

**ANTİBİYOTİK ÜRETİMİNDE KİLİT UNSUR OLAN 6-APA SENTEZİ
İÇİN KATALİTİK KRİYOJEL KOLONLAR**

Ceylan Hacıoğlu
Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Ağustos 2014

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ceylan HACIOĞLU'nun “Antibiyotik Üretiminde Kilit Unsuru Olan 6-APA Sentezi İçin Katalitik Kriyojel Kolonlar” başlıklı **Kimya** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi, 26.06.2014 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı İmza

Üye (Tez Danışmanı): Yard. Doç. Dr. SERPİL ÖZKARA YAVUZ

Üye :Prof. Dr. ARZU ERSÖZ

Üye :Yard. Doç. Dr. BORA GARİPCAN

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun.....tarih ve.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

**ANTİBİYOTİK ÜRETİMİNDE KİLİT UNSUR OLAN 6-APA SENTEZİ
İÇİN KATALİTİK KRİYOJEL KOLONLAR**

Ceylan HACIOĞLU

**Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Serpil ÖZKARA YAVUZ
2014, 80 sayfa**

Penisilin açılaz (PA) (E.C 3.5.1.11), yarı sentetik antibiyotiklerin üretimi sürecinde penisilin G'den, 6-aminopenisillanikasit (6-APA) üretiminde kullanılan endüstriyel olarak önemli bir enzimdir. PA, dünyada en yaygın kullanılan immobilize enzimdir. Kriyojel kolonlar immobilizasyon verimini artıran yüksek yüzey alanına sahip, özel yapıları nedeniyle gelişmiş kütle transportuna izin veren destek materyalleridir.

Bu çalışmada; 6-APA üretiminde mevcut ticari sistemlere alternatif, tekrar tekrar ve yüksek verimle kullanılabilen PA çapraz bağlanmış katalitik kriyojel kolonlar üretilmiş ve tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Bu amaçla; öncelikle PA, R. Say ve ark tarafından patenti alınan ANADOLUCA adı verilen, fotosensitif çapraz bağlama yoluyla hidroksietilmetakrilat (HEMA) tabanlı monolitik kriyojel kolon yapısına komonomer olarak sokularak, enzimimsi kriyojel kolon sentezlenmiş ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, sentezlenen katalitik kriyojel kolonların sürekli sistemde en uygun çalışma şartları belirlenmiştir. Çalışmanın son aşamasında ise mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılan PA, katalitik kriyojel kolon sentezinde kullanılmış ve 6-APA üretim performansları incelenmiştir. Katalitik kriyojel kolonların denge şişme oranı % 583,41 olarak bulunmuştur. Serbest ve PA katalitik kriyojel kolon için optimal pH 7.2 ve optimal sıcaklık 30°C olarak belirlenmiştir. Aynı kriyojel kolonun 16 defa kullanımından sonra başlangıç aktivitesinin yalnızca % 26'sını kaybettiği gözlenmiştir. 150 gün süren depolama (-20 °C de sodyumazid çözeltisi içinde) sonrasında katalitik kriyojeller aktivitelerinin % 80'nini korurken, serbest enzim, başlangıç aktivitesinin ancak % 42'sini koruyabilmiştir. *Penicillum chrysogenum*'dan saflaştırılan PA çapraz bağlanmış katalitik kriyojeller ile optimal şartlar altında 60 dak sürede 31,85 µg 6-APA üretimi gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Penisilin Açılaz (PA), 6-APA, Enzim immobilizasyonu, ANADOLUCA, Kriyojel

ABSTRACT

Master of Science Thesis

CATALYTIC CRYOGEL COLUMNS FOR THE SYNTHESIS OF 6-APA WHICH IS A KEY INGREDIENT IN THE PRODUCTION OF ANTIBIOTICS

Ceylan HACIOĞLU

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Chemistry Program

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Serpil ÖZKARA YAVUZ

2014, 80 pages

Penicillin G acylase (PA) (E.C 3.5.1.11) is an industrially important enzyme for the production of 6-aminopenicillanic acid from penicillin G during the manufacturing of semi synthetic antibiotics. PA is an immobilized enzyme which is extensively used in the world. Cryogel column are support materials having high surface area which cause an increase in immobilization efficiency and letting enhanced mass transport due to their special structure.

In this study, high efficiency catalytic cryogel columns, which are reusable and crosslinked with PA and will be an alternative to the current commercial systems for the production of 6-APA, have improved and reusability of this column has investigated. For this purpose, firstly, the hydroxy ethylmethacrylate (HEMA) based enzymemimicking cryogel column has been synthesized introducing PA as a co-monomer by photosensitive cross-linking using ANADOLUCA method patented by Say et al., and characterization studies have been performed. Then, the optimum conditions for these columns have been determined in continuous system. In the last step of the study, purified PA from microbial sources has used in the synthesis of catalytic cryogel column and production performance of 6-APA has been investigated. The swelling ratio of catalytic columns has found to be 583.41%. Optimum pH and temperature have determined as 7,2 and 30 °C, respectively, for free and immobilized PA. It has observed that the column activity has decreased only 26 % after 16 use of the same column. After 150 days of storage (in sodiumazide solution at -20°C), while 80% of catalytic activity of cryogels has conserved, free enzyme has conserved only 42% activity. 31,85µg 6-APA has produced in 60 minute optimum conditions using catalytic cryogel crosslinked with PA which has purified from *Penicillium chrysogenum* 807.

Key Words: Penicillin Acylase (PA), 6-APA, Immobilization of enzyme, ANADOLUCA, Cryogel

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında bana her türlü imkanı sağlayan ve değerli bilgileriyle yol gösteren, öğrencisi olmaktan ve kendisini örnek almaktan gurur duyduğum, danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Serpil ÖZKARA YAVUZ'a

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleriyle desteğini eksik etmeyen sayın Prof. Dr. Rıdvan SAY'a, sayın Prof. Dr. Arzu ERSÖZ'e, Fen Fakültesi Kimya Bölüm başkanı Prof. Dr. İbrahim KANI'ye ve deneysel çalışmalarım sırasında bana her türlü konuda yardımcı olan Araş. Gör. Özlem BİÇEN ÜNLÜER'e,

Biyokimya laboratuvarında her zaman yanımda olan ve beni destekleyen tüm biyokimya ve analitik kimya grubuna,

Tez süresince ve özellikle tezin yazılması sırasında her zaman ve her konuda yardımını gördüğüm sevgili nişanlım Halil ÇAN'a ,

Tüm yaşamım boyunca benden hiçbir maddi manevi desteği esirgemeyen, her zaman yanımda olan, çocukları olmaktan gurur duyduğum canım annem, canım babama, ve kardeşim Ayşe'ye tez çalışmam boyunca sıkıntılarımı azalttıkları, sevinçlerimi çoğalttıkları için

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Ceylan HACIOĞLU

Ağustos 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Enzimlerin Keşfi.....	4
2.2. Enzimler	4
2.2.1. Aktif merkezin bazı özellikleri	6
2.2.2. Enzim aktivitesi ve aktiviteyi etkileyen faktörler	6
2.3. Enzim Kinetiği	8
2.3.1. Michaelis-Menten kinetiği.....	8
2.4. Enzimatik Analiz ve Aktivite Belirleme Yöntemleri	10
2.4.1. Enzim aktiflik birimleri	11
2.4.2. Enzim ünitesi	11
2.4.3. Spesifik aktivite	11
2.5. İmmobilizasyon	12
2.5.1. Enzim immobilizasyon tarihi.....	13
2.5.2. İmmobilize enzimlerin avantaj ve dezavantajları	13
2.5.3. İmmobilize sistemlerde kullanılan destek materyalleri	14
2.5.4. Bölme etkisi	16
2.5.5. Difüzyon sınırlaması.....	16
2.5.6. Yapısal değişiklikler	17
2.5.7. Sterik sınırlamalar	17
2.5.8. İnaktivasyon.....	17
2.6. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	17

2.6.1. Kimyasal yöntemler	18
2.6.1.1. Kovalent bağlama ile immobilizasyon	19
2.6.1.2. Çapraz bağlanma	20
2.6.2. Fiziksel yöntemler	21
2.6.3. Adsorpsiyon ile immobilizasyon	21
2.6.4. Hapsetme ile immobilizasyon.....	22
2.6.5. Kafes tipi hapsetme yöntemi	24
2.7. Anadoluca Metodu	26
2.7.1. İmmobilize edilen enzimden beklenen özellikler	27
2.7.2. İmmobilizasyon yönteminin seçimi.....	27
2.8. Makrogözenekli Kriyojeller	28
2.9. Penisilin Açilaz Enzimi (PA)	32
2.9.1. Penisilin G açilazlar	34
2.10. PA'nın yapı ve işlevi	35
2.10.1. Penisilin açilazın kararlılığı	38
2.11. 6-APA Sentezi	39
2.11.1. Penisilin Açilaz ile kataliz edilen β laktamantibiyotiklerinin sentezi	40
3. MATERYAL VE YÖNTEM	42
3.1.1. Kullanılan kimyasallar	42
3.1.2. Kullanılan cihazlar	42
3.2. Yöntem	43
3.2.1. Penisilin açilaz çapraz bağlı katalitik kriyojel kolon sentezi	43
3.3.1. Şişme Testi.....	43
3.3.2. FTIR analizi	44
3.3.3. BET yöntemiyle yüzey alanı analizi	44
3.3.4. Yüzey morfolojisi analizi	44
3.3.5. Sıkıştırma testi	44

3.4. PA Çapraz Bağlı Kriyojelinin ve Ticari PA'nın Aktivite İncelemeleri	45
3.4.1. PA Çapraz Bağlı Kriyojelinin hazırlanması için farklı U değerlerinde PA denenmesi	45
3.4.2. Optimal sıcaklığın belirlenmesi	45
3.4.3. Optimal pH'ın belirlenmesi	45
3.4.4. Enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi	46
3.5. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	48
3.6. Mikrobiyal Kaynaktan PA Saflaştırılması, PA Çapraz Bağlı Katalitik Kriyojel Sentezi ve 6-APA üretimi.....	49
3.6.1. Mikrobiyal Kaynaktan PA Saflaştırılması	49
3.7. Mikrobiyal Kaynaktan Saflaştırılan PA Çapraz Bağlı Katalitik Kriyojelin 6-APA Üretim Performansının Değerlendirilmesi.....	50
4. BULGULAR	51
4.1. Penisilin Açılaz Çapraz Bağlı Katalitik Kriyojel Kolon Materyalinin ve poli(HEMA) Kriyojel Kolonun Karakterizasyonu.....	51
4.1.1. Yüzey morfolojisi	51
4.1.2. Yüzey alanı ölçümü	52
4.1.3. Şişme testi	52
4.1.4. FTIR analizleri	54
4.1.5. Sıkıştırma testi	55
4.2. PA Çapraz Bağlı Kriyojelin ve Serbest PA'nın İncelenmeleri	55
4.2.1. Penisilin Açılaz derişimi ile tepkime hızının değişimi	55
4.2.2. Optimal reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi	57
4.2.3. Optimal pH'ın belirlenmesi.....	58
4.2.4. Enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi	59
4.2.5. Serbest ve çapraz bağlı PA kriyojel kolonun depolama kararlılığı ..	61
4.2.6. PA çapraz bağlı kriyojel kolonun tekrar kullanım sayıları	62

4.3. Mikrobiyal Kaynaktan PA saflaştırılması, PA çapraz bağlı katalitik kriyojel sentezi ve 6-APA üretimi	57
4.3.1. Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel 4kolonu ile ham ekstrattan PA eldesi	63
KAYNAKLAR	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Anahtar kilit modeli	6
Şekil 2.2.	Substrat derişimiyle enzimatik tepkime hızının değişimi.....	7
Şekil 2.3.	Michaelis-Menten grafiği	9
Şekil 2.4.	Lineweaver-Burk grafiği	10
Şekil 2.5.	Niçin enzim immobilizasyonu.....	12
Şekil 2.6.	İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.....	18
Şekil 2.7.	Aktifleşme sonrası destek materyaline kovalent bağlanma ile immobilizasyon	19
Şekil 2.8.	Kovalent bağlanma ile immobilizasyon	20
Şekil 2.9.	Çapraz bağlanma modeli	20
Şekil 2.10.	Fizksel etkileşim modeli	21
Şekil 2.11.	Polakrilamit jel içine enzim hapsedilmesi	25
Şekil 2.12.	Rutenyum aminoasit şelat kompleksleri.....	26
Şekil 2.13.	Rutenyum aminoasit şelat kompleksleriyle etkileştirilen PA nın kriyojel gözeneklerindeki hipotetik modeli.....	27
Şekil 2.14.	Kriyojel üretiminin şematik gösterimi.....	31
Şekil 2.15.	β -laktam açılazların sınıflandırılması. Penisilinlerin, 6-APA ve sefalosporinlerin, 7 ACA çekirdeği ve çekirdeğin R pozisyonunda doğal yan zincirleri gösterilmiştir (Polderman-Tijmes 2004).....	34
Şekil 2.16.	Penisilin G molekülü üzerinde penisilin açilaz ve beta-laktamaz kesim bölgeleri	36
Şekil 2.17.	PA'nın ikincil yapısal elementlerini, α -heliksler ve β -tabakalarını gösteren şekli. a) Olgun enzim (McVey, 2001). b) Öncül: A domain yeşil, B domain mavi ve birleştirici peptit kırmızı renktedir. N-terminal nükleofilik serin rezidüsü sarı bir top olarak gösterilmiştir	36
Şekil 2.18.	PA enziminin kristal yapısı (Hewitt ve ark. 2000).	37
Şekil.2.19.	Bazı önemli β -laktam antibiyotiklerinin PA katalizli sentezi (Arroyo ve ark. 2003).....	40
Şekil 4.1.	PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolonun SEM görüntüsü.....	51

Şekil 4.2.	Boş poli(HEMA) kriyojel kolonun SEM görüntüsü.....	51
Şekil 4.3.	72 saat boyunca PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolonun su tutma kapasitesi grafiği	53
Şekil 4.4.	% şişme kapasitesi grafiği	53
Şekil 4.5.	Boş poli (HEMA)'nın FTIR spektrumu	54
Şekil 4.6.	PA çapraz bağlı kriyojelin kolonun FTIR spekturumu.....	54
Şekil 4.7.	Farklı PA derişimlerine karşı enzim aktivitesi grafiği.....	56
Şekil 4.8.	PA çapraz bağlı kriyojelin ve serbest PA'nın enzim aktivitesinin sıcaklık ile değişimi grafiği	56
Şekil 4.9.	300 U PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolon aktivitesinin zamanla değişim grafiği.....	56
Şekil 4.10.	PA çapraz bağlı kriyojelin ve serbest PA için enzim aktiviteinin pH ile değişim grafiği.....	56
Şekil 4.11.	PA çapraz bağlı kriyojel için Lineweaver-Burk grafiği	60
Şekil 4.12.	Serbest PA enziminin Lineweaver-Burk grafiği	60
Şekil 4.13.	Serbest ve çapraz bağlı PA kriyojelin % bağıl aktifliğinin depolanma süresi ile değişimi	61
Şekil 4.14.	PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolonun yüzde bağıl aktifliklerinin tekrar kullanım sayıları ile değişimi.....	62
Şekil 4.15.	Ticari PA'nın sulu çözeltisine ait FPLC kromatogramı	63
Şekil 4.17.	6 APA'nın kalibrasyon grafiği.....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Enzim immobilizasyonun da kullanılan bazı destek materyalleri	14
Çizelge 2.2. Enzim hapsetme yönteminde yaygın olarak kullanılan bazı polimerler	23
Çizelge 2.3. Polimerik jellerin sınıflandırılması ve üretim işlemleri	29
Çizelge 2.4. Penisilin G açılazın mikrobiyal kaynakları	37
Çizelge 4.1. PA nın Km ve Vmax değerleri	60

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
PA	: Penisilin açilaz
PAA	: Fenilasetik asit
PGA	: Penisilin G asilaz
PVA	: Penisilin V asilaz
6-APA	: 6-Aminopenisillanik asit
7-ACA	: 7-amino-3-deasetoksi sefalosporonik asit
HEMA	: 2-hidroksietil metakrilat
FT-IR	: Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
BET	: Gözenek boyutu analizörü
FPLC	: Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi
Na₂HPO₄	: Sodyum hidrojen fosfat
NaH₂PO₄	: Sodyum dihidrojen fosfat
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
NH₄Ac	: Amonyum asetat
(NH₄)₂SO₄	: Amonyum sülfat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
NIPAB	: 6-Nitro-3-Fenilasetamidobenzoik asit
MBAAm	: N, N'- Metilen bisakrilamid
TEMED	: N,N,N',N' Tetrametiletildiamin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
ES	: Enzim sübstrat kompleksi
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
IU	: Uluslararası enzim aktivite birimi
RPM	: Dakikadadöndürme hızı

1. GİRİŞ

Klinikte kullanılan önemli bir antibiyotik olan penisilin, ağırlıklı olarak reaksiyon çekirdeğinin 6-aminopenisillanik asitin (6-APA) olduğu yarı-sentez yöntemi ile üretilir. 6-APA, günümüzde üç yol ile üretilir; organik sentez, fermantasyon ve enzimatik teknoloji. Özellikle 1960'lı yıllardan beri enzim immobilizasyon ve biyoreaktör teknolojilerindeki gelişmelerle birlikte 6-APA üretimi ağırlıklı olarak enzimatik teknolojilere bağlıdır. Ticari 6-APA üretiminde, penisilin açılaz (PA) katalizör olarak kullanılır (Roberto, Giordano ve ark. 2006). PA, penisilin G molekülünden, 6-APA ve fenilastik asit (PAA) hidrolizini gerçekleştiren endüstriyel olarak kullanılan önemli bir ticari enzimdir (Ferrira ve ark. 2004).

Beta laktam antibiyotiklerinin dünya çapında kullanım pazarlarının %19'unu penisilinler kapsar. Penisilinlerin bakteri duvarlarına kuvvetli inhibisyon etkisi sebebiyle, antibakteriyel aktivite göstermesi, düşük toksisitesi ve çeşitli bakteri suşlarına etkinliğinin bulunması kullanımını arttırır. Fakat bu beta laktamların aşırı kullanılması dirençli patojenlerin oluşumuna yol açmıştır. Bu problemi yok etmenin ilk yolu yarı sentetik antibiyotiklerin kullanımınıdır. İkincisiyse daha az yan etkiye sahip, toksisitesi azaltılmış patojenlere karşı yüksek seçiciliği olan, geniş antimikrobiyal dizisi gelişmiş farmakolojik özellikleri olacak şekilde tasarlanmasıdır. Genellikle yarı sentetik olarak üretilen 6-APA, enzimatik ya da kimyasal olarak üretilir (Chisti ve Moo-Young 1991). 6-APA'yı kimyasal olarak üretmek için, çevre kirliliğine neden olan piridin, fosfopentaklorür ve nitrosil klorür gibi tehlikeli kimyasal maddeler kullanılır (Matsumoto 1993; Vandamme 1988). Kimyasal süreçlerin aksine enzimatik süreçlerde tepkime koşulları hafif ve seçicilikleri daha fazladır. 6-APA üretimi için maliyet karşılaştırılması yapılırsa; kimyasal üretime karşı enzimatik üretim % 9 daha ucuzdur (Anon 1992). Eğer 6-APA üretimi penisilin G fermantasyonu ile birleştirilirse % 20 tasarruf yapılmış olur. 6-APA'nın 2000 yılında tahmini gereksinimi 7000 tondur (Scrip 1987). 6-APA fiyatı yarı sentetik penisilinlerin üretim maliyeti üzerinde doğrudan etkili olduğundan 6-APA üretim teknolojisi

gelişmekte ve geliştirilmeye devam edilmektedir. 6-APA'nın seçiciliğini, aktivitesini, saflıklık derecesini arttırmak ve üretim maliyetini azaltmak için immobilize PA ürünleri yaygınlaştırılmalıdır (Parmar 2000).

Katalitik enzimlerin uygulama alanları artmaktadır. Biyoseçici olarak ilaç, tarım, sağlık alanlarında kullanılmaktadır. Fakat bazı enzim uygulamalarının tekrar kullanılabilirliği yoktur. Bunun sebebi, serbest enzim biyokatalizör olarak uzun süre kararlılığını koruyamaz. Bu enzimlerin geri dönüşümleri imkansızdır. İmmobilize enzim sistemleri, rijit katı destek üzerindeki immobilize enzimin kolay ayrılabilmesi ve dolgu kolon ya da akışkanlaştırılmış yatak reaktörde kullanım kolaylığı nedeniyle uygun görülmüştür. Son yıllarda birçok immobilize yöntem ve taşıyıcı sistemler incelenmiştir. Zengin fonksiyonel gruplara sahip enzimlerle temel etkileşim sağlandığından organik polimer taşıyıcılar yaygın olarak çalışılmıştır. Örneğin, Eupergit C oksiran enzim yatakları enzim taşıyıcı olarak kullanılır. Fakat organik desteklerde önemli problemler bulunmaktadır. Örneğin bu destekler mikrobiyal ataklarda ve organik çözücülerde zayıf kararlılık gösterirler. Buna karşın inorganik materyaller, silika jel, alümina ve çift katlı hidroksitler termal ve mekatronik kararlılığa sahip, mikrobiyal ataklara ve organik çözücülere karşı son derece dayanıklıdır. Bunlar arasında gözenekli taşıyıcılar, yüksek seçicilik alanı ve büyük hacimli gözenekleriyle enzim immobilizasyonu için umut vericidir. Genel avantajları; gözenekleri, substat ve ürünlerin kolay yüklenmelerine ve taşınmalarına izin verir (Chong 2004). Monolitik kolonlar immobilizasyon verimini artıran yüksek yüzey alanına sahip, özel yapıları nedeniyle gelişmiş kütle transportuna izin veren destek materyalleridir. Monolitik desteklere enzim immobilizasyonu bir devridaim reaktör meydana getirir. Küçük enzimler destek üzerine doğrudan immobilize edilebilirler. Büyük enzimler ise maksimum enzimatik dönüşüm sağlamak için bir uzatıcı kullanılarak immobilize edilmelidir. Bu sayede tamamen ya da kısıtlanmış olan enzim aktif merkezine ulaşılabilirliğin önüne geçilmeye çalışılır. Penisilin açılaz çapraz bağlama, kovalent tutturma, fiziksel tutuklama gibi çeşitli yöntemlerle immobilize edilmektedir.

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre önemli üstünlükleri vardır. Bunlar:

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir ve ürünler enzim tarafından kirlenmez,
- Çevre koşullarına karşı daha dayanıklıdır,
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir,
- Sürekli işlemlere uygulanabilir,
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir,
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.

İmmobilizasyon işleminin, tüm bu avantajları yanında, immobilize enzimin işlem sırasında ortama sızması ve immobilizasyon işlemi sırasında enzimin aktivite kaybı gibi önemli dezavantajları mevcuttur.

Bu çalışmada, PA, ANADOLUCA (AmiNoAcid Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach) metoduna (Say ve ark 2009) göre kriyojele immobilize edilerek değişik pH ve sıcaklıklarda aktivitesi çalışılmış ve tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Bu metod ile enzime yeni polimerleşebilen uçlar kazandırarak hem katalitik kriyojel yapısına komonomer olarak girebilmesi sağlanmış hem de enzimin kararlılığı korunmuştur. Bu şekilde immobilize sistemlerin tüm avantajları sağlanmakla birlikte, PA yapıya enzimin doğal formu korunarak sokulduğu ve protein yapısını olumsuz etkileyen immobilizasyon şartlarına gerek olmadığı için maksimum enzimatik dönüşüm korunmuştur. Enzim, katalitik kolon yapısına polimerizasyon sırasında monomer olarak katıldığı için immobilize sistemlerin diğer bir dezavantajı olan ortama sızma problemi de ortadan kaldırılmıştır. 6-APA üretiminde kullanılan mevcut ticari sistemlere alternatif kararlılığını uzun süre koruyabilen, ucuz, değişik pH ve sıcaklık aralıklarında çalışabilen katalitik kriyojeller üretilmiştir. En son aşamada grubumuz tarafından daha önce gerçekleştirilen mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılmış PA, katalitik kolon sentezinde kullanılarak 6-APA üretimi gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimlerin Keşfi

Enzim terimi ilk kez 1878 yılında Kuhne tarafından kullanılmıştır. 1897 yılında Eduard Buchner hücrelerden fonksiyonel enzimleri ekstrakte ettiğini yayımlamıştır (Paulo ve Gübitz 2003). 1940'lerden beri biyokimya alanında çalışmalar yapılmaya başlamıştır. (Pfeiffer 1954)

2.2. Enzimler

Enzimlerin katalizlenmelerinde mükemmel özellikleri bulunur; yüksek aktivite, seçicilik ve istikrar ve çevresel durumlar altında performansa ve kimyasal prosese izin verir. Böylece mühendislikle biyolojik varlıklardan elde edilen enzimler endüstriyel reaktörlerle amacına ulaşırlar. Uygulanabilecek birçok teknik vardır. Enzim özelliklerinin gelişmesine yardımcı olmaktadır ve bunlar birçok bilim dalında uygulanabilmektedir Mikrobiyoloji protein mühendisliği, kimya ve protein gibi... Fakat eski moda teknikler kullanılmasına rağmen son dönemlerde immobilizasyon sistemleri gelişmektedir İmmobilizasyon sistemlerine uygun tasarım yaptıklarında aktivitesi, seçicilikte artma ve inhibisyonu azalma olur (Cesar, Jose ve ark. 2008).

Enzim katalizli bir reaksiyonda, substrat enzimin aktif kısmına hidrojen bağları ve iyonik bağlarla bağlanır, daha sonra enzim, substratı reaksiyon ürünlerine çevirir. Bir enzim molekülü, dakikada binlerce kez reaksiyon döngüsüne girip, döngüyü yürütebilir (Sık 1998). Enzimlerin en önemli özellikleri katalizleme güçlerinin yüksek, kararlı ve spesifik olmalarıdır (Lehninger 1982). Enzimlerin yapısını oluşturan proteinlerdeki aminoasit sıralanışı, biyolojik aktivitelerinin en büyük nedenleri arasında sayılabilir (Lehninger 1982).

Günümüzde biyolojik malzemelerin fermantasyonu ile üretilip farklı substrat özgülüğü olan binlerce enzim bilinmektedir; fakat bunlardan çok azı saf halde elde edilip kristalize edilmiştir.

Enzimlerin sağladığı yararlar; substrat özgüllüğü, ılımlı reaksiyon koşulları ve düşük süreçtir. Doğru enzimin seçilmesiyle hangi ürünlerin üretileceğini kontrol ederek ve istenmeyen yan reaksiyonları en aza indirerek maximum verim elde edilebilir. Mikroorganizma kaynaklı enzimler, uygulama alanları, yüksek verimlilikleri, genetik değişime gösterdikleri uyum ve mikroorganizmaların ucuz besi ortamlarında hızlı büyümesi gibi özelliklerinden dolayı bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlerden daha kullanışlıdır. Dünyadaki mikroorganizmaların sadece yaklaşık %2'si enzim kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Bakteri türleri, yüksek aktivite sergilemeleri, nötr veya alkali pH'larda üremeleri ve sıcaklığa dayanıklı olmaları nedeniyle daha çok tercih edilmektedir (Hasan ve ark. 2006).

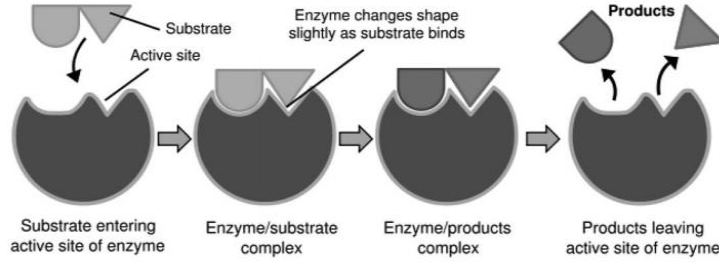
Enzimlerin, diğer kimyasal katalizörlere göre birçok üstünlükleri bulunmaktadır. Enzimlerin kimyasal katalizörlerden en önemli farkı spesifik olmalarıdır. Genel olarak enzimler belirli maddeler arasındaki belirli reaksiyonları katalize ederler. Biyokimyasal katalizörler, reaksiyon hızını 10^{20} 'ye kadar artırırken, diğer katalizörler 10^2-10^3 kadar arttırabilmektedir. Enzimler yalnızca canlı hücreler tarafından sentezlenir.

Enzim tarafından değişikliğe uğratılan maddelere “substrat” denir. Substratlar enzimde “aktif merkez” denilen özel bir bölgeye bağlanırlar. Polipeptit zincirinin belirli kısımlarının özel katmanları ile oluşan bu aktif merkez, katalitik aktiviteden sorumludur.

Alman Kimyacı Emil Fischer 1894 yılında Anahtar-Kilit ve Enzim-Substrat ilişkisini ortaya koymuştur.

Enzimler genellikle substratlardan daha büyük moleküllerdir. Enzim molekülü üzerindeki kofaktör ve koenzimlerin yer aldığı, enzim-substrat kompleksinin şekillendiği dar bir bölge aktif merkezi teşkil eder. Enzim molekülü özel bir cep içerir; bu aktif bölge olarak tanımlanır. Aktif taraf substratı bağlayarak enzim-substrat kompleksi oluşturur. Enzim ürün yapısına çevrilir ve sonra üründen enzim ayrılır. Bir enzimatik reaksiyon şu şekilde gerçekleşmektedir (Öztañ 2007).





Şekil 2.1. Anahtar kilit modeli (Koshland 1958)

2.2.1. Aktif merkezin bazı özellikleri

- Aktif merkez enzimin protein kısmında yer alır.
- Aktif merkez belirli çeşit, sayı ve dizilişte aminoasitlerden oluşmuştur.
- Substrat aktif merkeze H-bağları, Van-der Waals ve elektrostatik güçlerle çok zayıf olarak bağlanmaktadır.
- Bazı enzimlerin birden fazla aktif merkezi olabilmektedir.
- Aktif merkez enzimin toplam hacminin çok küçük bir bölümünü oluşturmaktadır.

2.2.2. Enzim aktivitesi ve aktiviteyi etkileyen faktörler

Enzim aktivitesini genel olarak sıcaklık, ortam pH'ı, substrat ve enzim derişimi etkiler. Bunun dışında ürün derişimi, çeşitli koenzim ve kofaktörlerin derişimi, karıştırma hızı ve enzimin kullanım süresi gibi etmenler de söz konusudur.

- **Sıcaklık:** Kimyasal tepkimelerde olduğu gibi sıcaklık enzime katalize edilen tepkimelerin hızını Arrhenius eşitliğine uygun olarak artırır. Sıcaklık arttıkça moleküller arasındaki çarpışmalar artar ve böylece aktivasyon enerjisini aşan moleküllerin sayısı artar. Sıcaklıkla enzimatik tepkime hızı bir maksimuma ulaşır. Bu nokta aynı zamanda optimal sıcaklık değerine tekabül eder; çünkü bu

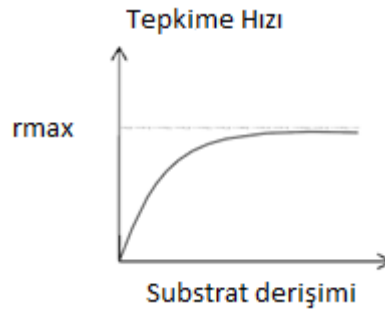
noktadan sonra sıcaklığın artması enzimin denatüre olmasına ve tepkime hızının düşmesine sebep olur.

- **pH:** Tepkime ortamındaki H^+ (hidronyum iyonu) iyon derişimi, enzimin aktivitesini etkileyen bir diğer parametredir. Her enzimin aktivite gösterdiği farklı pH değerleri vardır. En yüksek aktivitenin gözleendiği pH'a optimal pH adı verilir. Bu pH'ın etrafındaki pH'larda enzim aktivitesi daha düşüktür. Enzimle katalize edilen tepkimelerde pH'ı sabit tutmak için tampon çözeltiler kullanılır.

- **Substrat derişimi:** Sabit enzim derişimi için substrat derişimi arttıkça tepkime hızı belli bir substrat derişimine kadar artar ve yüksek substrat derişimlerinde tepkime hızı daha fazla artmaz ve bir platoya erişir. Bu noktadaki hız değeri maksimum hız (v_m) olarak da adlandırılır. Şekil 2.2'de substrat derişimiyle enzimatik tepkime hızının değişimi gösterilmektedir.

Bazı durumlarda yüksek substrat derişimlerinde tepkime hızı azalır. Bu durumda substrat inhibisyonu söz konusudur.

- **Enzim derişimi:** Substrat derişimi kısıtlayıcı olmadığında enzimatik tepkime hızı enzim derişimi ile doğru orantılı olarak artar. Tutuklanmış enzim sistemlerinde yüksek enzim derişimlerinde dış kütle aktarım kısıtlamalarından ötürü tepkime hızı belli bir değere kadar artar ve sabitlenir (Bailey ve Ollis, 1986).



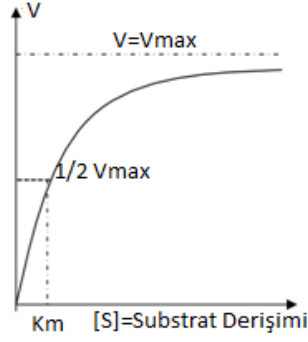
Şekil 2.2. Substrat derişimiyle enzimatik tepkime hızının değişimi

2.3. Enzim Kinetiği

Enzimler substrata bağlanarak ve enzim substrat kompleksi oluşturarak katalizledikleri tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürürler. Serbest enerji yükünü ya da denge sabitini etkilemezler. X ışını ve Raman spektroskopisi kullanılarak yapılan çeşitli çalışmalar enzim substrat (ES) kompleksinin varlığını ortaya çıkarmıştır. Ancak enzim-substrat etkileşimi moleküler açıdan henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bu etkileşim farklı (ES) kompleksleri için farklı olabilmektedir. Enzim ve substrat arasındaki etkileşim genellikle zayıf kuvvetlerle olmaktadır. Çoğunlukla Van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağı ES komplekslerinin oluşumunu sağlar. Substrat aktif bölge olarak bilinen enzimin özel bir bölgesine bağlanır. Substrat bağıl olarak küçük bir moleküldür ve çok daha büyük olan enzim molekülünde belli bir bölgeye yapısal olarak uyar. Bu etkileşimi anlatan en basit model Şekil 2.1’de gösterildiği gibi, enzimi kilit, substratı anahtar olarak alan anahtar-kilit modelidir. Tek substrat-enzim katalizli tepkimelerin kinetiğinin matematiksel modeli ilk defa V.C.R. Henri tarafından 1902’de ve L. Michaelis ve M.L. Menten tarafından 1913’te geliştirilmiştir. Enzim, substratı ürüne dönüştürürken önce onunla bir “Enzim-Substrat kompleksi” oluşturur, daha sonra da bu kompleks ürün ve enzime dönüşür.

2.3.1. Michaelis-Menten kinetiği

Michaelis-Menten kinetiğine göre başlangıç enzim derişimi sabit alınıp reaksiyon hızının substrat derişimine bağlılığı incelenir. Sonuçta hiperbolik bir fonksiyon ve eğri elde edilir (Şekil 2.3) Michaelis-Menten Bağıntısı şu şekilde tanımlanır.



Şekil 2.3. Michaelis-Menten grafiği

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K_m + [S]} \quad (2.1)$$

Eşitlik 2.1. Michaelis-Menten bağıntısı

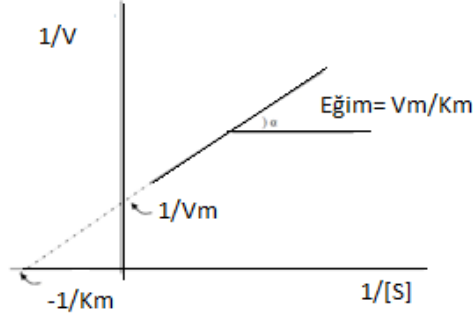
Bu eşitlikte Vmax; hiperbol asimtodunun y eksenini kestiği noktadır ve maksimum hız olarak belirtilir. Maksimum hızın yarısına (Vmax/2) karşılık gelen substrat derişimi Km (Michaelis-Menten sabiti) olarak belirtilir. Vmax ve Km, bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli enzim sabitleridir.

Michaelis-Menten grafiği 3 bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölgede substrat konsantrasyonu düşük olacağından ($[S] \ll K_m$) grafik doğrusaldır. İkinci bölgede oldukça büyük substrat konsantrasyonlarında herhangi bir ihmal yapılamaz, reaksiyon karışık dereceden yürür. Üçüncü bölgede $[S] \gg K_m$ 'dir. $V=V_{max}$ olur ve reaksiyon sabit bir hızla devam eder. Michaelis-Menten grafiği ile bir hiperbol elde edildiğinden, uygulamalarda kolaylık sağlamak amacı ile bunun bir doğru denklemi haline getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla eksen ölçekleri uygun şekilde değiştirilerek, değişik yollardan doğru denkleme dönüştürülebilir. Bunlardan en çok kullanılanı Eşitlik 2.2 'deki Lineweaver-Burk denklemdir (Lineweaver 1934).

$$1/V = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.2)$$

Eşitlik 2.2. Lineweaver-Burk denklemi

Bu denkleme göre ordinatta $1/V_{max}$, apsiste $1/[S]$ değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise K_m/V_{max} 'dir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Lineweaver-Burk grafiği

2.4. Enzimatik Analiz ve Aktivite Belirleme Yöntemleri

Enzimler, biyolojik katalizör olmaları nedeniyle dünyamızdaki yaşamı olası kılan etmenlerin başında gelmektedirler. Bu açıdan enzimoloji, moleküler biyolojinin en önemli alt çalışma alanlarından birisini oluşturmaktadır. Enzimlerin varlıklarını, etkinliklerini, lokalizasyonlarını, kataliz mekanizmalarını, miktarlarını, saflıklarını vb. belirlemenin en etkin yolu onların aktivitelerini ölçmektir. Şu ana kadar binlerce enzimin varlığı saptanmış ve bunlara ilişkin aktivite tayin yöntemleri geliştirilmiştir. Herhangi bir enzim için ideal bir aktivite belirleme yolu yoktur, çünkü bir yöntemin uygunluğu bazı faktörlere bağlıdır. Bunların başında, enzimin saflığı, fizikokimyasal özellikleri, katalizlediği reaksiyonun tipi, lokalize olduğu yer, ölçüm yönteminin maliyeti, eldeki mevcut ölçüm cihazlarının niteliği ve ölçümün duyarlılığı ile ilgili zorunluluklar vb. gelmektedir.

2.4.1. Enzim aktiflik birimleri

Enzimler, biyolojik ortamda çok az miktarda buldukları için miktarlarının ölçümü çok zordur. Ancak aktiviteleri ölçülebilir.

Bir enzimin aktivitesini çeşitli yollardan ifade etmek olasıdır. Örneğin, 1 mg enzim proteini tarafından birim zamanda meydana getirilen absorbans değişikliği bir birim olarak ifade edilebilir. Fakat dünya genelinde, elde edilen sonuçları karşılaştırabilmek için daha standart bir birim tanımlaması geliştirilmiştir. Bu uluslararası ünite (International Unit; IU) veya enzim ünitesi olarak ifade edilmektedir.

2.4.2. Enzim ünitesi

Optimum şartlarda, bir ünite enzim, bir dakikada 1 µmol ürünün oluşumunu (veya 1 µmol substratın dönüşümünü) katalizleyen enzim miktarıdır. Enzim üniteleri U şeklinde gösterilmektedir.

2.4.3. Spesifik aktivite

Bir enzimin aktivitesini tanımlamak için kullanılan diğer bir birim de spesifik aktivitedir. Bir enziminin spesifik aktivitesi, 1 miligram protein başına düşen enzim ünitesinin sayısıdır. Spesifik aktivite, enzim ünitesi/mg protein' dir. Saf bir enzimin spesifik aktivitesi sabittir ve o enzime özgü bir değerdir. Spesifik aktiviteden yola çıkarak enzim ünitesini miligram olarak tanımlamak da mümkündür.

$$\text{ünite/spesifik aktivite(ünite/mg)} = \text{miligram enzim} \quad (2.3)$$

Spesifik aktivite kavramı özellikle bir enzimin saflığını kabaca tanımlamak için kullanılan bir ölçüttür. Örneğin, ham özütlerdeki yüksek protein derişiminin ancak küçük bir kısmını ilgilendığımız enzime ait protein

oluşturmaktadır. Bu nedenle ölçüm yapıldığında oldukça yüksek bir enzim ünitesi elde etmek olasıdır, fakat bu durumda enzimin spesifik aktivitesi düşük olacaktır. Enzimi saflaştırdıkça çözeltildeki enzim ünitesi sabit kalırken, protein derişimi düşeceği için spesifik aktivite yükselecektir. Enzim en yüksek saflığa eriştiğinde spesifik aktivite sabit bir değere ulaşacaktır.

2.5. İmmobilizasyon

İmmobilizasyon, enzimlerin katalitik aktivitelerini kaybetmeden sürekli ve defalarca kullanımlarını sağlamak üzere, fiziksel veya kimyasal olarak bir destek materyali üzerine tutturulması olarak tanımlanır.

Endüstriyel ve analitik proseslerin çoğu, sulu ortamda gerçekleşir. Bu proseslerde enzimler, substrat çözeltilisi ile karıştırılır ve ortamda ürün elde edildikten sonra enzimler ekonomik olarak geri kazanılamazlar. Ayrıca sürekli üretim proseslerinde serbest enzimler kullanılamazlar. Enzimlerin sadece bir kere kullanılmaları ve pahalı olmaları nedeniyle, bu proseslerin maliyetleri oldukça yüksektir. Bu nedenle enzimler suda çözünmeyen bir desteğe immobilize edilerek hem defalarca kullanılabilen hem de sürekli proseslere uygulanabilmektedir. Böylece, önemli miktarda ekonomik kazanç elde edilmektedir. Günümüzde çok sayıda immobilize enzim endüstride kullanılmaktadır (Karadağ 2001).



Şekil 2.5. Ne için enzim immobilizasyonu

2.5.1. Enzim immobilizasyon tarihi

İlk kez 19. yüzyılın başında, immobilize mikroorganizmalar endüstriyel çapta yaygın bir şekilde kullanılmaktaydılar. Bu durum hem şarap üretimi hem de atık suların artımı için üretilen filtreler için geçerliydi (Hartmeier, 1988). Modern immobilizasyon tarihi 1940'ların sonlarına dayanmaktadır. Fakat o dönemdeki ilgili çalışmalardan bahseden yayınlar, diğer alanlar ile ilgili dergilerde yayınlanmalarından dolayı biyokimyacılarca büyük oranda yok sayılmıştır (Trevan 1980). İmmobilize enzim sistemlerinin pratik olarak ilk kullanımı ise Grobhofer ve Scheilth 1954 tarafından yapılmıştır (Aksoy 2003).

2.5.2. İmmobilize enzimlerin avantaj ve dezavantajları

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre pek çok işlevsel avantajları vardır. Bunlardan en önemlileri şu şekilde sıralanabilir (Mosbach 1976;Zaborsky 1973; Pitcher 1978).

- Sürekli proseslere uygulanabilmeleri,
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilme,
- Reaksiyon sonunda ortamdaki kolayca uzaklaştırılabilme,
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.b.) karşı daha dayanıklılık,
- Doğal enzime kıyasla daha karar olma,
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilme,
- Çok adımlı reaksiyonlar için kullanılabilme,
- Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı (otoliz) azalması,
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilmesidir.

İmmobilize enzimlerin bazı dezavantajları da vardır. Bunlar da şu şekilde sıralanabilir (Durante 2004;Trevan 1980).

- İmmobilizasyon işlemi boyunca enzim aktifliği azalabilir veya kaybolabilir.

- Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır.
- Enzim taşıyıcılarının maliyeti yüksektir.

2.5.3. İmmobilize sistemlerde kullanılan destek materyalleri

İmmobilize enzim sisteminin performansını belirlemede seçilen matriksin özellikleri çok ciddi derecede önemlidir. İdeal destek özelliklerini sıralamak gerekirse; sıkışmaya karşı fiziksel direnç, hidrofilisite, enzimlere karşı inertlik, kolay türevlendirilebilirlik, biyo-uyumluluk, mikrobiyal saldırılara dayanıklılık, elde edilebilirlik ve düşük maliyettir. Destekler kimyasal yapılarına göre organik veya inorganik olarak sınıflandırılabilirler (Buchholz ve Klein 1987).

Çizelge 2.1. Enzim immobilizasyonun da kullanılan bazı destek materyalleri

Doğal Polimer	Sentetik Polimer	Anorganik
Selüloz	Stiren esaslı polimerler	Kil
Nisasta	Akrilamid esaslı polimerler	Cam
Aljinat	Naylon	Silika jel
Karragenan	Vinil ve allil polimerler	Ponza taşı
Kollagen	Akrilat esaslı polimerler	Aktif karbon
Jelatin	İyon değiştirici reçineler	Metaller
Albümin	Maleik anhidrit polimerleri	Metal oksitler
İpek		Bentonit

Organik destekler de doğal ve sentetik polimerler olarak ayrılabilirler (Cabrera ve Kennedy 1991). Matrikslerin ortalama partikül çapı, şişme oranı, mekanik sağlamlık ve sıkışma oranı gibi fiziksel özellikleri immobilize sistemlerin performansında büyük bir öneme sahiptir ve teknik şartlar altında kullanılacak reaktör tipini belirlemektedir. Özellikle, por parametreleri ve partikül boyutları, toplam yüzey alanının büyüklüğünü etkilemekte ve böylece matriksin enzim bağlama kapasitesini etkilemektedir. Porsuz destekler düşük difüzyonel limitler göstermekte fakat az yükleme kapasitesine sahiptir. Bu nedenle, porlu

destekler genellikle tercih edilmektedir. Çünkü geniş yüzey alanı yüksek enzim yüklemesini sağlayabilmekte ve ayrıca da immobilize enzimler çevresel şartlardan daha iyi korunabilmektedirler. Porlu sistemler, kapasite ve akış özelliklerinin optimizasyonu için kontrollü por dağılımına sahip olmalıdırlar. İnorganik taşıyıcıların birçok avantajına karşın çoğu endüstriyel uygulamalar organik matrikslerle gerçekleştirilmektedirler. Hidrofilisite, immobilize enzimlerin aktivitesini belirleyen en önemli faktörlerden biridir. Çok geniş çapta kullanılan mükemmel bir matriks Agaroz'dur. Proteinler için geniş kapasite sağlayan yüksek porozitesine ek olarak hidrofilik karakterde olması, kolay türevlendirilebilmesi, yüklü grupların yokluğu, ticari olarak bulunabilirlik gibi çeşitli olumlu yönleri vardır. Fakat agarozun ve diğer birçok desteğin kullanımına ciddi bir olumsuzluk maliyetidir. Bu problem matrikslerin rejenerasyonunu ve tekrar kullanılmasını sağlayan tersinir metotlarla bertaraf edilebilirler. Enzimler desteğe geri dönüşlü fiziksel adsorpsiyondan ve iyonik bağlardan istikrarlı kovalent bağlara kadar birçok etkileşim ile bağlanabilirler. Çeşitli enzim immobilizasyonu yaklaşımlarını sınıflandırmanın bir yolu da bunları tersinir ve tersinmez bağlanma olarak ikiye ayırmaktır (Gupta ve Mattiasson 1992). Bağlanma gücü genellikle tersinirlik ile ters orantılıdır. Bu iki zıt kavramın kararlılık ve tersinirlik dengesini sağlamak zor olmaktadır. Bu konuda geleneksel olarak, kurulan bağın olabildiğine güçlü olması tercih edilmektedir (Beatriz ve Batista 2006).

Destek materyaline bağlanmada enzim molekülünün protein yapısından yararlanır. Enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar bağlanmada etkilidir. Bunların yanında immobilizasyonda kullanılacak destek materyallerinde bazı özellikler de aranır. Bunlar şu şekilde sıralanabilir (Beatriz ve Batista 2006).

- Hidrofilik karakter
- Suda çözünmeme
- Gözenekli yapı
- Mekanik dayanıklılık ve uygun partikül büyüklüğü
- Kimyasal ve termal dayanıklılık
- Mikroorganizmalara karşı dirençli olma
- Ucuzluk

- Zehirsizlik

İmmobilizasyon sırasında enzim molekülleri konformasyonel değişikliğe uğrayabilir. İmmobilize enzimin zincir hareketleri çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunlar, immobilizasyonda kullanılan kimyasalların tipi, destekle enzimin karşılıklı etkileşmesi, aktifleştirici veya çapraz bağlayıcı kimyasallar ile enzimin etkileşmesi olarak belirtilebilir. Enzimler içinde buldukları çevre tarafından etkilenirler. Enzimin katı destek üzerinde immobilizasyonu enzimin etrafındaki mikro çevreyi etkileyebilir, bu da enzimin görünen davranışları üzerinde aşağıda belirtildiği gibi bazı değişiklikler oluşturur.

- Bölme etkisi
- Difüzyon sınırlaması
- Yapısal değişiklikler
- Sterik sınırlamalar
- İnaktivasyon

2.5.4. Bölme etkisi

Poliiyonik destek kullanıldığında iyonik yapıya sahip substrat, tepkime ortamında homojen olarak dağılmaz ve enzim çevresinde farklı derişimde bulunabilir. Ölçülen derişim değerleri genellikle kütle fazından yapılıdır. Bölme etkisi çok gözlenen bir durumdur. Ayrıca, çözünen madde ile polimerik destek arasında hidrofobik etkileşmeler de olabilir.

2.5.5. Difüzyon sınırlaması

Difüzyonel sınırlama, fiziksel büyüklük ile ilgilidir. Eğer polimer desteğinin gözenek çapı substrat molekülünden küçük ise substratın destek içine difüzlenmesi ve enzim ile temasa geçmesi engellenir ve bunun sonucu olarakta herhangi bir tepkime meydana gelmez.

2.5.6. Yapısal değişiklikler

Enzim immobilizasyonunda, enzim yapısının belli bir pozisyonda uzun süre korunması ile enzim ve destek materyali arasında çok sayıda bağlanma oluşabilir. Enzimin katalitik aktifliği yapısal değişmelere bağlı olduğundan K_m ve V_{max} değerlerinde de farklılıklar, enzim aktifliğinde azalmalar olabilir.

2.5.7. Sterik sınırlamalar

Eğer immobilize enzimin aktif uçları substrat molekülünün yaklaşmasına elverişli pozisyonda değil ise sterik problemler ortaya çıkar. Örneğin enzimin aktif gurupları destek maddesine dönük ise substratın aktif merkeze yaklaşması engellenir. Enzim polimerik kafese hapsedildiğinde, substrat moleküllerinin enzime yaklaşıp direk temasa geçmesi matriks tarafından engellenebilir.

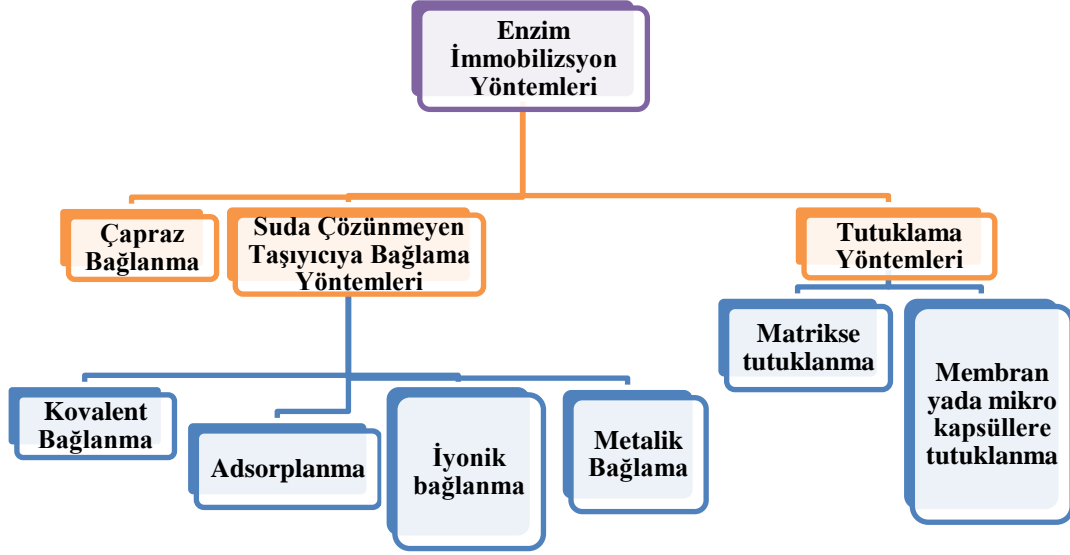
2.5.8. İnaktivasyon

Zor tepkime şartlarında (örneğin yüksek pH, ortamda serbest radikallerin, oksitleyici reaktiflerin varlığı gibi) gerçekleşen immobilizasyon işlemleri enzimin bir kısmının veya tamamının aktifliğini yitirmesine sebep olabilir. Böylece immobilize edilmiş enzimin spesifik aktifliği, serbest enzimin aktifliğinden oldukça düşük olabilir. Enzim herhangi bir konformasyonel değişim olmaksızın aktifliğini kaybedebilir (Yamak 2007).

2.6. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyonu için çeşitli yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler kimyasal ve fiziksel alıkonma olarak iki ana başlık altında incelenebilir. Kimyasal immobilizasyon çapraz bağlanma ve suda çözünmeyen taşıyıcıya bağlanma olarak, fiziksel bağlanma ise tutuklanma yöntemleri olarak

ayrılır. İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması Şekil 2.6.'da ki gibi yapılabilir.



Şekil 2.6. İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

2.6.1. Kimyasal yöntemler

Kimyasal immobilizasyon yöntemleri, suda çözünmeyen aktifleştirilmiş polimer ile enzim arasında kovalent bağ oluşumu veya birden fazla enzim molekülü arasında çapraz bağ oluşumunu gerektirir. Kimyasal yöntemler çoğunlukla tersinmezdir. Serbest enzimin yeniden geri kazanılması mümkün değildir (Saburo ve Atsuo 1985; Carr ve Bowers 1980). Kimyasal yöntemlerle immobilizasyonda, enzimin çok kararlı olması ve destek maddesinin dayanıklı olması gibi avantajlar vardır. Ancak immobilizasyon veriminin sınırlı olması, özel reaksiyon şartları gerektirmesi, kimyasal olarak inert olan destek maddelerine uygulanması için aktivasyon işlemini gerektirmesi gibi sorunlar da söz konusudur (John 1985).

Proteinlerin kovalent bağların oluşumunu temel alan immobilizasyonu en yaygın kullanılanlardandır. Bu metodun bir avantajı, enzim ile destek arasındaki

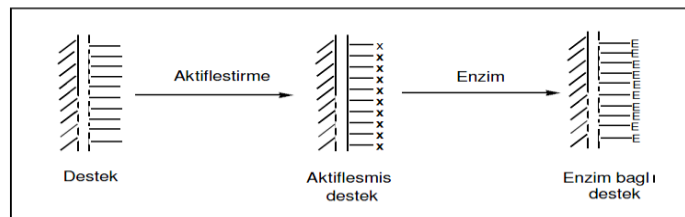
bağların güçlü doğası sayesinde kullanıldıklarında enzimlerin çözeltiye karışmamalarıdır. Fakat, yüksek bağlı enzim aktivitesine ulaşmak için, katalik aktivite için esansiyel olan amino asit uçlarının destek ile enzim arasındaki kovalent bağda yer almaması gerekir. Bazı durumlarda bu şartı sağlamak oldukça zor olmaktadır. Aktivite verimini bazen artıran basit bir prosedür de, substrat analoglarının varlığında eşleşme reaksiyonunu gerçekleştirmektedir (Mattiasson 1991). İmmobilizasyon için kovalent metotlar, enzimin üründe kesinlikle bulunmamasını gerektiren durumlarda kullanılmaktadırlar.

İmmobilizasyon için çok sayıda ticari destekler vardır. Her durumda en iyisi, katalizin ilgili özelliklerini ve kullanım amacını göz önünde bulundurarak seçim yapmaktır. Ancak, genellikle birden fazla yaklaşım denemek ve özel durum için belli bir metod uydurmak gereklidir (White ve Kennedy 1980; Taylor1991).

2.6.1.1. Kovalent bağlanma ile immobilizasyon

Taşıyıcı destek maddesi; hidroksil, karboksil, amino, tiyol gibi fonksiyonel gruplar taşımaktadır (John 1985).

Kovalent bağlı destek-enzim (Şekil 2.8) kompleksinin aktifliği doğal enziminkinden farklı olabilir. Bu farkın büyüklüğü taşıyıcı materyalin biçim ve büyüklüğüne, etkileşme yönteminin doğasına, taşıyıcı materyalin bileşimine, enzim yapısına ve reaksiyon sırasındaki spesifik şartlara bağlıdır. Kovalent bağlanma ile immobilizasyonda eğer taşıyıcı destek maddesi aktif değilse önce destek maddesi aktifleştirilir, daha sonra da enzimin kovalent bağlanması gerçekleştirilir (Dumitriu ve ark. 1988).



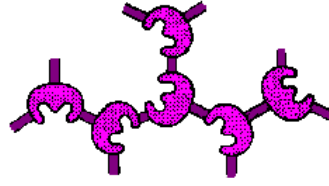
Şekil 2.7. Aktifleştirme sonrası destek materyaline kovalent bağlanma ile immobilizasyon (Gökgöz 2006)



Şekil 2.8. Kovalent bağlanma ile immobilizasyon (Bickerstaff 1997)

2.6.1.2. Çapraz bağlanma

Enzim molekülleri başka bir destek maddesi olmadan, kendi aralarında molekül içi veya moleküller arası çapraz bağlanarak immobilize olabilirler. Bu yöntem üç boyutlu çapraz bağlanmış enzim oluşumu esasına dayanmaktadır. Çapraz bağlanma ile enzimlerin immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken şartların seçimi ve kurulumu zordur (Sanjay 2006).

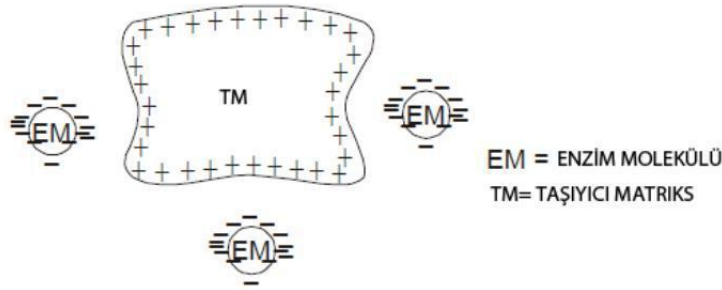


Şekil 2.9. Çapraz bağlanma modeli (Yamak 2007)

Enzim aktifliği, reaksiyon süresi, sıcaklık, iyonik şiddet, pH, çapraz bağlayıcı madde ve enzim konsantrasyonu gibi faktörlere ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır. Bu metodun en önemli avantajı, tek bir işlemde enzimleri immobilize etmek için iki ya da çok fonksiyonlu maddelerin kullanılabilmesidir. Bu metodun dezavantajı ise yüksek aktiflik gösteren immobilize enzim elde etmek için moleküller arası çapraz bağlanma reaksiyonunun kontrol edilmesindeki zorluklardır (Telefoncu 1997).

2.6.2. Fiziksel yöntemler

Fiziksel yöntemler kovalent bağ oluşumuna bağlı olmadan, enzimin belirli bir yere tutturulmasını içerir. Enzimlerin immobilizasyonu bazı fiziksel kuvvetlerin etkileşmesiyle (elektrostatik, protein-protein etkileşmesi, iyonik bağların oluşumu, v.b) enzimin destek maddesindeki mikrobölmeler içerisinde veya gözenekli membranlarda tutturulmasıyla sağlanır. Esas itibariyle fiziksel immobilizasyon yöntemleri tamamen tersinirdir. Bununla birlikte çoğu özel örneklerde göz ardı edilemeyecek kadar tersinmez bağ oluşumları da gözlenir. Fiziksel yöntemler adsorpsiyon ve hapsedme ile immobilizasyon olmak üzere iki gruba ayrılır (Yamak 2007).



Şekil 2.10. Fiziksel etkileşim modeli (Okubo 1984)

2.6.3. Adsorpsiyon ile immobilizasyon

Enzimin taşıyıcı destek üzerine fiziksel adsorpsiyonu, geniş uygulama alanı olan basit bir immobilizasyon yöntemidir (Zaborsky 1973). Adsorpsiyon yöntemi ile enzim immobilizasyonu katı destek taşıyıcı üzerinde enzimin fiziksel adsorpsiyonuna veya iyonik bağlanmasına dayanır. Fiziksel adsorpsiyonda immobilizasyonu sağlayan kuvvetler; hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerdir (Skovby 2007).

Adsorpsiyon yönteminde uygun bir çözelti içinde çözülmüş halde bulunan enzim, destek ile belli bir süre etkileştirilerek enzimin desteğe

tutturulması sağlanır. İmmobilize enzimde hemen hemen hiçbir kimyasal değişiklik olmaz. Çünkü destek materyali ile kimyasal bir tepkime olmamaktadır. Etkin bir immobilizasyon işlemi için, sıcaklık, adsorbanın miktarı, enzim derişimi, iyonik şiddet, pH ve çözücü karakteri gibi değişkenlere bağlıdır. Adsorpsiyon ortamının koşulları, enzimin fizyolojik koşullarına çok yakın olarak düzenlendiğinde, aktivite kaybı oldukça düşüktür. Bu avantajların yanında optimum koşulların sağlanma güçlüğü ve enzimle destek arasında zayıf bir çekim varsa enzimin desorpsiyonu ile ürün kirlenmesi gibi dezavantajlar da söz konusu olabilir. Adsorpsiyon yönteminde en çok kullanılan adsorbanslar; anyon ve katyon değiştiricili reçineler, aktif karbon, sentetik ve doğal polimerler, silikajel, nişasta, killer, alümina, bentonit, seramikler ve gözenekli camlardır (Carr 1987).

2.6.4. Hapsetme ile immobilizasyon

Bu yöntem polimerik matriks yapısında veya yarı geçirgen membranlarda enzimin hapsedilmesine dayanır (Arıca 1987). Enzim sulu monomer veya polimer çözeltisinde çözülür. Polimer oluşumu ve/veya çapraz bağlanma ısıyla, gama radyasyonu veya UV ışınlarıyla başlatılır ve oluşan hidrofilik polimer içinde enzim hapsedilir (Arıca ve Hasırcı 1987). Polimerik matriks yapısının, substrat ve ürünün difüzyonuna izin verirken proteinin difüzyonunu engellemesi için yeteri derecede sıkı olması gerekir. Bu yöntem her çeşit enzimi, diğer biyokatalizörleri, bütün hücreleri veya farklı çaptaki mikroorganizmaları hapsetmek için çok genel kullanılabilir (Dumitriu1988). Bu yöntem çok kolay uygulanabilen fiziksel bir yöntemdir. Kimyasal bağlanma olmadığından yüklü taşıyıcılara ihtiyaç yoktur. Ancak enzimin immobilizasyon işlemi sırasında inaktive olabilmesi gibi sorunlar olabilir.

Enzim hapsetme yöntemi için organik ve anorganik yapıya sahip birçok taşıyıcı destek maddesi kullanılır. Bu taşıyıcılar partikül, tüp, membran ve fiber şeklinde olabilir. Çizelge 2.2.'de enzim hapsetme yönteminde yaygın olarak kullanılan bazı polimerler gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Enzim hapsedilme yönteminde yaygın olarak kullanılan bazı polimerler

Doğal Destek Maddeleri	Sentetik Destek Maddeleri
Polisakkarit kökenliler - Selüloz - Aljinat - Karragenan	Poliakrilatlar Polistiren Vinil ve alil polimerler Poliamitler
Protein kökenliler - Kollajen	Maleik andrit bazlı kopolimerler

Enzim hapsedilmesi için taşıyıcı destek maddesi seçilirken çeşitli faktörlerin göz önünde bulundurulması gerekir. Bunlar; fiziksel form, sertlik ve dayanıklılık gibi mekanik özellikler, kimyasal ve mikrobiyal etkilere karşı direnç, hidrofilik-hidrofobik uç oranı, geçirgenlik, yüzey alanı, maliyet ve kolay bulunabilirliktir. Hapsedilme yöntemi mikrokapsül ve kafes tipi olmak üzere iki gruba ayrılır.

2.6.5. Mikrokapsül ile hapsedilme yöntemi

Bu yöntemde enzim molekülleri 10-1000 µm çaplı küçük yarı geçirgen membranlara hapsedilir. Yarı geçirgen membran, büyük protein veya enzimlerin mikrokapsül dışına çıkmasına engel olurken, küçük substrat ve ürün moleküllerinin serbestçe giriş-çıkışına izin verir. Enzimlerin mikrokapsüllemesi için iki yöntem kullanılır. Bunlar faz ayrımı ve ara yüzey polimerizasyonudur.

Faz ayrımı yönteminde, enzim ve mikrokapsülü oluşturan çözelti damlalar şeklinde çöktürücüye ilave edilir. Ara yüzey polimerizasyonun da ise enzimin sudaki çözeltisi, suyla karışmayan organik çözelti içerisinde emilmesidir

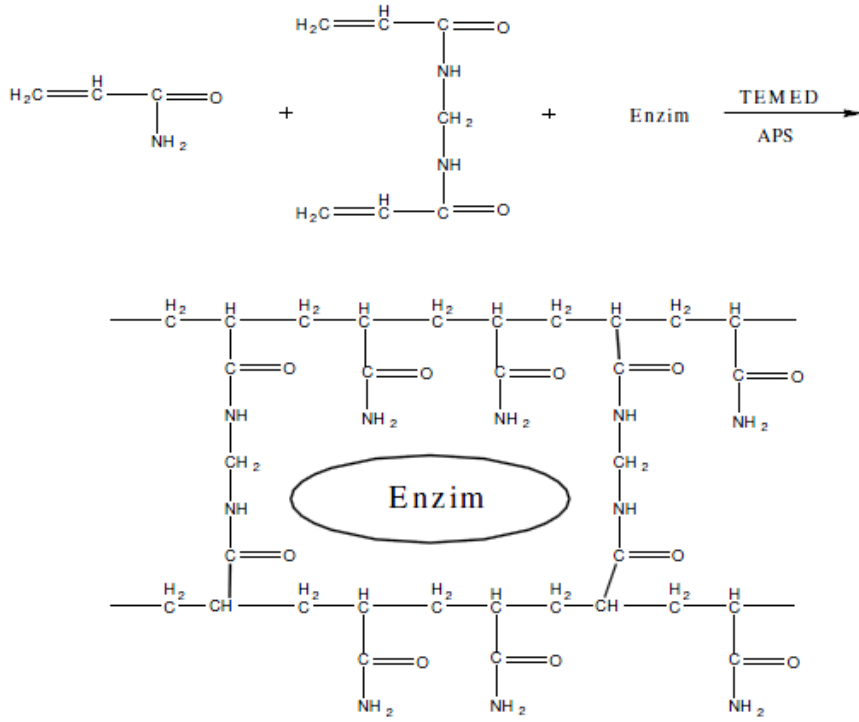
Ortama eklenen polimer çözeltisi, enzim mikro damlalarının etrafında membran oluşturur. Böylece enzim polimerik membran tarafından sarılarak mikrokapsüllemiş olur. Mikrokapsülleme yönteminde herhangi bir kimyasal bağlanma olmadığından enzim aktifliği serbest enzim aktifliğine yakındır. Bu

yöntem ile oldukça büyük yüzey-hacim oranına ulaşılır (İnam 1945). Bu oranının büyük olması da mikrokapsül içerisinde oluşan enzim substrat reaksiyonunun olasılığını arttırır. Bu yöntemde mikrokapsül oluşumu sırasında yüksek protein konsantrasyonuna gerek olması ve yüksek molekül ağırlıklı substrat ve ürünler gerektirmesi gibi dezavantajlar söz konusudur.

2.6.6. Kafes tipi hapsedme yöntemi

Kafes tipi hapsedme yöntemi, çapraz bağlı polimerlerin boşlukları içinde enzimin tutulması esasına dayanır. Bu yöntemde enzim içeren monomer yada polimer çözeltilerine uygun bir kimyasal başlatıcı, UV veya gama-ışınları uygulayarak yüksek oranda çapraz bağlı bir polimer ağı oluşturulur. Enzim molekülleri fiziksel olarak polimer kafes içerisinde tutulur ve jel matriksin dışına çıkamaz, fakat substrat ve ürün sürekli kafes içine giriş-çıkış yapabilir. Enzim kimyasal değişime uğramaz. Ayrıca bu yöntemde farklı fiziksel formlarda suda çözünmeyen enzim türevleri hazırlanabilir. Jelatinimsi yapıya sahip enzim türevleri, immobilize bir enzimin hem düzenli hem de düzensiz yüzeyler üzerinde kolayca depolamasını sağlar.

Çapraz bağlı polimer oluşturarak enzim hapsedilmesinde en çok kullanılan polimer, N,N-metilen-bis-akrilamit ile çapraz bağlanarak oluşturulan poliakrilamittir (Karadağ 2001).



Şekil 2.11. Polakrilamit jel içine enzim hapsedilmesi (Arıca 1998)

Bu yöntemin avantajları şu şekilde sıralanabilir (Arıca 1998; Michael 1980; Saburo 1985)

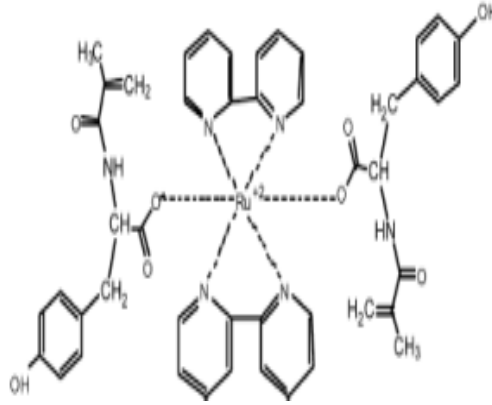
- Çapraz bağ oluşumunda kullanılan gama veya UV ışınları enzimin yapısını ve aktifliğini kimyasal metotlara göre daha az etkiler.
- Ortamdaki monomer ve çapraz bağlayıcı derişimini değiştirerek farklı büyüklükte gözenek boyutuna sahip polimerik kafesler elde edilebilir.
- Polimerleşme kolay ve hızlı bir şekilde gerçekleşebilmektedir.

Metodun dezavantajları ise;

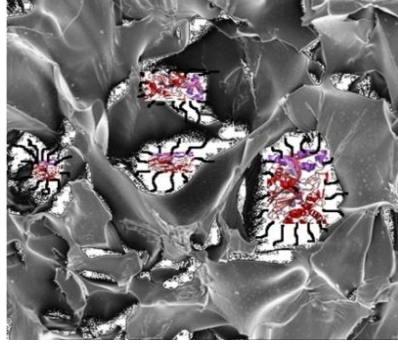
- Çapraz bağlı polimer ağlarından enzimin sızması,
- Küçük hacimli substratlar için sınırlı olması ve
- Makromoleküler substrat için düşük aktiflik göstermesidir.

2.7. Anadoluca Metodu (AmiNoAcid Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach)

R. Say ve ark. tarafından geliştirilen ANADOLUCA metodu farklı protein ve enzimlere uygulanarak biyoteknolojik alanda farklı uygulamalarla literatüre kazandırılmaktadır. ANADOLUCA metoduna göre, rutenyum kompleksi içeren fotosensitif aminoasit monomerler ile enzim, protein gibi biyomoleküller nano formatta sentezlenebildiği gibi, yine bu rutenyum aminoasit şelat kompleksleri [bis(2-20-bipyridyl)bis(MATyr)-ruthenium(II) fotosensitif monomer] enzimlerle etkileştirildiğinde, enzim yapısındaki kırılabilirliği engelleyerek, sağlam, kararlı yeni enzim yapıları oluşturulmaktadır. Rutenyum-aminoasit monomerleri enzimle etkileştirildiğinde enzim yapısında yeni polimerleşebilen uçlar oluşturularak kriyojelin polimerizasyonu aşamasında enzimin kriyojele çapraz bağlanması gerçekleştirilebilir. Bu şekilde geliştirilen yeni fotosensitif karakterli enzim immobilize sistemler farklı çalışmalarda üretim amacıyla kullanılabilir (Say ve ark. 2009).



Şekil 2.12. Rutenyum aminoasit şelat kompleksleri (Say ve ark. 2009)



Şekil 2.13. Rutenyum aminoasit şelat kompleksleriile etkileştirilen PA nın kriyojel gözeneklerindeki hipotetik modeli

2.7.1. İmmobilize edilen enzimden beklenen özellikler

Kullanılan immobilizasyon tekniği ne olursa olsun immobilize edilen enzimden beklenen özellikler :

- Yüksek kararlılık,
- Sürekli üretime olanak vermesi,
- Reaksiyon kontrolüne olanak vermesi,
- Yüksek saflık,
- Yüksek ürün yüzdesi,
- Ekonomik olmasıdır.

2.7.2. İmmobilizasyon yönteminin seçimi

İmmobilizasyon yönteminin seçiminde öncelikle enzimin bağlanacağı destek materyalinin yapısı dikkate alınmalıdır (D'Souza ve Godbole 2002).

Başarılı bir immobilizasyon için aşağıdaki faktörler göz önünde bulundurulmalıdır (Mosbach 1976).

- Destek materyalinin mekanik özellikleri, özellikle fiziksel formu ve mekanik kararlılığı göz önünde bulundurulmalıdır.

- Enzim, tepkimenin yürütüleceği koşullarda kararlı olmalıdır.
- Çapraz bağlayıcı reaktifler, enzimin aktif uçları ile tepkimeye girmemelidir veya çapraz bağlayıcı reaktif, enzimin aktif ucuna nüfuz etmemesi için olabildiğince büyük olmalıdır.
- Mümkünse enzimin aktif ucu bir şekilde korunmalıdır. Örneğin sülfidril enzimleri, glutatyon veya sistein ile tepkimeye sokularak korunabilir ve daha sonra enzim tekrar aktifleştirilebilir.
- İmmobilizasyonda, bağlanmamış enzimi uzaklaştırmak için uygulananyıkama işlemi enzimi etkilememelidir.
- İmmobilize enzim, bazı kimyasal tepkimelerde devamlı katalizör olarak kullanılacak ise immobilizasyon yöntemini seçmeden önce tepkimenin doğası göz önünde bulundurulmalıdır.

2.8. Makrogözenekli Kriyojeller

“Jel” adı altında toplanan polimerik malzemeler polimer-immobilize çözücü sistemleridir. Bu malzemelerde makromoleküller 3B ağ yapısı oluşturacak şekilde birbirine bağlanmış durumdadır. Jel morfolojisi (homo- veya heterofaz) jel hazırlama yöntemine; bağların yapısı ise polimerlerin kimyasal özelliğine bağlıdır. 3B-ağ yapısı içerisinde immobilize olan çözücünün rolü çok önemlidir.

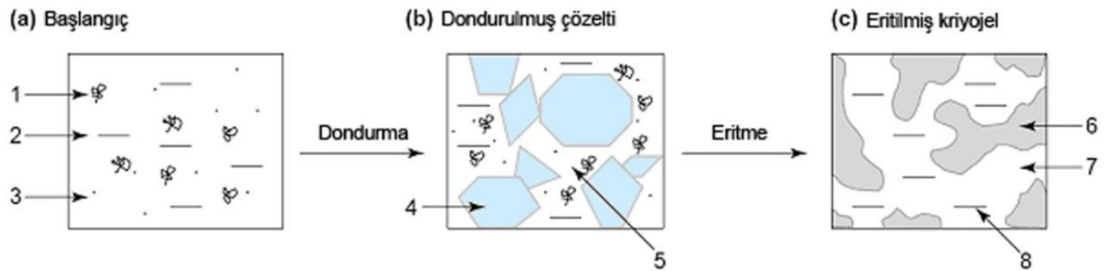
Çizelge 2.3. Polimerik jellerin sınıflandırılması ve üretim işlemleri.

Polimerik jeller			
Tür	Jel oluşumu	Örnekler	Yorumlar
Kemotropik jeller	Moleküller arası kimyasal bağlar sonucu oluşan 3 boyutlu kovalent örgü	Poliakrilamid jeller Polistiren temelli iyon değişim reçineleri veya poliakrilat matriksler Sephadexler olarak bilinen çapraz bağlı dekstran	Büyük bir jel grubudur. Monomerik öncüllerin dallanmış polimerizasyonu sırasında ya da polimerik öncüllerin çapraz bağlanmasıyla oluşur. Biyoteknoloji alanında yaygın kullanılır.
İyonotropik jeller	Moleküller arası iyonik bağlara (tuzlar) kararlılık veren iyon değişim tepkimeleri	Aljinat-polilisin veya kitosan-polifosfat karışımı matriksler gibi polielektrolit kompleksler	Bu jeller belli kompozisyona sahip ortamda kararlıyken sıvı ortamın pH veya iyonik bileşeni değiştirildiğinde kolaylıkla çözünürler. İmmobilize mikrobiyel, bitki veya hayvan hücresi taşıyıcıları olarak kullanılırlar
Şelatotropik jeller	Moleküller arası koordinasyon bağlarına kararlılık veren şelatlanma tepkimeleri	Jel oluşumu çok dişli güçlü koordinasyon yapan metal iyonlarının eklenmesiyle sağlanır. Cu(II) veya Co(II) ile kitosan çözeltileri, Cr(III) ile karboksimetil selüloz çözeltileri veya Ca iyonları ile çapraz bağlanmış aljinat jelleri,	Ca-aljinat jeller hücre immobilizasyonu için kullanılırlar diğer şelatotropik jeller için henüz biyoteknolojik uygulamalar bulunamamıştır.
Solvatotropik jeller	Çözücü bileşeninin değiştirilmesiyle oluşan jeller	Koaservasyon olgusu diye bilinen olay sonucu oluşur. Bu tür jelleşme filmlerin veya fiberlerin ıslak oluşumu sırasında bir ara basamaktır. Örn selüloz nitratlardan ve selüloz asetatlardan	Çözücü olmayan bir madde polimer çözeltisi ortamına eklendiğinde ortama olan polimer afinitesini düşürülerek ve kovalent olmayan polimer-polimer etkileşimleri oluşturularak jel oluşumunu sağlarlar.
Termotropik jeller	Başlangıç polimer sisteminin ısıtılmasıyla elde edilirler	Hidrofobik olarak modifiye edilmiş hidroksietil selüloz Ovalbümin ve yumurta beyazı jelleri Jelatin jeller Nişasta jelleri Agaroz ve agar agar jelleri Carrageenan jelleri	Moleküller arası hidrofobik etkileşimler jel oluşumunda önemli yere sahiptir.
Psikotropik jeller	Jelleşme başlangıç polimer sisteminin soğutulmasıyla elde edilir		Biyoteknolojide kromatografik malzemeler ve elektroforez matriksleri olarak kullanıldığı gibi hücre kültürlemesi için katı ortam olarak da sıkça kullanılır.
Kryotropik jeller	Başlangıç sisteminin dondurulmasıyla elde edilir.	Bu çalışmanın içeriğini oluşturmaktadır.	

Çözücü sıkı polimer yapısının oluşmasına izin vermemekte ve sistemin çökmesini önlemektedir. Jeller, akış ve yıkılma olmaksızın tersinir deformasyonlara dayanabilen fiziksel malzemelerdir. Polimerik ağ yapısında bulunan moleküllerarası bağların yapısına göre jeller iki gruba ayrılır: kimyasal ve fiziksel jeller. Çizelge 2.3'te jellerin daha detaylı bir sınıflandırılması özetlenmiştir.

Kriyojeller, kısmen donmuş monomer veya polimer çözeltileri kullanılarak hazırlanan jel matrisleridir. Genel olarak kriyojeller birbirine bağlı makrogözeneklere (veya süpermakrogözeneklere) sahiptir. Bu özellikleri kriyojellerin nano-mikro ölçek aralığında herhangi bir difüzyon sorunu olmaksızın kullanımına olanak sağlamaktır. Kriyojellerin osmotik, kimyasal ve mekanik kararlılığının yanında eşsiz yapısal özellikleri sayesinde, biyolojik nanopartiküllerin (plasmidler, virüsler, hücre organelleri) ve hatta tam hücrelerin (*E. coli*) kromatografik ayrılmasında kullanılması mümkündür. Polimerik jeller, biyoteknolojide kromatografik malzeme, molekül ve hücrelerin immobilizasyonu için taşıyıcı, katı kültür ortamı ve elektroforez için matrisler olarak kullanılmaktadır. Polimerik jellerin geniş spektrumda kullanım olanağı bazı gereksinimlere sebep olmaktadır. Bu gereksinimler, biyolojik uygulamalar için yeni nesil jel malzemelerin geliştirilmesini ve üretimini tetiklemektedir. Biyoteknolojide uygulanma potansiyeli olan polimerik jellerden biri de kriyojellerdir. Kriyojeller, düşük veya yüksek molekül ağırlığına sahip monomer çözeltilerinin donma noktalarında altında gerçekleştirilen kriyojenik uygulama yöntemi ile hazırlanmaktadır. Kriyojeller, ilk olarak 1960'lı yıllarda rapor edilmiş ve büyük ilgi görmüştür. Bu malzemelerin biyomedikal ve biyoteknoloji potansiyelleri ise yeni keşfedilmiştir (Hughes ve ark. 1982). Şekil 2.14.'te kriyojellerin üretiminin şematik gösterimi verilmiştir. Kriyotropik jelleşme ile elde edilen polimerik malzemelerin morfolojisi donmamış sistemde üretilen jellere göre önemli farklılıklar göstermektedir. Kriyojeller, diğer kimyasal jeller sınıflarına (kovalent, iyonik, non-kovalent) farklıdır. Özellikle ısısız başlatıcılı jeller (termotropik) kriyojel hazırlanmasında kullanılamazlar. Bazı istinalar dışında, donma-kurutma yöntemiyle hazırlanan polimerik malzemeler, kriyojellerle benzer özellik göstermektedir. Çözücünün dondurulması ve çözücü

kristallerinin süblimleştirilmesiyle hazırlanan polimerik malzemelerde birbirine bağlı gözenekler içeren bir ağ sistemi elde edilmektedir. Fakat, donmamış sıvı fazda herhangi bir jel oluşumu gözlenmemektedir. Donma-kurutma yöntemiyle sadece ince filmler, plakalar veya küçük partiküller hazırlanabilmektedir. Donma-kurutma yöntemiyle silindir veya ince blokların hazırlanması teknik olarak mümkün değildir. Fakat, kriyojeller istenilen şekil ve boyutta bloklar, silindirler, granüller ve diskler halinde hazırlanabilmektedir. Ayrıca, kriyojellerin üretiminde çözücünün düşük basınçta uzaklaştırılmasına gerek olmadığı için donma-kurutma yönteminden daha kolaydır. Geniş birbirine bağlı gözenekli ağ yapısı, kriyojellerin temel yapısal karakteridir. Süngerimsi yapı içerisindeki gözenek sistemi analit moleküllerinin aktarımla taşınmasını kısıtlamamaktadır. Kriyojel içerisinde oluşturulan makrogözeneklerin boyutları 10-250 µm aralığında değişim göstermektedir. Geniş gözeneklerin oluşturduğu ağ yapısı kriyojeller nano-mikro aralığında ölçeğe sahip birçok biyomolekülün ayrılmasında destek malzemesi olma potansiyeli kazandırmaktadır.



Şekil 2.14. Kriyojel üretiminin şematik gösterimi: 1, çözültedeki makromolekül; 2, çözücü; 3, düşük molekül ağırlıklı çözünen molekülleri; 4, dondurulmuş çözücünün polikristalleri; 5, donmamış sıvı mikrofaz; 6, polimerik kriyojel; 7, makrogözenekler; 8, çözücü.

Kriyotropik jelleşme işleminin temel karakteristik özellikleri;

Jel oluşum ajanlarını içeren reaksiyon karışımı, çözücünün donma noktasının bir kaç derece altında dondurulur. Donmuş haldeki sistem, tek parça katı blok gibi görünmesine rağmen donmamış sıvı mikrofaz (UFLMP) içeren heterojen bir karışımdır.

UFLMP içerisindeki jel oluşum ajanlarının derişimi çözücünün donmasının etkisiyle yükselmiştir. Kriyoderişme olarak adlandırılan bu olay, donmuş sistemlerde jel oluşumunun hızlanmasına sebep olmaktadır. Aynı derişime sahip sıvı monomer çözeltilerine göre jelleşme oldukça hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir.

Çözücü kristalleri, gözenek oluşturucu ajan olarak işlev görmektedir. Çözücü eritildiğinde, boşluklar oluşmakta, makrogözenekler çözücü ile dolmaktadır. Çözücü ve jel faz arasındaki yüzey gerilimi, gözeneklerin yapısının yuvarlaklaşmasına ve gözenek yüzeylerinin daha düzenli olmasına sebep olmaktadır. Donma işlemi gerçekleştiğinde, çözücü kristalleri diğer kristallerle birleşene kadar büyümektedir. Eritme işlemi sonra jel içerisinde birbirine bağlı gözeneklerden oluşan bir ağ sistemi oluşmaktadır. Gözeneklerin şekil ve boyutları, birçok faktöre bağlıdır; monomer derişimi ve kriyotropik uygulama sıcaklığı en önemli etki eden faktörlerdir.

Kriyojellerin polimerik fazında mikrogözenek oluşumları gözlenmektedir. Bundan dolayı, kriyojeller hem heterofaz hem de heterogözenekli bir yapıya sahiptirler (Şekil 2.14).

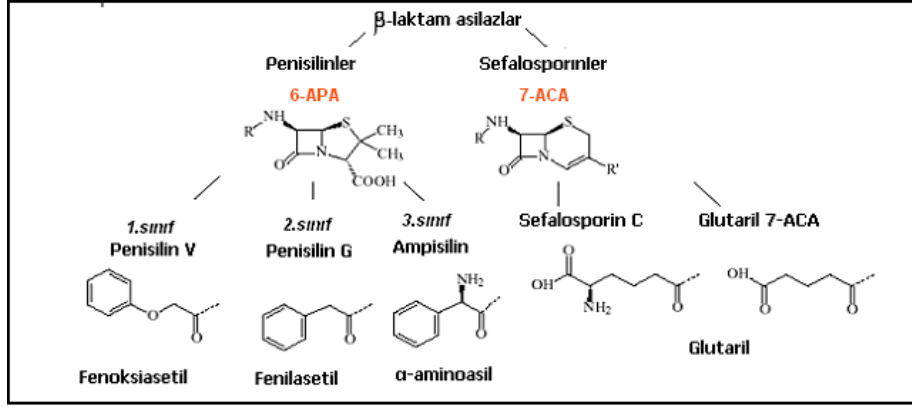
2.9. Penisilin Açılaz Enzimi (PA)

β -laktam antibiyotiklerde bulunan β -laktam çekirdeği ile bir karboksil grubu arasındaki amit bağımlı kesilen ilk enzim 1950'lerde tanımlanmıştır. Penisilin G açılaz olarak adlandırılan bu enzimin, on yıl sonra, ters reaksiyon (kondensasyon) yoluyla β -laktam antibiyotiklerini sentezleyebileceği belirlenmiştir. Geçen süreçte, çeşitli prokaryotlarda benzer aktivite gösteren ve farklı substrat özgülüğüne sahip birçok enzim bulunmuştur (Polderman-Tijmes, 2004) Penisilin açılazlar (PA) (penisilin amidohidrolazlar, EC 3.5.1.11), penisilinlerin yan zincirlerini kırma yoluyla 6-aminopenisillanik asit (6-APA) ve ilgili organik asitleri oluşturan bir grup enzimdir (Arroyo ve ark. 2003).

Penisilinler yıllık üretimleri ve reçetelerde kullanım sıklıkları nedeniyle, giderek artan miktardaki alternatif antimikrobiklerin varlığına karşın, en önemli

antibiyotiklerdir (Penalva ve ark. 1998). Penisilinler, bakteri hücre duvarı sentezinde üstün inhibe edici faaliyetlerine, çok çeşitli antimikrobiyal aktivitetlerine, çeşitli bakteriyel suşlara karşı göze çarpan etkinlikleri ve düşük toksisiteye bağlı olarak, tüm dünyada tahmini antibiyotik piyasasının yaklaşık olarak %19'unu kapsamaktadırlar (Parmar ve ark. 2000). Bu antibiyotiklerin aşırı kullanımını patojenlerde dirençlilik gelişimine yol açmakta ve dirençlilik probleminin üstesinden gelebilmek için daha yeni yarı-sentetik antibiyotikler üretilmektedir. Penisilin açılazlar, penisilinlerin yarı-sentetik penisilinlerin büyük bir kısmının yapıldığı β - laktam nükleusu olan 6-APA'ya hidrolizini katalizleyen enzimler olarak kullanılır. Protein mühendisliği yöntemleriyle oluşturulan yarı sentetik antibiyotikler, daha az yan etki, azaltılmış toksisite, patojenlere karşı daha fazla seçicilik, antimikrobiyal çeşitlilik ve iyileştirilmiş farmakolojik özelliklere sahip olacak şekilde geliştirilebilmektedirler (Rajendhran ve ark. 2004; Parmar ve ark. 2000). β -laktam açılazlar olarak adlandırılan bu grubun üyeleri, öncelikle, tercih ettikleri substratların ana çekirdeğine göre penisilin açılazlar ve sefalosporin açılazlar olarak ikiye ayrılırlar (Şekil 2.15). Penisilin açılazların substratlarının çekirdeği 6-APA, sefalosporin açılazları ise 7-aminosefalosporanik asit (7-ACA)'tir. Daha ileri sınıflandırma ise substratların yan zincirlerine göre yapılmaktadır (Polderman-Tijmes 2004).

Penisilin açılaz'lar; penisilin, 6-APA ve bir organik asite hidrolizini katalize eden enzimlerdir. Organik asitin doğası hidroliz edilmiş penisilin tipine bağlıdır (Mahajan 1984). PA'lar; penisilin amidaz, penisilin açılaz, penisilin amidohidrolaz, penisilin açıltransferaz, penisilin deaçılaz ve penamidaz gibi farklı isimlerle adlandırılırlar.



Şekil 2.15. β -laktam açılazların sınıflandırılması. Penisilinlerin, 6-APA ve sefalosporinlerin, 7 ACA çekirdeği ve çekirdeğin R pozisyonunda doğal yan zincirleri gösterilmiştir (Polderman-Tijmes 2004).

Penisilin açılazlar substrat tercihlerine göre sınıflandırılırlar (Şekil 2.15)

I. sınıf penisilin açılazlar (Penisilin V açılazlar); fenoksimetil penisilin (penisilin V)'i hidrolize ederler.

II. sınıf penisilin açılazlar (Penisilin G açılazlar); benzil penisilin (penisilin G)'i hidrolize ederler.

III. sınıf penisilin açılazlar (Ampisilin açılazlar); ampisiline karşı etkilidirler (Mahajan 1984). Günümüzde, ampisilin açılazlar, α -amino asit ester hidrolazlar (AEH'ler, EC 3.1.1.43) olarak sınıflandırılmaktadır (Skrob 2003).

2.9.1. Penisilin G açılazlar

Seçici olarak fenilasetil yan zincirine sahip penisilinleri (penisilin G) hidrolize ederler ve geniş bir substrat özgüllüğüne sahiptirler. Penisilin G açılazlar; *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter viscosus*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Kluyvera citrophila* ve *Providencia rettgeri* gibi birçok bakteride bulunur. β -laktam açılazların en çok bilinen ve endüstride yaygın olarak kullanılan üyesi E. coli ATCC 11105 penisilin açılazıdır. 24 ve 64 kDa ağırlığında iki farklı alt birimden (heteromer) oluşan E. coli penisilin açılazı periplazmik bir proteindir (Skrob ve ark. 2003).

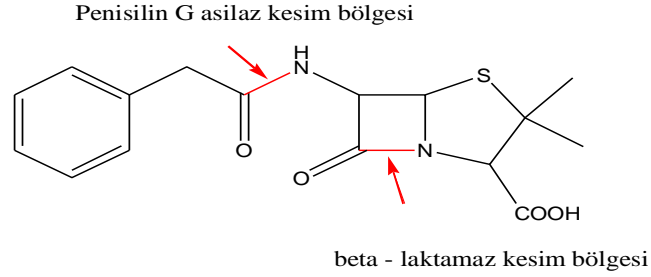
Penisilin açılaz ilaç endüstrisi için oldukça önemlidir (Jaiprakash ve ark.1997). Penisilin G açılaz (EC 3.5.1.11) endüstriyel süreçlerde yarı sentetik penisilinlerden olan, 6-aminopenisilanik asit (6-APA) ve 7-amino- sefalosporanik asit (7-ACA) üretiminde kullanılmaktadır. 6-APA ve 7-ACA alkalın pH (7.5-8.5) değerlerinde üretilirken yarı sentetik penisilinler asidik veya nötral pH (4.0-7.0) değerlerinde üretilir. Penisilin G açılaz değişik metotlarla; bira mayası, bakteri ve küf mikroorganizmaları kullanılarak üretilmekle birlikte çoğunlukla *Escherichia coli* bakterisinden üretilmektedir. Rekombinant *E.coli* kullanmak penisilin üretiminde karşılaşılan glukoz, fruktoz, laktoz ve diğer karbon kaynaklarının katabolik baskılaması gibi değişik problemleri elimine eder (Kheirloomoom 2001).

2.10. PA'nın yapı ve işlevi

E. coli'ye ait PA, iki alt üniteden (α - ve β - alt üniteleri, sırasıyla 24 ve 63 kDa) oluşan periplazmik heterodimerik bir enzimdir (Lee ve ark. 2000). *E. coli* ATCC11105'e ait pac yapısal geni bir sinyal peptit (S), α alt ünitesi (α), birleştirici peptit (C) ve β alt ünitesi (β) olmak üzere yaklaşık 95 kDa'luk öncül bir polipeptid (preproPA) kodlamaktadır. Öncül enzim periplazmik yüzeye taşınarak, periplazmada birleştirici peptidi uzaklaştırmak ve olgun enzimi üretmek için otokatalitik olarak işlenir (Kasche ve ark. 1999). Periplazmik işleme mekanizması, ilk olarak proPA'nın kesimi için (bağlayıcı peptit ve β -alt ünitesi arasındaki kesim yerinden) molekül içi otoproteolizisi, sonrasında ise iki ya da üç adımdan oluşan ardışık C-terminal proteolitik işleme aracılığıyla α -alt ünitesinden birleştirici peptidin uzaklaştırılmasını içermektedir (Kasche ve ark. 1999; Sizmann ve ark. 1990, Chou ve ark. 2000).

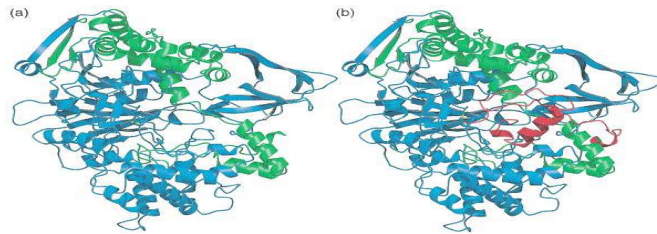
Periplazmik işlenmeyi birleştirici peptidin atılması izlemekte ve iki alt ünite (α , 24 kDa ve β , 63 kDa) olgun PA'nın oluşumu için hazır hale gelmektedir. α ve β alt ünitelerinden oluşan olgun PA'da her iki alt ünitenin de enzimatik aktivite için gerekli olduğu ispatlanmıştır (Bock ve ark. 1983). Bu çeşit bir olgunlaşma süreci viral proteinlerin ya da ökaryotik polipeptit hormonların oluşumunda görülmekte olup; nadiren bakterilerde bulunmaktadır. Bununla

birlikte her bir işleme adımı süresince gerekli olan enzimler ve bunların hücre içindeki yerleşimi halen tam olarak tanımlanmamıştır.



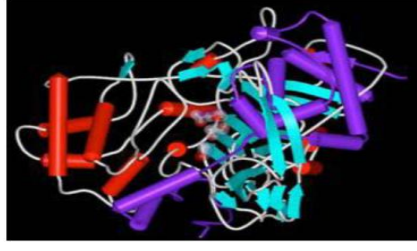
Şekil 2.16. Penisilin G molekülü üzerinde penisilin açilaz ve beta-laktamaz kesim bölgeleri

PA, Ntn katlanması olarak bilinen iki anti-paralel β tabakasıyla dört katmanlı bir $\alpha+\beta$ yapısı içinde katalitik rezidü olarak (bu durumda, β -Serin1) aktivite gösteren N-terminal bir nükleofilden oluşan N-terminal-nükleofil hidrolazlar ailesine aittir (Brannigan ve ark. 1995) (Şekil 2.16). PA'nın kristal yapısı, enzimin dimerik, öncül ve substrat-bağlı formları için bilinmektedir (Duggleby ve ark. 1995; Done ve ark. 1998; Alkema ve ark. 2000; Hewitt ve ark. 2000; McVey ve ark. 2001)



Şekil 2.17. PA'nın ikincil yapısal elementlerini, α -heliksler ve β -tabakalarını gösteren şekli. a) Olgun enzim (McVey, 2001). b) Öncül: A domain yeşil, B domain mavi ve birleştirici peptit kırmızı renktedir. N-terminal nükleofilik serin rezidüsü sarı bir top olarak gösterilmiştir.

Penisilin G'nin β -laktam çekirdeğinin birincil amino grubu ile fenilasetik asidin (PAA) yan zincirinin karboksil grubu arasındaki amit bağına hidrolize eder.



Şekil 2.18. PA enziminin kristal yapısı (Hewitt ve ark. 2000).

PA homologları bütün prokaryot krallığı içinde bulunmuştur (Polderman-Tijmes, 2004). *Escherichia coli*, *Kluyvera citrophila*, *Providencia rettgeri* ve *Alcaligenes faecalis* gibi Gram negatif bakterilerin PA'ları periplazmik alanda birikirken, *Arthrobacter viscosus* ve *Bacillus megaterium* gibi Gram pozitif bakterilerin PA'ları salgılanmaktadır (Çizelge 2.4). Son dönemde, bir *Bacillus sp.* suşundan hücre içi bir PA rapor edilmiştir (Rajendhran ve Gunasekaran 2004; Polderman-Tijmes 2004).

Çizelge 2.4. Penisilin G açılazın mikrobiyal kaynakları (Rajendhran ve Gunasekaran 2004).

Organizma	Enzim yerlesimi	Protein alt birimleri	
		α (kDa)	β (kDa)
<i>Escherichia coli</i>	periplazmik alan	23,8	63,4
<i>Kluyvera citrophila</i>	periplazmik alan	23,6	61,7
<i>Providencia rettgeri</i>	periplazmik alan	23,7	62,2
<i>Alcaligenes faecalis</i>	periplazmik alan	23	62,7
<i>Arthrobacter viscosus</i>	hücre dışı	24,3	61,4
<i>Bacillus megaterium</i>	hücre dışı	24,2	61,4
<i>Bacillus sp.</i>	hücre içi	belirlenmedi	

PA'nın ticari amaçla kullanılan işlev ve mekanizması geniş ölçüde anlaşılmış olmakla birlikte, PA'nın in vivo işlevleri üzerine yeterli bilgi yoktur.

PA'nın in vivo ekspresyonunun hem sıcaklık, hem de PAA tarafından düzenlendiği gözlenmiştir (McLanahan 2003). Bakterilerde, PA'nın rolünün henüz açık olmamasına rağmen, enzimin serbest yaşama evresindeki organizma tarafından bir karbon kaynağı olarak kullanılabilen PA üretimi için fenil asetilenmiş bileşenlerin yıkımında rol aldığı ileri sürülmektedir (Rajendhran ve Gunasekaran 2004; Arroyo ve ark. 2003; McLanahan 2003). Ayrıca, *Escherichia coli*'de pac geninin, yıkım yolağında işlevsel olan fenil asetillenmiş bileşenleri sağlayan, (4-hidroksifenilasetik asit yıkım yolağı bileşenlerini kodlayan) bir gen kümesinin yakınına yerleştiği gözönünde bulundurulmalıdır (Rajendhran ve Gunasekaran 2004).

Escherichia coli PA'sı gibi, diğer pek çok PA birbirinden farklı iki alt birimden oluşmaktadır ve benzer moleküler ağırlıklara sahiptirler. Dizileri, PA dizisine %29 ila %83 benzerlik göstermektedir ve dizi hizalama çalışmalarına dayanarak, bütün bu enzimlerin N-terminal bir katalitik serine sahip oldukları ve PA için tarif edildiği gibi bir öncülden tüvelendikleri sonucu çıkarılabilir.

2.10.1. Penisilin açılazın kararlılığı

Kararlı enzim elde etmek üzere genetik olmayan şu metotlar yaygın olarak kullanılmaktadır (Rajendhran ve Gunasekaran 2004).

1. Artmış içsel kararlılıkta enzimler için mikroorganizmaların taranması
2. Kararlılığı arttırabilen çeşitli katkıların kullanımı
3. Katı bir destek üzerine enzimlerin immobilizasyonu
4. Enzimlerin kimyasal modifikasyonu

Bütün bu metotlar sıcaklık, pH ve organik çözücülere karşı kararlılığı arttırmak için başarılı şekilde uygulanmaktadır (Rajendhran ve Gunasekaran 2004).

PA'ların sıcaklıkla denatürasyonu, sudaki konformasyonel hareketliliklerine bağlıdır. Hareketlilikleri, ulaşılabilen serbest su miktarının

düşmesiyle azalabilmektedir. Bu azalma, polioller, polietilen glikolleri, bisimidoesterler, nötral tuzlar, albüminler, diğer proteinler, tiol indirgeyici ajanlar ve şeker polioller gibi stabilize edici ajanların eklenmesiyle başarılabilmektedir (Arroyo ve ark. 2003). Geri dönüşümsüz enzim denatürasyonuna karşı şeker, yüzey aktif maddeler (bir sıvının yüzey gerilimini azaltan madde), polioller ve tuzlar gibi katkıları etkinken, geri dönüşümlü denatürasyon, en iyi immobilizasyon yöntemiyle durdurulmaktadır. Enzimlerin çapraz bağlanmış ajanlar tarafından kimyasal modifikasyonu, protein moleküllerinin sıcaklıkla denatürasyona karşı kararlılığını arttırmak için kullanışlı bir metottur (Rajendhran ve ark. 2004).

2.11. 6-APA Sentezi

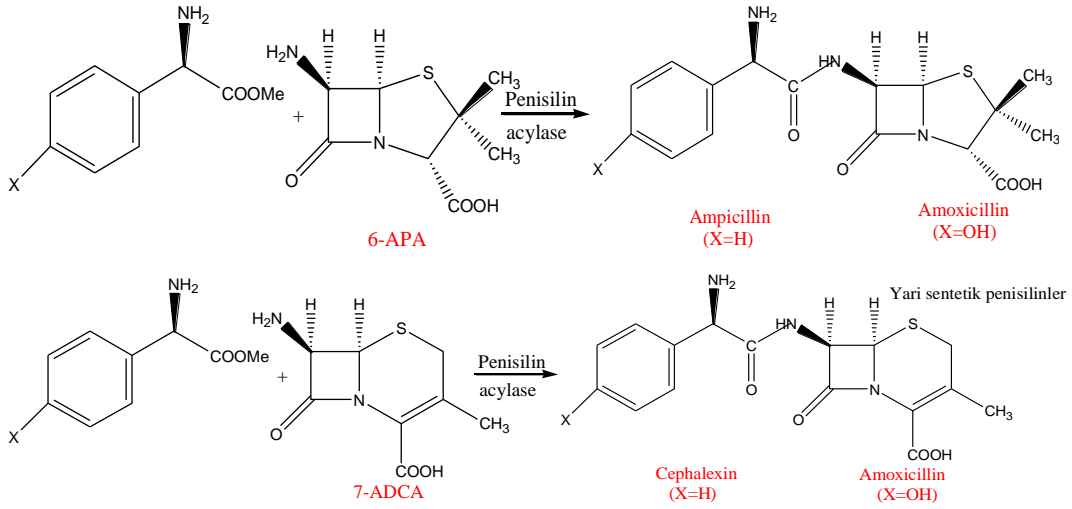
6-APA'nın geleneksel kimyasal sentezi, Gist-Brocades şirketinde 1970'lerde başlamıştır. Ancak bu sentez, zararlı kimyasallar ve çözücülerin kullanıldığı bir süreçle gerçekleşmektedir. Bu yaklaşım, penisilin G'den yüksek miktarda 6-APA oluşumunu sağlayan, PA hidroliz reaksiyonu ile yer değiştirene kadar 15–20 yıl süreyle kullanımda kalmıştır (Arroyo ve ark. 2003).

Penisilin G açılazlarla kıyaslandıklarında penisilin V açılazlar, daha yüksek bir substrat konsantrasyonunda, daha fazla dönüşümü başarmaktadırlar ve bu enzimlerin daha geniş optimal pH aralıklarında aktif olmaları, hidroliz süresince tamponlama gerekliliğini düşürmektedir. Dünyada en yaygın şekilde kullanılan β -laktam antibiyotikleridir. Bu antibiyotiklerin gereğinden fazla kullanımı dirençli patojenlerin gelişimine yol açmaktadır. Birçok mikroorganizmanın sahip olduğu doğal direnç mekanizmaları ya da mutasyon yoluyla kazanılan dayanıklılık nedeniyle penisilinler etkisiz kalabilmektedir. Öte yandan penisilin G midede kararlı değildir ve bu nedenle iğne yoluyla verilmesi gerekmektedir. Günümüzde, penisilin gibi antibiyotiklere karşı kazanılan bu direnç probleminin üstesinden gelen tek yöntem; yeni yarı sentetik penisilinlerin kullanımıdır. Yarı sentetik penisilinler, penisilin V ve penisilin G'ye göre; kararlılık, daha kolay emilim, daha az yan etki, azaltılmış toksisite, patojenler karşısında mükemmel seçicilik, geniş antimikrobiyal etki ve iyileştirilmiş farmakolojik özelliklere sahip olacak şekilde geliştirilebilir (Arroyo ve ark. 2000;

Parmar ve ark. 2000). Ancak, dünyada yapılan bütün 6-APA'nın sadece %15'i penisilin V'den üretilmektedir. 6-APA'nın dünya çapında yıllık 9000 ton civarındaki üretimi, penisilin G ve V üzerinden enzimatik olarak sağlanmaktadır (Arroyo ve ark. 2003). PA'ların biyoteknolojik uygulamaları, β -laktam antibiyotikleri, küçük peptitler ve rasemik karışımlardan saf izomerlerin üretimi için geleneksel kimyasal prosedürlere ciddi bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır (Arroyo ve ark. 2003).

2.11.1. Penisilin Açılaz ile kataliz edilen β -laktam antibiyotiklerinin sentezi

Yarı sentetik penisilinlerin ve sefalosporinlerin geniş ölçekli üretimi için biyoteknolojik işlemler, (Şekil 2.19), bir β -laktam nükleusuyla uygun D-amino asit türevinin penisilin açılazlar tarafından katalizlenen yoğunlaştırılması üzerine odaklanmıştır (Arroyo ve ark.2003).



Şekil.2.19. Bazı önemli β -laktam antibiyotiklerinin PA katalizli sentezi (Arroyo ve ark. 2003).

Yarı sentetik penisilinler enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yoğun olarak kullanılan antibiyotiklerdir. Dolayısıyla bunların üretimi ve tüketimi için dünyada büyük bir pazar oluşmuştur. Yarı sentetik penisilinler, antibakteriyel aktiviteden sorumlu β -laktam halkası içeren ve ana penisilin çekirdeği olarak

adlandırılan 6-APA'ya amino grubundan farklı yan zincirler bağlanmasıyla elde edilirler. Bu nedenle yarı sentetik penisilinlerin üretiminde öncelikle 6-APA'nın elde edilmesi zorunludur. 6-APA günümüzde değişik yollarla üretilir; penisilin G ya da penisilin V'den kimyasal (organik sentez), fermantasyon ve enzimatik teknoloji ve özellikle 1960'lı yıllardan beri enzim immobilizasyon ve biyoreaktör teknolojilerindeki gelişmelerle birlikte 6-APA üretimi ağırlıklı olarak enzimatik teknolojilere bağlıdır.

β -laktam antibiyotiklerinin enzimatik sentezi için en basit strateji, denge kontrolünün veya termodinamik olarak kontrol edilen sentezin kullanılmasıdır. Bu metot, düşük pH değerlerinde, örneğin, substratın çoğunun ayrılmamış formda bulunduğu koşullarda, 6-APA, 7-ACA veya 7-ADCA gibi uygun bir nükleofilin serbest asitler tarafından doğrudan açılmasını içermektedir. Su-organik çözücü karışımları, β -laktam antibiyotiklerinin doğrudan sentezinde bir iyileştirme yaratmak üzere kullanılabilir. Ek olarak, substratların ve ürünlerin pK değerleri artırılabilir, bu da asitlerin çözünmemiş formunun çözünürlüğünün artırılmasıyla sonuçlanmaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan saf PA (*Escherichia coli*) 5-10 unite/mg protein, 6-nitro-3-fenilasetamidobenzoik asit (NIPAB), Penicillin G sodyum tuzu $\geq 98.0\%$, 4-(Dimetilamino)benzaldehit, 2-Hidroksietilmetakrilat (HEMA), Amonyum per sülfat (APS), 4-aminoantipirin ve metakroilklorür Sigma (St Louis, USA) firmasından temin edilmiş ve metakroilklorür düşük basınç altında damıtılarak polimerizasyon inhibitörlerinden arındırılmıştır. N, N'- Metilen bisakrilamit (MBAAm) Fluka, Chemica ve N, N, N', N'- Tetrametiletilediamin (TEMED) Fluka, BioChemica firmalarından temin edilmiştir. 6-APA, Sodyum fosfat monohidrat, Sodyum fosfat dibazik BioXtra, $\geq 99.0\%$, Sodyum klorür BioXtra, $\geq 99.5\%$, Sodyum hidroksit BioXtra, $\geq 98\%$ Sigma-Aldrich firmasından ve diğer çözelti hazırlamada kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Kimyasallar kullanılıncaya kadar uygun koşullarda muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Monomer ve polimerlerin karakterizasyon çalışmalarında Shimadzu 8000 model FTIR, JEOL- JEM 1220EX model (Tokyo, Japan) taramalı elektron mikroskobu (SEM), Quontachrome, Nova 2200e model spesifik yüzey alanı ölçüm cihazı (BET) ve ÄKTA, UPC-900, P 920 model FPLC cihazı kullanılmıştır. Çözeltilerin pH değerlerine WTW Series pH 730 Inolab- pH-metresi ile bakılmıştır. Adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları ve enzim aktivitesi ölçüm çalışmalarında ise Synergy H1 hybrid reader model spektrofotometre kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Penisilin açılaz çapraz bağlı katalitik kriyojel kolon sentezi

PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolon sentezinde Anadoluca metodu kullanılmıştır. Bu amaçla 25 µM rutenyum bağlı metakroil amido tirozin ve 300 U PA çözeltisi 2 saat süreyle azot atmosferi altında karıştırılmıştır. Bu süre içerisinde 1 mL deiyonize suda çözülmüş 56 mg MBAAm ve 740 µL deiyonize su ile karıştırılmış 260 µL HEMA monomeri hazırlanarak, monomer çapraz bağlayıcı karışımı oluşturmak üzere üç çözelti birleştirilmiştir. Polimerizasyonun başlaması için 1 mL su içerisinde çözülmüş 4 mg APS ve 5 µL TEMED alt ucu parafinle kapatılmış olan 5 mL'lik 0.8 cm çaplı enjektöre doldurulmuş monomer çapraz bağlayıcı karışımına eklenmiş ve önce 2 saat süreyle -12 °C'de daha sonra da 16 saat süreyle -20 °C'de dondurulmuştur. Reaksiyona girmeyen bileşenlerin uzaklaştırılması amacıyla hazırlanan kriyojel sırasıyla % 75'lik, % 50'lik ve %25'lik 5 mL etanol çözeltisiyle daha sonra 10 mL deiyonize suyla yıkanmış ve kullanılıncaya kadar -20°C de muhafaza edilmiştir.

3.3. Karakterizasyon çalışmaları

3.3.1. Şişme Testi

PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolonun ve boş poli(HEMA) kriyojel kolonun denge şişme oranının belirlenmesi işlemi için; kuru kriyojel ± 0.0001 duyarlıkla tartılmış ve 50 mL saf su içeren kaba konulmuştur. Daha sonra kriyojel kolonlar belirli sürelerde sudan alınmış, süzgeç kâğıdı yardımı ile yüzeydeki su uzaklaştırılarak tartılmıştır. Kaydedilen kuru ve ıslak ağırlıklar kriyojel kolonların şişme oranlarının hesaplanmasında kullanılmıştır. Kolonların şişme oranları aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = [(W_s - W_0)/W_0] \times 100 \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte; W_0 : Kriyojellerin şişmeden önceki ağırlığı

W_s : Kriyojellerin şişmeden sonraki ağırlıklarını ifade etmektedir.

3.3.2. FTIR analizi

PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolon ve poli(HEMA) kriyojel kolon oda sıcaklığında kurutulmuş olarak FTIR spektrumu alınması için ATR modu kullanılmıştır.

3.3.3. BET yöntemiyle yüzey alanı analizi

PA çapraz bağlı katalitik kriyojel ve poli(HEMA) kriyojelden birer gram tartılarak BET yöntemiyle yüzey analizi yapan cihaza yerleştirilmiştir. Sıvı azot ile muamele edilerek ilk önce kriyojellerin gözeneklerinde bulunabilecek su uzaklaştırılmış ve yapının fiksasyonu yapılmıştır. Cihazda 50 noktaya göre analiz yapılarak kriyojellerin 1 gramının yüzey alanı bulunmuştur.

3.3.4. Yüzey morfolojisi analizi

PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolonun ve poli(HEMA) kriyojel kolonun yüzey morfolojisi SEM kullanılarak belirlenmiştir. Kriyojellerden alınan numuneler analiz edilmeden önce oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kuru kriyojeller örnek haznesine yerleştirilmiş ve yerleştirildikten sonra vakum altında yaklaşık 100 Å kalınlığında altın ile kaplanmış ve sonra SEM ile görüntüleri alınmıştır.

3.3.5. Sıkıştırma testi

PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolon ve poli(HEMA) kriyojel kolon etüv yardımıyla kurutulmuştur. Kurutulmuş kriyojel tartılmıştır. Daha sonra

kolonlar enjektöre alınarak doyuruluncaya kadar su ilave edilmiştir. Kriyojellerin gram başına tuttuğu su miktarı hesaplanmıştır.

3.4. PA Çapraz Bağlı Kriyojelin ve Ticari PA'nın Aktivite İncelemeleri

3.4.1. PA Çapraz Bağlı Kriyojelinin hazırlanması için farklı U değerlerinde PA denenmesi

200 U-1000 U arasında PA alınarak 5 mL lik PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolonlar hazırlanmıştır. Daha önceden hazırlanan pH 7,2 lik 10 mM fosfat tamponu içinde 250 µM NIPAB substrat olarak kullanılmış ve kriyojel kolona adsoplanan penisilin açilaz ile 30 °C'de etkileştirilmiştir. Sonuçta ürün olarak oluşan 6-nitro-3- aminobenzoik asit miktarındaki zamana bağlı değişimin 405 nm'de spektrofotometrik olarak tayiniyle penisilin açilaz aktivitesi hesaplanmıştır.

3.4.2. Optimal sıcaklığın belirlenmesi

PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolonun ve ticari PA'nın optimal reaksiyon sıcaklığını belirlemek üzere; 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 °C'de standart aktivite testleri yapılmıştır. pH 7.2'de 10 mM fosfat tamponu içinde 250 µM NIPAB çözülerek substrat olarak kullanılmış ve katalitik kriyojel kolonda bulunan 300 U PA ve 300 U ticari PA ile hazırlanan çözelti yukarıdaki sıcaklık değerleriyle 60 dk boyunca etkileştirilmiştir. Sonuçta 6-nitro-3-aminobenzoik asit miktarındaki zamana bağlı değişimin 405 nm'de spektrofotometrik tayiniyle PA aktivitesi hesaplanmıştır. Optimal sıcaklık değeri belirlenmiştir.

3.4.3. Optimum pH'ın belirlenmesi

PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolonun ve ticari PA'nın optimal reaksiyon pH'ını belirlemek üzere yapılan çalışmada pH'ları 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 7.2, 8.0, 9.0, 10.0 olan tampon çözeltiler hazırlanmıştır. 250 µM NIPAB

substrat olarak kullanılmıştır. PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolon ve ticari PA ile 30°C'de etkileştirilmiştir. Oluşan ürün 6-nitro-3-aminobenzoik asit miktarındaki zamana bağlı değişimin 405 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle PA aktivitesi hesaplanmıştır. Farklı pH aralıklarında çalışması için farklı pH'larda tamponlar hazırlanmıştır. Bu tampon çözeltilerin hazırlanma prosedürleri aşağıda verilmiştir;

Glisin-HCl tampon: 0.2 M glisin ve 0.2 M HCl stok çözeltileri hazırlanmıştır. 0.2 M glisin çözeltisinden 12.5 mL alınıp üzerine istenilen pH'ya göre yeterli miktarda 0.2 M HCl eklenerek H₂O ile 50 mL'e tamamlanmıştır. Glisin-HCl tamponu pH 2.0 - 4.0 aralığında hazırlanmıştır.

Asetat tampon: 0.2 M asetik asit ve 0.2 M sodyum asetat stok çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra bu stok çözeltilerden 50 mM asetik asit ve 50 mM sodyum asetat çözeltileri hazırlanmıştır. Bu iki çözelti birbiriyle uygun oranlarda karıştırılarak, pH 4.0 - 5.5 aralığında tampon çözeltiler hazırlanmıştır.

Potasyum fosfat tamponu: 1 M KH₂PO₄ ve 1 M K₂HPO₄ stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden 50 mM KH₂PO₄ ile 50 mM K₂HPO₄ hazırlanıp, pH 6.0-9.0 aralığında istenen pH değerini verecek şekilde birbiriyle karıştırılmıştır.

Karbonat-bikarbonat tamponu: 0.2 M sodyum karbonat ve 0.2 M sodyum bikarbonat stok çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra bu çözeltilerden hazırlanan 50 mM sodyum karbonat ve 50 mM sodyum bikarbonat çözeltileri birbiriyle uygun oranlarda karıştırılarak pH 9.0 - 11.0 aralığında tampon çözeltiler elde edilmiştir.

3.4.4. Enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi

PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolonun enzimlerin aktifliğine substrat derişiminin etkisinin incelenmiştir. Km ve V_{mak} sabitlerinin hesaplanması için de şu yol izlenmiştir.



Bu eşitlikte:

E:enzim,

S:substrat,

ES: enzim-substrat kompleksi,

Ü:ürünü tepkime hız sabitlerini göstermektedir.

Yukarıdaki enzim tepkimesi için reaksiyon hızı Michaelis-Menten Eşitliği ile verilir. Eşitlik (3.3)

$$V = V_{max}[S]/(K_m + [S]) \quad (3.3)$$

Eşitlikte; V, reaksiyon hızını, S, substrat derişimini, V_{mak}, maksimum reaksiyon hızını, K_m, ise Michaelis-Menten sabitini göstermektedir.

Michaelis-Menten Eşitliğinin düzenlenmesi ile Lineweaver-Burk Eşitliği elde edilir. Eşitlik (3.4)

$$1/V = K_m/V_{max} \cdot 1/[S] + 1/V_{max} \quad (3.4)$$

Bu eşitliğe göre; 1/V, 1/[S]'e karşı grafiğe geçirildiğinde yeni bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğiminden K_m/V_{mak} değeri ve y-eksenini kestiği noktadan ise 1/V_{mak} değeri hesaplanmıştır.

3.4.5. Depolama kararlılığı

Enzim immobilizasyonunda önemli parametrelerden biri de enzimin depolama kararlılığıdır. PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolon ve ticari PA -20 °C'de depolanarak 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150'nci günlerde aktivite ölçümleri alınarak depolama kararlılıkları belirlenmiştir.

3.4.6. Tekrar kullanılabilirlik

Enzimlerin immobilizasyonunda önemli parametrelerden biri de enzimin tekrar kullanım sayısıdır. Serbest enzim sadece bir kez kullanılabilir, ancak PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolon defalarca kullanılabilir. Bu çalışmada PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolonunu tekrar kullanım sayısını incelemek amacıyla aynı katalitik kriyojel kullanılarak aktiflik tayini deneyleri yapılmıştır.

3.5. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Hem serbest PA'nın hem de PA çapraz bağlı katalitik kriyollerin aktiviteleri, Nitro-3-fenilasetamidobenzoik asit yöntemi ile belirlenmiştir (Kutzbach ve Rauenbsch 1973). Bu prosedüre göre, pH 7,2 10 mM fosfat tamponu ile hazırlanmış 250 µM (NIPAB) çözeltisi substrat olarak kullanılmıştır. Enzim aktivitesi belirlenmek istenen PA hazırlanan substrat çözeltisi ile 30 °C'de etkileştirilmiştir. Oluşan ürün 6-nitro-3-aminobenzoik asit miktarındaki zamana bağlı artışın 405 nm'de spektrofotometrik olarak tayiniyle PA aktivitesi hesaplanmıştır. Bir enzim aktivitesi (U) dakikada 1 µmol 6-nitro-3-aminobenzoik asit oluşumunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Enzim aktivitesi ise aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\text{Enzim Aktivitesi} \left(\frac{U}{mL} \right) = \Delta \text{Abs} / \Delta T \times V \times 4.49 \quad (3.5)$$

Bu eşitlikte;

ΔAbs: Absorbanstaki değişimi

ΔT: Etkileşim süresini

V: Substrat çözeltisinin hacmini ifade etmektedir.

3.6. Mikrobiyal Kaynaktan PA Saflaştırılması, PA Çapraz Bağlı Katalitik Kriyojel Sentezi ve 6-APA üretimi

3.6.1. Mikrobiyal Kaynaktan PA Saflaştırılması

Penicillium chrysogenum 807 Amerika Birleşik Devletleri Tarımsal Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Poli(HEMA-co-MAAP kriyojel, metakroil amidoantipirin tutturulmuş 2-hidroksi etil metakrilat (HEMA) tabanlı süper makro gözenekli kriyojeller serbest radikal karyokopolimerizasyonu yöntemiyle sentezlenmiştir. Poli(HEMA-co-MAAP FPLC'de kolon materyali olarak kullanılmıştır. Hazırlanan ham ekstraktlar FPLC kolonuna verilmiştir. Desorpsiyon ajanı olarak 1 M NaOH kullanılmıştır. Desorpsiyon ajanı ile birlikte gelen pik toplanmış ve saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Bu saflaştırma işlemi (Akkuş 2012)' de verilmiştir.

3.6.2. Mikrobiyal Kaynaktan Saflaştırılmış PA Çapraz Bağlı Katalitik Kriyojel Sentezi

Mikrobiyal kaynaktan saflaştırılan PA'dan örnek alınarak 3.2.1.'de anlatılan PA çapraz bağlı katalitik kriyojel sentezlenmiştir. Bu amaçla 25 µM rutenyum bağlı metakroil amido tirozin ve 10 µg mikrobiyal kaynaktan saflaştırılan PA çözeltisi 2 saat süreyle azot atmosferi altında karıştırılmıştır. Bu süre içerisinde 1 mL deiyonize suda çözünmüş 56 mg MBAAM ve 740 µL deiyonize su ile karıştırılmış 260 µL HEMA monomeri hazırlanarak, monomer çapraz bağlayıcı karışımı oluşturmak üzere üç çözelti birleştirilmiştir. Polimerizasyonun başlaması için 1 mL su içerisinde çözünmüş 4 mg APS ve 5 µL TEMED alt ucu parafinle kapatılmış olan 5 mL'lik 0.8 cm çaplı enjektöre doldurulmuş monomer çapraz bağlayıcı karışımı eklenmiş ve önce 2 saat süreyle -12 °C'de daha sonra da 16 saat süreyle -20 °C'de dondurulmuştur. Reaksiyona girmeyen bileşenlerin uzaklaştırılması amacıyla hazırlanan kriyojel sırasıyla % 75' lik, % 50' lik ve % 25' lik 5 mL etanol çözeltisiyle daha sonra 10 mL deiyonize suyla yıkanmış ve kullanılıncaya kadar -20 °C de muhafaza edilmiştir.

3.7. Mikrobiyal Kaynaktan Saflaştırılan PA Çapraz Bağlı Katalitik Kriyojelin 6-APA Üretim Performansının Değerlendirilmesi

Mikrobiyal kaynaktan saflaştırılan PA kullanılarak hazırlanan katalitik kriyojelin 6-APA üretim performansı p-Dimetilaminobenzaldehit (PDAB) yöntemi ile belirlenmiştir (Balasingham ve ark. 1972). Bu prosedüre göre pH 7,2 50 mM fosfat tamponu kullanılarak 15 mM Pen G çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan katalitik kriyojel ile bu çözeltinin 10 mL'si kolonda 30 °C'de 1 saat devirdaim edilerek etkileştirilmiştir. Etkileşim sonrasında alınan 500 µL örnek üzerine, 3 mL sodyum asetat tamponu eklenip, reaksiyon durdurulmuştur. Oluşan 6-APA miktarına göre değişen sarı renk oluşumu gözlenmiştir. Örneklerin 415 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri okunarak hazırlanan 6-APA kalibrasyon grafiğinden üretilen 6-APA miktarları belirlenmiştir

3.7.1. 6-APA kalibrasyon grafiğinin hazırlanması

6-APA stok çözeltisi, pH 7,2 10 mM potasyum fosfat tamponunda 6-APA, 1 mgmL⁻¹ olacak şekilde hazırlanmıştır. % 0.5'lik PDAB çözeltisi deiyonize su kullanılarak hazırlanmıştır. 6-APA stok çözeltisinden 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 µL çözelti alınarak toplam hacim distile su ile 500 µL'ye tamamlanmıştır. Her bir tüpe 1,5 mL hazırlanan asetat tampon eklenmiştir. Daha sonra örneklerin üzerine 0,05 mL PDAB eklenerek 415 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçümleri yapılmıştır. İki setin değerlerinin ortalaması alınarak kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve eğrinin eğimi hesaplanmıştır. Elde edilen eğim değeri oluşan 6-APA'nın hesaplanmasında kullanılmıştır.

PA aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır;

$$\text{Aktivite} = \frac{A(415)}{\text{Eğim} \times \text{Enzim Hacmi (mL)}} \times \frac{1000 / \text{MA (6-APA)}}{\text{Reaksiyon Zaman ı (dk)}} \times \text{Reaksiyon Hacmi (3.6)}$$

Reaksiyon Süresi: 60 dakika

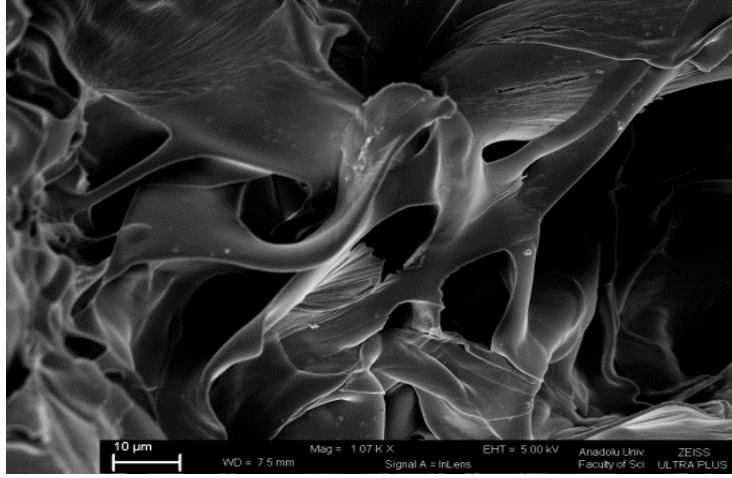
MA (6-APA): 216,3 gmol⁻¹

4. BULGULAR

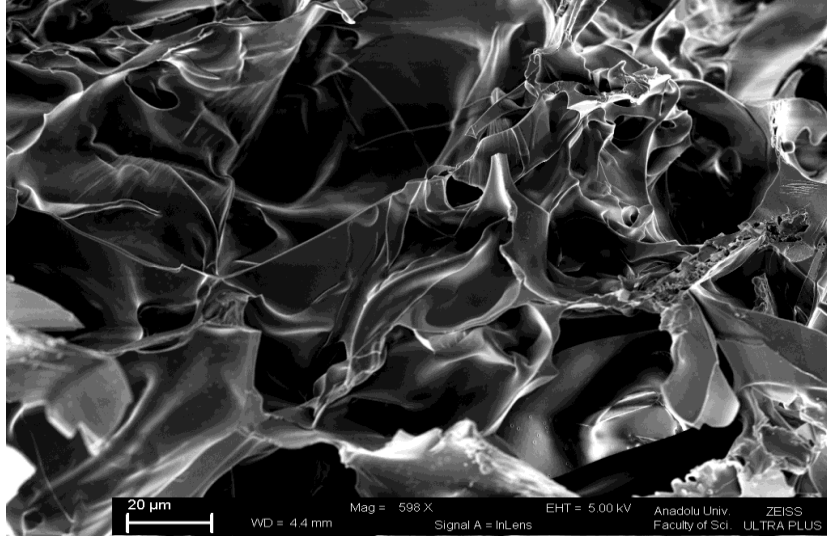
4.1. Penisilin Açılaz Çapraz Bağlı Katalitik Kriyojel Kolon Materyalinin ve poli(HEMA) Kriyojel Kolonun Karakterizasyonu

4.1.1. Yüzey morfolojisi

PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolon (Şekil 4.1) ve poli(HEMA) kriyojel kolon (Şekil 4.2) materyallerinin yüzey morfolojisi SEM kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.2’de görüldüğü gibi sentezlenen kriyojellerin gözenek boyutu enzim immobilizasyonuna imkan verecek kadar büyüktür ve heterojen bir gözenek dağılımına sahiptir. Şekilden de anlaşılacağı gibi PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolon materyalinin heterojenliği artmıştır. Geniş akış kanallarına ve süpermakro gözeneklere sahiptir. Kriyojeller, opak, süngerimsi ve elastiktir.



Şekil 4.1. Boş poli(HEMA) kriyojel kolonun SEM görüntüsü



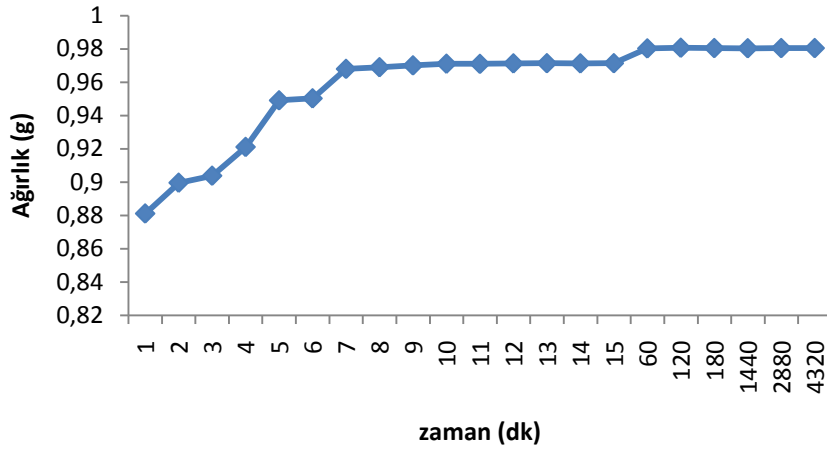
Şekil 4.2. PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolonun SEM görüntüsü

4.1.2. Yüzey alanı ölçümü

PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolon ve boş poli(HEMA) kriyojel kolon materyallerinin spesifik yüzey alanı BET yöntemiyle ölçülmüştür. PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolonun spesifik yüzey alanı $1455,446 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Ayrıca boş poli(HEMA) kriyojel kolon materyallerinin spesifik yüzey alanı $1790.913 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ bulunmuştur. Boş poli(HEMA) kriyojel kolona PA çapraz bağlandığı için yüzey alanı küçülmüştür.

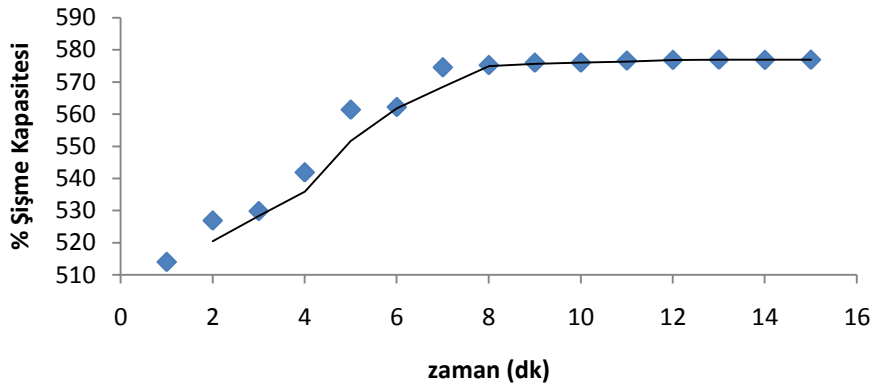
4.1.3. Şişme testi

PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolon polimerik yapıda, büyük gözenek boyutuna sahip, çapraz bağlı, hidrofilik bir matrikstir. Bu çalışmada çapraz bağlanan PA kriyojelin denge şişme oranı % 583,41 olarak bulunmuştur. Şişme testi çalışmasında 72 saat boyunca kriyojel örneği su dolu beherde tutulmuştur ve belli aralıklarla ağırlık ölçümü yapılmış ve % şişme oranı hesaplanmıştır. (Şekil4.3)



Şekil 4.3. 72 saat boyunca PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolonun su tutma kapasitesi grafiği

Şekil 4.3'te görüldüğü gibi zamanla PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolonun su tutma kapasitesi belli süreye kadar hızla artmıştır daha sonra sabite yakınlaşmıştır.

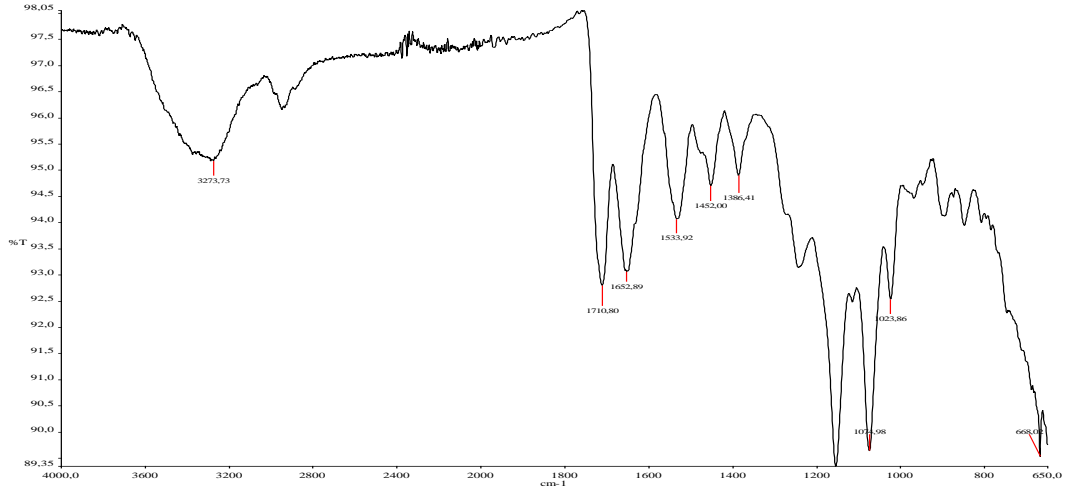


Şekil 4.4. % şişme kapasitesi grafiği

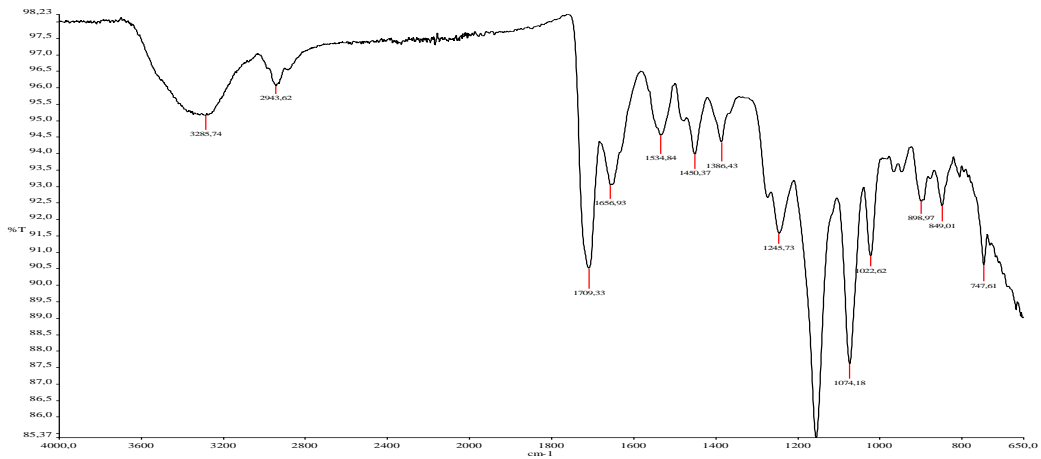
% Şişme kapasitesi hesaplanırken PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolonun su tutma kapasitesinden elde edilen veriler kullanılmıştır. Şekil 4.4.'te gösterildiği gibi 8. dakikaya kadar % şişme kapasitesini arttırdığı daha sonra % şişme kapasitesinin dengeye ulaştığı görülmüştür.

4.1.4. FTIR analizleri

Kriyojelin karakteristik pikleri olan 1656 cm^{-1} (karbonil bandı), 1600 cm^{-1} (N-H bandı eğilmesi; akrilamitteki karakteristik –CO-NH₂ grubuna ait pik), 3185 cm^{-1} (N-H gerilmesi), 1450 cm^{-1} (C-H eğilme bandı) pikler görülmektedir. (Şekil 4.5)



Şekil 4.5. Boş poli (HEMA)'nın FTIR spektrumu



Şekil 4.6. PA çapraz bağlı kriyojelin kolonun FTIR spektrumu

Kriyojelerin FTIR spektrumları ATR modunda alınmıştır. Elde edilen pikler Şekil 4.6'da görülmektedir. Poli(HEMA) kriyojellere ait olan spektrumda; 3400 cm^{-1} civarında geniş -OH titreşimleri, 3000 cm^{-1} 'de N-H bandı, 2400 cm^{-1} 'de C-H gerilmesine ait pik, 1700 cm^{-1} 'de C=O piki, 1190-1280 cm^{-1} 'de C-O pikleri görülmektedir. Şekilden de anlaşılacağı gibi 650-800 nm aralığında PA çapraz bağlı kriyojelin kolonun spektrumunda titreşim bandları görülmektedir. Bu sonuçlar, PA'nın poli(HEMA) kriyojellere başarıyla immobilize edildiğini göstermektedir.

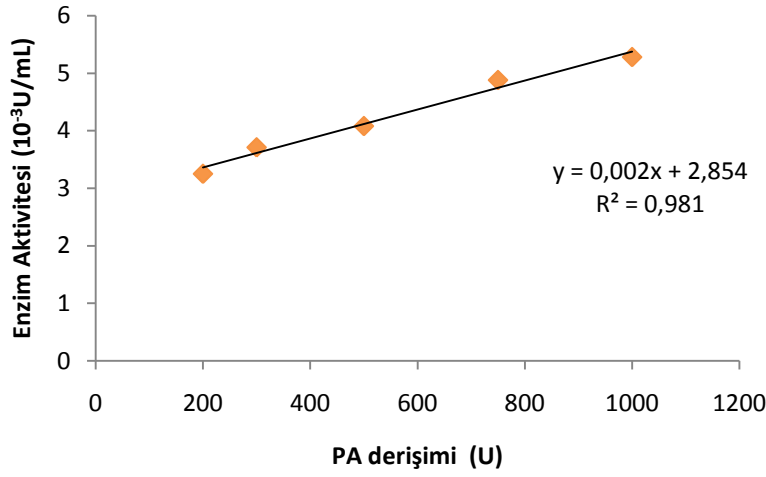
4.1.5. Sıkıştırma testi

1 gr kriyojelin su tutma kapasitesi hesaplanmıştır. 1 g kriyojel örneğinin 4,831 g su tuttuğu bulunmuştur. Kriyojeller hidrofilik karakterdedir. Reaksiyonlar sulu ortamlarda meydana geldiğinden su tutma kapasitesi önemlidir.

4.2. PA Çapraz Bağlı Kriyojelin ve Serbest PA'nın Aktivite İncelemeleri

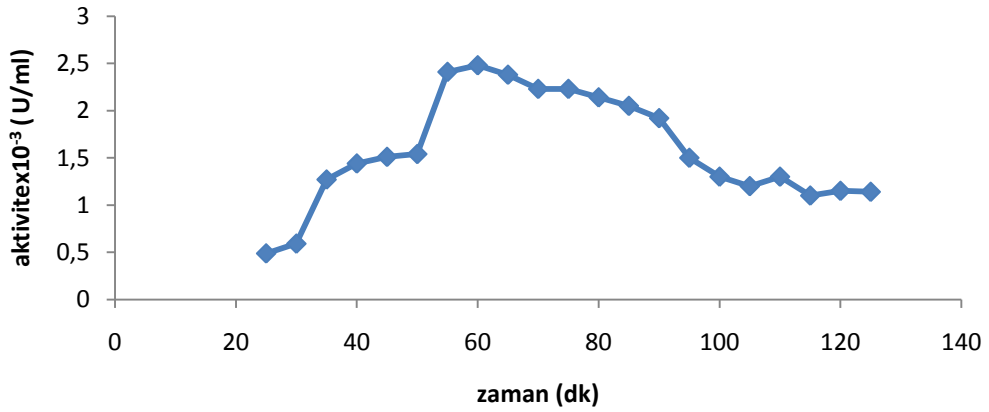
4.2.1. Penisilin Açilaz derişimi ile tepkime hızının değişimi

Aktiflik yani tepkime hızının PA derişimi ile doğrusal olarak değiştiği görülmüştür. Şekil 4.7'de en uygun 300 U PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolon sečilerek diğer çalışmalarda kullanılmıştır. 300 U PA enzimin az olmasına rağmen iyi aktivite göstermesinden ve PA'nın pahalı olmasından dolayı sečilmiřtir. PA Şekil 4.8'de 300 U PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolonun maksimum aktiviteyi gösterdiği zaman aralığını bulmak için 20-130 dk' ları arasında belli sürelerde aktivite ölçümleri yapılmıştır.



Şekil 4.7. Farklı PA derişimlerine karşı enzim aktivitesi grafiği

300 U PA apraz bağlı katalitik kriyojel kolonun maksimum aktiviteyi 60 dk.'da gösterdiği gözlenmiştir. Diğer çalışmalarda reaksiyon süresi 60 dk olarak belirlenmiş ve kullanılmıştır. (Şekil 4.8.)

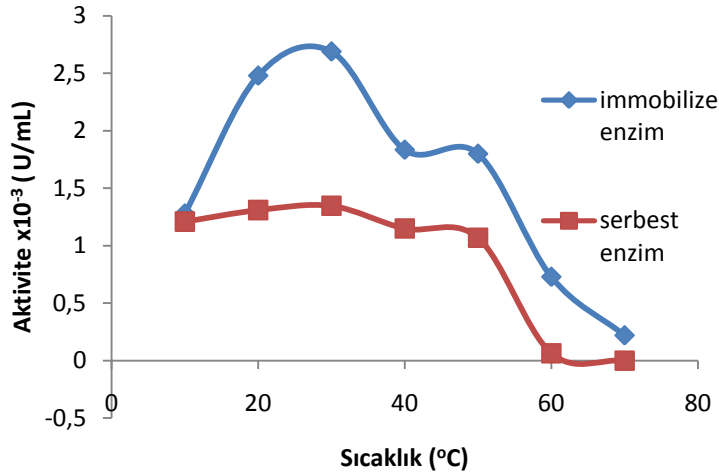


Şekil 4.8. 300 U PA apraz bağlı katalitik kriyojel kolon aktivitesinin zamanla değişim grafiği

4.2.2. Optimal reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi

PA çapraz bağlı kriyojelin ve serbest PA'nın aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla sıcaklığa karşı aktivite grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.9).

PA'nın optimal reaksiyon sıcaklığını belirlemek üzere; 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 °C'de standart aktivite testleri yapılmıştır. pH 7.2'de 10 mM fosfat tamponu içinde 250 µM NIPAB substrat olarak kullanılmış ve kriyojel kolonda bulunan PA ile hazırlanan çözelti yukarıdaki sıcaklık değerlerinde 60 dk boyunca etkileştirilmiştir. Sonuçta ürün olarak oluşan 6-nitro-3-aminobenzoik asit miktarındaki zamana bağlı değişimin 405 nm'de spektrofotometrik olarak tayiniyle PA aktivitesi hesaplanmıştır. Standart aktivite testi yapılarak, optimal sıcaklık değeri belirlenmiştir. Belirlenen optimal reaksiyon sıcaklığı 30 °C, bundan sonra yapılan tüm aktivite testlerinde kullanılmıştır.



Şekil 4.9. PA çapraz bağlı kriyojelin ve serbest PA'nın enzim aktivitesinin sıcaklık ile değişimi grafiği

Şekil 4.9 daki grafikte görüldüğü gibi çapraz bağlı PA'nın aktivitesi farklı sıcaklık değerlerinde daha yüksek çıkmıştır. İmmobilizasyon işlemi ile enzim sıcaklığa daha dayanıklı hale getirildiği görülmüştür. Optimal sıcaklıktaki enzim aktivitesindeki artış, çapraz bağlı enzim moleküllerinin konformasyonel

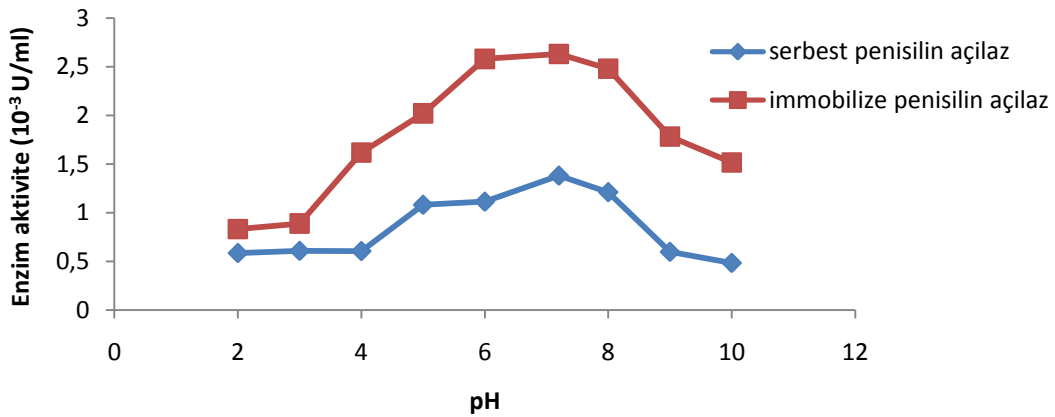
esnekliğinin azalması ve dolayısıyla enzim molekülünün görevini yapıp substrata bağlanmak için uygun bir konformasyona gelmesi ve yeniden düzenlenmesi için daha yüksek bir sıcaklık gerektirmesinden dolayıdır. Enzim katalitik aktifliğini gösterebilmek için daha büyük aktifleşme enerjisine sahip olmalıdır (Arıcı 1998).

4.2.3. Optimal pH'ın belirlenmesi

PA çapraz bağlı kriyojelin ve serbest PA'nın aktivitesi üzerine pH'ın etkisini incelemek amacıyla 300 U PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kullanılmıştır ve 30 °C de 1 saat etkileştirilmiştir. Bu işlem sonucunda oluşan 6-APA'nın spektrofotometrik ölçümleri kaydedilmiş ve bu değerlerden hesaplanan % bağlı aktiflik değerleri pH' a karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.10)

Penisilin açılazın optimal reaksiyon pH'ını belirlemek üzere yapılan çalışmada pH'ları 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 olan tamponu içinde 250 µM NIPAB substrat olarak kullanılmış ve kriyojel kolonda bulunan penisilin açılaz ile etkileştirilmiştir. Sonuçta ürün olarak oluşan 6-nitro-3-aminobenzoik asit miktarındaki zamana bağlı değişimin 405 nm' de spektrofotometrik olarak tayiniyle penisilin açılaz aktivitesi hesaplanmıştır.

Serbest enzim ve PA çapraz bağlı kriyojel maksimum aktiviteyi pH 7.2 göstermiştir. Bundan sonra yapılan tüm aktivite testlerinde pH 7.2 kullanılmıştır.



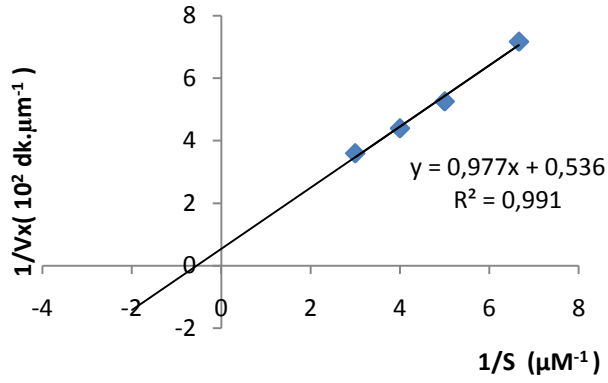
Şekil 4.10. PA çapraz bağlı kriyojelin ve serbest PA için enzim aktivitesinin pH ile değişimi grafiği

Çapraz bağlı enzimlerin pH aralığının serbest enzimden daha geniş olması immobilizasyonun enzim aktivitesini daha geniş pH alanında koruduğunun ve immobilize enzimlerin daha yüksek pH'da bile aktif olduğunun bir göstergesidir. Enzimler, elektrolit karakterli olduklarından, enzim aktifliği pH ile değişme gösterir (Michael 1980). Enzim, substrat ve koenzim moleküllerinde asidik ve bazik grupların varlığı pH değişimi ile enzim-substrat (ES) kompleksinin kararlılığını etkiler. Kararlı ES kompleksi oluştuğunda tepkime hızı maksimumdur. Böylece enzimler için tepkime hızının maksimum olduğu optimal pH değerleri belirlenir. Genellikle PA enzimlerin optimal pH değerleri 3-10 arasındadır. Çok asidik veya çok bazik ortamlarda enzimler denatüre olacağından reaksiyon hızı tersinmez olarak azalır ve sıfıra kadar düşebilir (Adhami 2002).

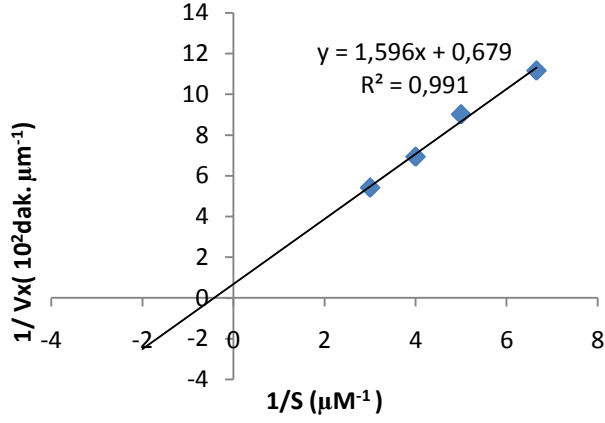
İmmobilize enzimlerin pH aralığının serbest enzimden daha geniş olması immobilizasyonun enzim aktivitesini daha geniş pH alanında koruduğunun ve immobilize enzimlerin daha yüksek pH'da bile aktif olduğunun bir göstergesidir (Arıca 1998).

4.2.4. Enzim aktifliğine substrat derişiminin etkisi

PA çapraz bağlı kriyojelin ve serbest PA'nın aktifliğine substrat derişiminin etkisinin incelenmesi için deneyler yapılmıştır. Eşitliğinin düzenlenmesi ile Lineweaver-Burk Eşitliği elde edilmiştir.(Şekil 4.11) ve (Şekil 4.12) Bu eşitliğe göre; $1/V$, $1/[S]$ 'e karşı grafiğe geçirildiğinde yeni bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğiminden K_m/V_{mak} değeri ve y-eksenini kestiği noktadan ise $1/V_{mak}$ değeri hesaplanmıştır. (Çizelge 4.1)



Şekil 4.11. PA çapraz bağlı kriyojel için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.12. Serbest PA enziminin Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.1. PA nın Km ve Vmax değerleri

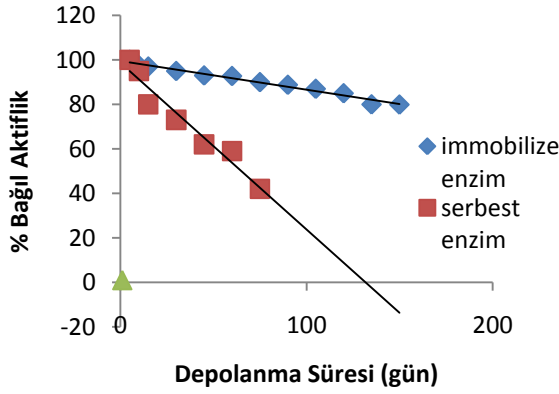
enzim	Km (μM)	Vmak ($\mu\text{M.dak}^{-1}$)
İmmobilize PA	$10,376 \times 10^{-3}$	$10,61 \times 10^{-3}$
Serbest PA	$4,25 \times 10^{-3}$	$6,78 \times 10^{-3}$

Genellikle immobilize enzimlerin kinetik sabitleri, difüzyon sınırlamaları, sterik etkiler ve iyonik güç nedeniyle serbest enziminkilerden farklılık gösterirler. Bunun yanında immobilize olan enzimin yapısındaki

değişiklikler ve substratın immobilize enzimin aktif bölgelerine daha zor ulaşabilmesi de bu farklılığa neden olmaktadır (Arıca 1994). Km sabiti enzimin substrata olan ilgisinin bir ölçüsüdür. Deney sonuçlarında enzim immobilize edildiğinde Km değerinin arttığı yani enzimin substrata olan ilgisinin azaldığı görülmektedir.

4.2.5. Serbest ve çapraz bağlı PA kriyojel kolonun depolama kararlılığı

Enzimin çapraz bağlanmasındaki en önemli parametrelerden biri de immobilize enzimin depolama kararlılığıdır. Serbest ve çapraz bağlı PA, sodyum azid çözeltisi içinde, -20 °C de depolanarak kararlılıkları belirlenmiştir. Depolama kararlılıklarının, depolama süresi ile değişimi Şekil 4.13'te gösterilmiştir.

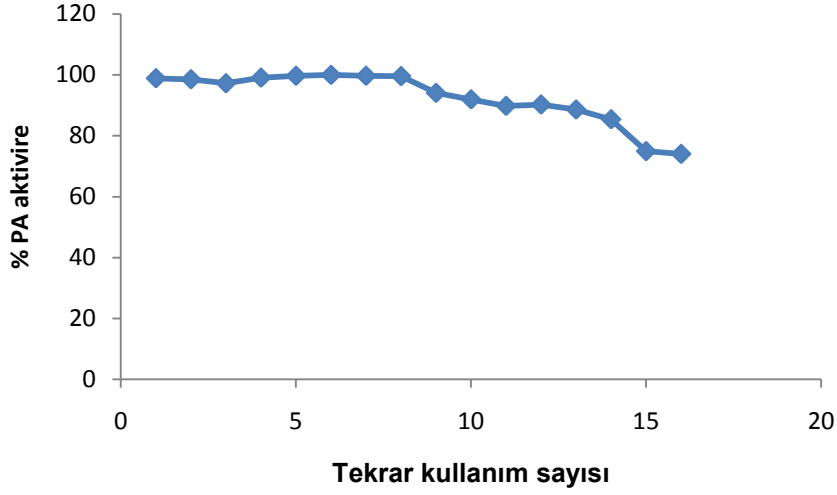


Şekil 4. 13. Serbest ve çapraz bağlı PA kriyojelin % bağlı aktifliklerinin depolama süresi ile değişimi

Serbest enzimle yapılan 90 günlük çalışma sonunda serbest enzimin başlangıç aktivitesinin % 42 sini koruduğu gözlenmiştir. PA çapraz bağlı kriyojel kolonun ise 150 günün sonunda aktivitesinin % 80' nini koruduğu gözlenmiştir. Aynı depolama şartları altında, PA çapraz bağlı kriyojel kolonun serbest PA'dan çok daha yavaş aktivitesini kaybettiği gözlenmiştir. Bu da immobilizasyonun enzimi daha kararlı hale getirdiğini gösterir.

4.2.6. PA apraz bağlı kriyojel kolonunun tekrar kullanım sayıları

Enzimlerin apraz bağlanması en önemli parametrelerden biri de tekrar kullanım sayısıdır (Şekil 4.14). Serbest enzim sadece bir kez kullanılabilir ancak PA apraz bağlı kriyojel kolon defalarca kullanılabilir.



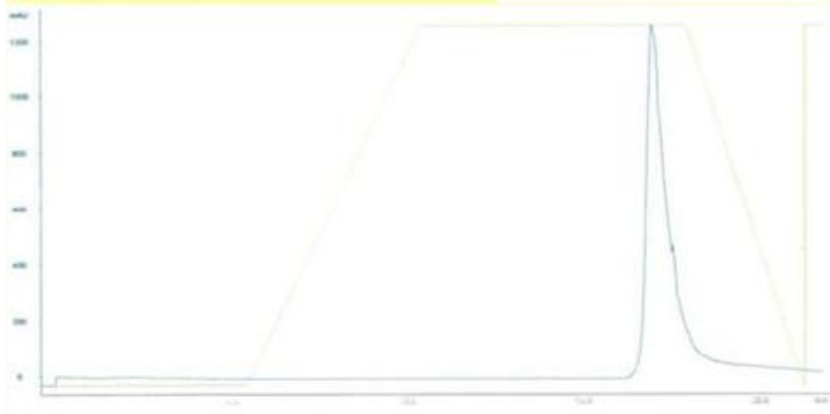
Şekil 4.14. PA apraz bağlı katalitik kriyojel kolonun yzde bağlı aktifliklerinin tekrar kullanım sayıları ile değişimi

PA apraz bağlı kriyojel kolonun 16 defa tekrar kullanımını sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık %26'sını kaybetmiştir. Tekrar kullanım sayısının fazla olması 6-APA üretim maliyetini azaltacak önemli bir parametredir.

4.3. Mikrobiyal Kaynaktan PA Saflaştırılması, PA Çapraz Bağlı Katalitik Kriyojel Sentezi ve 6-APA üretimi

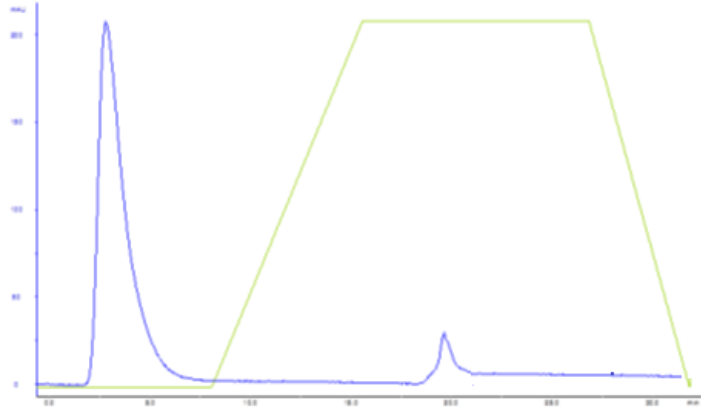
4.3.1. Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel kolonu ile ham ekstrattan PA eldesi

Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel FPLC’de kolon materyali olarak kullanılmıştır. Hazırlanan ham ekstraktlar FPLC kolonuna verilmiştir. Desorpsiyon ajanı olarak kullanılan 1 M NaOH ile birlikte gelen pik toplanmış ve saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan çözeltide bulunan protein derişimi Bradford metoduyla (Bradford 1976) spektrofotometrik olarak tayin edilerek poli(HEMA-co-MAAP) kriyojeline adsorplanan enzim miktarı bulunmuştur. FPLC’de gözlenen pikler Şekil 4.15 ve Şekil 4.16’de görülmektedir. Şekilden görüldüğü gibi ham ekstrakta bulunan ve pseudospesifik poli(HEMA-co-MAAP) kriyojeline afinite gösteren PA desorpsiyon ajanı ile birlikte gelmiştir.



Şekil 4.15. Ticari PA’ nın sulu çözeltisine ait FPLC kromatogramı

A: 0.1 M NaCl; B: 1 M NaOH T: 25 °C ; Akış hızı: 1mL dk⁻¹; Adsorpsiyon süresi: 1 saat



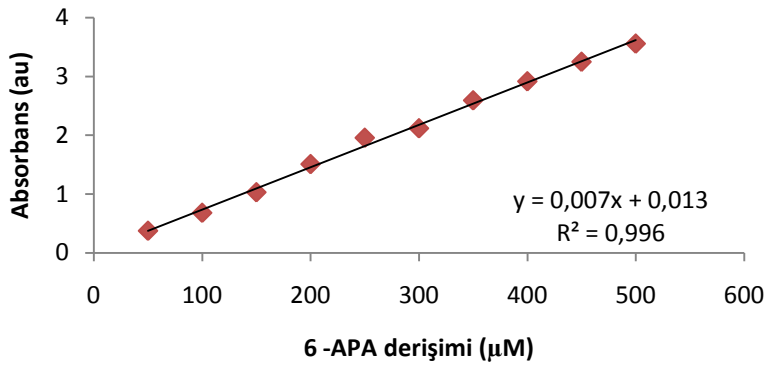
Şekil 4.16. Mikrobiyal kaynaktan elde edilen PA'a ait FPLC kromatogramı

A: 0.1 M NaCl; B: 1 M NaOH T: 25 °C ; Akış hızı: 1mLdk⁻¹; Adsorpsiyon süresi: 1 saat

Mikrobiyal kaynaktan saflaştırılan PA, katalitik kolon sentezinde kullanılmıştır ve 6-APA sentezi gerçekleştirilmiştir.

4.3.2. Mikrobiyal Kaynaktan Saflaştırılan PA ile Çapraz Bağlı Katalitik Kriyojel Sentezi ve 6-APA üretimi

Ticari olarak bulunan 6-APA belli derişimlerde alınarak, o derişimlerdeki aktivitesi ölçülmüştür ve kalibrasyon grafiği çizilmiştir. PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolon ve mikrobiyal kaynaktan saflaştırılan PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolonlardan elde edilen 6-APA miktarı aşağıda verilen (Şekil 4.17) grafik yardımıyla hesaplanmıştır.



Şekil 4.17. 6 APA'nın kalibrasyon grafiğ

PA apraz bağlı katalitik kriyojel kolonun absorbands değeri 0,475 au olarak bulunmuştur. Sonuç olarak; 6-APA miktarı 66 µgdır. Ham ekstrattan saflaştırılan *Penicillium chrysogenum* 807 ile hazırlanan katalitik kriyojel kolonun. 6-APA miktarı kalibrasyon eğrisi yardımıyla ölçülen absorbandsa göre hesaplanmıştır. Absorbans değeri 0,236 au ve 6-APA miktarda 31,85 µg olarak bulunmuştur.

5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada ilk aşamada; serbest PA enzimi, makro gözenekli, süngerimsi kriyojelin içine çapraz bağlanma yoluyla immobilize edilmiştir. Serbest PA ve PA çapraz bağlı kriyojel kolon için optimal pH değeri 7.2 olarak belirlenmiştir. PA çapraz bağlı katalitik kriyojel kolonu geniş pH aralığında (pH 2-10) yüksek aktivite gösterdiği saptanmıştır. Kutzbach ve ark yaptıkları çalışmada immobilize PA'nın 4-10 arasında ve max aktiviteyi pH 8'de bulmuşlardır (Kutzbach ve ark, 1973). ANADOLUCA metodu ile sentezlenen PA çapraz bağlı kriyojel kolon çalışmasında optimal pH 7.2 bulunduğundan, bu metot daha nötral ortamlarda çalışma olanağı sunmuştur. Ayrıca serbest PA ve PA çapraz bağlı kriyojel kolon için optimal sıcaklık 30 °C' de gözlenmiştir Kriyojel kolona çapraz bağlı PA'nın yüksek ve düşük sıcaklık koşullarında serbest PA ya göre daha yüksek aktivite göstermiştir ve 10-70 °C arasında geniş sıcaklık aralığında çalışabilmektedir.

Serbest PA için Km sabiti ve Vmak değeri sırasıyla, $4,25 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ ve $6,78 \times 10^{-3} \mu\text{M.dak}^{-1}$ olarak bulunmuştur. PA çapraz bağlı kriyojel kolon için ise, Km ve Vmak değerleri sırasıyla $10,376 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ ve $10,61 \times 10^{-3} \mu\text{M.dak}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

Serbest ve çapraz bağlı PA kriyojel kolon, sodyum azid çözeltisi içinde, -20 °C de depolanarak kararlılıkları belirlenmiştir. Serbest enzimle yapılan 90 günlük çalışma sonunda serbest enzimin başlangıç aktivitesinin % 42'sini koruduğu gözlenmiştir. Çapraz bağlı PA kriyojel kolonun 150 günün sonunda aktivitesinin % 80'nini koruduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar immobilizasyonun enzimi daha kararlı hale getirdiğini göstermektedir.

PA çapraz bağlı kriyojel kolon 16 tekrar kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık olarak sadece % 26'sını kaybetmiştir.

Mikrobiyal Kaynaktan saflaştırılan *Penicillium chrysogenum* 807 ANADOLUCA metodu ile çapraz bağlı kriyojel kolon sentezlenmiştir. Optimal şartlar altında 60 dakikada 5 ml hacmindeki kolondan elde edilen 6-APA miktarı

hesaplanmıştır Absorbans değeri 0,236 au olarak bulunmuştur. 31,85 µg 6-APA üretim performansı göstermiştir.

Sentezlenen kriyojeller SEM ile incelenmiş ve Şekil 4.2’de görüldüğü gibi gözenek boyutu büyük, heterojen dağılıma sahip kriyojeller elde edilmiştir.

Kriyojelin spesifik yüzey alanı BET yöntemiyle 1455,446 m²g⁻¹ olarak bulunmuştur. Suyu uçurulan kriyojel parçası suya daldırıldığında 1-2 saniye içerisinde orijinal boyut ve şekline tekrar dönebilmektedir. Sentezlenen kriyojellerin denge şişme oranı % 583,41 olarak bulunmuştur. 1 gr örneğin su tutma kapasitesi ise 4,831 gr olarak hesaplanmıştır.

PA enzimini kriyojelle tutturmak için ANADOLUCA yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin yüksek aktivite göstermesi, geniş pH ve sıcaklık aralığında çalışılması, enzim immobilizasyon sektöründe alternatif yöntem olacağını göstermektedir. Chen ve ark.’larının yaptığı çalışmada PGA’yı metal afinite membranına immobilize etmişlerdir. En iyi aktiviteyi pH 8 ve 50 °C de gözlemlemişlerdir. Km ve V_{max} değerleri sırasıyla 16.83 mM 9.62 U/mg-protein bulunmuştur (Chen ve ark. 1995). Ferreira ve ark.’ları penisilin amidaz’ın düşük pH değerlerinde aktivite ve stabilitesi incelemiş ve titrasyon metodu ile aktivite çalışması yapmışlardır. pH4.5-5 arasında verim almışlardır (Ferreira ve ark. 2003). Zhao ve ark.’ları makro gözenekli silika kürelere PA’yı immobilize etmişlerdir. Enzim aktivite ölçümleri PGA silika kürelerle birlikte packed-bed reaktör yerleştirilmiştir. Bulunma zamanları, başlangıç substrat miktarı ile ana ürün olan 6 APA birikmesi ve PGA’nın yüklenen enzim miktarını araştırmışlardır. Enzim yükleme miktarları makropor içindeki miktarları arttığını ve iç kütle direnci azaldığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak enzim yükleme miktarını 895 mg⁻¹ kuru destekte ve enzim aktivitesinin 1033 U_g⁻¹ olduğunu bulmuşlar (Zhao ve ark 2010). Chong ve ark.’ları büyük gözenekli meteryallere PGA’yı immobilize etmişler. Bu çalışmalarda Vinil fonksiyonlu SBA-15 silica kullanılmıştır. Başlangıç aktivitesi yüksek çıktığı halde Km değeri düşük çıkmıştır. PGA vinil gruplarla hidrofobik etkileşimlerle tutturulmuştur. Gözenekli taşıyıcılarıyla yüksek spesifik alan ve büyük hacimli gözenekler enzim immobilizasyonda umut vericidir. Ek olarak desteklerin genel avantajları gözenekler substrat ve ürünlerin yüklenmelerine ve taşınmalarına izin vermektedir (Chong ve ark 2004)

Tischer çalışmasında kriyojel kolona çapraz bağlanma ile PA tutturulmuştur. Kriyojel kolonun gözenek boyutlarının büyük olmasından yararlanılmıştır. (Tischer 1999)

Elde edilen sonuçlardan grldği gibi ANADOLUCA metodu ile PA apraz bağlı kriyojel kolonun literatür de rapor edilen sonuçlarla kıyaslanabilecek aktivite ve kararlılık değerlerine sahip olduğu gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Acar, S.(2006), '*Peptid protein kovalent konjugasyonu*', Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- Adhami A.J.H. Al-, J. Bryjak, B. Greb-Markiewicz, W.Peczyn'ska-Czoch, (2002) *Process Biochem.*,**37**, 1387.
- Alvaro G., Fernande Z., Lafuente R, Blance R. Guisan J, (1989) '*Immobilization-Stabilization of Penicillin G Acylase E. Coli*' Spain
- Akkuş B.(2012), '*Penisilin G Açılaz Saflaştırılması için Yeni Destek Materyali*'*Yüksek Lisans Tezi*', Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir
- Aksoy, C. (2003), "*Lipaz ve Üreaz Enzimlerinin Çeşitli Tasiyıcılara İmmobilizasyonu*", Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul 26-28.
- Anon. (1992) '*Genetically Engineered and Immobilized*', (Technomarket Survey Report on Enzymes) New Delhi: TIFAC, DST. pp. 125–47
- Anupama P, Kumarb H, . Marwahac S,. Kennedyd J 18 (2000), '*Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA)*' *Biotechnology Advances* 289–301
- Ardvisson, P., Plieva, F., Lozinsky, V., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. (2003) , '*Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent*', *Journal of Chromatography A.* 986 275–290.

Arıca, Y. M. and Hasırcı, V. N. (1987), “*Immobilization for the production of membranes*”, *Biomaterials*, 8: 489-495 60:507-514

Arıca Y. M.; Senel Ş ; Alaeddinoglu N.G ; Patır S ve Denizli A. ,(1994).
‘*Biomaterials*’ *J. Appl. Polym. Sci.* 8, 489.

Arroyo, M., Mata, I., Acebal, C., Castillon, M.P (2003),. ‘*Biotechnological applications of penicilin acylases: state of the art*’. *Appl Microiol Biotechnol.*

Arvidsson P, Plieva F.M, Lozinsky VI, Galaev IY, Mattiasson B. (1985),
“*Application of biocatalyst immobilized by polymer methods*” *Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous*’ Atsuo, T., *Enzyme Engineering*, Plenum Press, New York, 201-203.

Balasingham K, Warburton D, Dunnill P, Lilly MD.(1972) ‘*The isolation and kinetics of penicillin amidase from Escherichia coli*’. *Biochim Biophys Acta* ;276:250–6).

Beatriz M. Brena and Francisco Batista-Viera (2006) ‘*Immobilization of Enzymes*’ A Literature Survey

BernhnardS. (1968), ‘*The Structure and Function of Enzyme*’, W.A. Benjamin Inc., New York

Bickerstaff, G.F., (1997) ‘*Immobilization of Enzymes and Cells*’, Humana Pres, New Jersey

Bölgen N. (2008), ‘*Hema-Laktat-Dekstran Kriyojellerinin Üretimi ve Doku Mühendisliğinde Uygulamaları*’ doktora tezi. Hacettepe Üniversitesi .Fen Bilimleri Enstitüsü

- Buchholz, K. and Klein, J. (1987), '*Characterization of Immobilized Biocatalysts*'
In *Methods in Enzymology* volume 135, pp. 330 (Mosbach, K., ed.),
Academic Press, London.
- Cabral, J.M.S. and Kennedy, J. F (1991) '*Covalent and coordination
immobilization of proteins. In: Protein immobilization*'. *Fundamentals
and Applications*' (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, New York, NY,
pp. 73–138. California, (1975).
- Carr, P. W. and Bowers, L. D.(1980), '*Support considerations in chemical
analysis*', *Enzymes*, Academic Press, New York .56: 167-170.
- Carl K and Rauenbnsch E (1973), '*Preparation and General Properties of
Crystalline Penicillin Acylase from Escherichia coli ATCC 11105*'
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 354, S. 45-53
- Cesar M, Jose M. Palomo, Gloria Fernandez-Lorente, Jose M. Guisan, Roberto
Fernandez-Lafuente (2007) '*Improvement of enzyme activity, stability
and selectivity via immobilization techniques*' DOI: 10.1016/j.enzmictec.
01.018
- Chasin, M., Langer, R., (Eds.), (1990), '*Biodegradable Polymers as Drug
Delivery Systems*', Marcel Dekker, New York.
- Chih-I Chena, Yi-Miao Kob, Chwen-Jen Shiehc, Yung-Chuan Liub (2011),
'*Direct penicillin G acylase immobilization by using the self-prepared
immobilized metal affinity membrane*' 380 34– 40
- Chong, X.S. Zhao A.S. Maria (2004), '*Design of large-pore mesoporous
materials for immobilization of penicillin G acylase biocatalyst*'
Singapore

Chen J, Jo S, Park K. (1995), '*Polysaccharide hydrogels for protein drug delivery*'. Carboh Polym28:69-76

Chisti Y, Moo-Young M. (1986), '*Disruption of microbial cells for intracellular products*'. Enzyme' Microb Technol. 8:194–204

Chisti Y, Moo-Young M. (1991), '*Fermentation technology, bioprocessing, scale-up and manufacture*'. In Moses V, Cape RE, editors. Biotechnology: The Science and the Business. New York, Harwood Academic Publishers. pp. 167–209

Chou CP, Kuo B-Y, Lin W-J (1999), '*Optimization of the host/vector system and culture conditions for production of penicillin acylase in Escherichia coli*'. J Biosci Bioen. 88:160–167

D'Souza, S. F. and Godbole, S. S. (2002), '*Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine*', J. Biochem. Bioph. Meth. 52: 59-62

Dumitriu, S., Popa, M. and Dumitriu, M. (1988), '*Polymeric biomaterials as enzyme and drug carriers*', J. Bioact. Compat. Pol. 3: 243-312

E.S. John(1985), '*Biotechnology Principle*' I., Van Nostran Reinhold Co. Ltd., U.K., 18:1465–1473

Ferreira, J.S., Straathof, J.J., Franco, T.T., Wielen L.A.M. (2004), '*Activity and stability of immobilized penicillin amidase at low pH values*'. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. genes. Nucleic Acids Res27; 29-35.

Gözükara, E.M., Biyokimya, (2000), '*Peptit protein kovalent konjugasyonu*' Dördüncü Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul,

Gupta, M. and Mattiasson, B. (1992), '*Unique applications of immobilized proteins in bioanalytical systems*'. In: *Methods of Biochemical Analysis*, volume 36, (Suelter, C.H., ed.), Wiley, New York, NY. pp. 1–34

Harpe H. (1975), '*Enzyme Review of Physiological Chemistry*', los Atlos 15th. Edition, California

Hartmeier, W. (1988), '*Immobilized Biocatalysts*', Springer-Verlag, Berlin.

Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A., (2006), '*Industrial applications of microbial lipases*', *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 235-251.

Hedström M Plieva F.. Galaev Y. Mattiasson B. (2008), '*Monolithic macroporous albumin/chitosan cryogel structure: a new matrix for enzyme immobilization*', *Anal Bioanal Chem* 390:907–912

Hewitt L, Kasche V, Lummer K, Lewis RJ, Murshudov GN, Verma CS, Dodson GG, Wilson KS (2000), '*Structure of a slow processing precursor penicillin acylase from Escherichia coli reveals the linker peptide blocking the active-site cleft.*' *J Mol Biol* 302:887–898

Hughes, P., Lowe, C.R., Sherwood, R.F. (1982). '*Metal-ion promoted binding of triazine dyes to proteins: the interaction of Cibacron Blue F3GA with yeast hexokinase*'. *Biochem. J.*, 205, 453-460.

Inouye G.F M (1990), '*Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the Escherichia coligenes*'. *Nucleic Acids Res* 18:1465–1473

İnam, R., Çaykara, T. and Özyürek, C.,(2001), “*Polarographic determination of uranyl ion adsorption on poly(2-hydroxyethyl methacrylate-itaconic acid) hydrogels*”, Sep Sci Technol. 36(7): 1451-1461

Jungbauer A, Hahn R. (2004), ‘*Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their applications in biotechnology.*’J. Sep. Sci.;27:767-778.

Kaetsu, M. Kamura and M. Yoshida, (1979), ‘*Biotechnology*’. Bioeng.,21, 847

Karadag, H., (2001), “*Soya Fasulyesi Lipoksijenazının Poliakrilamid Jel Üzerine İmmobilizasyonu*“, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 26-28

Kasche, V., Loffer, F., Scholzen, T., Kramer, D.M., Boller, T.J, (1990), “*Rapid protein purification using phenylbutylamine-Eupergit; a novel method for largescale procedures*”Journal of Chromatography. ., 510, 149-154

Kharrata N, Ben Ali a, Marzouk S, Youssef-Talel G, Karra-Chaabouni M (2011), ‘*Immobilization of Rhizopus oryzae lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme*’ Process Biochemistry 46 (2011) 1083–1089

Keha, E. ve Küfrevioğlu, İ.,(2000), ‘*Biyokimya*’, Aktif Yayınevi,Erzurum.

Keçili, R., Say, R. ve Yavuz, H.,(2006) “*Synthesis and characterization of pseudoaffinity ligand for penicillin acylase purification*” *Int. J.Biol.Macromol.*,**39**, 250-255,

Keçili, R., Say, R., Ersöz, A., Yavuz, H., Denizli, A., (2007) “*Purification of penicillin acylase through a monolith column containing methacryloyl antipyrine*” *Separation and Purification Technology*, **55**, 1-7,

Kokufuta, E., Jinbo, E., (1992), '*Hydrogel capable of facilitating polymer diffusion through the gel porosity and its application in enzyme immobilization*', *Macromolecules*. 25, 3549–3552

Koshland, D. E. (1958), '*Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis*' *Proc. Natl. Acad. Sci.*44 (2):98-104

Kudela, V.,(1987),'*Hydrogels. In: Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*', J. Wiley & Sons, New York., 7, 783p

Kumar A, Srivastava A. (2010),'*Cell separation using cryogel-based affinity chromatography*'. *Nat. Protoc.* 5:1737-1747

Kutzbach C, Rauenbnsch R (1973), '*Preparation and General Properties of Crystalline Penicillin Acylase from Escherichia coli ATCC 11105*' *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*Bd. 354, S. 45-53, Januar 1974

Lehninger A.L. (1982). '*Enzymes Principles of Biochemistry*', Worth Publishers Inc, New York,

Lineweaver, H., Burk, D. (1934)., "*The determination of enzyme dissociation constant*" *J.Am.Chem. Soc.*, 56: 658-662

Lozinsky V. I., Galaev I.Y ., Plieva F.M., Savina I.S., Jungvid H and Mattiasson B. (2003) '*Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest*' *Trents in Biotechnology* Vol.21 No.10

Mahajan, B.P (1984). '*Penicillin acylases: a review*'. *Biochemistry and Biotechnology*. 9:

Maria Chong A.S., X.S. Zhao, (2004) '*Design of large-pore mesoporous materials for immobilization of penicillin G acylase biocatalyst.*' 93–95-293–299

Mateo C ., Palomo J, Fernandez-Lorente G, Guisan , J Fernandez-Lafuente R , (2007) '*Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques*', Enzyme and Microbial Technology 40 1451–1463

Matsumoto K. (1993). '*Production of 6-APA, 7-ACA and 7-ADCA by immobilized penicillin and cephalosporin amidases*'. In: Tanaka A, Tosa T, Kobayashi T, editors. Industrial Applications of Immobilized Biocatalysts. New York: Dekker. pp. 67–88

Mattiasson, B. and Kaul, R. ,(1991), '*Determination of coupling yields and handling of labile proteins in immobilization technology*'. In: *Protein immobilization. Fundamentals and Applications* (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, New York, NY.) pp. 161–179

McVey, C.E., Walsh, M.A., Dodson, G.G., Wilson, K.S., Brannigan, J.A., (2001) "*Crystal Structures of Penicillin Acylase Enzyme-substrate Complexes: Structural Insights into the Catalytic Mechanism*" *JMB.*, **313**, 139-150.

Michael D.T. (1980), '*Immobilized Enzyme*', John Wiley and Sons', New York.

Mosbach, K., (1976) "*Methods in enzymology*", Enzymology, Academic Press, New York. p:44-49

Njayou, M., Quash, G., (1991), '*Purification of measles virus by affinity chromatography and by ultracentrifugation: a comparative study*', Journal of Virological Methods. 32, 67–77

Okubo, M., Ahmad, H., (1984) “*Adsorption of enzymes on to submicron-sized temperature-sensitive composite polymer particles and its activity*” *Phys Affinity chromatography methods enzimol* 104, 3-56

Özer N. (2000). *Biyokimya 1 ders kitabı*, Palme Yayıncılık, Ankara,

Öztan D (2007) ‘*Tirosinaz Enziminin Ekstraksiyonunu, Saflaştırılması ve Fenollerin Gideriminde Kullanımı*’. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara

Pfeiffer, J. (1954) ‘*Enzymes, the Physics and Chemistry of Life*’, pg 171-173, Simon and Schuster, NY

P.W. Carr, L.D. Bowers, (1980) , ‘*Support Considerations in Chemical Analysis*’, Academic Press, New York

Parmar, A., Kumar, H., Marwaha, S.S., Kennedy, J.F.(2000) ‘*Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA)*’. *Biotechnology Advances*. 18: 289-301

Peppas NA, Huang Y, Torres-Lugo M, Ward JH, Zhang J. (2000); ‘*Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology*’. *Annu Rev Biomed Eng*. 2:9-29

Pitcher W.H. Jr. Ford, (1978) ‘*Immobilized lactase for whey hydrolysis; stability and operating strategy*’, *Enzyme Engineering*’, Ed. by Brown, G. B., Ganecke, Wingard, L. B., Jr., Plenum Press, New York.

Plieva FM, Karlsson M, Aguilar MR, Gomez D, Mikhalovsky S, Galaev IY. (2005), ‘*Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels*’. *Soft Matter*. 1:303-309

Plieva FM, Savina IN, Deraz S, Andersson J, Galaev IY, Mattiasson B. (2004), ' *Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles*'. J. Chrom B. 807:129-137

Polderman-Tijmes, J.J. (2004) '*Biochemical Characterization of α -Amino Acid Ester Hydrolases*', Doktora Tezi, Rijksuniversiteit Groningen, Hollanda

Rajendhran, J., Gunasekaran, P.Recent, (2004) '*Biotechnological interventions for developing improved penicilin G acylases*'. Journal of Bioscience and Bioengineering. , 97: 1-13

Rajendhran, J., Krishnakumar, V., Gunasekaran, P. (2002), '*Optimization of a fermentation medium for the production of penicilin G acylase from Bacillus*' Letters in Applied Microbiology. 35: 523-527

Rajendhran, J., Krishnakumar, V., Gunasekaran, P., (2003); '*Production of penicilin G acylase from Bacillus 'sp.: Effect of medium components.* World Journal of Microbiology & Biotechnology. 19: 107-110

Roberto C Giordano; Marcelo P A Ribeiro; Raquel L C Giordano (2006); '*Kinetics of beta-lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization.*' Biotechnology advances ;24(1):27-41.

Saburo F and Atsuo T, (1985), '*Application of Biocatalyst Immobilized by Polymer Methods, Enzyme Engineering,*' Plenum Press, New York,

Sanjay, G. and Sugunan, S., (2006). "*Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10*", Food Chem. 94: 573-579

- Santos A., Oliveira M.G, F. Maugeri F (1997) ‘*Modelling thermal stability and activity of free and immobilized enzymes as a novel tool for enzyme reactor design*’ *Bioresource Technology* 98 3142–3148
- Say R. et al., (2009) ‘*Photosensitive Aminoacid-Monomer Linkage and Bioconjugation Applications in Life Sciences and Biotechnology*’, *WIPO Patent Application WO/2011/070402*
- Scardi, V., (1987), *Immobilization of enzymes and microbial cells in gelatine*, *Methods in Enzymology*. **135B**, 293–299
- Scrip, cited from Shewale JG, Sivaraman H. (1989); ‘*Penicillin acylase: Enzyme production and its applications in the manufacture of 6-APA.*’ *Process Biochem.* 1171.28-24:146–54
- Shuler, M. L., Kargi, F., (2002), ‘*Bioprocess engineering: Basic concepts*’, Prentice-Hall International Editions, Second edition, pp. 57-67.
- Skrob, F., Becka, S., Plhacikova, K., Fotopulosova, V., Kyslik, P. Novel (2003) ‘*Penicillin G acylase from Achromobacter sp. CCM 4824.*’ *Enzyme and Microbial Technology*; 32:738–744.
- Sohpal V. K., Sharma R. K. , (2007) ‘*Investigate of Kinetic Process Parameters of Penicillin G Amidase Activity in Batch Culture*’ *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research* E-ISSN 2229-4619
- Taylor, R. F. (1991) ‘*Commercially available supports for protein immobilization. In: Protein immobilization*’. *Fundamentals and Applications* (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, New York, NY. pp. 139–160
- Telefoncu A., (1997) ‘*Immobilize Enzimler*’, *Enzimoloji (Yaz Okulu)*, Ed. A. Telefoncu.

Tennikova, T.B., Freitag, R., (2000), ‘*An introduction to monolithic disks as stationary phases for high performance biochromatography*’. Journal of High Resolution Chromotography and Chromotography Communication. 23, 27–38

Treva, M. ,(1980), ‘*Techniques of Immobilization. In: Immobilized Enzymes. An Introduction and Applications in Biotechnology*’(Treva, M., ed.), Wiley,Chichester-New York. pp. 1–9

Türkoğlu N. (1999). ‘*Tekstil Endüstrisinde Kullanılan Selülaz, Lakkaz ve Peroksidaz Enzimlerinin Funguslardan Üretiminin Araştırılması*’, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin,

Vandamme EJ. In, Moo-Young M, (1988), editor. ‘*Bioreactor Immobilized Enzymes and Cells: Fundamentals and Applications*’. New York: Elsevier. p. 261

White, C. A. and Kennedy, J. F. (1980), ‘*Popular matrices for enzyme and other immobilizations*’ Enzyme’ Microb. Technol. 2, **82–90**

Wilhelm Tischer1 Frank Wedekind(1999), ‘*Immobilized Enzymes: Methods and Applications*’Topics in Current Chemistry,Vol. 200 Springer Verlag Berlin Heidelberg

Woodward J. , (1985),. ‘*Immobilised Cells and Enzymes*’, Irl Pres, England,.

Zaborsky O. , (1973),*Adsorption Immobilized Enzyme*, Ed. by Weast, R. C., CRC Press, Ohio.

Zhao J, Wang, Y Guangsheng L, Shenlin Z.(2010), ‘*Immobilization of penicillin G acylase on macro-mesoporous silica spheres*’ Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing China