



**T.C.
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TAŞIYICI İÇERMİYEN İMMOBİLİZE ÇOKLU-ENZİM
SİSTEMLERİNİN TASARIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hasan Zeynel ENDOĞAN
(20179226003)**

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sema SALGIN

**SİVAS
Haziran-2020**

Hasan Zeynel ENDOĞAN'ın hazırladığı “**TAŞIYICI İÇERMEYEN İMMOBİLİZE ÇOKLU-ENZİM SİSTEMLERİNİN TASARIMI**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak Kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sema SALGIN

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Uğur SALGIN

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Onur DÖKER

Mersin Üniversitesi

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Özlem Pelin CAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından M-739 Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.



Tüm hakları saklıdır.

Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Hasan Zeynel ENDOĞAN, 2020

ETİK

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve tüm yazılı bilgi ve sonuçları bilimsel olarak kurallara uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

10.06.2020

Hasan Zeynel ENDOĞAN

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve lisans eğitimim süresince teorik ve pratik bilgi ve tecrübelerinden sınırsızca yararlandığım ve her zaman akademik, mesleki ve kişisel açıdan gelişimime katkıda bulunan, çalışmalarımda bana yol gösteren ve başarılı sonuçlara ulaşmama yardımcı olan, daima her konuda desteğini esirgemeyen saygı değer danışmam hocam Prof. Dr. Sema SALGIN'a çok teşekkür ederim. Yüksek lisans ve lisans eğitimim boyunca yardımını esirgemeyen, yol gösteren ve bazı aşılması zor konularda engin bilgi birikimi ile verdiği fikirlerle çalışmama destek olan saygı değer hocam Prof. Dr. Uğur SALGIN'a çok teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana yardımcı olan, yol gösteren, gelişimime katkıda bulunan, maddi ve manevi her zaman yanımda bulunan saygı değer Dr. Öğr. Üyesi Nagihan SOYER'e ve Abdullah Gül Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Nanoteknoloji Mühendisliği Bölümü'nden Arş. Gör. Dr. Derya DİNÇYÜREK EKİCİ'ye çok teşekkür ederim. Araştırma grubu üyelerimizden Öğr. Gör. Halil İbrahim ÇETİNTAŞ ve Öğr. Gör. Mustafa ÇAKAL'a, her zaman bana destek olan saygı değer arkadaşım Kimya Yüksek Mühendisi Emre TUĞ'a, çalışma grubu arkadaşlarım Kimya Yüksek Mühendisi Tuğba BAŞARA'ya, Kimya Yüksek Mühendisi İsmail ALOMARI'ye ve Kimya Mühendisi Emre ERDOĞAN'a ve Biyomühendis Yasmin ABOALWARD'a çok teşekkür ederim. Ayrıca bölümümüz yüksek lisans öğrencileri Mustafa KÜÇÜKYAZICI, Melek KURUTÇU, Dilek BİÇER ve Melih ÖZDURAN'a destekleri için teşekkür ederim.

Beni yetiştiren, maddi manevi desteğini esirgemeyen çok sevdiğim sevgili annem Gülsüm ENDOĞAN'a, ablalarım Zeynep Tuba BAYAZIT ve Betül ENDOĞAN'a, babam Yusuf ENDOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

TAŞIYICI İÇERMEYEN İMMOBİLİZE ÇOKLU-ENZİM SİSTEMLERİNİN TASARIMI

Hasan Zeynel ENDOĞAN

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman Prof. Dr. Sema SALGIN

2020, 77+ xv sayfa

Çeşitli biyodönüşüm tepkimelerinin katalizlenmesinde tutuklanmış enzimlerin kullanımı günümüzde yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır. Son yıllarda, çapraz bağlı enzim agregat (CLEA)'ları, yeni ve çok yönlü biyokatalizör tasarımı olarak ortaya çıkmıştır. Bu yüksek lisans tez çalışmasında, ticari amilaz ve lipaz enzimlerinden çoklu CLEA'nın biyokatalizörleri sentezlenmiştir. Bu çoklu enzimatik sistem yaklaşımı, kısa döngü süresi, üretimi artırma ve ardışık enzimatik reaksiyonlarda substratın etkili transferi gibi bazı avantajlar sağlayabilir. Bu çalışmada, ticari amilaz ve lipaz enzimlerini içeren çoklu-CLEA biyokatalizörlerinin hazırlanması için toplam enzim derişimi, çapraz bağlanma süresi, çapraz bağlayıcı gluteraldehit derişimi, presipitasyon ajanı türü ve derişimi, katkı maddelerinin derişimi parametreleri incelenmiştir. Çoklu-CLEA biyokatalizörü kinetik parametreler, ısıl kararlılık, pH kararlılığı ve tekrar kullanılabilirlik açısından karakterize edilmiştir. Sentezlenen biyokatalizörlerin morfolojisi ve kimyasal yapısı sırasıyla SEM ve FTIR analizi ile belirlenmiştir.

CLEA sentezi için optimum koşullar 150 mg / mL'lik toplam enzim konsantrasyonu, 30 dakikalık çapraz bağlama süresi, 32.6 mM GA konsantrasyonu, 0.60 g çökeltici PEG-6000 ve 6.66 mg / mL lizin katkı maddesidir. Ayrıca çoklu CLEA'nın kullanımı için en uygun pH ve sıcaklık değerleri sırası ile 7.5 and 35°C olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Çoklu-CLEA, amilaz, lipaz, katkı maddesi, presipitant, sentez koşulları.

ABSTRACT

DESIGN OF IMMOBILIZED MULTI-ENZYME SYSTEMS WITHOUT CARRIER

Hasan Zeynel ENDOĞAN

Master of Science Thesis

Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Sema SALGIN

2020, 77+ xv pages

The use of immobilized enzymes for catalyzing various biotransformations is now a widely used approach. In recent years, cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) have emerged as a novel and versatile biocatalyst design. In this master's thesis study, the biocatalysts of multi-CLEA from commercial amylase and lipase enzymes were synthesized. This approach of multi-enzymatic systems can significantly offer some advantages such as short cycle time, production enhancement and efficient transfer of substrate in sequential enzymatic reactions etc. In this study, for the preparation of multi-CLEA containing amylase and lipase enzymes, the parameters of total enzyme concentration, cross-linking time, glutaraldehyde (GA) cross-linker concentration, the type of precipitant and concentration, the additive concentration have been examined. The multi-CLEA biocatalyst were characterized in terms of kinetic parameters, thermal and pH stability and reusability. The morphology and the chemical structure of the synthesized biocatalysts were determined by SEM and FTIR analysis, respectively.

The optimum conditions for CLEA synthesis are the total enzyme concentration of 150 mg/mL, the cross-linking time of 30 min, the GA concentration of 32.6 mM, the precipitant PEG-6000 of 0.60 g and the lysine additive of 6.66 mg/mL. In addition, the optimum pH and temperature values for the use of multi-CLEA were determined as 7.5 and 35°C, respectively.

Key Words: Multi-CLEA, amylase, lipase, additives, precipitant, synthesis conditions.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER DİZİNİ	xiv
KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1 Enzimler	3
2.1.1 Lipazlar ve Amilazlar	7
2.2 Enzim Kinetiği.....	12
2.3 Enzim İmmobilizasyonu ve Yöntemleri	14
2.3.1 Taşıyıcısız immobilizasyon	18
2.4 Literatür Özeti	22
3. MATERYAL ve METOT	30
3.1 Materyal	30
3.2 Çoklu-CLEA Sentezi	30
3.3 Çoklu-CLEA Aktivitesinin Belirlenmesi	32
3.4 Çoklu-CLEA için Uygun pH ve Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi	33
3.5 Çoklu-CLEA Tekrar Kullanılabilirliği	33
3.6 Çoklu-CLEA Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi	33
3.7 Çoklu-CLEA Karakterizasyonu	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	35
4.1 Toplam Enzim Derişiminin Çoklu-CLEA Aktivitesine Etkisi.....	35
4.2 Çapraz Bağlanma Süresinin Çoklu-CLEA Aktivitesine Etkisi.....	37
4.3 Çapraz Bağlayıcı Derişiminin Çoklu-CLEA Aktivitesine Etkisi.....	39
4.4 Presipitasyon Ajan Türünün Çoklu-CLEA Aktivitesine Etkisi.....	41
4.4.1 Presipitasyon ajan türünün çoklu-CLEA yapısına etkisi.....	46
4.4.2. Presipitasyon ajan türünün çoklu-CLEA morfolojisine etkisi.....	49

4.5 Katkı Maddelerinin Çoklu-CLEA Aktivitesine Etkisi.....	50
4.5.1 Katkı maddelerinin çoklu-CLEA yapısına ve morfolojisine etkisi.....	53
4.6 Çoklu-CLEA için Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi.....	57
4.7 Çoklu-CLEA Tekrar Kullanılabilirliği.....	60
4.8 Çoklu-CLEA Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi.....	61
5. SONUÇLAR	63
KAYNAKLAR	64
EKLER	72
EK-1 p-Nitrofenol'ün Spektrum Taraması.	73
EK-2 p-Nitrofenol için Kalibrasyon Doğrusu.	74
EK-3 p-Nitrofenol için Absorptivite Değerinin Belirlenmesi ve Enzim Hidrolitik Aktivitesinin Hesaplanması.	75
EK-4 Maltoz için Absorptivite Değerinin Belirlenmesi ve Enzim Hidrolitik Aktivitesinin Hesaplanması.	77
ÖZGEÇMİŞ	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1	Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısı. 4
Şekil 2.2	Substratın enzimin aktif bölgesine bağlanması, ürün oluşumu ve ayrılması. 5
Şekil 2.3	Lipazların genel hidroliz tepkimesi. 7
Şekil 2.4	Lipaz enzimi. 8
Şekil 2.5	Amilazın yapısı. 10
Şekil 2.6	Nişasta yapısı. 11
Şekil 2.7	Nişastanın hidrolizi. 12
Şekil 2.8	Katalizörsüz ve enzim katalizli reaksiyonlar için enerji diyagramı. 13
Şekil 2.9	Enzim immobilizasyon yöntemleri. 17
Şekil 2.10	CLEA sentezi. 20
Şekil 3.1	Çoklu-CLEA sentez sistemi; 1) Sirkülatör, 2) orbital karıştırıcı, 3) ceket tipi reaktör, 4) enzim çözeltileri 31
Şekil 3.2	Soğutmalı santrifüj cihazı. 32
Şekil 3.3	FT-IR spektrometresi. 34
Şekil 4.1	Çoklu-CLEA aktivitesinin toplam enzim derişimi ile değişimi. 36
Şekil 4.2	FTIR spektrumları: Toplam enzim derişimi etkisi, (a) 100 mg/mL, (b) 150 mg/mL ve (c) 200 mg/mL. 36
Şekil 4.3	Çoklu-CLEA aktivitesinin çapraz bağlama süresi ile değişimi. 37
Şekil 4.4	FTIR spektrumları: Bağlanma süresi etkisi, (a) 15 min, (b) 30 min (c) 45 min ve (d) 60 min. 39
Şekil 4.5	Çoklu-CLEA aktivitesinin çapraz bağlayıcı derişimi ile değişimi. 40
Şekil 4.6	FTIR spektrumları: Çapraz bağlayıcı derişimi etkisi, (a) 32.6 mM, (b) 65.2 mM ve (c) 130.4 mM. 41
Şekil 4.7	Sıvı presipitant tür ve miktarının CLEA aktivitesine etkisi; (a) Etanol, (b) Aseton ve (c) PEG-200 42

Şekil 4.8	Katı presipitantların CLEA aktivitesine etkisi; (a) PEG-6000 ve (b) taç eter.	44
Şekil 4.9	FTIR spektrumu: Etanol presipitasyon ajanı etkisi.	46
Şekil 4.10	FTIR spektrumu: Aseton presipitasyon ajanı etkisi.	47
Şekil 4.11	FTIR spektrumu: PEG-200 presipitasyon ajanı etkisi.	47
Şekil 4.12	FTIR spektrumu: PEG-6000 presipitasyon ajanı etkisi.	48
Şekil 4.13	Çoklu-CLEA sentezinde taç eter presipitasyon ajanı etkisi: FTIR spektrumu.	48
Şekil 4.14	Çoklu-CLEA SEM fotoğrafları: Presipitasyon ajan türü etkisi, (NH ₄) ₂ SO ₄ (A), Etanol (B), Aseton (C), PEG-200 (D), PEG-6000 (E) ve Taç eter (F).	50
Şekil 4.15	Çoklu-CLEA aktivitesine BSA etkisi.	51
Şekil 4.16	Çoklu-CLEA aktivitesine lizin etkisi.	52
Şekil 4.17	Çoklu-CLEA aktivitesine taç eter etkisi.	53
Şekil 4.18	Çoklu-CLEA aktivitesine Triton X-100 etkisi.	53
Şekil 4.19	FTIR spektrumu: Çoklu-CLEA sentezinde BSA miktarı etkisi.	55
Şekil 4.20	FTIR spektrumu: Çoklu-CLEA sentezinde L-lizin miktarı etkisi.	55
Şekil 4.21	FTIR spektrumu: Çoklu-CLEA sentezinde Triton X-100 miktarı etkisi.	56
Şekil 4.22	FTIR spektrumu: Çoklu-CLEA sentezinde taç eter miktarı etkisi.	56
Şekil 4.23	Çoklu-CLEA SEM fotoğrafları: Katkı maddesi etkileri, BSA (A), L-Lizin (B), Triton X-100 (C) ve Taç eter (E).	57
Şekil 4.24	Çoklu-CLEA aktivitesinin pH ile değişimi.	58
Şekil 4.25	Çoklu-CLEA aktivitesinin sıcaklık ile değişimi.	59
Şekil 4.26	Çoklu-CLEA tekrar kullanılabilirliği.	60
Şekil 4.27	Lineweaver-Burke grafiği: Amilaz agregatı.	61
Şekil 4.28	Lineweaver-Burke grafiği: Lipaz agregatı.	62
Şekil E1	<i>p</i> -Nitrofenol'ün Spektrum Taraması	73
Şekil E2	<i>p</i> -Nitrofenol için Kalibrasyon Doğrusu	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>SAYFA</u>
Çizelge 2.1 Enzimlerin sınıflandırılması.	5
Çizelge 2.2 Enzimlerin kullanım alanları.	6
Çizelge 2.3 Kullanımı yaygın olan bazı ticari lipazlar	9
Çizelge 2.4 Mikobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları	9
Çizelge E1 <i>p</i> -Nitrofenol derişimlerinde ölçülen absorbans değerleri	74



SİMGELER DİZİNİ

C_s	Substrat derişimi, mM.
k	Tepkime hız sabiti, s^{-1}
K_m	Michaelis-Menten sabiti, mM.
V_{max}	Maksimum enzim reaksiyon hızı, mg/min
V	Enzim reaksiyon hızı, mg/min.
U	Enzim aktivitesi, $\mu\text{mol}_{\text{substrat}}/\text{g}_{\text{CLEA}} \cdot \text{min}$
λ	Dalga boyu, nm



KISALTMALAR DİZİNİ

AOA	: <i>Aspergillus oryzae</i> amilazı
BSA	: Bovin serum albumin
CLE	: Çapraz bağlı enzim
CLEA	: Çapraz bağlı enzim agregatı
CLEC	: Çapraz bağlı enzim kristali
CRL	: <i>Candida rugosa</i> lipazı
CSDE	: Çapraz bağlı spreyci kurutma enzim
DMSO	: Dimetil sülfoksit
ES	: Enzim substrat kompleksi
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi
GA	: Glutaraldehit
IEC	: Uluslararası Enzim Komisyonu
Lys	: Lizin
PEG	: Polietilen glikol
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
UV	: Ultraviyole
<i>p</i> -NP	: <i>p</i> -Nitrofenol
<i>p</i> -NPA	: <i>p</i> -Nitrofenilasetat

1. GİRİŞ

Enzimatik tepkimeler oda sıcaklığı, atmosferik basınç ve fizyolojik pH değerinde ılımlı koşullarda gerçekleşir. Enzimatik süreçler daha ekonomik, daha çevre dostu ve daha sürdürülebilir olduğu için üzerinde geniş çalışmalar yapılmaktadır (Sheldon & Pelt, 2013). Enzimatik sentezlerle elde edilen ekonomik değeri yüksek kimyasal ve biyokimyasal ürünlerdeki çeşitliliğin artması nedeniyle biyokatalizör uygulamalarının yer aldığı biyoteknoloji proseslerinde, endüstriyel enzimlere ve enzim sistemlerine olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Enzimatik sentezlerin yer aldığı ilgili proseslerde ürün ya da endüstriyel süreç geliştirmeye yönelik AR-GE çalışmalarında; üretim ortamı ve işletme koşullarına karşı maksimum performans gösterebilecek ideal biyokatalizör sistemlerinin geliştirilmesi, alternatif biyokatalizör sistemleri oluşturmak için yeni teknolojilerin geliştirilmesi ve var olan enzim sistemlerindeki darboğazların çözümüne yönelik çalışmalar da gün geçtikçe artmaktadır (Aptiş, 2012).

Biyokatalitik tepkimeler genelde serbest enzimin viskoz veya iki fazlı sistemde yer aldığı yığın çözelti içinde gerçekleşmektedir. Tepkime ortamında serbest halde bulunan enzimlerin tepkime sona erdikten sonra geri kazanımı ve geri döngüsü pek mümkün değildir. Enzimlerin biyoürün ortamından yüksek saflıkta geri kazanımının zorluğu ve yüksek ayırma maliyeti, reaksiyon sonrası enzim aktivitesinin korunamaması, reaksiyon sonrasında enzimin tekrar kullanılabilirliğinin olmaması ya da düşük sayıda olması endüstriyel biyodönüşüm proseslerinde sıkça karşılaşılan problemlerden bazılarıdır. Dolayısıyla enzimatik üretimler sadece yüksek fiyatlı ürünler için maliyet açısından uygun olabilir. Bu dezavantajların giderilmesi için çeşitli immobilizasyon yöntemlerine başvurulmuştur (Sheldon & Pelt, 2013). Immobilizasyon yöntemleri taşıyıcı/destek üzerine tutuklama ve taşıyıcısız tutuklama olarak ikiye ayrılabilir. Taşıyıcı üzerine tutuklama hapsedme ya da bağlanma ile gerçekleşir. Hapsedme yöntemleri; jel içine hapsedme, mikrokapsülleme, lif içine hapsedme yöntemleridir. Bağlanma ise, fiziksel adsorpsiyon, adsorpsiyon veya çapraz bağlama, şelat (metal) bağlama, iyonik bağlama, biyospesifik bağlama ve kovalent bağlama ile gerçekleşir. Taşıyıcıya bağlama işleminde spesifik aktivitede azalma gözlenmesine rağmen kullanım ömrü ve işletme kararlılığında artış gözlenmektedir. Ancak taşıyıcıya bağlı çözünmez formda enzim üretiminde iki temel dezavantaj bulunmaktadır. Birincisi katalitik olmayan kütlenin büyük bir kısmının (toplam kütlenin %90'ı) üretimde kullanılması

dolayısıyla düşük spesifik aktivite elde edilmesi, ikincisi ise kullanılan taşıyıcıların pahalı olmasıdır. 1960'ların başında taşıyıcısız enzim immobilizasyon yöntemlerinin geliştirilmesiyle taşıyıcılı enzim immobilizasyonunun dezavantajları giderilmeye çalışılmıştır. Çapraz bağlı enzim kristalleri (CLEC; Cross-linked Enzyme Crystal), çapraz bağlı enzimler (CLE; Cross-linked Enzyme), çapraz bağlı sprey kurutma enzimleri (CSDE; Cross-linked Spray-Dried Enzyme) ve çapraz bağlı enzim agregatı (CLEA; Cross-Linked EnzymeAggregate) sentez yöntemleri taşıyıcısız enzim immobilizasyon yöntemleridir. Bu yöntemlerle üretilen biyokatalizörlerin genellikle spesifik aktivitesinin yüksek olması, yüksek kararlılıkları ve düşük üretim maliyeti gibi belirgin avantajları bulunmaktadır (Elaldi, 2018; Sheldon vd., 2009). Günümüzde birden fazla enzimi içeren çoklu/birleşik CLEA formlarının hazırlanması üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. İki veya daha fazla enzimi içeren bu çalışmaların ortak amacı ardışık reaksiyonları tek bir adımda gerçekleştirilebilmektir (Touahar vd., 2014, Ning vd., 2014, Goetze vd., 2017, Dalal vd., 2007, Sojitra vd., 2016, Ahumada vd., 2015)

Bu çalışmada, deterjan, gıda ve biyoyakıt endüstrisi başta olmak üzere birçok endüstriyel alanda kullanılan hidrolaz enzim grubunda yer alan amilaz ve lipaz enzimlerini içeren çoklu-CLEA biyokatalizörü sentezlenmiştir. Çoklu-CLEA biyokatalizörlerinin hazırlanması için toplam enzim derişimi (100 – 300 mg/mL), çapraz bağlanma süresi (15 – 60 min), çapraz bağlayıcı glutaraldehit (GA) derişimi, presipitasyon ajanı türü (aseton, etanol, taç eter ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ve katkı maddeleri (lizin, bovin serum albumin (BSA), taç eter ve Triton X-100) türü gibi parametreler incelenmiştir. Çoklu-CLEA biyokatalizörünün kinetik parametreler, ısı ve pH kararlılığı ve tekrar kullanılabilirlik açısından incelenmiştir. Sentezlenen biyokatalizörlerin morfolojisi ve kimyasal yapısı sırasıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM; Scanning Electron Microscopy) ve Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR; Fourier Transform Infrared Spectrum) analizi ile belirlenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Enzimler

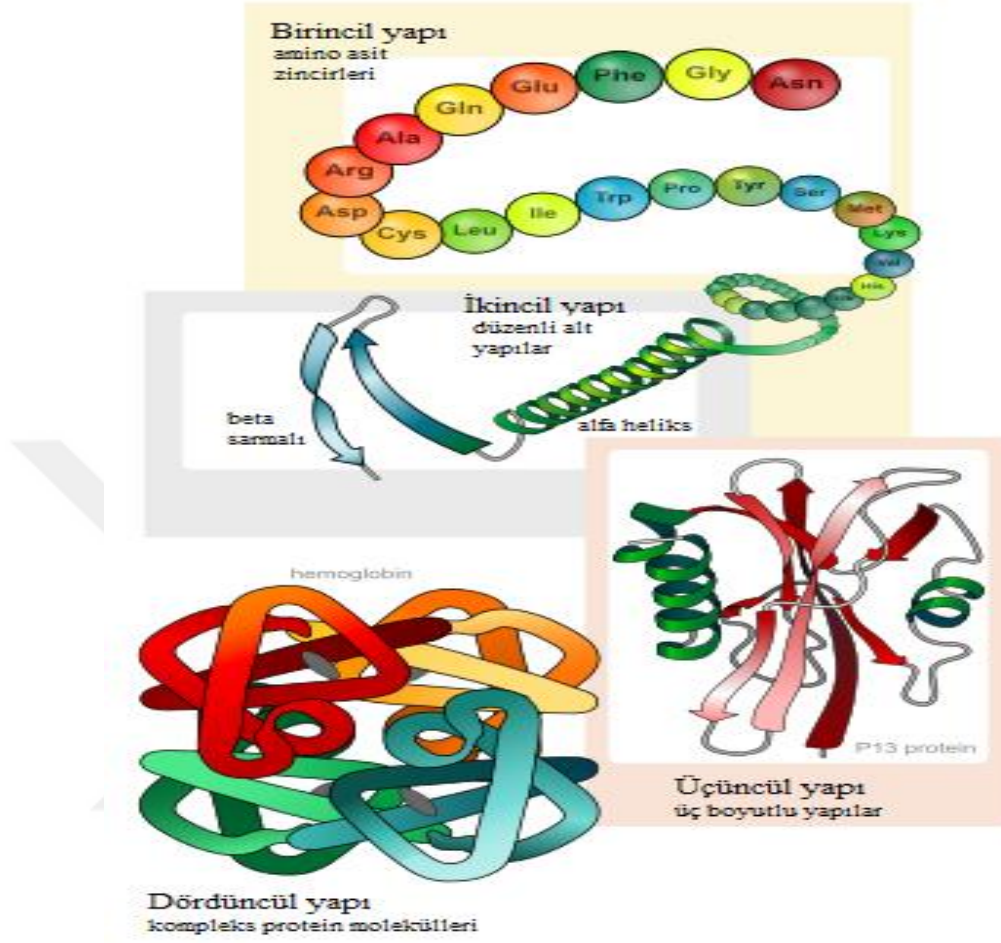
Enzimler canlı organizmalardaki biyokimyasal reaksiyonların ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan protein yapısındaki özgül biyokatalizörlerdir (Tüzün, 1997). Bununla birlikte uygun koşulların sağlanması durumunda etkilerini doğal ortamlarının dışında da gösterebiliyor olmaları pek çok alanda kullanılmalarına da olanak sağlamaktadır (Telefoncu, 1997).

Enzimlerin substratlara özgü olması, kimyasal katalizörler ile enzimler arasındaki en önemli farktır. Yani belirli substratlar arasındaki belirli reaksiyonları katalizlerler. Enzimler, kimyasal katalizörlerin tersine, prosesin enerji ihtiyacını azaltarak atmosfer basıncında ve 20 – 40°C sıcaklık aralığındaki reaksiyonları katalizleme özelliği gösterirler. Genellikle uygun pH değeri 5 – 8 aralığındadır. Enzimlerde yan reaksiyon olarak bozulma, rasemizasyon, izomerizasyon ve yeniden düzenlenme gibi durumlar olmamaktadır. Kimyasal katalizörlere göre biyokatalizörler, tepkimeleri 10^8 - 10^{10} kat daha hızlı ve daha düşük derişimde katalizlerler.

Enzimlerin büyük çoğunluğu protein yapısındadır ve protein konformasyonunun bütünlüğü katalitik aktiviteyi etkiler. Bir enzimin alt birimlere ayrıştırılması veya denatüre olması durumunda katalitik aktivitesi genellikle kaybolmaktadır. Enzimlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları katalitik aktivitelerinin temelini oluşturur (Şekil 2.1).

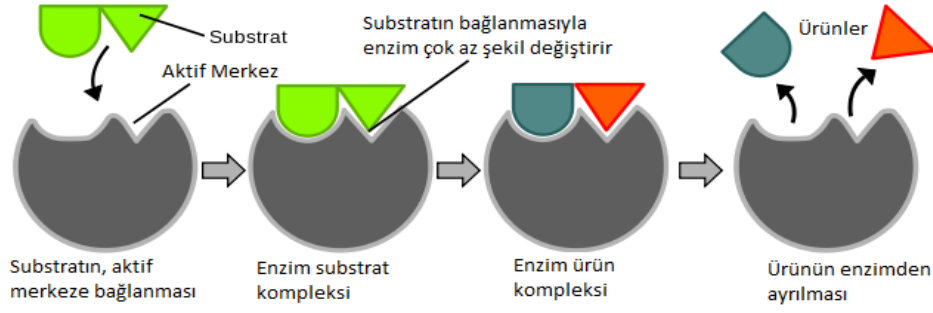
Enzimlerin bazıları katalitik aktivite göstermek için yapısında protein olmayan, kofaktör olarak adlandırılan bir bileşene de gereksinim duyarlar. Kofaktör, bir organik molekül (koenzim) ya da bir metal iyonu (Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) olabilir. Koenzimler spesifik grupların geçici taşıyıcıları olarak davranırlar. Bazı enzimlerin aktiflik göstermeleri için koenzim ile beraber birden fazla metal iyonu gerekir. Koenzim veya metal iyonu enzim proteinine kovalent olarak bağlandığında prostetik grup olarak isimlendirilir. Katalitik olarak aktif bir enzimle bağlı olan koenzim veya metal iyonları haloenzim olarak isimlendirilir. Böyle bir enzimin protein kısmı apoenzim veya apoprotein olarak isimlendirilir. Sonuç olarak bazı enzim proteinleri fosforilleme, glikolizleme gibi bazı

işlemlerle kovalent olarak değiştirilebilir. Bu değişikliklerin birçoğu enzim aktifliklerinin düzenlenmesiyle de ilgilidir (Nelson ve Cox, 2005).



Şekil 2.1 Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısı.

Enzimle katalizlenmiş bir tepkimenin ayırt edici özelliği, tepkimenin enzim üzerinde aktif bölge olarak adlandırılan kısımda gerçekleşmesidir. Aktif bölgeye bağlanan ve enzimlerin katalizledikleri tepkimelerde tepkimeye giren bileşenlere substrat denir (Şekil 2.2). Aktif bölgenin yüzeyi amino asit kalıntılarıyla, substrata bağlanan ve kimyasal dönüşümleri katalizleyen gruplarla örülüdür. Genellikle substrat tarafından aktif bölge sarılır ve çözeltiden ayrıştırılır (Nelson ve Cox, 2005).



Şekil 2.2 Substratın enzimin aktif bölgesine bağlanması, ürün oluşumu ve ayrılması.

Enzimler genellikle etkiledikleri substrat veya katalizledikleri tepkimenin sonuna "az" eki getirilerek adlandırılır. Bazı enzimlerin adlandırılması ise substratlarını ya da tepkimelerini belirtmeden yapılır. Ancak adlandırmada karışıklığa sebep olan, aynı tepkimeyi katalizleyen veya aynı substrata etki eden enzimlerin bulunması durumunda bu karışıklığı önlemek adına enzimler katalizledikleri tepkime türüne göre Uluslararası Biyokimya Birliği (International Union of Biochemistry) tarafından Uluslararası Enzim Komisyonu (IEC; The Commission on Enzymes) kurulmuştur. IEC katalizledikleri reaksiyon tipine göre enzimleri Çizelge 2.1'de gösterilen 6 temel gruba ayırmıştır (Sharma vd., 2001; Narlı, 2006, Şahutoğlu, 2013; Elaldı, 2018).

Çizelge 2.1 Enzimlerin sınıflandırılması.

Grup no.	Sınıf	Katalizlenen tepkime türü
1	Oksidoredüktazlar	Elektronların transferleri
2	Transferazlar	Grup transfer tepkimeleri
3	Hidrolazlar	Hidroliz tepkimleri (fonksiyonel grupların suya transferi)
4	Liyazlar	Çift bağa grupların eklenmesi ya da grupların uzaklaşmasıyla çift bağların oluşma reaksiyonları
5	İzomerazlar	İzomerik formaları oluşturmak üzere moleküler grupların transferi
6	Ligazlar	ATP'nin ayrılması ile eşleşmiş kondenzasyon tepkimeleri ile C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşması

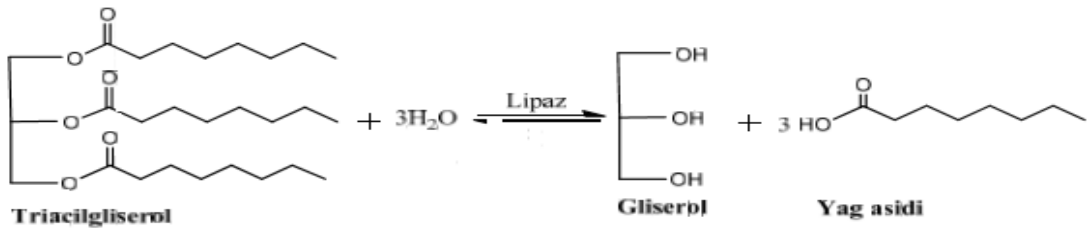
Çizelge 2.2’de ise tıp, eczacılık, tarım, hayvancılık, çevre, gıda, kağıt, tekstil, deterjan vb. birçok alanda yaygın olarak kullanılan enzimler özetlenmiştir.

Çizelge 2.2 Enzimlerin kullanım alanları.

Kolestrol oksidaz	Tıpta kolesterol tayininde
Proteaz, lipaz, amilaz	Deterjan sanayinde
Laktaz, mikrobiyal proteaz	Süt ve süt ürünleri endüstrisinde
Pektinaz, selülaz, limonaz	Meyve suyu saayinde
Proteaz, lipaz	Deri sanayinde
Amilaz, glukoz, izomeraz	Nişasta endüstrisinde
Katalaz, amilaz	Tekstil sanayinde
Amilaz, amiloglikozidaz, pentosanaz	Unlu gıda endüstrisinde
Redüktaz, amilaz, fosfotaz, oksidazlar	Analitik amaçlı analizlerde
Termolizin	Aspartam üretiminde
Ksilenaz	Kağıt endüstrisinde
Papain, katalaz	Et endüstrisinde
Penisilin amidaz, oksidaz	Eczacılıkta

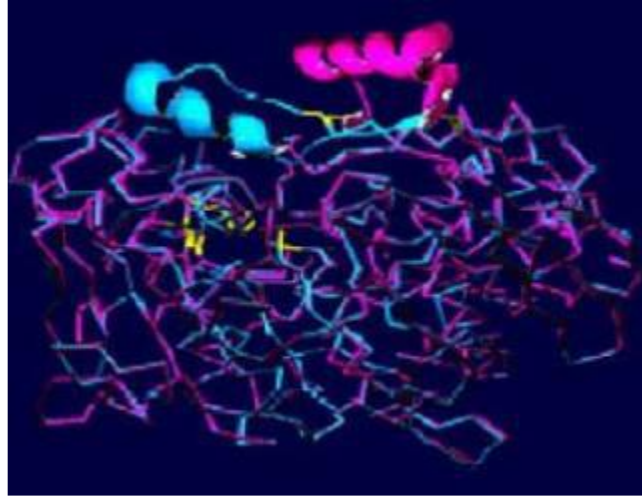
2.1.1 Lipazlar ve Amilazlar

Enzim sınıflandırmasında hidrolazlar sınıfında yer alan lipazlar; tri-, di- ve monoasılgliserollerin (hayvan, bitki ve mikrobiyal yağların ana bileşeni) karboksil ester bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Bu reaksiyon sonucu karboksilik asitler ve alkoller oluşur. Lipazlar birçok tepkimeyi katalizleyebilmeleri, yüksek enantio ve regio seçiciliğiyle birlikte geniş spesifisiteleri nedeniyle birçok endüstride yüksek oranda kullanılmaktadır ve lipazların, fizyolojik ve endüstriyel önemi yüksektir. Lipazlar yağları hidrolize ederek gliserol ve yağ asitleri olarak parçalarlar ve sadece su/yağ ara yüzeyinde aktivasyon gösterirler (Şekil 2.3). Ayrıca bu hidrolitik reaksiyon tersinirdir ve azalan su miktarı ve organik çözücüler varlığında lipazlar çeşitli esterifikasyon, interesterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonları için de etkili katalizörlerdir (Elaldı, 2018; Sheldon vd., 2009; Bakkal,2006).



Şekil 2.3 Lipazların genel hidroliz tepkimesi.

Lipazlar serin hidrolazlar sınıfı içerisinde yer alır ve bu nedenle kofaktöre ihtiyaç duymazlar (Tuna, 2011). Lipaz enziminin aktif bölgesi (sarı bölge), kapağı açık (pembe bölge) ve kapalı (mavi bölge) konumları ile Şekil 2.4’te sunulmuştur. *Candida rugosa* Lipazı (CRL) Serin, Glutamin ve Histidin katalitik üçlüsünden oluşan ve 31 amino asitten oluşan bir kapağı olan aktif bölgeye sahiptir. Kapağın aktif bölgeye bakan iç yüzeyi hidrofobik, dış yüzeyi ise hidrofiliktir. Aktif bölgenin kapak tarafından kapatıldığı durumda enzimin aktivitesi oldukça düşüktür ve bu forma “kapalı form” denir. Kapağın hidrofobik arayüzeyle etkileşerek açılması ile enzim aktivitesi önemli ölçüde artış gösterir. Kapağın açık olduğu bu forma ise “açık form” denir (Bakkal, 2006).



Şekil 2.4 Lipaz enzimi

Lipazlar katalitik aktivitelerini substrat emülsiyonunun yağ-su geçiş fazında gerçekleştirir. Enzimatik reaksiyonun hızı, oluşan yüzey alanına bağlıdır. Lipazlar; yağ asitlerinin zinci uzunluğu, doymuşluk derecesi, yağ asidinin pozisyonu ve substratın fiziksel durumuna özel spesifite gösterir. 4-10 karbonlu yağ asitleri daha uzun karbonlu yağ asitlerine göre daha hızlı bir şekilde hidroliz olarak yağın yapısından ayrılır ve serbest hale geçerler (Tuna, 2011). Lipazların seçicilik özelliği; enzimin moleküler özellikleri, substratın yapısı ve enzimin substrata bağlanmasını etkileyen faktörler tarafından kontrol edilir. Lipaz spesifikliğı 3 temel grupta toplanır; pozisyon, substrat ve stereo seçiciliktir.

CRL, özellikle farmasötiklerin rezolüsyonunda, deterjanlarda biyosüpfaktan olarak, biyosensörlerde, karbohidrat ester sentezinde, enantiyomerik saflıkta amin ve amidlerin üretiminde, deri endüstrisinde, kozmetik ve parfümeride kullanım alanları bulunmaktadır. CRL'nin ekonomik kullanımını sağlamak için tutuklanmış enzimin ticari kullanımı daha yaygındır (Bakkal, 2006).

Güçlü katalizleme özelliğı nedeniyle lipazlar, organik kimyasal üretimi, deterjan üretimi, biyosüpfektanların sentezi, gıda, tarım kimyasalları üretimi, kağıt üretimi, kozmetik ve ilaç üretiminde geniş aralıkta kullanılan enzimlerdir. Bu enzimlerin kullanımını yeni bileşiklerin sentezi için lipaz bazlı teknolojilerin geliştirilmesi ile yaygınlaştırmaktadır. Ancak istenen nitelikteki lipaz azlığı sınırlayıcı bir faktördür. Bazı ticari lipazlar Çizelge 2.3'de verilmiştir.(Elaldı, 2018).

Çizelge 2.3 Kullanımı yaygın olan bazı ticari lipazlar

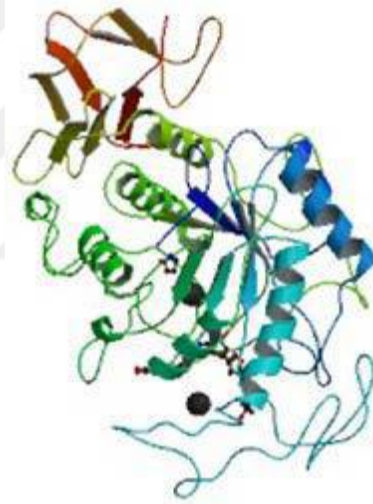
Tip	Kaynak	Uygulama alanı	Üretici firma
Fungal	<i>C. rugosa</i>	Organik sentez	Amano, Biocatalysist, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
	<i>C. antartica</i>	Organik sentez	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>T. lanuginosus</i>	Deterjan katkısı	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>R. miehei</i>	Gıda işletmesi	NovoNordisk, Biocatalysists, Amano
Bakteriyel	<i>B. cepacia</i>	Organik sentez	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	<i>P. alcaligenes</i>	Deterjan katkısı	Genencor
	<i>P. mendocina</i>	Deterjan katkısı	Genencor
	<i>Ch. Viscosum</i>	Organik sentez	Asahi, Biocatalysists

Lipazların endüstrideki bazı uygulama alanları ve görevleri Çizelge 2.4’te verilmiştir.

Çizelge 2.4 Mikobiyal lipazların endüstriyel uygulamaları

Endüstri	Görevi	Ürün ya da uygulama
Deterjan	Yağların hidrolizi	Kumaşlardan yağ lekelerinin uzaklaştırılması
Süt ürünleri	Süt yağının hidrolizi	Peynir, süt ve tereyağındaki tatlandırıcıların geliştirilmesi
Kozmetik	Sentez	Nemlendiriciler
Kağıt	Hidroliz	Geliştirilmiş kalitede kağıt
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri
Temilik	Hidroliz	Yağların uzaklaştırılması
İlaç	Transesterifikasyon	Sindirim düzenleyiciler
İlaç	Hidroliz	Özel lipidler
Yağ	Transesterifikasyon	Margarin, gliserol
Yağ	Hidroliz	Mono ve diaçil gliseroller

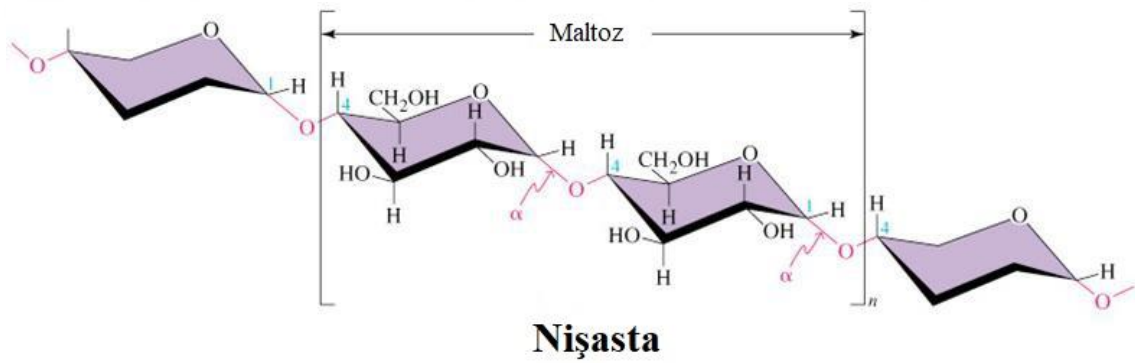
Şekil 2.5'te üç boyutlu yapısı gösterilen amilazlar ise bilinen en önemli ve eski endüstriyel enzimlerdir. Nişasta amilolitik enzimler tarafından indirgenir. Amilazlar, nişasta molekülünü hidroliz ederek dekstrin ve glikoz birimlerinden meydana gelen bir karışım oluştururlar (Özdemir, 2019). Nişasta, polisakkaritlerin depolanmasını sağlayan, insan beslenme düzeninin ana öğelerinden biridir. Bu nedenle çeşitli gıda ürünlerinin enzimatik proseslerinde kullanılmaktadır (de Souza ve de Oliveira-Magalhães, 2010). Nişasta, glikojen ve bunlarla ilişkili oligo ve polisakkaritler ile sentetik polisakkaritlerdeki α -1,4 veya α -1,6 glikozidik bağlarına etki eden enzimler amilolitik enzimler veya amilazlar olarak adlandırılırlar (Whitaker, 1993; Wong, 1995). Amilolitik enzimler endüstriyel açıdan önemli amilazlar ile yine endüstriyel açıdan uygulama potansiyeli bulunan pullanaz, α -glukozidaz ve siklodekstrin glikoziltransferaz gibi enzimleri içeren bir gruptur (Wong, 1995).



Şekil 2.5 Amilazın yapısı.

Nişastanın enzimatik dönüşümü; çirşlenme (jelatinizasyon), sıvılaşma (liquefaction) ve şekerlenme (sakkarifikasyon) olmak üzere üç aşamada meydana gelir. Jelatinizasyon; nişasta granüllerinin çözünmesi ve viskoz bir süspansiyon oluşturması, sıvılaşma; nişastanın kısmi hidroliz ile viskozitenin azalması olayıdır. Şekerlenme ise nişastadan glikoz ve fruktoz oluşmasıdır. Jelatinizasyon, nişastanın su ile ısıtılması ile oluşur ve nişasta, sadece yüksek sıcaklıkta suda çözünebilir (Rakshit, 1998). Nişasta (Şekil 2.6), glukoz birimlerinden oluşan amiloz ve amilopektin polimerlerinden oluşur ve sindirilebilir karbonhidratın asıl kaynağıdır (Meral, 2013). α -(1-4) ve α -(1-6) glikosidik bağ ile bağlanan glikoz birimlerinin suda çözünmeyen bir polisakkariti olan nişasta,

gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan şekerlerin üretimi için ucuz bir kaynaktır. Buna ek olarak üretilen şekerler, biyoetanol üretmek için fermente edilebilir. Nişasta dönüşümünde yaygın olarak kullanılan başlıca yaklaşımlar fiziksel, kimyasal ve biyokatalitik prosedürlerdir. Fiziksel ve kimyasal süreçler bir dereceye kadar faydalı olduklarını göstermiş olsalar da, bu işlemler enerji tüketmekte ve birçok yan ürün üretmektedir. Aksine, enzime dayalı biyokatalitik işlemler, daha yüksek ürün seçiciliğine sahip daha yumuşak ve daha yeşil reaksiyon koşulları altında gerçekleştirilir. Bu nedenle, enzim destekli nişasta dönüşümü, proses maliyetlerini azaltan, istenmeyen yan ürünleri önleyen ve reaksiyon spesifikliğini arttıran alternatif bir yeşil yaklaşım olarak kabul edilir (Talekar vd., 2017).

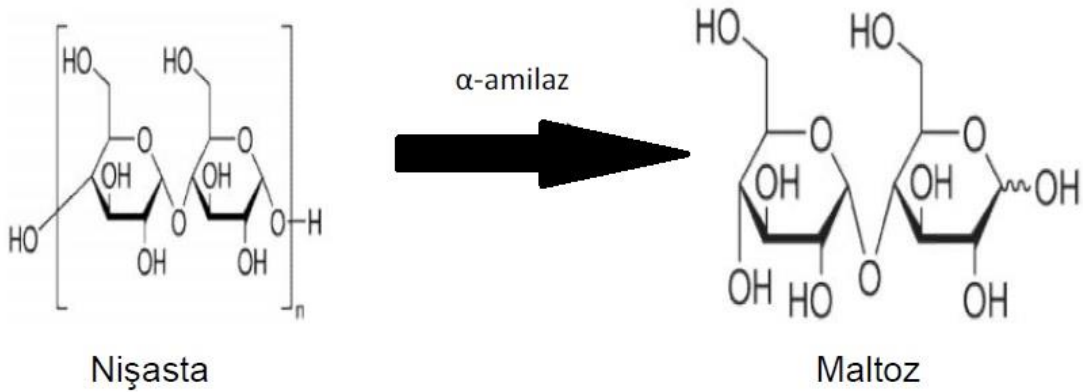


Şekil 2.6 Nişasta yapısı.

α -Amilaz enziminin, nişasta sıvılaştırma, şekerleşme, mayalama ile üretilen çeşitli gıda ürünleri, damıtmaya dayalı endüstriyel ürünler, kâğıt sanayi, tekstil ürünleri, deterjan endüstrisi gibi birçok alanda kullanımının artması üretimine daha çok önem verilmesine neden olmuştur (Gupta vd., 2003). Bu enzimler günümüzde büyük bir öneme sahiptir ve gıda, fermentasyon, tekstil ve kâğıt v.b endüstrilerinde kullanılmaktadırlar. Endüstriyel alanda kullanılan amilazlar bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kökenli olmakla birlikte ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedirler. Bunun nedeni, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, büyük miktarda ve yüksek saflıkta elde edilebilmeleridir (Fukara, 2007).

α -Amilaz (EC 3.2.1.1, 1,4- α -D-glukan glukanohidrolaz) substratın iç pozisyonundaki α -1,4-glukozidik bağı kıran ve ürün olarak C1-OH'i α konfigürasyonuna sahip

dekstrinler ve oligosakkaritler oluşturan bir endoglukozidazdır. Endoenzim rastgele bağ yıkımı gerçekleştirmekle birlikte, çeşitli çalışmalar enzimin izole edildiği kaynak organizmaya göre belirli bir düzen görülebildiğini göstermiştir. Substratın α -1,6 dallanma noktasına komşu pozisyonda bulunan bir α -1,4 bağı enzimin ataklarına karşı dayanıklıdır (Wong, 1995; de Souza ve de Oliveira-Magalhães, 2010; Şahutoğlu, 2013; Sundarram ve Murthy, 2014). Maltoz, maltotrioz, maltoteroz, maltopentoz ve maltoheksos nişasta hidrolizi (Şekil 2.7) sonucunda meydana gelen ana ürünlerdir. Hidrolizde oluşan ürünlerin dağılımı substrat derişimi, nişastanın yapısı, enzim miktarı gibi reaksiyon koşullarına bağlı olarak değişir (Bayramoğlu vd., 2004; Hasırcı vd., 2006).

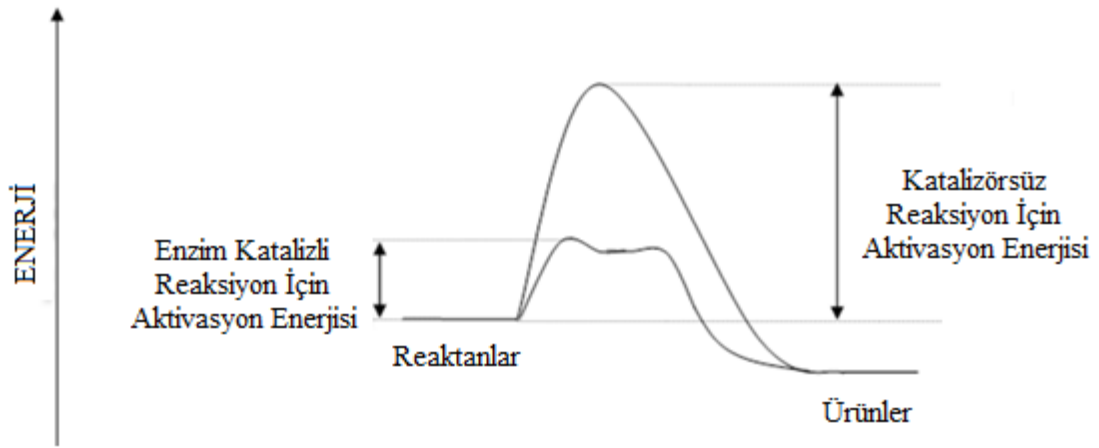


Şekil 2.7 Nişastanın hidrolizi

α -Amilazlar birçok organizmadan elde edilebilmektedir ancak her bir kaynaktan elde edilen α -amilazın optimum pH, sıcaklık gibi parametreleri birbirinden farklıdır. Bütün amilazlar en az bir Ca^{+2} iyonu içeren metaloenzimlerdir. α -Amilazlar çok miktarda kaynaktan elde edilmesine rağmen endüstride mikrobiyal kaynaklardan elde edilenleri kullanılmaktadır. Mikrobiyal amilazlar hücre dışı enzimlerdir ve genellikle *Bacillus* türleri tarafından üretilir. Kolay ayrılması, uygun fiyatı, tekstil, kağıt ve besin endüstrisi gibi yüksek sıcaklık ve pH' ın gerekli olduğu zor koşullarda dayanıklı olması mikrobiyal kaynaklı enzimlerin tercih edilme nedenidir. Bu amaçla en çok *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Aspergillus oryzae* kaynaklarından elde edilen α -amilazlar kullanılmaktadır (Meral, 2013).

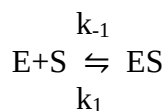
2.2 Enzim Kinetiği

Kimyasal bir reaksiyonun gerçekleşebilmesi için reaksiyona giren moleküllerin aktivasyon enerjisi adı verilen bir potansiyel enerji engelini aşmaları gerekir. Enzimler Şekil 2.8’de gösterildiği gibi bu aktivasyon enerjisinin düşürülmesini sağlarlar (Şahutoğlu, 2013).

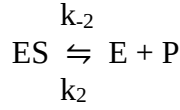


Şekil 2.8 Katalizörsüz ve enzim katalizli reaksiyonlar için enerji diyagramı.

Saflaştırılmış bir enzim tarafından katalizlenen bir tepkimenin hızını etkileyen anahtar etmen substrat derişimi [S]'dir. Ancak tepkime ilerlerken substrat derişiminin değışmesi ile etkisi karmaşıklışır. Kinetik çalışmalarda temel yaklaşımlardan biri substrat derişiminin enzim derişiminden [E] çok büyük olduğu durumda ilk hızı ölçmektir. Geçen süre oldukça kısa ise substrat derişimi sabit olarak kabul edilir. Enzim derişimi sabitken; substratın düşük derişimlerindeki hızının değışimi substrat derişiminin değışimi ile doğrusaldır. Yüksek substrat derişimlerinde substrat derişimindeki değışim karşılığında hızdaki değışim daha küçüktür. Substrat derişimdeki artış bir noktadan sonra hız değeri ni değıştirmez ve bu nokta maksimum hız olarak adlandırılır. 1903 yılında Wurtz önderliğinde Victor Henry bir enzimin substratıyla ES kompleksi oluşturmak için bir araya gelmelerinin şart olduğunu savunmuşlardır. 1913 yılında Leonor Michaelis ve Maud Menten tarafından bu görüş enzim davranışının genel teorisine uygulanmıştır. Enzimin ilk olarak substrat ile kompleks oluşturmak için göreceli hızlı tersinir bir basamakta birleştiğini ileri sürmüşlerdir:



Bu basamağın ardından ES kompleksi daha yavaş ikinci bir basamakta yıkılır, serbest enzim ve tepkime ürününü verir.



Daha yavaş olan ikinci tepkimeden dolayı tüm tepkimelerin hızı sınırlanır ve tepkime hızı ikinci basamaktaki türlerin derişimine bağılıdır (Meral, 2013).

Michaelis-Menten eşitliği substrat ve hız arasındaki ilişkiyi matematiksel olarak ifade etmektedir. Tepkimenin başlangıcında ürün miktarı önemsizdir ve k_{-2} ihmal edilebilir. ES ile belirlenen V , ürün oluşturmak üzere ES' nin parçalanması ile belirlenebilir. Michealis-Menten denkleminin (Eşt. 2.1) lineerleştirilmiş formu Lineveawer-Burke denklemini (Eşt. 2.2) vermektedir. K_m değeri enzimden enzime hatta aynı enzimin farklı substratlarına göre değişiklik gösterir. K_m aynı zamanda bir enzimin substratına olan ilgisinin bir ölçüsü olarak düşünülebilir. K_m değeri aslında tepkimenin farklı basamaklarının göreceli hızları gibi tepkime mekanizmasına özgü özelliklere bağılıdır (Nelson ve Cox ,2005).

$$V = \frac{V_{max} C_s}{K_m + C_s} \quad (2.1)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max} C_s} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.2)$$

2.3 Enzim İmmobilizasyonu ve Yöntemleri

Enzimler suda çözünebilen, spesifik biyokatalizörlerdir. Biyokataliz, son yıllarda daha sürdürülebilir bir biyo-temelli ekonomiye öngörülen geçişi sağlamak için öncü bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır (Sheldon, 2019). Serbest enzim, endüstriyel uygulamalarda sulu çözeltilerde katalizör olarak kullanıldıktan sonra tepkime ortamından aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması ve istenildiği anda tepkime ortamından ayrılması neredeyse imkansızdır. Bu nedenle tepkimenin kontrolü kolay değildir. Bu duruma çözüm olarak tepkime ortamına inhibitör eklenerek kontrolü sağlanabilir. Fakat bunun sonucunda da ortamda istenmeyen maddeler/kirlilik oluşacaktır. Ek olarak, çözünür enzimler kullanıldığında proseste safsızlık olarak kalır. Saflaştırılmış enzimlerin çözünür formda kullanılması, sadece atığa değil aynı zamanda enzimlerin sınırlı yeniden kullanımına da yol açar. İmmobilize enzimler kullanıldığında,

bu, enzimler yeniden kullanılabilir ve ayırma işlemlerini azaltabilir. Kirliliklerin uzaklaştırılması ise proses maliyetinin artmasına neden olur. Enzimlerin endüstriyel uygulaması genellikle uzun süreli operasyonel stabilite eksikliği, enzimin zor bir şekilde geri kazanılması ve yeniden kullanılması prosesin maliyetini artırdığı için sürekli sistemlerde kullanılmaz (Talekar vd., 2014; Elaldı, 2018). Endüstriyel kullanılabilirlik için geri dönüştürülebilir katalizörler olarak enzimlerin immobilizasyon yoluyla kolayca geri kazanılabilmesi ve geri dönüştürülebilmesi önemlidir (Sheldon, 2019). Enzimin sıvı bir formülasyondan ziyade bir katı olarak daha uygun şekilde kullanılmasına ek olarak, ürünün reaksiyon ortamından kolay ayrılmasını sağlar, böylece ürünün protein kontaminasyonunu en aza indirir veya ortadan kaldırır. Ayrıca, hareketsizleştirilmiş bir enzim cilde kolayca nüfuz edemez ve bu nedenle düşük veya hiç alerjenite göstermez (Roessl vd., 2010; Sheldon, 2011). Endüstriyel ölçekte, çoğunlukla farmasötik ara ürünler ve diğer ince kimyasalların imalatında gerçekleştirilen 130'dan fazla biyodönüşüm vardır. En geleneksel organik sentezlere kıyasla enzimatik yöntemlerin başlıca avantajları, genellikle yüksek kemo-, regio- ve stereoseçicilikleri ve hafif reaksiyon koşullarıdır (ortam sıcaklığı ve sudaki basınç). Ayrıca, enzimatik sentezler genellikle koruma ve koruma kaldırma adımlarına olan ihtiyacı ortadan kaldırarak ve çevreye zararlı olan organik çözücülerin kullanılmasından kaçınarak daha az işlem içerir. Öte yandan, ticarileştirilmeleri çoğu zaman nispeten yüksek fiyatları ile birlikte birçok enzimin operasyonel stabilitesinin olmaması nedeniyle engellenmektedir. Bu dezavantajlar genellikle uygun bir immobilizasyon yöntemi uygulanarak aşılabılır (Sheldon vd., 2009, Sheldon, 2011; Talekar vd., 2013b).

İmmobilizasyon ayrıca enzimin verimli bir şekilde geri kazanılmasını ve yeniden kullanılmasını kolaylaştırır, böylece örneğin sürekli, sabit yataklı proseste maliyetin etkin kullanımını mümkün kılar. Diğer bir avantaj, hem depolama hem de çalışma koşulları altında genellikle ısı veya organik çözücüler veya otoliz yoluyla denatürasyona doğru gelişmiş kararlılıktır. İyileştirilmiş enzim performansı ve tekrar kullanımı, daha yüksek katalizör verimliliklerini (kg enzim başına kg ürün) yansıtmaktadır. Taşıyıcıya bağlı enzimlerle çalışan bir biyoreaktöre büyük miktarda katalitik olmayan kütle verilebilir. Düşük spesifik aktiviteye sahip enzimler kullanıldığında bu ciddi bir sorun olabilir. Ayrıca, kullanılan taşıyıcılar genellikle kendilerine bağlı enzimlerden çok daha pahalıdır. Bu nedenle, çözünür proteinin spesifik aktivitesinin iyi tutulması ve aynı zamanda mekanik streslere karşı dirence sahip çözünmeyen bir parçacığa çökeltilmesi

ile güçlü bir taşıyıcı içermeyen heterojen biyokatalizör elde edilebilir (Roessl vd., 2010).

İmmobilize enzim, kompleks serbest biyokatalizörün temel biyokimyasal aktivitesine sahipken katı desteğin de fiziksel karakteristik özelliklerini gösterir. İmmobilizasyon akışkanın geçişini, özel bir modül üzerinde çözünmeyen bir kompleks oluşturarak sağlamaktadır (Yılmaz, 2016).

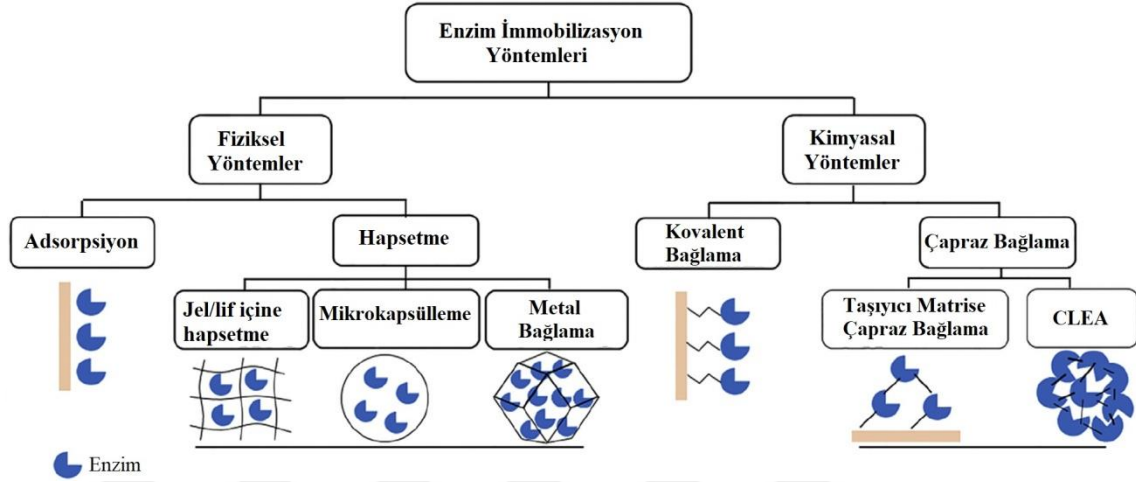
Serbest enzimlere göre immobilize enzimlerin üstünlüğü fazladır. Bu üstünlükler enzimlerin sürekli veya kesikli sistemlerde kullanımını kolaylaştırmaktadır. İmmobilizasyon prosesleri ekonomik açıdan avantajlıdır, bununla birlikte immobilize enzimlerin genel özellikleri aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Enzimler tekrar tekrar kullanılabilir,
- Prosesin kontrolü sağlanabilir,
- Tepkime ortamından ürün kolaylıkla ayrılabilir,
- Enzim nedeniyle oluşan ürün kirliliği azalır,
- Enzimin, aktivitesi ve ısıya dayanıklılığı artırılabilir,
- Serbest enzime göre daha karalıdır,
- Kirlilik problemleri en aza indirilebilir.

Enzim immobilizasyonu fiziksel (çözünen formda immobilizasyon) ve kimyasal (çözünmez formda immobilizasyon) bağlama yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilir (Şekil 2.9). Fiziksel yöntemlerde enzim desteğe hapsedilir veya zayıf olarak bağlanır. Kimyasal yöntemlerde ise katı destek ve enzim arasında kovalent bağ kurulur. Aktif merkezin, enzim immobilize edilirken etkilenmemesi gerekir. Aktif merkezde katalitik merkez ve substrat spesifikliğı sağlayan merkez olarak iki bölge bulunmaktadır. Aktif merkezdeki aminoasitler veya merkezin üç boyutlu yapısı değişirse katalitik aktivite azalır ve substrat spesifikliğı değişir. İmmobilizasyon işlemi ideal koşullarda gerçekleştirilmelidir aksi durumda denatüre olabilir ve dolayısıyla enzim aktivitesi azalır (Elaldı, 2018).

Kimyasal yöntemlerde kovalent bağlama ve çapraz bağlama yöntemleri vardır. Çapraz bağlama taşıyıcı matrise bağlama ya da taşıyıcısız immobilizasyon olarak iki gruba ayrılır. Taşıyıcı gerektiren immobilizasyonda, enzim taşıyıcıya bağlanabilir veya hareketsiz matrislere tutturulabilir. Taşıyıcı gerektirmeyen immobilizasyon ise kimyasal

yöntemler başlığı altında çapraz bağlama yöntemi ile gerçekleştirilir (Liu vd., 2018; Sheldon vd., 2009; Pera vd., 2005; Chen vd., 2017).



Şekil 2.9 Enzim immobilizasyon yöntemleri.

Enzim immobilizasyonu genellikle biyokatalizörün katalitik aktivitelerini uzun süre boyunca korunduğu fiziksel hapsi olarak ele alınır. Enzim üretiminin yüksek maliyetleri, saflaştırılması ve enzimatik süreçlerin geliştirilmesinin zorlukları gibi olumsuz etkenler biyokatalizörlerin istenen şekilde yeniden kullanılmasını ihtiyaç haline getiren başlıca faktörlerdir. Geleneksel enzim immobilizasyon teknikleri genellikle V_m ve/veya K_m gibi katalitik parametreler yoluyla gözlemlenen katalitik aktiviteleri azaltır. İmmobilizasyon prosedürleri hem enzimlerin uzun süre stabilitesini hem de biyokatalizörün birçok kez geri dönüşüm olasılığını artırır. Yeni taşıyıcıların ve yeni tekniklerin moleküler düzeyde geliştirilmesi, enzim stabilitesini ve aktivitesini birkaç kez ve ayrıca bazı durumlarda enzim hiperaktivasyonunu geliştirir (Pera vd., 2005).

2.3.1 Taşıyıcısız immobilizasyon

Taşıyıcıya bağlı enzimlerin, taşıyıcıya bağlanma veya kapsül içine hapsedilmesi gibi immobilizasyon yöntemlerinin belirgin bir dezavantajı, genellikle toplam kütlenin %90 ve %99'u arasında değişen katalitik olmayan kütle içermesinden kaynaklanan katalitik aktivitenin azalmasıdır. Bu kaçınılmaz olarak daha düşük hacimsel verime, uzay-zaman

verimine ve daha düşük katalizör verimine yol açar. Tersine, enzim moleküllerinin bifonksiyonel bağlama maddeleri ile çapraz bağlanması yoluyla immobilizasyon, bu ikinci dezavantajdan muzdarip değildir. Çapraz bağlama maddesinin moleküler ağırlığı, enziminkine kıyasla ihmal edilebilir olduğundan, elde edilen biyokatalizör esas olarak ağırlıkça %100 protein içerir (Schoevaart vd., 2004; Sheldon, 2011; Talekar vd., 2012; Talekar vd., 2013b).

Bu yöntemde, kovalent bağlar enzimlerin lizin, sistein veya aspartik ve glutamik asit kalıntıları gibi yan zincir amino asitleri arasındaki kimyasal reaksiyonlar yoluyla oluşur. Ek olarak, amino, karboksilik, imidazol, indolil ve fenolik hidroksil gruplarının fonksiyonel grupları, kovalent bağların oluşumu için uygundur (Lui vd., 2018).

Cao vd. (2000) çapraz bağlı enzim agregatlarını tanıtmış ve ticarileştirmiştir. Taşıyıcısız hareketsizleştirilmiş enzimlerin taşıyıcı olarak ekstra inaktif kütleye ihtiyacı yoktur. Genellikle çözünmüş, kristalize olmuş, spreyle kurutulmuş ve fiziksel olarak toplanmış enzimler gibi farklı enzim preparatlarının doğrudan çapraz bağlanmasıyla hazırlanırlar, bu da sırasıyla çapraz bağlı enzim (CLE), çapraz bağlı enzim kristalleri (CLEC), çapraz bağlı spreyle kurutulmuş enzimler (CSDE) ve çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) oluşumuyla sonuçlanır (Cao vd. 2003).

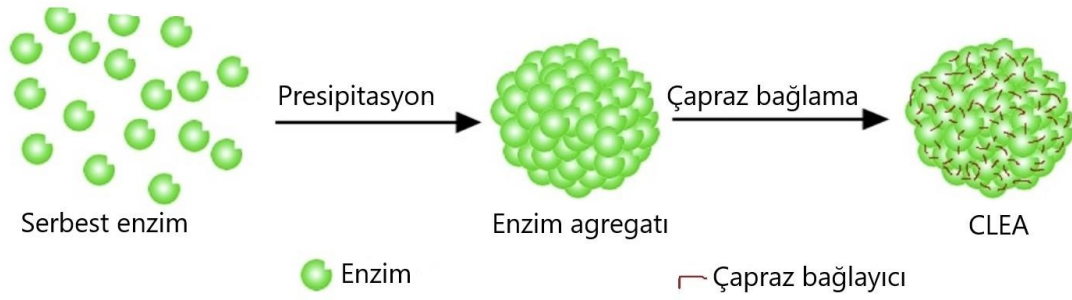
Çapraz bağlı enzimler (CLE), çözünmüş bir enzimin doğrudan çapraz bağlanmasıyla elde edilir. Sonuçta meydana gelen enzim preparatı, düşük aktivite tutma, zayıf tekrarlanabilirlik ve mekanik stabilite, düzensiz geometri sergiler ve jelatinimsi doğası nedeniyle kullanımı zordur (Talekar vd. 2013b). Çözünmeyen biyokatalizörler ayrıca enzimlerin doğrudan çözeltide çapraz bağlanmasıyla da elde edilir. Bunun sonucunda, oluşan enzim preparatlarının taşınması zor ve mekanik olarak kararsızdır. Çökeltme, bir dizi işlem değişkeninin (protein ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, pH, sıcaklık, iyonik güç, karıştırma ve diğerleri) hassas bir şekilde dengelenmesini gerektirmiştir ve bu nedenle genellikle tekrarlanamaz (Cao vd.,2003; Sheldon, 2011).

Çapraz bağlı spreyle kurutulmuş enzimler (CSDE) sağlandığında makul aktivite muhafaza edilmiştir. Püskürtmeli kurutma işleminin enzimleri geri dönüşümlü olarak devre dışı bırakması nedeniyle, CSDE şimdiye kadar kullanılmamıştır (Talekar vd. 2013b).

1960'larda keşfedilen CLEC yöntemi, ribonükleaz A, subtilisin, kaprboksipeptidaz B, alkol dehidrojenaz ve bazı lipazları içeren sınırlı sayıda enzime uygulanmıştır (Cao vd., 2003). Lipaz CLEC'lerin sürfaktanlar veya β -siklodekstrin ile kaplanması, raf ömrünün ve operasyonel stabilitenin daha da arttırılmasına katkıda bulunabilir (Rajan & Abraham 2008). CLEC'ler aktivite retansiyonu, ısı ile denatürasyona stabilite, organik çözücüler ve proteoliz, mekanik stabilite, parçacık geometrisi açısından daha iyi sonuçlar verdiği ve bu nedenle başarılı olduğu bulunmuştur (Talekadar vd., 2013b).

Çapraz bağlı enzim kristalleri (CLEC) oldukça aktif ve kararlı biyokatalizörlerdir. Ancak, yeterli bir kristalizasyon protokolünün geliştirilmesi pahalı ve zaman alıcıdır, bu da CLEC metodolojisinin büyük dezavantajıdır. CLEA çapraz bağlanması çok daha basit bir tekniktir. Temel olarak bir çöktürülmüş enzimin kovalent çapraz bağlanmasından oluşan prosedür, enzimlerin ve genel olarak proteinlerin denatürasyona girmeden inorganik tuzlar, iyonik olmayan polimerler veya organik çözücüler gibi maddeler tarafından çöktürülebileceği biyoproseslerdir (Lopez-Serrano vd., 2002).

Birçok çalışma, enzim yüklemesi ve aktivite ekspresyonunun büyük ölçüde taşıyıcıdaki gözeneklerin boyutuna ve erişilebilir yüzeye bağlı olduğunu açıkça göstermiştir. Yüksek aktivite tutma oranına ulaşmak için gözenek boyutu ile yüzey alanı arasında bir orantı sağlanmalıdır. Bu dezavantaj serbest CLEA kullanılarak aşılabılır. Serbest CLEA'lar (herhangi bir harici taşıyıcı kullanılmadan) genellikle, çözülebilen enzim moleküllerinin yakınlıklarını etkileyen özelliklerin, denatüre edici olmayan protein ayrılmasında yaygın olarak kullanılanlar gibi uygun agregasyon ajanlarının kullanımıyla oluşturulan fiziksel enzim agregatlarının kimyasal olarak çapraz bağlanmasıyla hazırlanır (Cao, 2005). Prensip olarak, CLEA'lar çözülebilen enzime bir tuz, iyonik olmayan polimer ya da bir organik çözücü ilave edilerek enzimin çöktürülmesi ve ardından elde edilen enzim agregatlarının glutaraldehit ile çapraz bağlanmasıyla hazırlanmaktadır (Şekil 2.10). İki fonksiyonlu bir reaktif ajan olan glutaraldehit, yüksek aktiviteye sahip çözünmeyen biyokatalizörler verecek şekilde enzimin yüzey amin grubu ile aldehit grubu reaksiyonu yoluyla agregatlardaki enzim moleküllerini çapraz bağlayabilir. Çökelme genellikle enzimleri saflaştırmak için kullanıldığından, CLEA'lar olarak enzim immobilizasyonu, saflaştırma ve immobilizasyonu tek bir birim işlemede birleştirir (Talekar vd., 2012).



Şekil 2.10 CLEA sentezi.

CLEA teknolojisi, gözenekli, gözeneksiz ve hetero-fonksiyonel destekler kullanılarak yapılan immobilizasyon ile karşılaştırıldığında, çoğu kontaminant protein ile uyumludur, çünkü her enzime özgü uygun koşullar altında çökebilir. Bu nedenle bir enzimi hareketsizleştirilmiş CLEA formunda doğrudan ham bir özütten (safılaştırmadan) izole etmek mümkündür. CLEA'lar, multimerik enzimlerin kuaterner yapısını, çok alt birimli kovalent bağlanma desteklerinden daha iyi stabilize ederek, multimerik enzimlerin ayrılmasını ve aktivite kaybını önler (Talekar vd. 2012).

CLEA'ların dezavantajlarından biri, tanecik boyutlarının genellikle 10 mm'nin altında olmasıdır. Bu nedenle, substrat parçacıklarının ve CLEA parçacıklarının aynı boyut aralığında olabildiği heterojen reaksiyon sistemlerinde kullanıldığında zorluklar ortaya çıkar. Hareketsizleştirilmiş bir enzimin stabilitesi, oluşan bağların sayısı, bağların doğası (kovalent, kovalent olmayan ya da kovalent ve kovalent olmayan bağların diğer türleri), taşıyıcıdaki enzim moleküllerinin tutulma derecesi, enzim ve taşıyıcının mikro ortamı ve immobilizasyon koşulları belirler (Cao, 2005).

CLEA, enzim çözeltisi ile organik bileşiklerin, tuz veya iyonik olmayan polimerlerle karıştırılmasından kaynaklanan enzim agregatının çapraz bağlanmasıyla oluşturulur. Çapraz bağlama yöntemi, enzimlerin molekülleri arasındaki kovalent bağların üretilmesinin bir sonucu olarak agregalara stabil bir yapı sunar, bu da onları çözünmez hale getirir (Rehman, 2016; Özacar vd., 2019).

Kimyasal çapraz bağlama yöntemleri, kimyasal işlevsellik, reaktivite ve büyüklük bakımından farklılık gösteren çok çeşitli mevcut çapraz bağlama reaktiflerinden yararlanır. İki işlevsel çapraz bağlayıcılar arasında, yani proteinleri hedeflemek için iki reaktif grup taşıyan GA muhtemelen en sık kullanılan çapraz bağlayıcıyı temsil eder (Gupta vd. 2007; Rehman vd., 2016; Talekar vd. 2012). Ek olarak, aynı anda ikiden

fazla fonksiyonel gruptaki proteinleri hedeflemek için de kullanılabilen çok fonksiyonlu çapraz bağlayıcılara birkaç örnek vardır. Geleneksel CLEA sentezi, bir agregasyon ajanı kullanılarak enzim agregatlarının oluşumunu, ardından çöken enzimlerin GA ile çapraz bağlanmasını içerir. Bununla birlikte, kovalent bağların oluşumu sırasında, fazla GA, katalitik olarak aktif enzimin aktif bölgesinde bulunan amino asitleri bağlayabilir ve böylece CLEA'ların aktivitesini önemli ölçüde azaltabilir. Bu nedenle, GA ile daha hafif bir çapraz bağlama dezavantajları azaltmak için gereklidir. CLEA aktivitesine çökeltinin tipi, çapraz bağlayıcı tipi, çapraz bağlama süresi, pH ve sıcaklık gibi çeşitli faktörlerin etkilediği görülmüştür (Reahman vd. 2016). Çapraz bağlayıcının enzime molar oranı, elde edilen CLEA'nın aktivitesini, stabilitesini ve partikül boyutunu etkilediğinden önemlidir. Oran çok düşükse, suda sızıntıya karşı çok esnek ve kararsız olan bir CLEA sağlayan yeterli çapraz bağlama meydana gelmez. Çok yüksekse, çok fazla çapraz bağlama, enzimin esnekliğinin ve dolayısıyla aktivitesinin tamamen kaybolmasına neden olabilir (Sheldon, 2011). CLEA preparatlarını, örneğin çapraz bağlamayı teşvik etmek için proteinli besleyiciler ekleyerek optimize etme yöntemleri ve gözenekleri makromoleküler substratlar için erişilebilir hale getirme stratejileri geliştirilmektedir (Shah, 2006; Sheldon, 2011; Sheldon, 2019).

CLEA'nın dezavantajlarını azaltmak için dikkate alınabilecek birkaç prosedür vardır; Mekanik dirençlerini arttırmak için dehidrasyon ve yoğun bir çapraz bağlama ile sertleştirilebilir veya sol jel üzerinde immobilize edilebilir veya bir inert protein veya polimer ilave edilebilir. Enzimlerin $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ ile çökeltilmesi sonucunda saflaştırılmış enzimlere ulaşabilir (Mahmod vd., 2015).

Sheldon (2011), farklı enzimler ile sentezlenen ve farklı biyodönüşümlerin bağımsız olarak gerçekleştirilmesi için kullanılabilen CLEA'lar için çoklu-CLEA ismini kullanmıştır. Kaskad reaksiyonların katalizi için çoklu enzim komplekslerinin kullanılması gerekmektedir. Birden fazla enzim aktivitesi aynı anda tek bir CLEA'da yakalanabilirse, bu çoklu-CLEA çeşitli biyodönüşümler için kullanılabilir. Çoklu-CLEA'lar kaskad reaksiyonlarda iki ardışık adımı tek bir biyodönüşümde gerçekleştirmek için belirtilmiş olsa da kaskad olmayan biyodönüşümlerde de kullanılabilir (Dalal vd., 2007). Çoklu-CLEA'lar, çevresel ve ekonomik verimlilikten atomik verimliliğe, katalitik basamakları, ara maddelerin ayrılmasına gerek kalmadan tek basamakta, katalitik bir kaskad işleminde birleştirmektir (Sheldon, 2007). Katalitik

kaskad süreçlerinin daha az birim operasyon, daha az reaktör hacmi ve daha yüksek hacim verimleri, uzay-zaman verimleri, daha kısa çevrim süreleri ve daha az atık üretimi gibi sayısız potansiyel faydası vardır. Ayrıca, adımları birleştirerek olumsuz dengeler ürüne doğru yönlendirilebilir. Prensip olarak, iki veya daha fazla enzimin çoklu-CLEA sentezinde birlikte çökeltilmesi ve çapraz bağlanmasıyla gerçekleştirilir (Sheldon, 2007; Mahmud vd., 2015; Xue ve Woodley, 2012; Talekar vd., 2013a; Chen vd., 2016; Talekar vd. 2017). Çoklu-CLEA sentezindeki başlıca zorluklar, enzimlerin eşzamanlı çökeltilmesi için bir yöntem geliştirmek ve enzimlerin tümü için önemli düzeyde aktivite tutulmasına izin veren çapraz bağlama koşullarını tanımlamaktır (Dalal vd., 2007).

Sheldon (2007), çalışmasında iki enzimin ayrı ayrı CLEA aktivitelerinin, çoklu-CLEA aktivitelerine oranla daha az katalitik aktivite gösterdiğini bildirmiştir. Bu durumu çoklu-CLEA içerisindeki iki enzimin yakın mesafesinin birinci aşamada oluşan ürünün ikinci kataliz basamağındaki aktif bölgeye daha hızlı aktarılması olarak açıklamıştır.

Mateo vd. (2006), kaskad reaksiyonlarda iki enzim aktivitesini sağlamak için çözülmesi gereken potansiyel uyumsuzluklarının pH ve reaksiyon ortamı olduğunu bildirmişlerdir. Çoklu-CLEA sentezinin bu sorunların aşılmasında etkili olduğunu göstermişlerdir.

Genel olarak çoklu-CLEA'lar, agregatlar oluşturmak için denatürasyona uğramadan ve daha sonra agregatları genellikle uygun dialdehitler genellikle glutaraldehit gibi iki fonksiyonlu bir ajan kullanarak bağlayarak inorganik tuzlar veya organik çözücüler gibi ajanlar tarafından iki veya daha fazla çözünür enzimin birlikte çökeltilmesiyle oluşturulur (Gupta vd., 2007; Talekar vd. 2013a).

2.4 Literatür özeti

Shah vd. (2006), yaptıkları çalışmada *Pseudomonas cepacia* lipazının ve penisilin açılazın CLEA formunu hazırlamışlardır. Proteik feeder BSA varlığında hazırlanan lipaz CLEA'sı aktivitesini başlangıç aktivitesine göre %100 koruduğu gözlenirken, BSA olmadan hazırlanan CLEA'nın başlangıç aktivitesinin yalnızca %0.4'ünü koruduğunu gözlemlemişlerdir. Tribütürinin transesterifikasyon tepkimesinde lipaz CLEA'sı kullanıldığında serbest enzime kıyasla aktivitenin 12 kat arttığını gözlemişlerdir. Jatropa yağının transesterifikasyonunda serbest enzimle %77 dönüşüme

ulaşmak için 50 mg serbest lipaz ve 8 h gerekli iken, CLEA ile %90 dönüşüme ulaşmak için sadece 6.25 mg lipaz ve 6 h gerektiğini belirtmişlerdir. Penisilin ailaz kullanıldığında, BSA ile hazırlanan CLEA aktivitesini %86 korurken; BSA olmadan hazırlanan CLEA aktivitesini %50 koruduğunu ayrıca BSA olmadan hazırlanan CLEA aktivitesinin 45°C'de 8 h sonunda %20 azaldığını, aynı koşullarda BSA içeren CLEA'nın aktivitesini tamamen koruduğunu bildirmişlerdir.

Dalal vd. (2007), çalışmalarında α -amilaz, lipaz ve fosfolipazA2 enzimlerinin oklu-CLEA formunu sentezlemişlerdir. Termal stabilitenin serbest enzime kıyasla büyük ölçüde kararlılık gösterdiğini sunmuşlardır. V_{max} ve K_m değerlerinde fosfolipazA2 ve lipaz için büyük ölçüde değişiklik olmazken α -amilaz için büyük ölçüde azalma olduğunu göstermişlerdir. SEM görüntüleri ile yeniden kullanımlar sonrası morfolojideki değişiklikleri sunmuşlardır. Presipitant türü olarak aseton, dimetoksietan (DME) ve t-bütanol organik çözücülerini kullanmışlardır. Çapraz bağlanma süresinin artmasıyla aktivitede azalma olduğunu bildirmişlerdir. En iyi aktivite sonuçlarını; 20 mM GA, DME kullanılarak sentezlenen oklu-CLEA'larda elde etmişlerdir.

Aytar ve Bakır (2008), çalışmalarında, mantardan izole ettikleri tirozinaz enziminin CLEA formunu sentezlemişlerdir. CLEA aktivitesi zerindeki $(NH_4)_2SO_4$, GA ve BSA derişim etkilerini araştırmışlar ve CLEA'yı pH, ısı ve saklama kararlılığı yönünden incelemişlerdir. Serbest enzime kıyasla enzimin CLEA formunun optimum pH ve sıcaklık değerlerinde küçük değişikliklerin meydana geldiğini bildirmişlerdir. CLEA için optimum sıcaklık ve pH değerlerini sırasıyla; 34°C ve 6.5, serbest trizonaz için 32°C ve 7.0 olarak belirlemişlerdir. Serbest trizonaz ve CLEA'sının üç aydan fazla bir sürede 4°C'de saklanması sonucunda başlangıç aktivitelerinin sırasıyla %36 ve %84'ünün korunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca oda sıcaklığında üç aydan fazla saklanan CLEA'nın başlangıç ativitesinin %83'n koruduğu dolayısıyla saklama sıcaklığının CLEA aktivitesini etkilemediğini rapor etmişlerdir.

Sangeetha ve Abraham (2008) alışmalarında *Bacillus subtilis*'den üretilen proteaz enziminin CLEA'sını sentezlemişlerdir. Enzimin agregatlarını $(NH_4)_2SO_4$ ve polietilen glikol ortamlarında, Triton X-100 ve tween 20 surfektanları varlığında hazırlamışlar; pH, sıcaklık, enzim kinetiği, termal kararlılığı ve organik çözücülerdeki kararlılığını araştırmışlardır. CLEA için optimum pH ve sıcaklık değerlerini sırasıyla 9.0 ve 70°C

olarak bulunmuşlardır. Ayrıca CLEA'nın tekrar kullanılabilirliği ve yüzey morfolojisi üzerine de araştırma yapmışlardır. Subtilisin CLEA'sının, hekzan ve siklohekzan gibi polar olmayan organik çözücülerde kararlılığının oldukça iyi olduğu ve 60°C'ye kadar yüksek termal kararlılığa sahip olduklarını belirtmişlerdir. Bu nedenle sulu ortamda çözünmeyen bileşiklerin biyotransformasyonu için katalizör olarak kullanılabileceklerini bildirmişlerdir. Farklı katkı maddeleri kullanılarak CLEA'nın aktivite değerlerini belirlemişlerdir. TritonX-100 ve polietilen glikol (PEG) birlikte kullanıldığında en düşük aktivite değeri gözlenirken, (NH₄)₂SO₄ kullanıldığında en yüksek aktivite değerini gözlemlemişlerdir. Subtilisin CLEA'sının, 60°C'de 11 kez kullanıldıktan sonra aktivitesinin %68'ini koruduğu ve bu nedenle tekrar kullanılabilirlik için uygun olduğunu belirtilmiştir.

Matijosyte vd. (2010), *Trametes versikolor*, *Trametes villosa* ve *Agaricus bisporus* olmak üzere üç farklı mikroorganizmadan izole edilen lakkaz enzimlerinin CLEA'larını hazırlamışlardır. Presipitant türü, pH, sıcaklık, GA derişimi ve çapraz bağlanma süresi gibi çeşitli parametrelerin CLEA'ların geri kazanım aktiviteleri üzerine etkilerini incelemişler her bir CLEA'nın işletme ve saklama kararlılıkları için farklı sonuçlar elde etmişlerdir. Lakkaz ile elde edilen CLEA'ların, serbest enzime göre beklenen kararlılık artışı gösterdiğini ancak bunun yüzeydeki lizin kalıntılarının sayısı ile doğrudan bir ilişkisinin olmadığını belirtmişlerdir. BSA'nın enzim kararlılığını arttırmadığını gözlemlemişlerdir. Lakkaz CLEA'ların, pH'ı 4 olan sulu tamponda aldehitlere benzer olarak lineer C₅-C₁₀ alifatik alkollerinin aerobik oksidasyonu için aktif ve kararlı katalizör olduklarını belirtmişlerdir. Sonuç olarak CLEA'ların serbest enzime göre daha yüksek kataliz hızına sahip olduklarını ve CLEA'ların kayda değer bir aktivite kaybı olmadan birkaç kez kullanılabildiğini bildirmişlerdir.

Yamaguchi vd. (2011), sentezledikleri CLEA'larda Lys katkısının etkisini incelemişlerdir. Çapraz bağlayıcı yokken herhangi bir bulanıklık olmadığını, Lys varlığının arttırılması ile hazırlanan CLEA'daki bulanıklığın arttığını bunun da etkili şekilde çapraz bağlanmadan kaynaklandığını düşünmüşlerdir. Lys konsantrasyonunun arttırılmasıyla aktivitenin de arttığı görülmüştür. Ayrıca CLEA'ların 1.6 kat daha fazla termal stabilite gösterdiklerini sunmuşlardır.

Talekar vd. (2012) çalışmalarında α -amilaz enziminin manyetik CLEA'sını hazırlamışlardır. Başlangıçtaki α -amilaz aktivitesinin %100'ü manyetik CLEA ile geri kazanılırken, manyetik olmayan CLEA ile α -amilazın düşük lizin içeriğinden dolayı sadece %45 oranında geri kazanım sağlamışlardır. SEM analiz sonuçları ile CLEA ve manyetik CLEA'nın küresel yapıda olduğunu belirlemişlerdir. CLEA ve manyetik CLEA için optimum pH değerinin asidik yönde değiştiğini, manyetik CLEA'nın optimum sıcaklığının serbest enzim ve CLEA'ya göre arttığını bildirmişlerdir. CLEA ve manyetik CLEA'da enzimin V_{max} değerlerinin değişmediğini ancak enzimin substrat afinitesinin arttığını gözlemlemişlerdir. Manyetik CLEA'nın ısı ve saklama kararlılıklarının manyetik olmayan CLEA'ya kıyasla fazla olduğunu ve manyetik CLEA'nın başlangıç aktivitesini 6 kez kullanıldığında da %100 koruduğunu belirlemişlerdir.

Talekar vd. (2013a), amilaz, pullulanaz ve glukoamilaz enzimlerini kullanarak sentezledikleri çoklu-CLEA çalışmalarında çoklu-CLEA biyokatalizörünün %100 aktivite sergilediğini bunun yanı sıra serbest enzimlerin ise %60 ve %40 aktivite sergilediğini bildirmişlerdir. Çoklu-CLEA'nın aktivitesinin 5 döngüye kadar iyi korunduğunu ve termal stabilitesinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Kim vd. (2013) yapmış oldukları çalışmada, *Candida boidinii*'den format dehidrojenazı immobilize etmek için CLEA yöntemini kullanmışlardır. CLEA'ların hazırlanması için optimum koşullar, çapraz bağlayıcı ajan miktarı ve yapısı, katkı maddesi derişimi, çapraz bağlanma süresi ve pH gibi çeşitli parametrelerin etkileri incelenerek belirlenmiştir. CLEA'ların geri kazanılan aktivitesinin GA derişimine önemli ölçüde bağlı olduğunu ancak çapraz bağlama özelliği zayıf olan dekstran polialdehit içeriğinin geri kazanım aktivitesini ciddi bir şekilde etkilemediğini bildirmişlerdir. Ayrıca proteik besleyici BSA'nın enzimin aktivite geri kazanımını %130 arttırdığını gözlemlemişlerdir. Dextran polialdehid ile hazırlanan CLEA'nın on kullanımdan sonra aktivitesini %95'in üzerinde koruduğunu bildirmişlerdir. Yüksek GA derişiminin ve çapraz bağlanma süresinin uzun olmasının CLEA aktivitesini olumsuz yönde etkilediğini ve CLEA için optimum pH değerinin 7.0 olduğunu bildirmişlerdir.

Mahmod vd. (2014) yaptıkları çalışmada lipaz enzimini nehir kanalı yayın balığı olan *Ictalurus punctatus*'ın iç organlarından ekstrakte etmiş ve CLEA formunu oluşturmuşlardır. Yaptıkları çalışmada çapraz bağlayıcı olarak GA, presipitant ajan

olarak aseton ve lipaz CLEA'sının aktivitesini geliştirmek için katkı maddesi olarak da BSA kullanmışlardır. Bu çalışmalar sonucunda lipaz CLEA'sının spesifik aktivitesi 1.713 U/mg olarak bulunmuş ve bu değerin serbest lipaz aktivitesine göre %20.43 kat fazla olduğu belirtilmiştir.

Mahmod vd. (2015), yayın balığından izole ettikleri lipaz ve proteaz enzimlerinin çoklu-CLEA formunu sentezlemişlerdir. Çalışmalarında agregasyon, çapraz bağlanma katkı maddelerinin çoklu-CLEA aktivitesini incelemişlerdir. BSA'nın lipaz ve proteaz için aktiviteyi arttırmak için etkili bir proteik besleyici olduğunu bildirmişlerdir. Proteaz-lipaz çoklu-CLEA'ların sentezinde optimum değerleri; çapraz bağlayıcı için GA derişimini 65 mM, presipitant (NH₄)₂SO₄ derişimini %55 (w/v) ve proteik besleyici olarak BSA derişimini 0.113 mM olarak bildirmişlerdir. Çalışma sonuçları yüksek aktiviteye, stabiliteye ve yüksek tekrar kullanılabilirliğe sahip yeni bir katalizör geliştirdiklerini göstermiştir. Deterjan endüstrisinde kullanımın yanı sıra biyodizel üretiminin katalizlenmesinde de proteaz-lipaz çoklu-CLEA biyokatalizörlerinin kullanılabileceğini savunmuşlardır.

Khanahmadi vd. (2015), kakao çekirdek zarından izole edilen lipaz enziminin CLEA formunu sentezlemiş ve bu sentez için GA, (NH₄)₂SO₄ ve BSA derişimlerinin optimum koşullarını cevap yüzey yöntemi kullanarak belirlemişlerdir. %20 doygunlukta (NH₄)₂SO₄, çapraz bağlayıcı olarak 60 mM GA ve proteik besleyici olarak 0.17 mM BSA kullanarak, 20 kez kullanımdan sonra kaydedilen en yüksek aktiviteyi 9.407 U (geri kazanılan aktivite %83) bulmuşlardır. Ayrıca serbest enzim ve immobilize enzim için optimum pH değerleri sırasıyla 8.0 ve 8.2, optimum sıcaklıkdeğerleri 45 °C ve 60°C olarak belirlemişlerdir. CLEA'nın pH ve sıcaklık kararlılığının serbest lipaza göre fazla olduğunu ve CLEA'nın K_M değerinin de serbest lipaza kıyasla fazla olduğunu belirlemişlerdir. Serbest enzime göre CLEA, altı kez tekrar kullanıldıktan sonra ilk aktivitesinin %60'ından fazlasını koruduğunu bildirmişlerdir.

Stressler vd. (2015), çalışmalarında x-prolil-dipeptidil aminopeptidaz (PepX) ve aminopeptidaz N (PepN) çoklu-CLEA sentezini gerçekleştirmişlerdir. En uygun presipitant türünü 8 farklı presipitant denemesi sonucunda (NH₄)₂SO₄ olarak belirlemişlerdir. Organik çözücülerin presipitant olarak kullanıldığında aktivite veriminin %3 altında olduğunu bildirmişlerdir. (NH₄)₂SO₄ kullanıldığında sırasıyla

PepX ve PepN için %10 ve %6 aktivite verimliliği gözlemişlerdir. 0.1 – 4 M derişimleri arasında $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ presipitantı deneyerek en yüksek aktivite verimliliğini 3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ presipitantı varlığında %14 olarak elde etmişlerdir. Çapraz bağlayıcı derişimi ve çapraz bağlanma süresinin aktivite verimliliğine etkisini incelemişler ve aktivite verimliliğinin en yüksek olduğu 2 – 4 h çapraz bağlanma süresi ve aktivite verimliliğinin en yüksek olduğu 50 – 100 mM çapraz bağlayıcı derişimi olarak bildirmişlerdir.

Zhang vd. (2015), *Thermomyces lanuginosus* lipazı CLEA'sı sentezinde lipaz derişimi, presipitant türü, GA derişimi, katkı maddeleri ve derişimlerini incelemişlerdir. Etanol, PEG 1500, PEG 800, aseton ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ presipitantları kullanılarak sentezledikleri CLEA'nın en yüksek aktivite sonucunu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kullanılarak sentezlenen CLEA'da elde etmişlerdir. Katkı maddesi türü olarak sodyum bis-2-etilhekzil sülfosukkinat, setrimid, Tween 80 ve Triton X-100 kullanılmıştır. En iyi aktiviteyi Tween 80 kullandıkları CLEA'larda elde etmişlerdir. Lipaz derişiminin artırılmasıyla CLEA aktivitesinin düştüğünü bildirmişlerdir. GA derişiminin artırılmasıyla CLEA aktivitesinin bir miktar arttığını daha sonra azalma görüldüğünü sunmuşlardır.

Sojitara vd. (2016), çalışmalarında α -amilaz, pektinaz ve selüloz manyetik nanopartikül üzerine immobilizasyonu ile çoklu-CLEA sentezlemişlerdir. Sentezledikleri manyetik çoklu-CLEA ile serbest enzim formlarının yarılanma ömrünün 2.4 kat daha fazla olduğunu, 50 – 70 °C sıcaklık değerleri arasında termal stabilitesini sürdürdüğünü, 3 – 6 pH değerleri arasında stabilitesini koruduğunu gözlemlemişlerdir. İmmobilizasyon sonunda K_m değerleri yüksek iken V_{max} değerlerinin daha düşük olduğunu rapor etmişlerdir. Manyetik çoklu-CLEA'ların tekrar kullanılabilirliğinin 8. döngü sonunda %77 aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir.

Rehman vd. (2016) çalışmalarında *Penicillium notatum* lipazını çapraz bağlayıcı ajan GA ve etilen glikol-bis [süksinik asit N-hidroksisüksinimid] kullanarak CLEA şeklinde immobilize etmişlerdir. Verimli bir CLEA sentezi için çöktürücü tipi, çapraz bağlanma süresi, çapraz bağlayıcı yapısı ve miktarı gibi parametreleri optimize etmişlerdir. CLEA'nın aktivitesinin GA'nın derişimine önemli ölçüde bağlı olduğunu ancak diğer çapraz bağlayıcı derişiminden önemli ölçüde etkilenmediğini bildirmişlerdir.

CLEA'ların en yüksek enzim aktivitesini pH 9.0 ve sıcaklık 42°C değerlerinde elde etmişlerdir. Sulu ortamda on kez kullanımdan sonra, GA ve etilen glikol-bis çapraz bağlı lipaz CLEA'ların sırasıyla başlangıç aktivitelerinin %63.62 ve %70.9'unu koruduklarını belirlemişlerdir.

Chen vd. (2017), çalışmalarında papain ve nötraz enzimlerinin çoklu-CLEA formunu sentezlemişlerdir. İki veya daha fazla enzimin taşıyıcısız CLEA formunun sentezlenmesinin taşıyıcı üzerine immobilizasyonuna kıyasla daha kolay olduğunu bildirmişlerdir. Optimum koşullar altında sentezlenen nötraz-papain çoklu-CLEA biyokatalizörünün serbest enzimlere göre daha yüksek termostabilite ve pH stabilitesi olduğunu göstermişlerdir. 4°C sıcaklık ve pH=7 değerlerinde yüksek depolama aktivitesi olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca polar olmayan ve hidrofilik çözücülerde daha yüksek aktivite tutulduğunu söylemişlerdir. Çapraz bağlanma sonrası çoklu-CLEA'ların molekül ağırlığı, termal denatürasyon sıcaklığının arttığı ve izoelektrik noktanın da azaldığını göstermişlerdir. Çoklu-CLEA'ların yüksek aktivitesini ve stabiliteğini, daha yüksek yüzey alanına ve yüzeydeki daha fazla boşluğa bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Talekar vd. (2017), çalışmalarında α -amilaz, pullulanaz ve glukoamilazın demir nano partikül üzerine immobilizasyonu ile çoklu-CLEA'larını sentezlemişlerdir. Elde ettikleri çoklu-CLEA aktivitesinin; işlevselleştirilmiş cam taneciklerine, polianilin, iyon değişim tanecikleri, jelatin, aljinat tanecikleri, kitosan tanecikleri, mezoporöz silika gibi farklı katı tanecikler üzerine immobilize edilen CLEA aktivilerine kıyasla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca çoklu-CLEA aktiviteleri hem serbest enzimler hem de immobilize enzimler ile karşılaştırılmıştır. Çoklu-CLEA'lar daha fazla nişasta hidrolize edilerek daha büyük miktarlarda glikoz ürettiklerinden, çoklu-CLEA'ların daha faydalı olduğunu bildirmişlerdir. Tek basamakta gerçekleştirilen nişasta dönüşümünde serbest enzimlerin %70 dönüşüm sağlarken, çoklu-CLEA'ların %100 dönüşüm sağladığını gözlemlemişlerdir. Çoklu-CLEA yapısının termal kararlılık ve katalitik verimliliği büyük ölçüde etkilendiğini göstermişlerdir. Sentezledikleri çoklu-CLEA biyokatalizörü 8 döngüye kadar aktivitesinin büyük kısmını korumuştur.

Goetze vd., (2017), sentezledikleri 3 enzimli çoklu-CLEA biyokatalizöründe 4 farklı presipitant türü, çapraz bağlayıcı derişimi, bağlanma süresi ve proteik besleyicilerin çoklu-CLEA aktivitesine etkisini incelemişlerdir. Proteik besleyici kullanılan ve

kullanılmayan çoklu-CLEA'nın serbest enzime kıyasla 1.5 kat daha fazla termal stabilitesi olduğun bildirmişlerdir. Çoklu-CLEA sentezinde en uygun koşulları 5 saat reaksiyon süresi, 110 mM GA, 0.66 mg/mL proteik besleyici ilavesi ve presipitant türünü etanol olarak bildirmişlerdir. Çoklu-CLEA aktivitesinde 10 döngü sonunda %20 geri kazanım elde ettiklerini bildirmişlerdir.



3. MATERYAL ve METOT

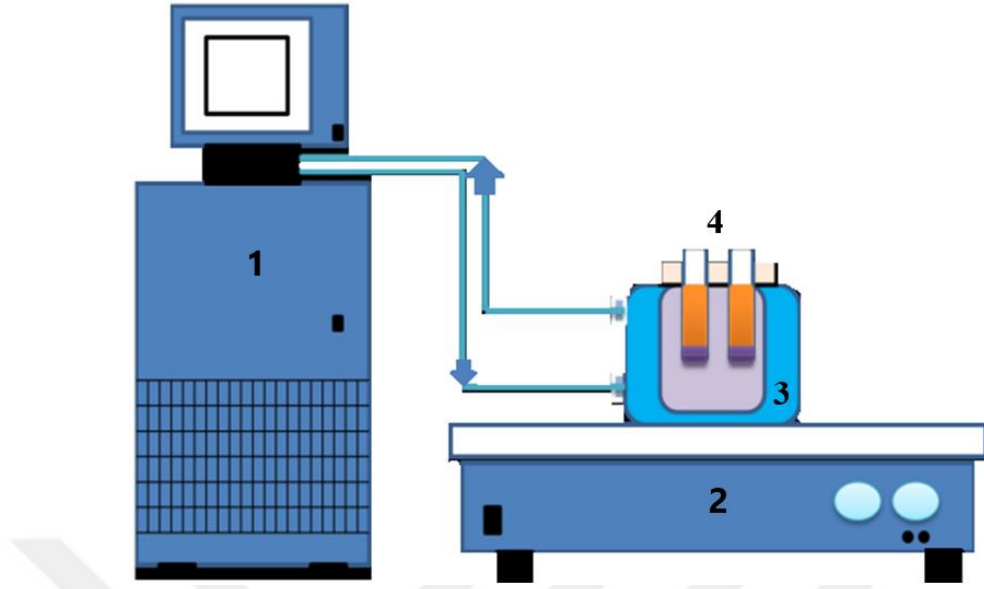
3.1 Materyal

Bu çalışmada çoklu-CLEA hazırlanması sürecinde *Aspergillus oryzae*'dan üretilen (E.C. 3.2.1.1) α -amilaz (Fluka, 10065) ve *Candida rugosa*'dan üretilen (E.C. 3.1.1.3) lipaz (Sigma, L1754) enzimleri kullanılmıştır. Bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajan olarak gluteraldehit (Sigma-Aldrich, G5882, Grade I %25'lik çözelti), presipitasyon ajan türleri olarak $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck, 101217), aseton (Sigma-Aldrich, 32201), etanol (Merck, 111727), PEG-200, PEG-6000 ve taç eter maddeleri kullanılmıştır. Katkı maddeleri olarak L-lizin (Sigma, L5501), BSA (Sigma, A2153) ve Triton X-100 (Sigma, 93426) kullanılmıştır. Deneylerde Na_2HPO_4 (Merck, 106586) ve $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, 106345) tuzlarını içeren tampondan yararlanılmıştır. Çoklu-CLEA aktivitelerinin belirlenmesinde amilaz enziminin substratı olarak çözünür nişasta (Merck, 101257), lipaz enziminin substratı olarak *p*-Nitrofenil asetat (*p*-NPA) (Sigma-Aldrich, N8130) kullanılmıştır. *p*-Nitrofenil asetat çözeltisi asetonitril (Sigma-Aldrich, 34851) ortamında hazırlanmıştır. Amilaz aktivitesi ölçümünde 3,5-Dinitrosalisilik asit (Aldrich, 12884), $\text{CH}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck, 8085) ve NaOH (Merck, 106462) kimyasalları kullanılmıştır. Deneylerde tüm sulu çözeltilerin hazırlanmasında ultra saf su sisteminden (Milli-Q, Gradient, Millipore) alınan ve iletkenlik değeri 18.2 M Ω .cm (25°C) olan deiyonize su kullanılmıştır.

3.2 Çoklu-CLEA Sentezi

Birden fazla enzimi içeren çoklu-CLEA sentezinde, Araştırma Grubumuz tarafından tek bir enzimi içeren CLEA sentezini içeren çalışmalar temel alınarak küçük bazı modifikasyonlar yapılmış ve çoklu-CLEA sentezinde aşağıda açıklanan yöntem izlenmiştir.

İki enzimi içeren çoklu CLEA sentezinde lipaz ve amilaz enzimleri Na_2HPO_4 - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tamponu (0.1 M, pH=7.5) içinde vorteks cihazı (IKA, Vortex Genius 3) kullanılarak çözülmüştür. Ardından enzim üretim ortamından gelen safsızlıkların giderilmesi ve agregat oluşumu için presipitasyon ajanı ortama eklenerek 2 h süreyle ve 200 rpm karıştırma hızında ceket tipi reaktöre yerleştirilerek 4 °C'de karıştırılmıştır. Reaktörde 4°C sıcaklık sirkülatör (Thermo Electron Co., HAAKE Phoenix II P2-C25P sirkülatör) yardımıyla sağlanırken karıştırma işlemi ise orbital karıştırıcı (Lab Companion, Dual-Action Shaker AAH31105K) ile yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Çoklu-CLEA sentez sistemi; 1) Sirkülatör, 2) orbital karıştırıcı, 3) ceket tipi reaktör, 4) enzim çözeltileri

Karıştırma işlemi sonunda ortama gluteraldehit eklenerek çapraz bağlanma tepkimesi 30 min aynı sıcaklık ve karıştırma hızında devam ettirilmiştir. Tepkime sonunda örnekler 4°C sıcaklıkta buzdolabında 24 h bekletilmiştir. Bu süre sonunda lipaz ve amilaz enzimlerini içeren çoklu-CLEA biyokatalizörlerinin çözelti ortamından geri kazanımı için örnekler 10000 rpm karıştırma hızında, 4°C sıcaklıkta 30 min boyunca soğutmalı santrifüj cihazında (Selecta Co., Medifriger BL-S Model) santrifüjlenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Soğutmalı santrifüj cihazı.

Santrifüj işlemi üç kez tekrarlanmış ve her bir santrifüj sonunda üst fazı atılan örneklerdeki agregatlar $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tamponu ($\text{pH}=7.5$, 0.1 M) ile yıkanmıştır. Bu işlemler sonunda sentezlenen çoklu-CLEA örnekleri liyofilize edilmiş (Telstar, Lyostar-85) ve 4°C sıcaklıkta bir sonraki basamağa kadar saklanmıştır (Akkuş, 2015; Salgın ve Salgın, 2017; Elaldı, 2018).

Çoklu-CLEA sentezinde çapraz bağlanma süresi (15, 30, 45 ve 60 min), çapraz bağlayıcı ajan miktarı (32.6, 65.2, 130.4 mM), toplam enzim derişimi (100, 150, 200 mg mL^{-1}), presipitasyon ajanı türü ve miktarı (etanol, aseton, PEG-200, PEG-6000 ve taç eter) ve katkı maddeleri tür ve miktarının (L-lizin, BSA, Triton X-100 ve taç eter) çoklu-CLEA aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir.

3.3 Çoklu-CLEA Aktivitesinin Belirlenmesi

İkili enzim sistemi şeklinde sentezlenen çoklu-CLEA aktivitesi, bu sistemi oluşturan amilaz ve lipaz enzimlerinin ayrı ayrı aktiviteleri ölçülerek belirlenmiştir. Her bir ölçümde 0.002 g çoklu-CLEA kullanılmıştır ve ölçümler üç kez tekrarlanarak ortalama değerleri alınmıştır.

Amilaz enziminin aktivitesi 1 mL enzim çözeltisinin içinde 20°C 'de, 3 min sonucunda ortaya çıkan mg maltoz miktarı (U) olarak tanımlanmıştır. Yöntemde; 1 mL enzim çözeltisi, 1 mL, $\text{pH}=6.9$ olan 0.02 M 100 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tamponunda

çözölmüş 1 g nişasta çözeltilisi ile 20°C ve 200 rpm karıştırma hızında 3 min inkübe edilir. Ardından 3,5-dinitrosalisilik asit, $C_4H_4KNaO_6.4H_2O$ ve NaOH içeren çözeltiliden 2 mL eklenir ve karışım 5 min kaynayan su içinde bekletilir. Bu süre sonunda örneklerin absorbands değeri $\lambda=520$ nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak UV-Vis spektrofotometre (UV-Vis 1800, Shimadzu) cihazında belirlenir.

Çoklu-CLEA bünyesindeki lipaz enziminin aktivitesi *p*-NPA'nın lipaz enzimi ile tepkimesi sonunda üretilen *p*-NP'nün üretim hızı 25°C sıcaklık, 200 rpm karıştırma hızı, 30 min inkübasyon sonucunda ölçölerek belirlenmiştir. *p*-NP üretim hızı spektrofotometrik olarak UV-Vis spektrofotometre (UV-Vis 1800, Shimadzu) cihazında *p*-NP'nin maksimum absorbands verdiği $\lambda=404$ nm dalga boyunda belirlenmiştir. Lipaz aktivitesi ölçümünde kullanılan *p*-NPA 0.05 M derişiminde asetonitril çözücüsü kullanılarak hazırlanmıştır.

3.4 Çoklu-CLEA için Uygun pH ve Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

Çoklu-CLEA biyokatalizörleriyle gerçekleştirilecek tepkimeler için en uygun pH ve sıcaklık değeri, enzim aktivitesinin en yüksek olduğu pH ve sıcaklık değeri belirlenerek bulunmuştur.

Çoklu-CLEA için optimum pH değeri; 25°C sıcaklıkta, 300 rpm karıştırma hızında, pH=6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 değeriinde biyokatalizörlerin 1 h inkübasyon süresi sonunda yapılan aktivite ölçümleri ile belirlenmiştir. Çoklu-CLEA için optimum sıcaklık değeri; pH=7.5, 300 rpm karıştırma hızında, T=15, 25, 35, 45, 55, 65°C sıcaklık değeriinde biyokatalizörlerin 1 h inkübasyon süresi sonunda yapılan aktivite ölçümleri ile belirlenmiştir.

3.5 Çoklu-CLEA Tekrar Kullanılabilirliği

Çoklu-CLEA'nın tekrar kullanılabilirliği optimum sıcaklık ve pH (pH=7.5 ve T=35°C) değeriinde ardışık olarak gerçekleştirilen aktivite ölçümleri ile belirlenmiştir. Her bir aktivite ölçümü tepkimesinden sonra çoklu-CLEA'lar 5 min, 10000 rpm ve 4°C koşullarında santrifüjlenerek tepkime ortamından geri kazanılmıştır.

3.6 Çoklu-CLEA Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

Çoklu-CLEA'ların Michealis-Menten kinetik sabitleri, optimum sıcaklık ve pH (pH=7.5 ve T=35°C) değeriinde başlangıç tepkime hızlarının ölçölmesiyle belirlenmiştir. Çoklu-CLEA bünyesindeki lipaz enzimi için *p*-NPA substratı, amilaz enzimi için ise nişasta substratı farklı derişimlerde hazırlanmış ve her bir derişim için

başlangıç tepkime hızları ölçülmüştür. Elde edilen veriler Michealis-Menten denkleminin (Eş. 2.1) lineerleştirilmiş formu olan Lineveawer-Burke denklemine (Eş. 2.2) uygulanarak çoklu-CLEA biyokatalizörleri için Michealis-Menten kinetik sabitleri belirlenmiştir.

3.7 Çoklu-CLEA Karakterizasyonu

Sentezlenen biyokatalizörlerin morfolojisi ve kimyasal yapısı sırasıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve Fourier dönüşümlü infrared (FTIR) spektroskopi analizleri ile belirlenmiştir. FTIR spektrometresinde (Spectrum 100, Perkin Elmer), 4 cm^{-1} spektral çözünürlükte, $4000 - 650\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında CLEA biyokatalizörlerinin kimyasal yapılarındaki değişimler belirlenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 FT-IR spektrometresi.

Farklı koşullarda sentezlenen CLEA'ların yüzey morfolojileri ise öncesinde altın-paladyum kaplanarak SEM (FEI, Quanta 400F) cihazında analiz edilmiştir. Bu işlemler Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkezi Laboratuvar'ından hizmet alımı ile yaptırılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

CLEA sentezinde toplam enzim derişimi (100, 150 ve 200 mg/mL), çapraz bağlanma süresi (15, 30, 45 ve 60 min), çapraz bağlayıcı miktarı (32.6, 65.2 ve 130.4 mM), presipitasyon ajanı türü ve miktarı (etanol, aseton, PEG-200, PEG-6000 ve ta eter) ve katkı maddelerinin L-lizin, BSA, Triton X-100 ve ta eter) oklu-CLEA aktivitesine etkileri incelenmiştir.

Çoklu-CLEA sentezinde toplam enzim derişimi, çapraz bağlanma süresi ve çapraz bağlayıcı derişimi etkilerinin incelendiği deney setlerinde CLEA’lar (NH₄)₂SO₄ presipitantı ile hazırlanmıştır. Çoklu-CLEA sentezine katkı maddesi etkisinin incelendiği deney setinde ise oklu-CLEA’lar PEG-6000 presipitantı ile hazırlanmıştır.

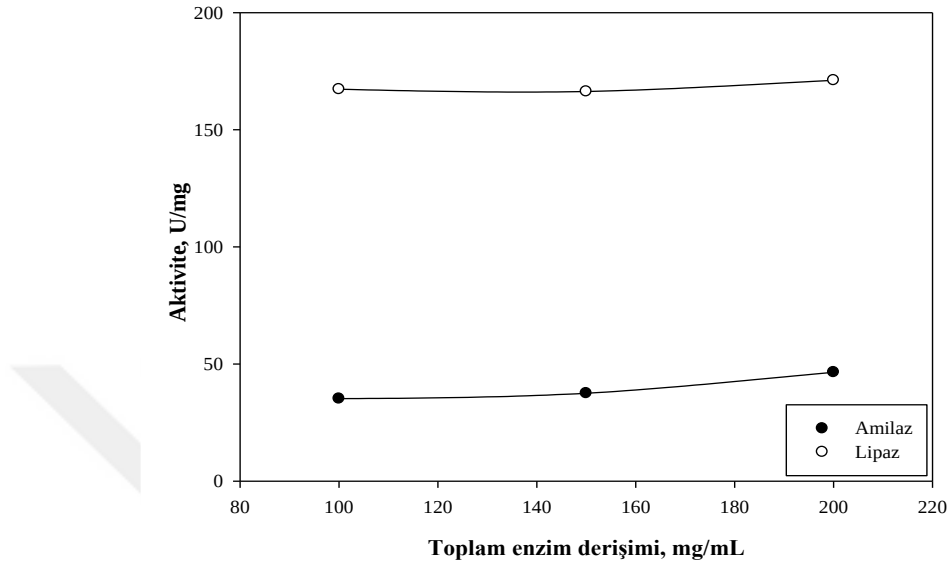
4.1 Toplam Enzim Derişiminin oklu-CLEA Aktivitesine Etkisi

Çoklu-CLEA yapısında bulunan amilaz ve lipaz enzimlerinin kütlece oranları 1:1 olacak şekilde toplam enzim derişimi 100, 150 ve 200 mg/mL derişimlerinde tepkime ortamına eklenmiş ve Bölüm 3.2’de belirtildiği şekilde CLEA sentez tepkime gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen CLEA’ların aktivitelerinin toplam enzim derişimi ile değişimi Şekil 4.1’de sunulmuştur. Toplam enzim derişiminin 100 mg/mL derişimden 200 mg/mL derişim değerine artırılması ile amilaz aktivitesi 1.32 kat, lipaz aktivitesi 1.02 kat artmıştır.

Kartal vd. (2011), lipaz enziminin CLEA formunu hazırladıkları çalışmalarında lipaz başlangıç enzimi derişiminin (12.5 – 100 mg/mL) CLEA’lara etkisini incelemiş ve serbest enzimlere göre aktivitelerini kıyaslamıştır. CLEA aktivitesinin 50 mg/mL enzim derişimine kadar arttığı gözlenirken daha sonra azaldığı bildirilmiştir. Zhang vd. (2015) biyodizel üretimi için lipaz enziminin CLEA formunu sentezledikleri çalışmalarında, başlangıç lipaz derişiminin (5 – 25 mg/mL) CLEA ile gerçekleştirilen transesterifikasyon tepkime verimini düşürdüğünü bildirmişlerdir. Yüksek enzim derişiminin kompakt CLEA formu oluşumuna yol açtığını ve bu sayede iç kütle aktarım sınırlamalarının arttığını bildirmişlerdir.

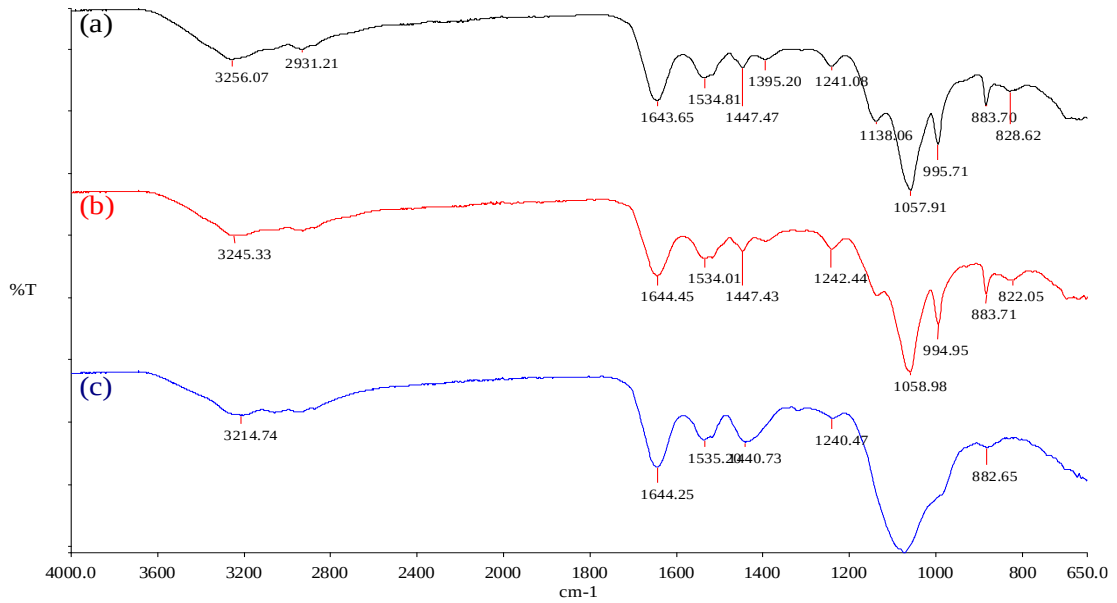
Çalışmamızda incelenen başlangıç enzim derişimleri yukarıda verilen çalışmalara göre daha yüksek derişimde olup hazırladığımız CLEA formu iki enzimi (lipaz ve amilaz) içermektedir. Lipaz aktivitesinin toplam enzim derişimi değişiminden çok fazla

etkilenmediği amilaz enziminin ise aktivite değerinin bir miktar arttığı gözlenmiştir. Çoklu-CLEA hazırlamasında toplam enzim derişimi sonraki çalışmalar için 150 mg/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1 Çoklu-CLEA aktivitesinin toplam enzim derişimi ile değişimi.

Farklı başlangış toplam enzim derişimlerinde çoklu-CLEA'ların kimyasal yapıları FTIR spektroskopisi ile belirlenmiş ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

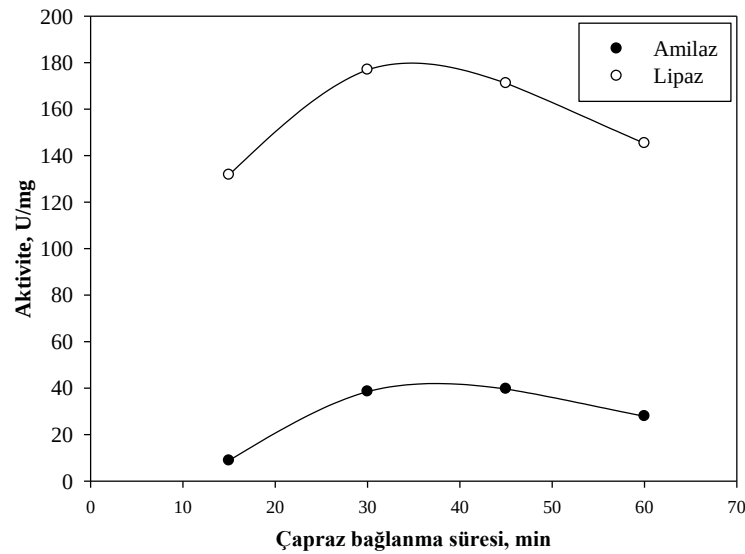


Şekil 4.2 FTIR spektrumları: Toplam enzim derişimi etkisi, (a) 100 mg/mL, (b) 150 mg/mL ve (c) 200 mg/mL.

Her üç derişim değesinde de beklenildiğı gibi protein yapısına ait olan pikler gözlenmiştir. Peptid grubu titreşimlerine bağı olarak ana protein bantları 1900 – 1200 cm^{-1} spektral bölgede meydana gelmektedir: amid I bandı (1600 – 1700 cm^{-1}) C=O gerilme titreşimlerinden, amid II bandı (1580 – 1510 cm^{-1}) N-H eğilme titreşimi ve C-N gerilme titreşimlerinden, amid III bandı (1400 – 1200 cm^{-1}) N-H eğilme titreşimi, C-C α ve C-N gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. FTIR spektroskopisinde 3342 – 3392 cm^{-1} dalga boyları arasında bulunan geniş pikler N-H ve O-H gerilme titreşimlerinden, 2928 – 2937 cm^{-1} dalga sayıları arasındaki pikler ise C-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Natalello vd., 2005; Salgın ve Salgın, 2017).

4.2 Çapraz Bağlanma Süresinin Çoklu-CLEA Aktivitesine Etkisi

Çoklu-CLEA sentezinde çöktürme işleminden sonra enzim agregatlarının bifonksiyonel ajan gluteraldehit ile çapraz bağlanma tepkimesinde bağlanma süresi 15, 30, 45 ve 60 min sürelerde incelenmiştir. CLEA'ların aktivitelerinin bağlanma süresi ile değişimi Şekil 4.3'te sunulmuştur.



Şekil 4.3 Çoklu-CLEA aktivitesinin çapraz bağlama süresi ile değişimi.

Çoklu-CLEA sentezinde çapraz bağlanma süresinin artması ile her iki enzim aktivitesinde önce artış sonra düşüş gözlenmiştir. Tepkime süresinin 15 min'den 30 min'e arttırılması ile amilaz aktivitesi 4.35 kat, lipaz aktivitesi 1.34 kat artmıştır. 60 min tepkime süresi sonunda ise amilaz ve lipaz enzim aktivitelerinde -30 min. süresi ile

gerçekleştirilen tepkimeye kıyasla- amilaz aktivitesinde 0.72 kat azalma, lipaz aktivitesinde 0.82 kat azalma gözlenmiştir.

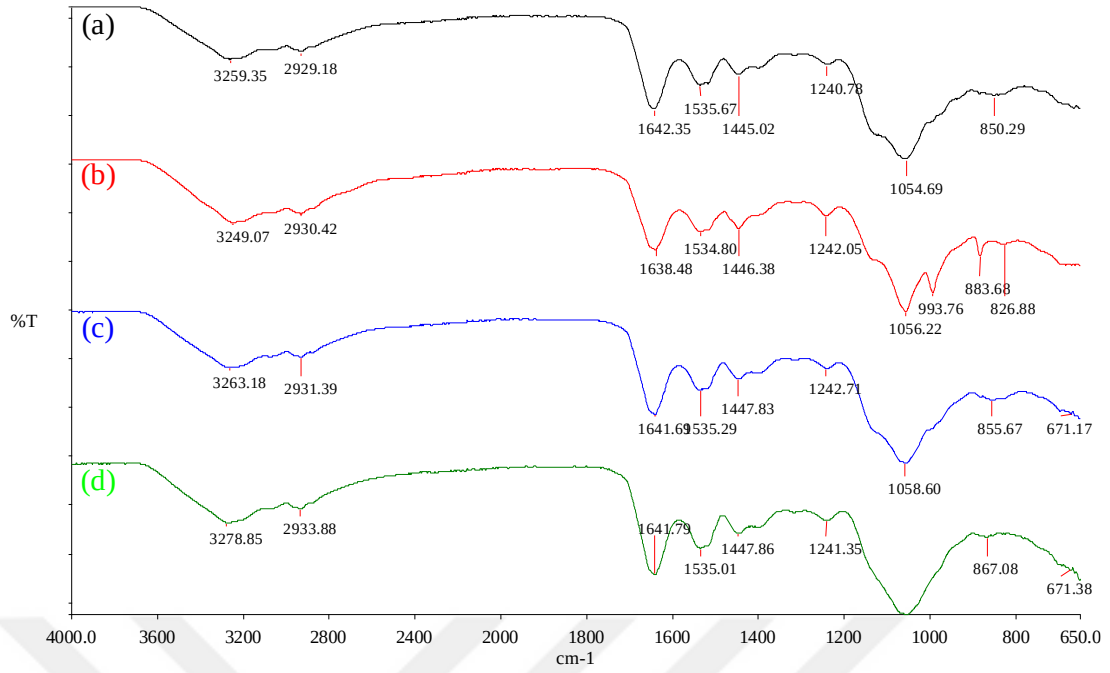
Talekar vd. (2013a), α -amilaz, glukoamilaz ve pullulanaz enzimlerini içeren çoklu-CLEA sentezledikleri çalışmalarında 4.5 h çapraz bağlama süresinin en uygun değer olduğunu bildirmişlerdir. Bu sürenin altında çapraz bağlanma süresinin yetersiz olduğunu, bu sürenin üzerinde ise aşırı çapraz bağlama sonucu enzimin esnek yapısının kaybolması nedeniyle enzim aktivitesinin azaldığını bildirmişlerdir.

Sojitra vd. (2016), α -amilaz, pektinaz ve selüloz enzimlerini içeren manyetik özellikli çoklu-CLEA sentezinde çapraz bağlanma süresinin etkisini inceledikleri çalışmalarında, maksimum aktiviteyi 10 h süre sonunda elde etmişlerdir. Çapraz bağlanma süresinin daha uzun sürdüğü tepkimelerde oluşan biyokatalizör formunun formda daha sıkı bir yapıya bürünmesinden dolayı enzim aktivitesinin düştüğünü bildirmişlerdir.

Chen vd. (2017), papain ve nötraz enzimlerini içeren çoklu-CLEA sentezledikleri çalışmalarında optimum çapraz bağlanma süresini 4 h olarak belirtmişlerdir. 4 h tepkime süresinin altında çapraz bağlanmanın tam olarak gerçekleşmediğini ve esnek bir yapı oluştuğunu, 4 h tepkime süresinin üstünde ise önemli katalitik amino asit kalıntılarının aşırı çapraz bağlanmasından dolayı aktivitenin azaldığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda çoklu-CLEA sentezinde çapraz bağlanma süresi aktivitenin en yüksek olduğu değer olarak 30 min seçilmiştir. Yukarıda özetlenen çalışmalara kıyasla bu çalışmada belirlenen çapraz bağlanma süresi kısadır. Bunun nedeni CLEA sentez yöntemlerinin farklı olmasıdır.

Şekil 4.4'te farklı çapraz bağlanma sürelerinde sentezlenen çoklu-CLEA'ların FTIR spektrumları sunulmuştur. Çapraz bağlanma süresinin değişmesiyle CLEA yapılarında ve spesifik pik şiddetlerinde önemli bir farklılık gözlenmemiştir.

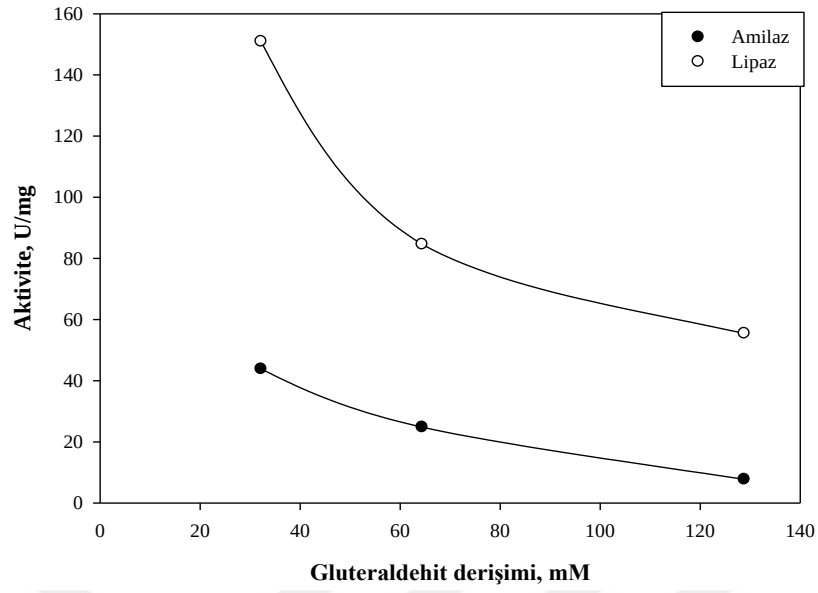


Şekil 4.4 FTIR spektrumları: Bağlanma süresi etkisi, (a) 15 min, (b) 30 min (c) 45 min ve (d) 60 min.

4.3 Çapraz Bağlayıcı Derişiminin Çoklu-CLEA Aktivitesine Etkisi

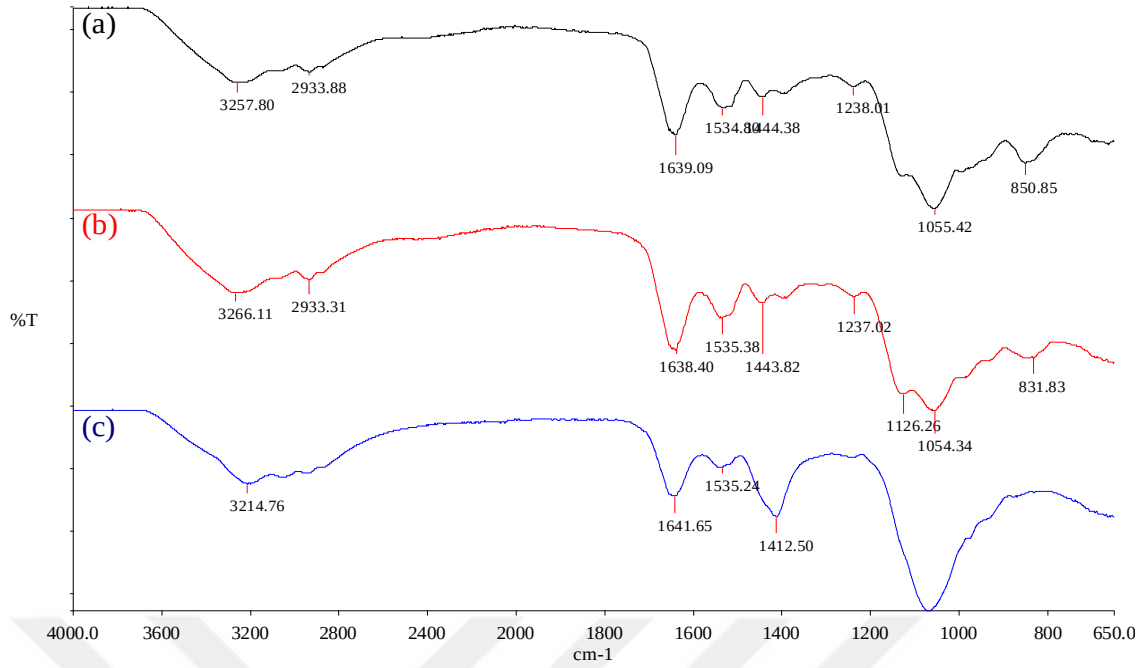
Çoklu-CLEA sentezinde çöktürme işleminden sonra enzim agregatlarının bifonksiyonel ajan glutaraldehit ile çapraz bağlanma tepkimesinde glutaraldehit derişimi 32.6, 65.2 ve 130.4 mM değerlerinde incelenmiş ve çoklu-CLEA aktivitesi ile değişimi Şekil 4.5'te sunulmuştur. Glutaraldehit derişiminin artmasıyla her iki enzim aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Glutaraldehit derişiminin 32.6 mM'dan 130.4 mM derişime arttırılmasıyla amilaz aktivitesi 5.66 kat, lipaz aktivitesi 2.72 kat azalmıştır. Bu azalmanın sebebi aşırı çapraz bağlanma sonucu CLEA yapısının daha sıkı bir forma dönüşmesi dolayısıyla substratın aktif konumlara ulaşmasının sınırlandırılmasıdır (Talekar vd., 2013a; Stressler vd., 2015; Mahmod vd., 2015; Sojitra vd., 2016; Chen vd., 2017).

Çalışmamızda çoklu-CLEA sentezinde en uygun glutaraldehit derişimi aktivitenin en yüksek olduğu değer olarak 32.6 mM seçilmiştir ve çoklu-CLEA hazırlamasında glutaraldehit derişimi sonraki çalışmalar için 32.6 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5 Çoklu-CLEA aktivitesinin çapraz bağlayıcı derişimi ile değişimi.

Şekil 4.6’da farklı çapraz bağlayıcı derişimlerinde sentezlenen CLEA’ların FTIR spektrumları sunulmuştur. En yüksek çapraz bağlayıcı derişimi kullanılarak sentezlenen ve en düşük aktivitenin elde edildiği çoklu-CLEA FTIR spektrumunda (Şekil 4.7c) temel pik şiddetlerinde (Amid I (1641 cm^{-1}) ve Amid II (1535 cm^{-1})) azalma gözlenmiştir. Amid I bandları enzimler gibi küresel proteinlerin ikincil yapıları hakkında bilgi vermektedir. İkincil yapı ise enzim aktivitesiyle ilişkilidir. Enzimin ikincil yapısını oluşturan α -heliks ve β -yaprak yapılarının çapraz bağlayıcı derişimi ile değişmesi sonucunda aktivitede azalma gözlenmiştir (Salgın and Salgın 2017).

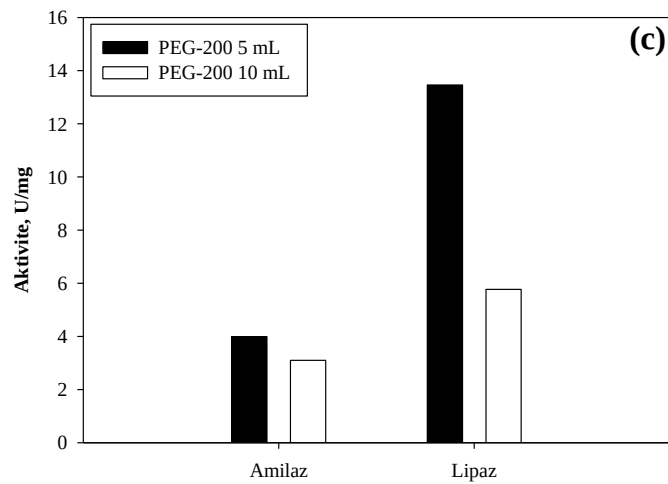
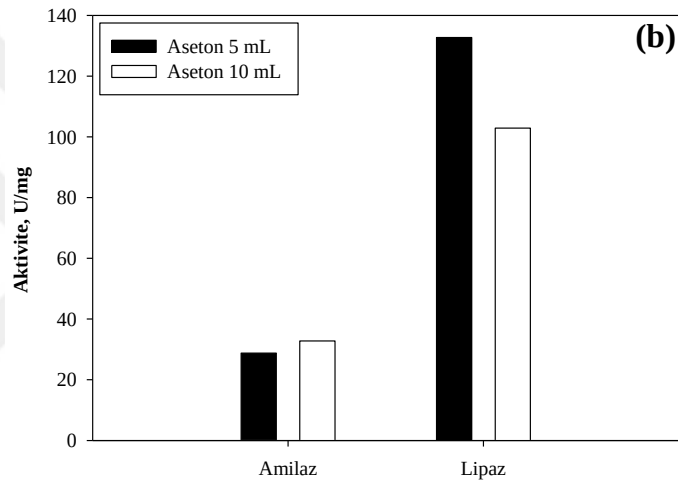
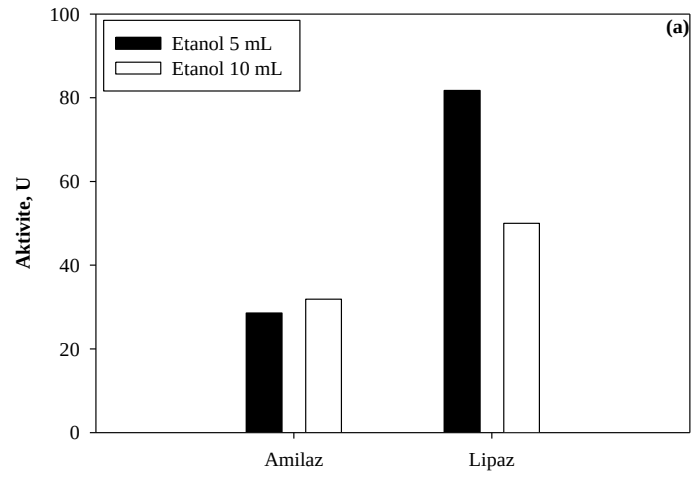


Şekil 4.6 FTIR spektrumları: Çapraz bağlayıcı derişimi etkisi, (a) 32.6 mM, (b) 65.2 mM ve (c) 130.4 mM.

4.4 Presipitasyon Ajan Türünün Çoklu-CLEA Aktivitesine Etkisi

Çoklu-CLEA sentezinde organik çözücüler ve iyonik olmayan polimerler gibi farklı presipitasyon ajan türleri (etanol, aseton, PEG-200, PEG-6000 ve taç eter) ve miktarının etkisi incelenmiştir.

Farklı derişimlerde etanol, aseton ve PEG-200 sıvı presipitantları kullanılarak hazırlanan çoklu-CLEA aktivitelerinin değişimi Şekil 4.7’de sunulmuştur. Şekil 4.7a’da etanolün presipitant olarak kullanıldığı durumda etanol miktarının 5 mL’den 10 mL’ye artırılması durumunda amilaz aktivitesinde 1.16 kat artış, lipaz aktivitesinde ise 0.61 kat düşüş gözlenmiştir. Asetonun presipitant ajanı olarak kullanıldığı durumda (Şekil 4.7b) ise aseton derişiminin artırılmasıyla amilaz aktivitesinde 1.14 kat artış, lipaz aktivitesinde 0.78 kat düşüş gözlenmiştir. Şekil 4.7c’de, PEG-200 kullanıldığı durumda, presipitant miktarının artırılmasıyla her iki enzim aktivitesinde azalma (amilaz için 0.78 kat, lipaz için 0.43 kat) gözlenmiştir. Dolayısıyla lipaz enzimi için presipitasyon ajan miktarının artırılması aktivite üzerine olumsuz etki yaparken, amilaz enzimi için etanol ve aseton presipitantlarının aktivite üzerine bir miktar olumlu etkisi gözlenmiştir.

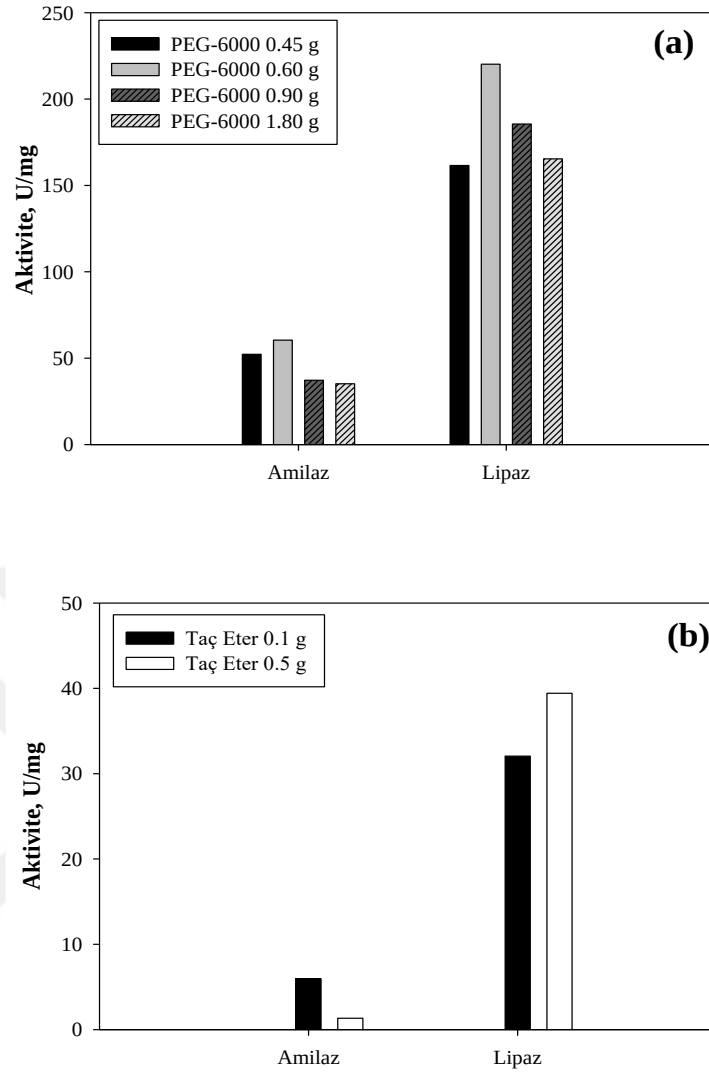


Şekil 4.7. Sıvı presipitant tür ve miktarının CLEA aktivitesine etkisi; (a) Etanol, (b) Aseton ve (c) PEG-200.

Katı presipitasyon ajan türü olarak PEG-6000 (0.45-1.8 g) ve ta eterin (0.1 ve 0.5 g) CLEA aktivitesine etkisi incelenmiş ve şekil 4.8'da sunulmuştur. Çoklu-CLEA sentezinde PEG-6000 miktarı için en uygun değer 0.60 g olarak belirlenmiş, bu miktarın üstünde aktivitede azalma gözlenmiştir. PEG-6000 miktarının 0.45 g'dan 0.60 g'a arttırılmasıyla amilaz aktivitesinde 1.16 kat, lipaz aktivitesinde ise 1.36 kat artış gözlenmiştir. Çoklu-CLEA sentezinde PEG-6000 miktarı 0.60 g değerinden 1.80 g değerine çıkarıldığında amilaz aktivitesinde 0.58 kat, lipaz aktivitesinde 0.75 kat azalma gözlenmiştir.

Çoklu-CLEA sentezinde, PEG-6000 presipitantının optimum miktarı (0.60 g) ile $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ presipitantı kıyaslandığında; PEG-6000 presipitantının, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ presipitantına göre amilaz aktivitesini 1.38 kat arttırdığı, lipaz aktivitesini ise 1.24 kat arttırdığı gözlenmiştir. PEG-200 presipitantı kullanıldığı durumda oklu-CLEA aktivitesinde ciddi bir azalma gözlenmesine rağmen, PEG-6000 kullanıldığında aktivitedeki artışın PEG'in molekül ağırlığı ile orantılı olduğunu göstermiştir. Polizelli vd. (2008), PEG'in zincir uzunluğunda artışın hidrofobik yapısında artışa bunun ise substratın daha kolay aktif konumlara ulaşmasına sağladığını ve aktivitenin arttığını bildirmişlerdir.

şekil 4.8b'de ta eterin presipitant olarak kullanıldığı durumda taç eter miktarının 0.1'den 0.5 g'a arttırılması durumunda amilaz aktivitesinde 0.22 kat azalma, lipaz aktivitesinde ise 1.23 kat artış gözlenmiştir.



Şekil 4.8 Katı presipitantların CLEA aktivitesine etkisi; (a) PEG-6000 ve (b) taç eter.

Deneysel çalışmaların başlangıç aşamasında çoklu-CLEA sentezinde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ presipitant olarak kullanılırken bu aşamadan sonra yapılan deneylerde presipitant türü olarak daha yüksek aktivite gözlemlendiği için PEG-6000 (0.60 g) kullanılmıştır.

Dalal vd. (2007), pektinaz, ksilanaz ve selüloz içeren çoklu-CLEA sentezinde farklı presipitant türlerinde (aseton, dimetoksietan ve n-propanol) çoklu-CLEA aktivitesini incelemişlerdir ve n-propanol presipitantının kullanıldığı durumda her üç enzim için tam çökme olduğunu bildirmişlerdir. Çoklu-CLEA’da en yüksek aktiviteyi n-propanol kullandıkları durumda elde etmişlerdir.

Matijošytė vd. (2010), sentezledikleri üç farklı kaynaktan elde edilen lakkaz-CLEA için organik çözücüler (etanol, izopropanol, aseton, asetonitril, dioksan ve

dimetilformamid), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve iki farklı PEG türünü (PEG 1500 ve PEG 3400) presipitant olarak incelemiştir. Her bir lakkaz-CLEA için presipitant türleri farklı etkiler göstermiştir. İyonik olmayan polimerlerde molekül ağırlığı arttıkça aktivitenin arttığı gözlenmiştir.

Kartal vd. (2011), sentezledikleri lipaz-CLEA için organik çözücülerin (etanol, tert-büanol, aseton ve izo-propanol) ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tuzunun presipitasyona etkisini incelemiştir. Maksimum CLEA aktivite kazanımını etanol kullanarak sentezlediklerinde elde etmişlerdir. Agregasyon hızının enzim denatürasyonunda önemli olduğunu bildirmişlerdir. Presipitasyon basamağında oluşan enzim agregatlarının, reaksiyon için elverişli olmayan indüklenmiş bir konformasyonda olabileceğini, fakat tampon içinde tekrar çözündüklerinde normal aktivite sergilediklerini bildirmiştir.

Cui ve Jia (2013), su ile karışabilen organik çözücülerin genellikle enzimlerin denatürasyonunu indüklediğini, bunun da enzimlerin aktivite kaybına neden olduğunu ve sonuçta sentezlenen CLEA'ların aktivite verimini düşürdüğünü belirtmişlerdir. Çalışmamızda da organik çözücüler, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve PEG-6000 presipitantlarına kıyasla daha düşük aktivite göstermiştir.

Talekar vd. (2013a), sentezledikleri α -amilaz, glukoamilaz ve pullulanaz enzimlerinin çoklu-CLEA sentezinde etanol, n-propanol, büanol, aseton, asetonitril, dimetilsülfoksit (DMSO) ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ maddelerini presipitant olarak denemişlerdir. En yüksek çoklu-CLEA aktivitesini $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile, en düşük aktivite değerlerini ise DMSO ile elde etmişlerdir. Presipitantların etkin bir çöktürme işlemi gerçekleştiremediği takdirde CLEA aktivitesinde kayıp olabileceğini bildirmişlerdir.

Nadar vd. (2016), α -amilaz CLEA için $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, aseton, metanol, asetonitril, etanol, izo-propanol gibi çeşitli presipitantlarının aktivite üzerine etkisi incelenmişler ve en yüksek aktiviteyi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve aseton kullanıldığı durumda elde ederken en düşük aktiviteyi etanol içeren ortamda elde etmiştir.

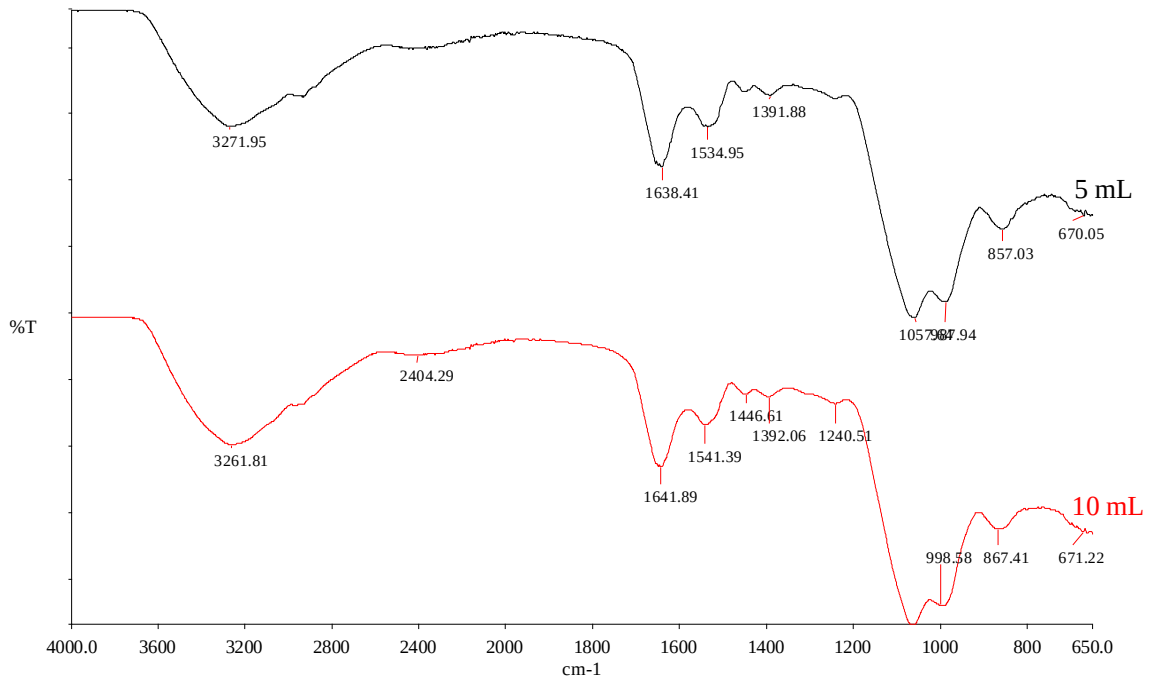
Chen vd. (2017), çoklu-CLEA sentezledikleri çalışmalarında $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve etanol presipitantını kullanmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda etanol presipitantı ile hazırlanan CLEA'nın $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kıyasla yaklaşık %7 daha fazla aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Pervez vd. (2019), amiloglukozidaz-CLEA sentezinde presipitasyon ajan türünün etkisini inceledikleri çalışmalarında $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ için %83, bütanol için %70, etanol, metanol ve PEG presipitantları için sırasıyla %66, %61, ve %56 agregasyon verimini gözlemişlerdir. Organik çözücülerin protein molekülünü denatüre ederek verimi azalttığını, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişiminin artırılmasıyla CLEA'ların iri taneli hale geldiğini ve daha kolay geri kazanım ve yüksek stabiliteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Özacar vd. (2019), sentezledikleri proteaz, katalaz ve lipaz içeren Çoklu-CLEA'lar için aseton ve etanol presipitantlarını denemişlerdir. Etanolü presipitant olarak kullandıkları durumda kalan aktivitenin %20'den daha az olduğunu bildirmişlerdir. Bunun nedenini etanolün enzimi denatüre etmesi olarak bildirmişlerdir. Aseton ile daha yüksek bir aktivite elde etmişlerdir.

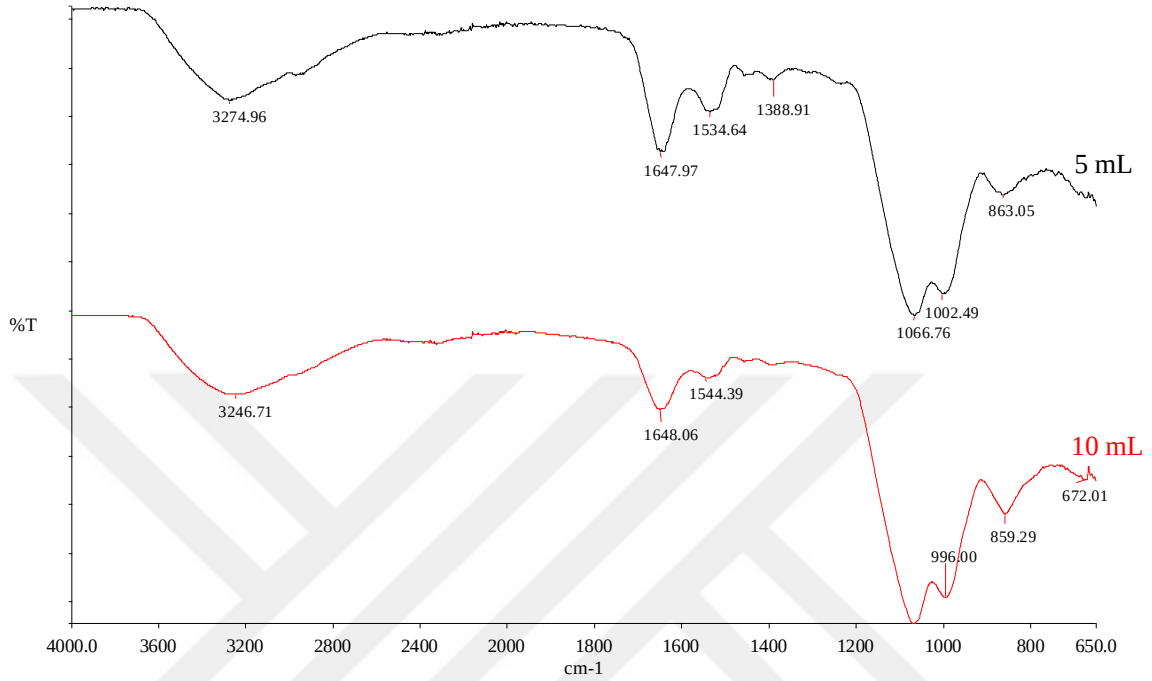
4.4.1 Presipitasyon ajan türünün çoklu-CLEA yapısına etkisi

Farklı presipitant türleri ve derişimleri kullanılarak sentezlenen çoklu-CLEA'ların kimyasal yapıları FTIR spektrometrsinde analizlenmiştir. Etanol ile presipite edilen çoklu-CLEA'ların Şekil 4.9'da sunulan FTIR spektrumlarında, etanol derişiminin artırılmasının biyokatalizör yapısı üzerinde fazla bir değışime sebep olmadığı gözlenmiştir

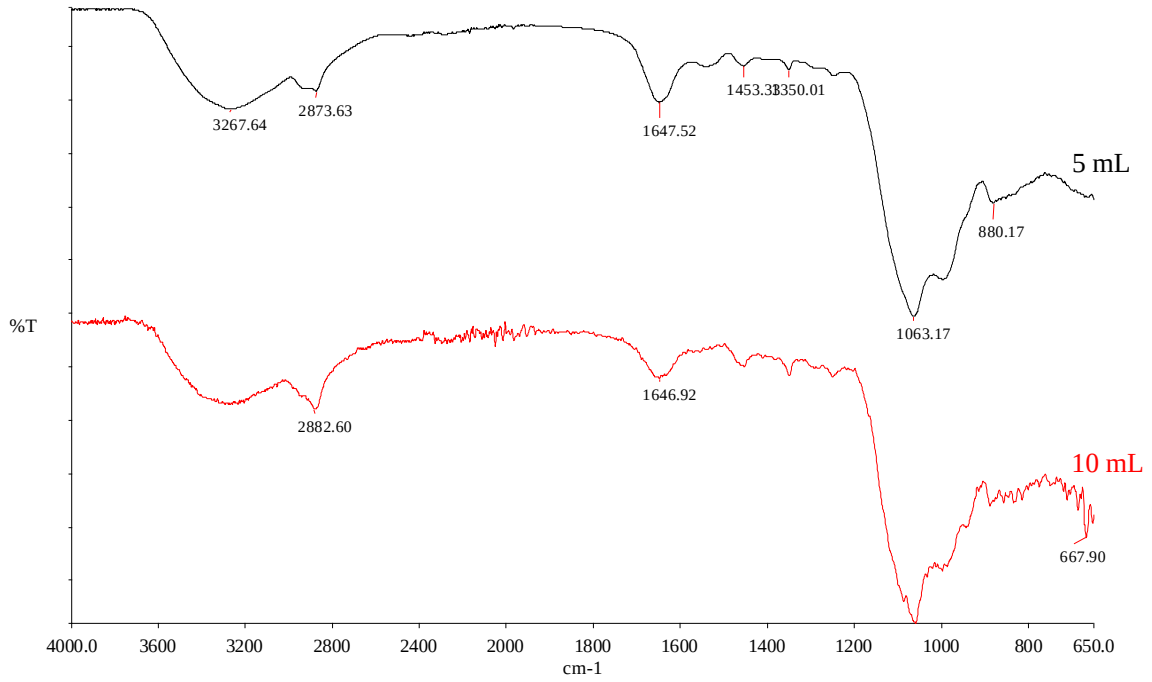


Şekil 4.9 FTIR spektrumu: Etanol presipitasyon ajanı etkisi.

Şekil 4.10’da aseton ve Şekil 4.11’de PEG-200 presipitantları kullanılarak sentezlenen çoklu-CLEA’ların FTIR spektrumları sunulmuştur. Her iki presipitant miktarının artırılmasıyla temel enzim pikleri olan Amid I ve Amid II bandlarının şiddetinde azalma gözlenmiştir.

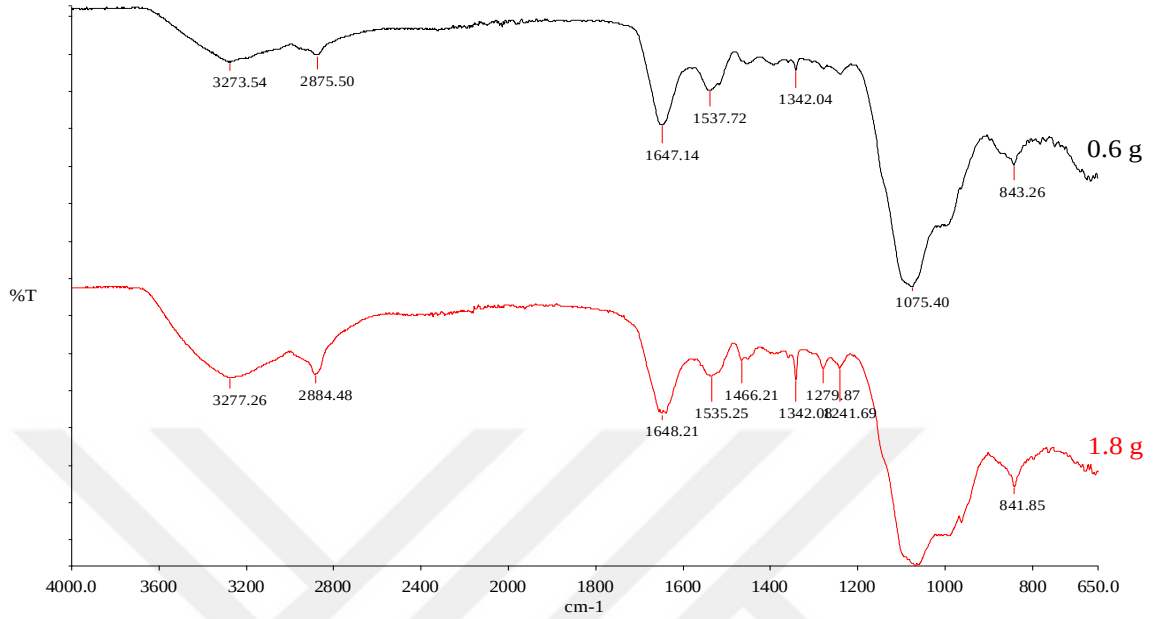


Şekil 4.10 FTIR spektrumu: Aseton presipitasyon ajanı etkisi.



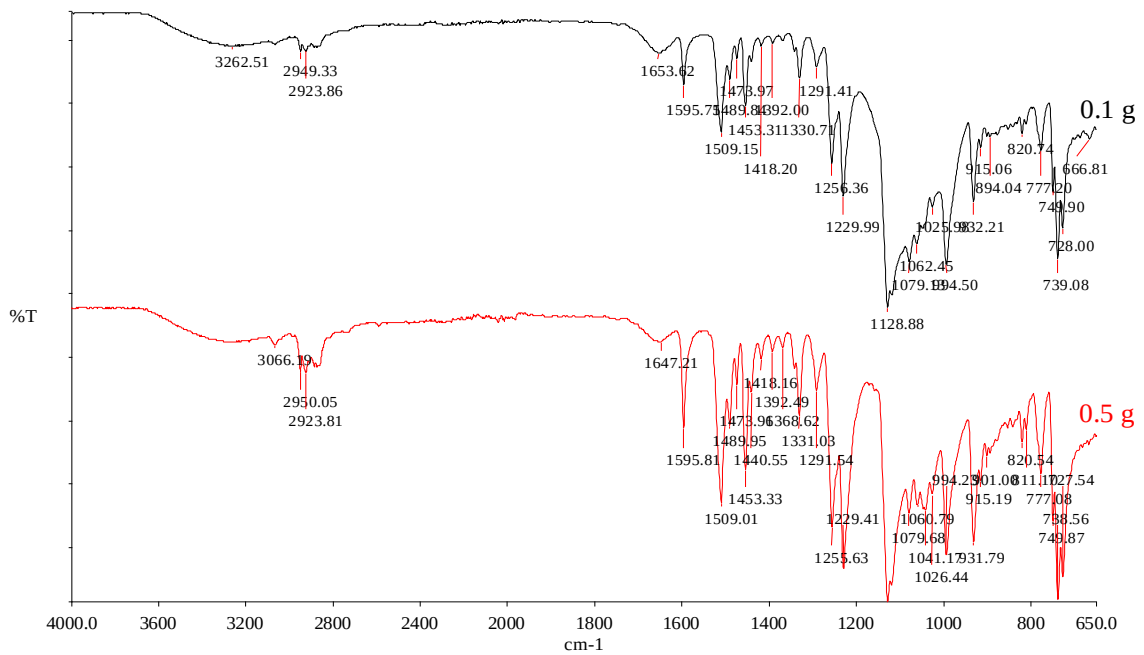
Şekil 4.11 FTIR spektrumu: PEG-200 presipitasyon ajanı etkisi.

Şekil 4.12’de katı presipitant PEG-6000’nin kullanılarak en yüksek ve en düşük aktivite değerlerinin elde edildiği CLEA’ların FTIR spektrumları sunulmuştur. Enzimin temel yapı piklerinde bir bozulma gözlenmemiştir.



Şekil 4.12 FTIR spektrumu: PEG-6000 presipitasyon ajanı etkisi.

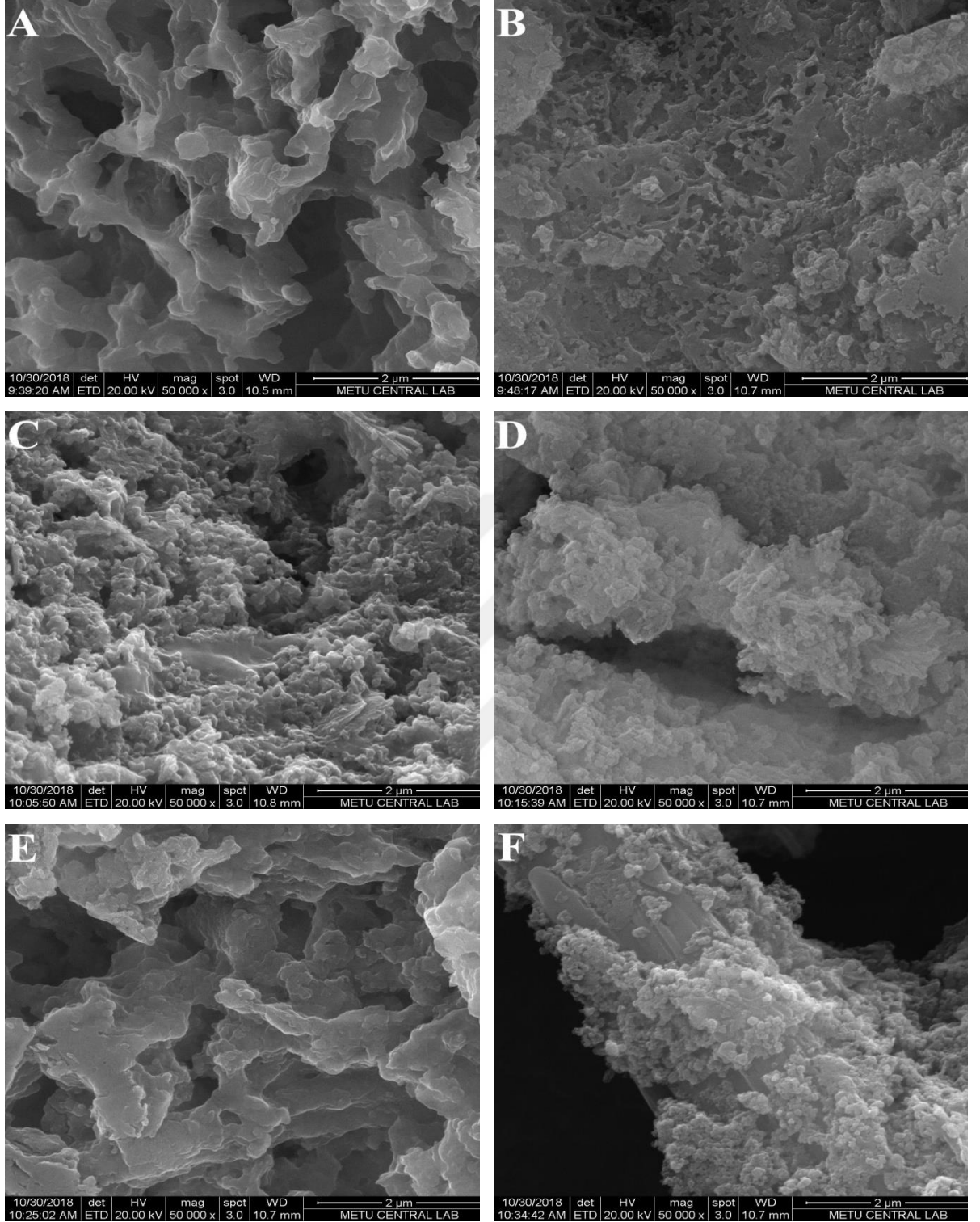
Şekil 4.13’te sunulan FTIR spektrumlarında presipitant olarak taç eter kullanılmıştır ve taç eterin enzim yapısını tamamen değiştirdiği tespit edilmiştir. Yapıdaki bu değişim diğer presipitantlara göre aktivitenin çok düşük olmasına sebep olmuştur.



Şekil 4.13 Çoklu-CLEA sentezinde taç eter presipitasyon ajanı etkisi: FTIR spektrumu.

4.4.2. Presipitasyon ajan türünün çoklu-CLEA morfolojisine etkisi

Farklı presipitant türleri kullanılarak sentezlenen çoklu-CLEA'ların morfolojik yapısı SEM cihazında analizlenmiştir. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, etanol, aseton ve PEG-6000 presipitantları ile sentezlenen çoklu-CLEA SEM görüntülerinden elde edilen yapıların gözenekli ve amorf yapılar olduğu ve ayrıca genelde süngerimsi yapıya sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.14). Farklı presipitant türleri kullanılarak sentezlenen çoklu-CLEA'lar literatürdeki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Boşluklu yapılara sahip olan CLEA'ların yüzey alanı fazladır ve substratın aktif konumlara ulaşması/kütle aktarımı daha kolaydır. Dolayısıyla daha yüksek aktivite gösterirler (Schoevaart vd., 2004; Aytar ve Bakır, 2008; Ayhan vd., 2012; Tükel vd., 2013; Chen vd., 2017; Salgın ve Salgın, 2017).

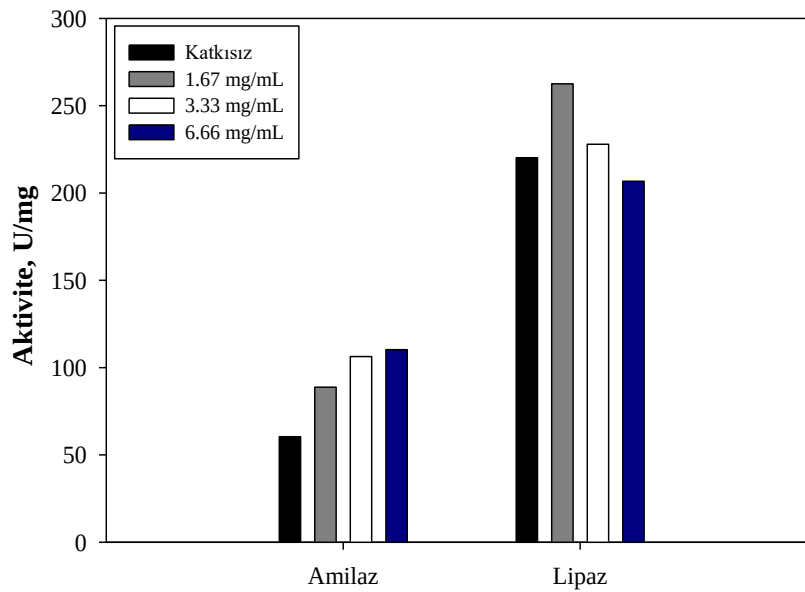


Şekil 4.14 Çoklu-CLEA SEM fotoğrafları: Presipitasyon ajan türü etkisi, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
(A), Etanol (B), Aseton (C), PEG_200 (D), PEG-6000 (E) ve Taç eter (F).

4.5 Katkı Maddelerinin Çoklu-CLEA Aktivitesine Etkisi

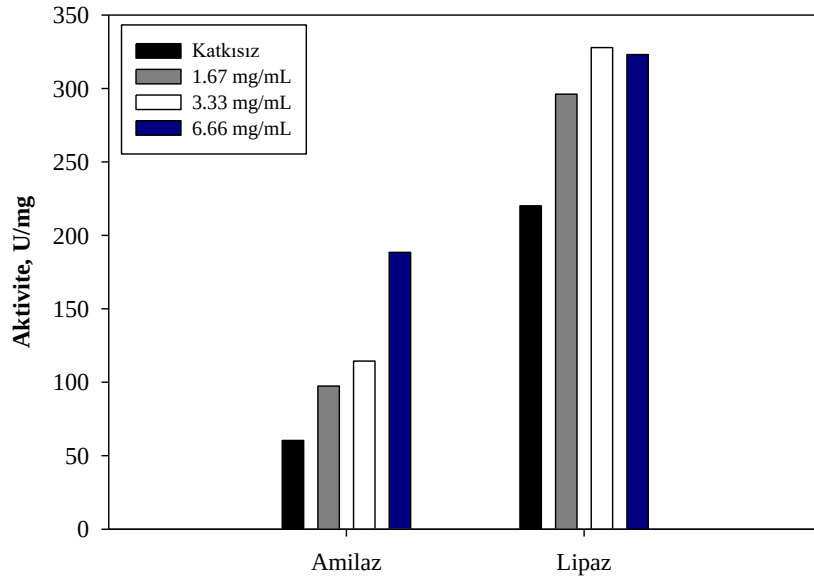
Çoklu-CLEA aktivitesine BSA, L-Lizin, taç eter ve Triton X-100 gibi farklı katkı maddelerinin etkisi tepkime ortamına farklı derişimlerde eklenerek incelenmiştir.

BSA'nın çoklu-CLEA aktivitesi etkisi 1.67, 3.33 ve 6.66 mg/mL derişim değerlerinde incelenmiş ve ölçülen aktivite değerleri Şekil 4.15'te sunulmuştur. BSA'nın derişiminin artmasıyla -katkısız CLEA'ya kıyasla- genelde amilaz ve lipaz aktivitelerinde artış gözlenmiştir. BSA katkısının aktiviteye olumlu etkisi lizin kalıntıları içermesinden kaynaklanmaktadır. BSA, protein yapısında var olan lizinin serbest amino gruplarıyla gluteraldehitin çapraz bağlanmayı geliştirir. Tepkime ortamına BSA eklenmesi ortamdaki protein miktarını artırarak enzimin denatürasyonunu engeller (Özacar vd. 2019).



Şekil 4.15 Çoklu-CLEA aktivitesine BSA etkisi.

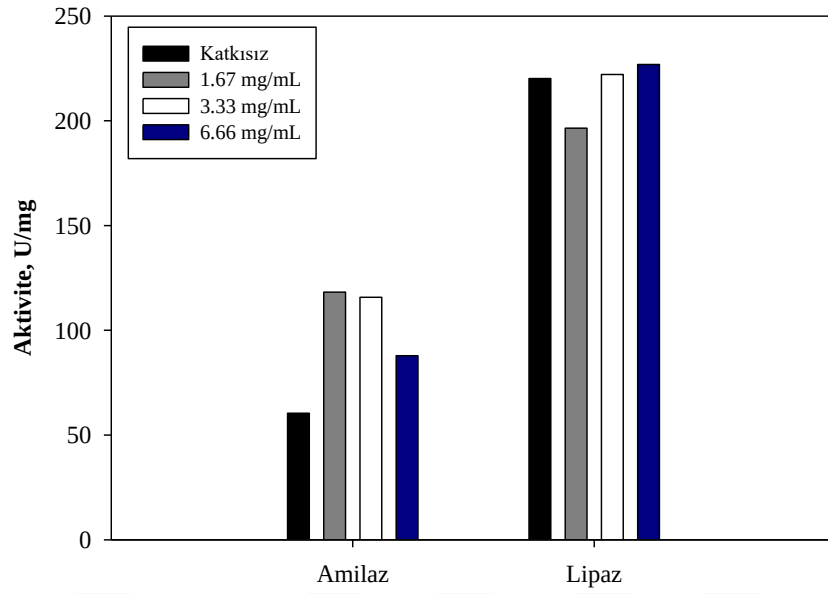
Çoklu-CLEA sentezinde L-lizinin farklı derişimlerinin aktiviteyle etkisi 1.67, 3.33 ve 6.66 mg/mL değerlerinde incelenmiş ve ölçülen aktivite değerleri Şekil 4.16'da sunulmuştur.



Şekil 4.16 Çoklu-CLEA aktivitesine lizin etkisi.

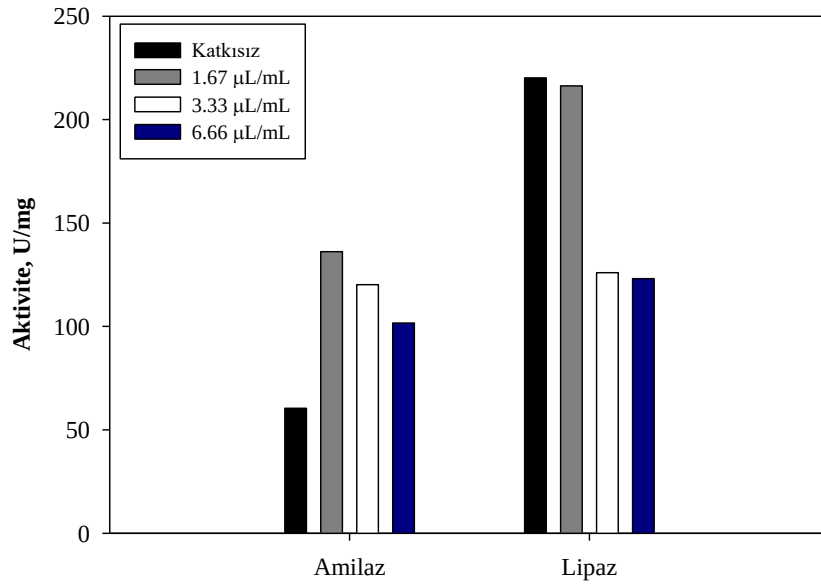
Lizin derişimi arttıkça amilaz ve lipaz aktivitelerinden oluşan Çoklu-CLEA aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Bir amino asit olan lizin kalıntıları genelde enzimin katalitik özelliğini sağlayan amino asit grubu içinde yer almaz, ancak çapraz bağlanma yaparak protein konformasyonunu dolayısıyla katalitik aktivitesini korurlar. Gluteraldehit çapraz bağlayıcısı, sulu çözelti içinde farklı formlarda –monomerik, polimerik ve siklik yapılar- bulunmaktadır ve bu formların hepsi proteinlerin lizin kalıntıları (ϵ -amino grup) ile tepkime verebilmektedir. Lizin derişiminin arttırılması ile gluteraldehit, enzimin aktif konumlarındaki katalitik görev yapan amino asitler yerine lizin ile çapraz bağlanarak aktif konumlarda bulunan amino asitlerin çapraz bağlanmasını engellemiştir (Aptiş 2012). Çalışmamızda lizinin tüm derişim değerlerinde sentezlenen CLEA aktivitelerinin, lizin içermeyen ortamda sentezlenen CLEA aktivitesine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Şekil 4.17’de çoklu-CLEA sentezinde farklı derişimlerde taç eterin kullanılarak sentezlendiği CLEA aktiviteleri verilmiştir. Taç eterin amilaz aktivitesini her derişim değerinde arttırdığı gözlenirken, lipaz aktivitesinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.17 Çoklu-CLEA aktivitesine taç eter etkisi.

Triton X-100 katkı maddesi derişimiyle çoklu-CLEA aktivitesinin değişimi Şekil 4.18’de sunulmuştur. Triton X-100 derişiminin artmasıyla amilaz aktivitesi artarken, lipaz aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Triton X-100 ilavesinin, lipaz CLEA aktivitesi üzerinde diğer yüzey aktif maddelerine kıyasla düşük bir etkisi olduğu bilinmektedir (Zhang vd., 2015).



Şekil 4.18 Çoklu-CLEA aktivitesine Triton X-100 etkisi.

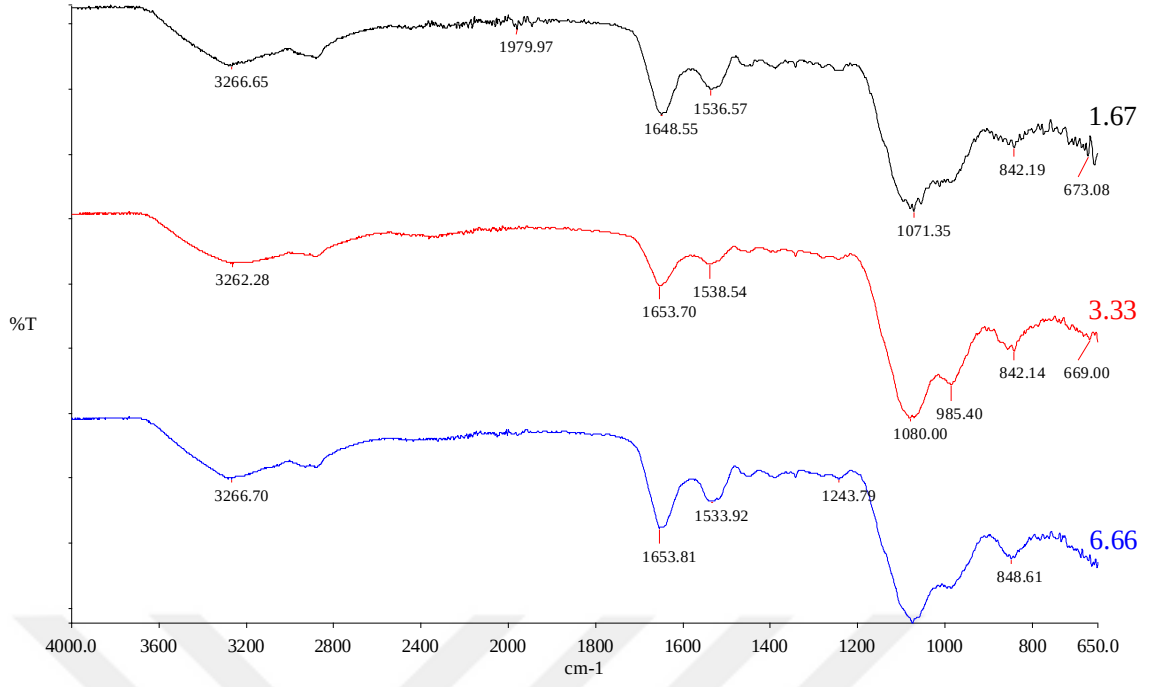
Triton X-100 enzim yapısı içinde gömülü olarak bulunan hidrofobik grupları açığa çıkararak konformasyonel değişimi sağlar. Böylece substratın enzimin aktif konumlarına ulaşımı kolaylaştırılmış olur. Triton X-100 genelde proteinleri denatüre etmez. Bu özelliği Triton X-100 molekülünün sahip olduğu yüklü olmayan polar baş kısmı ve apolar alkilfenil kuyruk kısmından kaynaklanmaktadır, yani ne çok uzun ne çok esnek bir moleküldür (Dinçyürek 2011, Elaldi 2018). Dolayısıyla Triton X-100 bu karakteristik özellikleri sayesinde çoklu-CLEA bünyesindeki amilaz aktivitesinde çalışılan her derişimde artışına sebep olurken, yüksek derişimlerde lipaz aktivitesinde düşüşe sebep olmuştur.

4.5.1 Katkı maddelerinin çoklu-CLEA yapısına ve morfolojisine etkisi

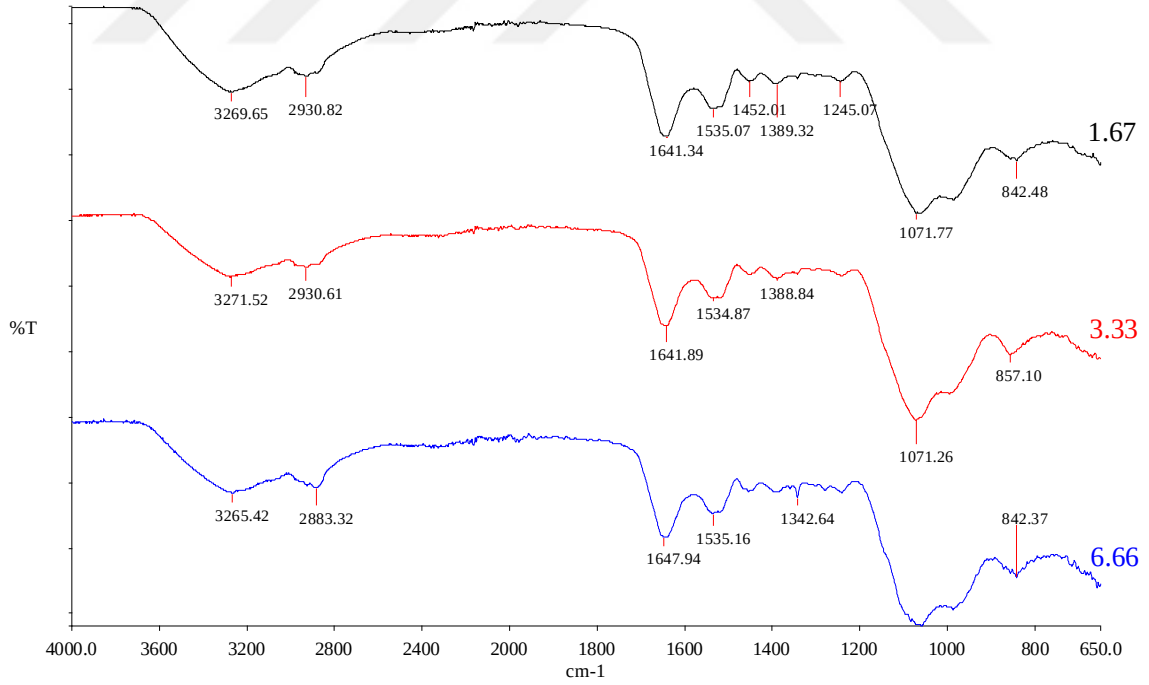
Katkı maddeleri ile çalışılan her bir koşulda çoklu-CLEA'ların FTIR spektrumları alınarak kimyasal yapıları analizlenmiştir. Şekil 4.19 – 4.22'de sırasıyla BSA, lizin, Triton X-100 ve taç eterin farklı derişimlerinde sentezlenen çoklu-CLEA FTIR spektrumları sunulmuştur.

Çalışılan tüm koşullarda FTIR spektrumlarında temel protein pikleri Amid I ve Amid II bandlarının korunduğu yapının değişmediği genel olarak gözlenmiştir. Temel pik şiddetlerinde az miktarda artış veya azalışlar gözlense de pik şiddetlerindeki değişimi biyokatalizör aktivitesiyle ilişkilendirebilmek için ikincil yapı analizlerinin yapılması daha doğru sonuç verecektir.

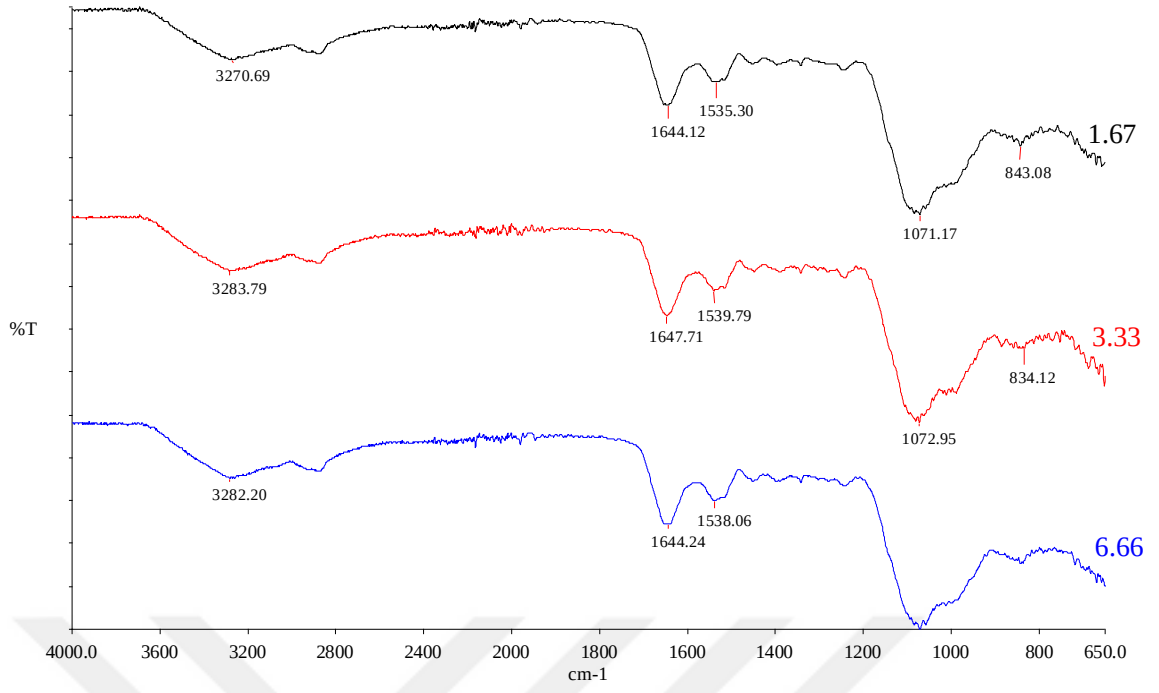
Çeşitli katkı maddeleri kullanılarak sentezlenen çoklu-CLEA'nın SEM görüntüleri ise Şekil 4.23'te sunulmuştur. Genelde CLEA'ların gözenekli ve amorf yapıya sahip olduğu gözlenmiştir.



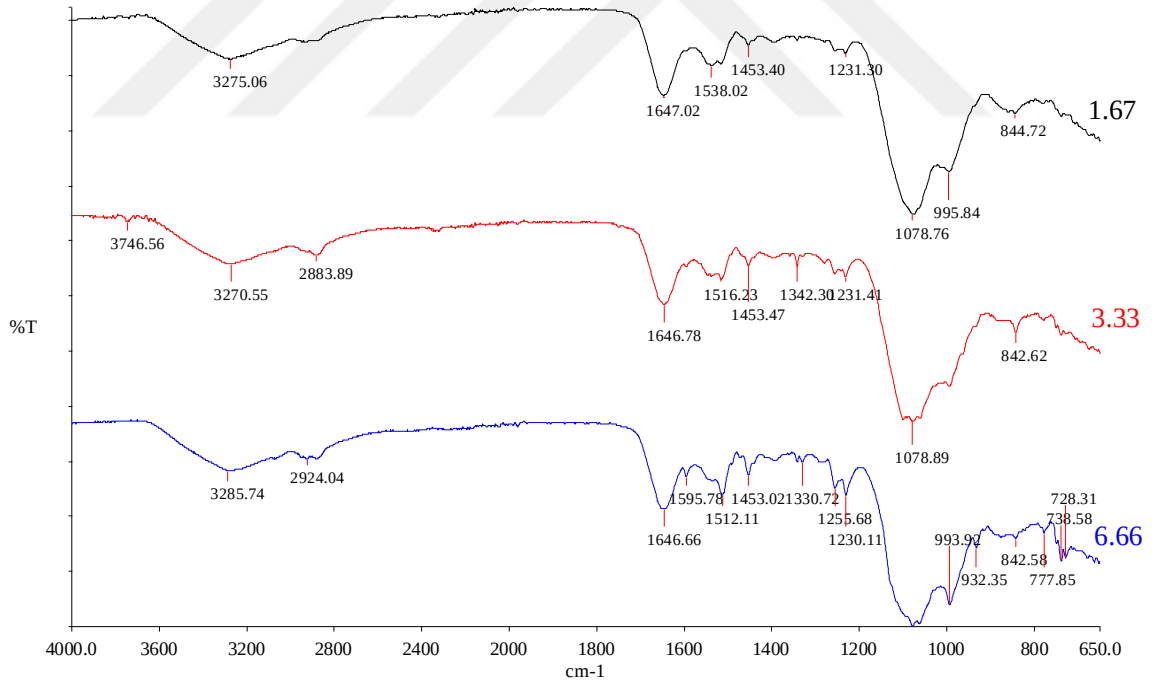
Şekil 4.19 FTIR spektrumu: Çoklu-CLEA sentezinde BSA miktarı etkisi.



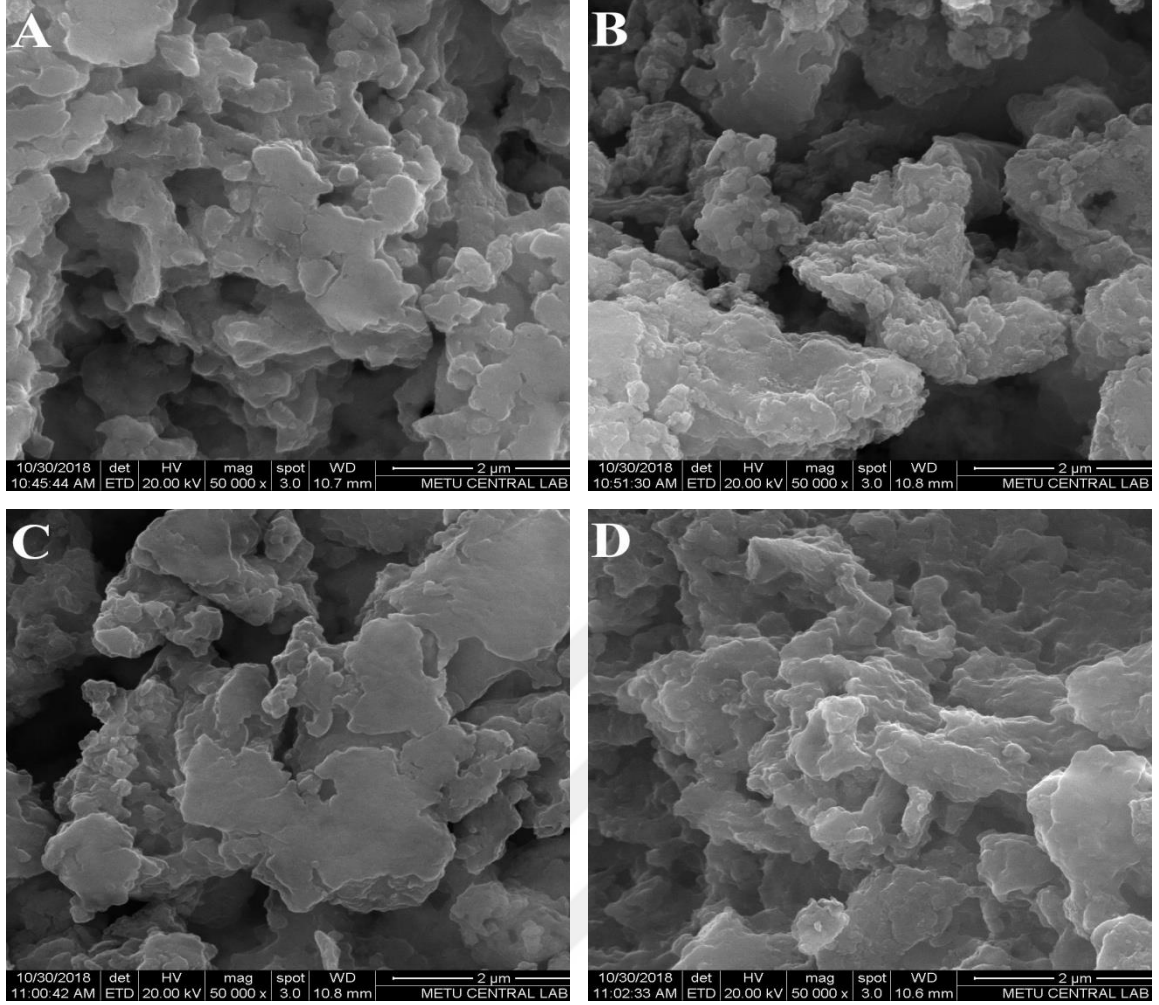
Şekil 4.20 FTIR spektrumu: Çoklu-CLEA sentezinde L-lizin miktarı etkisi.



Şekil 4.21 FTIR spektrumu: Çoklu-CLEA sentezinde Triton X-100 miktarı etkisi.



Şekil 4.22 FTIR spektrumu: Çoklu-CLEA sentezinde taç eter miktarı etkisi.



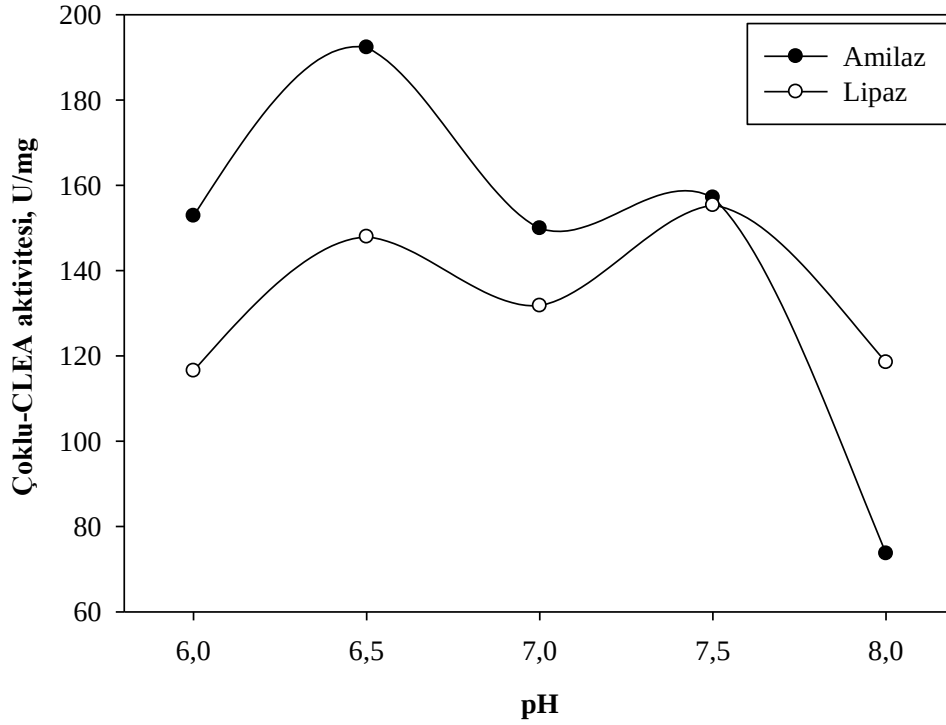
Şekil 4.23 Çoklu-CLEA SEM fotoğrafları: Katkı maddesi etkileri, BSA (A), L-Lizin (B), Triton X-100 (C) ve Taç eter (E).

4.6 Çoklu-CLEA için Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

Çoklu-CLEA aktivitesinin maksimum olduğu optimum pH ve sıcaklık değerleri Bölüm 3.4’de verilen yöntem kullanılarak belirlenmiştir.

Farklı pH değerlerinde (pH=6.0, 6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0) hazırlanan 0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tamponu içerisine alınan çoklu-CLEA’lar 1 h boyunca inkübe edildikten sonra aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.24’de çoklu-CLEA aktivitesinin pH ile değişimi sunulmuştur. Hem amilaz hem de lipaz enzimi için benzer pH değerlerinde CLEA aktivitelerinde artış görülmüştür. Çoklu-CLEA’da pH değeri 6’dan 6.5’e arttırıldığında amilaz aktivitesi de 1.26 kat, lipaz aktivitesi ise 1.27 kat artmıştır. pH değeri 6.5’ten 7.0 değerine arttırıldığında çoklu-CLEA amilaz aktivitesinde 0.78 kat, lipaz aktivitesinde ise 0.89 kat düşüş gözlenmiştir. pH değeri

7.0'den 7.5'e arttırıldığında çoklu-CLEA amilaz aktivitesinde 1.05 kat, lipaz aktivitesinde ise 1.18 kat değerinde artış gözlenmiştir. pH değeri 7.5'den 8'e getirildiğinde ise çoklu-CLEA amilaz aktivitesinde 0.47 kat, lipaz aktivitesinde ise 0.76 kat düşüş gözlenmiştir.



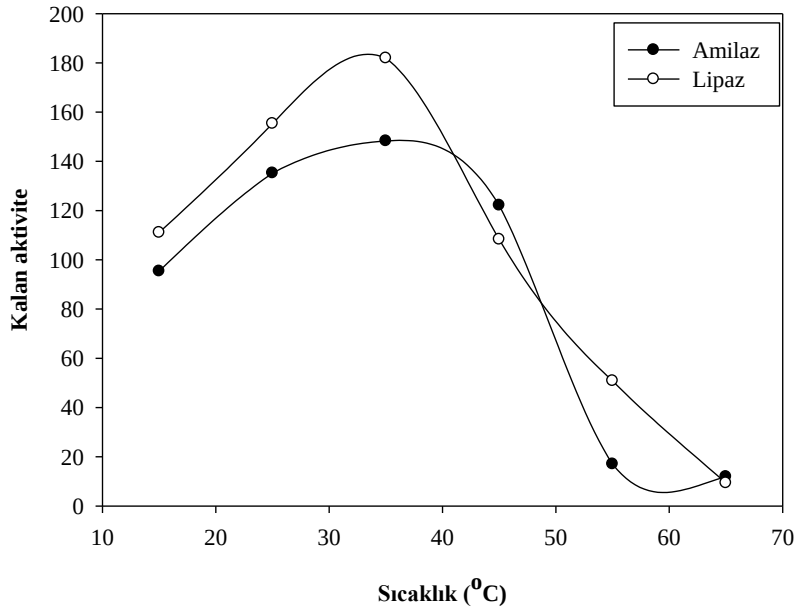
Şekil 4.24 Çoklu-CLEA aktivitesinin pH ile değişimi.

Çoklu-CLEA için optimum pH=7.5 olarak belirlenmiştir. Çoklu-CLEA için daha sonraki analizlerde pH=7.5 değerinde çalışılmıştır.

Literatürde belirtilen serbest α -amilaz'ın optimum pH (6.8) ve sıcaklık (37°C) değerleri ve lipaz'ın optimum pH (7.5) ve sıcaklık (37°C) değerleri, sentezlediğimiz çoklu-CLEA'lara göre daha dar pH ve sıcaklık aralıklarında aktivite göstermektedir. CLEA'lar serbest enzimlere kıyasla daha geniş pH aralıklarında aktivite gösterebilir (İsfahani vd., 2015; Nguyen vd. 2017). Çoklu-CLEA'ların yüksek stabilitesi, enzim konformasyonel değişikliklerini önleyen, inter ve intramoleküler kovalent çapraz bağlanma ile açıklanabilir (Wang vd., 2011; Ahumada vd., 2015). Bu bağlanmalar, ileri derece yapısal değişikliklerin oluşumunu azaltmaya yardımcı olmuş ve pH direncinin artmasına neden olmuştur (Nguyen vd. 2107). Enzim moleküllerinin bağlandığı

glutaraldehit, enzimin yüzeyi üzerindeki mevcut tüm amino gruplarını çapraz bağlar. Dolayısıyla, enzim yüzeyindeki asidik gruplar, optimum pH'ı daha yüksek değerlere getiren enzim proteinine negatif yük verir. CLEA formu oluşturulan enzimlerin optimum pH noktaları serbest formdaki hallerine göre daha baziktir. (Talekar vd., 2013a; Pervez vd. 2019).

0.1 M, pH=7.5 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tamponu içerisine alınan çoklu-CLEA'lar farklı sıcaklık değerlerinde ($T=15, 25, 35, 45, 55$ ve 65°C) 1 h boyunca inkübe edildikten aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.25'te çoklu-CLEA aktivitesinin sıcaklık ile değişimi sunulmuştur. Sıcaklığın artmasıyla her iki enzim aktivitesi 35°C 'ye kadar artmış daha sonrasında azalmıştır. Sıcaklık değeri 15°C değerinden 35°C değerine kadar arttırıldığında çoklu-CLEA amilaz ve lipaz aktiviteleri de artış göstermiştir. Bu sıcaklık artışı ile amilaz aktivitesinde 1.55 kat, lipaz aktivitesinde ise 1.64 kat artış gözlenmiştir. Daha sonra sıcaklık değeri 35°C değerinden 65°C değerine arttırıldığında çoklu-CLEA hem amilaz hem de lipaz aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Bu sıcaklıktaki değişim ile amilaz aktivitesinde 0.08 kat, lipaz aktivitesinde ise 0.05 kat aktivite kaybı gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre daha sonraki işlemler için optimum sıcaklık değeri her iki enzim için de 35°C olarak belirlenmiştir.

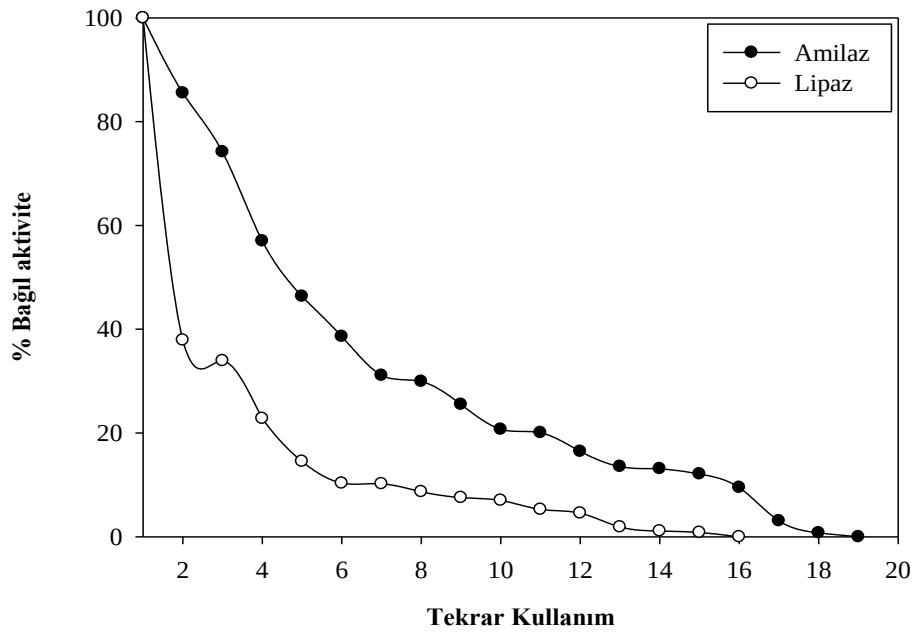


Şekil 4.25 Çoklu-CLEA aktivitesinin sıcaklık ile değişimi.

4.7 Çoklu-CLEA Tekrar Kullanılabilirliği

Endüstriyel uygulamalarda immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği, maliyet açısından etkin kullanım için önemli bir faktördür. Bu çalışmada Bölüm 3.5'te verilen yöntem uygulanarak lipaz ve amilaz enzimlerini içeren çoklu-CLEA'nın tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Şekil 4.26'da her bir kullanımdan sonra ölçülen aktivite değerleri bağıl aktivite olarak sunulmuştur. Çoklu-CLEA'ların 4 döngü sonunda bağıl aktivite değerleri amilaz için %57, lipaz için %23 olarak bulunmuştur. Talekar vd. (2013a), sentezledikleri taşıyıcısız çoklu-CLEA'da beş döngüde aktivitenin iyi korunduğunu, sonrasında sekizinci döngüye kadar aktivitenin düştüğünü bildirmiştir.

Schoevaart vd. (2004), CLEA'larında santrifüj sonrası kümeleşme problemin olduğunu ve bunun da substratın aktif merkezlere kütle aktarımını zorladığını bildirmiştir. Tekrarlanan kullanımdan sonra aktivitedeki azalma, mekanik hasardan ve tekrarlanan tamponla yıkama ve enzimin sızmasından kaynaklanabilmektedir (Nadar vd. 2016, Talekar vd. 2012).



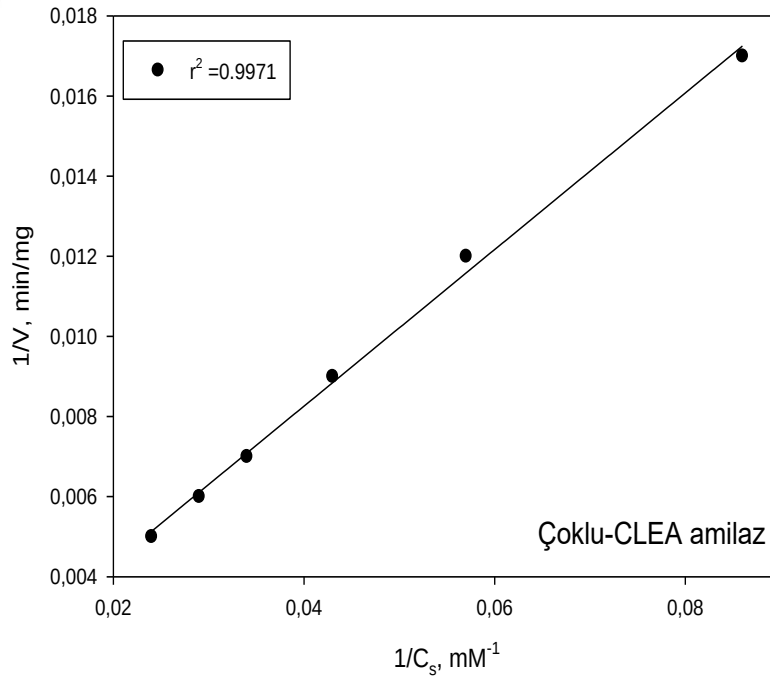
Şekil 4.26 Çoklu-CLEA tekrar kullanılabilirliği.

4.8 Çoklu-CLEA Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

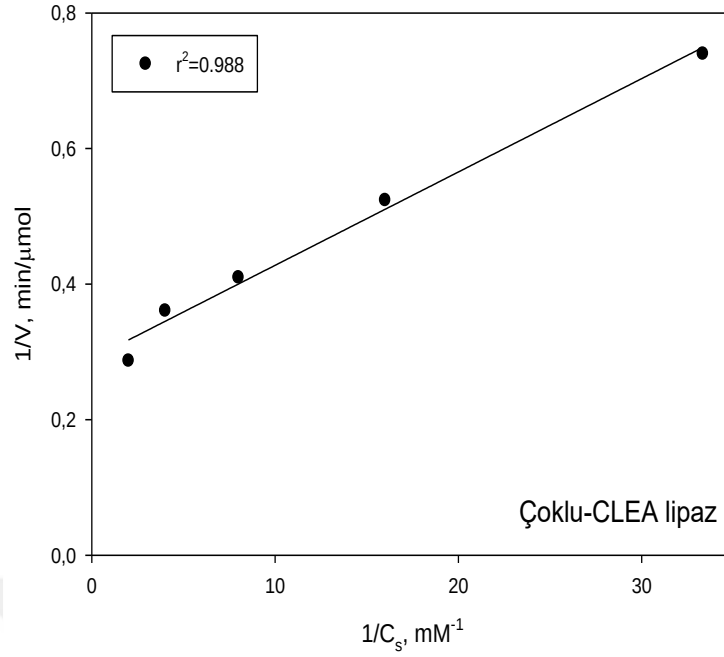
Çoklu-CLEA'ların Michealis-Menten kinetik sabitleri farklı derişimlerde lipaz enzimi için *p*-NPA (0.03 – 0.50 mM) ve amilaz enzimi için nişasta (11 – 42 mM) substratları kullanılarak 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄.2H₂O tamponunda optimum sıcaklık ve pH (pH=7.5 ve T=35°C) değerlerinde 200 rpm karıştırma hızı koşullarında gerçekleştirilen hidroliz tepkimelerinin başlangıç hızlarının ölçülmesiyle belirlenmiştir.

Şekil 4.27'de çoklu-CLEA bünyesindeki amilaz enzimi için nişasta substratı kullanılarak hidroliz tepkimesinin başlangıç hızlarının ölçüm verilerinden oluşturulan Lineweaver-Burke grafiğı sunulmuştur. Amilaz enzimi için Michealis-Menten sabitleri K_M=442.68 mM ve V_{max}=2265.52 mg/min olarak hesaplanmıştır.

Çoklu-CLEA bünyesindeki lipaz enzimi için farklı *p*-NPA derişimlerinde elde edilen hız verileri Lineweaver-Burke grafiğinin çiziminde kullanılmıştır (Şekil 4.28). Elde edilen doğrunun kayma değerinden V_{max} değeri 3.45 µmol/min olarak, eğim değerinden K_M değeri 0.0475 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.27 Lineweaver-Burke grafiğı: Amilaz agregatı



Şekil 4.28 Lineweaver-Burke grafiği: Lipaz agregatı

$V_{\max}$ değeri enzimin kendine özgü özelliklerini yansıtırken, bölünme ve yayılma etkilerine bağlı olarak K_M değeri enzimin etkinliğini yansıtmaktadır. K_M değeri ile enzimin substrata afinitesi arasında ters bir ilişki vardır (Salgın ve Salgın, 2017). İmmobilizasyona bağlı konformasyonel değişikliklerin, enzimin aktif bölgesini substrata doğru yönlendirmesine yardımcı olduğunu öne sürülmektedir (Aytar ve Bakır, 2008; Sangeetha ve Abraham, 2008; Talekar vd. 2012). K_m değerlerinin yüksek olması çapraz bağlandıktan sonra immobilize enzim yapısının konformasyonel esnekliğinin azaltılması ve makro moleküler substrat için sınırlı erişilebilirliğin azalması olarak açıklanabilir (Nadar ve Rathod, 2016; Sojitra vd., 2016) .

5. SONUÇLAR

Çoklu enzim sistemlerin tasarımı; kısa döngü süresi, üretimin artması ve ardışık enzimatik tepkimelerde substratın etkin taşınımı gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır. Bu yüksek lisans çalışmasında, amilaz ve lipaz enzimleri tek bir CLEA yapısına entegre edilerek çoklu-CLEA biyokatalizörleri sentezlenmiştir. amilaz ve lipaz enzimlerinin çoklu-CLEA formları sentezlenmiştir. Çoklu-CLEA sentezinde enzim aktivitesine; toplam enzim miktarı, çapraz bağlayıcı ajan derişimi, çapraz bağlanma süresi, çeşitli presipitantlar, katkı maddeleri etkileri incelenmiştir. Ayrıca, çoklu-CLEA için optimum pH ve sıcaklık değerleri, tekrar kullanılabilirliği, kinetik parametreleri, morfolojik ve kimyasal yapıları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- Toplam enzim derişiminin arttırılması ile çoklu-CLEA aktivitesinde artış gözlenmiştir.
- Çapraz bağlanma süresinin arttırılmasıyla çoklu-CLEA aktivitesi bir miktar artmış, daha sonra azalmıştır.
- Çapraz bağlayıcı derişiminin arttırılmasıyla çoklu-CLEA aktivitesi azalmıştır.
- En uygun presipitant PEG-6000 olarak ve miktarı 0.6 g olarak belirlenmiştir.
- En uygun katkı maddesi L-lizin ve derişimi, 3.33 mg/mL olarak belirlenmiştir.
- Çoklu-CLEA için en uygun sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 35°C, pH= 7.5 olarak kabul edilmiştir.
- Çoklu-CLEA'lar 4 döngü sonunda katalitik aktivitesini önemli bir kısmını korumuştur.

KAYNAKLAR

- Akkuş, E.** (2015). Manyetik nanopartiküller ve çapraz bağlı lipaz agregatları kullanılarak yeni bir biyokatalizör geliştirilmesi. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans Tezi)*, 72s, Sivas
- Aptiş, H.** 2012. “Süperkritik Akışkan Ortamında Lipazların Taşıyıcısız Enzim İmmobilizasyonu”, *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (Yüksek Lisans Tezi)*, Sivas.
- Ahumada, K., Urrutia, P., Illanes, A.; Wilson, L.** (2015). Production of combi-CLEAs of glycosidases utilized for aroma enhancement in wine. *Food Bioprod. Process.* 94, 555–560.
- Ayhan, H., Ayhan, F., Gülsu A.** (2012). Highly biocompatible enzyme aggregates crosslinked by L-lysine. *Turk J Biochem.* 37, 14–20.
- Aytar, B.S., Bakir, U.** (2008). Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates. *Process Biochemistry*, 43, 125–131.
- Bakkal, M.** (2006). Tutuklanmış *Candida rugosa* lipazı ile rasemik naproksen metil esterden (S)-naproksen üretiminde proses parametrelerinin incelenmesi. *Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans Tezi)*. 139s, Ankara.
- Cao, L., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A.** (2000). Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase. *Org. Lett.* 2, 1361–1364.
- Cao, L., LangenL., Sheldon, R. A.** (2003). Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free. *Current Opinion in Biotechnolog*, 14, 387–394.
- Cao, L.** (2005). Carrier-Bound Immobilized Enzymes, Principles, Applications, and Design; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2005.
- Chen, Z., Wang, Y., Liu, W., Wang, J., Chen, H.** (2017). A novel cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of papain andneutrase-production, partial characterization and application. *International Journal of Biological Macromolecules.* 95, 650–657.
- Cui J.D., Jia, S.R.** (2013). Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: current development and future challenges. *Crit. Rev. Biotechnol. Informa Health Care.* 1-14.

- Dalal, S., Kapoor, M., Gupta, M.N.** (2007). Preparation and characterization of combi-CLEAs catalyzing multiple non-cascade reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 44, 128–132.
- de Souza, P.M., de Oliveira-Magalhães, P.** (2010). Application of microbial α -amylase in industry, *Braz J Microbiol.* 41(4):850-61.
- Dinçyürek D.** (2011). Süperkritik CO₂ ile Ön İşlem Görmüş *Candida rugosa* ve *Candida antarctica* Lipaz Enzimlerinin Çapraz Bağlı EnzimAgregatları. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü* (Yüksek LisansTezi), 91s, Sivas.
- Elaldi, G.** (2018). Çapraz bağlı lipaz agregatları-manyetik nanopartikül komplekslerinin sentezi ve karakterizasyonu. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü* (Yüksek LisansTezi), 72s, Sivas.
- Fukara, G.** (2007). Bazı ekstrem termofil bakterilerin amilazlarının özelliklerinin belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü* (Yüksek Lisans Tezi). 65s, Ankara.
- Goetze, D., Foletto, E.F., da Silva, H.B., Vitória, C.C., Silveira, V.C.C., Dal Magro, L., Rodrigues, R.C.** (2017). Effect of feather meal as a proteic feeder on combi-CLEA preparation for grape fruit clarification. *Proc. Biochem.* 62, 122–127.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B.** (2003). Microbial α amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. 38, 1599-1616.
- Gupta, M.N., Dalal, S., Kapoor, M.** (2007). Preparation and characterization of combi-CLEAs catalyzing multiple non cascade reactions. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 44,128–132.
- Hasirci N., Aksoy S., Tümtürk H.** (2006). Activation of Poly(Dimer Acid-Co-Alkyl Polyamine) Particles for Covalent Immobilization of α -Amylase. *React. Funct. Polym.*, 66 (12): 1546-1551.
- Isfahani-Landarani, A., Taheri-Kafrani, A., Amini, M., Mirkhani, V., Moghadam, M., Soozanipour, A., Razmjou, A.** (2015). Xylanase immobilized on novel multifunctional hyperbranched polyglycerol-grafted magnetic nanoparticles: An efficient and robust biocatalyst. *Langmuir*. 31, 9219-9227.
- Kartal, F., Janssen, M.H.A., Hollmann, F., Sheldon, R.A., Kılınç, A.** (2011). Improved Esterification Activity of *Candida rugosa* lipase in Organic Solvent

- by Immobilization as Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs), *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71, 85-89.
- Khanahmadi, S., Yusof, F., Amid, A., Mahmud, S.S., Mahat, M.K.** (2015). Optimized preparation and characterization of CLEA-lipase from cocoa pod husk, *J.Biotechnol.* 202, 153–161.
- Kim, M.H., Parka, S., Kimb, Y.H., Wonc, K., Leea, S.H.** (2013). Immobilization of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* through cross-linked enzyme aggregates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 97, 209– 214.
- Liu, D-M., Chen, J., Shi, Y-P.,** (2018). Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization, *Trends in Analytical Chemistry*, 102, 332-342.
- Lopez-Serrano, P., Cao, L., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A.** (2002). Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: Application to lipases. *Biotechnol. Lett.*, 24, 1379–1383.
- Mahmud, S.S., Yusof, F., Jami, M.S.** (2014). Extraction and screening of various hydrolases from Malaysian channel catfish (*Ictalurus punctatus*) viscera, *Int. J.Chem. Environ. Eng.* 5 (2), 79–82.
- Mahmud, S.S., Yusof, F., Jami, M.S., Khanahmadi, S., Shah, H.** (2015). Development of an immobilized biocatalyst with lipase and protease activities as a multipurpose cross-linked enzyme aggregate. *Process. Biochem.* 50, 2144–2157.
- Mateo, C., Chmura, A., Rustler, S., van Rantwijk, F., Stolz, A., Sheldon, R.A.** (2006). Synthesis of enantiomerically pure (S)-mandelic acid using an oxynitrilase-nitrilase bienzymatic cascade: A nitrilase surprisingly shows nitrile hydratase activity. *Tetrahedron Asymmetry* 17, 320–323.
- Matijosyte, I., Arends, I.W.C.E., Vries, S., Sheldon, R.A.** (2010). Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62, 142–148.
- Meral, S.** (2013). Kitosan kaplı manyetik taneciklere alfa-amilaz immobilizasyonu. *Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.* 178s, Ankara.
- Nadar, S.S., Rathod, V.K.** (2016). Magnetic macromolecular cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of glucoamylase, *Enzyme and Microbial Technology*, 83, 78–87.

- Narlı, I.** (2006). Activity analysis of immobilized tyrosinase enzyme in the presence of different inhibitors. *Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Master of Science Thesis)*.116s, Ankara.
- Natalello, A., Ami, D., Brocca, S., Lotti, M., Doglia, S.M.** (2005). Secondary structure, conformational stability and glycosylation of a recombinant *Candida rugosa* lipase studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochem J.* 385, 511-517.
- Nelson, D.L., Cox, M.M.** (2005). Biyokimyanın İlkeleri, *Palme Yayıncılık (Çeviri ed. Kılıç, N.)*, Ankara, 1151 p.
- Ning, C., Su, E., Tian, Y., Wei, D.** (2014). Combined cross-linked enzyme aggregates (combi-CLEAs) for efficient integration of a ketoreductase and a cofactor regeneration system. *J. Biotechnol.* 184, 7–10.
- Nguyen, L.T.; Yang, K.-L.** (2017). Combined cross-linked enzyme aggregates of horseradish peroxidase and glucose oxidase for catalyzing cascade chemical reactions. *Enzym. Microb. Technol.* 100, 52–59.
- Özacar, M., Mehde, A.A., Mehdi, W.A., Özacar, Z.Z., Severgün, O.** (2019). The novel multi cross-linked enzyme aggregates of protease, lipase, and catalase production from the sunflower seeds, characterization and application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 173, 58–68
- Özdemir, G.** (2019). Termal kaynaklardan sıcaklığa dirençli alfa-amilaz enzimi üreten bakteri izolasyonu ve enzimin kısmi karakterizasyonu. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans Tezi)*, 82s, Osmaniye.
- Pera, L.M., Baigori, M.D., Pandey, A., Castro, G.R.** (2015). Industrial Biorefineries & White Biotechnology. *Biocatalysis*, Chapter 10, 19s, Argentina.
- Pervez, S., Nawaz, M.A., Shadid, F., Aman, A., Tauseef, I., Qader, S.A.U.** (2019). Characterization of cross-lined amyloglucosidase aggregates from *Aspergillus fumigatus* KIBGE-IB33 for continuous production of glucose. *International journal of niological macromolecules.* 135, 1252-1260.
- Polizelli, P.P., Tiera, M.J., Bonilla-Rodriguez, G.O.** (2008). Effect of surfactant and polyethylene glycol on the activity and stability of a lipase from oilseeds of *Pachira aquatica*. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 85, 749-753.

- Rakshit S.K.** (1998). Utilization of starch industry wastes. In: Martin, A.(Ed.), Bioconversion of waste materialsto industrial products, second ed. Blackie Academicand Professional London.
- Rehman, S., Bhatti, H.N., Bilal, M., Asgher, M.** (2016). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of Pencillium notatum lipaseenzyme with improved activity, stability and reusability characteristics. *Int. J. Biol. Macromol.* 91, 1161–1169.
- Roessl, U., Nahalka, J., Nidetzky, B.** (2010). Carrier-free immobilized enzymes for biocatalysis. *Biotechnol Lett* 32, 341–350.
- Salgin S., Salgin U.** (2017). Bioconjugation of magnetic iron oxide nanoparticles and cross-linked enzyme aggregates: characterization and comparison of CLEAs and magnetic CLEAs, *Current Nanoscience*, 13 (2), 149-158.
- Sangeetha, K., Abraham, T.E.** (2008). Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of Substulisin for controlled release application. *International Journal of Biological Macromolecules*.43(3), 314-319.
- Schoevaart, R., Wolbers, M.W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, P.G., van Rantwijk, F., Van der Wielen, L.A.M., Sheldon, R.A.** (2004). Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnol. Bioeng.* 87, 754–762.
- Shah, S., Sharma, A., Gupta, M.N.** (2006). Preparation of Cross-Linked Enzyme Aggregates by using Bovine Serum Albumin as a Proteic Feeder. *Analytical Biochemistry*, 351, 207–213.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. Chand** (2001). Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 19 627–662.
- Sheldon, R.A.** (2007). Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Adv. Synth. Catal.* 349,1289–1307.
- Sheldon, R.A.** (2007). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts. *Biochem Soc Trans*, 35, 1583-1587.
- Sheldon, R.A., Schoevaart, R., Van Langen, L.M.** (2009). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatalysis and Biotransformation*. 23, 141-147.

- Sheldon, R.A.** (2011). Characteristic features and biotechnological applications of crosslinked enzyme aggregates (CLEAs). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92, 467–477.
- Sheldon, R.A., van Pelt, S.** (2013). Enzyme Immobilization: Why, What and How? *Chem. Soc. Rev.* 42, 6223–6235.
- Sheldon, R.A.** (2019). CLEAs, Combi-CLEAs and ‘Smart’ Magnetic CLEAs: Biocatalysis in a Bio-Based Economy. *Catalyst*, 9, 261-292.
- Sojitra, U.V., Nadar, S.S., Rathod, V.K.** (2016). A magnetic tri-enzyme nanobiocatalyst for fruit juice clarification. *Food Chem.* 213, 296–305.
- Stressler, T., Ewert, J., Eisele, T., Fischer, L.** (2015). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of PepX and PepN-production, partial characterization and application of combi-CLEAs for milk protein hydrolysis. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 50, 752–760.
- Sundarram, A., Murthy, T.P.K.** (2014). α -Amylase Production and Applications: A Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(4), 166-175.
- Şahutoğlu, A.S.** (2013). α -amilaz ve γ -amilaz enzimlerinin çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) şeklinde immobilizasyonu. *Çanakkale On Sekiz Mart Üniversitesi (Yüksek Lisans Tezi)*. 97s, Çanakkale.
- Talekar, S., Ghodake, V., Ghotage, T., Rathod, P., Deshmukh, P., Nadar, S., Mulla, M., Ladole, M.** (2012). Novel magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of alpha amylase. *Bioresource Technol.* 123, 542-547.
- Talekar, S., Pandharbale, A., Ladole, M., Nadar, S., Mulla, M., Japhalekar, K., Pattankude, K., Arage, D.** (2013a). Carrier free co-immobilization of alpha amylase, glucoamylase and pullulanase as combined cross-linked enzyme aggregates (combi-CLEAs). *Bioresour. Technol.* 147, 269–275.
- Talekar, S., Joshi, A., Joshi, G., Kamat, P., Haripurkar, R., Kambale, S.** (2013b). Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). *RSC Advances*, 3, 12485-12511.
- Talekar, S., Joshi, G., Chougale, R., Nainegali, B., Desai, S., Joshi, A., Kambale, S., Kamat, P., Haripurkar, R., Jadhav, S., Nadar, S.** (2014). Preparation of stable cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of NADH-dependent nitrate reductase and its use for silver nanoparticle synthesis from silver nitrate. *Catalysis Communication*. 54, 62-66.

- Talekar, S., Joshi, A., Kambale, S., S., Jadhav, Nadar, S., Ladole, M.** (2017). A tri-enzyme magnetic biocatalyst with one pot starch hydrolytic activity. *Chemical Engineering Journal*. 325, 80-90.
- Telefoncu A.** (1995). *Biyoteknoloji*. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir. 253s.
- Touahar, I.E., Haroune, L., Ba, S., Belenger, J.P., Cabana, H.** (2014). Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase and their utilization for the elimination of pharmaceuticals. *Sci. Total Environ*. 481, 90–99.
- Tuna, S.** (2011). Alginat ve karagenan jellerde *Candida rugosa* lipazı ve defne lipazının immobilizasyonu. *Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans Tezi)*. 84s, Edirne.
- Tükel, S., Hürrem, F., Yıldırım, D., Alptekin, Ö.** (2013). Preparation of crosslinked enzyme aggregates (CLEA) of catalase and its characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 97, 252-257.
- Tüzün C.** (1997). *Biyokimya* (3rd ed.). Palme Yayınları, Ankara. 477p.
- Wang, M., Qi, W., Jia, C., Ren, Y., Su, R., He, Z.** (2011). Enhancement of activity of cross-linked enzyme aggregates by a sugar-assisted precipitation strategy: technical development and molecular mechanism. *J. Biotechnol*. 156, 30–38.
- Whitaker J. R.** (1993). *Principles of Enzymology for the Food Sciences* (Vol 2). CRC Press, New York. 625p.
- Wong D. W. S.** (1995). *Food Enzymes: Structure and Mechanism* (Vol 3). Chapman & Hall, New York. 37-83.
- Xue, X.; Woodley, J.M.** (2012). Process technology for multi-enzymatic reaction systems. *Bioresour. Technol*. 115, 183–195.
- Yılmaz, E.**(2016). Farklı Teknikler Kullanarak Değişik Destek Materyallerine Lipaz Immobilizasyonu ve Bir Anti-İnflamatör Olan S-Naprokseninin Oluşumunda Kullanılması. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Doktora Tezi)*, 275s, Konya.
- Yamaguchi, H., Miyazaki, M., Asanomi, Y., Maeda, H.** (2011). Poly-lysine supported cross-linked enzyme aggregates with efficient enzymatic activity and high operational stability. *Catal Sci Technol*. 1, 1256–1261.

Zhang, W. W., Yang, X.L., Jia, J.Q., Wang, N., Hu, C.J., Yu, X.Q. (2015). Surfactant-activated magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of *Thermomyces lanuginosus* lipase for biodiesel production. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 115, 83–89.

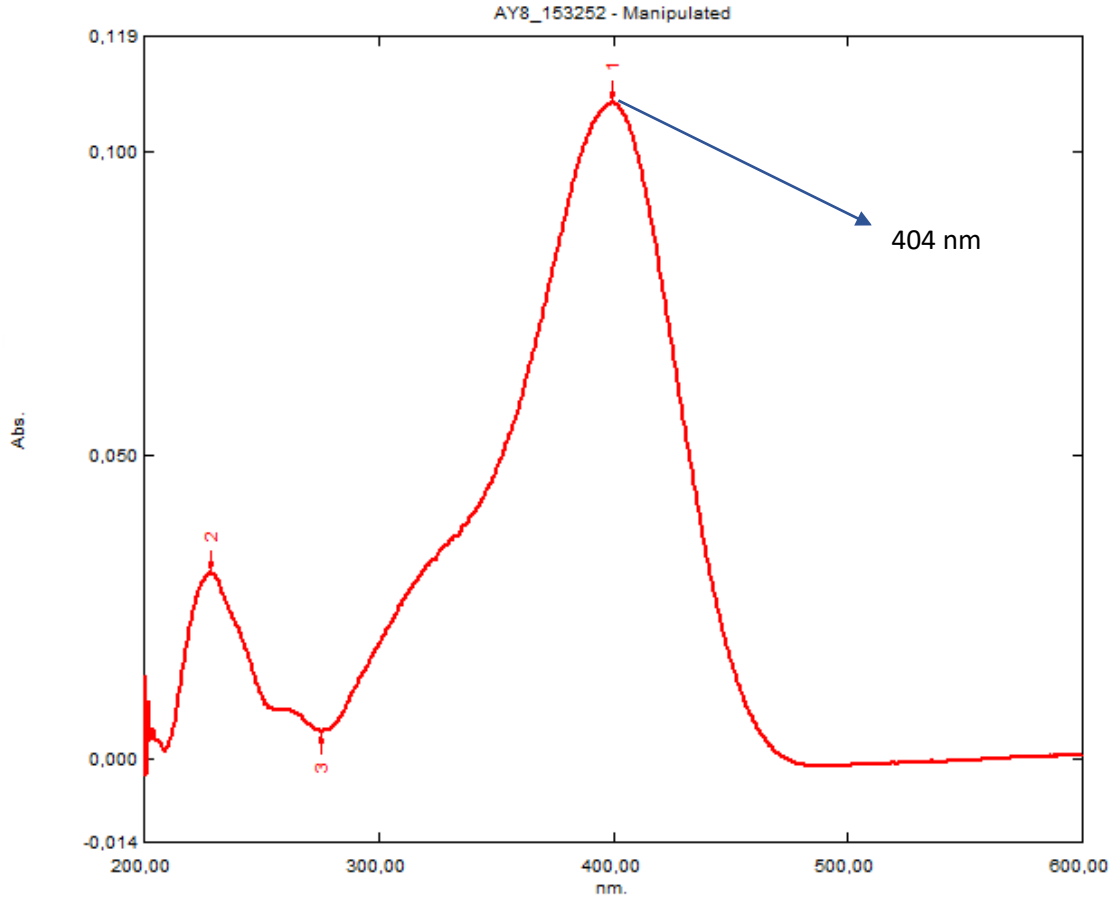




EKLER

EK-1 *p*-NP Spektrum Taraması

0.1 M ve pH=7.5 koşullarındaki Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tampon sisteminde hazırlanan *p*-NP'ün UV-Vis spektrofotometreden elde edilen spektrumu Şekil E1'de gösterilmiştir. Spektrum taramasında da görüldüğü gibi spektrofotometrik çalışmalar için en uygun dalga boyu değeri *p*-NP için 404 nm olarak saptanmıştır.



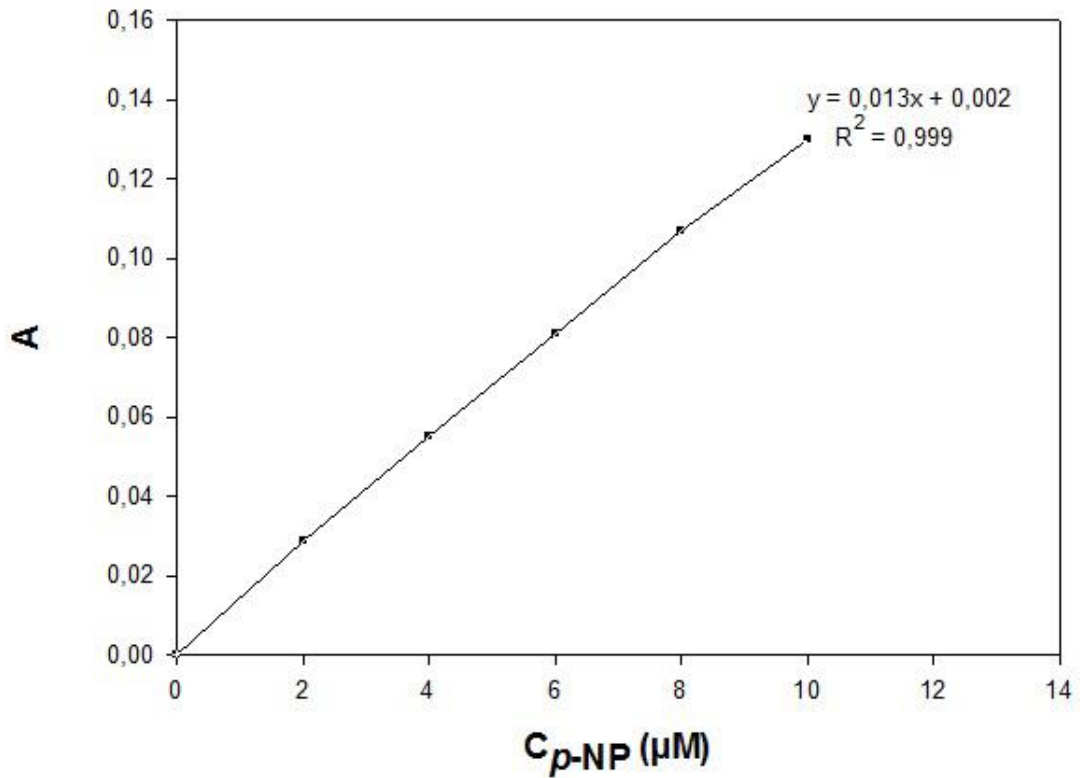
Şekil E1 *p*-Nitrofenol'ün spektrum taraması

EK-2 *p*-NP için Kalibrasyon Doğrusu

Çizelge E1'de *p*-NP'ün 0.1 M ve pH=7.5 koşullarındaki Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tamponunda farklı derişimlerinde hazırlanan çözeltilerinin 25°C sıcaklıkta ve $\lambda=404$ nm dalga boyunda UV-Vis spektrofotometrede okunan absorbens değerleri sunulmuştur. Çizelge E1'deki verilerin grafiğe geçirilmesi ile elde edilen *p*-NP'ün kalibrasyon doğrusu Şekil E2'de gösterilmiş olup R^2 değeri 1 olarak belirlenmiştir.

Çizelge E1 *p*-Nitrofenol derişimlerinde ölçülen absorbens değerleri

<i>p</i> -NP derişimi (μ M)	2	4	6	8	10
Absorbans	0.029	0.055	0.081	0.107	0.130



Şekil E2 *p*-NP için kalibrasyon doğrusu.

EK-3 *p*-NP için Absorptivite Değerinin Belirlenmesi ve Enzim Hidrolitik Aktivitesinin Hesaplanması

Seyreltik sistemlerde absorbans ile derişim arasındaki ilişki Lambert–Beer yasası ile tanımlanır (Eşitlik E1).

$$A = \varepsilon b C \quad (E1)$$

Burada;

A : Absorbansı

ε : Molar absorptivite katsayısı

b : Işığın çözelti içinde aldığı yol

C : Çözelti derişimi

Eşitlik (E1)'in her iki tarafı herhangi bir bağımlı değişkene göre türevi alınırsa Eşitlik (E2) elde edilir.

$$dA = d(\varepsilon b C) \quad (E2)$$

ε ve b birer sabit olduğundan türev dışına çıkartılır ve düzenlenirse Eşitlik (E3) elde edilir.

$$dA = \varepsilon b dC \quad (E3)$$

Lambert–Beer yasası, derişim ile absorbans ilişkisinin doğrusal olduğu durum için tanımlanmış bir yasadır. Bu durumda bir adi türevli diferansiyel denklem Δ şeklinde farklarla ifade edilebilir (Eşitlik E4).

$$\Delta A = \varepsilon b \Delta C \quad (E4)$$

Şekil E2'de gösterilen kalibrasyon doğrusu lineer bir değişim göstermektedir. Bu değişimin eğimi Eşitlik (E4)'de verilen εb değerinin kolaylıkla Eşitlik (E5) yardımıyla bulunmasını sağlar.

$$\text{Eğim} = \frac{\Delta A}{\Delta C} = \varepsilon b \quad (E5)$$

Şekil E2'de sunulan *p*-NP derişime karşı absorbans değerleri-grafiğın eğimi Denklem E5 gereğince molar absorptivite katsayısı ve ışığın çözelti içindeki aldığı yolun çarpımına eşittir (Eşitlik E6).

$$\varepsilon b = 0.013 \mu\text{M}^{-1} \quad (E6)$$

Burada; $b=1$ cm olduğuna göre $\varepsilon = 0.013 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bulunur.

CLEA ile *p*-NPA'ın hidroliz tepkimesi, tepkime stokiyometrisine göre 1 μmol ürün yani *p*-NP açığa çıkması için eş molar *p*-NPA substratı gerektirmektedir. Eşitlik (E3)'deki türev zamana göre alınırsa Eşitlik (E7) elde edilir;

$$\frac{dA}{dt} = \varepsilon b \frac{dC}{dt} \quad (E7)$$

Derişimin zamanla değişimi oluşan ürün için de aynı zamanda tanımlanabilir (Eşitlik E8) ve bu derişim lineer bir ilişkinin söz konusu olduğu bölge için yazılırsa bu durumda Eşitlik (E9) elde edilir.

$$\frac{dC}{dt} = \frac{1}{\epsilon b} \frac{dA}{dt} \quad (E8)$$

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{1}{\epsilon b} \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (E9)$$

Eşitlik (E9)'daki matematiksel ifade, Bölüm 3.3'de verilen hidrolitik aktivitenin tanımına göre aşağıdaki şekilde düzenlenmiştir.

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{1}{(1 \text{ cm})(0.013 \text{ cm}^{-1} \mu\text{M}^{-1})} \frac{\Delta A}{(60) \text{ saniye}} \quad (E10)$$

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = 1.282 \frac{\mu\text{M}}{\text{saniye}} \Delta A \quad (E11)$$

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = 1.282 \frac{\mu\text{M}}{\text{saniye}} \frac{60 \text{ saniye}}{1 \text{ dakika}} \frac{\mu\text{mol/L}}{1 \mu\text{M}} \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \frac{25 \text{ mL}}{2 \text{ mg enzim}} \frac{1000 \text{ mg enzim}}{1 \text{ g CLEA}} \Delta A \quad (E12)$$

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} \cong 961.5 \frac{(\mu\text{mol})}{(\text{g CLEA})(\text{dakika})} \Delta A \quad (E13)$$

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = U = 961.5 \frac{(\mu\text{mol})}{(\text{g CLEA})(\text{dakika})} \Delta A \quad (E14)$$

Çoklu-CLEA biyokatalizörünün hidrolitik lipaz aktivitesinin belirlenmesine ilişkin örnek bir hesaplama; 35°C ve pH 7.5 koşullarında *p*-NPA'nın enzimatik hidroliz tepkimesi sonunda açığa çıkan ürün *p*-NP'ün çözelti içindeki üretim hızı spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Kinetik modda gerçekteştirilen absorbans ölçümlerinin 2-3 ve 3-4 dakikaları arasında oluşan ürünün absorbans değerleri farklarının aritmetik ortalamalarından yararlanılarak hesaplanmıştır. Bu dakikalar aktivitenin en düzgün artan noktaları olduğundan seçilmiştir. 2, 3 ve 4 noktalarında absorbans değerleri sırasıyla; 0.604, 0.987 ve 1.244 olarak saptanmıştır. Elde edilen deneysel bulgular ışığında enzimin hidrolitik aktivitesi Denklem (E14)'den yararlanarak aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

$$\Delta A_{2,3} = 0.987 - 0.604 = 0.383$$

$$\Delta A_{3,4} = 1.244 - 0.987 = 0.257$$

$$\Delta A = \frac{\Delta A_{3,4} + \Delta A_{2,3}}{2} = \frac{0.257 + 0.383}{2} = 0.320$$

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = U = 961.5 \frac{(\mu\text{mol})}{(\text{g CLEA})(\text{dakika})} \times 0.320$$

$$U = 307.68 \frac{(\mu\text{mol})}{(\text{g CLEA})(\text{dakika})}$$

EK-4 Maltoz için Absorptivite Değerinin Belirlenmesi ve Enzim Hidrolitik Aktivitesinin Hesaplanması

Çoklu-CLEA biyokatalizörü ile nişastanın hidroliz tepkimesi, tepkime stokiyometrisine göre 1 μmol ürün yani maltoz açığa çıkması için eş molar nişasta substratı gerektirmektedir.

Maltoz derişime karşı absorbans değerleri Eşitlik E5 gereğince molar absorptivite katsayısı ve ışığın çözelti içindeki aldığı yolun çarpımına eşittir (Eşitlik E6).

$$\epsilon b = 1.503 \mu\text{M}^{-1} \quad (\text{E6})$$

Eşitlik (E9)'daki matematiksel ifade, Bölüm 3.3'de verilen hidrolitik aktivitenin tanımına göre aşağıdaki şekilde düzenlenmiştir.

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{1}{(1 \text{ cm})(1.503 \text{ cm}^{-1}\mu\text{M}^{-1})} \frac{A}{(180) \text{ saniye}} \quad (\text{E15})$$

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = 3.69 \times 10^{-3} \frac{\mu\text{M}}{\text{saniye}} A \quad (\text{E16})$$

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = 3.69 \times 10^{-3} \frac{\mu\text{M}}{\text{saniye}} \frac{60 \text{ saniye}}{1 \text{ dakika}} \frac{\mu\text{mol/L}}{1 \mu\text{M}} \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \frac{2 \text{ mL}}{2 \text{ mg enzim}} \frac{1000 \text{ mg enzim}}{1 \text{ g CLEA}} A \quad (\text{E17})$$

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = 221.4 \frac{(\mu\text{mol})}{(\text{g CLEA})(\text{dakika})} A \quad (\text{E18})$$

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = U = 221.4 \frac{(\mu\text{mol})}{(\text{g CLEA})(\text{dakika})} A \quad (\text{E19})$$

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı Hasan Zeynel ENDOĞAN
Doğum Yeri ve Tarihi Yenimahalle – 20 Ekim 1993
Medeni Hali Bekar
Yabancı Dil İngilizce
İletişim Adresi Gültepe Mahallesi Türe Sokak
Karahan Apartmanı A Blok No:23
Daire: 12
Beşyol/Küçükçekmece/İSTANBUL
E-posta Adresi hasan.endogan@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise Selahattin Akbilek Lisesi, 2011, Ankara.
Lisans Cumhuriyet Üniversitesi, 2016, Sivas.
Yüksek Lisans Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, 2020, Sivas.

Proje ve Denevım

Prof. Dr. Sema SALGIN (Yürütücü)	Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (M-739) Taşıyıcı İçermeyen İmmobilize Çoklu- enzim Sistemlerinin Tasarımı	Hasan Zeynel ENDOĞAN (Araştırmacı)
Hatko Electronics A.Ş.	Kimya Mühendisi, 2019	Laboratuvar Sorumlusu

Kongre ve Bildiriler

ENDOĞAN, H.Z., SALGIN, S., SALGIN, U. (2019). Amilaz ve Lipaz Enzimlerinin Birleşik CLEA Formunun Sentezi, 3. Avrasya Uluslararası Uygulamalı Bilimler Kongresi, Sivas.
ENDOĞAN, H.Z., SALGIN, S., SALGIN, U. (2019). Çapraz Bağlayıcı Ajan Derişiminin Birleşik CLEA Aktivitesine Etkisi, 3. Avrasya Uluslararası Uygulamalı Bilimler Kongresi, Sivas.