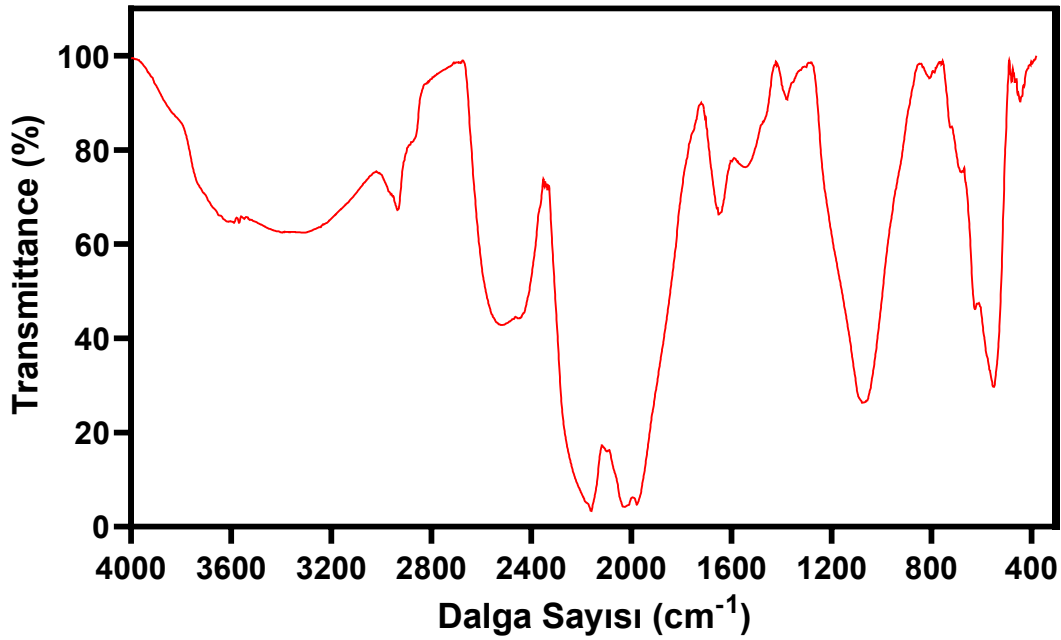
4.2. Fourier Dönüümlü Kızılötesi Spektrometresi (FT-IR)

Fonksiyonelleştirilen manyetik nanopartiküllerin kimyasal yapısındaki değişimleri değerlendirmek amacıyla immobilizasyon öncesi (Şekil 4.4) ve sonrası (Şekil 4.5) destek malzemelerinin FT-IR spektrumları karşılaştırmalı olarak analiz edildi. FT-IR spektrumları, malzemeler içindeki fonksiyonel grupları yansıtan belirgin tepe noktaları göstermektedir. İmmobilizasyon öncesine ait spektrum (Şekil 4.4), hem silika kaplamayı hem de APTES kaynaklı amino fonksiyonlarını işaret eden karakteristik bantlar içermektedir. 1080-1100 cm^{-1} bölgesinde gözlenen belirgin Si-O-Si asimetrik gerilme bandı ve 790-800 cm^{-1} civarındaki Si-O gerilme modu, TEOS ile gerçekleştirilen silika kaplamanın başarılı olduğunu göstermektedir. 560 cm^{-1} civarında izlenen Fe-O titreşim bandı, manyetik çekirdeğin varlığını doğrulamaktadır. APTES fonksiyonelleştirilmesine işaret eden $-\text{NH}_2$ grupları, 1550-1560 cm^{-1} bölgesinde N-H eğilme titreşimleriyle desteklenmektedir.



Şekil 4.4. İmmobilizasyon öncesi $\text{MNP}@SiO_2\text{-NH}_2\text{-GA}$ 'ların FTIR spektrumu

İmmobilizasyon sonrası spektrumda (Şekil 4.5), protein yapılarına özgü yeni bantların ortaya çıktığı ve bazı bant yoğunluklarının belirgin şekilde değiştiği görülmektedir. Özellikle yaklaşık $1630-1660\text{ cm}^{-1}$ civarında belirginleşen bant, enzim protein yapısına ait amid I gerilme titreşimidir ve C=O gruplarından kaynaklanmaktadır. $1520-1550\text{ cm}^{-1}$ aralığında ortaya çıkan amid II bandı ise immobilize enzim tabakasına bağlı N-H gerilme modlarını temsil etmektedir. Bu iki bandın immobilizasyon sonrası spektruma eklenmesi, enzimin partikül yüzeyine başarıyla bağlandığını güçlü bir şekilde desteklemektedir. Bununla birlikte yaklaşık $1630-1650\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki karakteristik kayma, glutaraldehit aracılı Schiff bazı (C=N) oluşumuna işaret eden tipik bir kimyasal göstergedir. Aldehit grupları ile APTES'in yüzeyindeki -NH_2 grupları arasında gerçekleşen kovalent bağlanma, immobilizasyon mekanizmasını doğrulayan bu C=N titreşim görünürlüğü artırılmaktadır. Ayrıca immobilizasyon sonrası spektrumda $2850-2950\text{ cm}^{-1}$ civarındaki C-H gerilme bantlarının yoğunlaşması, yüzeyde organik tabaka oluşumunun artmasına bağlanabilir.



Şekil 4.5. İmmobilizasyon sonrası $\text{MNP@SiO}_2\text{-NH}_2\text{-GA}$ 'ların FTIR spektrumları.

Genel olarak FT-IR sonuçları; manyetik çekirdeğin silika kaplandığını, APTES modifikasyonu ile yüzeyin amin fonksiyonları kazandığını, glutaraldehit aktivasyonunun gerçekleştiğini ve immobilizasyon sonrası enzim yapısındaki amid bağlarının belirgin şekilde

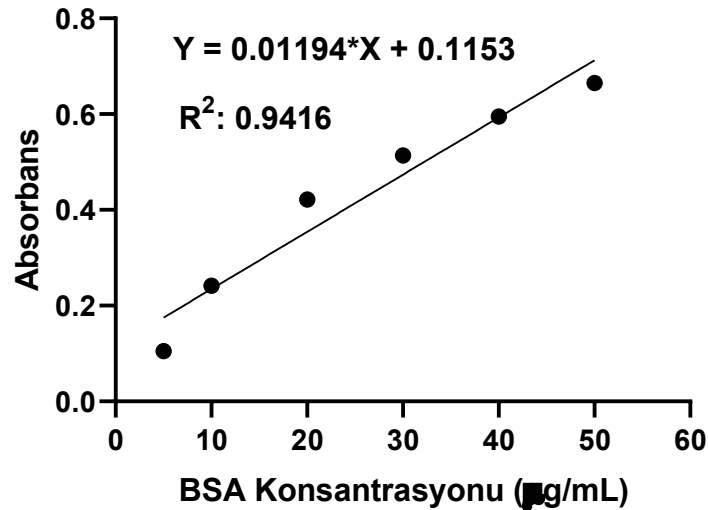
ortaya çıktığını göstermektedir. Bu bulgular, nanopartiküllerin yüzey kimyasında immobilizasyon sürecinin her aşamasının başarıyla tamamlandığını doğrulamaktadır.

4.3. İmmobilizasyon Verimi

İmmobilizasyon verimi standart bileşik sığır serum albümin (BSA) kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisinden hesaplandı (Şekil 4.6). Verim hesaplanmasında başlangıç protein miktarı ile süzüntü protein miktarı arasındaki fark dikkate alınarak gerçekleştirildi. Kalibrasyon eğrisi farklı konsantrasyonlardaki (5-50 µg/mL) BSA'nın 595 nm'deki absorbanslarının spektrofotometrede ölçülmesi ile belirlendi (Tablo 4.2). Kalibrasyon eğrisinin denklemi Graphad Prism 8.0.2 kullanılarak hesaplandı ve $Y=0,01194X + 0,1153$ ($R^2: 0,9416$) olarak bulundu.

Tablo 4.2. BSA standart kalibrasyon eğrisi

BSA Konsantrasyon (µg/mL)	Absorbans (595 nm)
5	0.105
10	0.242
20	0.422
30	0.514
40	0.595
50	0.665



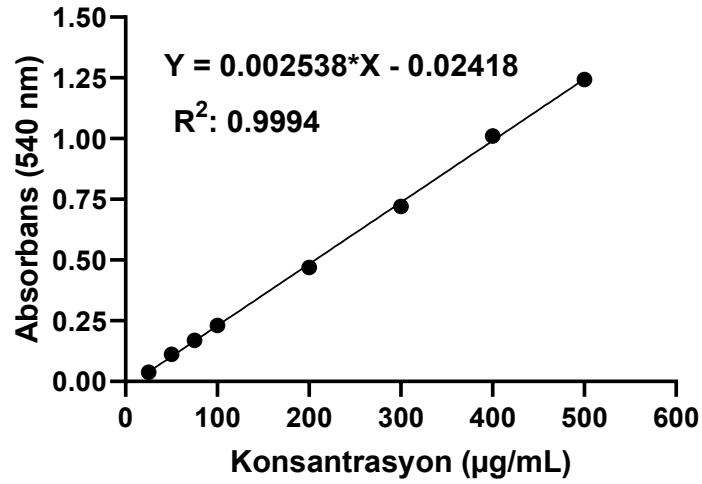
Şekil 4.6. Sığır serum albümin standart kalibrasyon eğrisi

İmmobilizasyon öncesi ve sonrası enzim çözeltisindeki protein miktarı kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlendi. D.7'ye göre yapılan hesaplamada immobilizasyon verimi %57 olarak bulunmuştur.

Enzim aktivite hesaplamalarında DNS yöntemi kullanılarak farklı D-galakturonik asit (25-500 µg/mL) konsantrasyonlarına karşı absorbanlar ölçüldü (Tablo 4.3). Elde edilen sonuçlardan kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 4.7). Kalibrasyon eğrisinin denklemi Graphad Prism 8.0.2 kullanılarak hesaplandı ve $Y = 0,002538X - 0,02418$ ($R^2: 0,9994$) olarak bulundu.

Tablo 4.3. D-Galakturonik asit konsantrasyonuna karşı absorban değerleri

Konsantrasyon (µg/mL)	Absorbans (540 nm)
25	0.038
50	0.112
75	0.169
100	0.231
200	0.470
300	0.721
400	1.010
500	1.243



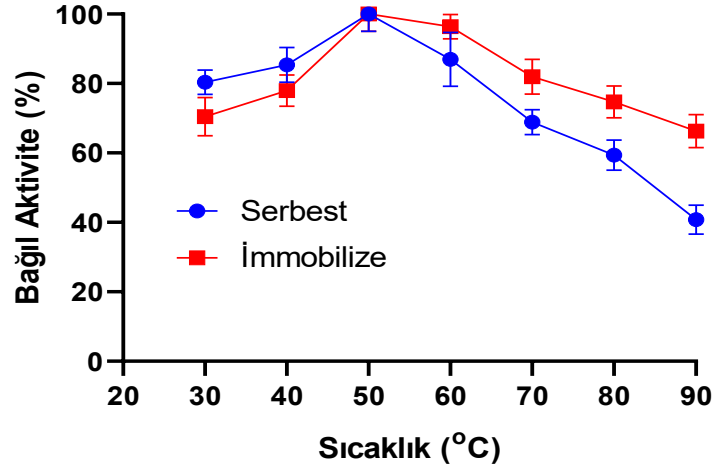
Şekil 4.7. D- Galakturonik asit kalibrasyon eğrisi

4.4. Optimum Sıcaklık Analizi

Pektinaz enziminin katalitik aktivitesi üzerinde sıcaklığın etkisi, biyoproseslerin endüstriyel ölçekteki verimliliğini ve uygulanabilirliğini belirleyen en kritik parametrelerden biridir. Bu doğrultuda, serbest ve immobilize pektinazın katalitik performansları üzerindeki sıcaklık etkisi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Deneysel analizler, pH 5 standart reaksiyon koşulları altında, 30 °C ile 90 °C arasında değişen sıcaklık aralıklarında yürütülmüştür (Şekil 4.8).

Hem serbest pektinazın hem de manyetik nanopartiküllere kovalent bağlı immobilize pektinazın maksimum katalitik aktivitesi sergilediği optimum sıcaklık değeri 50 °C olarak tespit edilmiştir. Bu bulgu, uygulanan kovalent bağlama prosedürünün enzimin optimum çalışma sıcaklık noktası üzerinde herhangi bir kaymaya veya modifikasyona neden olmadığını açıkça göstermektedir.

Bununla birlikte, sıcaklık aktivite profili genel olarak değerlendirildiğinde, 50 °C üzerindeki yüksek sıcaklıklarda immobilize pektinazın serbest pektinaza kıyasla bağlı aktivitesini belirgin şekilde daha yüksek oranda kurduğu ve termal direncinin arttığı gözlemlenmiştir. Serbest enzimin yüksek sıcaklıklarda termal stresin etkisiyle hızla inaktivasyona uğrayıp katalitik etkinliğini kaybederken, nanobiyokatalizör sisteminin yüksek sıcaklıklarda daha yüksek bir katalitik kararlılık sergilediği belirlenmiştir. Ancak 70 °C ile 90 °C gibi ekstrem sıcaklık sınırlarına ulaşıldığında, sıcaklıkların protein yapısı üzerindeki denatüre edici etkisine bağlı olarak her iki enzim formunun aktivitesinde de kaçınılmaz bir azalış kaydedilmiştir.



Şekil 4.8. Hem serbest pektinaz hem de immobilize edilmiş pektinaz için optimum sıcaklık grafiği

Enzimlerin nano boyutlu katı destek sistemlerine immobilizasyonu, biyokatalizörün mikroçevresini, kütle transfer özelliklerini ve konformasyonel esnekliğini doğrudan etkilemektedir (Lütz, 2013). Bu çalışmada, pektinazın aminosilan ve gluteraldehit ile aktive edilmiş manyetik nanopartiküller üzerine kovalent olarak bağlanması, enzimin doğal optimum sıcaklığını değiştirmemiş fakat yüksek sıcaklık koşullarındaki operasyonel stabilitesini önemli ölçüde de güçlendirmiştir.

İmmobilizasyon sonrasında optimum reaksiyon sıcaklığının 50 °C olarak korunması, literatürde yer alan ve sıcaklık etkisinin araştırıldığı bazı pektinaz immobilize çalışmalarıyla tam bir uyumluluk sergilemektedir (Bahri vd., 2022; Behram vd., 2023). Benzer immobilize metodolojilerinin kullanıldığı çalışmalarda da kovalent immobilizasyon prosesinin enzimin optimum sıcaklığı üzerinde değiştirici bir etkisi olmadığı rapor edilmiştir. Reaksiyon sıcaklık optimumunun sabit kalması, kovalent konjugasyon sırasında enzimin aktif bölgesinde yer alan ve katalitik aktiviteden sorumlu olan amino asit kalıntılarının üç boyutlu oryantasyonunun olumsuz etkilenmediğini, pektinazın aktif bölge konformasyonunun büyük ölçüde muhafaza edildiğini ve substratın aktif bölgeye erişiminin sterik engellemelere uğramadığını ortaya koymaktadır.

Diğer taraftan, 50 °C üzerindeki operasyonel sıcaklıklarda immobilize pektinazın serbest forma kıyasla üstün bir bağıl aktivite ve termal direnç sergilemesi, destek malzemesinin protein yapısı üzerinde sağladığı stabilize edici ve koruyucu etkiye atfedilmektedir (Fang vd.,

2016). Serbest haldeki protein molekülleri, sıcaklık artışına bağlı olarak yükselen termal kinetik enerji nedeniyle konformasyonel bir esneklik kazanmakta, yapıyı stabilize eden zayıf bağların kopmasıyla denatürasyon süreçlerine karşı savunmasız hale gelmektedir. Ancak pektinaz molekülünün yüzeyindeki fonksiyonel gruplar ile modifiyeli manyetik nanopartiküller arasındaki kovalent etkileşimler, enzimin konformasyonel sertliğini güçlendirerek protein yapısının ısı etkisiyle açılmasını ve yapısal deformasyonlara uğramasını sınırlandırmaktadır. İmmobilizasyon neticesinde enzimin yapısal reformlarının sınırlandırılması, deaktivasyon için gereken aktivasyon enerjisini yükselterek termal karlılığın artmasını doğrudan desteklemektedir (Mosafa vd., 2014).

Termodinamik ve karlılık odaklı yaklaşımlar incelendiğinde, uygun tasarlanmış bir immobilizasyon stratejisinin, stabilize edici moleküler etkileşimler yoluyla enzimlerin katlanmış halinin enerjisini değiştirebildiği ve ısısal stres altında meydana gelen enzim açılım kinetiğini etkili bir şekilde yavaşlatabildiği bilinmektedir (Muley vd., 2020). Ayrıca serbest enzim çözelti ortamında sıcaklık, karıştırma hızı veya pH dalgalanmaları gibi çevresel stres faktörlerine karşı tamamen açık ve protein agregasyonu ya da otoliz gibi geri dönüşümsüz inaktivasyon süreçlerine yatkın durumdadır (Guisan vd., 2020; Lütz, 2013). Sentezlenen aminosilan-glutaraldehit modifiyeli manyetik nanopartikül matrisi ise enzim moleküllerinin bu tür olumsuz dış etkilerden izole eden koruyucu bir mikro ortam oluşturarak enzimin uzun vadeli operasyonel kararlılığını optimize etmektedir.

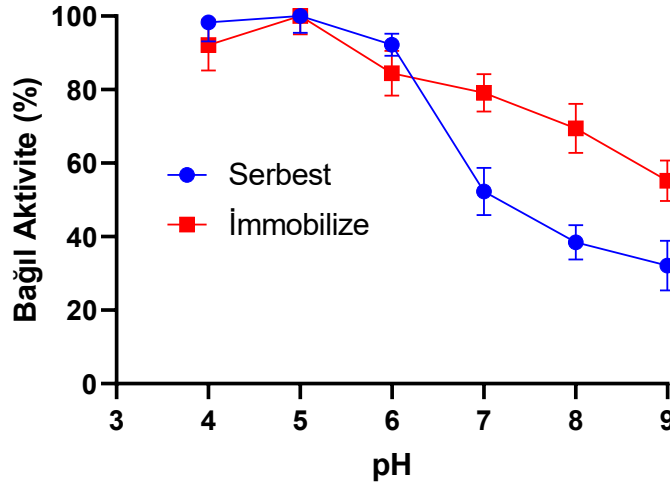
Sonuç olarak, geliştirilen manyetik nanobiyokatalizör sisteminin endüstriyel meyve suyu berraklaştırma sıcaklıklarında (50 °C) maksimum aktivite ile çalışabilmesi ve daha yüksek sıcaklık değerlerinde serbest forma kıyasla yüksek kararlılık sunması, gıda endüstrisindeki depektinizasyon hatlarında proses kararlılığını arttırmak, reaksiyon sürelerini optimize etmek ve ticari elinizin maliyetlerini düşürmek adına stratejik bir uygulama potansiyeline işaret etmektedir.

4.5. Optimum pH Analizi

Biyokatalitik proseslerin optimizasyonunda reaksiyon ortamının pH değeri, enzim aktivitesini doğrudan kontrol eden en kritik parametrelerden biridir (Miao vd., 2021). Reaksiyon ortamındaki hidrojen iyonu (H^+) konsantrasyonu, enzimin üç boyutlu konformasyonunu, aktif bölgedeki katalitik amino asit kalıntılarının iyonizasyon durumunu ve substratın aktif bölgeye bağlanma aktivitesini doğrudan etkilemektedir (Robinson, 2015). Bu kapsamda serbest pektinaz ile manyetik demir oksit (Fe_3O_4) nanopartikülleri üzerine kovalent

olarak immobilize edilen pektinazın bağıl katalitik aktiviteleri üzerindeki pH etkisi, pH 3 ile 9 aralığında karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (Şekil 4.9).

DeneySEL analizlerden elde edilen verilere göre, serbest pektinazın ve immobilize pektinazın maksimum katalitik aktivite sergilediği optimum pH değeri pH 5 olarak belirlenmiştir. pH 5 değerinden uzaklaştıkça hem serbest hem de immobilize forumun aktivitesinde azalmalar meydana gelmiştir. pH aktivite profili daha geniş bir perspektifle incelendiğinde, immobilize pektinazın alkali pH değerlerinde serbest enzime kıyasla katalitik aktivitesini daha yüksek oranda gösterdiği belirlenmiştir. Bunun nedeni, alkali bölgede immobilizasyon işleminin pektinazın pektine etki etmesi için uygun bir ortam sağlaması ve pektinazın (enzim) pektine (substrat) karşı artan afinitesi olabilir. Bu nedenle, immobilize enzim çevresel alkaliliğe iyi uyum sağladığı söylenebilir.



Şekil 4.9. Hem serbest pektinaz hem de immobilize edilmiş pektinaz için optimum pH grafiği

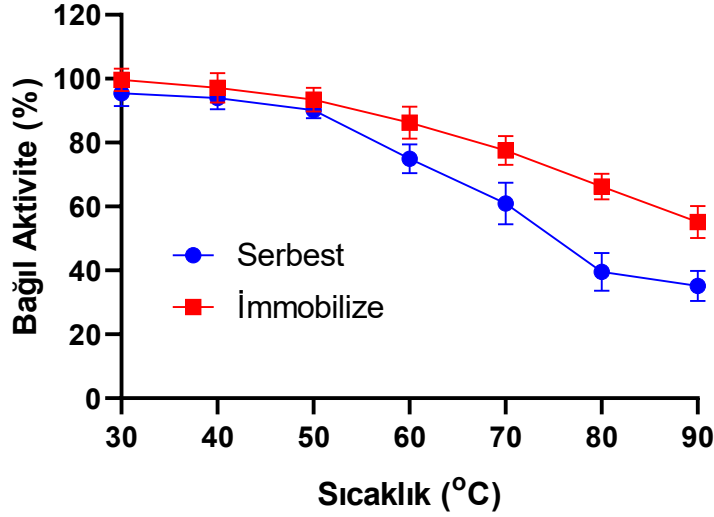
Enzimlerin optimum pH değerleri, aktif merkezlerinde yer alan katalitik aktiviteden sorumlu olan amino asit kalıntılarının iyonizasyon durumları ile doğrudan ilişkilidir (Dwevedi, 2016). Literatürde, enzimlerin bir destek materyaline immobilizasyon sonrasında, taşıyıcının yüzey yükü karakteristiğine ve mikro çevre etkilerine bağlı olarak optimum pH değerinin asidik veya bazik yöne kayabildiği ya da mevcut çalışmada olduğu gibi tamamen sabit kalabildiği rapor edilmiştir (Bahrami & Hejazi, 2013; Behram vd., 2023; T. Li vd., 2008; Miao vd., 2021; Qi vd., 2020).

Çalışmamızda hem serbest hem de immobilize pektinaz için optimum pH 5 olarak belirlenmesi, pektinazın konformasyonel yapısının ve aktif merkez geometrisinin immobilizasyon sürecinde olumsuz etkilenmediğini göstermektedir.

4.6. Termal Stabilite Analizi

Endüstriyel uygulamalar genellikle yüksek sıcaklıklarda yürütüldüğünden, geliştirilen biyokatalizörün sıcaklık değişimleri karşısındaki katalitik direncinin belirlenmesi kritik bir adımdır. Bu doğrultuda, manyetik demir oksit (Fe_3O_4) nanotaşıyıcı sistemine kovalent olarak bağlanan pektinaz enziminin ve serbest muadilinin termal kararlılık profilleri, 30 °C ile 90 °C arasında değişen geniş bir sıcaklık skalasında 3 saat inkübasyon süresi sonunda ölçülerek karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (Şekil 4.10).

Elde edilen deneysel veriler, sıcaklık artışına bağlı olarak her iki enzim formunun bağlı aktivitesinde bir azalma meydana geldiğini, ancak immobilize pektinazın aktivite kaybının serbest enzime kıyasla belirgin derecede daha yavaş ve kontrollü gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Özellikle 50 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda her iki enzim formu da orijinal katalitik aktivitelerinin büyük oranda korumuştur. Ancak termal stresin arttığı kritik eşik olan 60 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda, immobilize pektinazın serbest pektinaza karşı sergilediği kararlılık üstünlüğü net bir şekilde belirginleşmiştir. 3 saatlik inkübasyon periyodu sonunda 70 °C'de serbest pektinazın katalitik aktivitesi bir düşüş gösterirken manyetikler nanopartiküllere kovalent bağlı pektinaz enzimi yüksek bir termal direnç göstererek fonksiyonelliğini korumuştur. Ekstrem bir termal inaktivasyon koşulu olan 90 °C'de 3 saat boyunca bekletilen serbest pektinaz orijinal aktivitesinin yalnızca %35'ini koruyabilir iken, manyetik nanobiyokatalizör başlangıç aktivitesinin %55'ini muhafaza etmeyi başarmıştır. Bu bulgular, kovalent immobilizasyon stratejisinin pektinaz enzimine yüksek sıcaklık koşullarında üstün bir koruma kalkanı ve operasyonel dayanıklılık kazandırdığını göstermektedir.



Şekil 4.10. Serbest ve immobilize pektinazın termal stabilitesi

Sıcaklık, enzimlerin üç boyutlu üçüncül ve dördüncül yapılarından sorumlu olan hidrojen bağları, iyonik etkileşimler ve Van der Waals kuvvetleri üzerinde doğrudan bozucu bir etkiye sahiptir. Yüksek sıcaklıklarda protein omurgasının kinetik enerjisinin artması, enzimin aktif bölgesinde konformasyonel açılmalara ve dolayısıyla katalitik etkinliğin tamamen kaybolmasına yol açmaktadır (Bisswanger, 2014). Şekil 4.10’da immobilize pektinazın yüksek sıcaklıklarda sergilediği üstün koruma performansı, kovalent immobilizasyon doğasından kaynaklanan çok noktalı kovalent bağlanma mekanizması ile açıklanabilmektedir (Behram vd., 2023).

Enzimatik aktivite, sıcaklıkların denatüre edici etkisi nedeniyle özellikle 70°C - 90°C’de azalmıştır. Yürütülen bir çalışmada, 65°C’de hem serbest hem de immobilize edilmiş pektinazların tüm aktivitelerini kaybettiği gösterilmiştir (T. Li vd., 2008). Çalışmamızda ise tüm durumlarda, immobilize edilmiş enzimin stabilitesi, serbest enziminkinden daha yüksekti ve bu da immobilizasyon tekniğinin enzimin termal kararlılığını tatmin edici bir şekilde iyileştirdiğini gösteriyordu. Termal kararlılık, MNP’lerin yüzeyindeki pektinaz ile glutaraldehitin fonksiyonel grupları arasında güçlü bir kovalent bağ oluşumu nedeniyle artmıştır. Kovalent bağlanma tekniği, enzimin konformasyonel sertliğini daha da artırarak termal denatürasyon reaksiyonları için daha yüksek aktivasyon enerjisi seviyeleri gerektirir ve konformasyonel inaktivasyonu önler (Amin vd., 2023; Dwevedi & Kayastha, 2009). Bu gelişmiş termal stabilizasyon, yüksek sıcaklıklarda iyileştirilmiş stabilite ve geniş bir sıcaklık aralığında veya uzatılmış reaksiyon sürelerinde iyileştirilmiş performans gibi olumlu sonuçlar göstererek kapsamlı bir şekilde

raporlanmıştır (Chalella Mazzocato & Jacquier, 2024; Tasgin vd., 2020). Bu tür faydalar, özellikle içecek endüstrisinde enzim immobilizasyonundan elde edilen ürünler için, enzimlerin kullanımını genişleterek önemli bir ekonomik değer taşır.

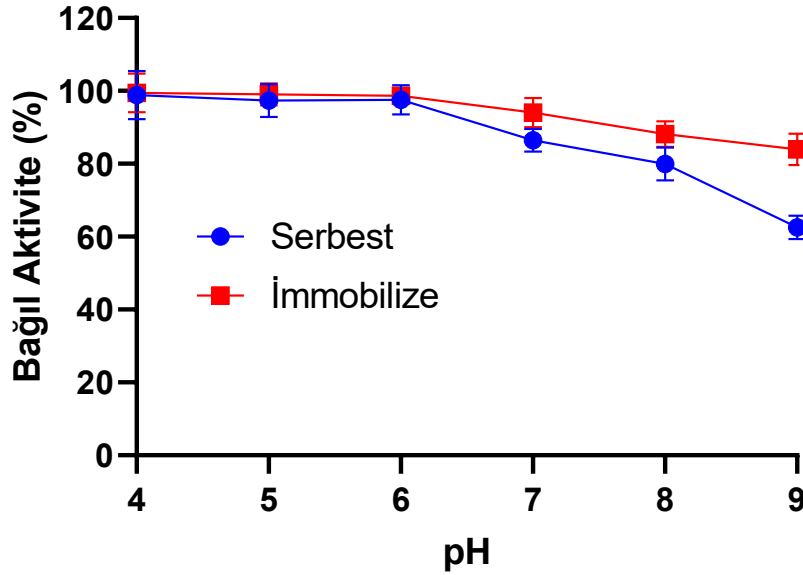
4.7. pH Stabilite Analizi

Biyokatalizörlerin endüstriyel gıda proseslerinde, özellikle de asidik nitelikteki meyve suyu berraklaştırma işlemlerinde uzun süreli operasyonel ve ticari uygulanabilirliğini belirleyen en kritik parametrelerden biri pH kararlılığıdır. Serbest enzimlerin üç boyutlu aktif bölge konformasyonları ile katalitik döngüde doğrudan görev alan fonksiyonel aminoasit kalıntılarının iyonizasyon durumları, reaksiyon ortamındaki pH dalgalanmalarına karşı son derece hassastır. Uygun olmayan pH koşulları, enzim yapısında geri dönüşümsüz denatürasyon ve dolayısıyla katalitik inaktivasyona yol açmaktadır (Miao vd., 2021). Bu doğrultuda, manyetik demir oksit nanopartikülleri matrisine ve kovalent olarak immobilize edilen pektinazın ile serbest pektinazın pH kararlılığı profilleri, pH 4.0 ile pH 9.0 aralığında, 50 °C ve 3 saatlik inkübasyon süresi sonunda incelenmiş, elde edilen veriler Şekil 4.11'de sunulmuştur.

Şekil 4.11'de yer alan pH kararlılığı eğrileri detaylı olarak incelendiğinde, her iki enzim formunun da asidik ve alkali ekstrem bölgelerdeki inkübasyon süresi uzadıkça bağıl aktivite kaybına uğradığı görülmektedir. Ancak kovalent olarak immobilize edilen pektinazın bağıl aktivite azalma hızı, serbest forma kıyasla tüm pH asında belirgin derecede daha düşük kalmıştır. Geniş bir pH aralığında gerçekleştirilen zamana bağlı kararlılık testleri, manyetik nano taşıyıcı üzerine kovalent bağlama stratejisinin, pektinazın ekstrem hidrojen (H⁺) ve hidroksil (OH⁻) iyonu konsantrasyonlarına karşı direncini dikkate değer ölçüde arttırdığını göstermektedir. Özellikle ekstrem alkali bir ortam olan pH 9.0'da 3 saat boyunca inkübe edilen serbest pektinaz orijinal katalitik aktivitesinin yalnızca %63 ünü koruyabilir iken kovalent olarak fonksiyonelleştirilen immobilize pektinaz %84 gibi yüksek bir bağıl aktivite kararlılığı sergilemiştir.

İmmobilize pektinazın geniş bir pH spektrumunda sergilediğı bu üstün koruma performansı, glutaraldehit çapraz bağlama ajanı aracılığıyla pektinazın amino grupları ile modifiye edilmiş manyetik demir oksit nanopartikül yüzeyi arasında kurulan güçlü ve çok noktalı kovalent bağların sağladığı konformasyonel rijitliğe atfedilmektedir (Behram vd., 2023). Serbest pektinaz enzimleri çözelti içerisinde ekstrem pH koşullarının indüklediğı elektrostatik itmelere, molekül içi bağların kopmasına ve yapısal özünmelere karşı tamamen savunmasız iken çok noktalı kovalent bağlanma tekniğı enzimin üç boyutlu yapısını adeta

kilitleyerek protein zincirinin açınım ve denatürasyon süreçlerini sınırlandırmaktadır (Lei vd., 2007). Bunun yanı sıra, süper paramanyetik demir oksit çekirdeğinin etrafındaki fonksiyonel kaplama tabakaları, çözeltideki iyon yoğunluğunun artık merkez üzerindeki yıkıcı etkilerini sönmleyen hidrofilik bir mikro çevre ve tamponlama etkisi yapmış olabilir (Bahri vd., 2022; Kharazmi, Taheri-Kafrani, & Soozanipour, 2020).



Şekil 4.11. Serbest ve immobilize pektinazın pH kararlılığı

Mevcut literatürde yer alan ve pektinaz enziminin farklı taşıyıcı sistemlere immobilize proseslerini içeren çalışmalar, Şekil 4.11'de elde ettiğimiz bulguları güçlü bir şekilde desteklemektedir. Örneğin, pektinazın glutaraldehit aktivasyonu ile demir oksit nanopartiküllerine kovalent olarak bağlandığı benzer nano katalizör sistemlerinde, kovalent bağ mukavemetinin enzimi konformasyonel inaktivasyondan koruduğu ve operasyonel pH esnekliğini maksimize ettiği bildirilmiştir (Aslani vd., 2018; Behram vd., 2023). Yapılan bir diğer çalışmada, pektinazın kovalent yöntemle polietilen glikol ve triklorotriazin modifikasyonlu manyetik nanopartiküllere bağlanmasının özellikle ekstrem pH noktalarında enzime üstün konformasyonel kararlılık kazandırdığı rapora edilmiştir (Kharazmi, Taheri-Kafrani, & Soozanipour, 2020). Benzer şekilde, pektinazın fonksiyonel kovalent matrisler veya aminosilan modifikasyonlu süper paramanyetik nanopartiküller üzerine kovalent immobilizasyonunun, çözeltideki serbest enzim inaktivasyon mekanizmalarını bloke ettiği ve endüstriyel berraklaştırma döngülerinde operasyonel avantaj sağladığı literatürde sıklıkla vurgulanmaktadır (Fang vd., 2016; Gebreyohannes vd., 2016).

Sonuç olarak Şekil 4.11'den elde edilen pH kararlılığı verileri, rasyonel yüzey modifikasyon teknikleriyle tasarlanan çalışmamızda elde edilen ürünün yalnızca asidik nitelikteki meyve suyu proseslerinde değil daha ekstrem pH koşulları gerektiren farklı operasyonlarda da endüstriyel bir nanobiyokatalizör olarak yüksek kararlılıkla kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

4.8. Kinetik Parametreler

Biyokatalitik sistemlerin endüstriyel ölçekteki uygulanabilirliğini ve substrat-enzim etkileşim mekanizmalarını değerlendirmede en temel yaklaşımlardan biri Michaelis-Menten kinetik parametrelerinin belirlenmesidir. Bu doğrultuda immobilize enzim ile serbest enzim formunun kinetik davranışları karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Deneyler optimum reaksiyon koşulları olan 50 °C ve pH 5.0 tampon ortamında, farklı pektin konsantrasyonları (0,25–5,0 mg/mL) kullanılarak yürütülmüştür. Serbest ve immobilize pektinaz sistemlerine ait deneysel verilerin Graphpad prism 8.0.2 programı aracılığıyla doğrusal olmayan reaksiyon analize tabi tutulması sonucunda elde edilen Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) değerleri Tablo 4.4'te sunulmuştur.

Tablo 4.4. Serbest ve immobilize enzimin kinetik parametreleri (K_m ve V_{max})

Enzim	K_m (mg/mL)	V_{max} (U/mL)
Serbest Pektinaz	3,319	0,280
İmmobilize Pektinaz	3,940	0,187

Tablo 4.4'ten elde edilen bulgular incelendiğinde, serbest pektinazın K_m değeri 3,319 mg/mL olarak hesaplanırken, manyetik nanopartikül destek materyaline kovalent olarak bağlanan immobilize pektinazın K_m değeri yaklaşık %18,7'lik bir artış göstererek 3,940 mg/mL seviyesine yükselmiştir. Bilindiği üzere K_m değeri, enzimin substratına olan afinitesinin ters bir göstergesidir ve bu değerdeki artış, enzimin substratına olan ilgisinde kısmi bir azalma meydana geldiğini doğrulamaktadır. Maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) değerleri ele alındığında ise, serbest enzimin sergilediği 0,280 U/mL'lik hızın, immobilizasyon prosesi sonrasında 0,187 U/mL düzeyine gerilediği tespit edilmiştir. Nanobiyokatalizör sisteminde gözlenen bu kinetik

değişimler, enzim immobilizasyon literatüründe sıklıkla karşılaşılan yapısal ve fizikokimyasal değişimlerin doğrudan bir sonucudur.

K_m değerindeki artışın ve buna bağlı olarak substrat afinitesindeki sınırlı düşüşün temel nedeni, makromoleküler yapıdaki pektin substratının nanopartikül yüzeyindeki koruyucu mikro çevreye doğru taşınması esnasında karşılaştığı kütle transferi dirençleri ve difüzyon sınırlamalarıdır. Serbest haldeki pektinaz çözelti içerisinde homojen ve serbestçe hareket edebilirken, katı destek materyaline immobilize edilen enzim moleküllerinin çevresinde hidrodinamik bir durgun tabaka oluşmaktadır. Bu durum, yüksek molekül ağırlıklı bir polisakkarit olan pektinin, enzimin aktif merkezine difüzyonunu fiziksel olarak zorlaştırmaktadır. Benzer bir doğrultuda, V_{max} değerindeki azalma ise iki temel mekanizma ile açıklanabilmektedir. Birincisi, glutaraldehit ile gerçekleştirilen çok noktalı kovalent çapraz bağlama reaksiyonunu, enzimin katalitik döngü esnasında ihtiyaç duyduğu konformasyonel esnekliği sınırlandırmasıdır. İkinci kritik faktör ise, rastgele gerçekleşen bağlanma yönelimleri sebebiyle pektinazın bazı aktif bölgelerinin sterik olarak engellemesi ya da manyetik taşıyıcı yüzeyine doğru kapanmasıdır. Buna karşın K_m değerindeki artışın nispeten dar bir aralıkta %18,7 kalması, sentezlenen demir oksit manyetik nanopartiküllerin sahip olduğu yüksek yüzey alanı/hacim oranının difüzyon kısıtlamalarının minimum düzeyde tuttuğunu ve aktif merkez konformasyonunun büyük ölçüde konduğunu göstermektedir.

Literatürden yer alan pektinaz immobilizasyonu çalışmaları incelendiğinde, farklı matrikslerin ve immobilizasyon yöntemlerinin kinetik parametreler üzerinde benzer eğilimler oluşturduğu görülmektedir. Örneğin Behram ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, pektinaz enziminin glutaraldehit aracılığıyla manyetik demir oksit nanopartiküllerine kovalent olarak bağlanması sonucunda K_m değerini arttırdığı, V_{max} değerinin ise düştüğü rapor edilmiştir. Bu durum mevcut tez çalışmamızın kinetik eğilimleri ile tam bir uyum sergilemektedir (Behram vd., 2023). Benzer şekilde kovalent immobilizasyon teknolojisinde çift fonksiyonlu bir çapraz bağlayıcı olan glutaraldehit kullanımı, enzim molekülünün amino grupları ile taşıyıcı arayüzü arasında güçlü Schiff bazları ($C=N$) tesis ederek rijit bir yapı oluşturmaktadır (Başaran & Işık, 2025). Bu kimyasal immobilizasyon, enzimi termal ve kimyasal denatürasyona karşı olağanüstü kararlı kılarken katalitik hız sabiti (V_{max}) üzerinde kaçınılmaz olarak hafif bir baskı oluşturmaktadır (Amin vd., 2023; Sheldon, 2007).

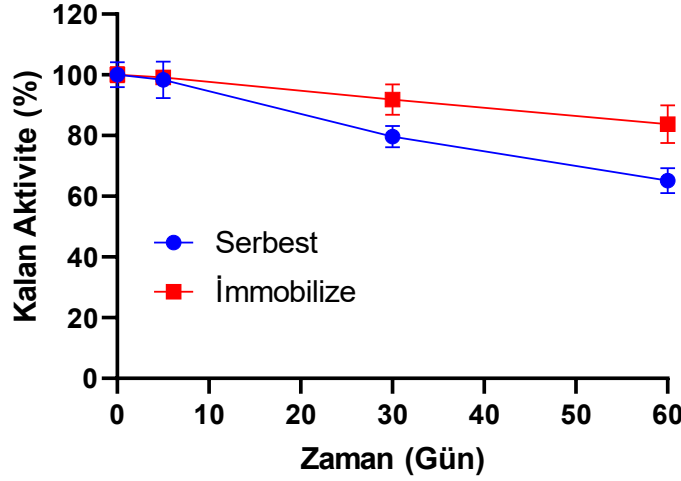
Farklı taşıyıcı sistemler bazında bakıldığında, pektinazın katı desteklerle bağlanması her zaman difüzyonel bariyerlere beraberinde getirmektedir. Konuyla ilgili olarak pektinazın

katyonik polistiren reçine boncuklarına glutaraldehit ile immobilize edildiği bir başka araştırmada, serbest enzimin K_m değeri 1.95 mM iken immobilize formda bu değerin 5.36 mM seviyesine çıktığı bulunmuştur (Miao vd., 2021). Yani substrat afinitesinde mevcut çalışmamıza kıyasla çok daha fazla bir düşüş yaşandığı bildirilmiştir. Makro boyutlu gözenekli matrislerde ya da polimerik membranlarda gözlenen bu yüksek afinite kayıpları substratın gözenek derinliklerine sızmasındaki zorluktan kaynaklanmaktadır (A. Sheldon & Pelt, 2013). Mevcut çalışmamızda nano boyutlu bir taşıyıcı platformun tercih edilmiş olması makro taşıyıcılardaki bu kronik kütle transferi dezavantajlarını ortadan kaldırmış ve substrat erişilebilirliğini optimize etmiştir (Adeel vd., 2018). Çalışmamızdaki immobilize nanobiyokatalizörün sergilediği kararlı kritik performans, iyileştirilmiş termal kararlılık ve genişletilmiş operasyonel ömür ile birleştirildiğinde sistemin meyve suyu berraklaştırma gibi endüstriyel gıda proseslerinde serbest enzime kıyasla çok daha ekonomik ve sürdürülebilir alternatif sunduğu kanıtlanmaktadır.

4.9. Depolama Stabilite Analizi

Endüstriyel uygulamalarda enzim kullanımının yüksek maliyeti ve zaman alıcı enzim immobilizasyon prosesleri nedeniyle, uzun vadeli enzim stabilitesine duyulan ihtiyaç, modern biyoteknolojideki araştırmacıların hedeflerinden biridir. Serbest enzimler, çözelti ortamında zamanla meydana gelen agregasyon, kendi kendini sindirme (otoliz) veya mikrobiyal kontaminasyon gibi etkenler neticesinde üç boyutlu özgün protein yapılarının kaybederek hızla inaktif hale gelmektedir. Enzimin katı bir destek üzerine kovalent olarak bağlanması ise protein yapısına konformasyonel bir rijitlik kazandırarak dış çevrenin olumsuz fizikokimyasal etkilerine karşı korunaklı bir mikro çevre oluşturur.

Şekil 4.12, serbest ve immobilize edilmiş enzimlerin pektin olmadan +4 °C'de fosfat tamponunda (pH 5.0) depolama kararlılığını göstermektedir ve kalan aktiviteleri 5, 30 ve 60 gün sonra ölçülmüştür. Uzun vadeli stabilitenin immobilizasyon işleminden sonra arttığı görüldü. İmmobilize edilmiş enzim, 60 gün sonra bile başlangıç aktivitesinin %83,76'sını korumuştur. Serbest enzim ise aynı süre sonunda başlangıç aktivitesinin %65,11'ini koruyabilmiştir. Sonuçlar, enzimin immobilizasyon sonrası daha kararlı bir hal kazandığını göstermiştir.



Şekil 4.12. Serbest ve immobilize pektinazın depolama stabilitesi.

Literatürde yer alan benzer çalışmalar incelendiğinde, pektinaz enziminin depolama kararlılığının katı desteklere immobilizasyon yoluyla artırılabilir ancak artış oranının kullanılan matriksin kimyasal yapısına ve immobilizasyon yöntemine doğrudan bağlı olduğu görülmektedir. Örneğin, pektinazın silika kaplı manyetit nanopartiküllere glutaraldehit ile kovalent bağlanması üzerine yapılan bir çalışmada, 30 günlük depolama sonunda kalan aktivitenin yaklaşık %78,9 olduğu rapor edilmiştir (Fang vd., 2016). Diğer bir çalışmada pektinaz enzimi, makromoleküler bir çapraz bağlayıcı olan dekstran poliadehit aracılığıyla kitosan manyetik nanopartiküllere kovalent olarak bağlanmış ve 15 günlük depolama periyodu sonunda kalan aktivitenin %89 seviyesinde korunduğu bildirilmiştir (Sojitra vd., 2017).

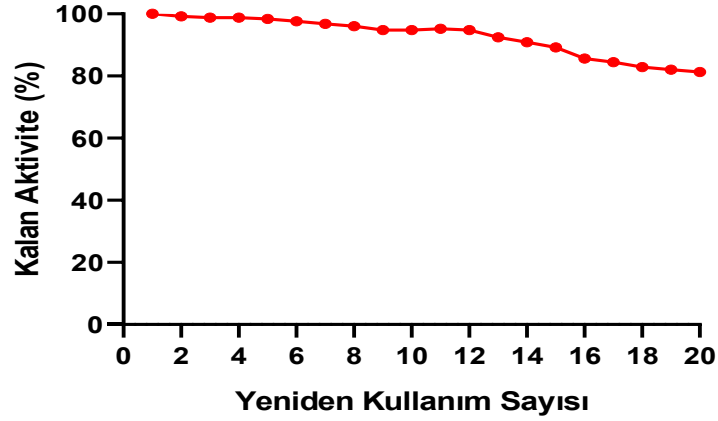
İmmobilize enzimin sergilediği depolama stabilitesi, manyetik nanopartiküller ile enzim molekülleri arasında kurulan çok noktalı kovalent bağların sağladığı yapısal rijitliğe bağlanabilir (Behram vd., 2023). Bu güçlü etkileşimler, enzimin katalitik olarak aktif üç boyutlu konformasyonunun bozulmasını fiziksel olarak önler. Serbest enzim çözeltide çevresel stres faktörlerine karşı daha savunmasızken ve protein agregasyonu veya denatürasyon süreçlerine yatkınken, manyetik nanopartikül matrisi, enzimi dış etkilerden izole eden koruyucu bir mikro ortam oluşturmuştur. Bu sonuçlar, kovalent sabitleme stratejisinin yalnızca anlık katalitik verimliliği değil, aynı zamanda enzimin uzun vadeli operasyonel ve lojistik sürdürülebilirliğini de optimize ettiğini doğrulamaktadır.

4.10. İmmobilize Pektinazın Yeniden Kullanılabilirlik Analizi

Endüstriyel biyoproseslerde enzim kullanımının ekonomik sürdürülebilirliğini belirleyen en temel parametrelerden biri, biyokatalizörün katalitik aktivitesini kaybetmeden ardışık reaksiyon döngülerinde kullanılabilme kapasitesidir. Serbest enzimler, reaksiyon ortamından geri kazanılamamaları nedeniyle tek kullanımlık bir karakter sergilerken; enzimlerin uygun bir destek materyaline immobilize edilmesi, bu kısıtlılığın aşılmasını ve operasyonel maliyetlerin minimize edilmesini sağlar (Behram vd., 2023; Sojitra vd., 2017). Bu çalışma kapsamında, manyetik demir oksit nanopartiküller üzerine kovalent olarak immobilize edilen pektinaz enziminin operasyonel stabilitesi, pH 5.0 ve 50 °C optimum koşulları altında 20 ardışık kullanım döngüsü boyunca taze bir reaksiyon ortamı hazırlanılarak test edilmiştir.

İmmobilize pektinazın 20 döngü sonunda dahi başlangıç aktivitesinin %81'inden fazlasını koruması, enzim ile manyetik demir oksit nanopartikül yüzeyi arasında glutaraldehit aracılığıyla kurulan güçlü kovalent bağlara atfedilebilir. Kovalent bağlanma stratejisi, enzimin üç boyutlu yapısında konformasyonel bir rijitlik kazandırarak, ardışık kullanım sırasında meydana gelebilecek protein denatürasyonunu ve destekten sızıntı problemini önemli ölçüde engellemiştir. Literatürde manyetik nanopartiküller üzerine immobilize edilen pektinaz çalışmaları ile kıyaslandığında; 10 döngü sonunda %55 ve 7 döngü sonunda %64,4 kalan aktivite gibi sonuçlar rapor edilmiştir (Fang vd., 2016; Kharazmi, Taheri-Kafrani, & Soozanipour, 2020). Bu çalışmanın bulguları (20 döngü, >%81 aktivite), geliştirilen sitemin literatürdeki benzerlerinden daha yüksek bir operasyonel stabilite sunduğunu kanıtlamaktadır.

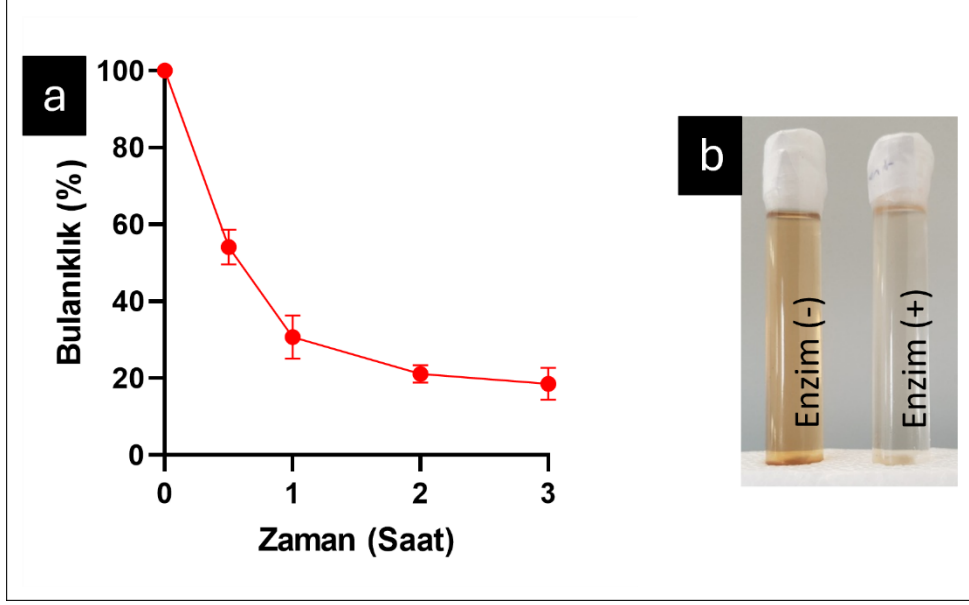
Bu yüksek stabilite performansı, manyetik nanopartiküllerin sahip olduğu yüksek yüzey alanı/hacim oranının substrat (pektin) erişilebilirliğini kolaylaştırması ve glutaraldehitin oluşturduğu çapraz bağların sağladığı yapısal kararlılık ile açıklanabilir (Rehman vd., 2013). Sonuç olarak, geliştirilen nanobiyokatalizör yüksek yeniden kullanılabilirlik potansiyeli ile endüstriyel meyve suyu berraklaştırma proseslerinde maliyet etkin ve yeşil bir alternatif sunmaktadır.



Şekil 4.13. Yeniden kullanılabilirlik çalışması

4.11. Üzüm Suyunun Berraklaştırılması

Meyve sularının bulanık ve puslu görünümü, pektin ve pektik bileşenlerin varlığından kaynaklanır. Bu nedenle, bu polisakkaritlerin pektinaz tarafından parçalanması, kalite özelliklerinin ve depolama stabilitesinin iyileştirilmesine yardımcı olur (Dal Magro vd., 2016; Sojitra vd., 2017). Berraklaştırma çalışmaları için üzüm suyu, immobilize pektinaz kullanılarak işlendi (Şekil 4.14). Elde edilen üzüm suyu iki farklı tüpe konuldu (Şekil 4.14b). Tüplerden biri kontrol olarak seçildi ve enzim ilavesi yapılmadı (Enzim(-)). Diğer tüpe immobilize enzim konularak 3 saat inkübasyona bırakıldı (Enzim(+)). Üzüm suyunun berraklaştırılması, spektroskopik yöntemle bulanıklık azaltımı açısından ölçüldü. İmmobilize pektinaz 30 dakikada %48 bulanıklık azaltımı sergiledi. Zamanla immobilize pektinaz muamelesi ile bulanıklık 180 dakikalık muameleden sonra %18'e kadar azaldı.



Şekil 4.14. (a) Üzüm suyunun zamana bağlı bulanıklık gösterimi, Enzim ile işlenmemiş üzüm suyu (solda) ve (b) immobilize enzimle işlenmiş üzüm suyu (sağda).

Üzüm suyundaki bulanıklığın hızla azalması, pektinazın askıda bulunan parçacıkları çevreleyen pektin kılıfını parçalamasıyla açıklanmaktadır (Patel vd., 2022). Pektin moleküllerinin enzimatik hidrolizi, parçacıklar arasındaki elektrostatik itici kuvvetleri ortadan kaldırarak agregasyona ve çökelmeye yol açar ve böylece berraklığı artırır. İmmobilize sistemin, özellikle ilk 60 dakika içindeki yüksek performansı, manyetik nanopartiküllerin geniş yüzey alanının enzim-substrat etkileşimini optimize ettiğini göstermektedir. Ayrıca, 2 saat sonra elde edilen düşük bulanıklık verileri, ticari berraklaştırma standartlarıyla tutarlıdır. Bu bulgular, geliştirilen nano-biyokatalizörün sadece yüksek stabilite sunmakla kalmayıp, aynı zamanda meyve suyu endüstrisinde operasyonel verimliliği artıracak güçlü bir alternatif olduğunu ortaya koymaktadır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Pektinaz gibi enzimlerin üretim ve saflaştırma ile ilişkili yüksek maliyetlerin yanında operasyonel stabiliteilerinin zayıf olması, yüksek sıcaklık ve pH değişimlerine karşı hassas olmaları, kullanımlarını sınırlamaktadır. Bu araştırma, pektinazın fonksiyonelleştirilmiş MNP'lere immobilizasyonu, biyokatalizörlerin hızlı manyetik ayırma yoluyla yeniden kullanılmasını sağlayarak maliyetleri düşürmektedir. İmmobilize edilmiş pektinaz iyi aktivite göstermiş ve 20 ardışık hidroliz adımından sonra geri dönüştürülebilmiştir. Pektin hidrolizinde 20 ardışık kullanımdan sonra %81,27 gibi yüksek bir yeniden kullanılabilirlik sergilediğinin altını çizmek önemlidir. Bu, maliyetleri düşürmede ve immobilize edilmiş pektinazın endüstriyel uygulamalar için kullanılabilirliğini artırmada önemli bir faktördür. Ayrıca, immobilize formdaki pektinaz, serbest enzime göre pH ve sıcaklık değişimlerine daha iyi uyum sağlamıştır. İmmobilize edilmiş enzimin depolama stabilitesi, serbest enzime göre daha kararlı davranış sergilemiştir. Sonuç olarak; manyetik nanopartiküller üzerine immobilize edilen pektinaz enziminin, yüksek stabilitesi, kolay geri kazanımı ve tekrar kullanılabilirliği sayesinde, serbest enzimin endüstriyel uygulamalardaki dezavantajlarını ortadan kaldıracak güçlü ve sürdürülebilir bir alternatif olduğu gösterilmiştir.

Gelecek çalışmalarda bağlanma verimini artırmak amacıyla, glutaraldehit dışındaki farklı uzunluktaki ayırıcı kolların veya polimerik çapraz bağlayıcıların denenmesi katalitik aktiviteyi daha da artırabilir.

Meyve suyu endüstrisinde genellikle pektinaz enzimi tek başına yeterli olmamaktadır. Gelecek çalışmalarda pektinazın, selülaz ve ksilanaz gibi diğer hücre duvarı yıkıcı enzimlerle birlikte aynı manyetik nanopartikül üzerine immobilize edilmesi proses verimliliğini maksimize edecektir.

Nanopartiküllerin gıda sektörü uygulamalarında kullanılabilmesi için son ürüne nanopartikül sızıntısı (leaching) olup olmadığının hassas analitik yöntemlerle incelenmesi ve *in vivo/in vitro* toksisite testlerinin yapılması büyük önem taşımaktadır.

Sentezlenen nanobiyokatalizörün sadece meyve suyu berraklaştırmada değil; aynı zamanda tarımsal atıklardan (elma posası, narenciye kabukları vb.) pektik oligosakkarit üretimi veya biyoyakıt prosesleri gibi katma değeri yüksek diğer biyoteknolojik alanlarda da potansiyeli araştırılmalıdır.

KAYNAKÇA

- Abaházi, E., Lestál, D., Boros, Z., & Poppe, L. (2016). Tailoring the Spacer Arm for Covalent Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B—Thermal Stabilization by Bisepoxide-Activated Aminoalkyl Resins in Continuous-Flow Reactors. *Molecules*, *21*(6), 767. <https://doi.org/10.3390/molecules21060767>
- Adalberto, P. R., José Dos Santos, F., Golfeto, C. C., Costa Iemma, M. R., Ferreira De Souza, D. H., & Cass, Q. B. (2012). Immobilization of pectinase from *Leucoagaricus gongylophorus* on magnetic particles. *The Analyst*, *137*(20), 4855. <https://doi.org/10.1039/c2an35682a>
- Adeel, M., Bilal, M., Rasheed, T., Sharma, A., & Iqbal, H. M. N. (2018). Graphene and graphene oxide: Functionalization and nano-bio-catalytic system for enzyme immobilization and biotechnological perspective. *International Journal of Biological Macromolecules*, *120*, 1430-1440. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.09.144>
- Ako, H., & Nip, W. K. (2006). Enzyme Classification and Nomenclature. İçinde Y. H. Hui (Ed.), *Food Biochemistry and Food Processing* (1. bs., ss. 135-154). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470277577.ch6>
- Alkorta, I., Garbisu, C., María, J. L., & Serra, J. L. (1996). Immobilization of pectin lyase from *Penicillium italicum* by covalent binding to nylon. *Enzyme and Microbial Technology*, *18*(2), 141-146. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00094-1](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00094-1)
- Al-Maqdi, K. A., Elmerhi, N., Athamneh, K., Bilal, M., Alzamly, A., Ashraf, S. S., & Shah, I. (2021). Challenges and Recent Advances in Enzyme-Mediated Wastewater Remediation—A Review. *Nanomaterials*, *11*(11), 3124. <https://doi.org/10.3390/nano11113124>
- Amin, F., Asad, S. A., Nazli, Z.-H., Kalsoom, U., Bhatti, H. N., & Bilal, M. (2023). Immobilization, biochemical, thermodynamic, and fruit juice clarification properties of lignocellulosic biomass-derived exo-polygalacturonase from *Penicillium paxilli*. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *13*(14), 13181-13196. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02559-1>
- Amin, F., Bhatti, H. N., & Bilal, M. (2019). Recent advances in the production strategies of microbial pectinases—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *122*, 1017-1026. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.048>
- Amin, F., Bhatti, H. N., Bilal, M., & Asgher, M. (2017a). Improvement of activity, thermostability and fruit juice clarification characteristics of fungal exo-polygalacturonase. *International Journal of Biological Macromolecules*, *95*, 974-984. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.10.086>
- Amin, F., Bhatti, H. N., Bilal, M., & Asgher, M. (2017b). Multiple Parameter Optimizations for Enhanced Biosynthesis of Exo-polygalacturonase Enzyme and its Application in Fruit Juice Clarification. *International Journal of Food Engineering*, *13*(2), 20160256. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2016-0256>
- An, N., Zhou, C. H., Zhuang, X. Y., Tong, D. S., & Yu, W. H. (2015). Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors. *Applied Clay Science*, *114*, 283-296. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.05.029>
- Anand, G., Yadav, S., & Yadav, D. (2017). Purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus flavus* MTCC 7589. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *10*, 264-269. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.03.018>

- Anuradha, K., Padma, P. N., Venkateshwar, S., & Reddy, G. (2010). Fungal isolates from natural pectic substrates for polygalacturonase and multienzyme production. *Indian Journal of Microbiology*, *50*(3), 339-344. <https://doi.org/10.1007/s12088-010-0054-5>
- A. Sheldon, R., & Pelt, S. van. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chemical Society Reviews*, *42*(15), 6223-6235. <https://doi.org/10.1039/C3CS60075K>
- Aslani, E., Abri, A., & Pazhang, M. (2018). Immobilization of trypsin onto Fe₃O₄@SiO₂ – NH₂ and study of its activity and stability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *170*, 553-562. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.022>
- Bahrami, A., & Hejazi, P. (2013). Electrostatic immobilization of pectinase on negatively charged AOT-Fe₃O₄ nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *93*, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.03.010>
- Bahri, S., Homaei, A., & Mosaddegh, E. (2022). Zinc sulfide-chitosan hybrid nanoparticles as a robust surface for immobilization of Sillago sihama α -amylase. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *218*, 112754. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112754>
- Bai, Y., Yang, H., Yang, W., Li, Y., & Sun, C. (2007). Gold nanoparticles-mesoporous silica composite used as an enzyme immobilization matrix for amperometric glucose biosensor construction. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *124*(1), 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.12.020>
- Bailey, J. E., & Cho, Y. K. (1983). Immobilization of glucoamylase and glucose oxidase in activated carbon: Effects of particle size and immobilization conditions on enzyme activity and effectiveness. *Biotechnology and Bioengineering*, *25*(8), 1923-1935. <https://doi.org/10.1002/bit.260250803>
- Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2013). Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Advances*, *4*(4), 1583-1600. <https://doi.org/10.1039/C3RA45991H>
- Barbosa, O., Torres, R., Ortiz, C., & Fernandez-Lafuente, R. (2012). Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. *Process Biochemistry*, *47*(8), 1220-1227. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2012.04.019>
- Başaran, S., & Işık, M. (2025). Enhancement of Catalytic Stability and Kinetic Evaluation of Acetylcholinesterase Immobilized on Functionalized Fe₃ O₄ Magnetic Nanoparticles. *ChemistrySelect*, *10*(30), e02600. <https://doi.org/10.1002/slct.202502600>
- Baumann, J. (1981). Application of enzymes in fruit juice technology. İçinde *Enzymes and food processing* (ss. 129-147). Springer.
- Behram, T., Pervez, S., Nawaz, M. A., Ahmad, S., Jan, A. U., Rehman, H. U., Ahmad, S., Khan, N. M., & Khan, F. A. (2023). Development of Pectinase Based Nanocatalyst by Immobilization of Pectinase on Magnetic Iron Oxide Nanoparticles Using Glutaraldehyde as Crosslinking Agent. *Molecules*, *28*(1), 404. <https://doi.org/10.3390/molecules28010404>
- Beilen, J. B. van, & Li, Z. (2002). Enzyme technology: An overview. *Current Opinion in Biotechnology*, *13*(4), 338-344. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00334-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00334-8)

- Benucci, I., Mazzocchi, C., Lombardelli, C., Cacciotti, I., & Esti, M. (2019). Multi-enzymatic Systems Immobilized on Chitosan Beads for Pomegranate Juice Treatment in Fluidized Bed Reactor: Effect on Haze-Active Molecules and Chromatic Properties. *Food and Bioprocess Technology*, *12*(9), 1559-1572. <https://doi.org/10.1007/S11947-019-02315-W/TABLES/3>
- Bhardwaj, V., Degrassi, G., & Bhardwaj, R. K. (2017). Microbial pectinases and their applications in industries: A review. *polymer*, *4*(8), 829-836.
- Bilal, M., Zhao, Y., Noreen, S., Shah, S. Z. H., Bharagava, R. N., & Iqbal, H. M. N. (2019). Modifying bio-catalytic properties of enzymes for efficient biocatalysis: A review from immobilization strategies viewpoint. *Biocatalysis and Biotransformation*, *37*(3), 159-182. <https://doi.org/10.1080/10242422.2018.1564744>
- Biró, E., Németh, Á. Sz., Sisak, C., Feczko, T., & Gyenis, J. (2008). Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *70*(6), 1240-1246. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2007.11.005>
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, *1*(1-6), 41-55. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>
- Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Enzymes. *Içinde Medical Biochemistry* (ss. 153-175). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00008-2>
- Bolivar, J. M., Valikhani, D., & Nidetzky, B. (2019). Demystifying the Flow: Biocatalytic Reaction Intensification in Microstructured Enzyme Reactors. *Biotechnology Journal*, *14*(3), 1800244. <https://doi.org/10.1002/biot.201800244>
- Bolivar, J. M., Woodley, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2022). Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization. *Chemical Society Reviews*, *51*(15), 6251-6290. <https://doi.org/10.1039/D2CS00083K>
- Bommarius, A. S., & Paye, M. F. (2013). Stabilizing biocatalysts. *Chemical Society Reviews*, *42*(15), 6534-6565. <https://doi.org/10.1039/C3CS60137D>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brady, D., & Jordaan, J. (2009). Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology Letters*, *31*(11), 1639-1650. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0076-4>
- Brasil, I. M., Maia, G. A., & de Figueiredo, R. W. (1995). Physical-chemical changes during extraction and clarification of guava juice. *Food Chemistry*, *54*(4), 383-386. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00066-R](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00066-R)
- Burek, B. O., Dawood, A. W. H., Hollmann, F., Liese, A., & Holtmann, D. (2022). Process Intensification as Game Changer in Enzyme Catalysis. *Frontiers in Catalysis*, *2*, 858706. <https://doi.org/10.3389/fctls.2022.858706>
- C Rodrigues, R., Hernandez, K., Barbosa, O., Rueda, N., Garcia-Galan, C., CS dos Santos, J., Berenguer-Murcia, A., & Fernandez-Lafuente, R. (2015). Immobilization of proteins in poly-styrene-divinylbenzene matrices: Functional properties and applications. *Current Organic Chemistry*, *19*(17), 1707-1718.

- Caffall, K. H., & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research, Pectin: Structure and Function*, 344(14), 1879-1900. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021>
- Cantone, S., Ferrario, V., Corici, L., Ebert, C., Fattor, D., Spizzo, P., & Gardossi, L. (2013). Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: Criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6262. <https://doi.org/10.1039/c3cs35464d>
- Cao, L. (2005). Immobilised enzymes: Science or art? *Current Opinion in Chemical Biology, Bioorganic chemistry / Biocatalysis and biotransformation*, 9(2), 217-226. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.02.014>
- Carballares, D., Rocha-Martin, J., & Fernandez-Lafuente, R. (2022). Chemical amination of immobilized enzymes for enzyme coimmobilization: Reuse of the most stable immobilized and modified enzyme. *International Journal of Biological Macromolecules*, 208, 688-697. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.151>
- Carlsson, N., Gustafsson, H., Thörn, C., Olsson, L., Holmberg, K., & Åkerman, B. (2014). Enzymes immobilized in mesoporous silica: A physical–chemical perspective. *Advances in Colloid and Interface Science*, 205, 339-360. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.08.010>
- Carneiro, L., dos Santos Sa, I., dos Santos Gomes, F., Matta, V. M., & Cabral, L. M. C. (2002). Cold sterilization and clarification of pineapple juice by tangential microfiltration. *Desalination*, 148(1), 93-98. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00659-8](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00659-8)
- Cerreti, M., Liburdi, K., Benucci, I., & Esti, M. (2016). The effect of pectinase and protease treatment on turbidity and on haze active molecules in pomegranate juice. *LWT*, 73, 326-333. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.030>
- Cerreti, M., Liburdi, K., Benucci, I., Spinelli, S. E., Lombardelli, C., & Esti, M. (2017). Optimization of pectinase and protease clarification treatment of pomegranate juice. *LWT - Food Science and Technology*, 82, 58-65. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2017.04.022>
- Cerreti, M., Markošová, K., Esti, M., Rosenberg, M., & Rebroš, M. (2017). Immobilisation of pectinases into PVA gel for fruit juice application. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(2), 531-539. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13309>
- Chalella Mazzocato, M., & Jacquier, J.-C. (2024). Recent Advances and Perspectives on Food-Grade Immobilisation Systems for Enzymes. *Foods*, 13(13), 2127. <https://doi.org/10.3390/foods13132127>
- Chamchong, M., & Noomhorm, A. (1991). EFFECT of pH and ENZYMATIC TREATMENT ON MICROFILTRATION and ULTRAFILTRATION of TANGERINE JUICE. *Journal of Food Process Engineering*, 14(1), 21-34. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.1991.tb00079.x>
- Chaparro Sosa, A. F., Kienle, D. F., Falatach, R. M., Flanagan, J., Kaar, J. L., & Schwartz, D. K. (2018). Stabilization of Immobilized Enzymes via the Chaperone-Like Activity of Mixed Lipid Bilayers. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(23), 19504-19513. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b05523>
- Chen, J., Liu, W., Liu, C.-M., Li, T., Liang, R.-H., & Luo, S.-J. (2015). Pectin Modifications: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(12), 1684-1698. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.718722>

- Chen, Z., Zhang, J., Singh, S., Peltier-Pain, P., Thorson, J. S., & Hinds, B. J. (2014). Functionalized Anodic Aluminum Oxide Membrane–Electrode System for Enzyme Immobilization. *ACS Nano*, 8(8), 8104-8112. <https://doi.org/10.1021/nn502181k>
- Copeland, R. A. (2023). *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. John Wiley & Sons.
- Cosimo, R. D., Auliffe, J. M., Poulouse, A. J., & Bohlmann, G. (2013). Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6437-6474. <https://doi.org/10.1039/C3CS35506C>
- Coşkun, G., Çıplak, Z., Yıldız, N., & Mehmetoğlu, Ü. (2021). Immobilization of *Candida antarctica* Lipase on Nanomaterials and Investigation of the Enzyme Activity and Enantioselectivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(2), 430-445. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03443-2>
- Cui, J., Jia, S., Liang, L., Zhao, Y., & Feng, Y. (2015). Mesoporous CLEAs-silica composite microparticles with high activity and enhanced stability. *Scientific Reports*, 5(1), 14203. <https://doi.org/10.1038/srep14203>
- da Silva, P. M., Esparza-Flores, E. E., Virgili, A. H., de Menezes, E. W., Fernandez-Lafuente, R., Dal Magro, L., & Rodrigues, R. C. (2023). Effect of Support Matrix and Crosslinking Agents on Nutritional Properties of Orange Juice during Enzyme Clarification: A Comparative Study. *Foods*, 12(21), 3919. <https://doi.org/10.3390/foods12213919>
- Dai, H. (2002). Carbon Nanotubes: Synthesis, Integration, and Properties. *Accounts of Chemical Research*, 35(12), 1035-1044. <https://doi.org/10.1021/ar0101640>
- Dal Magro, L., Hertz, P. F., Fernandez-Lafuente, R., Klein, M. P., & Rodrigues, R. C. (2016). Preparation and characterization of a Combi-CLEAs from pectinases and cellulases: A potential biocatalyst for grape juice clarification. *RSC Advances*, 6(32), 27242-27251. <https://doi.org/10.1039/C6RA03940E>
- Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: An overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.1007/S13205-012-0071-7>
- De Santis, P., Meyer, L.-E., & Kara, S. (2020). The rise of continuous flow biocatalysis – fundamentals, very recent developments and future perspectives. *Reaction Chemistry & Engineering*, 5(12), 2155-2184. <https://doi.org/10.1039/D0RE00335B>
- Decsi, B., Krammer, R., Hegedűs, K., Ender, F., Gyarmati, B., Szilágyi, A., Tóth, R., Katona, G., Paizs, C., Balogh, G. T., Poppe, L., & Balogh-Weiser, D. (2019). Liver-on-a-Chip–Magnetic Nanoparticle Bound Synthetic Metalloporphyrin-Catalyzed Biomimetic Oxidation of a Drug in a Magnechip Reactor. *Micromachines*, 10(10), 668. <https://doi.org/10.3390/mi10100668>
- Demir, E. (2021). A review on nanotoxicity and nanogenotoxicity of different shapes of nanomaterials. *Journal of Applied Toxicology*, 41(1), 118-147. <https://doi.org/10.1002/jat.4061>
- Deshmukh, P. S., Manjunatha, S. S., & Raju, P. S. (2015). Rheological behaviour of enzyme clarified sapota (*Achras sapota* L) juice at different concentration and temperatures. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 1896-1910. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1222-5>

- Díaz, I., & Martínez, M. (2013). Plant C1A Cysteine Peptidases in Germination and Senescence. İçinde *Handbook of Proteolytic Enzymes* (ss. 1852-1858). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00417-8>
- Dwevedi, A. (2016). *Enzyme Immobilization*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41418-8>
- Dwevedi, A., & Kayastha, A. M. (2009). Optimal immobilization of β -galactosidase from Pea (PsBGAL) onto Sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its applications. *Bioresource Technology*, *100*(10), 2667-2675. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.048>
- Echavarría, A. P., Torras, C., Pagán, J., & Ibarz, A. (2011). Fruit Juice Processing and Membrane Technology Application. *Food Engineering Reviews*, *3*(3-4), 136-158. <https://doi.org/10.1007/S12393-011-9042-8>
- Ender, F., Weiser, D., & Poppe, L. (2016). Microfluidic Multiple Chamber Chip Reactor Filled with Enzyme-Coated Magnetic Nanoparticles. İçinde M. Stoytcheva & R. Zlatev (Ed.), *Lab-on-a-Chip Fabrication and Application*. InTech. <https://doi.org/10.5772/62512>
- Faber, K. (2018). *Biotransformations in Organic Chemistry*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-61590-5>
- Fang, G., Chen, H., Zhang, Y., & Chen, A. (2016). Immobilization of pectinase onto Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ and its activity and stability. *International Journal of Biological Macromolecules*, *88*, 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.059>
- Fasim, A., More, V. S., & More, S. S. (2021). Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Current Opinion in Biotechnology*, *69*, 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.002>
- Fehér, A., Bedó, S., & Fehér, C. (2021). Comparison of Enzymatic and Acidic Fractionation of Corn Fiber for Glucose-rich Hydrolysate and Bioethanol Production by *Candida boidinii*. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, *65*(3), 320-330. <https://doi.org/10.3311/PPch.17431>
- García-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernández-Lafuente, R., & Rodrigues, R. C. (2011). Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, *353*(16), 2885-2904. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>
- Garg, G., Singh, A., Kaur, A., Singh, R., Kaur, J., & Mahajan, R. (2016). Microbial pectinases: An ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech*, *6*(1), 47. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0371-4>
- Gebreyohannes, A. Y., Mazzei, R., Poerio, T., Aimar, P., Vankelecom, I. F. J., & Giorno, L. (2016). Pectinases immobilization on magnetic nanoparticles and their anti-fouling performance in a biocatalytic membrane reactor. *RSC Advances*, *6*(101), 98737-98747. <https://doi.org/10.1039/C6RA20455D>
- Girard, B., & Fukumoto, L. R. (1999). Apple Juice Clarification Using Microfiltration and Ultrafiltration Polymeric Membranes. *LWT - Food Science and Technology*, *32*(5), 290-298. <https://doi.org/10.1006/fstl.1999.0554>
- Golchin, K., Golchin, J., Ghaderi, S., Alidadiani, N., Eslamkhah, S., Eslamkhah, M., Davaran, S., & Akbarzadeh, A. (2018). Gold nanoparticles applications: From artificial enzyme

- till drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(2), 250-254. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1305393>
- Goldhahn, C., Burgert, I., & Chanana, M. (2019). Nanoparticle-Mediated Enzyme Immobilization on Cellulose Fibers: Reusable Biocatalytic Systems for Cascade Reactions. *Advanced Materials Interfaces*, 6(19), 1900437. <https://doi.org/10.1002/admi.201900437>
- González-Delgado, I., Segura, Y., Martín, A., López-Muñoz, M. J., & Morales, G. (2018). β -galactosidase covalent immobilization over large-pore mesoporous silica supports for the production of high galacto-oligosaccharides (GOS). *Microporous and Mesoporous Materials*, 257, 51-61. <https://doi.org/10.1016/J.MICROMESO.2017.08.020>
- González-Temiño, Y., Ruíz, M. O., Ortega, N., Ramos-Gómez, S., & Busto, M. D. (2021). Immobilization of naringinase on asymmetric organic membranes: Application for debittering of grapefruit juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 73, 102790. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102790>
- Guan, T., Liu, B., Wang, R., Huang, Y., Luo, J., & Li, Y. (2021). The enhanced fatty acids flavor release for low-fat cheeses by carrier immobilized lipases on O/W Pickering emulsions. *Food Hydrocolloids*, 116, 106651. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106651>
- Guisan, J. M. (Ed.). (2016). *Immobilization of enzymes and cells* (Softcover reprint of the original 3rd edition 2013). Humana Press.
- Guisan, J. M., Bolivar, J. M., López-Gallego, F., & Rocha-Martín, J. (Ed.). (2020). *Immobilization of Enzymes and Cells: Methods and Protocols* (C. 2100). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0215-7>
- Gupta, A. K., & Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18), 3995-4021. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.012>
- Gupta, A. K., Yumnam, M., Medhi, M., Koch, P., Chakraborty, S., & Mishra, P. (2021). Isolation and characterization of naringinase enzyme and its application in debittering of Pomelo juice (*Citrus grandis*): A comparative study with macroporous resin. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(5), e15380. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15380>
- Hamdy, H. S. (2005). Purification and characterization of pectin lyase produced by *Rhizopus oryzae* grown on orange peels. *Annals of Microbiology*, 55(3), 205.
- Hamid, A., Rumysa, R. |, Khan, S., Taha, |, Wani, U., Mushtaq, |, Beigh, A., Sheikh, F. A., Jammu, Kashmir, & Correspondance, I. (2022). Overview on immobilization of enzymes on synthetic polymeric nanofibers fabricated by electrospinning. *Biotechnology and Bioengineering*, 119(1), 9-33. <https://doi.org/10.1002/BIT.27963>
- Hanefeld, U., Cao, L., & Magner, E. (2013). Enzyme immobilisation: Fundamentals and application. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6211. <https://doi.org/10.1039/c3cs90042h>
- Hanefeld, U., Gardossi, L., & Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*, 38(2), 453-468. <https://doi.org/10.1039/B711564B>
- Harholt, J., Suttangkakul, A., & Vibe Scheller, H. (2010). Biosynthesis of Pectin. *Plant Physiology*, 153(2), 384-395. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156588>

- Hartmann, M., & Kostrov, X. (2013). Immobilization of enzymes on porous silicas – benefits and challenges. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6277. <https://doi.org/10.1039/c3cs60021a>
- Hedstrom, L. (2010). Enzyme Specificity and Selectivity. İçinde Wiley, *Encyclopedia of Life Sciences* (1. bs.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000716.pub2>
- Herizchi, R., Abbasi, E., Milani, M., & Akbarzadeh, A. (2016). Current methods for synthesis of gold nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(2), 596-602. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.971807>
- Hickey, A. M., Marle, L., McCreedy, T., Watts, P., Greenway, G. M., & Littlechild, J. A. (2007). Immobilization of thermophilic enzymes in miniaturized flow reactors. *Biochemical Society Transactions*, 35(6), 1621-1623. <https://doi.org/10.1042/BST0351621>
- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., & Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: An update. *Journal of Chemical Biology*, 6(4), 185-205. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>
- Homaei, A., & Saberi, D. (2015). Immobilization of α -amylase on gold nanorods: An ideal system for starch processing. *Process Biochemistry*, 50(9), 1394-1399. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.06.002>
- Huang, J., Lin, L., Sun, D., Chen, H., Yang, D., & Li, Q. (2015). Bio-inspired synthesis of metal nanomaterials and applications. *Chemical Society Reviews*, 44(17), 6330-6374. <https://doi.org/10.1039/C5CS00133A>
- Hussain, A., Rafeeq, H., Qasim, M., Jabeen, Z., Bilal, M., Franco, M., & Iqbal, H. M. N. (2021). Engineered tyrosinases with broadened bio-catalysis scope: Immobilization using nanocarriers and applications. *3 Biotech*, 11(8), 365. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02913-6>
- Hyde, E. D. E. R., Seyfaee, A., Neville, F., & Moreno-Atanasio, R. (2016). Colloidal Silica Particle Synthesis and Future Industrial Manufacturing Pathways: A Review. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 55(33), 8891-8913. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b01839>
- Ibrahim, I. A., Zikry, A., & Sharaf, M. A. (2010). Preparation of spherical silica nanoparticles: Stober silica. *J. Am. Sci*, 6(11), 985-989.
- Intisar, A., Hedar, M., Sharif, A., Ahmed, E., Hussain, N., Hadibarata, T., Shariati, M. A., & Smaoui, S. (2023). Enzyme immobilization on alginate biopolymer for biotechnological applications. İçinde *Microbial Biomolecules* (ss. 471-488). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99476-7.00008-9>
- Iwasaki, T., Mizutani, N., Watano, S., Yanagida, T., & Kawai, T. (2012). Hydrothermal synthesis of magnetite nanoparticles *via* sequential formation of iron hydroxide precipitates. *Journal of Experimental Nanoscience*, 7(4), 355-365. <https://doi.org/10.1080/17458080.2010.515250>
- Jadaun, J. S. (2018). Pectinase: A Useful Tool in Fruit Processing Industries. *Nutrition & Food Science International Journal*, 5(5). <https://doi.org/10.19080/NFSIJ.2018.05.555673>
- Jain, P. K., Huang, X., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2007). Review of Some Interesting Surface Plasmon Resonance-enhanced Properties of Noble Metal Nanoparticles and Their Applications to Biosystems. *Plasmonics*, 2(3), 107-118. <https://doi.org/10.1007/s11468-007-9031-1>

- Jayani, R. S., Saxena, S., & Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40(9), 2931-2944. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.026>
- Jesionowski, T., Zdarta, J., & Krajewska, B. (2014). Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption*, 20(5-6), 801-821. <https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>
- John, J., Kaimal, K. K. S., Smith, M. L., Rahman, P. K. S. M., & Chellam, P. V. (2020). Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 1086-1099. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.224>
- Kamal, S., Rehman, S., Bibi, I., Akhter, N., Amir, R., Alsanie, W. F., & Iqbal, H. M. N. (2022). Graphene oxide/chitosan composites as novel support to provide high yield and stable formulations of pectinase for industrial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 220, 683-691. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.101>
- Kant, S., Vohra, A., & Gupta, R. (2013). Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. *Protein Expression and Purification*, 87(1), 11-16. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.09.014>
- Katchalski-Katzir, E. (1993). Immobilized enzymes—Learning from past successes and failures. *Trends in Biotechnology*, 11(11), 471-478. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90080-S](https://doi.org/10.1016/0167-7799(93)90080-S)
- Kaushal, J., Mehandia, S., Singh, G., Raina, A., & Arya, S. K. (2018). Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 192-199. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.035>
- Kavuthodi, B., & Sebastian, D. (2018). Review on bacterial production of alkaline pectinase with special emphasis on *Bacillus* species. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 11(1), 18-30. <https://doi.org/10.21786/bbrc/11.1/4>
- Khan, M., Nakkeeran, E., & Umesh-Kumar, S. (2013). Potential Application of Pectinase in Developing Functional Foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4(1), 21-34. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182525>
- Khan, M. R. (2021). Immobilized enzymes: A comprehensive review. *Bulletin of the National Research Centre*, 45(1), 207. <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00649-0>
- Kharazmi, S., Taheri-Kafrani, A., & Soozanipour, A. (2020). Efficient immobilization of pectinase on trichlorotriazine-functionalized polyethylene glycol-grafted magnetic nanoparticles: A stable and robust nanobiocatalyst for fruit juice clarification. *Food Chemistry*, 325, 126890. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126890>
- Kharazmi, S., Taheri-Kafrani, A., Soozanipour, A., Nasrollahzadeh, M., & Varma, R. S. (2020). Xylanase immobilization onto trichlorotriazine-functionalized polyethylene glycol grafted magnetic nanoparticles: A thermostable and robust nanobiocatalyst for fruit juice clarification. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 402-413. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.06.273>
- Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 345-351. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00328-2)
- Kohli, P., & Gupta, R. (2015). Alkaline pectinases: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(3), 279-285. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.07.001>

- Kotnala, B., N, S. M., & Vasu, P. (2018). Purification and Characterization of a Salt-Dependent Pectin Methyltransferase from *Carica papaya* Fruit Mesocarp-Exocarp Tissue. *Journal of Food Science*, 83(8), 2062-2070. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14215>
- Kuddus, M. (2019). *Enzymes in food biotechnology: Production, applications, and future prospects*. Academic Press, an imprint of Elsevier.
- Kudr, J., Haddad, Y., Richtera, L., Heger, Z., Cernak, M., Adam, V., & Zitka, O. (2017). Magnetic Nanoparticles: From Design and Synthesis to Real World Applications. *Nanomaterials*, 7(9), 243. <https://doi.org/10.3390/nano7090243>
- Kujawa, J., Głodek, M., Li, G., Al-Gharabli, S., Knozowska, K., & Kujawski, W. (2021). Highly effective enzymes immobilization on ceramics: Requirements for supports and enzymes. *Science of The Total Environment*, 801, 149647. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149647>
- Kumar, A., & Sharma, R. (2012). Production of alkaline pectinase by bacteria (Cocci sps.) isolated from decomposing fruit materials. *Journal of Phytology*, 4, 1-5.
- Kumar, A., & Venkatesu, P. (2012). Overview of the Stability of α -Chymotrypsin in Different Solvent Media. *Chemical Reviews*, 112(7), 4283-4307. <https://doi.org/10.1021/cr2003773>
- Kumar, N., & Upadhyay, L. S. B. (2020). Enzyme Immobilization over Polystyrene Surface Using Cysteine Functionalized Copper Nanoparticle as a Linker Molecule. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191(3), 1247-1257. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03257-2>
- Lan, D., Li, B., & Zhang, Z. (2008). Chemiluminescence flow biosensor for glucose based on gold nanoparticle-enhanced activities of glucose oxidase and horseradish peroxidase. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(4), 934-938. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.07.064>
- Lara-Espinoza, C., Carvajal-Millán, E., Balandrán-Quintana, R., López-Franco, Y., & Rascón-Chu, A. (2018). Pectin and Pectin-Based Composite Materials: Beyond Food Texture. *Molecules*, 23(4), 942. <https://doi.org/10.3390/molecules23040942>
- Lee, C. H., Jin, E. S., Lee, J. H., & Hwang, E. T. (2020). Immobilization and Stabilization of Enzyme in Biomaterialized Calcium Carbonate Microspheres. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 553591. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.553591>
- Lee, C., Jang, S.-H., & Chung, H.-S. (2017). Improving the Stability of Cold-Adapted Enzymes by Immobilization. *Catalysts*, 7(4), 112. <https://doi.org/10.3390/catal7040112>
- Lei, Z., Bi, S., Hu, B., & Yang, H. (2007). Combined magnetic and chemical covalent immobilization of pectinase on composites membranes improves stability and activity. *Food Chemistry*, 105(3), 889-896. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2007.04.045>
- Lei, Z., & Jiang, Q. (2011). Synthesis and Properties of Immobilized Pectinase onto the Macroporous Polyacrylamide Microspheres. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2592-2599. <https://doi.org/10.1021/jf103719t>
- Leznicki, P., & Kulathu, Y. (2017). Mechanisms of regulation and diversification of deubiquitylating enzyme function. *Journal of Cell Science*, 130(12), 1997-2006. <https://doi.org/10.1242/jcs.201855>

- Li, F., Wu, W., Ning, A., & Wang, J. (2015). Surface Functionalization and Magnetic Motion of Hydrophobic Magnetic Nanoparticles with Different Sizes. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 13(1), 113-118. <https://doi.org/10.1515/ijcre-2014-0075>
- Li, Q. (2023). *Enzyme Under Confinement: From Biomaterials Development to Structural Basis Underlying the Functionality* [PhD Thesis]. North Dakota State University.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012). TECHNOLOGY PROSPECTING ON ENZYMES: APPLICATION, MARKETING AND ENGINEERING. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3), e201209017. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209017>
- Li, T., Li, S., Wang, N., & Tain, L. (2008). Immobilization and stabilization of pectinase by multipoint attachment onto an activated agar-gel support. *Food Chemistry*, 109(4), 703-708. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.012>
- Liese, A., & Hilterhaus, L. (2013). Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6236. <https://doi.org/10.1039/c3cs35511j>
- Liu, W., Wu, H., Li, B., Dong, C., Choi, M. M. F., & Shuang, S. (2013). Immobilization of platinum nanoparticles and glucose oxidase on eggshell membrane for glucose detection. *Analytical Methods*, 5(19), 5154-5160. <https://doi.org/10.1039/C3AY40327K>
- Lütz, S. (2013). Biocatalysts and Enzyme Technology. 2nd Edition. By Klaus Buchholz, Volker Kasche and Uwe Theo Bornscheuer. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(28), 7073-7073. <https://doi.org/10.1002/anie.201304275>
- Ma, M., Zhang, Y., & Gu, N. (2011). Peroxidase-like catalytic activity of cubic Pt nanocrystals. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 373(1), 6-10. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.08.007>
- Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., & Azzazy, H. M. E.-S. (2023). Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. *ACS Omega*, 8(6), 5184-5196. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>
- Magro, L. D., Moura, K. S. de, Backes, B. E., Menezes, E. W. de, Benvenuti, E. V., Nicolodi, S., Klein, M. P., Fernandez-Lafuente, R., & Rodrigues, R. C. (2019). Immobilization of pectinase on chitosan-magnetic particles: Influence of particle preparation protocol on enzyme properties for fruit juice clarification. *Biotechnology Reports*, 24, e00373. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2019.E00373>
- Magro, L. D., Pessoa, J. P. S., Klein, M. P., Fernandez-Lafuente, R., & Rodrigues, R. C. (2021). Enzymatic clarification of orange juice in continuous bed reactors: Fluidized-bed versus packed-bed reactor. *Catalysis Today*, 362, 184-191. <https://doi.org/10.1016/J.CATTOD.2020.02.003>
- Majidi, S., Zeinali Sehrig, F., Farkhani, S. M., Soleymani Goloujeh, M., & Akbarzadeh, A. (2016). Current methods for synthesis of magnetic nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(2), 722-734. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.982802>
- Mannaa, M., Han, G., Seo, Y.-S., & Park, I. (2021). Evolution of Food Fermentation Processes and the Use of Multi-Omics in Deciphering the Roles of the Microbiota. *Foods*, 10(11), 2861. <https://doi.org/10.3390/foods10112861>

- Marangoni, A. G. (2003). *Enzyme kinetics: A modern approach*. John Wiley & Sons.
- Mariño, M. A., Moretti, P., & Tasic, L. (2023). Immobilized commercial cellulases onto amino-functionalized magnetic beads for biomass hydrolysis: Enhanced stability by non-polar silanization. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *13*(10), 9265-9275. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01798-y>
- Martín, M. C., López, O. V., Ciolino, A. E., Morata, V. I., Villar, M. A., & Ninago, M. D. (2019). Immobilization of enological pectinase in calcium alginate hydrogels: A potential biocatalyst for winemaking. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *18*. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101091>
- Martínez Cuesta, S., Rahman, S. A., Furnham, N., & Thornton, J. M. (2015). The Classification and Evolution of Enzyme Function. *Biophysical Journal*, *109*(6), 1082-1086. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.020>
- Martins, P. M., Lima, A. C., Ribeiro, S., Lanceros-Mendez, S., & Martins, P. (2021). Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications: From the Soul of the Earth to the Deep History of Ourselves. *ACS Applied Bio Materials*, *4*(8), 5839-5870. <https://doi.org/10.1021/acsbm.1c00440>
- Mathesh, M., Luan, B., Akanbi, T. O., Weber, J. K., Liu, J., Barrow, C. J., Zhou, R., & Yang, W. (2016). Opening Lids: Modulation of Lipase Immobilization by Graphene Oxides. *ACS Catalysis*, *6*(7), 4760-4768. <https://doi.org/10.1021/acscatal.6b00942>
- Matveeva, V. G., & Bronstein, L. M. (2021). Magnetic Nanoparticle-Containing Supports as Carriers of Immobilized Enzymes: Key Factors Influencing the Biocatalyst Performance. *Nanomaterials*, *11*(9), 2257. <https://doi.org/10.3390/nano11092257>
- McDonald, A. G., & Tipton, K. F. (2023). Enzyme nomenclature and classification: The state of the art. *The FEBS Journal*, *290*(9), 2214-2231. <https://doi.org/10.1111/febs.16274>
- Mellinas, C., Ramos, M., Jiménez, A., & Garrigós, M. C. (2020). Recent Trends in the Use of Pectin from Agro-Waste Residues as a Natural-Based Biopolymer for Food Packaging Applications. *Materials*, *13*(3), 673. <https://doi.org/10.3390/ma13030673>
- Menegatti, T., & Žnidaršič-Plazl, P. (2021). Hydrogel-Based Enzyme and Cofactor Co-Immobilization for Efficient Continuous Transamination in a Microbioreactor. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*, 752064. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.752064>
- Miao, Q., Zhang, C., Zhou, S., Meng, L., Huang, L., Ni, Y., & Chen, L. (2021). Immobilization and Characterization of Pectinase onto the Cationic Polystyrene Resin. *ACS Omega*, *6*(47), 31683-31688. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c04374>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Milosavić, N. B., Prodanović, R. M., Veličković, D., & Dimitrijević, A. (2017). Macroporous Poly(GMA-co-EGDMA) for Enzyme Stabilization. İçinde S. D. Minter (Ed.), *Enzyme Stabilization and Immobilization* (C. 1504, ss. 139-147). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6499-4_11
- Min, K., & Yoo, Y. J. (2014). Recent progress in nanobiocatalysis for enzyme immobilization and its application. *Biotechnology and Bioprocess Engineering 2014 19:4*, *19*(4), 553-567. <https://doi.org/10.1007/S12257-014-0173-7>

- Mirsaeedghazi, H., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, S. M., Aroujalian, A., & Navidbakhsh, M. (2010). Clarification of pomegranate juice by microfiltration with PVDF membranes. *Desalination*, 264(3), 243-248. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.03.031>
- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 29(2), 205-220. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>
- Mondor, M., Girard, B., & Moresoli, C. (2000). Modeling flux behavior for membrane filtration of apple juice. *Food Research International*, 33(7), 539-548. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00089-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00089-2)
- Mosafa, L., Shahedi, M., & Moghadam, M. (2014). Magnetite Nanoparticles Immobilized Pectinase: Preparation, Characterization and Application for the Fruit Juices Clarification. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 61(3), 329-336. <https://doi.org/10.1002/JCCS.201300347>
- Muley, A. B., Mulchandani, K. H., & Singhal, R. S. (2020). Chapter Three—Immobilization of enzymes on iron oxide magnetic nanoparticles: Synthesis, characterization, kinetics and thermodynamics. İçinde C. V. Kumar (Ed.), *Nanoarmoring of enzymes with carbon nanotubes and magnetic nanoparticles* (C. 630, ss. 39-79). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.10.016>
- Mulinari, J., Oliveira, J. V., & Hotza, D. (2020). Lipase immobilization on ceramic supports: An overview on techniques and materials. *Biotechnology Advances*, 42, 107581. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107581>
- Nelson, D. L., Cox, M. M., Hoskins, A. A., & Lehninger, A. L. (2021). *Lehninger principles of biochemistry* (Eighth edition). Macmillan International Higher Education.
- Neubeck, C. (1959). Pectic enzymes in fruit juice technology. *Journal of Association of Official Agricultural Chemists*, 42(2), 374-382.
- Nguyen, H. H., & Kim, M. (2017). An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Appl. Sci. Converg. Technol*, 26(6), 157-163. <https://doi.org/10.5757/ASCT.2017.26.6.157>
- Nicoletti, G., Cipolatti, E. P., Valério, A., Carbonera, N. G., Soares, N. S., Theilacker, E., Ninow, J. L., & De Oliveira, D. (2015). Evaluation of different methods for immobilization of *Candida antarctica* lipase B (CalB lipase) in polyurethane foam and its application in the production of geranyl propionate. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(9), 1739-1748. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1415-6>
- Nighojkar, A., Patidar, M. K., & Nighojkar, S. (2019). Pectinases: Production and Applications for Fruit Juice Beverages. İçinde *Processing and Sustainability of Beverages* (ss. 235-273). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815259-1.00008-2>
- Njoki, P. N., Lim, I.-I. S., Mott, D., Park, H.-Y., Khan, B., Mishra, S., Sujakumar, R., Luo, J., & Zhong, C.-J. (2007). Size Correlation of Optical and Spectroscopic Properties for Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(40), 14664-14669. <https://doi.org/10.1021/jp074902z>
- Nouri, M., & Khodaiyan, F. (2020). Magnetic Biocatalysts of Pectinase: Synthesis by Macromolecular Cross-Linker for Application in Apple Juice Clarification. *Food Technology and Biotechnology*, 58(4), 391-401. <https://doi.org/10.17113/ftb.58.04.20.6737>

- Oumer, O. J. (2017). Pectinase: Substrate, Production and their Biotechnological Applications. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 2(3), 1007-1014. <https://doi.org/10.22161/ijeab/2.3.1>
- Ouyang, J., Pu, S., Wang, J., Deng, Y., Yang, C., Naseer, S., & Li, D. (2020). Enzymatic hydrolysate of geniposide directly acts as cross-linking agent for enzyme immobilization. *Process Biochemistry*, 99, 187-195. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.09.006>
- Pálovics, P., Németh, M., & Rencz, M. (2020). Investigation and Modeling of the Magnetic Nanoparticle Aggregation with a Two-Phase CFD Model. *Energies*, 13(18), 4871. <https://doi.org/10.3390/en13184871>
- Pancerz, M., Kruk, J., Łukasiewicz, M., Witek, M., Kucharek, M., Jaschik, J., & Ptaszek, A. (2021). Red currant pectin: The physicochemical characteristic of pectin solutions in dilute and semi dilute regimes. *Food Hydrocolloids*, 113, 106420. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106420>
- Pandey, P., Singh, S. P., Arya, S. K., Gupta, V., Datta, M., Singh, S., & Malhotra, B. D. (2007). Application of Thiolated Gold Nanoparticles for the Enhancement of Glucose Oxidase Activity. *Langmuir*, 23(6), 3333-3337. <https://doi.org/10.1021/la062901c>
- Paniagua, C., Posé, S., Morris, V. J., Kirby, A. R., Quesada, M. A., & Mercado, J. A. (2014). Fruit softening and pectin disassembly: An overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Annals of Botany*, 114(6), 1375-1383. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu149>
- Pantić, N., Prodanović, R., Đurđić, K. I., Polović, N., Spasojević, M., & Prodanović, O. (2021). Optimization of phenol removal with horseradish peroxidase encapsulated within tyramine-alginate micro-beads. *Environmental Technology & Innovation*, 21, 101211. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101211>
- Paradisi, F., & Poppe, L. (2021). 10 Continuous-flow biocatalysis with enzymes and cells. İçinde F. Darvas, G. Dormán, V. Hessel, & S. V. Ley (Ed.), *Flow Chemistry – Applications* (ss. 277-312). De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/9783110693690-010>
- Patel, V. B., Chatterjee, S., & Dhoble, A. S. (2022). A review on pectinase properties, application in juice clarification, and membranes as immobilization support. *Journal of Food Science*, 87(8), 3338-3354. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16233>
- Patidar, M. K., Nighojkar, S., Kumar, A., & Nighojkar, A. (2018). Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: A review. *3 Biotech*, 8(4), 199. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1220-4>
- Picot-Allain, M. C. N., Ramasawmy, B., & Emmambux, M. N. (2022). Extraction, Characterisation, and Application of Pectin from Tropical and Sub-Tropical Fruits: A Review. *Food Reviews International*, 38(3), 282-312. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1733008>
- Popat, A., Hartono, S. B., Stahr, F., Liu, J., Qiao, S. Z., & Qing (Max) Lu, G. (2011). Mesoporous silica nanoparticles for bioadsorption, enzyme immobilisation, and delivery carriers. *Nanoscale*, 3(7), 2801. <https://doi.org/10.1039/c1nr10224a>
- Prasek, J., Drbohlavova, J., Chomoucka, J., Hubalek, J., Jasek, O., Adam, V., & Kizek, R. (2011). Methods for carbon nanotubes synthesis—Review. *Journal of Materials Chemistry*, 21(40), 15872-15884. <https://doi.org/10.1039/C1JM12254A>

- Punekar, N. S. (2018). More Complex Rate Expressions. İçinde N. S. Punekar, *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms* (ss. 177-191). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0785-0_16
- Punekar, N. S. (2025). Henri–Michaelis–Menten Equation. İçinde N. S. Punekar, *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms* (ss. 151-173). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-97-8179-9_14
- Qi, D., Gao, M., Li, X., & Lin, J. (2020). Immobilization of pectinase onto porous hydroxyapatite/calcium alginate composite beads for improved performance of recycle. *ACS Omega*, 5(32), 20062-20069. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.0C01625/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AO0C01625_M004.GIF
- Rai, P. K., Pinnick, R. A., Parra-Vasquez, A. N. G., Davis, V. A., Schmidt, H. K., Hauge, R. H., Smalley, R. E., & Pasquali, M. (2006). Isotropic–Nematic Phase Transition of Single-Walled Carbon Nanotubes in Strong Acids. *Journal of the American Chemical Society*, 128(2), 591-595. <https://doi.org/10.1021/ja055847f>
- Rajdeo, K., Harini, T., Lavanya, K., & Fadnavis, N. W. (2016). Immobilization of pectinase on reusable polymer support for clarification of apple juice. *Food and Bioprocess Processing*, 99, 12-19. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.03.004>
- Ramadan, M. F. (2019). Enzymes in Fruit Juice Processing. İçinde *Enzymes in Food Biotechnology* (ss. 45-59). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00004-9>
- Razzaghi, M., Homaei, A., Vianello, F., Azad, T., Sharma, T., Nadda, A. K., Stevanato, R., Bilal, M., & Iqbal, H. M. N. (2022). Industrial applications of immobilized nano-biocatalysts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 45(2), 237-256. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02647-y>
- Rehman, H. U., Aman, A., Silipo, A., Qader, S. A. U., Molinaro, A., & Ansari, A. (2013). Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. *Food Chemistry*, 139(1-4), 1081-1086. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.069>
- Rehman, H. U., Aziz, S., Shamim, H., Rahim, M. C., Ali, W., & Bahram, S. (2024). *Immobilization of Bacillus-Derived Pectinase on Agarose Beads for Improved Catalytic Performance*. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-5223779/v1>
- Reichert, C., Hoell, W. H., & Franzreb, M. (2004). Mass transfer enhancement in stirred suspensions of magnetic particles by the use of alternating magnetic fields. *Powder Technology*, 145(2), 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2004.06.010>
- Reshmi, R., Sanjay, G., & Sugunan, S. (2007). Immobilization of α -amylase on zirconia: A heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis. *Catalysis Communications*, 8(3), 393-399. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2006.07.009>
- Rinaldi, M., Caligiani, A., Borgese, R., Palla, G., Barbanti, D., & Massini, R. (2013). The effect of fruit processing and enzymatic treatments on pomegranate juice composition, antioxidant activity and polyphenols content. *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 355-359. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.02.015>
- Robescu, M. S., & Bavaro, T. (2025). A Comprehensive Guide to Enzyme Immobilization: All You Need to Know. *Molecules*, 30(4), 939. <https://doi.org/10.3390/molecules30040939>

- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: Principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1-41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>
- Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., & Fernández-Lafuente, R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem. Soc. Rev.*, 42(15), 6290-6307. <https://doi.org/10.1039/C2CS35231A>
- Rodriguez-Abetxuko, A., Sánchez-deAlcázar, D., Muñumer, P., & Beloqui, A. (2020). Tunable Polymeric Scaffolds for Enzyme Immobilization. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 830. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00830>
- Ropartz, D., & Ralet, M.-C. (2020). Pectin Structure. İçinde V. Kontogiorgos (Ed.), *Pectin: Technological and Physiological Properties* (ss. 17-36). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-53421-9_2
- Rother, C., & Nidetzky, B. (2014). Enzyme Immobilization by Microencapsulation: Methods, Materials, and Technological Applications. İçinde M. C. Flickinger, *Encyclopedia of Industrial Biotechnology* (1. bs., ss. 1-21). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib275>
- Rueda, N., Dos Santos, J. C. S., Torres, R., Barbosa, O., Ortiz, C., & Fernandez-Lafuente, R. (2015). Reactivation of lipases by the unfolding and refolding of covalently immobilized biocatalysts. *RSC Advances*, 5(68), 55588-55594. <https://doi.org/10.1039/C5RA07379K>
- Rusu, A., Chiriac, A., Nita, L., Balan, V., Serban, A., & Croitoriu, A. (2022). Synthesis and Comparative Studies of Glucose Oxidase Immobilized on Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Using Different Coupling Agents. *Nanomaterials*, 12(14), 2445. <https://doi.org/10.3390/nano12142445>
- Sánchez-Morán, H. (2023). *Interfacing Enzymes and Polymer Brushes: Tailoring Interactions for Optimizing Immobilized Biocatalysis* [PhD Thesis]. University of Colorado at Boulder.
- Sanjay, G., & Sugunan, S. (2008). Acid activated montmorillonite: An efficient immobilization support for improving reusability, storage stability and operational stability of enzymes. *Journal of Porous Materials*, 15(3), 359-367. <https://doi.org/10.1007/s10934-006-9089-8>
- Satapathy, S., Rout, J. R., Kerry, R. G., Thatoi, H., & Sahoo, S. L. (2020). Biochemical Prospects of Various Microbial Pectinase and Pectin: An Approachable Concept in Pharmaceutical Bioprocessing. *Frontiers in Nutrition*, 7, 117. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00117>
- Sayah, M. Y., Chabir, R., Benyahia, H., Rodi Kandri, Y., Ouazzani Chahdi, F., Touzani, H., & Errachidi, F. (2016). Yield, Esterification Degree and Molecular Weight Evaluation of Pectins Isolated from Orange and Grapefruit Peels under Different Conditions. *PLOS ONE*, 11(9), e0161751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161751>
- Sharma, N., Ojha, H., Bharadwaj, A., Pathak, D. P., & Sharma, R. K. (2015). Preparation and catalytic applications of nanomaterials: A review. *RSC Advances*, 5(66), 53381-53403. <https://doi.org/10.1039/C5RA06778B>
- Sharma, S., Verma, A., Kumar, A., & Kamyab, H. (2018). Magnetic Nano-Composites and their Industrial Applications. *Nano Hybrids and Composites*, 20, 149-172. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/NHC.20.149>

- Sheldon, R. A. (2007). Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(8-9), 1289-1307. <https://doi.org/10.1002/adsc.200700082>
- Sheldon, R. A. (2011). Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts. *Organic Process Research & Development*, 15(1), 213-223. <https://doi.org/10.1021/op100289f>
- Sheldon, R. A., Schoevaart, R., & Van Langen, L. M. (2005). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatalysis and Biotransformation*, 23(3-4), 141-147. <https://doi.org/10.1080/10242420500183378>
- Shivaprasad, P., & Carolina Emanuelsson, E. A. (2018). Process Intensification of Immobilized Enzyme Reactors. İçinde A. Górak & A. Stankiewicz (Ed.), *Intensification of Biobased Processes* (ss. 249-267). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781788010320-00249>
- Shrestha, S., Kognou, A. L. M., Zhang, J., & Qin, W. (2021). Different Facets of Lignocellulosic Biomass Including Pectin and Its Perspectives. *Waste and Biomass Valorization*, 12(9), 4805-4823. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01305-w>
- Sieiro, C., da Silva, A. F., García-Fraga, B., López-Seijas, J., & Villa, T. G. (2012). *Microbial pectic enzymes in the food and wine industry*. INTECH Open Access Publisher Rijeka.
- Sigurdardóttir, S. B., Lehmann, J., Ovtar, S., Grivel, J., Negra, M. D., Kaiser, A., & Pinelo, M. (2018). Enzyme Immobilization on Inorganic Surfaces for Membrane Reactor Applications: Mass Transfer Challenges, Enzyme Leakage and Reuse of Materials. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 360(14), 2578-2607. <https://doi.org/10.1002/adsc.201800307>
- Sirisha, V. L., Jain, A., & Jain, A. (2016). Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. İçinde *Advances in Food and Nutrition Research* (C. 79, ss. 179-211). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.07.004>
- Skoronski, E., Fernandes, M., Magalhães, M., Da Silva, G., João, J., Soares, C., & Júnior, A. (2014). Substrate Specificity and Enzyme Recycling Using Chitosan Immobilized Laccase. *Molecules*, 19(10), 16794-16809. <https://doi.org/10.3390/molecules191016794>
- Sneha, H. P., Beulah, K. C., & Murthy, P. S. (2019). Enzyme Immobilization Methods and Applications in the Food Industry. İçinde *Enzymes in Food Biotechnology* (ss. 645-658). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00037-2>
- Sojitra, U. V., Nadar, S. S., & Rathod, V. K. (2017). Immobilization of pectinase onto chitosan magnetic nanoparticles by macromolecular cross-linker. *Carbohydrate Polymers*, 157, 677-685. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.018>
- Solano, D. M., Hoyos, P., Hernáiz, M. J., Alcántara, A. R., & Sánchez-Montero, J. M. (2012). Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresource Technology*, 115, 196-207. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.11.131>
- Song, Y., Ding, Y., Wang, F., Chen, Y., & Jiang, Y. (2019). Construction of nano-composites by enzyme entrapped in mesoporous dendritic silica particles for efficient biocatalytic degradation of antibiotics in wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 375, 121968. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.121968>

- Sorrivas, V., Genovese, D. B., & Lozano, J. E. (2006). Effect of Pectinolytic and Amylolytic Enzymes on Apple Juice Turbidity. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30(2), 118-133. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2006.00054.x>
- Stöber, W., Fink, A., & Bohn, E. (1968). Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*, 26(1), 62-69. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90272-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5)
- Sun, X., Zhu, W., & Matyjaszewski, K. (2018). Protection of Opening Lids: Very High Catalytic Activity of Lipase Immobilized on Core–Shell Nanoparticles. *Macromolecules*, 51(2), 289-296. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.7b02361>
- Sun, Y., Wang, Z., Wu, J., Chen, F., Liao, X., & Hu, X. (2006). Optimising enzymatic maceration in pretreatment of carrot juice concentrate by response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(9), 1082-1089. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01182.x>
- Suryawanshi, R. K., Jana, U. K., Prajapati, B. P., & Kango, N. (2019). Immobilization of *Aspergillus quadrilineatus* RSNK-1 multi-enzymatic system for fruit juice treatment and manno oligosaccharide generation. *Food Chemistry*, 289, 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.035>
- Talekar, S., Joshi, G., Chougale, R., Nainegali, B., Desai, S., Joshi, A., Kambale, S., Kamat, P., Haripurkar, R., Jadhav, S., & Nadar, S. (2014). Preparation of stable cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of NADH-dependent nitrate reductase and its use for silver nanoparticle synthesis from silver nitrate. *Catalysis Communications*, 53, 62-66. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2014.05.003>
- Tapre, A., & Jain, R. (2014). Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. *International Food Research Journal*, 21(2), 447.
- Tasgin, E., Babagil, A., Nadaroglu, H., & Allegretti, P. E. (2020). Immobilization of Purified Pectin Lyase from *Acinetobacter calcoaceticus* onto Magnetic Carboxymethyl Cellulose Nanoparticles and Its Usability in Food Industry. *Journal of Chemistry*, 2020, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2020/4791408>
- Teja, A. S., & Koh, P.-Y. (2009). Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 55(1-2), 22-45. <https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2008.08.003>
- Tu, J., Boyle, A. L., Friedrich, H., Bomans, P. H. H., Bussmann, J., Sommerdijk, N. A. J. M., Jiskoot, W., & Kros, A. (2016). Mesoporous Silica Nanoparticles with Large Pores for the Encapsulation and Release of Proteins. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(47), 32211-32219. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b11324>
- Umut, E. (2013). Surface Modification of Nanoparticles Used in Biomedical Applications. İçinde M. Aliofkhazraei (Ed.), *Modern Surface Engineering Treatments*. InTech. <https://doi.org/10.5772/55746>
- Vaghari, H., Jafarizadeh-Malmiri, H., Mohammadlou, M., Berenjian, A., Anarjan, N., Jafari, N., & Nasiri, S. (2016). Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. *Biotechnology Letters*, 38(2), 223-233. <https://doi.org/10.1007/S10529-015-1977-Z/TABLES/2>
- Vasudevan, M., Perumal, V., Karuppanan, S., Ovinis, M., Bothi Raja, P., Gopinath, S. C. B., & Immanuel Edison, T. N. J. (2024). A Comprehensive Review on Biopolymer Mediated Nanomaterial Composites and Their Applications in Electrochemical Sensors. *Critical*

- Reviews in Analytical Chemistry*, 54(7), 1871-1894.
<https://doi.org/10.1080/10408347.2022.2135090>
- Wang, J., Ren, F., Yi, R., Yan, A., Qiu, G., & Liu, X. (2009). Solvothermal synthesis and magnetic properties of size-controlled nickel ferrite nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*, 479(1), 791-796. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2009.01.059>
- Wang, Y., Zhang, X., Luo, Z., Huang, X., Tan, C., Li, H., Zheng, B., Li, B., Huang, Y., Yang, J., Zong, Y., Ying, Y., & Zhang, H. (2014). Liquid-phase growth of platinum nanoparticles on molybdenum trioxide nanosheets: An enhanced catalyst with intrinsic peroxidase-like catalytic activity. *Nanoscale*, 6(21), 12340-12344. <https://doi.org/10.1039/C4NR04115A>
- Wei, H., Chen, C., Han, B., & Wang, E. (2008). Enzyme Colorimetric Assay Using Unmodified Silver Nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 80(18), 7051-7055. <https://doi.org/10.1021/ac801144t>
- Wei, W., & Wang, Z. (2018). Investigation of Magnetic Nanoparticle Motion under a Gradient Magnetic Field by an Electromagnet. *Journal of Nanomaterials*, 2018, 1-5. <https://doi.org/10.1155/2018/6246917>
- Weijers, S. R., & Van't Riet, K. (1992). Enzyme stability in downstream processing part 1: Enzyme inactivation, stability and stabilization. *Biotechnology Advances*, 10(2), 237-249. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(92\)90004-S](https://doi.org/10.1016/0734-9750(92)90004-S)
- Weiser, D., Bencze, L. C., Bánóczy, G., Ender, F., Kiss, R., Kókai, E., Szilágyi, A., Vértessy, B. G., Farkas, Ö., Paizs, C., & Poppe, L. (2015). Phenylalanine Ammonia-Lyase-Catalyzed Deamination of an Acyclic Amino Acid: Enzyme Mechanistic Studies Aided by a Novel Microreactor Filled with Magnetic Nanoparticles. *ChemBioChem*, 16(16), 2283-2288. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500444>
- Weltz, J. S., Kienle, D. F., Schwartz, D. K., & Kaar, J. L. (2019). Dramatic Increase in Catalytic Performance of Immobilized Lipases by Their Stabilization on Polymer Brush Supports. *ACS Catalysis*, 9(6), 4992-5001. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b01176>
- Weng, Y., Ranaweera, S., Zou, D., Cameron, A., Chen, X., Song, H., & Zhao, C.-X. (2022). Alginate Particles for Enzyme Immobilization Using Spray Drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(23), 7139-7147. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c02298>
- Wong, L. S., Khan, F., & Micklefield, J. (2009). Selective Covalent Protein Immobilization: Strategies and Applications. *Chemical Reviews*, 109(9), 4025-4053. <https://doi.org/10.1021/cr8004668>
- Wu, L., Wu, S., Xu, Z., Qiu, Y., Li, S., & Xu, H. (2016). Modified nanoporous titanium dioxide as a novel carrier for enzyme immobilization. *Biosensors and Bioelectronics*, 80, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.045>
- Wu, S., Snajdrova, R., Moore, J. C., Baldenius, K., & Bornscheuer, U. T. (2021). Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 60(1), 88-119. <https://doi.org/10.1002/anie.202006648>
- Xu, J., Sun, J., Wang, Y., Sheng, J., Wang, F., & Sun, M. (2014). Application of Iron Magnetic Nanoparticles in Protein Immobilization. *Molecules*, 19(8), 11465-11486. <https://doi.org/10.3390/molecules190811465>

- Yadav, S., Dubey, A. K., Anand, G., & Yadav, D. (2013). Purification and characterization of pectin lyase secreted by *Aspergillus flavus* MTCC 10938. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49(4), 400-405. <https://doi.org/10.1134/S0003683813040145>
- Yadav, S., Yadav, P. K., Yadav, D., & Yadav, K. D. S. (2009). Pectin lyase: A review. *Process Biochemistry*, 44(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.09.012>
- Yamada, Y., Koibuchi, M., Miyamoto, K., Ueda, J., & Uheda, E. (2015). Breakdown of middle lamella pectin by •OH during rapid abscission in *A. zolla*. *Plant, Cell & Environment*, 38(8), 1555-1564. <https://doi.org/10.1111/pce.12505>
- Yang, J.-S., Mu, T.-H., & Ma, M.-M. (2018). Extraction, structure, and emulsifying properties of pectin from potato pulp. *Food Chemistry*, 244, 197-205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.059>
- Yao, L., Xu, G., Dou, W., & Bai, Y. (2008). The control of size and morphology of nanosized silica in Triton X-100 based reverse micelle. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 316(1-3), 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.08.016>
- Yavaşer, R., & Karagözler, A. A. (2020). Covalent immobilization of papain onto poly(hydroxyethyl methacrylate)-chitosan cryogels for apple juice clarification. *Food Science and Technology International*, 26(7), 629-641. <https://doi.org/10.1177/1082013220919307>
- Yetter, R. A., Risha, G. A., & Son, S. F. (2009). Metal particle combustion and nanotechnology. *Proceedings of the Combustion Institute*, 32(2), 1819-1838. <https://doi.org/10.1016/j.proci.2008.08.013>
- Yushkova, E. D., Nazarova, E. A., Matyuhina, A. V., Noskova, A. O., Shavronskaya, D. O., Vinogradov, V. V., Skvortsova, N. N., & Krivoshapkina, E. F. (2019). Application of Immobilized Enzymes in Food Industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(42), 11553-11567. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04385>
- Zaitsev, S. Yu., Savina, A. A., & Zaitsev, I. S. (2019). Biochemical aspects of lipase immobilization at polysaccharides for biotechnology. *Advances in Colloid and Interface Science*, 272, 102016. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102016>
- Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., & Pinelo, M. (2018). A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. *Catalysts*, 8(2), 92. <https://doi.org/10.3390/catal8020092>
- Zeng, S., Yong, K.-T., Roy, I., Dinh, X.-Q., Yu, X., & Luan, F. (2011). A Review on Functionalized Gold Nanoparticles for Biosensing Applications. *Plasmonics*, 6(3), 491-506. <https://doi.org/10.1007/s11468-011-9228-1>
- Zhang, J., Tang, L., Yu, Q., Qiu, W., Li, K., Cheng, L., Zhang, T., Qian, L., Zhang, X., & Liu, G. (2021). Gold-platinum nanoflowers as colored and catalytic labels for ultrasensitive lateral flow MicroRNA-21 assay. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 344, 130325. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130325>
- Zhang, J., Zhao, L., Gao, B., Wei, W., Wang, H., & Xie, J. (2018). Protopectinase production by *Paenibacillus polymyxa* Z6 and its application in pectin extraction from apple pomace. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1), e13367. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13367>

- Zimmermann, V., Esparza-Flores, E. E., Partichelli, C. P., da Silva, E. F. C., & Rodrigues, R. C. (2024). Genipin-activated chitosan particles as support of pectinase immobilization and their application as stable biocatalyst for fruit juice clarification. *Process Biochemistry*, *139*, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.01.018>
- Zucca, P., & Sanjust, E. (2014). Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. *Molecules*, *19*(9), 14139-14194. <https://doi.org/10.3390/molecules190914139>