

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

FUNGAL BİR KÜTİNAZ ENZİMİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE
PET PARÇALAMA POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Naile TURHAN

EKİM 2025
TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**FUNGAL BİR KÜTİNAZ ENZİMİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE
PET PARÇALAMA POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ**

Naile TURHAN

ORCID :

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"YÜKSEK LİSANS (MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 16/ 09 / 2025

Tezin Savunma Tarihi : 31/ 10/ 2025

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Uğur UZUNER

ORCID :

Trabzon 2025

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında
Naile TURHAN Tarafından Hazırlanan**

**FUNGAL BİR KÜTİNAZ ENZİMİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE
PET PARÇALAMA POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 02 / 10 / 2025 gün ve 2122 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ

Üye : Prof. Dr. Fatih Şaban BERİŞ

Üye : Doç. Dr. Uğur UZUNER

Prof. Dr. Asim KADIOĞLU

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Fungal Bir Kütinaz Enziminin Klonlanması, Ekspresyonu ve PET Parçalama Potansiyelinin Belirlenmesi” başlıklı yüksek lisans tezi, Kütinaz enziminin polyester PET plastik üzerindeki etkisini göstermekte olup, aynı zamanda sentetik polimerlerin geri dönüşüm sürecini geliştirebilmek için bilgiler içermektedir.

Karadeniz Teknik Üniversitesi’nde yürütmüş olduğum yüksek lisans çalışmam boyunca, bana her zaman yol gösteren, bilgi ve tecrübeleriyle akademik gelişimime büyük katkı sağlayan değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Uğur UZUNER’e en içten teşekkürlerimi sunarım. Kendisinin sabrı, desteği ve yönlendirmeleri, bu çalışmanın her aşamasında yolumu aydınlatmıştır.

Laboratuvarıda birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım, ihtiyaç duyduğum her an bilgi ve tecrübelerini paylaştıkları için başta Arş. Gör. Betül YEŞİLYURT olmak üzere tüm hocalarıma ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca yanımda olan, sevgileri ve fedakârlıklarıyla bana güç veren canım anneme ve babama, her zaman destekleriyle moral kaynağım olan kardeşlerime gönülden teşekkür ederim. Onların sevgisi, sabrı ve inancı, karşılaştığım her zorlukta bana ilham vermiştir.

Son olarak ve en önemlisi, çalışmamı dile getirebileceğimden çok daha fazla biçimde mümkün kıldığı için canım eşim Oğuz’a en derin teşekkürlerimi sunarım.

Naile TURHAN

Trabzon 2025

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Fungal Bir Kütinaz Enziminin Klonlanması, Ekspresyonu ve PET Parçalama Potansiyelinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Uğur UZUNER’in sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri ve analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 31/10/2025

Naile TURHAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Plastikler.....	2
1.1.1. Doğal Polimerler	2
1.1.2. Sentetik Polimerler.....	3
1.1.3. Termoplastikler ve Termoset Plastikler	3
1.1.4. Plastik Türleri.....	5
1.1.5. Plastik Atıkların Ekosisteme Etkisi.....	7
1.1.6. Plastik Geri Dönüşüm Yöntemleri	8
1.2. Biyoremediasyon Ajanları Olarak Kullanılan Farklı Mikroorganizmalar	11
1.2.1. Mikrobiyal Biyoremediasyonun Mekanizmaları	11
1.3. Polietilen Tereftalat (PET)	12
1.3.1. PET'in Özellikleri	12
1.3.2. PET Degredasyonu	15
1.3.3. Plastik Sektöründe PET	16
1.4. Enzimler	20
1.4.1. Enzimlerin Sınıflandırılması	21
1.4.2. Enzimlerin Spesifikliği	22
1.4.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Etki Eden Faktörler	23
1.4.4. Mikrobiyal Enzimler Kullanılarak Çoklu Kirlenici Biyolojik İyileştirme	25
1.4.5. <i>Trichoderma Harzianum</i>	27
Çalışmanın Amacı	28

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	29
2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	29
2.2. Moleküler Yerleştirme (Docking) Çalışmaları.....	29
2.3. <i>Trichoderma harzianum</i> Kütinaz Geninin <i>E. coli</i> Konağına Uygun Olarak Kodon Optimizasyonu ve Sentetik Olarak Sentezi	30
2.4. Sentetik DNA Fragmanının PCR ile Çoğaltılması ve Ara Vektöre Klonlanması.....	31
2.4.1. <i>E. coli</i> DH10B Kompetent Hücrelerin Hazırlanması ve Transformasyonu	32
2.5. Rekombinant Plazmitlerin Restriksiyon Endonükleaz Analizi	33
2.6. <i>T. harzianum</i> Kütinaz Geninin PET-28a Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	34
2.7. Rekombinant <i>T. harzianum</i> Kütinazının Ekspresyonu.....	35
2.8. Protein Üretimi ve Protein Saflaştırma	35
2.9. Enzim Aktivite Tayini ve Enzimin Optimum Şartlarının Belirlenmesi	36
2.9.1. Enzim Aktivitesi	36
2.9.2. Farklı Sıcaklıkta Enzimin PET Parçalama Potansiyellerinin Analizi	36
2.9.3. Farklı pH Varlığında Enzimin PET Parçalama Potansiyellerinin Analizi	36
2.9.4. Farklı Zaman Aralıklarında Enzim Aktivitesi Sonuçları	37
2.9.5. Enzimatik PET Degradasyonuna İlişkin Mikroskop Görüntüleri.....	37
3. BULGULAR.....	38
3.1. <i>T. harzianum</i> Kütinaz Enzimi Üzerinde Biyoinformatik Analizler	38
3.2. Moleküler Docking Bulguları	41
3.3. Sentetik DNA Fragmanının Analizi	42
3.4. PCR	43
3.5. Sentetik DNA Fragmanının %1'lik Agaroze Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi	43
3.6. Rekombinant DNA' nın Transformasyonu ve Ekspresyonu.....	47
3.7. SDS-PAGE Analizi	48
3.8. Enzim Assay Çalışmaları	49
3.8.1. Enzim Aktivitesi	49
3.8.2. Kütinaz Enziminin pH, Sıcaklık, Zaman ve PET Film Üzerine Etkisi	51
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	56
5. ÖNERİLER.....	58

6. KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	69



ÖZET

FUNGAL BİR KÜTİNAZ ENZİMİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE
PET PARÇALAMA POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ
Naile TURHAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Uğur UZUNER
2025, 68 Sayfa

Çevresel plastik kirliliği küresel olarak endişe verici boyutlara ulaşmıştır. Günümüz mekanik ve kimyasal geri dönüşüm yöntemleri yetersiz kaldığından, yenilikçi ve sürdürülebilir çözümlerin geliştirilmesi hayati önem taşımaktadır. Polietilen tereftalat (PET) kirliliği, polimerin yaygın kullanımı, kristal yapısı ve biyolojik bozunmaya karşı doğal direnci nedeniyle önemli bir çevre sorunudur. Bazı doğal mikroorganizmalar PET'i hidrolize etme kabiliyeti gösterse de endüstriyel uygulanabilirlikleri sınırlıdır.

PET polimerini parçalayabilen polietilen tereftalat hidrolaz (PETaz), esteraz, lipaz ve kütinaz gibi enzimler tanımlanmıştır. Ancak yüksek PET parçalama potansiyelli kütinaz ve PETaz enzimleri, endüstriyel uygulamalarda daha çok tercih edilmektedir.

Bu tez çalışmasında, biyokontrol ajanı *Trichoderma. harzianum* CBS 226,95 kütinaz enziminin PET parçalama potansiyeli araştırılmıştır. Enzim karakterizasyon çalışmaları, *E. coli* ekspresyon sisteminde gerçekleştirilmesinin akabinde, optimum enzimatik koşullar; 10 mM pNPA varlığında, pH 6, sıcaklık 50 °C ve inkübasyon süresi 5 dakika olarak belirlenmiştir. Saf enzimin K_m , V_{max} ve spesifik aktivite parametreleri ise; sırasıyla 0,85 mM, 11,52 ($\mu\text{M}/\text{min}$) 11,52 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ olarak hesaplanmıştır.

Mevcut bulgular, tarımsal uygulamalarda patojen kontrolü için kullanılan *Trichoderma* türlerinin, çevresel PET atıklarını parçalamada etkin enzimsel profile sahip olduklarını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Trichoderma. harzianum* CBS 226,95 , Plastik degradasyonu, kütinaz, PET,

Master Thesis

SUMMARY

CLONING, EXPRESSION, AND DETERMINATION OF PET DEGRADATION POTENTIAL OF A FUNGAL CUTINASE ENZYME

Naile TURHAN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Molecular Biology and Genetics Graduate Program
Supervisor: Assoc. Prof. Uğur UZUNER
2025, 68 Pages

Environmental plastic pollution has reached alarming levels globally. As current mechanical and chemical recycling methods are inadequate, the development of innovative and sustainable solutions is vital. Polyethylene terephthalate (PET) pollution is a significant environmental problem due to the polymer's widespread use, crystalline structure, and natural resistance to biodegradation. While some natural microorganisms demonstrate the ability to hydrolyze PET, their industrial applicability is limited.

Enzymes such as polyethylene terephthalate hydrolase (PETase), esterase, lipase, and cutinase have been identified that can degrade PET polymer. However, cutinase and PETase enzymes with high PET degradation potential are more preferred in industrial applications.

In this thesis, the PET degradation potential of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CBS 226.95 cutinase was investigated. Following enzyme characterization studies in an *E. coli* expression system, optimum enzymatic conditions were determined: In the presence of 10 mM pNPA, pH was 6.0, temperature was 50 °C, and incubation time was 5 minutes. The K_m , V_{max} , and specific activity parameters of the pure enzyme were calculated as 0.85 mM, 11.52 ($\mu\text{M}/\text{min}$), and 11.52 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, respectively.

The present findings demonstrate that *Trichoderma* species used for pathogen control in agricultural applications have an effective enzymatic profile for degrading environmental PET waste.

Key Words: *Trichoderma. harzianum* CBS 226.95, Plastic, degradation, cutinase, PET

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Karbon-karbon omurgasına sahip plastikler (PE, PP, PS, PVC) ve ana zincirinde heteroatom bulunduran plastiklerin (PET, PU) çevresel süreçler aracılığıyla parçalanma mekanizmalarının şematik gösterimi.....	5
Şekil 2.	Mekanik geri dönüşüm yöntemi ile istenen verimin alınamaması gibi durumlarda kullanılan kimyasal geri dönüşüm yöntemi parçalanması	10
Şekil 3.	PET plastiğin molekül yapısı ve monomerleri	12
Şekil 4.	Polietilen tereftalat (PET) molekül yapısı	15
Şekil 5.	2019-2022 plastik atık geri dönüşüm ve imha (bertaraf) verilerinin dağılımı.....	18
Şekil 6.	Plastik Atık ve Geri Dönüşüm Verileri (2019-2022) (The National Environment Agency, 2023).....	19
Şekil 7.	Farklı sektörlere göre PET türü plastik tüketiminin dağılımı Yıl: 2016, toplam tüketim: 23,5 milyon ton	20
Şekil 8.	Enzim-Substrat Kompleksi.....	23
Şekil 9.	Enzimatik reaksiyonun hızı üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Cerrahoğlu, 2014).....	24
Şekil 10.	<i>H. insolens</i> ve <i>T. harzianum</i> kütinaz enzimlerinin amino asit dizinleri kullanılarak gerçekleştirilmiş ikili hizalama verileri	38
Şekil 11.	<i>H. insolens</i> ve <i>T. harzianum</i> kütinaz enzimlerinin protein 3D yapılarının yapısal benzerliklerini ortaya koyan görsel.....	39
Şekil 12.	Farklı kütinaz enzim sekanslarının fonksiyonel bölgelerine karşılık gelen amino asit sıraları kullanılarak gerçekleştirilmiş çoklu sekans hizalama analizi verileri.....	40
Şekil 13.	2PET-ThKütinaz enzim-ligand kompleksinin moleküler yerleştirme sonuçlarına ait 3D görseli ve oluşmuş kompleks yapıya ait biyokimyasal etkileşimleri ortaya koyan 2D etkileşim görseli	41
Şekil 14.	PCR sonunda elde edilmiş sentetik DNA fragmanının %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü	43
Şekil 15.	pET28a vektörüne kütinaz geninin klonlanması sonrası restriksiyon enzim (E1/X1) kesim analizi sonucu elde edilen %1'lik agaroz jel görüntüsü	44
Şekil 16.	<i>E. coli</i> JM101 transformasyonu sonucu oluşan kolonilerin.....	45
Şekil 17.	<i>E. coli</i> JM101 transformasyonu sonucu oluşan kolonilerden plazmit izolasyonu	46
Şekil 18.	Kolonilerden izole edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi ile kesilerek agaroz jelde görüntülenmesi	47

Şekil 19.	pET28a-NCU rekombinant plazmiti <i>E. coli</i> BL21 hücrelerine transformasyonu sonucu oluşan kolonilerin seçici besiyerinde görünümü.....	48
Şekil 20.	Saflaştırılmış ThKütinaz proteininin SDS-PAGE analizi.....	49
Şekil 21.	Michaelis-Menten eğrisi kullanılarak kütinaz enziminin substrat konsantrasyonuna bağlı hızı	50
Şekil 22.	Enzimin farklı pH değerlerinde p-nitrofenil ester substratının hidrolizi sonucu açığa çıkan p-nitrofenil salınımına dayalı bağlı aktivitesi.....	52
Şekil 23.	Enzimin farklı sıcaklık değerlerinde p-nitrofenil ester substratının hidrolizi sonucu açığa çıkan p-nitrofenil salınımına dayalı bağlı aktivitesi.....	53
Şekil 24.	Enzimin farklı zamanlarda p-nitrofenil ester substratının hidrolizi sonucu açığa çıkan p-nitrofenil salınımına dayalı bağlı aktivitesi.....	54
Şekil 25.	ThKütinaz Enziminin PET film üzerindeki etkisinin stereo mikroskop ile altında görüntüleri.....	55

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Termoset plastikler olarak sınıflandırılan plastik türleri ve bunların başlıca kullanım alanları	4
Tablo 2. Termoplastikler olarak sınıflandırılan plastik türleri ve bunların başlıca kullanım alanları	4
Tablo 3. Farklı polimerlerin yoğunluk, kristallenme oranı ve doğada kullanım ömrü değerleri.....	7
Tablo 4. PET'in fiziksel ve kimyasal özellikleri (Anabal,2007)	13
Tablo 5. Enzimlerin Uluslararası sınıflandırması: Enzimler katalizledikleri reaksiyon tipine göre altı ana sınıfa ayrılmaktadır	22
Tablo 6. PCR bileşenleri	31
Tablo 7. PCR koşulları.....	32
Tablo 8. ThKütnaz geninde hedef bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerler	32
Tablo 9. Solüsyonların İçeriği.....	34
Tablo 10. Farklı organizma kaynaklarından yüksek aktiviteli kütnaz ve PETaz enzimlerinin moleküler yerleştirme analizli verileri.....	42
Tablo 11. Farklı Substrat Konsantrasyonunda Enzim Aktivitesi Sonuçları	50
Tablo 12. Farklı pH Değerlerinde Enzim Aktivitesi Sonuçları	52
Tablo 13. Farklı Sıcaklık Değerlerinde Enzim Aktivitesi Sonuçları	53
Tablo 14. Farklı Zaman Aralıklarında Enzim Aktivitesi Sonuçları.....	54

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
~	: Yaklaşık
°	: Derece
μ	: Mikro
α	: Alfa
Δ	: Delta
°C	: Santigrat derece
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
mM	: Milimolar
bç	: Baz çifti
dk	: Dakika
sn	: Saniye
U	: Ünite
UV	: Ultraviole
PET	: Polietilen Teraftalat
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
CaCl ₂	:Kalsiyum Klorür
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
LB	: Luria–Bertani
APS	: Amonyum Persülfat
pNPA	:P-nitrofenol asetat

1. GENEL BİLGİLER

Dünyanın en önemli sorunlarından biri olan çevre kirliliği giderek büyük riskler oluşturmaktadır. Atık suların ve çöplerin arıtılmadan kontrolsüz bir şekilde çevreye bırakılması doğaya ve insanlara zarar vermektedir (Jie vd., 2023). Çevre kirliliğine neden olabilecek faktörlere bakıldığında nüfus artışı, kentleşme, sanayileşme, modern tarım uygulamaları ve insanın diğer faaliyetleri karşımıza çıkmaktadır. Bu faktörler ile birlikte doğaya çok büyük miktarda toksik kirletici maddeler salınmakta olup hava, su ve toprak ekosistemlerindeki bitkilere, insanlara ve hayvanlara zarar verip ciddi hastalıklara neden olmaktadır (Weralupitiya vd., 2021; Zhang vd., 2015). Ağır metaller, plastikler, pestisitler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar) ve boyalar biyolojik olarak parçalanmamaları ve uzun yıllar doğada kalabilmeleri nedeniyle çevresel kirleticiler olarak kabul edilmektedir (Vardhan vd., 2019).

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar), yanma işlemi boyunca kömür, petrol ve gaz endüstrileri gibi çeşitli endüstriyel faaliyetlerden türetilen kimyasallar olarak tanımlanmaktadır. PAH'lar, daha uzun bozunma sürelerine sahip olan ve çevrede karmaşık bir karışım halinde bulunan ve çevredeki birçok yaşam formlarına zararlı etkilere neden olan son derece toksik, kalıcı kirletici maddelerdir. İnsanlarda PAH'ların uzun süreli araştırılması sonucu kronik etkiler olarak genetik mutasyona ve kansere neden olabileceği bilinmektedir. (Anyanwu vd., 2020; Saravanan vd., 2021)

Plastikler, genellikle fosil yakıtlardan elde edilen küçük organik molekülü gruplardaki bağın koparılmasıyla uzun ve zincirli bir yapıya dönüştürülmesi reaksiyonuyla meydana gelen sentetik organik polimerler olarak tanımlanmaktadır. Yapıları gereği biyolojik olarak parçalanamayan plastikler doğada uzun süre boyunca kalabilmekte ve çevre kirliliğine neden olmaktadır. Ayrıca plastikler bu süre zarfında doğada ve özellikle suda yaşayan canlılar için zararlı olan poliklorlu bifeniller (PCB) ve diklorodifeniltriokloroetan (DDT) gibi toksik kimyasallar üretmektedirler (Filho vd., 2021).

Plastik kirliliğine ekonomik açıdan bakıldığında ise yılda yüz milyonlarca doları aşan ekonomik kayıplara neden olan önemli bir sorun olduğu gözlemlenmektedir (Hardesty vd., 2015). Her yıl 300 milyon tondan fazla plastik üretimi yapıyor ve üretilen bu plastik türlerinin çoğu geri dönüştürülemezdir. Bundan ötürü doğamızda çok fazla plastik atık kirliliği oluşmaktadır.

1.1. Plastikler

Plastikler, sentetik veya yarı sentetik kökenli, hafif, ucuz ve korozyona dayanıklı malzemelerden oluşan polimerlerdir. Plastikler, tarımda, evlerde, otomobillerde, ambalaj malzemelerinde, oyuncaklarda, elektronikte ve diğer çeşitli uygulamalarda kullanımlarının yüksek talebi nedeniyle büyük miktarlarda üretilmektedir. Plastiğe olan talep 1990'dan bu yana her yıl %5 artmıştır (Kunwar vd., 2016). Plastik kullanımının artması, buna paralel olarak üretilen plastik atık miktarını da artırmaktadır.

Plastik türlerini büyüklüklerine göre makro ve mikro olacak şekilde iki gruba ayrılmaktadır. Makro plastikler en yaygın olarak denizlerde, kıyılarda bulunan 25 mm'den büyük plastiklere denmektedir. Bu plastikler büyüklüklerine rağmen deniz canlıları tarafından besin olarak tüketilmektedir. Mikro plastikler ticari ve evsel kullanım için mikroskobik ölçekte üretilen birincil mikro plastikler ve makro plastiklerin ayrışmasıyla oluşan ikincil mikro plastikler olarak ikiye ayrılmaktadır. Yüzen plastiklerin rengi ve kokusu genellikle suda yaşayan hayvanların dikkatini çekmektedir. Mikro ve nano plastikler biyolojik bariyerleri hızlı bir şekilde aşabilir ve dokularda birikerek sonuçta canlıda büyük organ hasarlarına sebep olmaktadır (Laskar & Kumar, 2019; Tiwari vd., 2023).

Plastikler, sentetik veya doğal olarak bulunabilen yumuşak haldeyken şekil verilebilen ve şeklini koruması için sonradan sertleştirilebilen bir malzeme grubu olarak bilinmektedir. Çevremizde doğal halde bulunan polimerlere katran, kaplumbağa kabuğu, hayvan boynuzu, gomalak, selüloz ağaç öz suyundan elde edilen lateks ve amber örnek olarak verilebilir. Sentetik polimerler polietilen (PE), polistiren (PS), polipropilen (PP) polivinil klorür (PVC) ve politetrafloroetilen veya Teflon olarak karşımıza çıkmaktadır (Singh, 2022).

1.1.1. Doğal Polimerler

Doğal polimerler organik ve inorganik olarak iki gruba ayrılır. Canlı organizmalarda önemli bir rol alan organik polimerler temel yapısal bileşenleri sağlamakta ve önemli yaşam süreçlerine katılmaktadırlar. Buna verilebilecek en güzel örnek tüm bitkilerin katı bileşenlerini oluşturan polimerdir. Bunların arasında selüloz, lignin ve farklı reçineler bulunmaktadır. Amino asitlerin polimerleri olan proteinler ve nükleotidlerin polimerleri olan nükleik asitler diğer iki önemli doğal polimer çeşitleridir. Nükleik asitler, bütün canlı hücrelerde ve virüslerde bulunan, nükleotid birimlerden oluşmuş polimerlerdir. Nişasta,

bitkiler tarafından sağlanan temel besinsel enerji kaynakları olan glikozdan elde edilen doğal polimerlerdir. Elmas ve grafit gibi birçok inorganik polimerde doğada bulunabilmektedir.

1.1.2. Sentetik Polimerler

Sentetik polimerlerin üretimi çeşitli aşamalardan oluşmaktadır. Hafif, bozulmaya karşı dayanıklı ve ucuz olan sentetik plastikler ambalaj, elektronik, tekstil, inşaat, ulaşım ve tarım gibi sektörlerin vazgeçilmez bir parçası olmuştur. Günlük yaşamda ise plastik poşetler, oyuncaklar, ambalajlar, tek kullanımlık plastik ürünler ve balıkçılık ekipmanları gibi birçok alanda karşımıza çıkmaktadır (Filho vd., 2021).

1.1.3. Termoplastikler ve Termoset Plastikler

Plastik türleri fiziksel özelliklerine göre incelendiğinde iki ana gruba ayrılmaktadır. Birinci grup olan termoplastikler ısıtıldıklarında eriyebilir, kolay şekil alabilir ve tekrardan soğutulduklarında sertleşebilen yapıya sahip olan geri dönüştürülebilir plastik grubu olarak bilinmektedir. Çok çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılan termoplastikler, polietilen tereftalat (PET), PE, PP, PVC, PS, polikarbonat (PC) ve poliamid (PA) örnek gösterilmektedir (Chamas vd., 2020). İkinci plastik grubu olan termosetler polimer zincirleri arasında kalıcı kimyasal bağların oluşmasından kaynaklı ısıtıldıklarında geri dönüştürülemez şekilde sertleşmektedirler. Termoset grubuna örnek olarak bazı polyesterler, poliüretan (PUR), epoksi reçine ve akrilik reçine verilebilir (WHO, 2019).

- Termoset Plastikler

Termoset plastikler sert ve dış darbelere karşı oldukça dayanıklı, soğuyup sertleştikten sonra şekillerini koruyup ve orijinal formlarına geri dönemeyen plastik türlerine denmektedir. Kimyasal yapıları, çapraz bağlı polimer zincirlerinden oluşur, bu da onlara yüksek ısı ve kimyasal direnç sağlamaktadır (Yüce & Kılıç, 2016). Bu grupta yer alan plastik türleri ve kullanım alanları Tablo 1’de gösterilmektedir.

Tablo 1. Termoset plastikler olarak sınıflandırılan plastik türleri ve bunların başlıca kullanım alanları

TERMOSET PLASTİK TÜRLERİ	KULLANIM ALANLARI
POLİÜRETAN	• İZOLASYON KÖPÜKLERİ, SÜNGERLER (KOLTUK,YATAK VB.) YAPIŞTIRICILAR, ARABA PARÇALARI, AYAKKABI TABANLARI
EPOKSİ REÇİNELER	• TEKNELER, KOMPOZİT MALZEMELER, SPOR EKİPMANLARI
FENOLİK REÇİNELER	• CİHAZLAR, ELEKTRİK-ELEKTRONİK YALITIM PARÇALARI, ARABA PARÇALARI, ISIYA DAYANIKLI MUTFAK GEREÇLERİ
FURAN REÇİNELERİ	•YAPI VE İNŞAAT MALZEMELRİ, DÖKÜM SANAYİSİNDE KUM KALIP BAĞLAYICISI, KİMYASAL KOROZYONA DAYANIKLI KAPLAMALAR

• Termoplastikler

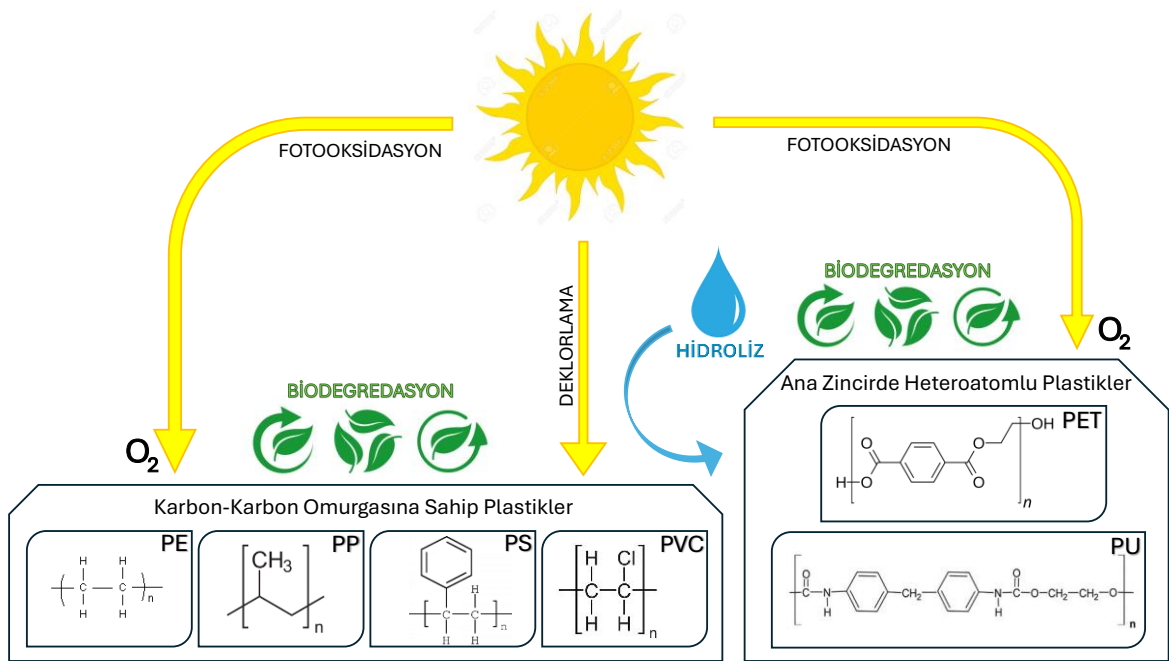
Isıtıldıklarında eriyebilen, doğrusal ya da dallı yapıda olabilen polimerler termo-plastik olarak adlandırılır. Bu malzemelerde çapraz bağların bulunmaması, ısının etkisiyle zincirler arası zayıf etkileşimlerin kopmasına ve zincirlerin birbiri üzerinden kolaylıkla hareket ederek malzemenin akışkan bir hal almasına olanak sağlar (Yüce & Kılıç, 2016). Bu grupta yer alan plastik türleri ve uygulama alanları Tablo 2’de gösterilmektedir.

Tablo 2. Termoplastikler olarak sınıflandırılan plastik türleri ve bunların başlıca kullanım alanları

TERMOPLASTİK TÜRLERİ	KULLANIM ALANLARI
PET	• İÇECEK ŞİŞELERİ, SENTETİK ELYAF, GIDA AMBALAJLARI
POLİPROPİLEN	•PİL KUTULARI, TEKSTİL İPLİKLERİ, MUTFAK KAPLARI
POLİSTİREN	•ELEKTRONİK CİHAZ KASALARI, YALITIM KÖPÜKLERİ, CD/DVD KUTULARI
PVC	•PENCERE PROFİLLERİ, BORU VE TESİSAT MALZEMELERİ, OYUNCAKLAR, KABLO KAPLAMALARI
LDPE	•POŞET,STREÇ FİMLER, OYUNCAK, YALITIM MALZEMELERİ
HDPE	•KONTEYNER, BİDON, GIDA VE KİMYASAL AMBALAJLARI
AKRİLONİTRİLE-BUTADİEN-STİREN (SAN/ABS)	• ŞEFFAF KAPLAR, OTOMOTİV İÇ AKSAMLARI, ELEKTRONİK CİHAZ KASALARI, DARBE DAYANIKLI LEVHALAR
POLİAMİD	•PANTOLON, SPOR GİYİM, BALIK AĞLARI, HALATLAR

1.1.4. Plastik Türleri

En yaygın plastik türleri sırasıyla PE, PP, PVC, PS, PET ve PU'dur. Plastiklerin bozunma yolları göz önüne alındığında, karbon-karbon omurgasına sahip plastikler ve ana zincirde heteroatomlara sahip plastikler olacak şekilde ayrılmaktadır (Şekil 1). PE, PP, PS ve PVC'nin yalnızca karbon atomlarından oluşan bir omurgası vardır. PET ve PU plastiklerin ana zincirinde heteroatomlar bulunmaktadır.



Şekil 1. Karbon-karbon omurgasına sahip plastikler (PE, PP, PS, PVC) ve ana zincirinde heteroatom bulunduran plastiklerin (PET, PU) çevresel süreçler aracılığıyla parçalanma mekanizmalarının şematik gösterimi

- Karbon-Karbon Omurgasına Sahip Plastikler

Bu grupta PE, PP, PS ve PVC bulunmaktadır. Ana ambalaj malzemeleri bu plastik polimerlerinden üretilmekte, üretilen malzemeler kısa sürede çöpe atılacağından çevre kirliliğine sebep olma potansiyelleri oldukça yüksektir ("Plastics,the Fast Facts", 2023). PE, PP ve PS, aerobik dış ortamlardaki en önemli abiyotik bozunma yolu olduğuna inanılan, foto-başlatmalı oksidatif bozunmaya karşı hassastır. Bu bozunma yolu üç aşamadan

meydana gelmektedir: başlatma, yayılma ve sonlandırma (Pritchard, 1998). İlk aşaması olan başlatma basamağında, ana polimer zincirindeki kimyasal bağlar ışıkla (veya termal başlatma durumunda ısıyla) kırılarak bir serbest radikal oluşmaktadır. Foto-başlatmanın meydana gelmesi için polimerlerin ışık enerjisini emen doymamış kromoforik gruplar içermesi gerekmektedir (Gijsman vd., 1999). UV ışığı polimer omurgasındaki C-H bağlarını kırduğunda serbest radikaller elde edilir. Yayılma adımında ise polimer radikali oksijenle reaksiyona girip bir peroksi radikali meydana çıkar. Hidroperoksitlerin oluşumunun yanı sıra başka karmaşık radikal reaksiyonlar da meydana gelir ve otoksidasyona yol açmaktadır. Yayılma sonuçta zincir bölünmesine veya çapraz bağlanmaya sebep olmaktadır. İki radikalin birleşiminden inert ürünler oluştuğunda radikal reaksiyon sona ermektedir. Bundan dolayı oksidasyona bağlı olarak rastgele zincir bölünmesi veya uç zincir bölünmesi, dallanma, çapraz bağlanma ve oksijen içeren fonksiyonel grupları oluşmaktadır. Sonlanma basamağının son ürünleri Olefinler, aldehitler ve ketonlardır (Gewert vd., 2015).

Yüksek molekül ağırlıklı PE, PP ve PS polimerlerinin, ölçülebilir bir oranda biyolojik bozunma gerçekleşmeden önce, abiyotik bozunma yoluyla daha küçük parçalara parçalanması gerektirmektedir. Polimerler çok büyükse mikrobiyal hücrel membranlardan geçemezler. Ayrıca abiyotik bozunma, polimerin hidrofiliğini artıran ve dolayısıyla biyolojik bozunma için kullanılabilirliğini artıran karbonil grupları üretmektedir. Biyolojik bozunma sırasında polimer monomerlerine dönüştürülür (Shah vd., 2008). Katkı maddesi olarak kullanılan antioksidanlar ve stabilizatörler polimerin bozunmasını engellerken, prooksidan katkı maddeleri polimerin bozunmaya karşı daha duyarlı olmasını sağlamaktadır (Gewert vd., 2015).

- Ana Zincirde Heteroatomlu Plastikler

Ana zincirde karbon ve hetero atomlarından oluşan polimerlerden yapılan plastik malzemeler, yalnızca karbon omurgasına sahip polimerlere kıyasla daha yüksek termal stabiliteye sahiptir (Venkatachalam vd., 2012). Bunlar potansiyel olarak hidrolitik bölünmeye karşı hassas oldukları bilinmektedir. Örnek olarak ester veya amid bağları verilebilir. Bu gruptaki polimerler PET ve PU olarak bilinmektedir. Ana zincirde heteroatomlu plastikler foto-oksidasyon, hidroliz ve biyolojik bozunma yoluyla bozunabilmektedir (Müller vd., 2005). Bu daha küçük parçaların ve karboksilik uç grupların oluşmasıyla sonuçlanır.

1.1.5. Plastik Atıkların Ekosisteme Etkisi

Kaynaklara bakıldığında plastik atıklardan dolayı oluşan çevre kirliliği ilk kez 1970'lerde rapor edilmiştir (Carpenter & Smith, 1972). Artan plastik atık miktarı küresel bir endişe haline gelmektedir ve oldukça tehlikeli bir durumdur. Plastik atıklar, ayrı toplama ve geri dönüşüm yoluyla bertaraf ederek azaltmaya yönelik artan tüm çabalara rağmen, büyük miktarda plastik katı atıklar hâlâ çöp depolama alanlarında birikmeye devam etmektedir. 2017 yılı itibarıyla plastik üretiminin tamamından (8.300 milyon ton), atıkların geri dönüştürülmesi, yakılması (enerji geri kazanımı) ve evsel kullanımdaki plastiklerin hesaplanması sonrasında; %95'i çöplüklerde ve %5'i okyanuslarda ve diğer karasal alanlarda olmak üzere yaklaşık %60'ı çevrede kaldığı rapor edilmiştir (Ragaert vd., 2017). Çevredeki plastik döküntüler doğada foto-, biyo- termo-oksidatif depolimerizasyon ve sürtünme yoluyla degrade olabilmektedir (Vocciante vd., 2019). Bu plastiklerin biyolojik olarak bozunması doğal ortamda mümkün olmasına rağmen 50 yıldan 100 yıla kadar uzun süreler alabilmektedir (Tablo 3).

Tablo 3. Farklı polimerlerin yoğunluk, kristallenme oranı ve doğada kullanım ömrü değerleri
PET: Polietilen tereftalat; LDPE: Düşük yoğunluklu polietilen; HDPE:Yüksek yoğunluklu polietilen; PS: Polistiren; PP: Polipropilen; PVC: Polivinil klorür

Polimer	Yoğunluk (g/ L)	Kristallenme (%)	Kullanım ömrü (yıl)
PET	1,35	0-50	450
LDPE	0,91-0,93	50	10-600
HDPE	0,94-0,97	70	>600
PS	1,03-1,09	0	50-80
PP	0,90-0,91	50	10-600
PVC	1,35-1,45	0	50-150

Plastiklerin doğadan uzaklaştırılması için günümüzde tercih edilen yöntemlerden yüksek sıcaklıklarda yakma veya çöp depolama alanlarında biriktirilmesi gibi yöntemler, çevre üzerinde birçok tehlikeli etkiye sebep olmaktadır. Atık depolama alanındaki artış, uzun yıllar süren bozunma süreciyle birleştiğinde, mevcut arazi alanının tükenmesine, potansiyel

olarak komşu arazileri etkilemesine ve tarım gibi elverişli alanların zarar görmesine neden olmaktadır (Awasthi vd., 2017). Plastik atıkların durmaksızın çevrede yayılması toprağın kirlenmesine neden olacak ve sonuçta gıda ve yem olarak kullanılan tarım ürünlerini etkileyecektir. Plastik degradasyonu sonucu açığa çıkan ürünlerinin birikmesi ve bu ürünlerin besin zincirine girmesi hem insanlar hem de hayvanlar için ciddi sağlık sorunları oluşturmaktadır. Düşük yoğunluklu polietilenden salınan metan ve etilen gibi eser gazların doğaya zararı oldukça yüksektir (Ali vd., 2021). Polietilen, polivinil ve polistiren gibi plastikler kullanıldığında yakılır, benzen, toluen ve ksilen gibi toksik maddeler havaya salınmaktadır. Salınan tehlikeli kimyasalların havaya karışması sonucu hayvanlar ve insanlar tarafından solunarak birçok kanser türüne, akciğer hastalığına, bağışıklık bozukluklarına vb. neden olmaktadır. İnsan ve hayvan sağlığı üzerinde oldukça zararlı etkilere sebep olan plastik kirliliğinin kaynakları kara hava ve deniz ortamlarına kadar uzanmaktadır (Khandare vd., 2021).

Çevremizde en çok plastik kirliliğine sebep olan plastik poşetler, ekosistemler üzerindeki büyük etkileri önemli endişelere yol açmaktadır. Plastik poşetler dışında da yaygın kullanılan diğer plastik türleri biyolojik olarak parçalanamadığı için günümüzde farklı çalışmalarla plastik degradasyon yolları araştırılmaktadır.

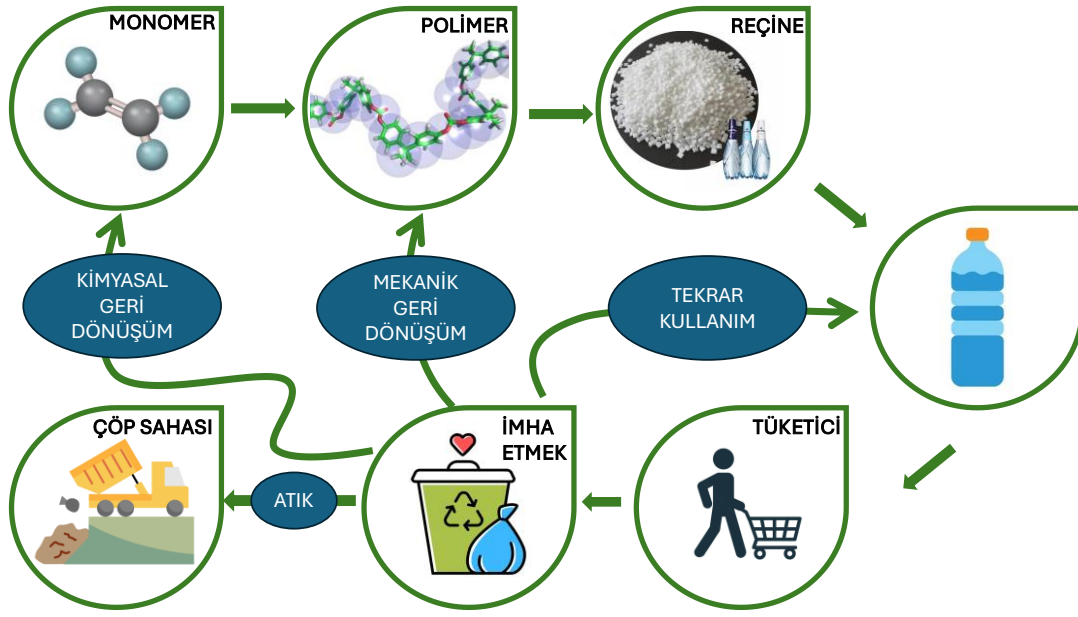
Günümüzde kullanılan plastiklerin doğaya zarar vermesinin yanında insan ve hayvanlara da zararı oldukça fazladır (Elbagory vd., 2022; Gilani vd., 2015). Örneğin deniz hayvanlarının, büyük baş hayvanların ve kuşların besin olarak plastikleri tüketmelerinden dolayı plastik parçacıklar hayvanların midelerinde birikmeye başlar (Khandare vd., 2021). Bu durumdan kaynaklı hayvanlar düzgün şekilde besin ihtiyaçlarını karşılayamaz ve sağlık sorunları ortaya çıkmaktadır (Bardsley, D., 2021). Ayrıca hayvanların yedikleri plastik ürünler yavaş yavaş kimyasal maddeler salgılamaya başlar ve hayvandan insanların besin olarak kullanmak için elde ettikleri ürünlerin yapısına bu kimyasal maddeler karışmış olur. Dolayısıyla bu durum insan sağlığını da olumsuz etkileyip çeşitli sağlık sorunlarına sebep olmaktadır (Priyanka & Dey, 2018).

1.1.6. Plastik Geri Dönüşüm Yöntemleri

Çevredeki toksik kirleticileri minimize edebilmek için mekanik, kimyasal ve biyolojik türde çeşitli yöntemler bulunmaktadır (Şekil 2). Mekanik geri dönüşüm, çevreden toplanan plastik atıkların geri dönüşüm merkezine transferi gerçekleştirilip fiziksel olarak işlenerek

tekrardan kullanılabilir hale getirilmesi işlemidir. Burada plastik atıklar sırasıyla parçalama, öğütme, yıkama ve eritme adımları uygulanarak granül veya talaş formuna dönüştürülür. Bu işlemlerin ardından elde edilen granül veya talaş yeni plastik ürünlerin üretiminde kullanılmak üzere saklanmalıdır. Mekanik geri dönüşüm, günümüzde düşük enerji tüketimi ve ekonomik açıdan avantajlı olması sebebiyle diğer yöntemlere göre daha fazla tercih edilmektedir (Rathi vd., 2021). Bu yöntem, özellikle PET şişeler ve poliolefin bazlı ambalajlar gibi tek tip ve nispeten temiz akışlarda en çok tercih edilen ve çevresel açıdan en avantajlı geri dönüşüm yöntemidir. Fakat polimerlerin termomekanik işlemler sırasında yapısında değişikliklere sebep olmasından kaynaklı malzeme özelliklerinin kademeli olarak düşmesi (down-cycling) görülmektedir (Geyer vd., 2017; Ragaert vd., 2017).

Kimyasal geri dönüşüm, polimerlerin monomerlerine veya diğer kimyasal ürünlere dönüştürülmesini hedefleyen termokimyasal ya da solvolitik işlemleri kapsar. Bu yöntem, özellikle karışık ve kirli atık akışlarının işlenmesinde mekanik geri dönüşüme kıyasla daha esnek çözümler sunar. Piroliz ve gazifikasyon poliolefin bazlı plastiklerden yakıt veya sentez gazı üretimini sağlarken, PET gibi polyesterler için hidroliz, glikoliz ve metanoliz gibi depolimerizasyon yöntemleri saf monomer geri kazanımı sunar. Kimyasal geri dönüşüm, malzeme kalitesini ilk üretim seviyesinde koruma potansiyeli taşısa da, yüksek enerji gereksinimi ve proses maliyetleri yaygınlaşmasının önündeki temel sınırlayıcı etkenlerdir (Ragaert vd., 2017).



Şekil 2. Mekanik geri dönüşüm yöntemi ile istenen verimin alınamaması gibi durumlarda kullanılan kimyasal geri dönüşüm yöntemi parçalanması

Biyolojik yöntemler, plastiklerin parçalanmasında enzimler veya mikroorganizmaların kullanıldığı sürdürülebilir alternatiflerdir. Biyolojik geri dönüşüm genellikle kontrollü endüstriyel koşullarda yürütülürken, biyoremediasyon çevresel ortamlarda (toprak, deniz, çöplük) plastiklerin doğal mikrobiyal topluluklar tarafından parçalanmasını ifade etmektedir (Ayangbenro & Babalola, 2017). Bu süreçlerin ortak hedefi, plastik polimerlerin daha küçük moleküllere, monomerlere ve son aşamada mineralizasyon ürünlerine (CO_2 , H_2O , biyokütle) dönüştürülmesidir (Ojuederie & Babalola, 2017). Biyoremediasyon diğer yöntemlerle kıyaslandığında daha ucuz, kolay, güvenilir ve en önemlisi çevre dostu bir yaklaşım olduğundan daha avantajlıdır. Biyoremediasyon için kullanılan mikroorganizmalar, kataliz yoluyla biyolojik parçalamayı dahada kolaylaştıran hidrolazlar, lipazlar, oksidoredüktazlar, oksijenazlar, , peroksidazlar, fosfodiesterazlar vb. gibi farklı enzim türlerini salgılamaktadırlar (Sharma vd., 2018). Yukarıda saydığımız enzimler aktivasyon enerjisini düşürerek plastik gibi toksik kirleticilerin biyolojik olarak parçalanmasını sağlamaktadırlar. Enzim kullanılarak çevresel kirleticilerin degradasyonunun sağlanması daha spesifik olabilecek bir yöntemdir. Bunun sebebi enzimler, enzim-substrat etkileşimine bağlı olarak çalışmaktadırlar yani enzim, substratla temas ettiği ve kataliz işlemini gerçekleştirdiği, aktif bölge dediğimiz substrat için eşsiz bir bağlanma bölgesine sahiptir (Ayılara & Babalola, 2023; Rizvi vd., 2022). Enzimatik

biyobozunma, mikrobiyal biyoremediasyon yöntemine göre çok daha fazla avantaja sahiptir; oldukça spesifik, hızlı, besin kaynağına gerek yok ve daha geniş çalışma koşulları içermektedir. Ayrıca zorlu çevre koşullarında bile etkili sonuçlar vermektedir (Kensa, 2011). Biyoremediasyon teknolojilerine bakıldığında enzimatik bozunma diğer yöntemlere göre daha net sonuçlar vermektedir. Fakat enzim üretimi için uygun mikrobiyal kaynakların seçimi kritik öneme sahiptir. Bunun yanında endüstriyel ölçekteki işlemler için enzimlerin üretimi ve saflaştırılması da oldukça yüksek maliyetlere sebep olmaktadır. Günümüzde araştırmacılar immobilizasyon tekniklerinden faydalananarak proses verimliliğini arttırmaya, enzim üretimi ve enzimin saflaştırılması için gereken maliyeti biraz olsa da azaltabilmek amacıyla kullanmaktadırlar (Antecka vd., 2018; Ba vd., 2013).

1.2. Biyoremediasyon Ajanları Olarak Kullanılan Farklı Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar tarafından çevremizdeki toksik bileşenleri mineralizasyon olarak bilinen süreçte monomerlerine kadar parçalama gerçekleştirilebilmektedir (G. Kumar vd., 2022; Mahmoud, 2021). Biyoremediasyon sürecinde bakteri, mantar, alg vb. mikroorganizmalar kullanılabilir. Mikroplar ve bakteriler doğada birçok alanda bulunabilir ve çok çeşitli substratları karbon kaynağı yani besin kaynağı olarak kullanabilmektedirler. Dolayısıyla çok çeşitli kirleticileri absorbe edebildikleri olağandışı ortamlarda yaşamlarını sürdürebilmektedirler. (Kour vd., 2022). Bunun yanı sıra tuhaf ortamlarda hayatta kalma yetenekleri de verimliliklerini artırmaktadır. Örneğin asidofiller asidik ortamlarda, psikrofiller soğuk iklimlerde, halofiller ise tuzlu ortamlarda yaşamlarını sürdürebilmektedir (Perera & Hemamali, 2022).

1.2.1. Mikrobiyal Biyoremediasyonun Mekanizmaları

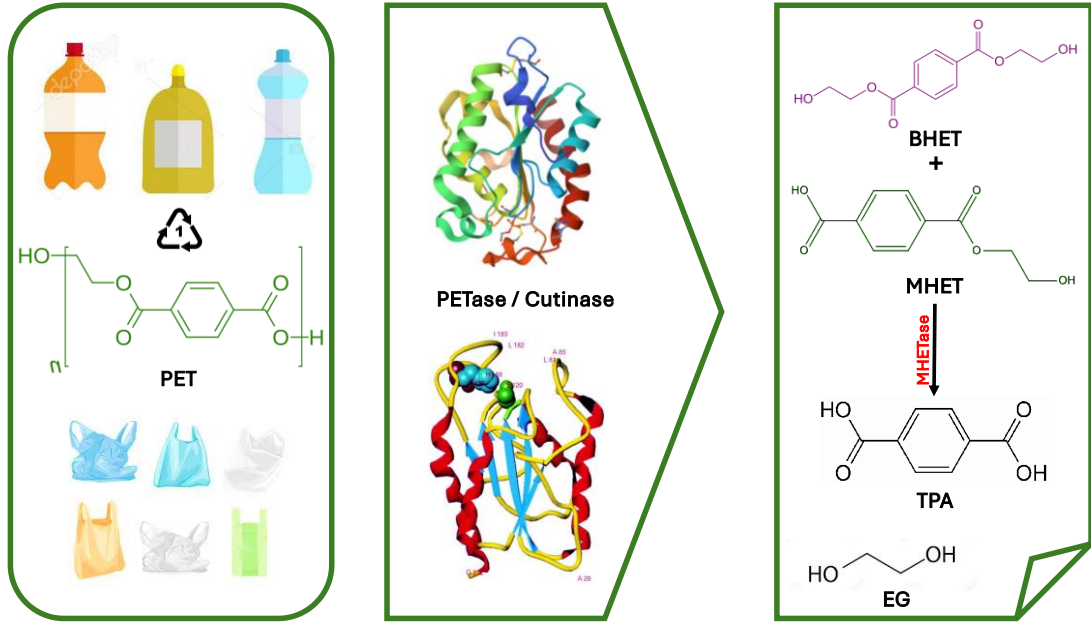
Mikroplar farklı mekanizmalar kullanarak çevresel kirleticileri doğadan uzaklaştırabilmektedir. Bu mekanizmalar immobilizasyon ve mobilizasyon olarak iki gruba ayrılmaktadır (Ndeddy Aka & Babalola, 2017; Verma & Kuila, 2019). Mobilizasyon süreci, enzimatik oksidasyon, biyoliç, enzimatik indirgeme vb. prosedürünü içermektedir. Immobilizasyon mekanizmasında ise biyobirikim, kompleksleşme, biyosorpsiyon ve çökelmeyi (katılaşma) gibi yöntemleri içerir (Ayangbenro vd., 2019). Mineralizasyon sırasında mikroorganizmalar çevresel toksik maddelerin karbondioksit ve su gibi son

ürünlere veya diğer ara metabolik maddelere dönüştürülmesine yardımcı olmaktadır. İmmobilizasyon bileşiklerin farklı bir forma dönüştürülmek ve bunu yaparken daha az zararlı bir maddenin elde edilmesi için kullanılan bir yöntemdir (Pratush vd., 2018). Bu yöntem genellikle yüksek oranda kirlenmiş ortamlarda bulunan ağır metallerin biyolojik olarak arıtılması için kullanılmaktadır.

1.3. Polietilen Tereftalat (PET)

1.3.1. PET'in Özellikleri

Plastikler arasında neredeyse en fazla üretilen Polietilen tereftalat başlıca sentetik petroplastiklerden biri olarak bilinmektedir. Şekilde kimyasal formülü ($C_{10}H_8O_4$)_n olan PET'in molekül yapısı gösterilmektedir (Şekil 3). Dünya geneline bakıldığında PET 'in kullanımı oldukça geniştir. Örneğin iplik, lastik, kablo, şişe, fotoğraf filmi, saklama kapları, emniyet kemeri, gıda ambalajları ve çoğu kişisel bakım ürünlerinin ambalajları gibi çeşitli alanlarda karşımıza çıkmaktadır.



Şekil 3. PET plastiğin molekül yapısı ve monomerleri

PET plastik düşük viskoziteli veya yüksek viskoziteli olarak iki sınıfa ayrılabilir. Düşük viskoziteli PET reçine iplik, şişe, kova, kap ve fotoğraf filmi

üretiminde kullanılmaktadır. Yüksek viskoziteye sahip PET türleri; lastikler için takviye kablolarında, emniyet kemeri üretiminde, otomotivde kullanılan dayanıklı parçaların imalatında ve benzeri pek çok yapısal uygulamada tercih edilmektedir. PET'in kimyasal yapısı incelendiğinde, bu polimerin etilen glikol ile dimetiltereftalat (DMT) ya da tereftalik asit (TPA) monomerlerinin reaksiyonu sonucunda oluştuğu görülmektedir. Endüstriyel ölçekte kullanılan hammaddeler genellikle dimetiltereftalat ve tereftalik asittir. PET sentezi iki temel basamaktan oluşur: İlk aşamada bis-(2-hidroksietil)-tereftalat (BHET) monomeri ile metanol ve su açığa çıkar. İkinci aşamada ise BHET monomerleri belirli sıcaklık, basınç ve katalizör koşullarında polimerleşerek PET yapısını oluşturur (Tayyar & Üstün Çetin, 2010). Tablo 4'te PET'in fiziksel ve kimyasal özellikleri belirtilmiştir.

Tablo 4. PET'in fiziksel ve kimyasal özellikleri (Anabal,2007)

ÖZELLİK	TEST METODU	DEĞER
Moleküler Ağırlık	-	192 (gmol ⁻¹)
Ortalama Mol. Ağırlık (MW)	-	30,000-80,000 (gmol ⁻¹)
Mark-Houwink Parametreleri	-	k=3,72x10 ⁻² (ml/g ⁻¹)=0,73
Erime Sıcaklığı	DSC	265 °C
Camsı Geçiş Sıcaklığı	DSC	69-115 °C
Yoğunluk	-	1,41(g/cm ⁻³)
Kırılma Kuvveti	Tensile	50 (Mpa)
Çekme Dayanımı	-	1700 (Mpa)
Su Absorbsiyonu (24 Saat Sonra)	-	0,5 (%)
Darbe Dayanımı	ASTM D256-86	90 (J m ⁻¹)
Deformasyona Uğrayabildiği En Düşük Gerilme Değeri	Tensile	4 (%)

PET'in kimyasal ve fiziksel özelliklerine bakıldığında kristal yapılı olduğunu ve $T_e = 265$ °C, $T_c = 80$ °C ve 175 °C değerlerine kadar kullanışlıdır. Bu plastik türü alkalilere karşı oldukça duyarlı olup asitlerden etkilenmemektedir. PET bir organik asit ve bir alkolün polikondenzasyonu ile oluşmaktadır (Seventekin, 2001). PET üretimi, temel olarak iki ana

yöntemle gerçekleştirilir: doğrudan esterleşme (PTA yöntemi) ve transesterifikasyon (DMT yöntemi).

- PTA Yöntemi

Bu yöntemde, pürifiye tereftalik asit (PTA) ve etilen glikol (EG), yüksek sıcaklık ve basınç altında, genellikle antimon (Sb) veya titanyum (Ti) bileşikleri gibi katalizörler eşliğinde reaksiyona girerler. Reaksiyon sonucunda su açığa çıkar ve sürekli olarak uzaklaştırılır. Elde edilen bis(2-hidroksietil) tereftalat (BHET) monomerleri, polikondenzasyon reaksiyonuna tabi tutulur. Bu süreç, PET'in yüksek moleküler ağırlıklı ve düşük viskoziteli formunun elde edilmesini sağlar (USEON, 2025).

- DMT Yöntemi

Alternatif olarak, dimetil tereftalat (DMT) ve etilen glikol (EG), metanol (CH_3OH) yan ürünü ile, bazik bir katalizör eşliğinde 150–200 °C sıcaklıkta reaksiyona girer. Bu reaksiyon sonucunda metanol uzaklaştırılır ve BHET monomerleri elde edilir. Ardından, bu monomerler polikondenzasyon reaksiyonuna tabi tutulur. Transesterifikasyon yöntemi, DMT'nin saflaştırılmasının daha kolay olması nedeniyle tercih edilebilir (Bashir vd., 2005).

- Polikondenzasyon Reaksiyonu

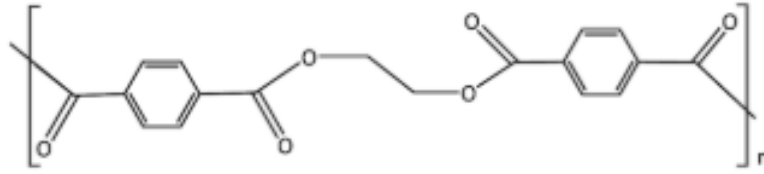
Elde edilen BHET monomerleri, yüksek sıcaklık (250–280 °C) ve düşük basınç altında, genellikle antimon trioksit (Sb_2O_3) gibi katalizörler eşliğinde polikondenzasyon reaksiyonuna tabi tutulur. Bu süreçte, ester bağları arasında su açığa çıkar ve sürekli olarak uzaklaştırılır. Sonuç olarak, yüksek moleküler ağırlıklı PET polimeri elde edilir ve granül veya pellet formunda üretilir (Al-Munif vd., 2014).

PET molekülünün yapısı Şekil 4'te gösterilmektedir. PET yapısı gereği doğada kendi kendine ayrışamaz ve yıllarca doğada kalmaktadır. Fakat geri dönüşüm sayesinde PET tekrar tekrar kullanılabilen bir malzeme çeşididir (Jwaida vd., 2023). PET'in diğer bir özelliği olan havada yüksek cam geçiş sıcaklığı (T_g) değerleri 75-80 C dir. Fakat bu T_h değerleri sulu çözeltide yaklaşık olarak 60-65 C ye kadar düşebilmektedir. Bahsettiğimiz bu T_g

sıcaklıklarında PET polyesterinin amorf bölgesi daha erişebilir hale gelmekte olup mikrobiyal bozunma ya da enzimatik bozunma yöntemleri ile daha kolay şekilde deforme edilebilmektedir (Odusanya vd., 2013).

PET 'in düşük zincir hareketliliği, yüksek kristal yapısı ve yüksek yüzey hidrofobik özellikleri mikrobiyal ya da enzimatik bozunma yöntemlerini kısıtlayan faktörlerdir. Bunun yanı sıra doğada bulunan enzimlerin kararlı C-C bağlarını parçalama yeteneklerinin olmaması, vinil polimerlerin biyolojik olarak degradasyonunun gerçekleşmesini engellemektedir. Polimerlerin yapısında karbonil grupları meydana getirmek enzimatik reaksiyonların oluşmasına yardımcı olmaktadır. Karbonil gruplarını ekleyebilmek için oksidasyon ve ultraviyole yöntemleri kullanılarak aktif hale gelen abiyotik bölünme oluşmaktadır. Böylece polimerin yapısında bulunan ester bağları biyolojik bozunmaya oldukça hassas hale gelebilmektedir. PET'in tüm özellikleri göz önüne alındığında esnek amorf yapısının daha erişebilir olduğu yarı kristal alanlarının ise kısıtlı erişebilirlikten dolayı plastik bozunmasının hızını oldukça yavaşlattığı görülmektedir (Yoshida vd., 2021).

1.3.2. PET Degredasyonu



Şekil 4. Polietilen tereftalat (PET) molekül yapısı

Polietilen tereftalat , yüksek mekanik dayanıklılığı ve kimyasal stabilitesi nedeniyle ambalaj, tekstil ve endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılan bir sentetik polyesterdir; ancak bu özellikler aynı zamanda PET'in çevrede uzun yıllar kalmasına yol açar. PET'in bozunumu hem fiziksel ve kimyasal hem de biyolojik süreçlerle gerçekleşir. Fiziksel bozunma, UV ışığı ve yüksek sıcaklık gibi çevresel faktörlerin etkisiyle polimer zincirlerinde oksidatif kırılmalara ve zincir uzunluğunda kısalmaya neden olur; bu süreç malzemenin mekanik dayanıklılığını düşürür ve kırılgan hale getirir. Benzer şekilde, hidroliz reaksiyonları ester bağlarını hedef alarak polimeri daha kısa zincirli oligomerler ve monomerler hâline getirir (Andrady, 2011). Biyolojik degradasyon, PET'in doğada çözünürlüğünün düşük olmasına rağmen özellikle son yıllarda keşfedilen

mikroorganizmalar ve enzimler aracılığıyla mümkün hale gelmiştir. *Ideonella sakaiensis* bakterisi, PETaz ve MHETaz enzimleri ile PET'i tereftalik asit (TPA) ve etilen glikol (EG) monomerlerine ayırabilmektedir; bu enzimatik süreç, ester bağlarını spesifik olarak hedefleyerek polimer zincirlerini hidroliz eder ve biyobozunabilir monomerler oluşturur (Yoshida vd., 2016). Bunun yanında, mühendislik çalışmaları ile PET depolimeraz enzimlerinin termostabilitesi ve katalitik verimliliği artırılmış, böylece endüstriyel ölçekli biyolojik geri dönüşüm potansiyeli ortaya konmuştur (Tournier vd., 2020). PET degradasyonunda ortam sıcaklığı, pH, nem ve mikroorganizma türü gibi faktörler sürecin hızını önemli ölçüde etkiler; örneğin yüksek sıcaklık ve nemli ortamlar hidroliz hızını artırırken, düşük sıcaklıklar ve düşük enzim konsantrasyonları süreci yavaşlatmaktadır (Urbanek vd., 2018). Biyolojik PET degradasyonu, plastik atık yönetiminde mekanik ve kimyasal geri dönüşüm yöntemlerini tamamlayıcı bir rol oynayarak sürdürülebilir çevre yönetimi stratejilerinde kritik bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (Tournier vd., 2020; Urbanek vd., 2018).

1.3.3. Plastik Sektöründe PET

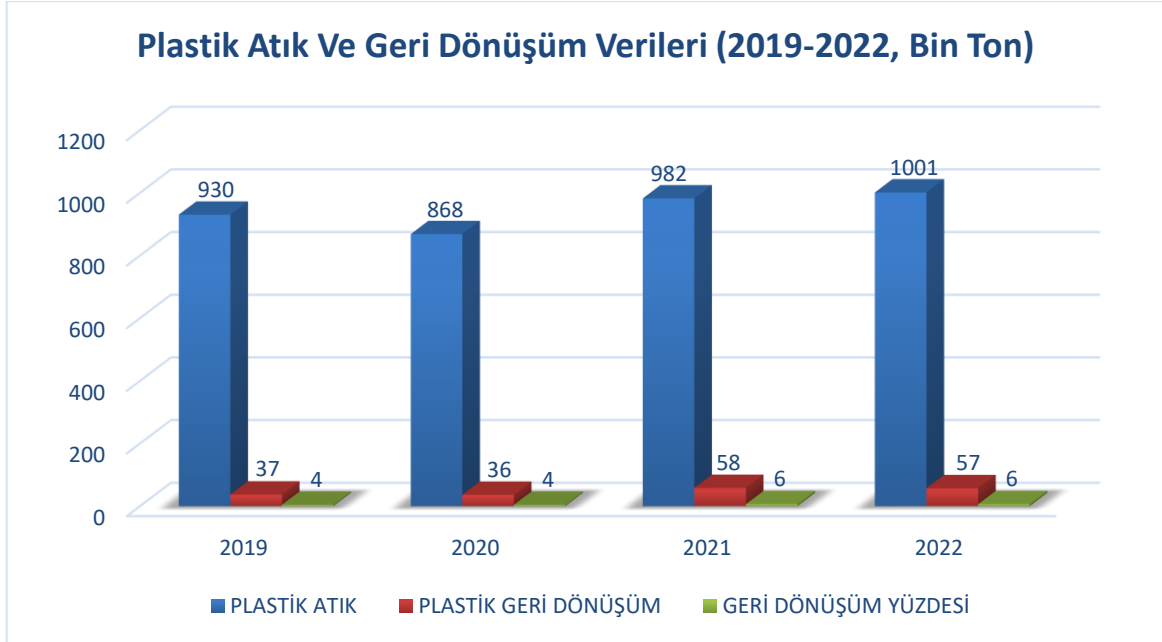
Yapılan araştırmalara göre yaklaşık 1950 sonrası plastik üretiminin arttığı bilinmekte olup yenilenemeyen hidrokarbon olan petrol ve doğal gaz maddelerinden elde edilen plastiklerin o zamanlarda yıllık olarak dünya çapında üretimi 2 milyon ton iken 2020 yılında bu sayı neredeyse 430 milyon tonu geçmektedir (Geyer vd., 2017; *OECD Work on Plastics.*, 2021). Üretilen plastiklerin kullanım sonrasında dünyamızda oluşturduğu plastik atık miktarlarına baktığımızda ise; bu rakamlar oldukça ürkütücü olabilmektedir. Örneğin 2000 yılında plastik atık miktarı yaklaşık 155 milyon ton olduğu bu rakamın 20 yıl içinde neredeyse iki katına yaklaştığı 360 milyon ton olduğu belirlenmiştir. Dünyamız için bu veriler oldukça tehdit edicidir. Plastik atık miktarının bu kadar büyük rakamlar olmasının sebeplerine bakıldığında nüfus artışı ve bilinçsiz üretim ve tüketim alışkanlığımız söylenebilir (*UNFPA*, 2022). Elde edilen verilere bakıldığında yıllık olarak 2020 yılında üretilen plastik 400 milyon tondur ve üretilen plastiğin neredeyse %40'ı tek kullanımlık plastik olup bu plastik atıkların çeşitli alanlarda uzun yıllar boyunca birikmesiyle ekosisteme verdiği zararı oldukça büyüktür (Briggs, H., 2022). Bilinçsiz plastik üretimi ve kullanımı böyle devam ederse, 2050 yılına kadar yıllık küresel plastik üretiminin yaklaşık olarak 1.200 milyon tonun üzerine çıkacağı öngörülmektedir (Environment, 2023). Birleşmiş Milletler

Çevre Programı'nın raporuna göre, 2050 yılına kadar doğal çevreye ve çöplüklere atılan toplam plastik atığın ise 12 milyar ton olacağı tahmin edilmektedir (Morris, 2011).

Plastikler büyük bir kısmının yenilenemeyen fosil yakıtlardan (petrol, doğal gaz vb.) üretildiği çok az kısmının ise nişasta, bitkisel yağ ve selüloz gibi çeşitli maddelerden üretildiği bilinmektedir. Bundan dolayı plastikler ekosistem için oldukça tehlikeli polimerlerdir. Bu polimerler kullanılıp çevrede birikmesiyle ya da yakılıp yok edilmesi ekosisteme oldukça zarar vermektedir. Ekosisteme verdiği zarar düşünüldüğünde bu durumda yapılması gereken kullanılan plastiklerin tekrardan nasıl geri dönüştürüleceği konusunda çalışmaları arttırmaktır. Geri dönüştürülemeyen neredeyse 25 milyon ton plastik atık dünyamızda çöplüklerde, denizlerde, okyanuslarda, karada birçok alanda birikmektedir. Yıllar geçtikçe atık plastikler reaksiyona girip zararlı kimyasal maddeler salgılamaktadır. 2021 yılında yapılan bir araştırmaya göre 555 balık türünden çalışma için alınan numunelerin 386'ında plastik atık görülmüştür. Denizlerde plastik atıktan etkilenen canlı türü sayısına bakıldığında bu rakamın yaklaşık olarak 400 olduğu bulunmuştur (Euronews, 2022). Plastik yıllık üretimi 430 milyon ton olduğu bilinmektedir. Bu plastiklerin sadece %12'si doğadan yakılarak uzaklaştırılmakta ve sadece %9'u geri dönüştürülebilmektedir. Yani geriye kalan %79 oranındaki plastik atıkların bahsettiğimiz gibi dünyanın çeşitli alanlarında birikmektedir (Environment, 2023).

Plastik atık ve geri dönüşüm grafiğine baktığımızda 2019-2020 yılları arası üretim miktarlarında devamlı bir artış söz konusudur (Şekil 5). 2020 yılında Covid-19 etkisiyle pandeminin başlamasının ardından plastik üretiminde düşüşler meydana gelmiştir. Bunun en büyük sebeplerinden biri tedarik zincirlerinde yaşanan aksamalar olmuştur. Fakat pandemide eve kapanan tüketiciler evlerine sipariş verme durumunu kısa bir süre içerisinde alışkanlık haline getirmiştir. Böylece plastik üretimi oldukça artmıştır. Hatta pandemi sonrası tüketicilerde bu alışkanlık devamlılık kazandığı için plastik üretimi devamlı olarak artmaktadır. Paketlerde kullanılan malzeme genellikle plastik türü olduğundan dolayı çevreye salınan plastik atık miktarı da maalesef artmıştır. Grafiğe baktığımızda 2019 yılında plastik atık miktarı 930 bin iken pandemi ile bu rakam 2020 yılında 868 bin tona düşmektedir. Fakat anlattığımız bilinçsiz tüketim sonucu 2021 yılında bu rakam 982 bin tona ulaşmış hatta 2022 de hızla artarak plastik atık miktarı 1 milyon tonu geçmektedir. Araştırmalar sonucu bu atıkların çok az bir kısmını geri dönüştürebilmekteyiz (Yakışık,

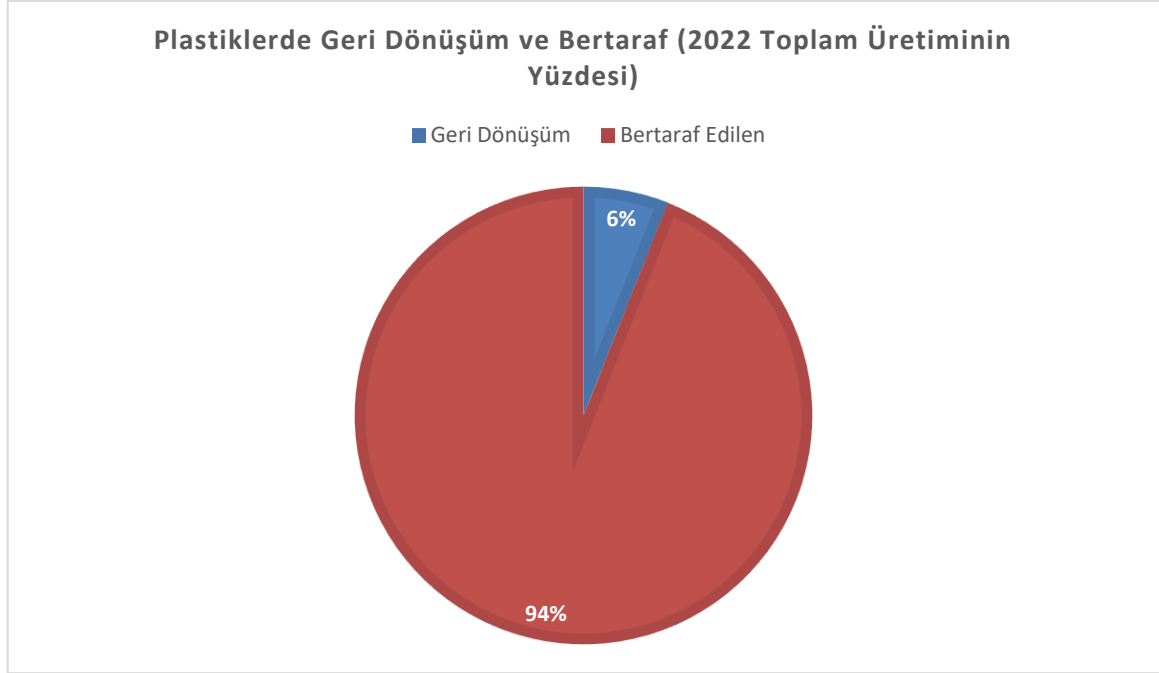
2023). Bu durum aslında dünyamızı daha iyi bir hale getirmemiz için ne kadar çok çalışmamız gerektiğini düşündürmektedir.



Şekil 5. 2019-2022 plastik atık geri dönüşüm ve imha (bertaraf) verilerinin dağılımı

Dolayısıyla plastik atıkların geri dönüşümü ve bertarafına ilişkin veriler, etkin yönetim ve çözüm uygulamaları hayata geçirilmediği takdirde gelecekte ekosistem için nasıl bir tehdit oluşturabileceğine dair önemli ipuçları vermektedir. 2022 yılı verilerine göre plastik atıkların yalnızca %6'sı geri dönüştürülürken, %94'ü bertaraf edilmiş ya da doğrudan ekosisteme bırakılmıştır (Şekil 6). Plastik atıkların bu denli büyük bir kısmına ilişkin detaylı istatistiklere ulaşılamaması, sorunun görünenden çok daha büyük bir boyuta işaret ettiğini göstermektedir.

Türkiye'de 2021 yılına ait plastik atık verileri incelendiğinde, 5 milyon 600 bin ton plastik atık olduğu bildirilmektedir. Bu miktar, ülkemizin plastik atık yönetimindeki durumunu ve küresel ölçekteki yerini ortaya koymaktadır. Nitekim 2021 yılı verileri, Türkiye'nin plastik atık oluşturan ülkeler arasında 9. sırada yer aldığını göstermektedir (Öztürk, 2022).

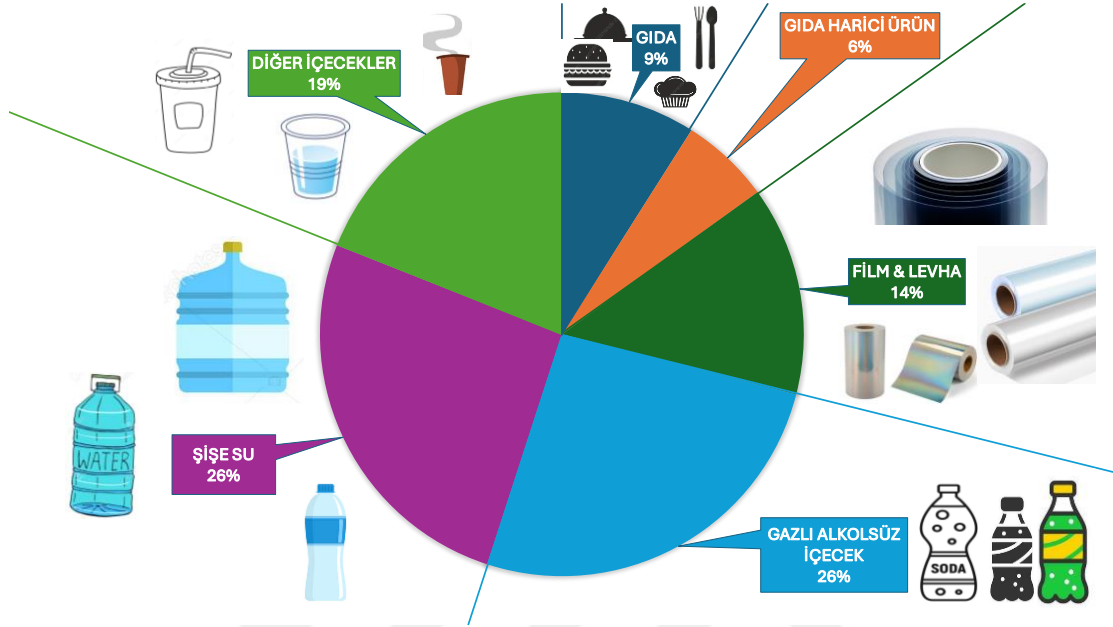


Şekil 6. Plastik Atık ve Geri Dönüşüm Verileri (2019-2022) (The National Environment Agency, 2023)

İçecek endüstrisinde PET şişelere yönelik artan talep, küresel pazarın büyük ölçüde PET ürünlerine yönelmesine neden olmaktadır. Su, gazlı içecekler, meyve suları ve enerji içeceklerinin ambalajlanmasında PET şişelerin yaygın olarak tercih edilmesi bu talebi desteklemektedir. Ayrıca kişisel bakım sektöründe pansuman, şampuan ve losyon gibi ürünlerin ambalajlanmasında PET kullanımının giderek artması da pazarın büyümesine katkı sağlamaktadır. Tüketicilerin değişen yaşam tarzları ise taşınabilir, kullanışlı ve hareket halindeyken tüketimi kolay ürünlere yönelik ambalaj gereksinimini artırmakta; bu da hafif ve taşınabilir PET şişelerin daha fazla tercih edilmesine yol açmaktadır. Tüm bu faktörler doğrultusunda içecek endüstrisindeki PET şişelere yönelik artan talep, küresel pazar büyümesini desteklemeye devam etmektedir (IMARC, 2024).

PET, en yaygın biçimde şişe üretiminde kullanılan plastik türüdür. Küresel PET şişe pazarı 2019 yılında 12,7 milyon tonluk kapasiteye ulaşmıştır. PP, HDPE ve PVC gibi diğer plastik çeşitlerinden üretilen şişelerle kıyaslandığında PET şişeler çok daha dayanıklı, hafif ve ekonomik olmaları nedeniyle tercih edilmektedir. PET'in şeffaf olması, reaktif olmaması ve yüksek termal kararlılık göstermesi de önemli avantajlar sağlamaktadır. Ayrıca geri dönüştürülebilir olması ve tekrar tekrar kullanılabilmesi, PET ürünlerinin üretim maliyetlerini düşürmekte ve hem üreticiler hem tüketiciler tarafından tercih edilmesini

artırmaktadır (IMARC, 2024). Dünya genelinde oldukça sık kullanılan PET türü plastiğin sektörlere göre kullanım oranları Şekil 7’de gösterilmektedir.



Şekil 7. Farklı sektörlere göre PET türü plastik tüketiminin dağılımı Yıl: 2016, toplam tüketim: 23,5 milyon ton

1.4. Enzimler

Enzimler biyolojik katalizörler olarak tanımlanmakta olup canlı hücrelerde gerçekleşen kimyasal reaksiyonların hızını artırarak, bu reaksiyonların genel bir değişime uğramadan gerçekleşmesini sağlamaktadır. Enzimlerin katalizlediği reaksiyonlarda etkileşime girdikleri moleküller “substrat” olarak adlandırılır. Her enzim, belirli bir substrat veya substrat grubu üzerinde etkili olan yüksek özgüllüğe sahip protein yapıları katalizörlerdir. Tüm enzimler proteinlerden oluşmasına rağmen, kofaktör adı verilen protein olmayan yardımcı bileşenlerin yokluğunda birçok enzim katalitik aktivitesini gerçekleştiremez. Böyle durumlarda enzimin aktif olmayan protein kısmına “apoenzim”, apoenzimin kofaktör ile birleşmiş hâline ise “holoenzim” denilmektedir (Palmer & Bonner, 2011).

1.4.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler başlangıçta, katalizledikleri substratların isimlerine “-az” eki getirilerek adlandırılmıştır. Bu yöntem, enzimin hangi substrat üzerinde etkili olduğu hakkında genel bir bilgi verse de bazı enzim isimleri substrat türü hakkında yeterli açıklık sağlamamıştır. Zamanla keşfedilen enzim sayısının artmasıyla daha sistematik ve evrensel bir sınıflandırma ihtiyacı ortaya çıkmış; bunun sonucunda Uluslararası Enzim Komisyonu (EC) enzimleri katalizledikleri reaksiyon türleri ve mekanizmalarına göre gruplandırmıştır.

Sistematik enzim adlandırmasının temel özellikleri şu şekildedir:

- Reaksiyon tipleri ve bu reaksiyonları katalizleyen enzimler 6 ana gruba ayrılmaktadır.
- Enzim adları genellikle iki bölümden oluşur: İlk bölüm substrat adını, ikinci bölüm ise katalizlenen reaksiyon türünü tanımlar ve genellikle “-az” eki ile sonlandırılır.
- Reaksiyonun niteliğini daha ayrıntılı açıklamak gerektiğinde, bu bilgi parantez içinde enzim adının sonuna eklenebilir.

Her enzime ayrıca uluslararası kabul gören bir EC (Enzyme Commission) numarası verilmiştir. Dört basamaklı bu kodun ilk rakamı enzimin bağlı olduğu ana sınıfı, ikinci rakam alt grubu, üçüncü rakam alt-alt grubu ve dördüncü rakam ise aynı üç basamağı paylaşan enzimler arasındaki sıralamayı ifade eder (Keha & Küfrevioğlu, 2015). Enzimlerin ayrıldıkları 6 ana grup ve tanımları Tablo 5’te verilmiştir.

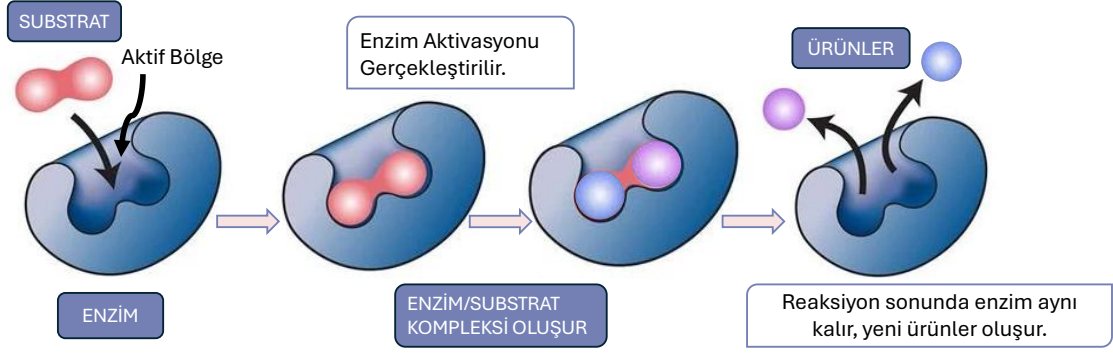
Tablo 5. Enzimlerin Uluslararası sınıflandırması: Enzimler katalizledikleri reaksiyon tipine göre altı ana sınıfa ayrılmaktadır

ENZİMLERİN ULUSLARARASI SINIFLANDIRMASI		
NO	SINIF	KATALİZLENEN TEPKİME TİPİ
1	Oksidoredüktazlar	Elektron, hibrit veya hidrojen atomu aktarımına aracılık eden reaksiyonlar
2	Transferazlar	Kimyasal grupların bir molekülden diğerine taşındığı tepkimeler
3	Hidrolazlar	Su katılarak bağların kırıldığı hidroliz reaksiyonları
4	Ligazlar	ATP kullanımıyla yeni kimyasal bağların sentezlendiği kondenzasyon tepkimeleri
5	İzomerazlar	Molekülün kendi içinde yeniden düzenlenerek izomerik bir forma dönüşmesi
6	Liyazlar	Çift bağ içeren yapıların eklenmesi ya da bağların kopmasıyla gerçekleşen reaksiyonlar

1.4.2. Enzimlerin Spesifikliği

Enzimler, yalnızca katalizledikleri reaksiyon türüne değil, aynı zamanda dönüştürdükleri substrata karşı da oldukça özgüllük gösterirler. Benzer yapıya sahip bileşikler, hatta aynı molekülün stereoisomerleri dahi enzim tarafından çoğu zaman tanınmaz ve reaksiyona sokulmaz. Bu yüksek özgüllük düzeyi sayesinde, oldukça basit yapıli hücrelerde dahi aynı zamanda çok sayıda farklı biyokimyasal reaksiyon düzenli biçimde yürütölmesi mümkün olmaktadır (Usluoğlu,2016).

Substratlar, enzimlerin aktif bölge olarak adlandırılan özel kısımlarına bağlanırlar (Şekil 8). Genellikle asimetrik bir oyuk ya da cep yapısında bulunan bu aktif merkezin üç boyutlu konformasyonu, substratın moleküler yapısıyla uyumludur ve substratın buraya özgün biçimde bağlanmasını mümkün kılmaktadır. Fiziksel yapı uygunluğunun yanı sıra, aktif bölge polarlık ve elektriksel yük bakımından da substrat molekülünün kolayca bağlanmasını sağlayacak özelliktedir. Substrat molekülündeki yüklü kısımlar aktif merkezdeki zıt yüklü bölgelerle elektrostatik etkileşimler yaparlar (Cerrahoğlu, 2014; Kaya vd., 2018).



Şekil 8. Enzim-Substrat Kompleksi

1.4.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Etki Eden Faktörler

- pH

Enzimlerin katalitik performansı, bulundukları ortamın hidrojen iyonu derişimine bağılı olarak değışiklik göstermektedir (Cerrahoğlu, 2014). Her enzimin en yüksek aktivite gösterdiği belirli bir pH aralığı bulunur ve bu aralığın dışına çıkıldığında enzim etkinliği azalır (Usluoğlu, 2016). pH değışimleri, enzimlerin ve substratların yapısında yer alan iyonik bölgelerin yük durumlarını etkilediğı için bu koşullar, substratın enzime bağlanma kapasitesini ve reaksiyon hızını doğrudan değıştirebilmektedir (Holme, 2005).

- Sıcaklık

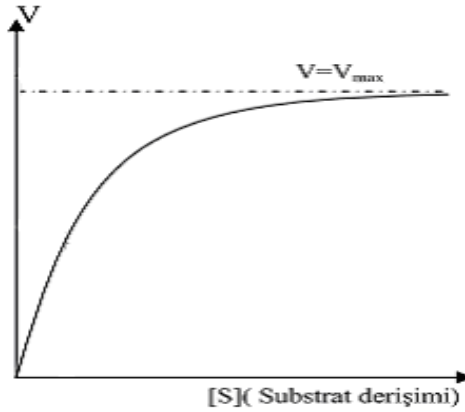
Bütün kimyasal reaksiyonların hızı sıcaklıkla artmaktadır. Enzimlerin dahil olduğu reaksiyonlar bu genel kuraldan farklı bir davranış göstermez. Artan sıcaklıkla enzimatik reaksiyon hızı artar, fakat 50-60°C üzerine çıkıldığında aktivitede düşüş gözlenir. Bu durum yüksek sıcaklıkla enzim yapısında meydana gelen denatürasyondan kaynaklanmaktadır.

Bir enzimde sıcaklığın 10 °C'lik değışimiyle ortaya çıkan aktivite farklılığı, Q10 katsayısı ile ifade edilmektedir. Örneğin, 20 °C ve 30 °C'de belirli miktardaki bir enzimin ölçülen aktiviteleri karşılaştırıldığında, yüksek sıcaklıkta elde edilen aktivite değeri düşük sıcaklıktaki değere bölünmesiyle Q10 hesaplanır. Genel olarak enzimler için Q10 değeri 1,7 ile 2,5 arasında değışmektedir. Bu nedenle laboratuvar ortamında gerçekleştirilen enzimatik aktivite ölçümlerinde sıcaklığın 0,1 °C hassasiyetinde kontrol edilmesi önem taşır. Bununla birlikte sıcaklık, in vivo koşullarda enzim aktivitesini düzenleyen temel bir faktör değıldir;

Çünkü canlı organizmalar, sıcaklığın görece sabit kaldığı izotermal sistemler olarak işlev görürler (Keha & Küfrevioğlu, 2015).

- Substrat Konsantrasyonu

Enzim aracılı reaksiyonlarda, enzim miktarı sabit tutulduğuunda, reaksiyon hızı substrat derişiminin artışıyla birlikte yükselir (Usluoğlu, 2016). Ancak substrat konsantrasyonu belirli bir düzeye ulaştığında enzim aktif bölgelerinin tamamı dolarak doygunluk meydana gelir. Bu noktadan sonra substrat miktarındaki artış reaksiyon hızını etkilemez ve hız sabit kalır (şekil 9). Böyle bir durumda enzim, maksimum hız (V_{max}) kapasitesinde çalışıyor kabul edilir.



şekil 9. Enzimatik reaksiyonun hızı üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Cerrahoğlu, 2014)

- Zaman

Bir enzim tarafından katalize edilen reaksiyon sürerken hız giderek düşer. Bunun nedeni reaksiyon devam ederken oluşan ürünlerin aksi yönde bir reaksiyon oluşturmaları, enzimin zamanla inaktive olması, substratın tükenmesi gibi olaylardır (Cerrahoğlu, 2014).

1.4.4. Mikrobiyal Enzimler Kullanılarak Çoklu Kirletici Biyolojik İyileştirme

- Hidrolitik Enzimler

Çoklu kirleticilerin uzaklaştırılmasında mikrobiyal enzim temelli biyolojik iyileştirme tekniklerinin kullanılması, geleneksel fiziksel ve kimyasal iyileştirme yöntemlerine kıyasla daha güvenli, çevre dostu ve ekonomik bir alternatif sunmaktadır (Da'ana vd., 2021). Mikrobiyal aktivite, özellikle organik kirleticilerin hidrolizinde (degradasyonunda) kritik bir role sahiptir. Molekül ağırlığı <600 kg/mol olan kirleticiler, hücre zarının gözenekli yapısından dolayı pasif olarak hücre içine taşınabilir. Bu nedenle, hidrolitik enzimler biyopolimerlerin bozunmasında ve parçalanmasında önemli bir konuma sahiptir (Dong & Zhang, 2021). Hidrolitik enzimler, kirleticilerdeki temel kimyasal bağları parçalayarak onların toksik etkilerini azaltır (Sharma vd., 2018).

Hidrolazlar, genel olarak hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen ve alt gruplara ayrılan enzimlerdir. Amilazlar, ksilanazlar, lipazlar, DNazlar ve proteazlar gibi hidrolazlar, gıda, yem, biyomedikal ve kimya endüstrilerinde geniş uygulama alanına sahiptir (Thapa vd., 2019). Ester bağlarının hidrolizini katalizleyen hidrolazlar hem ilk düzenleyici metabolik reaksiyonları hem de kirleticilerin bozunma süreçlerini hızlandırabilir. Serzterazlar ise ester bağlarının hidrolizinde ilk adımı katalizleyerek organofosfatlar, piretroidler ve karbamatlar gibi pestisitlerin ortamdan uzaklaştırılmasını önemli ölçüde artırmaktadır (Bhatt vd., 2021).

- Lipazlar

Lipazlar, lipidleri parçalayan enzimler olup birçok mikroorganizma tarafından sentezlenebilmektedir. Yapılan çalışmalar, toprakta bulunan lipaz aktivitesi ile çeşitli organik kirleticiler arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur (Zaaba & Jaafar, 2020). Mikroorganizmaların lipaz üretimi, topraktaki hidrokarbon kirleticilerinin parçalanmasında önemli bir rol oynar ve lipazlar bu nedenle biyoremediasyon çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır (Polyak vd., 2018). Petrol türevli kirleticilerin azaltılmasına yönelik yapılan mikrobiyal lipaz çalışmalarının da bu alanı desteklediği bildirilmektedir (Yusoff vd., 2020). Lipazlar; hidroliz, aminoliz, esterifikasyon ve alkoliz gibi farklı reaksiyonları katalizleyebilen çok yönlü enzimlerdir (Chandra vd., 2020). Triasilgliserollerin gliserol ve yağ asitlerine hidrolizini katalizleyen lipazlar, özellikle vücutta doğal olarak bulunan enzimler sınıfında yer almaktadır. Lipazın temel görevi, triačilgliserollerdeki ester bağlarını

sırayla parçalayarak önce diolein ve monoolein, sonrasında ise gliserol oluşturulmasını sağlamaktır. Reaksiyonun devamında ise omega-9 yağ asidi üretimi gerçekleşir. Gliserolün hidrofik olması nedeniyle reaksiyon sonunda suya benzeyen bir çözünürlük özelliği gösterdiği belirtilmektedir (Hun Lee vd., 2020). Lipazın gıda, kimya, kâğıt, deterjan ve kozmetik gibi birçok endüstriyel alanda kullanım potansiyeli vardır; ancak yüksek üretim maliyetleri, lipazların endüstriyel ölçekte kullanımını sınırlayan önemli bir faktördür (X. Liu & Kokare, 2017).

- Kütinazlar

Kütinazlar (EC 3.1.1.74), α/β -hidrolaz süper ailesinde yer alan serin esterazlar olup, bitki apoplastik bariyerlerinin temel yapısında bulunan kütin ve süberin gibi doğal polyesterlerdeki ester bağlarının hidrolizini gerçekleştirir. Bitki yüzeyindeki bütünlüğü bozarak mantar patojenlerinin istilasına zemin hazırladığı düşünülen polyesterlerin parçalanmasında kütinazların rolü büyüktür. Kütinazlar, doğal hedeflerinin yanı sıra, çok çeşitli düşük moleküler ağırlıklı çözünebilir esterler, hem kısa hem uzun zincirli triasilgliseroller ile polibütillen süksinat (PBS), PET ve poli(ϵ)-kaprolakton (PCL) gibi çeşitli sentetik polyesterleri de parçalayabilmektedir (Wang vd., 2025). Kütinazların sahip olduğu bu geniş katalitik yetenek, onları çevresel kirliliğin giderilmesi ve polimerlerin geri dönüşümü için umut vaat eden biyokatalizörler haline getirmektedir. *Fusarium solani* pisi’de kütinazın ilk defa tanımlanmasından itibaren, farklı ekotiplerden gelen hemibiyotrofik, biyotrofik ve saprotrofik mantarlardan birçok kütinaz türü detaylı şekilde incelenmiştir (Torres de Oliveira vd., 2024).

CAZy veri tabanına (www.cazy.org) göre, kütinazlar karbonhidrat esteraz ailesi 5 (CE5) içerisinde sınıflandırılmaktadır. Bu enzimler, bitki hücre duvarı polisakkaritlerinde bulunan asetil, feruloil ve p-kumaril gibi yan grupların hidrolizini katalizleyerek hem selülozun hem de hemiselülozun daha etkin parçalanmasına katkı sağlar (Lombard vd., 2014). CE enzimleri genellikle ester bağlarını hedef alır ve lignoselülozik biyokütlelerin enzimatik hidrolizi sırasında hem selülazlar hem de hemiselülazlarla sinerjik çalışmaktadır (Biely, 2012).

Karbonhidrat esteraz ailesi içinde farklı alt aileler tanımlanmıştır (CE1–CE20). Bu alt ailelerin fonksiyonları asetil ksilanoesteraz, feruloil esteraz ve kütinaz gibi spesifik aktivitelerle ilişkilidir (D. Kumar & Singh, 2016). Özellikle CE5 ailesi, kütinazları da

kapsamakta olup polyester bağlarının hidrolizinde rol oynamaktadır. CE5 kütinazları, hem bitkisel kütinin hem de sentetik polimerlerin parçalanmasında görev alabildiklerinden biyoteknolojik uygulamalar açısından büyük önem taşımaktadır (Chen vd., 2013).

Son yıllarda yapılan yapısal biyoinformatik çalışmalar, CE enzimlerinin aktif bölgelerindeki çeşitliliğin substrat spesifikliğini belirlediğini, ayrıca endüstriyel enzim mühendisliği açısından potansiyel taşıdığını göstermektedir (Nakamura vd., 2017). Bu nedenle, CE ailesinde bulunan enzimler özellikle biyoyakıt üretimi, biyoplastik geri dönüşümü ve gıda endüstrisi gibi alanlarda stratejik bir enzim grubu olarak kabul edilmektedir.

- α/β Hidrolazlar (PETaz)

PETaz enzimi, özellikle *I. sakaiensis* bakterisinde keşfedilen ve PET plastiklerini monomerlerine dönüştürerek biyolojik parçalanmayı mümkün kılan bir esterazdır (Yoshida vd., 2021). Yapısal olarak α/β hidrolaz ailesine ait olan PETaz, serin-histidin-aspartat katalitik üçlüsünü kullanarak PET içindeki ester bağlarını hedef alır. Enzimin aktif bölgesi, diğer esterazlardan farklı olarak açık bir yapıya sahip olup, bu durum PET substratının enzime erişimini kolaylaştırır. Ancak doğal PETaz, düşük sıcaklık ve pH aralıklarında sınırlı stabilite ve aktiviteye sahiptir. Bu nedenle, endüstriyel uygulamalarda kullanımını artırmak için enzim mühendisliği teknikleriyle stabilite ve katalitik etkinlik üzerinde iyileştirme çalışmaları yürütülmektedir. PETaz, çevre dostu plastik geri dönüşümü ve biyoremediasyon açısından umut vadeden bir biyokatalizör olarak görülmekte, plastik atıkların biyolojik olarak etkin şekilde ayrıştırılması için önemli bir potansiyel taşımaktadır (Austin vd., 2018; Tournier vd., 2020).

1.4.5. *Trichoderma Harzianum*

Trichoderma harzianum, çoğu zaman biyolojik mücadele ajanı olarak bilinen toprak kökenli bir mantar olmasına rağmen, son yıllarda çevresel kirleticilerin ve özellikle polimer atıklarının biyobozunumu açısından da dikkat çeken bir mikroorganizma haline gelmiştir. Bu tür, yüksek adaptasyon yeteneği ve geniş ekstraselüler enzim repertuarı sayesinde plastiklerin çevresel bozunmasında potansiyel bir biyokatalizör olarak değerlendirilmektedir (Rubio vd., 2008).

Literatürde, *T. harzianum*'un yüksek yoğunluklu polietilen (HDPE) üzerinde uygulandığı bir çalışmada, UV ile ön işlemden geçmiş yüzeylerde yaklaşık %40'a varan ağırlık kaybı gözlemlendiği ve FTIR ile NMR analizlerinde alkol, karboksilik asit ve aromatik proton sinyallerinin ortaya çıktığı bildirilmiştir (Auta vd., 2017). Bu bulgular, mantarın ester bağları ve hidrofobik polimer zincirleri üzerinde oksidatif enzimatik saldırı gerçekleştirebildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, *T. harzianum*'un hidrolitik enzimleri, özellikle kütinazlar, polimerlerin ester bağlarını hedef alması açısından büyük önem taşır. Rubio ve ark., *T. harzianum* T34 suşunda Thcut1 genini klonlayarak, bu genin kütinaz enzimini kodladığını ve bu enzimin yağ asidi esterlerini ve kütin monomerlerini hidrolize etme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, genin zeytinyağı ve 16-hidroksi-heksadekanoik asit varlığında yüksek düzeyde indüklendiği, glikoz varlığında ise baskılandığı rapor edilmiştir (Rubio vd., 2008). Bu veriler, *T. harzianum*'un PET gibi çift ester bağları içeren plastiklerin biyolojik bozunmasında potansiyel bir enzim kaynağı olabileceğini desteklemektedir.

PET tipi plastikler, yüksek kristalin yapıları ve hidrofobik karakterleri nedeniyle biyolojik olarak parçalanması en zor polimerlerden biridir. Bu bağlamda *T. harzianum*'un *Aspergillus niger* ile birlikte PET yüzeylerinde test edildiği başka bir çalışmada, yaklaşık %1.8'lik bir ağırlık kaybı rapor edilmiştir (Ahmed vd., 2025) . Bu düşük oran, mantarın PET'i doğrudan karbon kaynağı olarak kullanma kapasitesinin sınırlı olduğunu; ancak polimer yüzeyinde mikroyapısal değişim ve oksidatif bozunma yaratma yönünde etkili olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, *T. harzianum* gelecekte genetik veya enzim mühendisliği yaklaşımlarıyla geliştirilerek, biyopolimerlerin ve PET'in biyoteknolojik dönüşümünde değerlendirilebilecek umut verici bir adaydır.

Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın temel amacı, *Trichoderma harzianum* CBS 226.95'e ait bir kütinaz geninin klonlanarak heterolog sistemde ekspresyonunun gerçekleştirilmesi, saf enzim üretiminin sağlanması ve elde edilen enzimin polietilen tereftalat (PET) polimeri üzerindeki potansiyel parçalama aktivitesinin araştırılmasıdır. Böylece çalışma, fungal kökenli kütinaz enzimlerinin PET gibi dirençli polimerlerin biyolojik parçalanmasında kullanılabilirliğini ortaya koymayı ve gelecekteki enzim mühendisliği yaklaşımlarına bilimsel bir temel oluşturmayı hedeflemektedir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda 3 farklı *Escherichia coli* bakterisinin suşu kullanılmıştır. Bunlar *E. coli* DH10B, *E.coli* JM101 ve *E.coli* BL21 ırklarıdır. Çalışma esnasında kullanılan Agar, Lurient besiyeri, sodyum klorür Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) şirketinden satın alınmıştır. Triton X-100, p-nitrofenil asetat, izopropanol, aseton, agaroz , CaCl₂, ampisilin, kanamisin, Sol1 Sol2 ve Sol3 solüsyonlar için gerekli kimyasallar , kloroform : izoamilalkol (24:1) Sigma (Sigma Chemical Co., Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. Petri kapları PolarLab (Adana, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. T4 DNA Ligaz (*NEB*), *EcoR* I, *Xho* I, IPTG (İzopropil β-D-1-tiyogalaktopiranosit), 1.5 M Tris (pH:8.8) SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (%10), amonyum persülfat (%10) ve TEMED, akrilamid-bis akrilamid, asetik asit tamponu, fosfat tamponu ve Tris-HCl tamponu için gerekli kimyasallar Sigma (Sigma Chemical Co., Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir.

2.2. Moleküler Yerleştirme (Docking) Çalışmaları

Yeni PET parçalayıcı karakteristiklere sahip olduğu düşünülen *T. harzianum* Kütinaz enziminin (ThKütinaz) PET ligandına olan afinitesini belirlemek amacıyla, teorik moleküler yerleştirme analizleri yürütülmüştür. Bu bağlamda, ThKütinaz enziminin aktif bölgesinin PET ligandına bağlanma afinitesi AutoDockVina (V.1.5.7.) programı kullanılarak test edilmiştir (Trott & Olson, 2010). Bu iş için, *T. harzianum* Kütinaz enziminin 3 boyutlu (3D) yapısına ait pdb dosyası (#AF-A0A2T3ZUU5-F1), UniProt veri bankasından (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A2T3ZUU5/entry#structure>) elde edilmiştir. İlgili protein modeli, yerleştirme çalışmaları öncesinde MGLTools programı kullanılarak yerleştirme işlemleri için hazır hale getirilmiştir (<https://ccsb.scripps.edu/mgltools/>). Bu aşamada, ThKütinaz 3D yapısı üzerinde bulunan ligand ve su molekülleri uzaklaştırılmış, peptit bağ kırıkları onarılmış, polar hidrojen ilaveleri yapılarak 3D yapısı protonlanmış ve Kollman yükleri ile yüklenmesi tatbik edilmiş ve enerji minimizasyonu sağlanarak, ilgili protein dosyası moleküler yerleştirme analizleri öncesi hazır hale getirilmiştir.

Moleküler yerleştirme çalışmaları esnasında 2PET 2D yapısı, PET ligandı olarak kullanılmıştır. Bu bağlamda 2PET ligandı için SMİLE formülü üzerinden pdbqt dosyası oluşturulmuş ve akabinde, hedef enzim aktif bölgesine bağlanma modları, moleküler yerleştirme yoluyla araştırılmıştır. Bunun için, ilk etapta 2PET ligandının sdf dosyası; ardından pdb dosyası oluşturulup kaydedilmiştir. Ardından, 2PET ligandının .pdb dosyası kullanılarak .pdbqt dosya uzantıları MGLTools programı çalıştırılarak hazırlanmış ve yerleştirme çalışmaları öncesinde kaydedilmiştir. Moleküler yerleştirme işleminde, AutoDock Vina programı ara yüzünde yerleştirme çalışmaları 3 bağımsız moleküler yerleştirme analizi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Ligandların serbest hareket etmesine izin verilmiş ancak reseptör bağlanma bölgesi sabit tutulmuştur. Ardından, her bir bileşiğin ThKütinaz proteini aktif bölgesine bağlanması esnasında oluşturması muhtemel biyokimyasal bağ etkileşimlerini yansıtan 2D etkileşim diyagramları, moleküler yerleştirme analizleri sonucunda ulaşılmış protein-ligand kompleks yapılarının detaylı analizleri sonrasında oluşturulmuştur. İlaveten, 2PET-ThKütinaz *in silico* moleküler yerleştirme bulguları kullanılarak enzim-ligand kompleks yapılarının 3D görünümleri incelenmiştir. Bu iş için Discovery Studio Accelrys (v21.1.0.20298) (Discovery Studio Visualizer) programı arayüzü analizleri (Dassault Systems, BIOVIA) tatbik edilmiştir.

2.3. *Trichoderma harzianum* Kütinaz Geninin *E. coli* Konağına Uygun Olarak Kodon Optimizasyonu ve Sentetik Olarak Sentezi

Kodon optimizasyon stratejileri, genin kodon kullanımını değiştirerek protein ifadesini arttırmaya çalışmaktır. 20 amino asit 61 kodon tarafından kodlandığı için kodon kullanımını değiştirmek mümkündür. Metiyonin (Met) ve triptofan (Trp) tek bir kodonla kodlansa da diğer tüm amino asitler iki, üç, dört veya altı kodonla ifade edilebilmektedir. Genetik koddaki bu dejenerasyon nedeniyle, farklı eşanlamı kodon bileşimlerine sahip mRNA dizilerinin aynı polipeptiti kodlaması mümkün hale gelebilmektedir. Proteinleri kodlayan diziler *E. coli* kodon kullanım sıklığına göre optimize edilmiştir. Elde edilen yeni gen dizisi Sentetik DNA olarak sentezlendirilmiştir.

2.4. Sentetik DNA Fragmanının PCR ile Çoğaltılması ve Ara Vektöre Klonlanması

Sentetik DNA fragmanının PCR ile çoğaltılması için Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (Biolabs Inc.) kullanılmıştır. PCR reaksiyonu Tablo 6’da gösterildiği şekilde kuruldu ve belirlenen PCR koşullarda PCR atılmıştır (Tablo 7). Primer olarak Thcut2F ve Thcut2R primerleri kullanılmıştır (Tablo 8). PCR sonunda elde edilen DNA fragmanları %1’lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir. Çoğaltılan DNA fragmanının jelden kesimi yapılmıştır. Bu aşama için QIAquick Gel Extraction (*Qiagen*) kiti kullanılmış ve DNA saf halde elde edilmiştir. Elde edilen DNA fragmanının konsantrasyonunu ölçmek için Nanodrop ile miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Daha sonra PCR ürünü NEB® PCR Cloning (*Biolabs Inc.*) kiti kullanılarak *pMINIT*™ 2.0 ara vektörüne klonlanmıştır. Deney tüpüne ligasyonun son hacmi 10 µl olacak şekilde Linearized *pMINIT* 2.0 Vektörden 1 µL, Cloning Mix 1’den 4 µL, Cloning Mix 2’den 1 µL ve insertten konsantrasyonuna göre 1-4 µL arası koyulup geri kalan miktar ddH₂O ile tamamlanmıştır. Ligasyon tüpü oda sıcaklığında minimum 15 dk boyunca bekletilerek ligasyon gerçekleştirilmiştir.

Tablo 6. PCR bileşenleri

PCR BİLEŞENLERİ	MİKTAR
Taq polimeraz	0,2 µL
Template	1 µL
Buffer	5 µL
Forward primer (Thcut2F)	1,25 µL
Reverse primer (Thcut2R)	1,25 µL
ddH ₂ O	18 µ

Tablo 7. PCR koşulları

PCR KOŞULLARI		
SICAKLIK	SÜRE	DÖNGÜ
98	1 dk	1
98	20 sn	10
70	20 sn	
72	20 sn	
98	20 sn	10
68	20 sn	
72	20 sn	
72	4 dk	1

Tablo 8. ThKütinaz geninde hedef bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerler

Primer Adı	Primerlerin Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı
Thcut2F	5'-AGCACAACACGGAATGAAC- 3'	69
Thcut2R	5'- ACCGATCCGGTTGATAAG -3'	72

2.4.1. *E. coli* DH10B Kompetent Hücrelerin Hazırlanması ve Transformasyonu

Rekombinant plazmitin *E. coli* hücrelerine aktarımı aşamasında, CaCl₂ kullanımına dayalı kimyasal kompetent hücre hazırlama yöntemi kullanılmıştır (Bergmans vd., 1981). Agar pleyt üzerine çizgi ekim sonrası elde edilmiş *E. coli* DH10B hücrelerinden tek koloni seçilip, 3 ml LB besiyerine aşılanmış ve 37 °C 150 rpm’de sallanarak gece boyu inkübe edilmiştir. Ertesi gün, yoğunlaşmış hücre kültüründen 100 µL alınarak 900 µL ddH₂O da seyreltilmiş ve optik yoğunluğu (OD:600) spektrofotometrede ölçüm yapılarak belirlenmiş ve 0,1 olacak şekilde ayarlanıp 30 ml LB Broth besiyeri içerisine aşılama yapılmıştır. Hücreler OD600 0,4–0,6 yoğunluğa ulaşacak şekilde çoğaltılmıştır. İstenilen yoğunluğa ulaşan hücreler, 4 °C’de 4500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Oluşan pellet üzerine 100 mM 10 mL CaCl₂ eklenip 30 dk buz içerisinde pelletin çözülmesi için bekletilmiştir. Ardından, 4500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Son olarak pellete 100 mM 2 mL CaCl₂ eklenip 4 °C’de 2 saat beklendikten sonra bir sonraki deney aşaması için

kullanılmıştır. Transformasyon için hazırlanan kompetent *E. coli* DH10B hücrelerinden tüp içerisine 100 µL alınmış ve üzerine 10 µL ligasyon ürünü eklenmiştir. Tüp buz içerisinde 30 dakika boyunca bekletilip, ardından hemen 42 °C’de 50 saniye ve tekrardan buz içerisinde 1 dakika olacak şekilde ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Hücrelerin üzerine 800 µL LB besiyeri konuldu ve 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu çoğalan kültür 100 µg/mL ampicilin içeren seçici LB agar besiyerine yayma ekimi yapılmıştır ve petriler 37 °C’de gece boyu inkübasyona bırakıldıktan sonra, oluşan kolonilerden rastgele koloni seçimi gerçekleştirilmiştir.

2.5. Rekombinant Plazmitlerin Restriksiyon Endonükleaz Analizi

Transformasyon sonucu oluşan kolonilerden seçilip 3 mL LB Broth içeren (100 µg/mL ampicilin) besiyeri içerisine ekim yapılmış ve 37 °C’de 150 rpm’de gece boyu çoğaltılmıştır. Kültür 1,5 ml ependorf tüplerine aktarılmış ve 8000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Pellet üzerine modifiye edilmiş laboratuvar protokolü kapsamında sırasıyla Sol1, Sol2 ve Sol3 solüsyonları ilave edilmiş, belirtilen süreler boyunca inkübasyonları gerçekleştirilmiştir (Tablo 9). Akabinde ependorf tüpleri 10 dakika boyunca buzda inkübe edilmiştir. Ardından, karışımları içeren ependorf tüpleri 13.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra 600 µL civarındaki süpernatant kısmı (üst faz), yeni ependorflara aktarılıp üzerine 600 µL kloroform : izo-amil alkol (24:1) eklenmiştir. Tüpler 13.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, üst faz kısmı yeni ependorfa aktarılmıştır. Üzerine 600 µL izopropanol eklenip -20 °C’de en az 1,5-2 saat bekletilmiştir. Daha sonra izopropanol çöktürme yapmak için ependorf maksimum hızda 10 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant dikkatlice uzaklaştırılıp pellet üzerine %70 EtOH eklenip 10.000 rpm’de 2 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası alkol uzaklaştırılmıştır ve tamamen uçması için ependordun kapağı açık bir şekilde 37°C etüvde kontrollü bir şekilde kurutulmuştur. Elde edilen pellet 20 µL TE buffer çözdürülmüştür. NanaDrop ile ölçüm yapılarak plazmit DNA’nın konsantrasyonunu belirlenmiştir. Akabinde, rekombinant plazmitin doğrulanması için restriksiyon endonükleaz kesimi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 9. Solüsyonların İçeriği

Solüsyon 1	Solüsyon 2	Solüsyon 3
1M TrisHCl	2N NaOH	KoAc
0,5 M EDTA	%10'luk SDS	CH ₃ COOH
%20'lik glikoz	ddH ₂ O	ddH ₂ O
ddH ₂ O	-	-

2.6. *T. harzianum* Kütinaz Geninin PET-28a Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Genler pET-28a ekspresyon vektörü içerisine klonlayabilmek için ilgili geni içeren pMINIT-NCU vektörü *EcoR* I ve *Xho* I restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra pET-28a vektörü de *EcoR* I ve *Xho* I enzimleri ile kesilerek doğrusal hale getirilip kesim ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür ve jelden QIAquick Gel Extraction (*Qiagen*) kiti ile temizlenerek alınmıştır. Yapışkan uçlara sahip genler ve ekspresyon vektörü T4 DNA Ligaz (*NEB*) kullanılarak birbirlerine yapıştırılmıştır. Ligasyon toplam hacim 10 µl olacak şekilde T4 DNA Ligaz 1,5µl, T4 DNA Ligaz Buffer (10X) 1µl, pET-28a vektörden 2,5µL, insertten 2,5µl ve son olarak dH₂O eklenerek kurulmuştur. Oda sıcaklığında 30 dakika beklendikten sonra ligasyon ürünü *E. coli* JM101 kompetent hücrelerine ısı şok yöntemi ile transforme edilmiştir. Bundan dolayı JM101 hücresinden kompetent hazırlanmıştır. Transformasyonu gerçekleştirilen hücreler 50 µg/mL kanamisin içeren LB agar besiyerine yayma ekimi yapılmıştır. 37 °C'de gece boyu inkübasyondan sonra koloni seçimi gerçekleştirilmiştir. Seçilen kolonilerden plazmit izolasyonu yapılmıştır. Dolu olan rekombinant plazmitler *EcoR* I ve *Xho* I restriksiyon enzimleri kesilmiştir. Kolonilerin rekombinant geni içerip içermediği restriksiyon enzim kesimi ile doğrulanmıştır. Elde edilen rekombinant plazmitler pET28a-ThKütinaz olarak adlandırılmıştır.

2.7. Rekombinant *T. harzianum* Kütinazının Ekspresyonu

pET28a-ThKütinaz rekombinant plazmiti *BL21* hücrelerine transformasyonu CaCl_2 yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Koloniler uygun miktarda kanamisin içeren LB Agar üzerinden seçilmiştir. Daha sonra seçilen koloniler, 3 ml 50 $\mu\text{g/mL}$ kanamisinli LB Broth içerisinde kültive edilip, 37°C 'de 180 rpm'de gece boyu inkübe edilmiştir. Kültürden uygun antibiyotiği içeren 100 mL LB Broth besiyeri içerisine OD600 0,1 olacak şekilde aşılama yapılmıştır. Hücrelerin yoğunluğu OD600 0,4–0,6 olacak şekilde 37°C 'de 150 rpm'de büyütülmüştür. Beklenen hücre yoğunluğuna ulaşan kültürlerle son konsantrasyon 0,5 mM olacak şekilde IPTG (İzopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosit) ilave edilip ve 30°C 'de 5- 6 saat inkübe edilmiştir.

2.8. Protein Üretimi ve Protein Saflaştırma

Rekombinant olarak üretilecek *T. harzianum* kütinazının protein ağırlık ve eksprese edilmiş toplam konsantrasyon analizleri %15'lik SDS PAGE jel kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE işleminin yapılabilmesi için ilk olarak tek jel kaseti içerisinde yürütme jeli ve yükleme jel olmak üzere iki farklı por çapına sahip dikey jeller hazırlanmıştır. Yürütme jelinin hazırlanması için 5 mL akrilamid-bis akrilamid, 1,5 M Tris (pH:8.8) 2,5 mL, 2,35 mL distile su, 100 μL SDS (%10), 25 μL amonyum persülfat (%10) ve 15 μL TEMED karıştırılarak jel kasetinin üst yüzeyinin bir miktar altına kadar yüklenmiştir. Jel oluşumu için 20 dk beklenmiş ve jel yüzeyinin düzgün olması için yüzey distile su ile birkaç defa yıkanmıştır. Jel donduktan sonra üzerindeki su mikropipet yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, 830 μL akrilamid-bis akrilamid, 1M Tris (pH: 6,8) 630 μL , 3,4 mL distile su, 5 μL SDS, 5 μL APS ve 7 μL TEMED ile hazırlanan %15' lik yükleme jeli solüsyon yürütme jelinin üzerine dökülmüştür ve içerisine örnek yükleme kuyucuklarını oluşturan tarak yerleştirilmiştir. Yükleme jelinin de donması ile hazır olan jel kasetinden taraklar çıkartılarak elektroforez cihazına yerleştirilmiştir. Protein örnekleri jele yükleme öncesinde örnek yükleme tamponu ile eşit miktarda olacak şekilde karıştırılıp yaklaşık 10 dk kaynar su içerisinde bekletilmiştir. Ardından örnekler buz içerisine alındı. Jeldeki ilk kuyucuğa moleküler ağırlıkları bilinen protein standardı diğer kuyucuklara ise örnekler yüklenmiştir. Daha sonra proteinlerin jel boyunca yürütülmesi 100 Voltluk akım ile gerçekleştirilmiştir. Yürütme işlemi bittikten sonra jel "jel boyama solüsyonu "içerisinde 1,5 saat bekletildi ve

daha sonra “yıkama solüsyonu” ile 6 saat aralıklarla yıkanarak protein bantları görünür hale gelmiştir.

2.9. Enzim Aktivite Tayini ve Enzimin Optimum Şartlarının Belirlenmesi

2.9.1. Enzim Aktivitesi

Enzim aktivitesi, substrat olarak 50 mM sodyum fosfat tamponu içinde hazırlanmış 0,1-1,0 mM pNPA (P-nitrofenol asetat) kullanılmıştır. Reaksiyon tamponunun pH'ı pH 7'ye ayarlanmıştır. Saflaştırılmış proteinin konsantrasyonu (protein konsantrasyonu 30–70 mg L⁻¹) belirlendikten sonra 1 µg saflaştırılmış kütinaz enzimi kullanılarak bu çalışma yapılmıştır. Enzim substrat karışımının muamelesi oda sıcaklığında 5 dakikalık bir inkübasyon süresi boyunca gerçekleştirilmiştir. Ardından enzim aktivitesinin kantifikasyonu ve P-nitrofenol asetat salınımının belirlenmesi için, 405 nm'de bir Mikroplaka Spektrofotometreden (Multiskan GO, *Thermo Fisher Scientific*) ölçümler alınmıştır. Km ve Vmax, reaksiyon hızının substrat konsantrasyonuna (0,1-1,0 mM) göre çizilmesiyle ve kinetik sabitlerin verilerin Michaelis-Menten denkleminde uyarlanmasıyla hesaplanarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi çalışmalarında negatif kontroller (E+T, S+T) kullanılmıştır ve elde edilen değerler enzim içeren numunelerin verdiği değerlerden çıkarılmıştır. Bu çalışmalar sonunda ThKütinaz aktivitesi; pNPA substratını 1 dakikada 1 µmol pNP'ye hidrolize etmek için gereken ünite (U) cinsinden enzim miktarı olarak belirlenmiştir (Y. Liu vd., 2022).

2.9.2. Farklı Sıcaklıkta Enzimin PET Parçalama Potansiyellerinin Analizi

Fungal kütinaz enzimi için çalıştığı optimum sıcaklığın belirlenebilmesi için, farklı sıcaklıklarda 1 µg ham enzim 900 µL 50 mM sodyum fosfat tamponu içerisine 10 mM pNPA substrat ile (30-60°C) 5 dakika inkübe edilmesiyle belirlenmiştir. Ölçüm sonucunda elde edilen değerler GraphPad Prism 9 programında grafik oluşturulmuştur.

2.9.3. Farklı pH Varlığında Enzimin PET Parçalama Potansiyellerinin Analizi

Elde edilen ham enzimin optimum pH'ını, substrat olarak p-nitrofenol asetat kullanılarak ve her biri 50 mM olan asetat tamponu (pH 4-5) sodyum fosfat tamponu

(pH 5-6), Tris-HCl tamponu (pH 6-9) kullanılarak pH 4-9 aralığında aktivitesinin analiz edilmesiyle test edilmiştir. Enzim substrat karışımı, her bir tamponda (pH 4-9 aralığında) enzim için belirlenen optimum sıcaklıkta 5 dakika boyunca inkübe edilecek ve enzimin aktivitesi belirlenmiştir. Bu deney sonunda elde edilen veriler GraphPad Prism 9 programında analiz edilerek grafik oluşturulmuştur.

2.9.4. Farklı Zaman Aralıklarında Enzim Aktivitesi Sonuçları

Fungal kütinaz enzimi için çalıştığı optimum zaman aralığının belirlenebilmesi için, 1 µg ham enzim kullanılarak 900 µL 50 mM sodyum fosfat tamponu içerisine eklenerek 10 mM pNPA substrat ile 1-30 dk zaman aralığı boyunca inkübe edilmesiyle belirlenmiştir. Ölçüm sonucunda elde edilen değerler GraphPad Prism 9 programında grafik oluşturulmuştur.

2.9.5. Enzimatik PET Degredasyonuna İlişkin Mikroskop Görüntüleri

PET film 1x2 cm² olacak şekilde kesilmiştir. Pet filmler ilk olarak 50 ml dH₂O içerisinde yıkanıp sonrasında 20 ml %1 SDS ile yıkanıp tekrardan 50 ml dH₂O içerisinde yıkanmıştır. Daha sonra 1-2 saat UV ışık altında bırakılmıştır. PET filmler %75 EtOH ile yıkanmıştır. Bu aşamalardan sonra PET filmler 30 °C'de 900 µL besiyerine 100 µL ham enzim eklenerek gece boyu bekletilmiştir. Steril edilen PET filmler PET parçalama yeteneği 0-72 saat boyunca mikroskop altında görüntülenmiştir.

3. BULGULAR

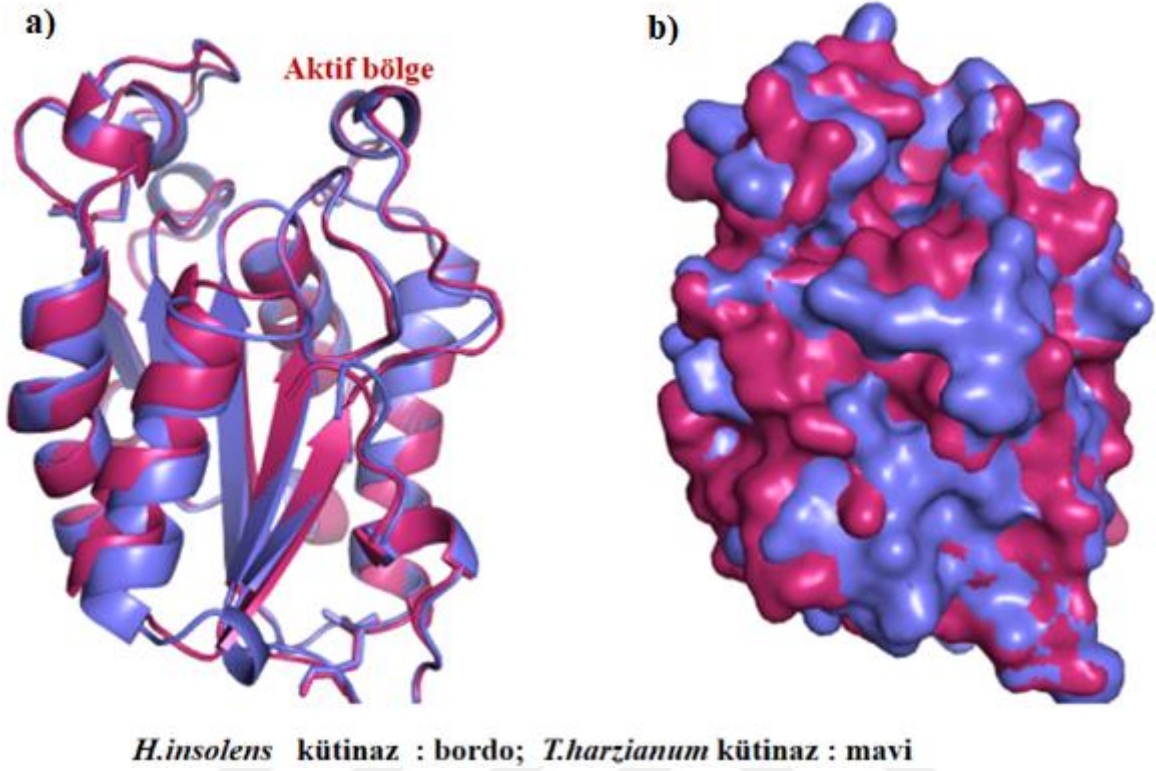
3.1. *T. harzianum* Kütinaz Enzimi Üzerinde Biyoinformatik Analizler

T. harzianum kütinaz enziminin olası PET parçalayıcı karakteristiği hakkında kesin verilere ulaşmak adına bir dizi öncü biyoinformatik analizler yürütülmüştür. Bu bağlamda yakın zamanda yüksek termostabiliteye sahip ve PET parçalayıcı özelliği ile öne çıkmış olan *Humicola insolens* kütinaz enzimi (PDB ID: 4OYY) temel alınmıştır. Bu bağlamda *T. harzianum* biyokontrol ajanı kütinaz enziminin, bitki kök yapılarına nüfuz etmesini kolaylaştıran yüksek PET parçalama potansiyelli bir kütinaz olabileceği öngörülmüştür. Ardından, *H. insolens* kütinaz enzimi ile *T. harzianum* kütinaz enzimi arasında protein sırası benzerliği (Şekil 10) ve ilgili enzim homologlarının üç boyutlu (3D) yapı benzerlikleri sorgulanmıştır. Yapılan ikili hizalama analizleri neticesinde, *H. insolens* ve *T. harzianum* kütinazm enzimleri arasındaki protein sırası benzerliği %61,14 olarak bulunmuştur.

T.harzianum_CBS226.95_Kütinaz	TEGVASLAERQLSTTRNELESGSSSFACPRVIFIFARAST	39
H.insolens_Kütinaz	-----QLGAIENGLESGSANACPDAILIFARGST	29
T.harzianum_CBS226.95_Kütinaz	EIGNMVGASAGPAVANALEGHYGASQVWVQGVGDPYTA	78
H.insolens_Kütinaz	EPGNM--GITVGPALANGLESHI--RNIWIQGVGGPYDA	64
T.harzianum_CBS226.95_Kütinaz	DLASNFLPGGTSQAAINEAKRLFNEANQKCPNSAIVAGG	117
H.insolens_Kütinaz	ALATNFLPRGTSQANIDEGKRLFALANQKCPNTPVVAGG	103
T.harzianum_CBS226.95_Kütinaz	YSQGTAVMSGSI SGLSSSTVQNQIKGVVLFGYTQNFQNGG	156
H.insolens_Kütinaz	YSQGAALIAAAVSEL SGAVKEQVKGVALFGYTQNLQNRG	142
T.harzianum_CBS226.95_Kütinaz	GIPNFPSSKLDVFCAATDAVCYGTFLILPAHFLYIDEAA	195
H.insolens_Kütinaz	GIPNYPRETRKVFECNVGDVAVCTGTLIITPAHLSYTI EAR	181
T.harzianum_CBS226.95_Kütinaz	DEAPDFLINRIG-	207
H.insolens_Kütinaz	GEAARFLRDRI RA	194

Şekil 10. *H. insolens* ve *T. harzianum* kütinaz enzimlerinin amino asit dizinleri kullanılarak gerçekleştirilmiş ikili hizalama verileri

Diğer taraftan bu iki enzim sırasına karşılık gelen protein 3D yapıları arasındaki yapı benzerliği analizleri neticesinde ise; bu iki enzim yapısının birbirine 0,65 kök ortalama kare sapma (RMSD) varlığında %99,48 oranında yapısal benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 11a ve 11b). Benzer şekilde, 3D yapı benzerlik analizleri, her iki enzime ait aktif bölge koordinatlarının yüksek benzerlik gösterdiğini de ortaya koymuştur (Şekil 13b).

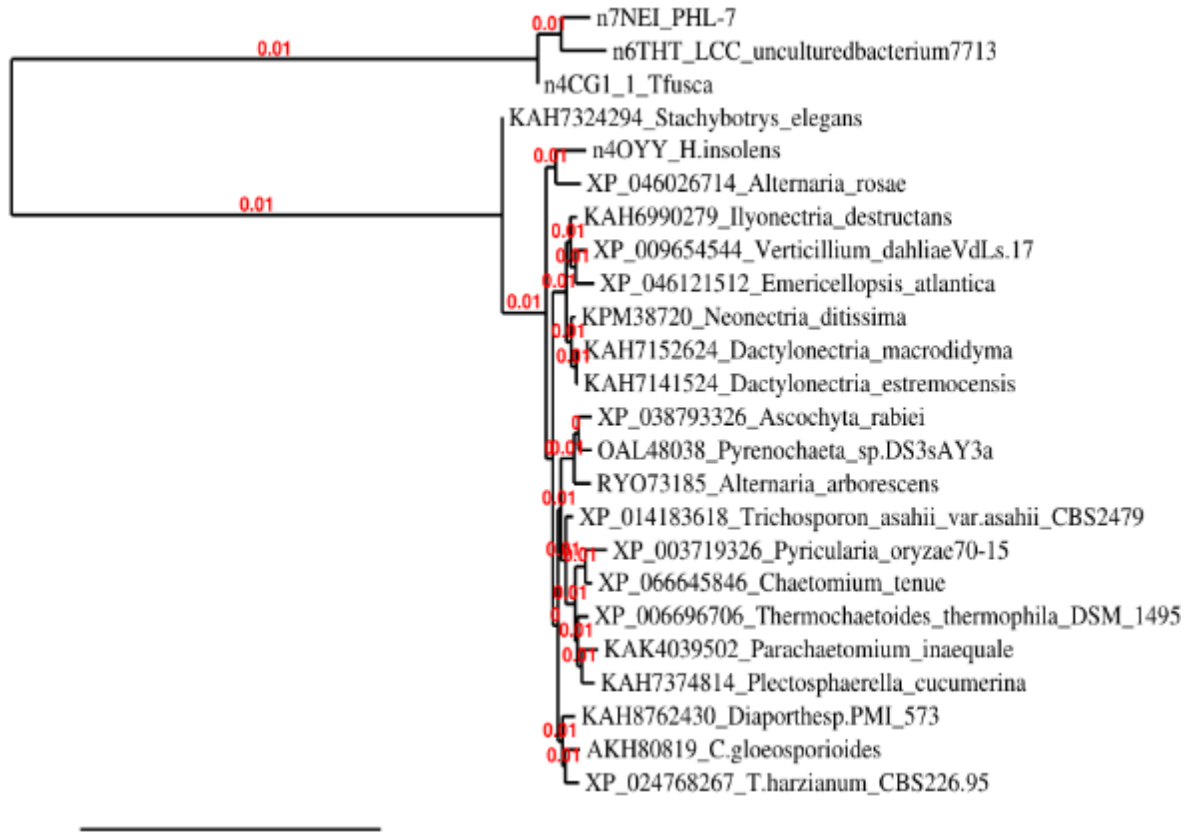


Şekil 11. *H. insolens* ve *T. harzianum* kütinaz enzimlerinin protein 3D yapılarının yapısal benzerliklerini ortaya koyan görsel

Akabinde, *T. harzianum* kütinaz enziminin PET polimer yapısını parçalamada etkin olarak tanımlanmış diğer yüksek aktiviteli kütinaz enzimlerine olan sekans benzerliği çoklu sekans hizalama analizleri ile ortaya konmuştur (Şekil 12). Bu bağlamda, ilgili kütinaz sekanslarının fonksiyonel bölgelerine karşılık gelen amino asit sıraları kullanılarak çoklu sekans hizalama analizleri için fasta formatları oluşturulmuştur. Akabinde, diziler, en yüksek doğruluk için yapılandırılmış MUSCLE (v3.8.31) programı ile hizalandı. Hizalama sonrasında, belirsiz bölgeler (yani boşluklar içeren ve/veya zayıf hizalanmış bölgeler), aşağıdaki parametreler kullanılarak Gblocks (v0.91b) ile uzaklaştırıldı:

- boşluk temizliğinden sonra bloğun minimum uzunluğu: 10 olarak girildi,
- son hizalamada boşluk pozisyonuna izin verilmedi,
- 8'den büyük bitişik, korunmamış pozisyonlara sahip tüm segmentler reddedildi,
- bir yan pozisyon için minimum dizi sayısı: %85.

Filogenetik ağaç, PhyML programında (v3.1/3.0 aLRT) uygulanan maksimum olabilirlik yöntemi kullanılarak yeniden oluşturuldu. Varsayılan ikame modeli, sabit bölgelerin tahmini oranı (0,000) ve bölgeler arası hız heterojenliğini hesaba katmak için 4 gama dağılımlı hız kategorisi varsayılarak seçildi. Gama şekil parametresi doğrudan verilerden tahmin edildi (gama = 0,973). İç dallanmanın güvenilirliği, aLRT testi (SH-Benzeri) kullanılarak değerlendirildi.



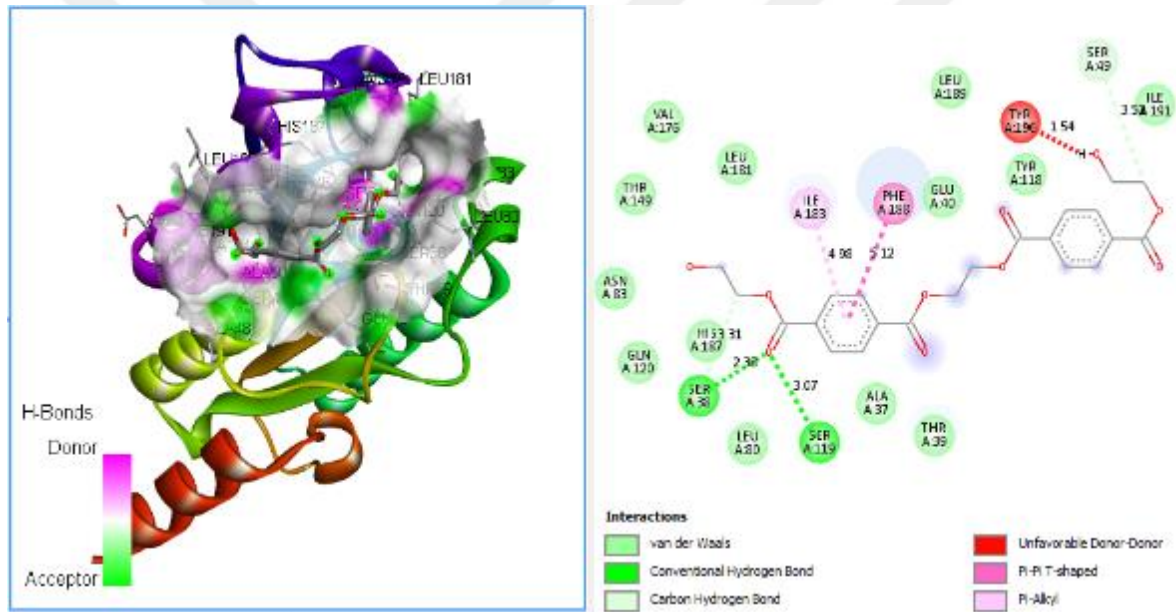
Şekil 12. Farklı kütinaz enzim sekanslarının fonksiyonel bölgelerine karşılık gelen amino asit sıraları kullanılarak gerçekleştirilmiş çoklu sekans hizalama analizi verileri

Gerçekleştirilmiş filogenetik analizler neticesinde, fungal kaynaklı kütinaz enzimlerinin farklı gruplar/kladlar altında toplandığı ve nispeten önemli varyasyonlar gösterdiği anlaşılmıştır. Bu bağlamda, *Trichoderma. harzianum* CBS 226.95 kütinaz enziminin, analizi gerçekleştirilmiş fungal kütinazlardan *Colletotrichum gloeosporioides* ve *Diaporthe* sp. kütinaz enzimleri ile bir grup oluşturduğu gözlemlenmiştir. Çalışmaya dahil edilmiş olan bakteriyel kaynaklı PHL7, LCC, *Thermobifida fusca* kütinaz enzimlerinin ise;

fungus kütinazlardan ciddi derecede farklılaştığı ve bir dış grup şeklinde ayrıştıkları belirlenmiştir.

3.2. Moleküler Docking Bulguları

Çalışmaya konu olmuş olan *T. harzianum* kütinaz enziminin teorik çalışmalar çerçevesinde PET ligandına olan bağlanma afinitesi moleküler yerleştirme analizleri içinden test edilmiştir. Yapılan analizler neticesinde ThKüt enziminin 2PET ligandına düşük bağlanma serbest enerjisi (-7,0 kcal/mol) varlığında (Tablo 4) yüksek bağlanma afinitesi gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. 2PET-ThKütinaz enzim-ligand kompleksinin moleküler yerleştirme sonuçlarına ait 3D görseli ve oluşmuş kompleks yapıya ait biyokimyasal etkileşimleri ortaya koyan 2D etkileşim görseli

(Komplekste bulunan muhtemel Hidrojen bağları kesikli yeşil çizgiler olarak verilmiştir)

Çalışma kapsamında ThKütinaz enziminin olası yüksek aktivitesine dair güçlü verilere sahip olabilmek adına; moleküler yerleştirme çalışmaları diğer yüksek aktiviteli Kütinaz ve PETaz enzimlerine ait 3D yapılar kullanılarak da gerçekleştirilmiştir ve bu enzimler ve ThKütinaz enziminin 2PET ligandına olan afiniteleri, karşılaştırmalı olarak irdelenmiştir (Tablo 10).

Tablo 10. Farklı organizma kaynaklarından yüksek aktiviteli kütinaz ve PETaz enzimlerinin moleküler yerleştirme analizli verileri

Ligand	Kütinaz	Bağlanma Serbest Enerjisi (kcal/mol)
2PET	7NEI (PHL7)	-6,6
2PET	LCC (PDB ID:6THT)	-6,8
2PET	1AGY	-6,7
2PET	4CG1 (<i>Thermobifida fusca</i> KW3)	-6,2
2PET	1CUS	-6,7
2PET	4OYY (<i>Humicola insolens</i>)	-7,4
2PET	<i>Mycobacterium herakliensis</i>	-7,0
2PET	4EB0 (Yaprak-dal kompostu bakteriyel kütinaz homoloğu)	-6,6
2PET	Thr_Kütinaz	-7,0

3.3. Sentetik DNA Fragmanının Analizi

Biyokontrol ajanı *T. harzianum* CBS 226.95 suşuna ait ve *H. insolens* kütinazına yüksek benzerlik gösterdiği biyoinformatik analizlerle tespit edilmiş kütinaz enzimi (NCBI Referans Sekans ID : XP_024768267.1) protein sırasının fasta versiyonu aşağıda verilmiştir. Yeşille gölgelendirilmiş N ucu sekansı ilgili proteinin ekstrasellüler dağıtımını yönlendirmekten sorumlu hücre dışı sinyal peptidini temsil etmektedir. Toplam uzunluğu 228 amino asit olan ThKütinaz enziminin N ucunda hücre altı lokalizasyonunu belirleyen 21 amino asitten oluşan ve ‘MKFLRLVPYLALGAAVPVQHA’ sekansına sahip bir sinyal peptide sahip olduğu belirlenmiştir.

>XP_024768267.1 Carbohydrate esterase family 5 protein [*Trichoderma harzianum* CBS 226.95]

>MKFLRLVPYLALGAAVPVQHA

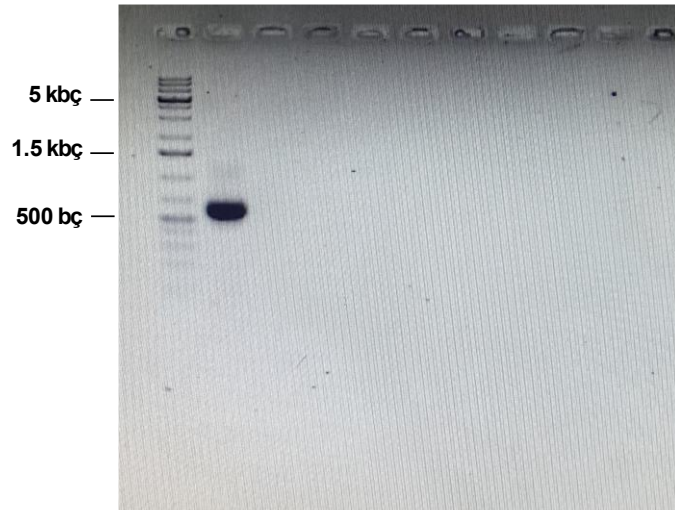
TEGVASLAERQLSTTRNELESGSSFACPRVIFIFARASTEIGNMVGGASAGPAVANALEGHYGASQVWVQGVG
DPYTADLASNFLPGGTSQAAINEAKRLFNEANQKCPNSAIVAGGYSQGTAVMSGISGLSSTVQNQIKGVVLF
GYTQNFQNGGGIPNFPSSKLDVFCATDAVCYGTLFILPAHFLYIDEAADEAPDFLINRIG

3.4. PCR

Sentetik DNA fragmanının PCR reaksiyonu kurulmuştur ve belirlenen PCR koşullarda PCR atılmıştır. DNA örneğinin miktar ve kalitesi belirlendikten sonra PCR yapılmıştır. Kullanılan uygun primerler ThKütinaz geninde 591 bç'lik bir bölgeyi çoğalttığı için PCR sonucunda bu büyüklükte bir bant beklenmiştir.

3.5. Sentetik DNA Fragmanının %1'lik Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

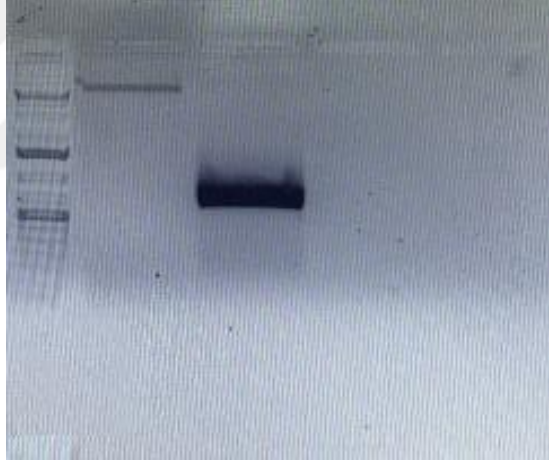
PCR işlemi sonrasında ürün agaroz jelde kontrol edilerek ürün büyüklüğü belirlenmiştir (Şekil 14). Agaroz jel elektroforezi sonucunda *T. harzianum* CBS 226.95 ırkında yaklaşık olarak 591 bç uzunluğunda bant gözlemlenmiştir. Bant büyüklüğünü belirleyebilmek için GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder kullanılmıştır.



Şekil 14. PCR sonunda elde edilmiş sentetik DNA fragmanının %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü

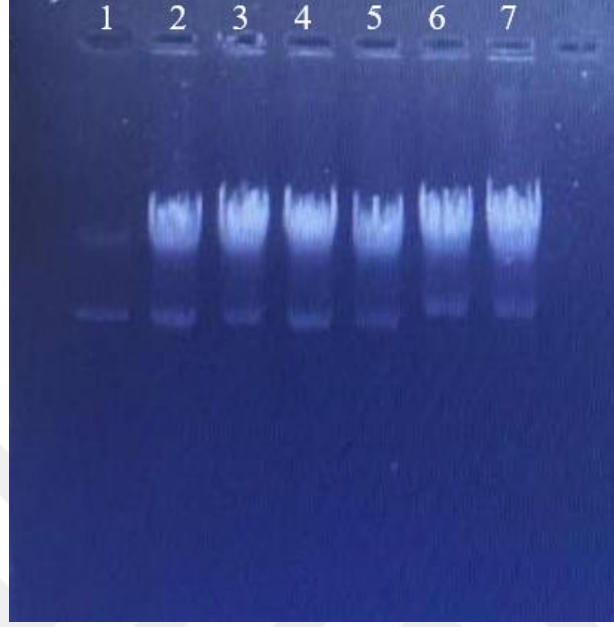
1. kuyucuk: Ladder 2. kuyucuk: ThKütinaz sentetik gen.

Elde edilen büyüklük beklenen büyüklüğe uygun olduğu için PCR ürünü QIAquick agaroz jel ekstraksiyon kiti kullanılarak jelden kesimi yapılmış ve DNA bandı jel parçasından saflaştırılmıştır. *E. coli*'de rekombinant protein üretiminde yaygın olarak kullanılan ekspresyon vektörlerinden biri olan pET-28a(+), *EcoRI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri ile kesilerek lineer forma dönüştürülmüş ve aynı enzimlerle kesilip ThKütinaz geninin vektöre eklenmesi amacıyla ligasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Restriksiyon enzimleri, hem vektörde hem de hedef gende birbirine tamamlayıcı yapışkan uçlar oluşturarak doğru yönde bağlanmayı mümkün kılmıştır. Kesim sonrası elde edilen ürünler %1'lik agaroz jel elektroforezi ile incelenmiş ve pET-28a(+) vektörüne ait 5369 bp büyüklüğünde bir bant gözlemlenmiştir (Şekil 15). Bu bulgular, vektörün başarıyla lineer hale getirildiğini ve restriksiyon enzimleriyle kesimin doğru şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Ardından, oluşturulan rekombinant vektörün çoğaltılması amacıyla *E. coli* JM101 suşuna transformasyon yapılmıştır (Şekil 16).



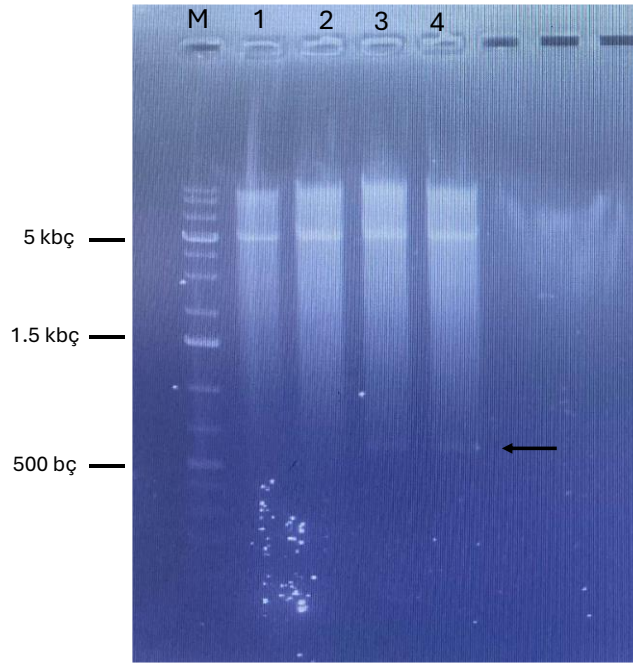
Şekil 15. pET28a vektörüne kütinaz geninin klonlanması sonrası restriksiyon enzim (E1/X1) kesim analizi sonucu elde edilen %1'lik agaroz jel görüntüsü
1: pET28a kontrol plazmiti, 2: Linear pET28a –*EcoRI* ve *XhoI* kesimi, 3: ThKütinaz geni *EcoRI* ve *XhoI* kesimi

zamanda kolonilerden gliserol stokları hazırlanarak -80 °C’de uzun süreli saklama için depolanmıştır.



Şekil 17. *E. coli* JM101 transformasyonu sonucu oluşan kolonilerden plazmit izolasyonu
1.kuyucuk: Boş pET28a(+) vektörü 2.3.4.5.6. ve 7.kuyucuk *E. coli* JM101 transformasyonu sonucu oluşan kolonilerden rekombinant vektörü taşıdığı düşünülen plazmitler.

İzolasyon sonucunda plazmit DNA miktarı spektrofotometre ile 5 µg/µL olarak belirlenmiştir. İzole edilen vektörün ThKütinaz genini taşıyıp taşımadığı ve genin doğru oryantasyonda ligasyon yapıp yapmadığı EI/XI restriksiyon enzimleri ile kesim atılmıştır ve kesim sonucu %1’lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. Kesim sonucunda pET28a(+) vektörü için 5369 bp. bant ve ThKütinaz geni için 591 bp civarında bant görüntülenmesi beklenmiş ve beklenen büyüklükteki bu bantlar elde edilmiştir (Şekil 18).

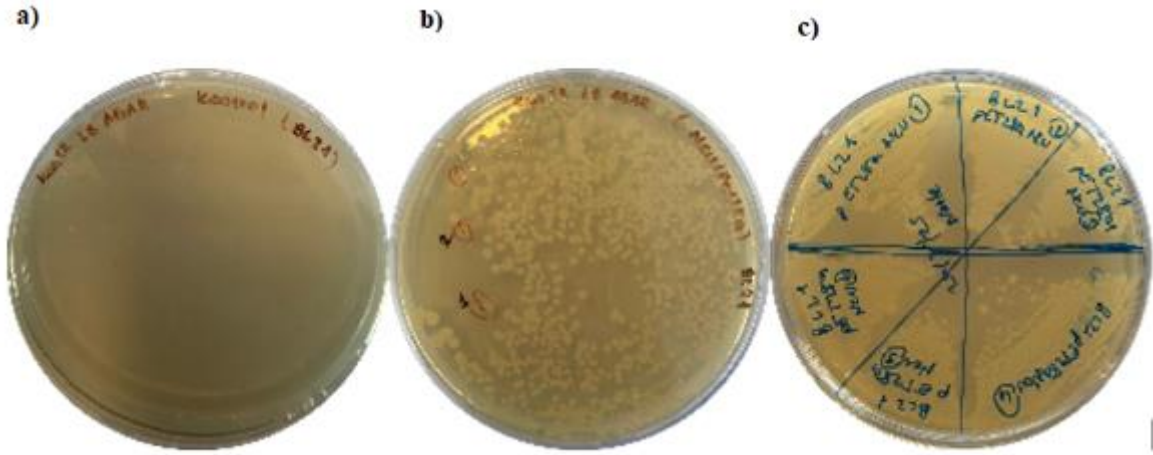


Şekil 18. Kolonilerden izole edilen plazmitlerin restriksiyon enzimi ile kesilerek agaroz jelde görüntülenmesi

M:(ladder), diğer kuyucuklarda ise transformantlardan elde edilen plazmit DNA'larının kesim sonrası bant profilleri yer almaktadır. 3. ve 4. Kuyucuklarda hedef geni taşıyan dolu plazmitler görülmektedir.

3.6. Rekombinant DNA' nın Transformasyonu ve Ekspresyonu

Bu çalışmada elde edilen ve doğruluğu kanıtlanan pET28a (+)/ThKütinaz rekombinant vektörünün *E. coli* BL21 suşuna transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte ThKütinaz genini içermeyen boş vektörün de transformasyonu gerçekleştirilerek bir kontrol grubu oluşturulmuştur. Bu iki grup LB 50 µg/mL kanamisinli katı besi ortamına ekilmiştir. Transformasyon gerçekleştiği düşünülen kolonilerden uygun olanlar seçilmiştir (Şekil 19b). SDS-PAGE çalışması için gece kültürü atılmıştır. Transformasyon sonunda oluşan kolonilerden seçilerek çizgi ekimi yapılmış ve gliserol stokları hazırlanıp -80'de stoklanmıştır (Şekil 19c). Tek koloni alma amaçlı çizgi ekimleri de 50 µg/mL Kan+ içeren LB katı besiyeri ortamlarında takip edilmiş rutin mikrobiyolojik yöntemlerle yapılmıştır. Kontrol amacıyla yapılan yayma ekimini göstermekte olup herhangi bir koloni oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 19a).

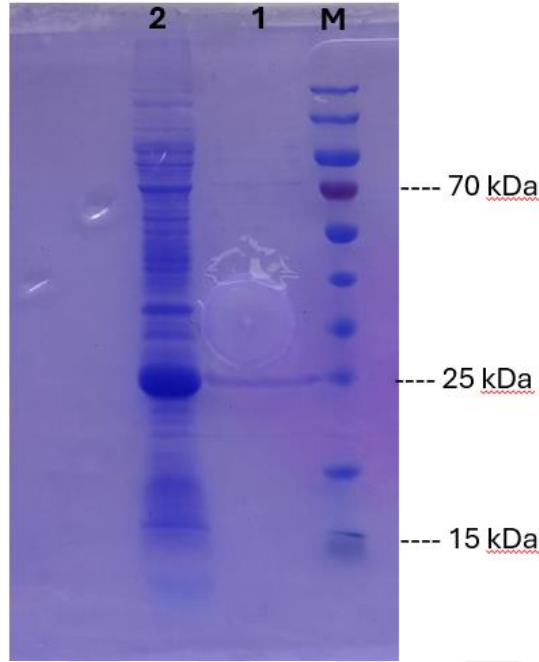


Şekil 19. pET28a-NCU rekombinant plazmiti *E. coli* BL21 hücrelerine transformasyonu sonucu oluşan kolonilerin seçici besiyerinde görünümü

a: Kontrol grubu b: 50 µg/mL Kan+ içeren LB besiyerinde rekombinant kolonilerin görüntüsü c: Seçilen kolonilerin protein saflaştırma çalışması için yapılan çizgi ekimi görüntüsü

3.7. SDS-PAGE Analizi

Proteininde herhangi bir degradasyon olup olmadığını değerlendirmek amacıyla SDS-PAGE analizi uygulanmıştır. Saflaştırılmış protein örneğinden 20 µL alınarak %15'lik poliakrilamid jeline yüklenmiş ve elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel, Coomassie Brilliant Blue boyası renklendirilmiştir. Böylece protein bantları ışık altında net bir şekilde görüntülenebilir hale getirilmiştir (Şekil 20). SDS-PAGE sonuçlarına göre protein örneklerinde degradasyona ilişkin bir bulguya rastlanmamıştır.



Şekil 20. Saflaştırılmış ThKütinaz proteininin SDS-PAGE analizi
M: Protein moleküler ağırlık markırı, Kuyucuk 1: MagneHis (*Promega Corp*) Protein Saflaştırma Kiti sonucu elde edilen saf protein (ThKütinaz ~22 kDa). 2. ThKütinaz eksprese eden *E. coli* hücre içi total protein profili. Jel, Coomassie Brilliant Blue ile boyanmıştır

3.8. Enzim Assay Çalışmaları

3.8.1. Enzim Aktivitesi

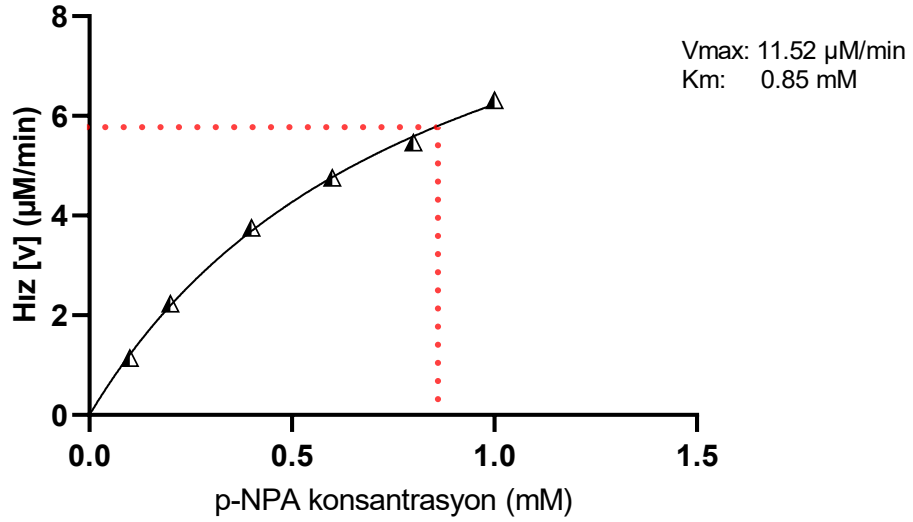
Enzimatik reaksiyonun farklı substrat konsantrasyonları (0,1–1 mM pNPA) altında ölçülen absorbens değerleri Tablo 11’de özetlenmiştir. Her konsantrasyon için, üç deneysel tekrar yapılmış ve ortalama değerler buna göre hesaplanmıştır. Blank (S+B) ve Blank (E+B) değerleri kontrol olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada, E+B absorbens değeri ~ 0,005 olarak ölçülmüştür ve bu değer değişmediği için tabloya eklenmemiştir. Enzim aktivitesi hesaplanırken bu değer ortalama değerden çıkartılarak hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Substrat konsantrasyonu arttıkça ortalama absorbens değerlerinde belirgin bir artış gözlenmiş, bu da enzimin substrat derişimine bağlı olarak aktivitesinin yükseldiğini göstermiştir. 1 mM substrat konsantrasyonunda en yüksek ortalama absorbens değeri (0,568) elde edilmiştir. Michaelis-Menten eğrisi kullanılarak kütinaz enziminin substrat konsantrasyonuna bağlı reaksiyon hızı incelenmiştir (Şekil 21). Elde edilen kinetik parametreler: $K_m = 0,85$ mM, $V_{max} = 11,52$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ enzim olarak belirlenmiştir.

Bu değerler GraphPad Prism yazılımı ile non-linear regresyon analizi sonucunda hesaplanmıştır. K_m , enzim hızının yarı maksimum değerine ulaştığı substrat konsantrasyonunu; V_{max} ise enzimin maksimum katalitik hızını temsil etmektedir. Elde edilen kinetik parametreler ışığında ThKütinaz enziminin spesifik aktivitesi 11,52 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ olarak hesaplanmıştır.

Tablo 11. Farklı Substrat Konsantrasyonunda Enzim Aktivitesi Sonuçları

SUBSTRAT KONSANTRASYONU	BLANK S+B	1.TEKRAR	2.TEKRAR	3.TEKRAR	ORTALAMA
0,1 mM	0,000	0,095	0,108	0,106	0,103
0,2 mM	0,000	0,189	0,218	0,196	0,201
0,4 mM	0,000	0,343	0,322	0,349	0,338
0,6 mM	0,000	0,410	0,421	0,453	0,428
0,8 mM	0,000	0,450	0,502	0,524	0,492
1 mM	0,000	0,560	0,612	0,532	0,568

Michaelis-Menten Eğrisi



şekil 21. Michaelis-Menten eğrisi kullanılarak kütinaz enziminin substrat konsantrasyonuna bağlı hızı

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mg)} = \frac{\text{Enzim Aktivitesi (U)}}{\text{Protein miktarı (mg)}}$$

$$\text{Aktivite (U)} = \frac{(\Delta A/\Delta t \times V_{\text{toplam}} \times \text{faktör})}{(\epsilon \times l \times V_{\text{enzim}})}$$

Formüldeki Terimler:

$\Delta A/\Delta t$: Absorbans değişimi (dakika başına)

V_{toplam} : Reaksiyon toplam hacmi (mL)

V_{enzim} : Reaksiyona eklenen enzim hacmi (mL)

ϵ (epsilon) : Substratın molar absorptivite katsayısı ($M^{-1}cm^{-1}$)

l : Küvet ışık yolu (cm)

Faktör : μmol 'a çevrim için kullanılan katsayı

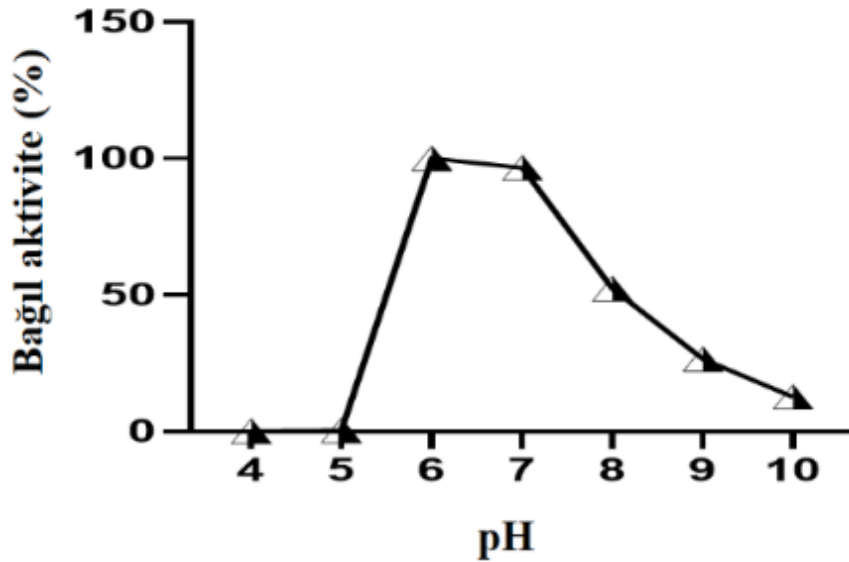
$$\begin{aligned} \text{Spesifik Aktivite (U/mg)} &= \frac{11,52 (\mu\text{M}/\text{min}) \times 0,001 \text{ L}}{0,001 \text{ mg}} \\ &= \frac{0,01152 \mu\text{mol} / \text{min}}{0,001 \text{ mg}} \\ &= 11,52 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg} \end{aligned}$$

3.8.2. Kütinaz Enziminin pH, Sıcaklık, Zaman ve PET Film Üzerine Etkisi

ThKütinaz enziminin farklı pH lardaki etkinliğini ve pH toleransını belirlemek için, farklı pH aralıklarında enzim aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Tablo 12). Elde edilen verilere göre, pH 4 ve pH 5 koşullarında enzim aktivitesi ihmal edilebilir düzeydedir. En yüksek aktivite ise pH 6 değerinde ölçülmüş olup ortalama 0,411 olarak hesaplanmıştır. Bunu sırasıyla pH 7 (0,397) ve pH 8 (0,215) değerleri takip etmektedir. pH 9'da ise aktivite düşük olmakla birlikte (0,109) pH 4 ve pH 5'e göre daha yüksek bir değer göstermektedir. GraphPad Prism 9 programı kullanılarak ThKütinaz proteinin p-nitrofenil salınımına dayalı bağıl aktivitesi Şekil 22'de gösterilmiştir. Bu sonuçlar, kütinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH aralığının 6–7 arasında olduğunu, asidik ortamlarda aktivitenin belirgin şekilde azaldığını ve bazik ortamda ise kısmen düşüş gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Tablo 12. Farklı pH Değerlerinde Enzim Aktivitesi Sonuçları

pH	BLANK S+B	1.TEKRAR	2.TEKRAR	3.TEKRAR	Ortalama
4,0	0,000	0,001	0,002	0,002	0,002
5,0	0,000	0,002	0,004	0,001	0,002
6,0	0,000	0,375	0,355	0,504	0,411
7,0	0,000	0,394	0,395	0,402	0,397
8,0	0,000	0,212	0,218	0,215	0,215
9,0	0,000	0,070	0,123	0,135	0,109



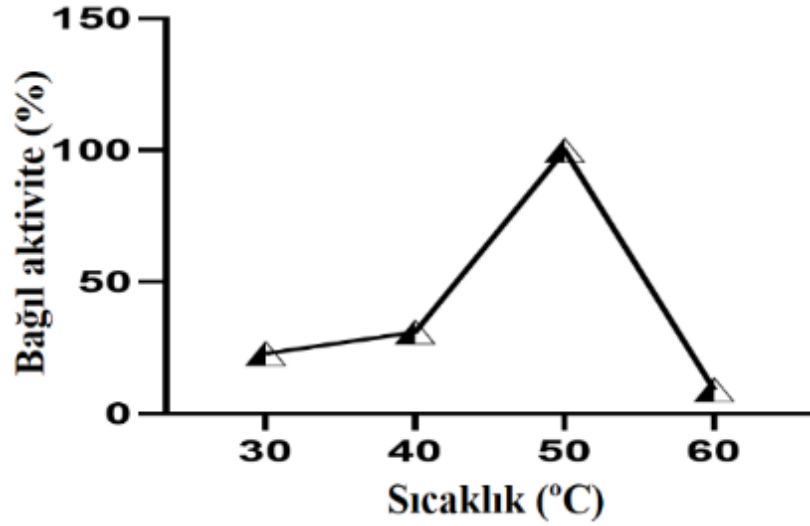
Şekil 22. Enzimin farklı pH değerlerinde p-nitrofenil ester substratının hidrolizi sonucu açığa çıkan p-nitrofenil salınımına dayalı bağıl aktivitesi

Tablo 13'te farklı sıcaklık değerlerinde ölçülen p-nitrofenil salınımına ait absorbans sonuçları sunulmuştur. Bu veriler kullanılarak GraphPad Prism 9 programı ile Şekil 23'te gösterilen sıcaklığa bağlı bağıl aktivite grafiği oluşturulmuştur. Çalışma sonucunda enzim aktivitesinin 50 °C'de en yüksek seviyeye ulaştığı ve ortalama 0,411 olarak hesaplandığı belirlenmiştir. Diğer sıcaklık değerleriyle karşılaştırıldığında, enzim aktivitesinin 40 °C'de kısmen yüksek olmakla birlikte 50 °C'ye göre daha düşük olduğu ve ortalama 0,128 değerine ulaştığı görülmüştür. 30 °C ve 60 °C'de ise enzim aktivitesi oldukça düşük olup, sırasıyla 0,094 ve 0,038 değerleri elde edilmiştir. Bu bulgular, ThKütinaz enziminin optimum

aktivitesini 50 °C’de gösterdiğini, düşük ve yüksek sıcaklıklarda ise enzim aktivitesinin belirgin şekilde azaldığını ortaya koymaktadır.

Tablo 13. Farklı Sıcaklık Değerlerinde Enzim Aktivitesi Sonuçları

SICAKLIK	BLANK	1.TEKRAR	2.TEKRAR	3.TEKRAR	ORTALAMA
30°	0,000	0,092	0,087	0,104	0,094
40°	0,000	0,115	0,129	0,139	0,128
50°	0,000	0,375	0,355	0,504	0,411
60°	0,000	0,034	0,037	0,043	0,038

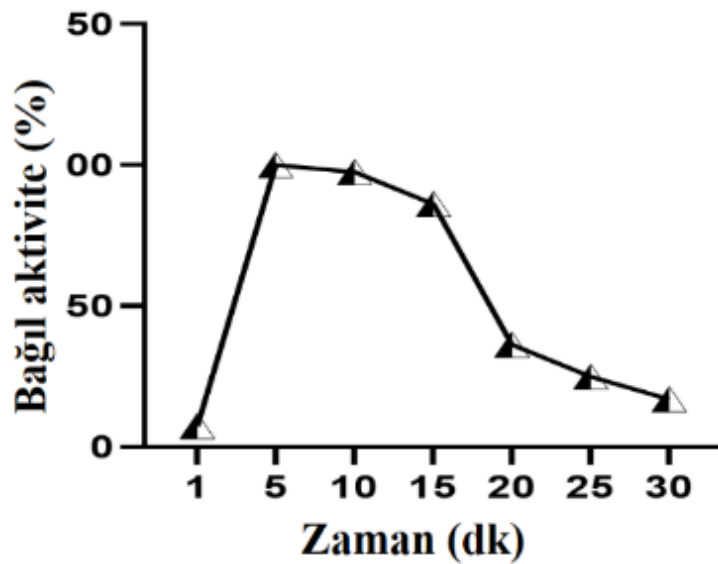


Şekil 23. Enzimin farklı sıcaklık değerlerinde p-nitrofenil ester substratının hidrolizi sonucu açığa çıkan p-nitrofenil salınımına dayalı bağlı aktivitesi

Tablo 14’te farklı zaman aralıklarında gerçekleştirilen ölçümlerde enzim aktivitesinin başlangıçta düşük olduğu, 5. dakikada ise en yüksek seviyeye ulaştığı belirlenmiştir (0,325). Daha sonraki zaman noktalarında aktivitenin kademeli olarak azaldığı görülmüştür; 10. dakikada 0,317, 15. dakikada 0,280, 20. dakikada 0,118 ve 30. dakikada 0,055 olarak kaydedilmiştir ve bu değerlerle GraphPad Prism 9 programında grafik oluşturulmuştur (Şekil 24). Elde edilen sonuçlar, enzimin kısa sürede maksimum aktiviteye eriştiğini ve ilerleyen zamanlarda aktivitenin giderek azaldığını göstermektedir.

Tablo 14. Farklı Zaman Aralıklarında Enzim Aktivitesi Sonuçları

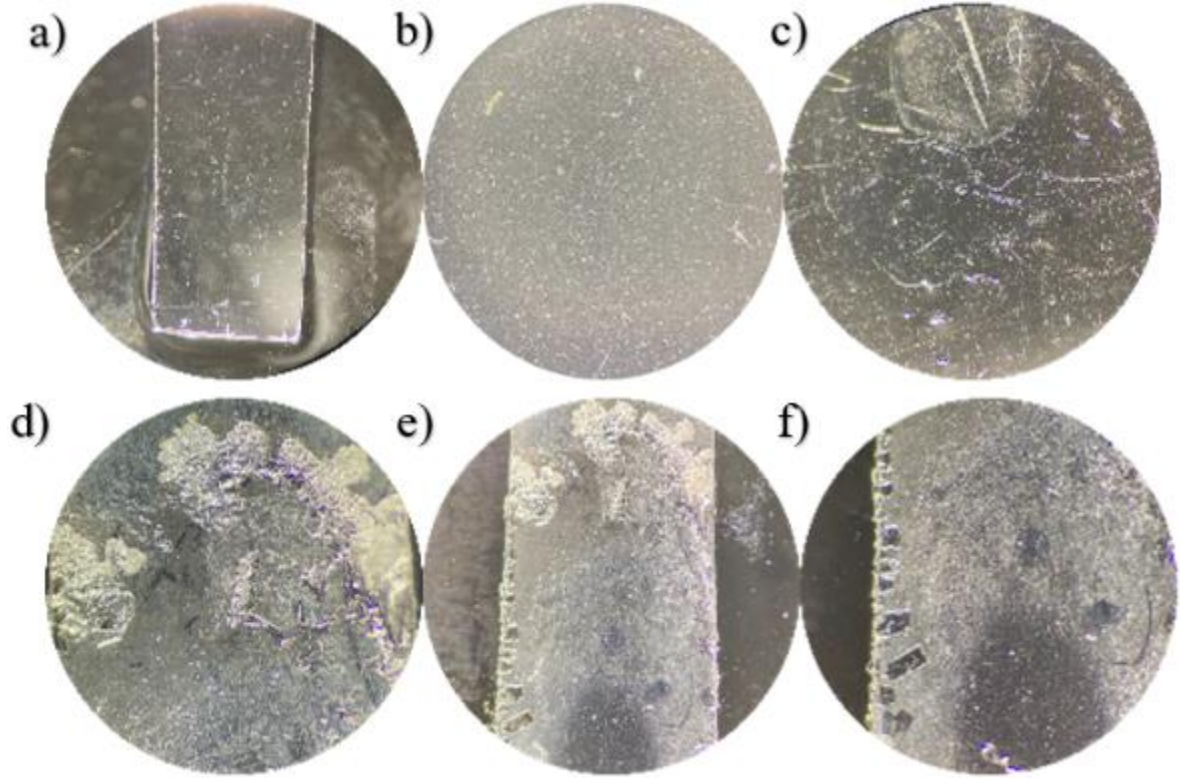
ZAMAN	BLANK S+B	1.TEKRAR	2.TEKRAR	3.TEKRAR	ORTALAMA
1	0,000	0,020	0,023	0,029	0,024
5	0,000	0,335	0,312	0,328	0,325
10	0,000	0,316	0,307	0,328	0,317
15	0,000	0,272	0,282	0,286	0,280
20	0,000	0,120	0,113	0,121	0,118
25	0,000	0,072	0,083	0,088	0,081
30	0,000	0,051	0,060	0,054	0,055



Şekil 24. Enzimin farklı zamanlarda p-nitrofenil ester substratının hidrolizi sonucu açığa çıkan p-nitrofenil salınımına dayalı bağıl aktivitesi

ThKütinaz Enziminin PET film üzerindeki etkisinin stereo mikroskop ile altında görüntülerine bakıldığında Şekil 25a ve Şekil 25b görselleri kontrol grubu olarak kullanılan 1×2 cm² boyutlarındaki PET filmine aittir ve film yüzeyinde herhangi bir bozulma veya yapısal değişim gözlenmemiştir. Şekil 25c görselinde ise 24 saatlik inkübasyon sonrasında elde edilen PET filminde yüzey üzerinde çizgilenmeler ve ilk düzeyde yapısal değişiklikler dikkat çekmiştir. Şekil 25d, Şekil 25e ve Şekil 25f görselleri ise 48 saatlik inkübasyon sonrası elde edilmiştir. Bu görüntülerde film yüzeyinde belirgin bir düzensizlik, parçalanma

ve yüzey bütünlüğünün bozulduğu açıkça görülmektedir. Özellikle 25e ve 25f görsellerinde yüzeydeki pürüzleşmenin artması ve filmin yer yer deforme olması, PET filminin degradasyona uğradığını göstermektedir. Bu bulgular, uygulanan koşullar altında PET filminin zamanla yapısal bütünlüğünü kaybettiğini ve parçalanmaya başladığını ortaya koymaktadır.



Şekil 25. ThKütinaz Enziminin PET film üzerindeki etkisinin stereo mikroskop ile altında görüntüleri

- a: 1x2 cm² PET filmin gece boyu inkübasyon öncesi stereo mikroskop 8X görüntüsü
- b: 1x2 cm² PET filmin gece boyu inkübasyon öncesi mikroskop 50X görüntüsü
- c: 1x2 cm² PET filmin 24 saat sonra görüntüsü
- d: 1x2 cm² PET filmin 48 saat sonra elde edilen görüntüsü 50X
- e: 1x2 cm² PET filmin 48. saat 8X görüntüsü
- f: 1x2 cm² PET filmin 48. saat 16X görüntüsü

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Kütinaz proteininin saflaştırma başarısını değerlendirmek için SDS-PAGE analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 20’de görüldüğü üzere, markır hattının yanındaki kuyucukta (M’den sonra) yaklaşık 22 kDa da yoğun ve belirgin bir bant gözlenmiştir. Bu bant, kütinazın teorik moleküler ağırlığı ile uyumlu olup hedef proteinin başarıyla eksprese edilip saflaştırıldığını göstermiştir.

SDS-PAGE analizinde gözlenen ~22 kDa’lık baskın bant, literatürde kütinaz için bildirilen moleküler ağırlık ile uyumludur (Chen vd., 2013; Herrero Acero vd., 2011).

Bu durum, MagneHis Protein Saflaştırma kiti ile gerçekleştirilen saflaştırma basamaklarının yüksek verimlilikte çalıştığını ve proteinin büyük oranda saf olarak elde edildiğini ortaya koymuştur. Benzer şekilde, literatürdeki çalışmalar da, saflaştırılmış kütinaz proteinleri için tek ve yoğun bant profilleri rapor edilmiş, düşük yoğunluklu bantları ise degradasyon veya kontaminasyon olasılığı olarak değerlendirmiştir (Chen vd., 2013; Wei vd., 2019).

ThKütinaz enziminin aktivitesini etkileyen parametrelerin belirlenmesi amacıyla substrat konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Substrat konsantrasyonu deneyinde (0,1-1mM) pNPA kullanıldığında elde edilen değerler belirlenmiştir (Tablo 11). Saflaştırılmış haldeki ThKütinaz enziminin *K_m* ve *V_{max}* değerleri sırasıyla 0,85 mM ve 11,52 (µM/min) olarak tespit edilmiştir. Michaelis-Menten eğrisi kullanılarak kütinaz enziminin substrat konsantrasyonuna bağlı reaksiyon hızı, GraphPad Prism programı yardımıyla kantifiye edilmiştir (Şekil 21). Enzim assay reaksiyonları ve akabinde gerçekleştirilmiş absorbans ölçümlerinin bağıl ortalamaları dikkate alınarak spesifik enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

pH optimizasyonuna yönelik deneysel süreçler sonucunda, enzimin maksimum aktivitesini pH 6’da gösterdiği, hem asidik (pH 4–5) hem de bazik (pH 8–9) koşullarda aktivitenin belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir (Şekil 22). ThKütinaz enziminin optimum çalışma sıcaklığını belirlemeye yönelik deneysel denemeler sonucunda ise ThKütinaz optimum çalışma sıcaklık değeri 50 °C olarak tespit edilmiş, bu değerin üzerinde enzim aktivitesinde kademeli düşüş meydana geldiği gözlemlenmiştir (Şekil 23). Zamana bağlı enzim aktivite ölçümleri için yapılan denemeler sonucunda; optimum koşullar belirlenmiş ve ThKütinaz enziminin pNPA substratı ile reaksiyona girmesinin akabinde, maksimum ThKütinaz aktivitesi, 5 dakikalık inkübasyon süresinde elde edilmiştir (Şekil 24).

Optimizasyon çalışmaları sonucunda, kütinaz enzimi için optimum koşulların; 10 mM pNPA substrat konsantrasyonu, pH 6, sıcaklık 50 °C ve inkübasyon süresi 5 dakika olarak belirlenmiştir. Literatürde de kütinazlar için optimum pH değerinin genellikle nötr veya hafif asidik aralıkta olduğu (pH 6–8) ve bu değerlerin substratın yapısına ve enzimin kaynağına bağlı olarak değişebildiği bildirilmiştir (Chen vd., 2013; de Oliveira vd., 2025). Benzer şekilde, sıcaklık optimizasyonu çalışmalarında *Thermobifida* ve *Humicola* türlerinden elde edilen kütinazların optimum sıcaklıklarının 45–55 °C aralığında olduğu rapor edilmiştir (Herrero Acero vd., 2011; Thumarat vd., 2015). Bu çalışmada elde edilen 50 °C optimum sıcaklık değeri literatür ile uyumludur. Substrat konsantrasyonunun 10 mM seviyesinde en yüksek aktiviteyi sağlaması, daha yüksek konsantrasyonlarda ise aktivitenin azalması, muhtemelen substrat inhibisyonu veya enzim aktif bölgesinin doyuma ulaşması ile açıklanabilir (Bisswanger, 2014).

Bu bulgular ışığında mevcut çalışma; yaygın bir biyokontrol ajanı olarak bitki patojeni fungus ve bakterilerle savaşmada söz sahibi ve biyolojik fayda sağlama özelliğinde olan *Trichoderma* türlerinin de güçlü PET parçalama potansiyeline sahip kütinaz enzimleri ile donatılmış olduklarını kanıtlayan ilk çalışma olma özelliğindedir. Diğer taraftan, bu enzimlerin ekspresyon seviyesindeki artışları yönetecek genetik mühendisliği yaklaşımları ile; *Trichoderma* biyokontrol ajanlarının da çevresel ve toprak plastik kirliliği ile savaşmada öncü ajanlar olarak kullanılabileceğine dair öngörülere ulaşılmıştır. Bunun yanı sıra; *Trichoderma* konaklarında ekspres edilecek yüksek PET parçalama potansiyelli LCC veya PHL7 gibi kütinaz enzimleri ile *Trichoderma* biyokontrol ajanlarının mevcut plastik bertaraf etme potansiyelleri geliştirilebilir ve tarımsal alanlardaki plastik kirliliğinin önüne geçmede ciddi faydalar sağlama potansiyelinde olduklarına dair öncü verilere ulaşılmıştır. Böyle bir yaklaşım içinden; tarımsal alanlardaki plastik atıklarının uzaklaştırılması/degrede edilmesi ve tarım arazilerinin sürdürülebilirliğinin güvence altına alınması için biyolojik ve yenilikçi yaklaşımlar olarak yüksek PET parçalama potansiyelli rekombinant *Trichoderma* türleri servis edilmesi ileriki çalışmaların konusu olma potansiyelindedir.

5. ÖNERİLER

1.Optimum Koşulların Uygulamalara Uyarlanması: Bu tez çalışmasında *BL21* (DE3) hücrelerinde pET28a vektörü ile rekombinant olarak ifade edilen ve MagneHis Protein Saflaştırma kiti ile saflaştırılan kütinaz enzimi için optimum koşullar (pH 6, 50 °C, 10 mM pNPA substratı, 5 dakikalık inkübasyon) ilk kez belirlenmiştir. Bu koşullar, kütinazın biyoplastik geri dönüşümü, tekstil ön işlem prosesleri ve doğal polyesterlerin hidrolizi gibi endüstriyel uygulama süreçleri doğrultusunda modifiye edilerek mevcut enzimin bu alanlara entegrasyonunun önü açılabilir.

2.Farklı Substrat Türlerinin Test Edilmesi: Gelecek çalışmalarda ThKütinaz enzimi substratı olarak pNPA yerine; PET, poli(ε)-kaprolakton (PCL) gibi sentetik polyesterler kullanılabilir ve kütin ve süberin gibi doğal polimerlerin hidrolizi incelenebilir. Böylece enzimin substrat spesifikliğı ve endüstriyel potansiyeli daha kapsamlı şekilde değerlendirilebilir.

3.Enzim Stabilesinin Artırılması: Yüksek sıcaklık, ekstrem pH ve organik çözücü ortamlarında enzim stabilesini artırmak amacıyla site-directed mutagenез veya yönlendirilmiş evrim gibi protein mühendisliğı teknikleri uygulanabilir. Ayrıca enzimin immobilizasyonu ile yeniden kullanılabilirliğı artırılarak proses maliyeti düşürülebilir.

5.Pilot Ölçek Testleri: Laboratuvar ölçeğinde belirlenen optimum koşullar, yarı-endüstriyel reaktörlerde test edilerek ölçeklenebilirlik analizleri yapılabilir. *BL21*(DE3) hücrelerinde üretim veriminin artırılması için fermentör koşulları (oksijen transferi, karıştırma hızı, besi yeri optimizasyonu) optimize edilebilir.

6.Ekonomik ve Çevresel Değerlendirme: Kütinaz kullanımının geleneksel kimyasal yöntemlere göre maliyet, enerji tüketimi ve atık üretimi açısından avantajları değerlendirilerek, sürdürülebilir üretim süreçleri için uygulanabilirliğı ortaya konabilir.

6. KAYNAKLAR

- Ahmed, M., Iram, S., Tabassum, N., Sajid, M., Paseutsakoun, K., Aleksza, L., & Székács, A. (2025). Biodegradation Efficacy of *Aspergillus niger* and *Trichoderma harzianum* on Low-Density Polyethylene. *Polymers*, 17(10), 1303.
- Ali, S. S., Elsamahy, T., Koutra, E., Kornaros, M., El-Sheekh, M., Abdelkarim, E. A., Zhu, D., & Sun, J. (2021). Degradation of conventional plastic wastes in the environment: A review on current status of knowledge and future perspectives of disposal. *Science of The Total Environment*, 771, 144719.
- Al-Munif, M., Rao, M. V., Bashir, Z., & Padmanabhan, S. (2014). *Process for making polyethylene terephthalate* (United States Patent US8901271B2). <https://patents.google.com/patent/US8901271B2/en>
- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1596-1605.
- Antecka, K., Zdarta, J., Siwińska-Stefańska, K., Sztuk, G., Jankowska, E., Oleskowicz-Popiel, P., & Jesionowski, T. (2018). Synergistic Degradation of Dye Wastewaters Using Binary or Ternary Oxide Systems with Immobilized Laccase. *Catalysts*, 8(9), Article 9.
- Anyanwu, I. N., Sikoki, F. D., & Semple, K. T. (2020). Risk assessment of PAHs and N-PAH analogues in sediment cores from the Niger Delta. *Marine Pollution Bulletin*, 161, 111684.
- Austin, H. P., Allen, M. D., Donohoe, B. S., Rorrer, N. A., Kearns, F. L., Silveira, R. L., Pollard, B. C., Dominick, G., Duman, R., El Omari, K., Mykhaylyk, V., Wagner, A., Michener, W. E., Amore, A., Skaf, M. S., Crowley, M. F., Thorne, A. W., Johnson, C. W., Woodcock, H. L., ... Beckham, G. T. (2018). Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(19).
- Auta, H. S., Emenike, C. U., & Fauziah, S. H. (2017). Screening of *Bacillus* strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation. *Environmental Pollution*, 231, 1552-1559.
- Awasthi, S., Srivastava, P., Singh, P., Tiwary, D., & Mishra, P. K. (2017). Biodegradation of thermally treated high-density polyethylene (HDPE) by *Klebsiella pneumoniae* CH001. *3 Biotech*, 7(5), 332.

- Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2017). A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(1), Article 1.
- Ayangbenro, A. S., Babalola, O. O., & Aremu, O. S. (2019). Bioflocculant production and heavy metal sorption by metal resistant bacterial isolates from gold mining soil. *Chemosphere*, 231, 113-120.
- Ayilara, M., & Babalola, O. (2023). Bioremediation of environmental wastes: The role of microorganisms. *Frontiers in Agronomy*, 5. <https://doi.org/10.3389/fagro.2023.1183691>
- Ba, S., Arsenault, A., Hassani, T., Jones, J. P., & Cabana, H. (2013). Laccase immobilization and insolubilization: From fundamentals to applications for the elimination of emerging contaminants in wastewater treatment. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(4), 404-418.
- Bardsley, D.,. (2021). *UAE recycling: Hundreds of UAE camels have died from eating plastic bags, study shows*. <https://www.thenationalnews.com/uae/environment/uae-recycling-hundreds-of-uae-camels-have-died-from-eating-plastic-bags-study-shows-1.1117788>
- Bashir, Z., Siddiqui, J., Sampath, V., & Luhaidan, K. A. (2005). *Process for the production of polyethylene terephthalate copolyester, copolyester obtained thereby and its use and catalyst useful in the process* (European Union Patent EP1593702A1). <https://patents.google.com/patent/EP1593702A1/en>
- Bergmans, H. E., van Die, I. M., & Hoekstra, W. P. (1981). Transformation in *Escherichia coli*: Stages in the process. *Journal of Bacteriology*, 146(2), 564-570.
- Bhatt, P., Zhou, X., Huang, Y., Zhang, W., & Chen, S. (2021). Characterization of the role of esterases in the biodegradation of organophosphate, carbamate, and pyrethroid pesticides. *Journal of Hazardous Materials*, 411, 125026.
- Biely, P. (2012). Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1575-1588.
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1), 41-55.
- Briggs, H. (2022). *Plastik krizinin çözümü için umut doğdu: BM üyeleri uluslararası anlaşma için müzakerelere başlayacak—BBC News Türkçe*. <https://www.bbc.com/turkce/haberler-dunya-60599536>

- Carpenter, E. J., & Smith, K. L. (1972). Plastics on the Sargasso Sea Surface. *Science*, 175(4027), 1240-1241.
- Cerrahoğlu, e. (2014). *Eflatun çiçekli ballıbabası (lamium purpureum) bitkisinden polifenol oksidaz enziminin karakterizasyonu ve immobilizasyonunun incelenmesi*. T.c. sakarya üniversitesi fen bilimleri enstitüsü.
- Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J. H., Abu-Omar, M., Scott, S. L., & Suh, S. (2020). Degradation Rates of Plastics in the Environment. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(9), 3494-3511.
- Chandra, P., Enespa, Singh, R., & Arora, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 169.
- Chen, S., Su, L., Chen, J., & Wu, J. (2013). Cutinase: Characteristics, preparation, and application. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1754-1767.
- Da'ana, D. A., Zouari, N., Ashfaq, M. Y., Abu-Dieyeh, M., Khraisheh, M., Hijji, Y. M., & Al-Ghouti, M. A. (2021). Removal of Toxic Elements and Microbial Contaminants from Groundwater Using Low-Cost Treatment Options. *Current Pollution Reports*, 7(3), 300-324.
- de Oliveira, M. V. D., Calandrini, G., da Costa, C. H. S., da Silva de Souza, C. G., Alves, C. N., Silva, J. R. A., Lima, A. H., & Lameira, J. (2025). Evaluating cutinase from *Fusarium oxysporum* as a biocatalyst for the degradation of nine synthetic polymer. *Scientific Reports*, 15, 2887.
- Dong, X., & Zhang, Y. (2021). An insight on egg white: From most common functional food to biomaterial application. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 109(7), 1045-1058.
- Elbagory, M., El-Nahrawy, S., Omara, A. E.-D., Eid, E. M., Bachheti, A., Kumar, P., Abou Fayssal, S., Adelodun, B., Bachheti, R. K., Kumar, P., Mioč, B., Kumar, V., & Širić, I. (2022). Sustainable Bioconversion of Wetland Plant Biomass for *Pleurotus ostreatus* var. *florida* Cultivation: Studies on Proximate and Biochemical Characterization. *Agriculture*, 12(12), Article 12.
- Environment, U. N. (2023, Ocak 30). *Annual Report 2022*. UNEP - UN Environment Programme. <http://www.unep.org/resources/annual-report-2022>
- Euronews. (2022). *BM'den Plastik Kirliliğine Karşı İddialı Adım*. <https://tr.euronews.com/2022/03/03/bm-den-plastik-kirliligine-kars-iddial-ad-muluslararası-sozlesme-2024-te-imzaya-ac-lacak>

- Filho, W. L., Salvia, A. L., Bonoli, A., Saari, U. A., Voronova, V., Klõga, M., Kumbhar, S. S., Olszewski, K., De Quevedo, D. M., & Barbir, J. (2021). An assessment of attitudes towards plastics and bioplastics in Europe. *Science of The Total Environment*, 755, 142732.
- Gewert, B., Plassmann, M. M., & MacLeod, M. (2015). Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17(9), 1513-1521.
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), e1700782.
- Gijsman, P., Meijers, G., & Vitarelli, G. (1999). Comparison of the UV-degradation chemistry of polypropylene, polyethylene, polyamide 6 and polybutylene terephthalate. *Polymer Degradation and Stability*, 65(3), 433-441.
- Gilani, I.E., Singh, V., Prasad, P., 2015. (t.y.). *Isolation, screening and characterization of plastic degrading microbes isolated from soil samples of Patna region in Bihar*. *IRIS* 5, 38–44.
- Hardesty, B. D., Good, T. P., & Wilcox, C. (2015). Novel methods, new results and science-based solutions to tackle marine debris impacts on wildlife. *Ocean & Coastal Management*, 115, 4-9.
- Herrero Acero, E., Ribitsch, D., Steinkellner, G., Gruber, K., Greimel, K., Eiteljoerg, I., Trotscha, E., Wei, R., Zimmermann, W., Zinn, M., Cavaco-Paulo, A., Freddi, G., Schwab, H., & Guebitz, G. (2011). Enzymatic Surface Hydrolysis of PET: Effect of Structural Diversity on Kinetic Properties of Cutinases from Thermobifida. *Macromolecules*, 44(12), 4632-4640.
- Holme, H. P. D. J. (2005). *Analytical Biochemistry*.
- Hun Lee, T., Hau Lee, C., Alia Azmi, N., Kavita, S., Wong, S., Znati, M., & Ben Jannet, H. (2020). Characterization of Polar and Non-Polar Compounds of House Edible Bird's Nest (EBN) from Johor, Malaysia. *Chemistry & Biodiversity*, 17(1), e1900419.
- IMARC. (2024). *ET Bottle Market Report by Capacity (High, Medium, Low), Distribution Channel (Business to Business, Retail), Color (Transparent, Coloured), Technology (Stretch Blow Molding, Injection Molding, Extrusion Blow Molding, Thermoforming, and Others), End-Use (Packaged Water, Carbonated Soft Drinks, Food Bottles & Jars, Non-Food Bottles & Jars, Fruit Juice, Beer, and Others), and Region 2024-2032* (ID: SR112024A583).

- Jie, H., Khan, I., Alharthi, M., Zafar, M. W., & Saeed, A. (2023). Sustainable energy policy, socio-economic development, and ecological footprint: The economic significance of natural resources, population growth, and industrial development. *Utilities Policy*, 81, 101490.
- Jwaida, Z., Dulaimi, A., Mydin, M. A. O., Özkılıç, Y. O., Jaya, R. P., & Ameen, A. (2023). The Use of Waste Polymers in Asphalt Mixtures: Bibliometric Analysis and Systematic Review. *Journal of Composites Science*, 7(10), 415.
- Kaya, E. D., Türkhan, A., Eydurhan, S. P., & Akin, M. (2018). Iğdır İlinin Yerel Üzümü Kırmızı Kışmı (Vitis vinifera L.) Çeşidinden Polifenol Oksidazın Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(4), 153-161.
- Keha, Prof. Dr. E. E., & Küfrelioğlu, Prof. Dr. İ. (2015). *Biyokimya* (11.Baskı).
- Kensa, V. M. (2011). *Bioremediation—An overview*. 27, 161-168.
- Khandare, S. D., Chaudhary, D. R., & Jha, B. (2021). Marine bacterial biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) plastic. *Biodegradation*, 32(2), 127-143.
- Kour, D., Khan, S. S., Kour, H., Kaur, T., Devi, R., Judy, C., Rai, P. K., McQuestion, C., Spells, S., Bianchi, A., Mohan, R., Rai, A. K., & Yadav, A. N. (2022). Microbe-mediated bioremediation: Current research and future challenges. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 6-24.
- Kumar, D., & Singh, V. (2016). Dry-grind processing using amylase corn and superior yeast to reduce the exogenous enzyme requirements in bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 228.
- Kumar, G., Lal, S., Soni, S. K., Maurya, S. K., Shukla, P. K., Chaudhary, P., Bhattacharjee, A. K., & Garg, N. (2022). Mechanism and kinetics of chlorpyrifos co-metabolism by using environment restoring microbes isolated from rhizosphere of horticultural crops under subtropics. *Frontiers in Microbiology*, 13.
- Kunwar, B., Cheng, H. N., Chandrashekar, S. R., & Sharma, B. K. (2016). Plastics to fuel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 54, 421-428.
- Laskar, N., & Kumar, U. (2019). Plastics and microplastics: A threat to environment. *Environmental Technology & Innovation*, 14, 100352.
- Liu, X., & Kokare, C. (2017). Microbial Enzymes of Use in Industry. İçinde *Biotechnology of Microbial Enzymes* (ss. 267-298). Elsevier.

- Liu, Y., Liu, Z., Guo, Z., Yan, T., Jin, C., & Wu, J. (2022). Enhancement of the degradation capacity of IsPETase for PET plastic degradation by protein engineering. *Science of The Total Environment*, 834, 154947.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D490-D495.
- Mahmoud, G. A.-E. (2021). Microbial Scavenging of Heavy Metals Using Bioremediation Strategies. İçinde V. Kumar, R. Prasad, & M. Kumar (Ed.), *Rhizobiont in Bioremediation of Hazardous Waste* (ss. 265-289). Springer Singapore.
- Morris, C. W. (2011). *The State* (G. Klosko, Ed.; C. 1). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780199238804.003.0031>
- Müller, R., Schrader, H., Profe, J., Dresler, K., & Deckwer, W. (2005). Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate): Rapid Hydrolyse using a Hydrolase from *T. fusca*. *Macromolecular Rapid Communications*, 26(17), 1400-1405.
- Nakamura, A. M., Nascimento, A. S., & Polikarpov, I. (2017). Structural diversity of carbohydrate esterases. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1), 35-51.
- Ndeddy Aka, R. J., & Babalola, O. O. (2017). Identification and characterization of Cr-, Cd-, and Ni-tolerant bacteria isolated from mine tailings. *Bioremediation Journal*, 21(1), 1-19.
- Odusanya, S. A., Nkwogu, J. V., Alu, N., Etuk Udo, G. A., Ajao, J. A., Osinkolu, G. A., & Uzomah, A. C. (2013). Preliminary Studies on Microbial Degradation of Plastics Used in Packaging Potable Water in Nigeria. *Nigerian Food Journal*, 31(2), 63-72.
- OECD Work on Plastics. (2021). <https://www.oecd.org/environment/plastics/>
- Ojuederie, O. B., & Babalola, O. O. (2017). Microbial and Plant-Assisted Bioremediation of Heavy Metal Polluted Environments: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(12), 1504.
- Palmer, T., & Bonner, P. L. (2011). An Introduction to Enzymes. İçinde *Enzymes* (ss. 2-13). Elsevier.
- Perera, I. C., & Hemamali, E. H. (2022). Genetically Modified Organisms for Bioremediation: Current Research and Advancements. İçinde D. C. Suyal & R. Soni (Ed.), *Bioremediation of Environmental Pollutants* (ss. 163-186). Springer International Publishing.

- Plastics, the fast Facts. (2023). *Plastics Europe*. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-fast-facts-2023/>
- Polyak, Y. M., Bakina, L. G., Chugunova, M. V., Mayachkina, N. V., Gerasimov, A. O., & Bure, V. M. (2018). Effect of remediation strategies on biological activity of oil-contaminated soil—A field study. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 57-68.
- Pratish, A., Kumar, A., & Hu, Z. (2018). Adverse effect of heavy metals (As, Pb, Hg, and Cr) on health and their bioremediation strategies: A review. *International Microbiology*, 21(3), 97-106.
- Pritchard, G. (Ed.). (1998). *Plastics Additives: An A-Z reference* (C. 1). Springer Netherlands.
- Priyanka, M., & Dey, S. (2018). Ruminant impact due to plastic materials—An increasing threat to ruminants and its impact on human health in developing countries. *Veterinary World*, 11(9), 1307-1315.
- Prof. Dr. Mustafa Öztürk | AB'nin atık ihracatının ana hedefi Türkiye mi? (2022, Haziran 4)
- Ragaert, K., Delva, L., & Van Geem, K. (2017). Mechanical and chemical recycling of solid plastic waste. *Waste Management*, 69, 24-58.
- Rathi, B. S., Kumar, P. S., & Show, P.-L. (2021). A review on effective removal of emerging contaminants from aquatic systems: Current trends and scope for further research. *Journal of Hazardous Materials*, 409, 124413.
- Rizvi, A., Ahmed, B., Umar, S., & Khan, M. (2022). *Bacterial biofertilizers for bioremediation: A priority for future research* (ss. 565-612).
- Ronkvist, Å. M., Xie, W., Lu, W., & Gross, R. A. (2009). Cutinase-Catalyzed Hydrolysis of Poly(ethylene terephthalate). *Macromolecules*, 42(14), 5128-5138.
- Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Hermosa, R., Gutiérrez, S., & Monte, E. (2008). Cloning and characterization of the Thcut1 gene encoding a cutinase of *Trichoderma harzianum* T34. *Current Genetics*, 54(6), 301-312.
- Saravanan, A., Kumar, P. S., Vo, D.-V. N., Jeevanantham, S., Karishma, S., & Yaashikaa, P. R. (2021). A review on catalytic-enzyme degradation of toxic environmental pollutants: Microbial enzymes. *Journal of Hazardous Materials*, 419, 126451.

- Seventekin, N. (2001). *Kimyasal lifler*. Ege Üniversitesi Tekstil ve Konfeksiyon Araştırma Uygulama Merkezi.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26(3), 246-265.
- Sharma, B., Dangi, A. K., & Shukla, P. (2018). Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. *Journal of Environmental Management*, 210, 10-22.
- Singh, N. V. (2022). 2. Composition, Use, and Effects of Addition Polymers or Plastics. *General Chemistry*.
- Tayyar, A. E., & Üstün Çetin, S. (2010). Geri Kazanılmış Pet'in Kullanımı. *Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1), Article 1.
- Thapa, S., Li, H., OHair, J., Bhatti, S., Chen, F.-C., Nasr, K. A., Johnson, T., & Zhou, S. (2019). Biochemical Characteristics of Microbial Enzymes and Their Significance from Industrial Perspectives. *Molecular Biotechnology*, 61(8), 579-601.
- The National Environment Agency. (2023). <https://www.nea.gov.sg/index>
- Thumarat, U., Kawabata, T., Nakajima, M., Nakajima, H., Sugiyama, A., Yazaki, K., Tada, T., Waku, T., Tanaka, N., & Kawai, F. (2015). Comparison of genetic structures and biochemical properties of tandem cutinase-type polyesterases from *Thermobifida alba* AHK119. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(5), 491-497.
- Tiwari, R., Azad, N., Dutta, D., Yadav, B. R., & Kumar, S. (2023). A critical review and future perspective of plastic waste recycling. *Science of The Total Environment*, 881, 163433.
- Torres de Oliveira, C., Alexandrino de Assis, M., Lourenço Franco Cairo, J. P., Damasio, A., Guimarães Pereira, G. A., Mazutti, M. A., & de Oliveira, D. (2024). Functional characterization and structural insights of three cutinases from the ascomycete *Fusarium verticillioides*. *Protein Expression and Purification*, 216, 106415.
- Tournier, V., Topham, C. M., Gilles, A., David, B., Folgoas, C., Moya-Leclair, E., Kamionka, E., Desrousseaux, M.-L., Texier, H., Gavalda, S., Cot, M., Guémard, E., Dalibey, M., Nomme, J., Cioci, G., Barbe, S., Chateau, M., André, I., Duquesne, S., & Marty, A. (2020). An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature*, 580(7802), 216-219.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.

- UNFPA (2022). *World Population Trends*. <https://www.unfpa.org/world-populationtrends#readmore-expand>. (Erişim Tarihi: 13.10.2023). - Google Search.
- Urbanek, A. K., Rymowicz, W., & Mirończuk, A. M. (2018). Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(18), 7669-7678.
- USEON. (2025). USEON. <https://www.useon.com/>
- Usluoğlu, A. (2016). *Bitkilerden elde edilecek bazı enzimlerin tekstil proseslerinde kullanılması*.
- Vardhan, K. H., Kumar, P. S., & Panda, R. C. (2019). A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: Current trends and future perspectives. *Journal of Molecular Liquids*, 290, 111197.
- Venkatachalam, S., Nayak, S. G., Labde, J. V., Gharal, P. R., Rao, K., Kelkar, A. K., Venkatachalam, S., Nayak, S. G., Labde, J. V., Gharal, P. R., Rao, K., & Kelkar, A. K. (2012). Degradation and Recyclability of Poly (Ethylene Terephthalate).
- Verma, S., & Kuila, A. (2019). Bioremediation of heavy metals by microbial process. *Environmental Technology & Innovation*, 14, 100369.
- Vocciante, Finocchi, D'Auris, Conte, Tonziello, Pola, & Reverberi. (2019). Enhanced Oil Spill Remediation by Adsorption with Interlinked Multilayered Graphene. *Materials*, 12(14), 2231.
- Wang, H., Zhang, T., Chen, K., Long, L., & Ding, S. (2025). Biochemical Characterization and Polyester-Binding/Degrading Capability of Two Cutinases from *Aspergillus fumigatus*. *Microorganisms*, 13(5), 1121.
- Wei, R., Song, C., Gräsing, D., Schneider, T., Bielytskyi, P., Böttcher, D., Matysik, J., Bornscheuer, U. T., & Zimmermann, W. (2019). Conformational fitting of a flexible oligomeric substrate does not explain the enzymatic PET degradation. *Nature Communications*, 10(1), 5581.
- Weralupitiya, C., Wanigatunge, R., Joseph, S., Athapattu, B. C. L., Lee, T.-H., Kumar Biswas, J., Ginige, M. P., Shiung Lam, S., Senthil Kumar, P., & Vithanage, M. (2021). Anammox bacteria in treating ammonium rich wastewater: Recent perspective and appraisal. *Bioresource Technology*, 334, 125240.

WHO. (2019). <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565707>

Yakişik, H. (2023). Plastik atıklar ve sürdürülebilirlik: türkiye’de plastik atık yönetimi. *Giresun Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Dergisi*, 9(2), 36-55.

Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278), 1196-1199.

Yoshida, S., Hiraga, K., Taniguchi, I., & Oda, K. (2021). Ideonella sakaiensis, PETase, and MHETase: From identification of microbial PET degradation to enzyme characterization. *Methods in Enzymology*, 648, 187-205.

Yusoff, D. F., Raja Abd Rahman, R. N. Z., Masomian, M., Ali, M. S. M., & Leow, T. C. (2020). Newly Isolated Alkane Hydroxylase and Lipase Producing Geobacillus and Anoxybacillus Species Involved in Crude Oil Degradation. *Catalysts*, 10(8), 851.

Yüce, E., & Kılıç, M. (2016). PVC ve PET Atıkların Seçimli Flotasyonu Bölüm 2: Laboratuvar ve Pilot Ölçekli Kolon Testleri. *Çukurova Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 29(2), Article 2.

Zaaba, N. F., & Jaafar, M. (2020). A review on degradation mechanisms of polylactic acid: Hydrolytic, photodegradative, microbial, and enzymatic degradation. *Polymer Engineering & Science*, 60(9), 2061-2075.

Zhang, X., Zhong, T., Liu, L., & Ouyang, X. (2015). Impact of Soil Heavy Metal Pollution on Food Safety in China. *PLOS ONE*, 10(8), e0135182.

ÖZGEÇMİŞ

Adnan Menderes Anadolu Lisesi'nden mezun olduktan sonra 2015 yılında Gümüşhane Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nde lisans eğitime başladı ve 2019 yılında mezun oldu. Mezuniyetinin ardından Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Tezli Yüksek Lisans Eğitime başladı.

