

**SÜPERKRİTİK AKIŞKAN ORTAMDA
LİPAZLARIN TAŞIYICISIZ ENZİM İMMOBİLİZASYONU**

HASAN APTİŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
2012**

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜPERKRİTİK AKIŞKAN ORTAMDA
LİPAZLARIN
TAŞIYICISIZ ENZİM İMMOBİLİZASYONU

HASAN APTİŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
DOÇ.DR. UĞUR SALGIN

SİVAS
2012

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : _____

Üye : _____

Üye : _____

ONAY

Bu tez çalışması, 06 /11/2012 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir

Prof. Dr. Mustafa Değirmenci
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 7 sayılı toplantısında kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

ÖZET

SÜPERKRİTİK AKIŞKAN ORTAMDA LİPAZLARIN TAŞIYICISIZ ENZİM İMMOBİLİZASYONU

HASAN APTİŞ

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Uğur SALGIN

2012, 98 sayfa

Presipite edilen enzimlerin kovalent çapraz bağlanmasıyla oluşturulan çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) taşıyıcısız immobilize enzim ailesine son yıllarda katılmıştır. Yüksek lisans tez projenin temel amacı; yaygın uygulamalar için katalitik açıdan oldukça aktif ve yeniden kullanılabilir CLEA'larının tasarımına yönelik esnek bir teknoloji platformu oluşturmaktır. Bu yeni teknoloji ile hazırlanan CLEA'lar enzim agregatların partikül boyutlarının kontrolü, enzim konformasyonunun esnekliği ve enzim aktivitesinin artırılması gibi önemli avantajlar sağlamaktadır. Süperkritik akışkanın fizikokimyasal karakteristiklerinin proses parametreleri ile değiştirilmesi sonucu enzimin mikro çevresi meydana gelen değişimler enzimin katalitik aktivitesini ve kararlılığını etkilemektedir. Bir protein çözeltisi süperkritik CO₂ (scCO₂) ile basınçlandırıldığında çözeltinin asitlik derecesini azaltarak potansiyel protein presipitasyonu gerçekleşmektedir. Çözeltilerin elektrostatik sabiti uygun presipitant ve agregat ajanının eklenmesiyle değiştirilebilir. Yüksek lisans tez projesinde model enzim olarak *Candida rugosa* lipazı (CRL) kullanılmıştır. CLEA teknolojisindeki darboğazların çözümü taşıyıcısız enzim immobilizasyonunun koşulları optimize edilerek çözülebilir ve elde edilen immobilize enzimlerin morfolojik ve yapısal değişimleri ile karakterize edilebilir. Bu projenin amacı doğrultusunda yüksek basınç reaktör sistemi içerisinde scCO₂ ortamında ön işlem gören CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'ların katalitik performansının geliştirilmesi hedeflenmiştir. scCO₂'in sıcaklık ve basınç koşulları sırasıyla 31-50 °C ve 7.38-30 Bar aralığında değiştirilmiştir. CRL enzimi kullanılarak oluşturulacak olan CLEA'ların katalitik performanslarını geliştirmek için en uygun ön işlem koşulları; 31 °C, 100 bar ve 15 min olarak belirlenmiştir. CLEA aktivitelerinde başlangıç enzim derişimi (C_{E0}=150 mg/mL) ve amonyum sülfat derişimi (C_{(NH4)2SO4}=600 mg/mL) etkisinde incelenmiştir. Oluşturulan agregatların birbirine bağlanmasında çapraz bağlayıcı ajan olarak gluteraldehit (GA) kullanılmıştır. GA derişimi C_{GA}=20-40 µL/mL değişim aralığında incelenmiştir. Sentezlenen CLEA'ların katalitik aktivitelerini arttırmak için proteik feeder ajan olarak bovin serum albümin (BSA) ve lizin, katkı maddesi olarak da Triton X-100 kullanılmıştır. Sentezlenen CLEA'ların katalitik aktivitelerini arttırmak için proteik feeder ajan olarak bovin serum albümin (BSA) ve lizin, katkı maddesi olarak da Triton X-100 kullanılmıştır. BSA derişimi C_{BSA}= 3.33-16.65 mg/mL, lizin derişimi (C_{Lizin}=1.67-8.35 mg/mL) ve Triton X-100 derişimi C_{Triton X-100}=3.33-6.66 µL/mL değişim aralığında incelenmiştir. CLEA sentezinde ortam pH'ının etkisi de incelenmiştir. Ortam pH'ı 5-9 aralığında değişmiştir. En yüksek CLEA aktivitesine, pH=7'ı olan 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄.2H₂O tampon ortamında ön işlem görmüş enzimin C_{E0}=150 mg/mL, C_{GA}=20 µL/mL, C_{(NH4)2SO4}=600 mg/mL, Clizin =6.67 mg/mL ve C_{Triton X-100}=6.66 µL/mL koşullarında elde edilmiş ve CLEa aktivitesi 3755 U/g CLEA olarak saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Taşıyıcısız enzim immobilizasyonu, Çapraz bağlı enzim agregatları, *Candida rugosa* lipazı, Enzim, Süperkritik CO₂

ABSTRACT

LIPASE ENZYME IMMOBILIZATION CARRIER OF SUPERCRITICAL FLUID ENVIRONMENT

HASAN APTİŞ

Master of Science Thesis, Department of Chemical Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Uğur SALGIN

2012, 98 pages

Cross-linked enzyme aggregates created by covalent cross-linking of the enzyme precipitated have participated in the carrier-free enzyme immobilization family in the recent years. This master project is to construct a flexible technology platform for designing highly active and reusable CLEAs for broad applications. CLEAs prepared with this new technology provides significant advantages such as particle size control of enzyme aggregates, flexibility of enzyme conformation and improvement of enzyme activity. The alteration of physicochemical characteristics of supercritical fluids by process parameters remarkably influence around the micro environment of enzymes and this also affects catalytic activity and stability of enzyme. The acidity degree of a protein solution decreases with the pressurization of supercritical CO₂, and so the potential protein precipitation can occur. The electrostatic constant of solutions can be changed with the addition of the appropriate precipitant and aggregate agents. The solution of drawbacks in the CLEA technology can be solved by the enzyme immobilization conditions. The immobilized enzyme obtained can be characterized by morphological and structural changes. For the purpose of this project we aim to enhance the catalytic performance of enzyme which treated with scCO₂ medium in high pressure reactor system before the CLEA preparation of CLEA. The pressure and temperature conditions of scCO₂ were varied 31-50 °C and 7.38-30 Bar, respectively. The appropriate pre-treatment conditions to improve the catalytic performance of CLEAs synthesized using CRL were determined as 31 °C, 100 bar and 15 min. The effect of initial enzyme concentration ($C_{E0}=150$ mg/mL) and ammonium sulphate concentration ($C_{(NH_4)_2SO_4}=600$ mg/mL) on CLEAs activities were investigated. Glutaraldehyde (GA) as cross-linking agent was used for binding in the generated aggregates. The concentration of GA varied from 20-40 µL/mL. Bovine serum albumin (BSA) and lysine as a proteic feeder and also Triton X-100 on CLEAs activities were also investigated to increase the catalytic activity of the synthesized CLEAs. BSA concentration (C_{BSA}) and lysine concentration (C_{Lysine}) varied from 3.33 to 16.65 mg/mL, and from 1.67 to 8.35 mg/mL, respectively, and also Triton X-100 concentration ($C_{Triton X100}$) varied from 3.33 to 6.66 µL/mL. The effect of the environment pH was also investigated in CLEA synthesis. The range of the environment pH varied from 5 to 9. The maximum CLEA activity obtained as approximately 3755 U/g CLEA at $C_{E0}=150$ mg/mL, $C_{GA}=20$ µL/mL, $C_{(NH_4)_2SO_4}=600$ mg/mL, $C_{Lysine}=6.67$ mg/mL and $C_{Triton X-100}=6.66$ µL/mL with pH=7 0.1M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄.2H₂O buffer

Keywords: Carrier free enzyme immobilization, Cross linked enzyme aggregates, *Candida rugosa* lipase, *Candida antarctica* lipase, Enzyme, Supercritical CO₂

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca kıymetli görüşlerinden yararlandığım, tezimin planlanması ve yürütülmesinde, tezimin her aşamasında yoğun ilgi ve desteğini gördüğüm Sayın Doç.Dr. Uğur SALGIN’a tezimin yürütülmesindeki, desteklerinden ve dostane yaklaşımlarından ötürü derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Deneysel sonuçlarımın yorumlanmasında ve bazı dar boğazların aşılmasında verdiği fikirlerle çalışmalarına destek olan hocam Doç.Dr. Sema SALGIN’a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen araştırma grubumuzun üyeleri değerli arkadaşlarım Kimya Yüksek Mühendisleri Cumhur TEMÜRER, Seda BAHADIR, Hasan KORKMAZ ve Ömer ALTINSOY’a, doktora öğrencileri Arş. Grv. Derya DİNÇYÜREK ve Arş. Grv. Nagihan SOYER’e çok teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde yanımda olan, beni bugünlere getiren, beni ben yapan isimlerin başında gelen Canım Annem Bedriye APTİŞ’e, okuyup iyi bir mevkie gelmemi benden daha çok isteyen Canım Babam Murat APTİŞ’e ve her zaman bana destek veren Canım Kardeşim Eren APTİŞ’e sonsuz teşekkür ederim. Tüm okul hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Dayım Sadık KUMLUK ve ailesine çok teşekkür ederim.

“Süperkritik Akışkan Ortamda Lipazların Taşıyıcısız Enzim İmmobilizasyonu” konulu Yüksek Lisans Tez Projemi, CÜBAP M-463 nolu proje destekleyen Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne ayrıca teşekkür ederim.

HASAN APTİŞ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER DİZİNİ	xv
KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	7
2.1 Enzimler	7
2.1.1 Lipazlar	9
2.1.1.1 Lipazın yapı ve işlevi	13
2.1.2 Enzim/Protein Üç Boyutlu Yapısı	16
2.1.3 Lipazın Uygulamaları	17
2.2 Enzim İmmobilizasyonu	19
2.2.1 İmmobilize Enzimlerin Özellikleri	20
2.2.2 Destek Materyali	22
2.2.3 İmmobilizasyon Yöntemleri	23
2.2.3.1 Fiziksel Adsorpsiyon	23
2.2.3.2 Kovalent Bağlama	24
2.2.3.3 Hapsetme	26
2.2.4 Taşıyıcısız Enzim İmmobilizasyonu	28
2.2.5 Çapraz Bağlı Enzim Agregatları Üretiminde Karşılaşılan Darboğazlar	32
2.3 Süperkritik Akışkanlar	33
2.3.1 Süperkritik Akışkanların Uygulamaları	36
2.3.2 Süperkritik Akışkan Ortamında Enzimlerin Katalitik Performanslarını Etkiyen Faktörler	37
3 MATERYAL VE METOD	49
3.1 Materyaller	49
3.2 Çapraz Bağlı Enzim Agregatlarının Hazırlanması	49
3.2.1 Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması	49
3.2.2 Üretim Ortamından Gelen Safsızlıkların Giderilmesi	50

3.2.3 Süperkritik CO ₂ Ortamında Enzimlere Ön İşlem Uygulanması	53
3.2.3.1 Yüksek Basınç Reaktör Sistemi	53
3.2.3.2 Enzimlerin Süperkritik CO ₂ İle Tersinir Basınç Denatürasyonu	54
3.2.4 Çapraz Bağlı Enzim Agregatlarının Üretimi	55
3.3 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	56
3.4 Enzimin Konformasyonel Yapısındaki Değişimler	57
3.5 Enzim Boyutundaki Değişimler	58
4 ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMALAR	60
4.1 Süperkritik CO ₂ 'nin Termodinamik Değişkenlerinin Candida rugosa Lipaz Enzimi Aktivite Etkisi	60
4.2 Süperkritik CO ₂ Ortamda Termodinamik Değişkenlerin Candida rugosa Lipaz Enziminin Konformasyonel Yapısına Etkileri	63
4.2.1 Saflaştırılmış CRL Enziminin Konformasyonel Yapısındaki Değişimler	63
4.3 Çapraz Bağlı Enzim Agregatlarının Üretiminde Enzim Aktivitesine Etki Eden Parametrelerin İncelenmesi	66
4.3.1 Gluteraldehit ve Lizin Derişiminin Etkisi	66
4.3.2 Katkı Maddesi Triton X-100 ve BSA Etkisi	72
4.3.3 Katkı Maddesi Triton X-100 ve Lizin Derişiminin Etkisi	75
4.3.4 Yüksek Basınç Reaktör Sisteminde CLEA Üretimi	84
4.3.5 CLEA Aktivitesine Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄ Tampon pH'ının Etkisi	85
5 SONUÇLAR	88
KAYNAKLAR	91
ÖZGEÇMİŞ	97

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 2005-2011 yılları arasında global endüstriyel enzim satış hacmi	1
Şekil 1.2 Triaçilgliserolün lipaz katalizli hidroliz tepkimesi	2
Şekil 1.3 Çapraz bağlı enzim agregatları biçimindeki taşıyıcısız enzim immobilizasyonu	6
Şekil 2.1 Açık ve kapalı konformasyonları içeren <i>Candida rugosa</i> lipazı enziminin 3D yapısı	11
Şekil 2.2 Lipazların α -sarmal ve β -yaprak yapılarının şematik gösterimi	14
Şekil 2.3 <i>Mucor miehei</i> lipazının kapağı (A, C) ve açık (B, D) formlarının yapısı	15
Şekil 2.4 Serbest ve taşıyıcısız enzim özelliklerinin karşılaştırılması	21
Şekil 2.5 Düşük iyon gücünde hidrofobik destekler üzerinde lipazın ara yüzey aktivasyonu	24
Şekil 2.6 Kovalent bağlama şeklinde yaygın olarak kullanılan immobilizasyon teknikleri	25
Şekil 2.7 Hapsetme yöntemi ile immobilizasyon	27
Şekil 2.8 Taşıyıcısız immobilizasyon için dört farklı metodolojik yaklaşım	29
Şekil 2.9 Saf CO ₂ ve H ₂ O için basınç-sıcaklık faz diyagramı	34
Şekil 3.1 <i>Candida rugosa</i> lipazı enziminin saflaştırılma basamakları	51
Şekil 3.2 Soğutma sirkülatörlü, orbital karıştırma sistemi	52
Şekil 3.3 Santrifüj cihazı	53
Şekil 3.4 Safir cam pencere ve mekanik karıştırıcı yüksek basınç reaktör sistemi	53
Şekil 3.5 <i>p</i> -nitrofenilasetat lipaz katalizli enzimatik hidroliz tepkimesi	56
Şekil 3.6 FTIR-ATR spektrofotometresi	58
Şekil 3.7 Zetasizer cihazı	58
Şekil 4.1 scCO ₂ ile ön işlem görmüş serbest formdaki CRL enzimlerinin aktivitesine termodinamik değişkenler sıcaklık ve basınç etkisi	61

Şekil 4.2 scCO ₂ ortamında farklı basınç değerlerinde ön işlem uygulanan saflaştırılmış CRL enzimlerinin, scCO ₂ ortamında ön işlem görmeyen CRL enzimi ile karşılaştırmalı spektrumları: T=31°C	64
Şekil 4.3 scCO ₂ ortamında farklı basınç değerlerinde ön işlem uygulanan saflaştırılmış CRL enzimlerinin, scCO ₂ ortamında ön işlem görmeyen CRL enzimi ile karşılaştırmalı spektrumları: T=40°C	65
Şekil 4.4 scCO ₂ ortamında farklı basınç değerlerinde ön işlem uygulanan saflaştırılmış CRL enzimlerinin, scCO ₂ ortamında ön işlem görmeyen CRL enzimi ile karşılaştırmalı spektrumları: T=50°C	66
Şekil 4.5 scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine GA derişimi etkisi: C _{Lizin} =1.67 mg/mL	67
Şekil 4.6 scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine GA derişimi etkisi: C _{Lizin} = 3.34 mg/mL	68
Şekil 4.7 scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine GA derişimi etkisi: C _{Lizin} = 5.01 mg/mL	69
Şekil 4.8 scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine GA derişimi etkisi: C _{Lizin} = 6.68 mg/mL	70
Şekil 4.9 scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine GA derişimi etkisi: C _{Lizin} = 8.35 mg/mL	71
Şekil 4.10 scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine BSA derişimi etkisi: C _{Triton X-100} =3.33 µL/mL; C _{GA} =20 µl/mL	73
Şekil 4.11 scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine BSA derişimi etkisi: C _{Triton X-100} =6.66 µL/mL; C _{GA} =20 µl/mL	74

Şekil 4.12 scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine lizin derişiminin etkisi: C _{Triton X-100} =3.33 µL/mL; C _{GA} =20 µl/mL	76
Şekil 4.13 scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine lizin derişiminin etkisi: C _{Triton X-100} =6.66 µL/mL; C _{GA} =20 µl/mL	77
Şekil 4.14 scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine lizin derişiminin etkisi: C _{Triton X-100} =3.33 µL/mL; C _{GA} =30 µl/mL	78
Şekil 4.15 scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine lizin derişiminin etkisi: C _{Triton X-100} =6.66 µL/mL; C _{GA} =30 µl/mL	79
Şekil 4.16 scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine lizin derişiminin etkisi: C _{Triton X-100} =3.33 µL/mL; C _{GA} =40 µl/mL	80
Şekil 4.17 scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine lizin derişiminin etkisi: C _{Triton X-100} =6.66 µL/mL; C _{GA} =40 µl/mL	81
Şekil 4.18 scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesinin GA derişimi ile değişimi: C _{E0} =150 mg/mL, C _{(NH4)2SO4} =600 mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu	82
Şekil 4.19 scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesinin GA derişimi ile değişimi: C _{E0} =150 mg/mL, C _{(NH4)2SO4} =600 mg/mL, C _{Triton X-100} =3.33 µL/mL, C _{BSA} =3.33 µL/mL C _{Lizin} =1.67 mg/mL ve pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu	83
Şekil 4.20 scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA aktivitelerine tampon pH'ının etkisi	86

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Mikroorganizmalar tarafından üretilen bazı lipaz örnekleri	3
Çizelge 2.1 Enzimlerin sınıflandırılması	8
Çizelge 2.2 Taşıyıcısız immobilize enzimlerin karşılaştırılması	32
Çizelge 2.3 Ekstraksiyon uygulamalarında kullanılan bazı akışkanların kritik sıcaklık ve basınç değerleri	35
Çizelge 2.4 Süperkritik karbondioksitin suda çözünürlüğü	36
Çizelge 2.5 50 °C sıcaklık koşullarında proteaz enzimlerinin enantioseçimliliğine süperkritik triflormetan ortam basıncının etkisi	41
Çizelge 3.1 Tampon sisteminin hazırlanması için gereken ortam bileşimi	50
Çizelge 4.1 Saflaştırılmış CRL enzimlerinin hidrotinamik boyutunun scCO ₂ ortamında farklı sıcaklık ve basınç değişimi	62
Çizelge 4.2 Yüksek basınç reaktör sisteminde CLEA oluşumunda kullanılan parametre ve değerler	84
Çizelge 4.3 CLEA üretimi için belirlenen en uygun koşullar	85

SİMGELER DİZİNİ

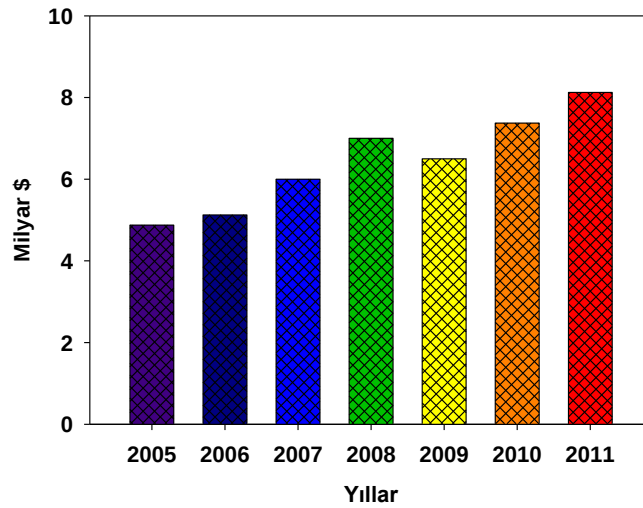
C_{E_0}	Başlangıç enzim derişimi, mg/mL
$C_{(NH_4)_2SO_4}$	Amonyum sülfat derişimi, mg/mL
C_{GA}	Gluteraldehit derişimi, μ L/mL
C_{BSA}	BSA derişimi, mg/mL
C_{Lizin}	Lizin derişimi, mg/mL
$C_{Triton\ X-100}$	Triton X-100 derişimi, μ L/mL
P	Mutlak basınç, bar
P_c	Kritik basınç, bar
T	Mutlak sıcaklık, $^{\circ}C$
T_c	Kritik sıcaklık, $^{\circ}C$

KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	Bovin Serum Albümin
CLE	Çapraz Bağlı Çözünmüş Enzim
CLEA	Çapraz Bağlı Enzim Agregatları
CLEC	Çapraz Bağlı Enzim Kristalleri
CRL	<i>Candida Rugosa</i> Lipazı
scCO ₂	Süperkritik Karbondioksit
SCF	Süperkritik Akışkan
GA	Gluteraldehit
D ₂ O	Döteryum Oksit
FTIR-ATR	Fourier Dönüşümlü Infrared-Azaltılmış Toplam Yansıma
HPLC	Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi

1 GİRİŞ

Enzim ve enzim sistemlerine yönelik teknolojilerin giderek gelişmesi, enzimatik sentezlerle elde edilen ekonomik değeri yüksek kimyasal ya da biyokimyasal moleküllerdeki çeşitliliğin artması nedeniyle biyokatalizör uygulamaların yer aldığı biyoteknoloji sektörlerinde endüstriyel enzimlere ve enzim sistemlerine olan ilgiyi gün geçtikçe arttırmaktadır. Enzimatik sentezlerin yer aldığı ilgili proseslerde ürün ya da endüstriyel proses geliştirmeye yönelik AR&GE çalışmalarında; üretim ortamı ve işletme koşullarına karşı maksimum performans gösterebilecek ideal biyokatalizör sistemlerinin geliştirilmesi, alternatif biyokatalizör sistemleri oluşturmak için yeni teknolojiler oluşturulması ya da var olan enzim sistemlerindeki darboğazların çözümüne yönelik çalışmalar da gün geçtikçe arttırmaktadır. Proseslerinde enzim kullanımına gerek duyan endüstrilerin bu ihtiyacını karşılamak için enzim üretimini gerçekleştiren üreticilerin satış hacimleri hakkında detaylı bir bilgi 2012 yılı Koncept Analytics raporunda sunulmuştur [1]. Şekil 1.1’de görüldüğü gibi bu raporda 2005-2011 yılları arasında gerçekleşen global endüstriyel enzim satış hacimleri dikkate alındığında belirlenen yıllar arasında yaklaşık %70’lik bir söz konusudur.

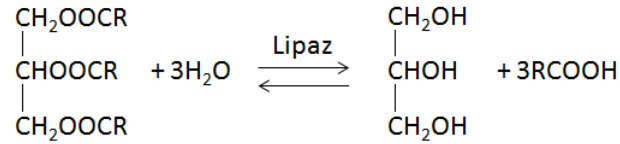


Şekil 1.1 2005-2011 yılları arasında global endüstriyel enzim satış hacmi

Endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin %59’unu proteazlar, %28’ini karbohidrazlar, %3’ünü lipazlar ve %10’unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır [2]. 21. yüzyılın başlarına doğru lipaz enzimlerinin global endüstriyel enzim satış hacimleri içerisindeki payı %4’e yükselmiştir [3, 4]. Lipazlar, suda çözünmeyen trigliseritleri, di-

ve mono-açilgliseridlere, serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Lipazlar, enzim sınıflandırmasında hidrolazlar (E.C.3), ester bağlarını parçalayanlar (E.C.3.1), karboksilik ester hidrolazlar (E.C.3.1.1) ve triaçilgliserol lipazlar (E.C.3.1.1.3) içinde yer almaktadırlar. Lipaz enzimleri başta hidroliz olmak üzere esterleşme, transesterleşme, interesterleşme, alkoliziz ve aminoliziz tepkimelerini düşük sıcaklıkta katalizleyebilme potansiyeline sahiptir.

Yağlar suda çözünmezler ve eğer hücre için besleyici olarak işlev görürlerse, emilimi kolaylaştırmak için daha düşük moleküllü parçalarına hücre dışında parçalanması gerekmektedir. Bu nedenle canlı sistemlerinde lipazların çoğu hücre dışında (extra cellular) bulunurlar. Şekil 1.2’de triaçilgliserolün lipaz katalizli hidroliz tepkimesinin stokiyometrik denklemi gösterilmiştir.



Şekil 1.2 Triaçilgliserolün lipaz katalizli hidroliz tepkimesi

Lipazlar hayvansal, bitkisel ve doğal veya genetik olarak iyileştirilmiş mikroorganizmalardan elde edilebilir. Çeşitli bakteri, maya ve küfler ticari lipaz üretim potansiyeline sahip mikroorganizmalardır. Çizelge 1.1’de lipaz üretim potansiyeline sahip bazı mikroorganizmaların türleri gösterilmiştir. Mikroorganizmanın türüne bağlı olarak elde edilen lipaz enzimlerinin en küçük molekül kütlesi 20-25 kDa aralığında ve en büyük molekül kütlesi ise 60-65 kDa arasında değişmektedir [5].

20. yüzyılın son çeyreğine kadar lipazların pek çok biyoteknoloji sektöründeki önemi ekonomik açıdan anlaşılamamıştır. Tüm enzimlerde olduğu gibi lipazların da ilgili biyoteknoloji sektörlerinde yaygın olarak kullanımını engelleyen en önemli faktörler arasında enzimlerin düşük stabilitesi, aktivitesi ve seçiciliği yer almaktadır. Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan sentezlenmektedir. Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel ya da hayvan kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajlara sahiptir. Mikrobiyal kaynaklı lipazların da biyokatalitik potansiyelinin

anlaşılmasıyla birlikte, lipaz enzimleri endüstrinin pek çok alanında yaygın olarak kullanılmaya başlanmış ve böylece toplam satış hacminde üçüncü sırada yer almıştır [6].

Çizelge 1.1 Mikroorganizmalar tarafından üretilen bazı lipaz örnekleri [1]

Mikroorganizma Kaynağı	Cinsi	Türü
Bakteriler	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
		<i>Bacillus cereus</i>
	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus canosus</i>
		<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
		<i>Micrococcus fredenreichii</i>
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas glumae</i>
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Mantarlar	<i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus delemar</i>
		<i>Rhizopus oryzae</i>
	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
		<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium cyclopium</i>
		<i>Penicillium camambertii</i>
	<i>Mucor</i>	<i>Mucor miehei</i>
		<i>Mucor javanicus</i>
Mayalar	<i>Candida</i>	<i>Candida rugosa</i>
		<i>Candida antarctica</i>
	<i>Pichia</i>	<i>Pichia bispora</i>
		<i>Pichia Svicola</i>
Aktinomisetler	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces cinnamomeus</i>
		<i>Streptomyces coelicolor</i>

Son yıllarda lipaz enzimlerinin katalizlediği hidroliz, esterleşme, transesterleşme, interesterleşme, alkoliziz ve aminoliziz reaksiyonlar ile ekonomik açıdan uygun işletme koşullarında sentezlenen kimyasal ve biyokimyasal moleküllerdeki çeşitliğin artması nedeniyle araştırmacıları enzim kullanımında karşılaşılan darboğazların çözümüne yönelik AR&GE çalışmalarını hızlandırmıştır.

Özellikle genetik mühendisliği prensipleri ile genetik özellikleri geliştirilmiş mikroorganizmalar yardımıyla lipaz enzimlerini gibi diğer enzim üretim kapasitelerinde artışlar sağlanmıştır [7]. Enzim içerikli üretim proseslerin global olarak ekonomik açıdan rekabet edilebilirliğinin sağlanabilmesi için stratejik yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bunun için enzimlerin katalitik özelliklerinin geliştirilmesi için bazı fiziksel ve kimyasal işlemler uygulanması ön plana çıkmıştır. Bu stratejilerden en önemlileri arasında enzimlerin immobilizasyonudur. Enzim immobilizasyon; yani lipaz gibi suda çözünen ve çözeltide serbest hareket edebilen enzim moleküllerin, suda çözünmeyen reaktif polimer taşıyıcıya kovalent bağlanarak, yine suda çözünmeyen yüzey aktif taşıyıcılarda adsorplanarak bifonksiyonel reaktifler ile çapraz bağlanarak ve polimer matriste yarı geçirgen membran veya mikro kapsüllerde tutuklanarak hareketinin sınırlandırılması olayı olarak tanımlanabilir [8]. Enzim immobilizasyonu ilk olarak sürekli sistemlerde enzim kullanımını sağlamak için geliştirilmiştir. Bunun yanı sıra, tepkime ortamından etkin biçimde uzaklaştırılabilmesi sonucu hem prosesin kontrolü kolaylaştırılabilmekte hem de enzimlerin geri kazanımı ile tekrar kullanımı sağlanabilmektedir. Ayrıca enzimlerin immobilizasyon ile katalitik aktivitesi, seçiciliği ve stabilitesi de arttırılabilmektedir [9].

Serbest enzimlerle kıyaslandığında immobilize formdaki enzimlerle;

- i) reaksiyon ortamdan kolayca uzaklaştırılabilmekte,
- ii) reaksiyon ürününün enzim attığı içermesi önlenebilmekte,
- iii) biyoproses koşullarına karşı dayanımı arttırılabilmekte,
- iv) uzun süre reaksiyon ortamlarında yeniden kullanılabilirliği arttırılabilmekte,
- v) seri ve paralel reaksiyonların yer alacağı biyokatalitik reaktör sistemlerinin geliştirilmesiyle hem ürün seçiciliği hem de verimliliğinin kontrolü sağlanabilmekte,
- vi) doğal enzimlere kıyasla kararlılıkları geliştirilebilmekte,
- vii) bazı durumlarda serbest enzimlere kıyasla daha yüksek aktivite gösterebilmekte, ve ayrıca
- viii) bazı enzimlerin immobilize edilmesi sonucu otokatalizi yani kendini parçalama olasılığı da azaltılabilmektedir.

Enzimlerin immobilizasyonu süreci ilk olarak 20. yüzyılın ikinci yarısında başlamıştır. Son 70 yıldır enzimlerin immobilizasyonu sürecinde birçok taşıyıcı sistemi enzim immobilizasyon yöntemlerinde geliştirilmiştir [9]. Bu süreçte, mikroküre, membran, film, kapsül gibi değişik immobilizasyon sistemleri taşıyıcı yani destek maddeleri olarak kullanılmıştır. Bu destek maddeleri doğal, yarı sentetik ya da sentetik polimerler ya da biyopolimerlerden oluşmaktadır. Taşıyıcı destek maddelerinin kullanmasındaki temel amaç;

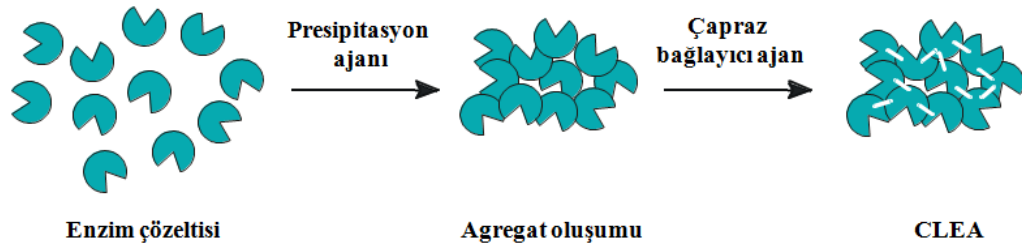
- i) enzimin sıvı (su ya da organik bir bileşik) tepkime ortamında çözünmez duruma getirmek,
- ii) taşıyıcıya bağlanmış enzimin ortam koşullarına karşı dayanıklılığını artırmak, ve
- iii) enzimin tepkime ortamından ayrılmasını kolaylaştırmaktır.

Taşıyıcılı immobilizasyon sistemlerinde destek maddesi olarak kullanılan materyalin (doğal, yarı sentetik ya da sentetik polimerler ve biyopolimer) katalitik olmayan kütlesi immobilize enzim formundaki biyokatalizörün katalitik aktivitesinde azalmaya neden olur. İmmobilizasyon işlemi sonunda elde edilen biyokatalizörün birim kütlesi başına enzim miktarının artırılması –yani daha fazla enzim yüklemesinin yapılması– biyokatalizörün katalitik aktivitesinde serbest enzime göre %50’den fazla azalmaya neden olabilmektedir [10].

Son yıllarda, yukarıda belirtilen bu darboğazların çözümü için taşıyıcısız enzim immobilizasyonu ve taşıyıcısız enzim immobilizasyon sistemlerinin geliştirilmesine yönelik bilimsel çalışmalar hem süreli yayın literatüründe hem de patent literatüründe geniş yer almaktadır. Taşıyıcısız enzim immobilizasyon işlemine yönelik ilk çalışma 1960 yıllarında serbest enzimlerdeki $-NH_2$ grupları ile çapraz bağlayıcı ajan gluteraldehitin $-CHO$ gruplarının birbirleriyle kovalent bağlanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Çözünmüş enzim moleküllerinin uygun çapraz bağlayıcı ile birbirlerine bağlanarak gerçekleştirilen immobilizasyon yönteminde moleküller arası çapraz bağlanmanın aktiviteyi, mekanik dayanımı ve verimi azalttığı saptanmıştır. Karşılaşılan bu darboğazların çözümüne yönelik çapraz bağlı enzim kristalleri (CLEC: cross-linked enzyme crystals) şeklinde gerçekleştirilen immobilizasyon yöntemi ile ilgili çalışmalar ilk olarak Quijoch ve Richards tarafından 1964 yılında gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlayıcı ajan olarak gluteraldehitin kullanıldığı bu

çalışmadaki immobilizasyon yönteminde boyut kontrolünde karşılaşılan problemler ve yüksek saflıkta kristal formunda enzim gereksinimi immobilizasyon yönteminin temel dezavantajları arasındadır. Enzimlerin immobilizasyonunda karşılaşılan bu darboğazların çözümü için çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA: cross-linked enzyme aggregates) biçimindeki enzim immobilizasyon yöntemi geliştirilmeye başlanmıştır. Son yıllarda CLEA formunda gerçekleştirilen enzim immobilizasyon yöntemi ise özel ilgi görmektedir.

Bu immobilizasyon yönteminde, Şekil 1.3’de gösterildiği gibi çözünmüş enzim molekülleri arasındaki uzaklık uygun bir presipitasyon ajanı yardımı ile sıklaştırılarak agregat oluşumunu sağlanması ve uygun bir çapraz bağlayıcı ajan yardımı ile agregat formundaki enzimlerin birbirleriyle kovalent bağlanması sürecini kapsamaktadır.



Şekil 1.3 Çapraz bağlı enzim agregatları biçimindeki taşıyıcısız enzim immobilizasyonu [11]

Sürekli yayın literatüründe çapraz bağlı enzim agregatları formunda gerçekleştirilen biyokatalizörlerin katalitik performansı ve kararlılığının çapraz bağlı enzim kristalleri formundaki biyokatalizörlerin katalitik performansı ve kararlılığına benzer olduğu bildirilmektedir. Çapraz bağlı enzim kristallerinin aksine çapraz bağlı enzim agregatları yoğun iş gücü gereksinimine ve yüksek saflıkta kristal formda enzim kullanımına gerek duyulmaz [12]. Çapraz bağlı enzim agregatları diğer taşıyıcısız enzim immobilizasyon yöntemlerine alternatif ve 2000’li yıllardan sonra ortaya çıkmış yeni bir yöntem olmasına karşın;

- enzim agregat boyutlarının herhangi bir difüzyon kısıtlaması olmadan nasıl kontrol edilebileceği,
- enzim konformasyonunun nasıl daha esnek hale getirilebileceği, ve
- enzim aktivitesi ve seçiciliğinin agregasyon koşullarının farklılaştırılması ile nasıl ayarlanabileceği

gibi darboğazların aydınlatılması gerekmektedir.

Yüksek lisans tez projesinin amacı; *Candida rugosa* lipaz enzimlerinin Şekil 3.1’de gösterilen agregasyon basamağı öncesi, tampon ortamında çözünmüş serbest formdaki lipaz enzimlerinin süperkritik CO₂ (scCO₂) ortamında ön işlem görmesiyle enzim konformasyon yapısında bir tersinir basınç denatürasyonu gerçekleştirerek aktif konumların korunmasını sağlamaktır. Böylece çapraz bağlayıcı ajan gluteraldehitin enzimlerde aşırı bağlanması önlenerek katalitik performansı geliştirilmiş çapraz bağlı enzim agregatları formundaki enzim immobilizasyonunun tasarımını gerçekleştirmektedir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Enzimler

Enzimler, kimyasal ya da biyokimyasal reaksiyonları katalizleyebilen biyomoleküler yapıdaki proteinlerdir. Proteinler, belirli amino asitlerin belirli sayıda ve belirli bir diziliş sırasında karakteristik düz zincirlerle birbirlerine kovalent bağlanmasıyla oluşmuş polipeptitlerdir. Enzimlerin makromoleküller yapıda olmasına karşın substratlara karşı doğrudan katalitik aktivite gösteren konumların sayısı ise çok azdır. Aktif konumlarının sayısı genellikle 3 ya da 4 aminoasitten oluşur [13]. Katalitik atık içeren enzim parçası yüzey üzerine bağlanır ve kimyasal değişimle 3 aminoasit birleşerek aktif konum denilen katalitik üçlü oluştururlar. Enzim için gerekli olan aktivite ve seçiciliği, amino asit dizilimindeki protein yapısının karakteristik katlanma modeli belirler. Enzimler sıcaklık ya da pH gibi ortam koşullarındaki ekstrem değişimlere maruz kalması durumunda denatürasyona uğrayarak protein yapısı değişebilir ve katalitik özelliklerini kaybeder .

Katalitik aktivitenin gerçekleşebilmesi için birçok enzim kofaktör olarak adlandırılan ve protein özellikte olmayan ek bir enzim bileşeni ile bağlı olması gerekir. Kofaktörler proteinin metal iyonlarından (Ca⁺², K⁺, Mg⁺, Zn⁺²) meydana gelen koenzim kısmıdır. Koenzim, enzimlerin aktivite göstermeleri için gereksinim duydukları organik moleküllerdir. Birçok kofaktör enzim ile bağlı olmamasına karşın kovalent bağ ile kendi aralarında oldukça sıkı bir bağ yaparlar. Enzim ve kofaktör arasındaki bağlanma güçlü ise kofaktöre protez grup denir, böyle bir enzime halojen enzim de denir. Enzimler yüksek aktivite ve seçicilik gibi mükemmel özelliklere sahip olup, çevre dostu biyomoleküllerdir. Canlı sistemlerde doğal evrim süreciyle birlikte biyolojik fonksiyonlarını optimize eden enzimler, kompleks biyokimyasal reaksiyonların yer

aldığı metabolik yol izinde ve geleneksel yöntemlerle sentezi mümkün olmayan reaksiyonları katalizleyebilirler.

Proteinlerde olduğu gibi enzimlerinde hemen hemen hepsi kiral olan aminoasit moleküllerinden meydana gelen yapılardan oluşur. Enzimler katalizledikleri tepkimeye göre oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olmak üzere 6 grupta sınıflandırılır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Enzimlerin sınıflandırılması [14]

Sınıf	Alt Grupları	Kod Numarası
Oksidoredüktazlar	CH-OH bağıını etkileyenler	E.C.1.1
	C=O bağıını etkileyenler	E.C.1.2
	C-C bağıını etkileyenler	E.C.1.3
	C-NH ₂ bağıını etkileyenler	E.C.1.4
	C-NH- grubunu etkileyenler	E.C.1.5
	NADH veya NADPH'a etkileyenler	E.C.1.6
Transferazlar	Tek karbon gurubu aktaranlar	E.C.2.1
	Aldehit ya da keton gurubunu aktaranlar	E.C.2.2
	Açıl transferazlar	E.C.2.3
	Glikosiltransferazlar	E.C.2.4
	Akil ve benzeri grupları aktaranlar	E.C.2.5
	Azotlu grupları aktaranlar	E.C.2.6
	Fosfor içeren grupları aktaranlar	E.C.2.7
	Kükürtlü grupları aktaranlar	E.C.2.8
Hidrolazlar	Ester bağıını hidroliz edenler	E.C.3.1
	Glikozil bileşiklerini hidroliz edenler	E.C.3.2
	Eter bağlarını hidroliz edenler	E.C.3.3
	Peptid bağlarını hidroliz edenler	E.C.3.4
	Peptid dışında kalan C-N bağlarını hidroliz edenler	E.C.3.5
	Asit anhidrit bağlarını hidrolize edenler	E.C.3.6
Liyazlar	C-C bağıını bölenler	E.C.4.1
	C-O bağıını bölenler	E.C.4.2
	C-N bağıını bölenler	E.C.4.3
	C-S bağıını bölenler	E.C.4.4
	C-halojenür bağıını bölenler	E.C.4.5
İzomerazlar	Rasemaz ve epimerazlar	E.C.5.1
	Cis-Trans izomerazlar	E.C.5.2
	Moleküler arası transferazlar	E.C.5.3
	Moleküller arası oksido-redüktazlar	E.C.5.4
	Moleküller arası liyazlar	E.C.5.5
Ligazlar	C-O bağlarını oluşturanlar	E.C.6.1
	C-S bağlarını oluşturanlar	E.C.6.2
	C-N bağlarını oluşturanlar	E.C.6.3
	C-C bağlarını oluşturanlar	E.C.6.4

Hidrolazlar bilimsel araştırmalarda ve endüstriyel uygulamalarda en yaygın kullanılan enzimlerdir. Hidrolaz grubunda yer alan enzimler; C–O, C–N, C–C ve fosfatlarda P–O bağlarını içeren ve bazı diğerk bağların hidrolitik parçalanmasını katalizlerler. Hidrolitik enzimler etki mekanizmalarına göre serin hidrolazlar, sistein hidrolazlar, metalloproteazlar ve aspartil proteazlar olmak üzere 4 gruba ayrılırlar. Lipazlar serin hidrolazlar grubunda yer alır. Serin hidrolazlar, enzimin aktif bölgesinde serin, histidin ve aspartik asitten oluşan katalitik üçlü taşırlar. Katalitik üçlüde serin kalıntısı yardımıyla enzime kovalent olarak bağlanan o-açıl ara ürününün oluşumunu katalizler. Bu ara ürünün nükleofilik yer değıştirmesi sonucu, ürün açığa çıkar [15].

2.1.1 Lipazlar

Lipaz (E.C. 3.1.1.3, triaçilgliserol açilhidrolaz), triaçilgliserol açil hidrolizi ve suda çözünmeyen lipid substratları ester bağlarının hidrolizini katalizler bu nedenle esterazların bir alt sınıfını oluşturan suda çözünebilen enzimlerdir. Karboksil ester bağları dışındaki bağların başka lipaz katalizörlüğünde olduğı tespit edilmiştir. Bu kapsamda, lipazlar karboksil esterazlar olarak ele alınır ve büyük esteraz ailesi içinde ayrı bir grup oluşturmaktadır. Lipazların fizyolojik önemi açısından canlı sistemlerinde potansiyel öneme sahiptir. Lipitler canlı sistemlerin; sindirim, taşınım ve beslenme proseslerinde çok önemli fonksiyonlara sahiptir. Bu nedenle bitki, hayvan ve mikroorganizma gibi değışik canlı sistemlerinde lipaz enzimi bulunabilir. Lipazlar hayvansal ve bitkisel yağların normal koşullar altında tersinir hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Lipazların yoğun bulunduğı canlı sistemlerine örnekler Çizelge 1.1’de verilmiştir. Mikrobiyal sistemlerden sentezlenen lipazlar daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda, sulu ya da organik sistemlerde gerçekleştirilen pek çok değıerli biyomolekülün reaksiyonlarını katalizleyebilen mikrobiyal kaynaklı lipazların biyokatalitik performanslarının geliştirilmesiyle birlikte endüstriyel üretimi gerçekleştirilen ürünlerin sentezlendiğı proseslerdeki reaksiyonların gerçekleştirilebilmesinde ve ürün verimliliğı ya da seçimliliğı yüksek ticari ürünlerin sentezinde biyokatalizör göreviyle bir inert besleme bileşeni olarak reaksiyon ortamlarında yer almaya başlamıştır.

Organik çözücülere karşı toleransı ve sıcaklığa karşı stabilitesi nedeniyle biyoteknoloji uygulamalarında yaygın kullanım alanına sahiptirler [16]. Ester bağına spesifik olan lipazlar yüksek sıcaklık koşullarında da aktif özellik gösterirler. Enzim substrat ilişkisinden sonra mikrobiyal kontaminasyonu ve yan ürün oluşumunu

engellerler. Son yıllarda farklı biyolojik kaynaklardan izole edilen lipazlar ile organik çözücülere ve yüksek sıcaklığa karşı karalılıklarını artırmaya yönelik bilimsel çalışmalar geniş bir spektrumda sürdürülmektedir. Diğer enzimlerin aksine lipazlar ekonomik ve kolay bulunabilirliğinin yanı sıra hem kimyasal hem de biyoteknolojik proseslerde hızla artan kullanım geniş bir potansiyel sahiptir [17].

Lipazlar yağ asitlerinin zincir uzunluğu, doyma derecesi, yağ asidinin pozisyonu ve substratın fiziksel durumuna uygun spesifiklik gösterirler. Triaçilgliserolün lipaz katalizli hidroliz tepkimesine bir örnek Şekil 1.1’de gösterilmiştir. Lipolitik enzimlerin aktivitesi süt endüstrisinde önemlidir. Margarinler, sorteningler (shortening), fırın ürünleri ve bitkisel ürünler gibi ürünlerde lipazla modifiye edilmiş tereyağı ürünleri aroma geliştirici olarak kullanılmaktadırlar [14]. Lipazlar, hem sulu hem de susuz çözücü sistemlerinde katalitik aktivite gösterdikleri için pek çok biyoteknolojik sektöründe özellikle farmasötik ve medikal alanında önemli bir potansiyele sahiptirler. Bu enzimlerin lipid içeren atık suların enzimatik degradasyonunda, organik sentezlerde, deterjan formülasyonlarında, biyolojik sürfektanların sentezinde, oleokimyasal endüstrisi, agrokimyasal endüstrisi, süt endüstrisi, kağıt endüstrisi, gıda endüstrisi, kozmetik endüstrisi ve farmasötik endüstrisinde yaygın uygulama alanları bulunmaktadır. Mikrobiyal lipazların biyoteknoloji sektörlerinde yüksek kullanım potansiyeli; organik çözücü sistemlerinde stabil olmaları, kofaktöre gereksinim duymamaları, geniş substrat spesifikliğine sahip olmaları ve yüksek enantiyoseçimlilik göstermelerinden kaynaklanmaktadır.

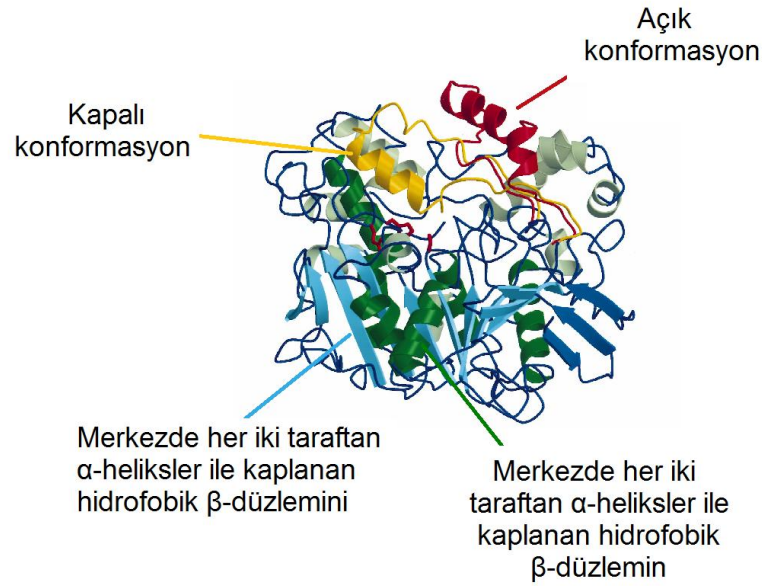
Lipaz enzimleri tarafından katalizlenen reaksiyonlar doğal metabolik yol izinde yer alan reaksiyonlara benzer. Kimyasal reaksiyonlara kıyasla ekosistem ile uyumlu bir biyomolekül olarak tanımlanırlar. Düşük aktivasyon enerjilerine sahip olmalarından dolayı lipazlarla gerçekleştirilen biyokatalitik reaksiyonlar daha düşük sıcaklık ve nötral pH ortamlarında gerçekleştirilmektedir. Ayrıca enerji gereksinimleri düşük olup, ürün ve substratlara karşı aktiviteleri çok yüksektir. Özellikle yüzey aktivasyonu nedeniyle yağ-su ara yüzeyinde lipazların aktiviteleri en yüksek seviyededir.

Lipazlar suda çözünmeyen substratların yer aldığı sistemlerde biyokatalitik tepkimeleri katalizleyebilme özelliğine sahiptir. Ancak reaksiyon ortamında istenilen dönüşüm oranına ulaşabilmek için yağ-su arayüzeyine sahip olması gerekir. Yapılan araştırmalar sonucunda tüm lipazların;

- i) α/β -hidrolaz katlanması (merkezde her iki taraftan α -heliksler ile kaplanan hidrofobik β -düzlemi),

- ii) Ser-His-Asp/Glu katalitik üçlüsünden oluşan bir aktif konum,
- iii) bir oksianyon boşluğu (substratın karbonil grupları üzerindeki oksianyonların gelişiminin dengede tutulmasını sağlar) ve
- iv) pek çok durumda aktif konumu kapatan α -heliksten oluşan bir kapak

içerdikleri gözlemlenmiştir. Yukarıda belirtilen açık ve kapalı konformasyonların üç boyutlu (3D) yapısı *Candida rugosa* lipazı enzimi için Şekil 2.1.'de gösterilmiştir [18].



Şekil 2.1 Açık ve kapalı konformasyonları içeren *Candida rugosa* lipazı enziminin 3D yapısı

1990 yılında lipaz enziminin 3D yapısının tanımlanmasından sonra ara yüzey aktivasyon olayının, çözelti içindeki enzimin aktif merkezini bir kapak gibi çevreleyen amfifilik peptidik yapıdaki bir halkadan kaynaklandığı düşünülmüştür. Ara yüzeyin olmaması durumunda lipaz ikincil yapı elemanlarına sahiptir ve bu yapı enzimin substrata ulaşmasını engeller. Fakat, hidrofobik bir ara yüzey ile karşılaşması durumunda lipaz “açık yapı” durumuna geçer ve aktif hale gelir. Bu şekilde lipazlar katalitik merkezi çevreleyen hidrofobik alanlar aracılığıyla hidrofobik yüzeylere güçlü bir şekilde adsorbe olur. Bu mekanizma kapak yapısı ile açıklanabilir. Daha önce de belirtildiği üzere lipazın aktif merkezi Asparjin–Histidin–Serin aminoasitlerini içermektedir. Çözelti içindeyken, heliksel bir kısım lipazın aktif merkezini çevreler fakat lipit veya organik çözücü varlığında kapağın açılması ile yapısal bir değişim olur

ve aktif merkezi içeren hidrofobik merkez ortamla temas eder. Bu sebeple, ara yüzeye olan gereksinim aktivite için temeldir. Kapağın dış yüzeyi nispeten hidrofilik iken aktif merkeze dönük olan kısım hidrofobiktir. Ara yüzey ile olan etkileşim artar ve substrat aktif merkezi içeren hidrofobik tünele girer. Kapak genellikle hidrofobik ve hidrojen bağları ile yerinde tutulur. Kapağın yapısı yüzeydeki yerleşim ve sayı olarak değişmektedir. Lipazın lipid ara yüzeyine bağlanma etkinliği kapaktaki α -heliksinin amfifilitesine bağlı olarak değişmektedir. Amphifilik özellikler azaldıkça enzimin aktivitesi de azalır. Bu şekilde ara yüzey aktivasyonunun lipaz yapısında bazı değişikliklere sebep olduğu varsayılmaktadır. Bu değişiklikler ile katalitik özellikler ve özellikle de seçicilik gelişir. Lipazın ara yüzeylerdeki davranışları göz önüne alındığında, adsorpsiyonun geri dönebilirliği, aktivite kaybı olasılığı ara yüzeyin kalitesi gibi bazı faktörler incelenmelidir. Genel olarak, artan yüzey basıncının desorpsiyona sebep olduğunun bilinmesinden dolayı, lipazların ara yüzeylere geri dönüşümlü olarak adsorbe olduğu düşünülür. Ara yüzeyin kalitesi lipazın aktivitesini etkileyebilir. Enzimin ara yüzeye olan eğilimi ve moleküllerin yerleşimi de aktivite üzerinde etkilidir. Canlılarda suda çözünmeyen lipid ile suda çözünebilir lipazın etkileşmesi sonucu trigliserid sindirimi su-yağ ara yüzeyinde gerçekleşmektedir. Ara biriminin yüzey alanı hidroliz hızını belirler. Öte yandan, reaksiyonun tersinir olduğu ve lipazların düşük su derişimi içeren ortamlarda ise reaksiyon ester sentezi ile transesterifikasyon için katalize edebilir olduğu da bilinmektedir [19].

Endüstriyel uygulama potansiyeli nedeniyle günümüzde lipaz enzimleri birçok proste ve akademik araştırmalarda yaygın biçimde kullanılmaktadır. Lipazlar; hayvan, bitki ve birçok doğal ya da genetiği modifiye edilmiş mikroorganizmaların endojen ve eksojen formlarından elde edilebilir. Bitki, hayvan ve mikrobiyal orijinli lipazların katalitik özellikleri arasında mükemmel bir uyum bulunmasına karşın, mikrobiyal yöntemle lipazların üretimi daha kolay ve çeşitli hidrolitik ve sentetik reaksiyonları katalizleyebilir. Metabolik yol izinde yer alan birçok reaksiyon mekanizması lipazlar yardımıyla gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle lipaz katalizli reaksiyonların yer aldığı prosesler için çevre dostu biyomoleküller olarak ele alınabilirler [20]. Kimyasal ve stereo-seçicilik özelliği nedeniyle lipazlar yüksek katma değerli ürünlerin üretim proseslerinde yer alır. Lipazların yer aldığı reaksiyonlar kimyasal katalizörlere kıyasla düşük aktivasyon enerjisine sahip olduğundan tepkime hızları daha fazladır. Ancak ılımlı sıcaklık ve pH koşullarda gerçekleştirilen reaksiyonlar nedeniyle tepkiyen ve ürünün için bir tehlike bulunmaz. Bunun yanı sıra organik çözücü ortamında

gerçekleştirilen lipaz katalizli reaksiyonlarda enzim kararlılığının korumak için kofaktöre gereksinim duyulmaz. Lipazlar; gıda farmasötik, tarımsal ilaç, aloe kimyası ve deterjan sektörleri gibi değişik biyoteknolojik proseslerde yaygın kullanıma sahiptir. Günümüzde organik kimyacılar, farmakologlar, fizikçiler, biyokimyasal ve proses mühendisleri, biyoteknoloji, mikrobiyolog ve biyokimyacıların araştırmalarında da lipazlar en çok ilgi gören potansiyel biyokatalizörlerdendir.

2.1.1.1 Lipazın yapı ve işlevi

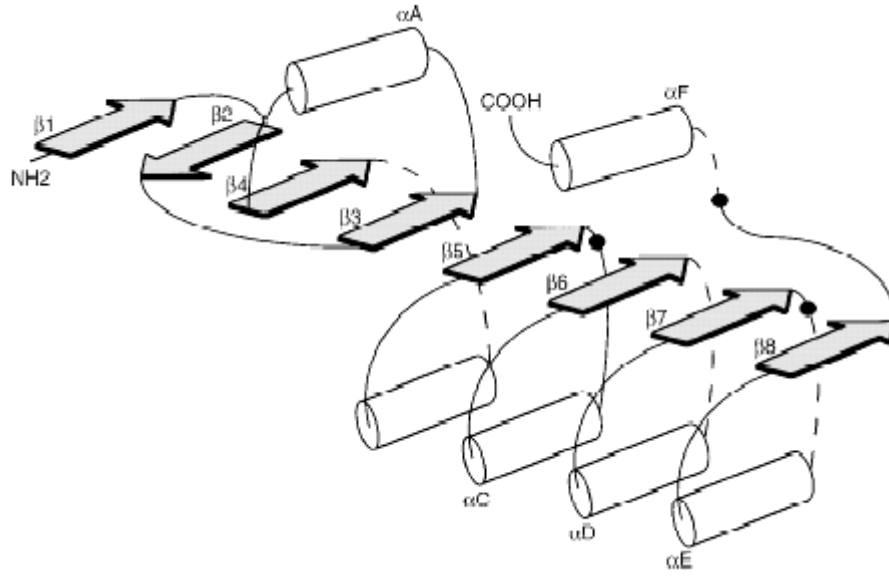
Hemen hemen tüm enzimler gibi lipazlar da küresel protein yapısındadır. Diğer enzimlerde olduğu gibi lipazların da uzun, düz zincirli ve kıvrımlı aminoasitlerden oluşan 3D yapısı bulunmaktadır. Lipazların 3D yapısal özelliği Şekil 2.2’de gösterildiği gibi α -heliks tarafından her iki yandan çevrelenmiş sekiz paralel β -yapraktan oluşur ve hidrolazı bir α/β yapısı izler [21].

1958 yılında Sarda ve Desnuelle ara yüzey aktivasyonu olayını temel alarak, lipazların etki mekanizmasını kinetik olarak tanımlamışlardır. Buna göre, lipazların aktiviteleri çözünen substratlara karşı zayıf, ancak çözünmeyen substratlara karşı oldukça fazladır. Bu özellikleri ile lipazlar, suda çözünen ester moleküllerine etki eden esterazlardan oldukça farklıdırlar ve uzun zamandan beri lipazlar, suda ağırlaştırılan moleküllerin hidrolizinde aktif olan, özel esteraz sınıfı olarak anılmaktadırlar. Esterazlar, lipazlardan arayüzey aktivasyonu göstermemeleri ve etki ettikleri substratların farklılıklardan dolayı ayrılırlar. Esterazlar, uzun zincirli yağ asitlerin esterlerini hidrolizlemezler ve suda çözünebilir substratları tercih ederler [22-23].

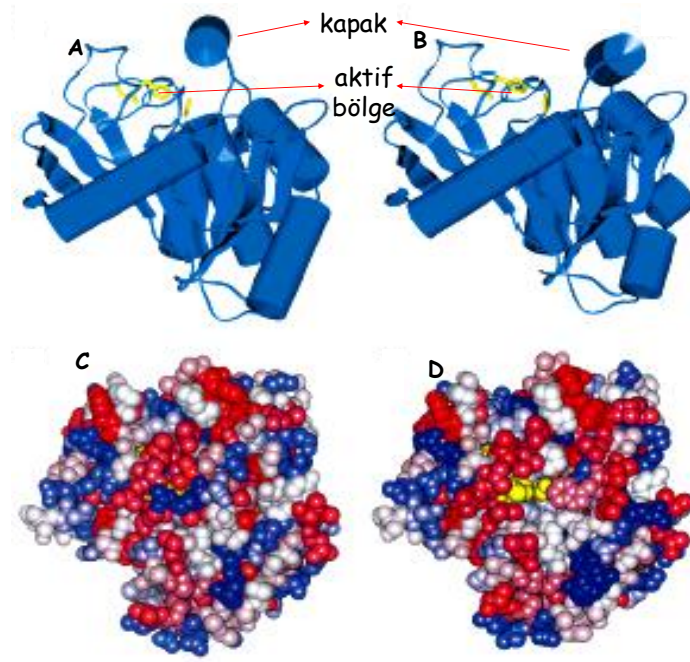
1990 yılında, ilk kez insan pankreatik lipazı (HPL) ve *Rhizomucor miehei* lipazlarının yapıları, X-ışını kırınım yöntemi ile ortaya çıkarılmıştır. Bu lipazlarda, bir kapağın aktif bölgeyi kapladığı görülmüştür. Daha sonraki araştırmalarda, lipaz ve substrat analogları arasındaki ortak kristallerin X-ışını yapılarından, lipid-su arayüzeyi varlığında, kapağın konformasyonel bir yeniden düzenlenme ile aktif bölgeyi, substratı kabul edebilecek hale getirdiği ortaya çıkmıştır [24]. Ancak, Avrupa Lipaz Projesi çerçevesinde, 1990-1994 yılları arasında 24 laboratuarda, yüksek saflıktaki lipazlar üzerinde gerçekleştirilen yapısal ve biyokimyasal çalışmalar sonucunda tüm lipazların arayüzey aktivasyonu göstermediği belirlenmiştir. Örneğin, tersiyer yapıları bilinen *Pseudomonas glumae* ve *Candida antarctica* (CAL-B) lipazları da aktif bölgelerini kaplayan amfipatik kapağa sahip oldukları halde, arayüzey aktivasyonu göstermemektedirler [22]. X-ışını yapı araştırmaları tüm lipazların α/β hidrolaz kıvrım

ailesinden olduklarını ve α sarmal ve β yaprakların spesifik dizininden oluşan ortak bir yapıya sahip olduklarını göstermiştir. α/β Hidrolaz kıvrımı, amfipatik iki α -sarmal arasına sıkışmış, merkezi, sekiz şeritli hidrofobik β -yapraktan oluşmaktadır. Şekil 2.2’de bu yapı şematik olarak gösterilmiştir [22-24].

Çoğu lipazın bir diğer ortak özelliği ise, amfipatik α -sarmal peptit dizinine sahip olan ve kapalı konformasyonda substratın katalitik üçlüye ulaşmasını önleyen bir kapağa sahip olmalarıdır. Bu kapak, lipaz gövdesine esnek yapı elemanları ile bağlanmış bir ya da iki adet kısa α -sarmallardan oluşur. Kapak açıldığında, hidrofobik substratın bağlandığı geniş bir hidrofobik yüzey ortaya çıkar. Tahmin edilen bu mekanizma, alkil fosfonatlar, sikloalkilfosfonatlar veya alkil sülfonatlar gibi hidrofobik inhibitörlerle kovalent kompleks oluşturulmuş lipazların X-ışını yapılarıyla desteklenmiştir [22-24]. Şekil 2.3’te *Mucor miehei* lipazının açık ve kapalı formları gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Lipazların α -sarmal ve β -yaprak yapılarının şematik gösterimi (Silindirler α -sarmalları, oklar da β -yaprak yapıları simgelemektedir. Aktif bölge kalıntıları siyah yuvarlaklar halinde gösterilmiştir. Ser, β^5 'ten sonra, Asp/Glu β^7 'den sonra, His ise β^8 ile αF arasında yer almaktadır).



Şekil 2.3. *Mucor miehei* lipazının kapalı (A, C) ve açık (B, D) formlarının yapısı

Lipazların birincil yapılarının aminoasit sayısında büyük farklılıklar olmasına karşın, bütün lipazların ortak özelliği aktif konumlarının üç serin aminoasit olan aspartat, glutamat ve histidinden oluşmasıdır. Lipazların aktif bölgesindeki kapakların büyük bir bölümü yüzeysel sarmal özelliktedir. Katalitik aktivitenin tam gerçekleşebilmesi için lipazda olmayan ek protein bileşenli *proco lipazları* adı verilen yapılar gereklidir.

Lipazların yapısı ve fonksiyonları geniş kapsamlı olarak incelenmiştir. 1990 yılında Winkler vd. pankreasının lipaz yapısını aydınlatmıştır. Üç yıl sonra Van Tilbeurgh vd. ara yüzeyi harekete geçirecek mekanizmayı ortaya koymuştur (Şekil 2.4). Yani, kataliz sırasında kısa bir α -sarmal (kapak) tamamen farklı bir uyum benimser ve geri enzimin aktif sitesine bağlamak için zemin sağlayan lipaz (açık form), aktivasyona sebep olabilir. Aksi halde, su-lipid ara yüzey yokluğunda, lipaz ve inaktif durumda bulunan bir kapak aktif sitesini (kapalı form) kapsar [25-26].

2.1.2 Enzim/Proteinlerin üç boyutlu yapısı

Her protein, işlevini yansıtan bezersiz bir üç boyutlu yapıya sahiptir. Proteinlerin yapısı birçok zayıf etkileşimle sabitlenmektedir. Hidrofobik etkileşimler, çoğu çözünür

proteinin küresel yapısının sabitlenmesine büyük katkı sağlar, hidrojen bağları ve iyonik etkileşimler ise termodinamik olarak en kararlı özgül yapının oluşumunu sağlar [27].

Polipektik zincirindeki kovalent bağların doğası, yapı üzerindeki sınırlamaları belirler. Peptit bağı, kısmi çift bağ karakteri sergiler ve bu yapı, bütün peptit grubunu katı bir düzlemsel konfigürasyonda tutar. Bir polipeptit zincirinin 3D yapısını (üç boyutlu yapısı) açıklayan üçüncül yapı, sık rastlanan değişken olarak; süper ikincil yapılar, motifler ya da katlanmalar olarak isimlendirilen kararlı alt yapıların incelenmesiyle anlaşılabilir [27].

Proteinlerin fibröz ve globüler şeklinde iki genel sınıfı vardır. Başlıca yapısal görevleri olan fibröz proteinler, ikincil yapının basit tekrarlayan elementlerine sahiptir. İkincil yapının ana konformasyonları, α -heliks ve β -kıvrılmalarıdır. Her ikisi de polipeptit iskeletindeki peptit bağları arasında optimal hidrojen bağlarıyla karakterizedir. Keratin ve kollajen gibi fibröz proteinlerde, ikincil yapının tek bir tipi baskındır. Polipeptit zinciri halat şeklinde süper sarmal oluşturur ve daha sonra kuvvet sağlamak için daha büyük sarmallar halinde birleşir. İpek fibroininin β tabakaları güçlü fakat esnek yapıyı oluşturmak için üst üste istiflenmiştir. Küresel proteinler daha karmaşık bir üçüncül yapıya sahiptir ve sıklıkla aynı polipeptit zinciri içinde ikincil yapının birkaç tipini içerir. X-ışını kırınımı yöntemleri kullanılarak belirlenen ilk küresel protein yapısı miyoglobine aittir. Bu yapı, ön görülen bir ikincil yapının proteinlerdeki varlığını doğruladı. Bir diğer deyişle doğrulanan bu yapıyla, hidrofobik amino asitlerin, proteinin iç kısmında yer aldığı ve küresel proteinlerin sıkı paketlenildiği gösterilmiştir. Daha sonra pek çok küresel protein yapısı üzerinde yapılan araştırmalar bu sonuçları destekledi ve üçüncül yapıda büyük çeşitlilik olabileceğini gösterdi [27].

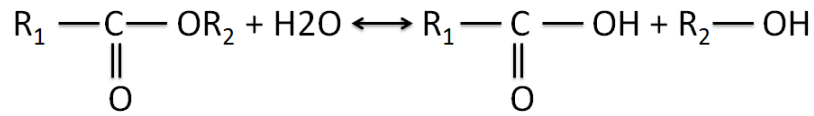
Dördüncül yapı çoklu alt birimli proteinlerin veya büyük protein topluluklarının alt birimler arasındaki etkileşimi ifade eder. Bazı multimerik proteinler tek alt birimin tekrarlayan birimlerine veya protomer olarak tanımlanan alt birim grubuna sahiptir. Protomerler genellikle rotasyonel veya helikal simetriyle ilişkilidir. Proteinlerin üç boyutlu yapısı, zayıf etkileşimleri bozan işlemlerle bozulabilir, bu süreç denatürasyon olarak adlandırılır. Denatürasyonun, proteinin işlevini bozması, yapı ve işlev arasındaki ilişkiyi kanıtlamaktadır [27].

2.1.3 Lipaz Uygulamaları

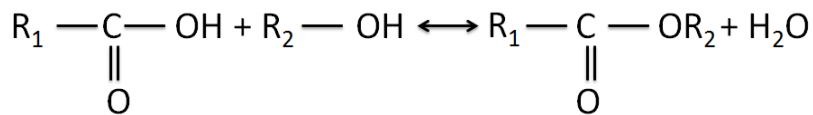
Biyokatalizörlerden özellikle lipazlar, giderek artan üstün özellikleri nedeniyle organik kimyada kullanılır. Lipazların kullanılabilirliği her şeyden önce onları çok etkileyici bir

hale getirmiştir. Lipazlar çeşitli mikroorganizmaların izolasyonu ile elde edilebilir ve günümüzde çeşitli ticari tedarikçilerden satın alınabilir. Rekombinant DNA teknikleri ile, lipazlar da yüksek saflık elde edilebilir bu da onları organik kimya kullanımı için ideal hale getirmektedir. Lipazların ikinci bir avantajı ise yüksek stablitedir. Birçok lipazların yüksek sıcaklıkta ve çeşitli organik çözücünde yapısı bozulmaktadır. Lipazların kabul edilen diğer önemli bir özelliği doğal olmayan yüzeylerde geniş alana sahip olmasıdır. Doğal olan yüzeylerden farkı, kullanılabilir lipazların uygulanabilirliğini arttırmasıdır. Ayrıca lipazlar regio ve stereoselektif şekilde katalizler. Farklı kaynaklardan gelen lipazlar farklı enansiyoselektif özelliklerine ve farklı yüzey özelliklerine sahiptir. Bu nedenle, lipazların belirli bir sentez yapabilmesi için veritabanından doğru enzimi seçmeleri genellikle mümkündür. Ester hidroliz, esterleştirme, interesterifikasyon, polimerizasyon ve amidation reaksiyonlarını bildirmektedir.

i) Hidroliz

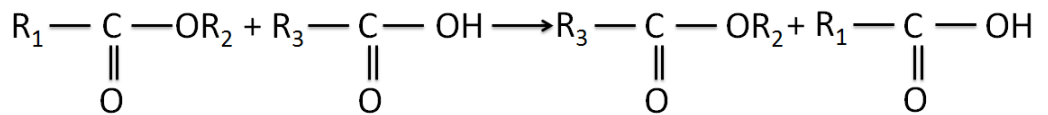


ii) Esterleşme

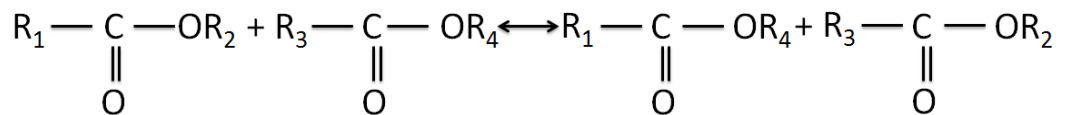


iii) Transesterleşme

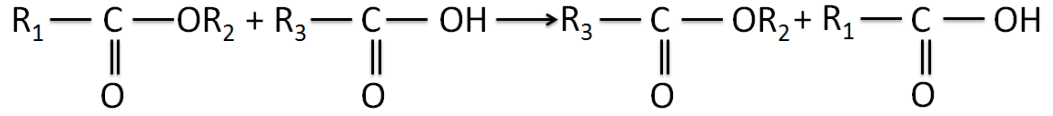
Asidoliziz



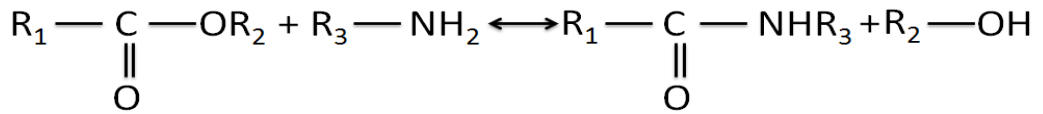
İnteresterleşme



iv) Alkoliziz



v) Aminoliziz



Doğal olmayan yüzeylerde farklı reaksiyon türlerini katalize edebilmeleri, yüksek sıcaklıklarda ve organik çözücülerde istikrarlı, enantioselectivity ve kullanılabilir olmaları, gibi büyük çeşitlilik içeren bu avantajlar lipazların organik kimyada kullanımı için umut verici olmaktadır. Lipazlar gıda, kozmetik, ilaç, kimyasal maddelerin sentezinde ve deterjan gibi bir sürü örnek uygulamalarında kullanılmaktadır. Ancak, bir çamaşır deterjanına eklenmek için, lipaz koşullarının (30-60 °C), proteazlar ve yüzey aktif yıkama maddelerinin tolere edebilmesi gerekir ve onların, farklı kompozisyonların yağ çıkarmak için düşük bir substrat özgülüğü içermesi gerekmektedir. Gıda üretiminde lipazlar diğer türlerden farkı, yüksek değerli yağ ile istenmeyen yağ yerine kullanılmasıdır. Örneğin, Undurraga ve ark. bir kakao yağı yedeğini üretmek için stearik asit ile palmiye yağı palmitik asit yerine bir transesterifikasyon reaksiyonu için Novo-Nordisks lipozym kullanmışlardır. İlaç, kozmetik ve kimya sanayisinde kullanılan lipazın diğer türlerden farkı enansiyoselektif ürünler yapmada katalizör olarak kullanılmasıdır.

2.2 Enzim İmmobilizasyonu

Endüstriyel ve bilimsel araştırmalarda enzimlerinin kullanımında elde edilebilen potansiyel yararların yanı sıra, büyük ölçeklerli sistemlerde gereksinim duyulan çok fazla enzim miktarı ve buna paralel olarak gerçekleşen yüksek biyokatalizör maliyetleri ve düşük enzim stabilizasyonu nedeniyle, inorganik/organik biyokatalizörlere kıyasla ekonomik açıdan birim fiyatı düşük ürün/ürünlerin sentezlerinin gerçekleştirilmesinde

enzimlerin yaygın biçimde kullanımında önemli darboğazlar oluşturmaktadır. Endüstriyel boyutta enzim kullanımı için ekonomik açıdan uygulanabilir özellikte ve katalitik performansı reaksiyonun gerçekleştirildiği prosesin işletme koşullarına karşı direnç kazandırılmış yeniden kullanılabilir ve geri kazanımı kolay biyokatalizör sistemlerinin geliştirilmesine yönelik mühendislik stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir. Belirtilen darboğazların çözümüne yönelik enzim immobilizasyonu önemli bir stratejik yaklaşımdır.

Yukarıda da vurgulandığı gibi doğal enzimler mükemmel özelliklere sahiptir. Ancak endüstriyel işletme koşulları (işletme sıcaklığı, çözücü etkileri, kesme gerilimleri gibi) altında bazı fonksiyonel özelliklerini kaybederek denatüre olabilirler. Reaksiyon ortamından serbest formdaki enzimlerin ayrılması oldukça zordur. Doğal olmayan ortamlarda enzim performansının iyileştirilmesi için kullanılan en iyi yöntem immobilizasyondur. Immobilizasyon enzim hareketliliğini kısıtlayan ve enzimin bir sistem içerisinde hareketsiz lokalizasyonudur. İlk enzim immobilizasyonu maliyeti yüksek enzimlerin yeniden kullanılması için geliştirilmiş ve birçok araştırmacı 1950'li yıllardan itibaren yoğun biçimde çok değişik immobilizasyon konfigürasyonlarında enzimleri bir taşıyıcı matris sisteminde hareketsiz hale getirmiştir. İlk immobilizasyon çalışmaları Georg Manecke tarafından polimer taşıyıcı sistemlerde proteinleri nispeten kararlı olacak biçimde immobilize etmiştir [28].

İmmobilize enzimlerin ilk endüstriyel uygulamaları optikçe saf aminoasit üretiminde ve hidroliz reaksiyonu ile Penisilin-G'nin üretiminde kullanılmıştır [29]. Immobilizasyonun temel avantajı enzimin reaksiyon işlemi sonunda geri kazanımının kolay ve yeniden kullanılabilirliğini sağlamaktır. Bunun yanında geliştirilmiş katalitik performansı da diğer bir avantajdır. Immobilizasyon sonrası bazı enzimler normal sıcaklık koşulları üzerinde ve organik çözücülere karşı artan bir tolerans gösterirler. Endüstride immobilize enzim sisteminin sağladığı avantajlar aşağıda sıralanmıştır [30].

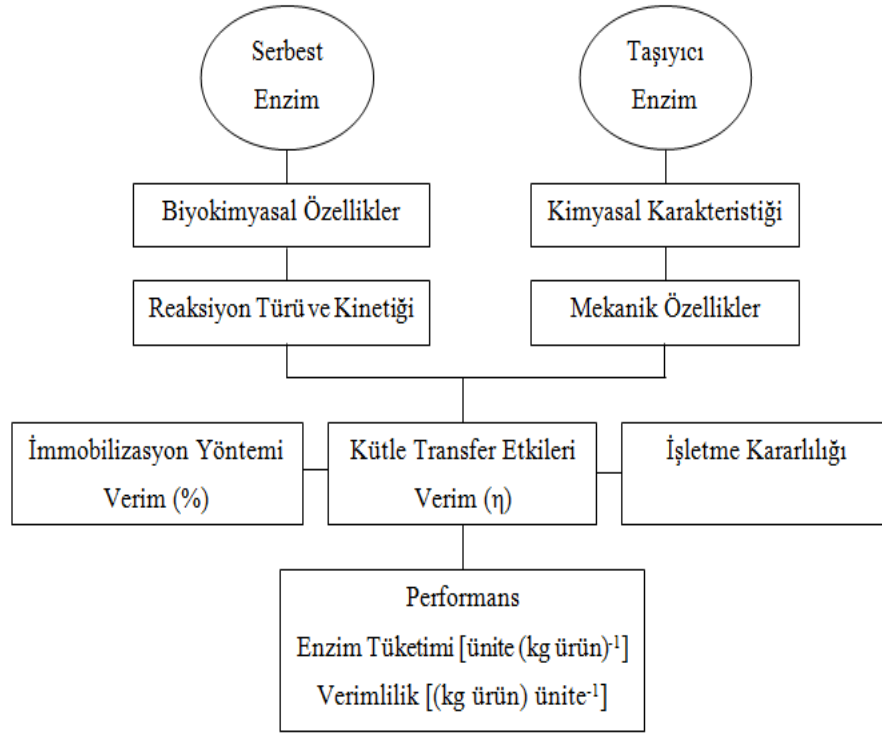
- i) Yeniden kullanılabilirlik,
- ii) Sürekli işletim sistemlerinde kullanılabilirlik ve kontrol edilebilirlik,
- iii) Ürünler kolayca ayrılabilirliği,
- iv) Enzimlerin katalitik performansları değişik immobilizasyon stratejileri ile proses koşullarına karşı avantaj sağlanabilirliği,
- v) Yüksek saflıkta ürün verimliliğinin sağlanabilirliği,

- vi) Reaksiyon ortamlarında enzimlerin ürün inhibisyonuna karşı minimize edilebilirliği,
- vii) Optimum pH ve sıcaklık koşullarında sağlanabilir kararlılık ve
- viii) İdeal reaktör sistemlerinin tasarlanabilirliğidir

Yukarıda sıralanan tüm avantajlara karşın immobilize enzim sistemlerinin endüstriyel uygulamalarda günümüzdeki kullanımı sınırlıdır. İmmobilizasyon yöntemleri kısaca; fiziksel adsorpsiyon (enzim hidrofobik, van der Waals ya da iyonik etkileşimleri ile bir destek materyale bağlanabilir), kovalent bağlanma (enzim kovalent etkileşim ile bir destek materyale bağlanabilir), hapsetme (enzim bir polimer ağ ya da bir mikrokapsül yapıdaki bir membran sistemine sıkıştırılmıştır) ve makro parçacıklar oluşturmak üzere enzimlerin bifonksiyonel ajanlar ile çapraz bağlanması şeklinde özetlenebilir.

2.2.1 İmmobilize Enzimlerin Özellikleri

İmmobilize enzimlerin özellikleri enzim ve taşıyıcı destek materyalinin özelliklerine bağlı olarak değişebilir. Serbest ve taşıyıcı enzim sistemlerinin arasında bir karşılaştırma Şekil 2.4’de gösterilmiştir. Yüzeyde moleküler kütle, fonksiyonel gruplar ve saflık gibi enzimin biyokimyasal özellikleri immobilizasyon için önemli faktörlerdir. Örneğin enzim yüzeyindeki fonksiyonel grupların türü, desteği ve enzim arasında gerçekleşen etkileşimler hakkında bilgi verebilir. Ayrıca enzimin saflığı da önemlidir. Saf olmayan bir enzim kullanıldığında kirliliğin substratı etkilemesi örnek olarak gösterilebilir. İmmobilize enzim parametrelerini belirlemek için reaksiyon tipi ve enzim tarafından katalizlenen reaksiyon kinetiğinin bilinmesi gerekir. Aktivasyon, inhibisyon, spesifik aktivite kinetik parametreler ile stabilite gibi özelliklerinin yanı sıra pH, sıcaklık, çözücü türü ve safsızlıklarda immobilize enzim sistemlerini etkiler.



Şekil 2.4 Serbest ve taşıyıcı enzim özelliklerinin karşılaştırılması [31]

Taşıyıcı malzemenin fiziksel ve kimyasal özellikleri de immobilize enzimin sistemlerinin özelliklerini etkiler. Taşıyıcının en önemli özelliklerinden biri enzim ile etkileşimi belirleyecek kimyasal yapısıdır. Destek malzemesi çok gözenekli ise gözenek büyüklüğü ve gözenek dağılımı immobilize enzim özelliklerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Enzimlerin yapısal düzenlenmesinde küçük gözeneklilik ve hareketsiz olmaları difüzyon hareketinin sınırlandırılmasına neden olabilir. Ancak, gözenek boyutu çok büyük olduğu durumlarda ise enzimler bir arada olabilir. Enzim ve taşıyıcı özellikleri birleştirildiğinde immobilize enzim sisteminde üstün özellikler kazandırılabilir. Yukarıda tartışılmış immobilizasyon yöntemi aynı zamanda biyokatalist özellikler (pH, sıcaklık, immobilizasyon süresi, gibi) için çok önemlidir.

Enzimlerin katalizledikleri sistemlerde reaksiyon hızı kütle aktarım etkilerinden büyük ölçüde etkilenir. Immobilize enzim sistemlerinin mikro ya da nano ortamlar içine yönelik kütle akarımı derişim ve pH farkından kaynaklanır. Bu etkiler enzimin immobilize edildiği destek materyaline de bağlıdır. Enzimi çözebilme potansiyeline sahip bir çözücü ortamında serbest formdaki enzime kıyasla hareketliliği kısıtlanmış destek materyalinde enzimler ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda enzimatik sentezlerde genellikle azalma söz konusudur. Bunun yanı sıra gözenekli bir matris içerisine

substratın moleküler düzeyde taşınım sürecinin uzun zaman alması nedeniyle de reaksiyon hızlarında düşüşler söz konusu olabilir.

2.2.2 Destek materyali

Daha önce de belirtildiği gibi en yaygın immobilizasyon yöntemleri destek materyaline fiziksel adsorpsiyon, kovalent bağlanma ve hapsetme şeklindedir. Şekil 1.5'den de görülebileceği gibi bir immobilize enzim sisteminin performansı taşıyıcı destek materyalinin kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlıdır. Bu nedenle katalitik açıdan başarılı bir immobilize enzim sisteminin tasarımında destek materyalinin hem fiziksel hem de kimyasal özellikleri dikkatli biçimde seçilmelidir. Günümüzde en yaygın kullanılan destek materyalleri aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir [32].

- i) İnorganik bazlı destek materyalleri
- ii) Doğal kaynaklardan elde edilen organik destek materyalleri
- iii) Sentetik organik bazlı destek materyalleri

İmmobilize enzim sistemlerinde kullanılan inorganik bazlı destek materyalleri genellikle organik bazlı destek materyallerinden daha stabildir. Çünkü inorganik bazlı destek materyalleri yüksek basınç ve sıcaklık gibi reaksiyon koşullarına ve özellikle karıştırmalı tank tipi reaktör ya da biyoreaktör sistemlerindeki yüksek kesme gerilimlerine karşı daha dayanıklıdır. İmmobilize enzim sistemlerinde en yaygın kullanılan inorganik bazlı destek materyalleri; silika ve türevleri, celite ve alüminyum türevleridir. Günümüze kadar bu destek materyallerini ile birçok enzimin immobilizasyon süreci kapsamlı olarak incelenmiştir. Elde edilen deneysel bulgular hem laboratuvar hem de endüstriyel boyutta inorganik destek materyallerinin uygulama potansiyellerinin olabileceği sonucunu göstermektedir.

Bunun yanı sıra genellikle polisakkaritler başta olmak üzere doğal özellikteki destek materyalleri ve organik bazlı destek materyallerin enzimler ile geliştirilmiş uyumluluk avantajı söz konusudur. Bu tip destek materyalleri hidrofilik özellikte olduklarından enzimlerle etkileşimleri zayıftır. Ancak minimum inaktivasyona neden olmalarından ve fonksiyonel özellikleri immobilize enzim sistemlerinin tasarımında avantaj gibi görülmesine karşın fiziksel açıdan zayıf olup mekanik dayanımları oldukça düşüktür. Agaroz ve selüloz türevleri ile çapraz bağlı dextranlar yaygın olarak kullanılan doğal destek materyalleridir. Sentetik polimerler gibi organik destek

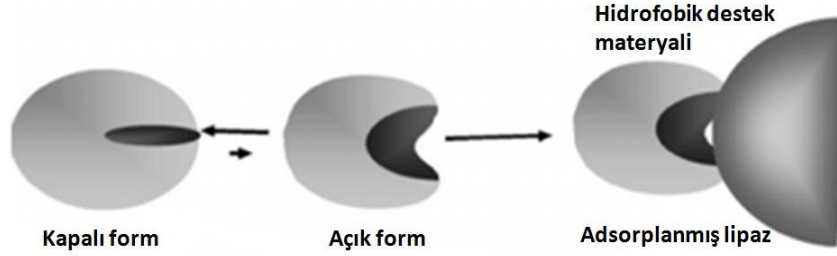
materyalleri de immobilizasyon süreçlerinde yaygın olarak kullanılan taşıyıcı sistemlerdir. Bazı iyon değişim özellikteki materyalleri de yoğun biçimde enzim immobilizasyonunda kullanılmıştır. Örneğin farklı ağ yoğunluğuna sahip polistiren, divinilbenzen miktarına bağlı olarak elde sentezlenebilir. Bunun yanı sıra birkaç kopolimerlerde enzim immobilizasyon için kullanılmıştır [33]. İki komonomer arasındaki orana bağlı olarak seçici özelliği arttırılmış kopolimer bazlı taşıyıcı sistemleri geliştirilebilir. Bu nedenle farklı amaçlar için her türlü taşıyıcılı immobilize enzim sistemi özel olarak tasarlanabilir.

2.2.3.2 İmmobilizasyon Yöntemleri

2.2.3.1 Fiziksel Adsorpsiyon

Fiziksel adsorpsiyon ile enzim immobilizasyonu hidrofobik, van der waals ya da iyonik etkileşimler ile enzimin destek materyaline bağlanmasıdır. Yöntem genellikle işlemin kolaylığı ve düşük maliyet nedeniyle yaygın biçimde kullanılmaktadır. Fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile gerçekleştirilen enzim immobilizasyon yönteminde süreç pH değişimi sayesinde tersine çevrilerek reaksiyon ortamında denatüre olan enzimlerin uzaklaştırılması sağlanabilir ve yeni enzim destek materyaline yeniden bağlanabilir. Bu özellik fiziksel adsorpsiyon yönteminin başlıca avantajları arasındadır. Değişik polimerler, karbon nanolifler, silis ve celite gibi destek materyalleri üzerine lipazların fiziksel adsorpsiyon ile bağlanmaları bu yöntemle gerçekleştirilmiştir. Hidrofobik özellikteki destek materyallerin yüzeylerinde lipazların fiziksel adsorpsiyonu ile gerçekleştirilen immobilize enzim sistemlerinde lipazların ara yüzey aktivasyonunun etkin olduğu belirlenmiştir. Oktadesil-sepabeads üzerine *Candida antarctica* B, *Mucor miehei* ve *Candida rugosa* lipazlarının fiziksel adsorpsiyonu başarılı biçimde gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda belirtilen lipaz enzimlerinin glyoxyl-agaroz üzerine çoklu kovalent bağlama ile immobilizasyonları da gerçekleştirilmiştir. Oktadesil-sepabeads üzerine adsorplanan lipazlar aşırı aktivite sergilediği bildirilmektedir [34]. Aktivite değerindeki artışın nedeni lipazların hidrofobik özellikteki destek materyali yüzey ve ara yüzeyindeki adsorpsiyonu hiperaktivasyonundan kaynaklanmaktadır (Şekil 2.5). Lipaz enzimi hidrofobik özellikteki destek materyalinin yüzeyi ile etkileştiğinde kapak açılır ve denge koşullarına ulaşıldığında açık form nedeniyle aktivitesinde bir artış görülür. Fiziksel adsorpsiyon ile immobilize edilen enzimlerin aktivite gösterebilmesi ortam sıcaklığı ve pH'ına bağlıdır. *Candida rugosa* lipaz

enzimlerinin poli(N-methylolacrylamide) üzerine fiziksel adsorpsiyonu ile gerçekleştirilen immobilizasyon sürecinde enzimin en etkin katalitik performansı düşük ortam sıcaklıklarında maksimuma ulaşmaktadır [35].

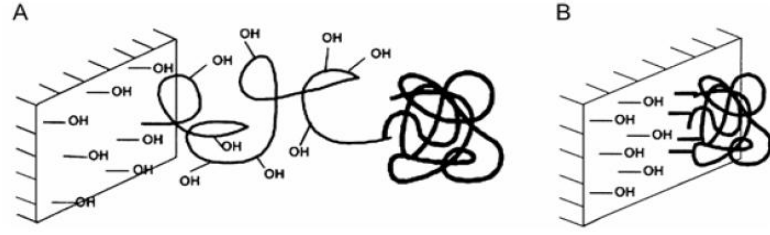


Şekil 2.5 Düşük iyonik gücünde hidrofobik destekler üzerinde lipazın ara yüzey aktivasyonu [36].

2.2.3.2 Kovalent Bağlanma

Enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri de enzimlerin destek materyaline kovalent bağ ile bağlanmasıdır. Kovalent bağ ile bir destek materyali üzerine kimyasal olarak sıkı biçimde bağlanan enzimlerin destek materyalinden desorpsiyonu ya da ekstraksiyonu gerçekleşmez ve kuvvetli bağlanma nedeniyle destek materyali de ayrıca zarar görmez. Ancak kesme gerilimlerine karşı fiziksel dayanımı arttırılmış immobilize enzim sistemlerinin tasarlanmasında enzim ve destek materyali arasındaki bağın gücünü arttırmak için yapılan girişimler enzimin devre dışı kalmasına neden olabilir.

Kovalent bağlanma yöntemiyle gerçekleştirilen enzim immobilizasyonu genellikle iki farklı yöntem ile gerçekleştirilir. Bunlardan ilki destek materyali ile enzim arasında her iki materyalin uzun bir bağlayıcı ajan molekülü ile tek noktadan bağlanması olmasına karşın ikinci yöntemde ise destek materyali ile enzim molekülleri çok noktadan ve daha kısa bir uzunlukta bağlayıcı ajan molekülleri ile bağlanması şeklindedir (Şekil 2.6). İmmobilizasyonda çok noktadan bağlanma daha stabil enzim sistemlerinin oluşturulmasına katkı sağlarken bağlanmanın gerçekleştirildiği uzunluğun derecesi enzim konfigürasyonunda ılımlı bir kısıtlama yaratmaktadır. Çok noktadan bağlanma yönteminde bir bifonksiyonel ajan glutaraldehit çapraz bağlayıcı olarak yaygın biçimde kuşanılmaktadır [37-38].



Şekil 2.6 Kovalent bağlanma şeklinde yaygın olarak kullanılan immobilizasyon teknikleri (A: tek noktadan uzun space kolu ile, B: çok noktadan kısa space kolu ile)

Kovalent bağlanma şeklinde gerçekleştirilen immobilizasyon yöntemleri ile elde edilen enzim sistemleri kesme gerilimlerine karşı daha stabil biyokatalizörlerin geliştirilmesine olanak sağladığından bu yöneme olan ilgi de artmıştır ([39,40,41,42,43,]) Bu yöntemde kullanılacak immobilize biyokatalizör sistemleri reaksiyon ortamlarına bağlı olarak fiziksel ve kimyasal özellikleri farklı pek çok destek materyalin farklı enzim türleri ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Destek materyallerine enzimlerin bağlanma noktası genellikle enzimlerin amin grubu üzerinden gerçekleşmektedir. Örneğin epoksi halkaları ya da aktif karbonil grupları gibi reaktif guruplar enzimlerin amin grupları ile bağlanmasında aktif konumları oluşturmaktadır. Ayrıca geri çözünür özellikteki bazı polimerlerin de destek materyali olarak kullanıldığı immobilizasyon süreçleri söz konusudur. Bu tip destek materyali ile gerçekleştirilen immobilizasyon tekniğinde hem enzimin hem de polimerik yapıda olan destek materyalinin geri kazanımı sağlanabilmektedir. Aynı zamanda katı-sıvı sistemlerde karşılaşılan kütle katarım mekanizmalarında ki gözenek için difüzyon kısıtlamalarında karşılaşılan darboğazların üstesinden gelinerek enzimatik reaksiyonların gerçekleştirilmesi sağlanır.

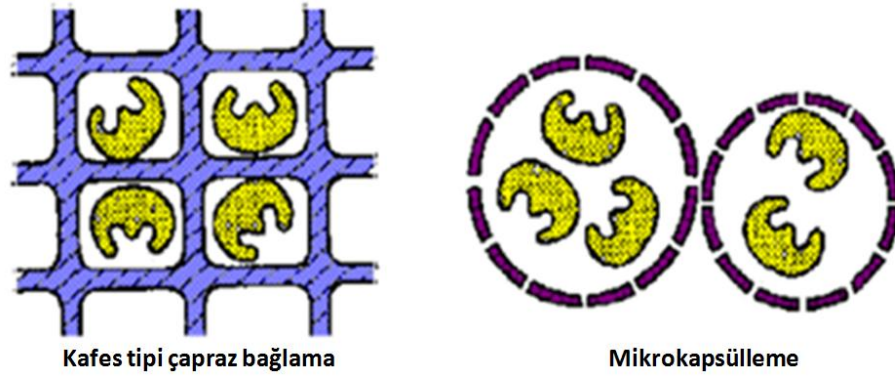
γ -Fe₂O₃ gibi manyetik özellikteki nanopartiküllere CRL enzimlerinin kovalent immobilizasyonu da gerçekleştirilmiştir [44]. Manyetik partiküllerin avantajı basit bir manyetik alanda immobilize enzim sistemlerinin geri kazanımını kolaylaştırmasıdır. Bunun yanı sıra nano boyuttaki destek materyali üzerine kovalent bağlarla bağlanan immobilize enzim sistemlerin biyolojik sistemlere uygulanabilirliği de söz konusudur.

Fiziksel adsorpsiyon ve çoklu noktalardan kovalent bağlarla bağlanmış immobilize enzim sistemlerinde lipaz enzimlerinin uygulaması potansiyel avantajlar sağlamaktadır. Hidrofobik yüzeylere çoklu noktalardan lipaz enzimin fiziksel adsorpsiyon şeklinde bağlanmasında ya da gluteraldehit ile çoklu noktadan kovalent

bağlarla bağlanması gerçekleştirilebilmektedir. Süreli yayın literatüründe yer alan başka bir çalışmada ise epoksi silika HPLC kolonuna lipaz enzimlerinin immobilize edildiği bildirilmiştir [45]. Yukarıda belirtilen immobilizasyon işlemleri sonucu enzim aktivitelerinin ham toz enzime kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Ancak birçok uygulamada da destek materyali üzerine immobilize edilen enzimlerin konformasyonel yapılarında oluşan değişimler ya da aktif konumlar üzerinden gerçekleşebilecek kovalent bağlanmaların aktif konum sayılarını azalması nedeniyle katalitik performansları da azalmaktadır. Bu gibi durumların söz konusu olduğu immobilize enzim sistemlerinde kısmen düşük aktiviteye sahip olan biyokatalizörlerin sahip olduğu özellikler nedeniyle endüstriye kullanılmaktadır. Burada en önemli kriter geliştirilmiş stereospesifiklik kazandırılmış immobilize enzim sistemlerinin yaratılmış olmasıdır. *Pseudomonas fluorescens*'dan izole edilen lipaz enzimin glyoxyl–agaroz üzerine çoklu noktadan kovalent bağlarla gerçekleştirildiği bir immobilizasyon sonucu enzimin enantioseçimliğinde 3 kat artış olduğu saptanmıştır [47].

2.2.3.3 Hapsetme

Hapsetme ile enzimlerin immobilizasyonu Şekil 2.7'da gösterildiği gibi yarı geçirgen bir kafes sistemi içine ya da enzimi çevreleyen yarı geçirgen polimerik bir membran sisteminde enzimin hareketinin kısıtlanmasıdır. Ancak ortam ile enzim arasında substrat ve ürünün penetrasyonunun sürekliliği sağlanmakta olup, enzimin jel matris ya da membran yüzeylerine fiziksel ya da kimyasal olarak bağlanması söz konusu olmadığından yaygın kullanım alanına sahiptir. Kimyasal olarak gerçekleştirilen bağlanma yönteminde enzimlerin katalitik konumlarında kayıplar gözlenebilir. Bu nedenle enzimlerin immobilizasyon sürecinde en uygun immobilizasyon koşullarının ve yöntemlerin dikkatli biçimde seçilmesi gerekir.



Şekil 2.7 Hapsetme yöntemi ile immobilizasyon

Tuzak kapsül ve mikrokapsül grubu olarak sınıflandırılabilir.

- i) Kafes tip tuzak bir çapraz bağlı suda çözünmeyen polimer boşlukları içindeki sürüklenmemesine enzimler içerir. Bu tür bazı poliakrilamid gibi sentetik polimerler, polivinilalkol vb., doğal polimerler bu teknik kullanılarak immobilize enzimler için kullanılmıştır.
- ii) Mikrokapsül tipi sürüklenmemesine yarı geçirgen polimer membranlar içinde enzimler kapsayarak içerir. Bu durumda az gelişmiş immobilizasyon tekniği immobilize edilen enzim ve bütün çevre olmasına rağmen, tuzakla immobilizasyon yöntemine çok benzemektedir. Mikrokapsülleme bir zarla yapay hücrelere ayrılmış yapıdadır. Enzim mikrokapsüller hazırlanması son derece iyi kontrol edilen koşullar gerektirir; ve enzimlerin mikro kapsülasyon için prosedürler sıvı kurutma, faz ayrılması ve arayüzey polimerizasyon yöntemi vardır [48].

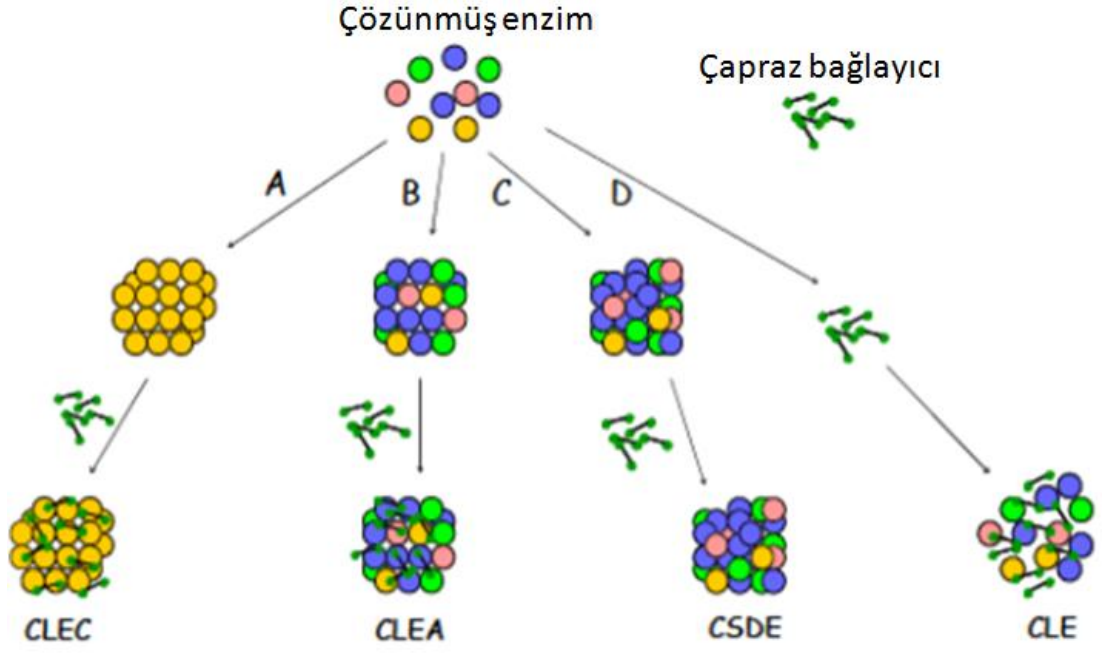
Böyle bir immobilizasyon tekniğin avantajı enzimin kimyasal polimer ile etkileşimde olmamasıdır; bu nedenle denatürasyon genellikle önlenir. Bununla birlikte, membran etrafında kütle transferi olayları problem teşkil etmektedir. Substrat ve ürün zarı difüzyon hızını genellikle etkileyen sınırlayıcı bir parametredir. Genellikle, yüksek konsantrasyonlarda substrat nüfuzunu sınırlamak için gereklidir. Büyük olanları membran geçmek ve biyo katalizör aktif sitesine ulaşmak için mümkün olmayabilir, yana sürüklenen enzimler daha küçük yüzeylerde kullanılır [48].

2.2.4 Taşıyıcısız enzim immobilizasyonu

Taşıyıcılı enzim immobilizasyon sistemlerinde enzimin aktivitesi taşıyıcı olarak kullanılan materyalin katalitik olmayan kütlesinden dolayı birim biyokatalizör kütlesi başına aktivite kayıplarına yol açmaktadır. Taşıyıcısız enzim immobilizasyonu geleneksel immobilizasyondaki taşıyıcılı immobilizasyon sistemlerinin yarattığı darboğazları ortadan kaldırmak için alternatif olarak geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu yöntemde taşıyıcıya gerek duyulmaksızın enzimlerin birbirlerine çapraz bağlanması sonucu gerçekleştirilen bir yöntemdir. Bu yöntemin temel amacı, taşıyıcılı immobilizasyon sistemlerine kıyasla enzimlerin katalitik aktivitesini arttırmak, yüksek seçicilik kazandırmak ve daha düşük maliyetli biyokatalizör sistemlerini geliştirmektir [49]. Taşıyıcısız enzim immobilizasyon sistemlerine yönelik çalışmalar aşağıda belirtildiği gibi dört farklı grupta sınıflandırılabilirler [50].

- i) Çapraz bağlı çözünmüş enzim (CLE, Cross-Linked Enzymes)
- ii) Çapraz bağlı enzim kristalleri (CLEC, Cross-Linked Enzyme Crystals)
- iii) Çapraz bağlı püskürtülerek kurutulmuş enzim (CSDE, Cross-Linked Spray Dried Enzyme)
- iv) Çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA, Cross-Linked Enzyme Aggregates)

Sulu çözeltilerinden yola çıkılarak taşıyıcısız enzim immobilizasyon sistemlerinin geliştirilmesine yönelik yöntem kısaca Şekil 2.8’da gösterilmiştir. Taşıyıcılı enzim immobilizasyon sistemlerine alternatif olarak geliştirilen ilk taşıyıcısız enzim immobilizasyon yöntemi çapraz bağlı çözünmüş enzimlerdir. Bu yöntemde, uygun bir çapraz bağlayıcı ajan yardımıyla çözünmüş enzim moleküllerinin doğrudan çapraz bağlanması sonucu taşıyıcısız enzim immobilizasyon sistemleri gerçekleştirilmiştir. Ancak enzimlerin sulu sistemlerdeki yüksek çözünürlüğü ve immobilizasyon sürecinde enzim molekülleri arasındaki yakınlığın etkin olarak ayarlanamamasından dolayı enzim molekülleri arasında zayıf bağlanmalar gerçekleşmektedir. Zayıf bağlanma ise biyokatalizörlerin mekanik dayanıklılığının düşük olmasına neden olmaktadır. Ayrıca kontrolsüz biçimde gerçekleşen aşırı bağlanmalar ise hem aktif konum sayısının azalmasına hem de taşıyıcısız enzim immobilizasyonu formundaki biyokatalizörlerin boyut kontrolündeki zorluklara neden olmaktadır [51].



Şekil 2.8 Taşıyıcısız immobilizasyon için dört farklı metodolojik yaklaşım

Çapraz bağlı çözünmüş enzim formundaki taşıyıcısız enzim immobilizasyon yönteminde karşılaşılan darboğazların çözümüne yönelik alternatif çapraz bağlı enzim kristalleri geliştirmiştir. Çapraz bağlayıcı ajan olarak gluteraldehitin yer aldığı ilk çalışma Quioco ve Richards tarafından 1964 yılında yapılmıştır. Ancak bu yöntem ile gerçekleştirilen immobilizasyon işlemlerinde yüksek saflıkta ve kristal formda enzimlere gereksinim duyulması ve boyut kontrolünde karşılaşılan darboğazlar, bu yöntemin en önemli dezavantajlarını oluşturmaktadır [52]. Çapraz bağlı enzim kristalleri hazırlanırken enzimlerin, yüksek saflıkta yani kristal formda olması gerekmektedir. Uygun presipitasyon ajanı yardımıyla kristal formdaki enzim molekülleri birbirlerine yaklaştırılarak enzim moleküllerinin arasındaki uzaklık azaltılır. Birbirlerine yaklaştırılan enzim molekülleri uygun bir çapraz bağlayıcı ajan yardımıyla birbirlerine bağlanarak çapraz bağlı enzim kristalleri şeklindeki taşıyıcısız enzim immobilizasyonu gerçekleştirilir. Çapraz bağlı enzim kristali formundaki biyokatalizörler ile enzimlerin sıcaklığa karşı toleransı ve mekanik dayanımı artırılabilir. Aynı zamanda geniş pH aralığında çalışabilme olanağı sağlanmış ve organik çözücülere karşı toleransları geliştirilmiştir [51]. Çapraz bağlı enzim kristallerinde, kristalleştirme ortamının koşulları ayarlanarak daha yüksek aktivite gösterebilen ve seçicilik için en doğru kristal boyutu ve geometrisi tasarlanabilir.

Biyokatalizörlerin katalitik aktiviteleri; substratın boyutuna, özelliklerine ve reaksiyon ortamındaki bileşiklere ve derişimlerine, enzimatik reaksiyonun gerçekleştirildiği reaktör sistemlerindeki işletme koşullarına da bağlıdır. Bu bağlamda çapraz bağlı enzim kristallerinin boyutu 1-100 µm aralığında tutularak, oldukça aktif ve stabil taşıyıcısız enzim immobilizasyonu gerçekleştirilebilmektedir. 20. yüzyılın sonlarından başlayarak günümüze kadar lipazlar, proteazlar ve akilazlar gibi birçok hidrolaz, asimetrik sentez için kiral biyokatalizör olarak üretilmekte ve biyoteknolojik sektörlere sunulmaktadır. Çapraz bağlı enzim kristallerinin bir başka uygulama alanı ise kromatografide kullanılan mikro gözenekli materyaller ya da protein içerikli ilaçların kontrollü salım sistemleridir [8].

Çapraz bağlı enzim agregatları ise 20. yüzyılın başlarında ortaya çıkan ve taşıyıcısız enzim immobilizasyon yöntemi olarak bu sınıfa yeni katılmış bir tekniktir. Presipite edilen enzim bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajanlar ile kovalent bağlanır. Fazladan katalitik kütleye ihtiyaç duymadığından aktivitelerinde önemli düşüş görülmez [53].

Çapraz bağlı enzim agregatları, çapraz bağlı enzim kristallerine alternatif olarak geliştirilmiştir. Bu yöntemde çapraz bağlı enzim kristallerinde olduğu gibi kristal formda yani yüksek saflıkta enzime gerek duyulmaz. Bilindiği gibi organik çözücüler, tuzlar ya da iyonik sıvılar proteinleri çöktürürler. Çapraz bağlı enzim agregatlarında çözünmüş enzim moleküllerinin bu uygun presipitasyon ajanları yardımıyla presipitasyonu sağlanır. Yani enzim moleküllerinin arasındaki uzaklığı etkileyen özellikler değiştirilir [51].

Presipitasyon koşullarında, sulu sistemlerde yüksek çözünürlüklü enzim molekülleri bir araya toplanarak doğal enzim konformasyonunda çözünmez enzim agregatları oluşturmak üzere çökelti oluştururlar. Bu fiziksel çözünmez agregatlar, enzim kristallerinin çapraz bağlanmasına benzer şekilde bifonksiyonel çapraz bağlayıcılar ile ardı ardına bağlanır. Çapraz bağlı enzim agregatlarının enzim kristallerine yakın aktiflik ve kararlılık değerlerine sahip olduğu literatürde bildirilmiştir. Çapraz bağlı çözünmez enzimlerin, proteinin çoğunluğunun çöktürüldüğü durumda en yüksek aktiviteye sahip olduğu, herhangi bir çökeltme maddesi katılmadığında CLE ise en düşük aktiviteyi verdiği keşfedilmiştir. Bu gözlemler, çözünmez enzim agregatlarının oluşumunun, çapraz bağlanma boyunca enzim aktivitesini korumak için başlıca basamak olduğunu öne sürmektedir. Açıkçası bu sıkı moleküller, çözünmüş ve dağınık halde bulunan moleküllerden daha kolay çapraz

bağlamaktadır. Bu durum, enzim moleküllerinin çözelti içinde gluteraldehit eklenmesi halinde bile neden çapraz bağlanmadıklarını açıklamaktadır [8].

Çapraz bağlı enzim agregatlarının spesifik aktivitesi yüksektir, oda sıcaklığında ve belirli pH aralığında stabil olup yüksek ürün verimliliğine sahiptir. scCO_2 ve iyonik sıvılar (IL) gibi konvansiyonel olmayan ortamlarda ise daha aktif olup yüksek saflıkta enzim gerektirmezler. Ekstrem sıcaklık ve pH değerlerinde denatürasyona uğramazlar, kararlıdırlar. Yeniden kullanılabilirliği yüksek, biyoteknike ortamlarından filtrasyon gibi basit ayırma süreçleri ile geri kazanımı kolay, kesikli sistemlerde yeniden kullanılabilir, sürekli sistemlerde ise uzun süre ve pratik olarak kullanılabilirler [54].

Çapraz bağlı enzim agregatları hazırlanırken presipitasyon işlemi için genellikle amonyum sülfat kullanılır. Amonyum sülfat tuzunun 0–30 °C aralığında çözünürlüğü çok düşük olup, proteinleri stabilize eder. Amonyum sülfatın 4 M doymuş çözeltisinin yoğunluğu, çözeltideki protein agregatlarının yoğunluğundan küçüktür. Bu nedenle santrifüj ile proteinlerin ya da enzimlerin amonyum sülfat ortamından ayırma işlemi kolaydır. Tuzun yoğunluğu agregat yoğunluğundan düşük olduğu için agregatın saf halde dibe çöküp tuzun onun üzerinde kalması, yüksek derişim değerlerinde (doymuş çözelti) bakteriyel kontaminasyonun engellemesi açısından amonyum sülfat tuzunun kullanımı önemlidir. Çöktürücü yani presipitant derişimi arttıkça agregat boyutu artar. Amonyum sülfat tuzu proteinlere bağlı olan suyu çekeceğinden enzimlerin çökmesi sağlanır. Buna salting out etkisi denir. Çözünmüş enzimlere tuz eklenerek enzimin çözünürlüğü azalır ve enzimler agregat oluşturmaya başlarlar, enzimler çöktükçe agregat boyutları da artar. Yine aynı şekilde gluteraldehit derişimi arttıkça agregat boyutu da artar. Fakat agregat boyutunun artması bir süreye kadar aktiviteyi yükseltir. Agregat boyutundaki artışlar her zaman için iyi sonuç vermez [49]. Çapraz bağlı enzim agregatları hazırlanırken agregat aktivitesini yükseltmek amaçlı proteik feeder ajan kullanılmaktadır. Proteik feeder, ortamda gluteraldehitin enzime fazla bağlanmasını önleyerek enzimin aktif konumlarının açık tutulmasını sağlamaktadır. Böylece çapraz bağlı enzim agregatlarının aktivitesinde yükselişe neden olmaktadır. Agregat boyutu da katalitik aktivite için önemli bir etkidir.

CLEA formundaki immobilize enzim sistemleri hidrolazlar (lipaz, esteraz, amidaz, proteaz, nitrilaz ve glikodideraz), liyaz (nitril hidrataz, oksinitrilaz ve aldolaz) ve oksidoredüktazlar (galaktoz oksidaz, glukoz oksidaz ve lakkaz) gibi endüstriyel olarak kullanılan pek çok enzim için uygulanabilme potansiyeline sahiptir [51]. Çizelge

2.2’de taşıyıcısız immobilize enzim sistemlerinin avantaj ve dezavantajları karşılaştırılmıştır.

Çizelge 2.2 Taşıyıcısız immobilize enzim yöntemlerinin karşılaştırılması

Form	Avantaj	Dezavantaj
CLE	Yüksek termostabilite	- Düşük katalitik performans - Mekanik gerilimlere karşı dayanımı çok zayıf - Rastgele çapraz bağlanma nedeniyle tekrarlanabilirlik az
CLEC	- Yüksek termostabilite - Mekanik gerilimlere karşı dayanımı yüksek - pH kullanım aralığı geniş - Organik çözücülere karşı yüksek tolerans	- Kristal formda enzim kullanımının gereksinimi - Yüksek maliyet
CLEA	- Yüksek termostabilite - Mekanik gerilimlere karşı dayanımı yüksek - Geniş pH kullanım aralığı - Ayarlanabilir partikül boyutu ile etkin kütle aktarımı	Katalitik performansı presipitasyon ajan özelliklerine bağlı olarak değişebilmekte
CSDE	Üretimi kolay	- Düşük katalitik aktivite - Tersinmez enzim deaktivasyonu

2.2.5 Çapraz bağlı enzim agregatları üretiminde karşılaşılan darboğazlar

CLEA diğer taşıyıcısız enzim immobilizasyon yöntemlerine alternatif ve yeni ortaya çıkmış (~2000) bir yöntem olmasına karşın;

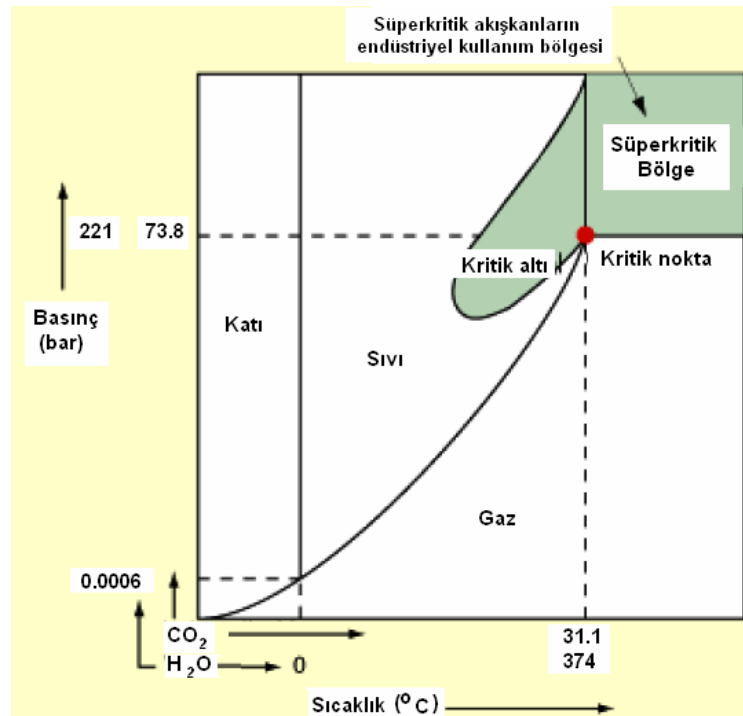
- Enzim agregat boyutlarının herhangi bir difüzyon kısıtlaması olmadan nasıl kontrol edilebileceği,
- Enzim konformasyonunun nasıl daha esnek hale getirilebileceği, ve

- iii) Enzim aktivitesi ve seçiciliğinin agregasyon koşullarının farklılaştırılması ile nasıl ayarlanabileceği

gibi darboğazların aydınlatılması gerekmektedir. Her ne kadar diğer yöntemlerle, özellikle de CLEC ile aktivite, dayanıklılık ve temel prensip açısından benzerlik gösterse de hala CLEA hakkında cevaplanması gereken birçok soru bulunmaktadır. CLEA'nın geniş bir enzim aralığında uygulanabilirliği, boyut kontrolü, yeni agregasyon yöntemleri ve yeni çapraz bağlayıcılar şu an en çok çalışma yapılan konulardır. Amaç, daha yaygın uygulamalar için güçlü çapraz bağlı enzim agregatlarını seçip, tasarlamak üzere esnek bir teknoloji platformu oluşturabilmektir. Taşıyıcısız immobilize enzimlerin biyokatalizör olarak kullanılmaya başlaması, endüstriyel uygulamalar açısından bazı avantajlar sunmaktadır. Bunlar; taşıyıcısız immobilize enzimin maliyetini düşürecek ve pazarlamayı kolaylaştıracak şekilde hazırlama kolaylığı, yaygın bir alanda, esnek kullanım fırsatları sunmaları olarak özetlenebilir.

2.3 Süperkritik Akışkanlar

1985 yılından itibaren su içermeyen süperkritik akışkan (SCF) ortamlarında gerçekleştirilen enzim katalizli reaksiyonların akademik araştırmalarda başarılı sonuçlar vermesiyle homojen/heterojen katalitik reaksiyon alanındaki uygulamaları özel ilgi görmeye başlamıştır [55]. Süperkritik koşullardaki çözücü ortamının sıcaklık ve basınç gibi termodinamik değişkenlerinin değiştirilmesiyle reaksiyon ortamının fizikokimyasal ve taşıma karakteristikleri ayarlanabilmektedir. Bu karakteristik değişimler homojen/heterojen katalitik reaksiyonlarda kütle aktarımı ve reaksiyon kinetiği üzerine önemli avantajlar sağlamaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda reaksiyon ortamında kullanılan enzimlerin katalitik aktivitelerinin çözücü özelliklerine bağlı olduğu açıkça göstermişlerdir [56-57]. SCF'ler enzim katalizli reaksiyon ortamının sıcaklık ve basınç gibi termodinamik değişkenlerin değiştirilmesiyle reaksiyonun seçiciliği ve verimliliğinde önemli avantajlar sağlamaktadır. Sıcaklık ve basınç konuları kritik nokta ve üzerinde olan akışkanlar SCF olarak adlandırılır. Şekil 2.9'de görüldüğü gibi kritik altı civarın da geniş uygulama alanı bulmaktadır.



Şekil 2.9 Saf CO₂ ve H₂O için basınç-sıcaklık faz diyagramı [58]

Süperkritik akışkanların fizikokimyasal ve taşınım özellikleri gaz ve sıvı akışkanların özellikleri arasında yer alır. Örneğin, SCF'ların yoğunlukları sıvılara, kütle difüzyon hızı ve momentum difüzyon hızı ise gazlara benzer. Bu nedenle, SCF'lerin gazlara benzer düşük kütle difüzyon hızı ve momentum difüzyon hızı sayesinde serbest ya da özellikle immobilize formdaki enzim sistemlerindeki aktif konumlara substratın moleküler düzeyde ulaşım hızını artırması nedeniyle kütle aktarım kısıtlayıcı reaksiyonlarda önemli avantajlar sağlamaktadır. Özellikle gözenek içi kütle aktarım kısıtlayıcıların söz konusu olduğu heterojen katı-akışkan reaksiyon sistemlerinde SCF içinde çözünmüş substrat moleküler düzeyde gözenek içindeki taşınım hızının artmasında etkin rol oynamaktadır. Bu nedenle yüksek substrat derişimlerinde gerçekleştirilen enzim katalizli reaksiyonlarda gözlenen reaksiyon hızı artar.

Kritik konlarda SCF'lerin yoğunlukları sıcaklık ve basınca karşı çok duyarlıdır. Dielektrik sabiti, çözünürlük parametresi ve çözgen tutma parametresi gibi yoğunluğa bağlı çözücü özellikleri reaksiyon ortam basıncına bağlı olarak değiştirilebilmektedir. Basınç koşullarının değiştirilmesiyle belirtilen çözücü karakteristiklerinde (solvent tunability) önemli değişimler sağlanabilmekte ve reaksiyon mühendisliği ve uygulamaları açısından SCF'ler reaksiyon ve sistem mühendislerine önemli avantajlar

yaratmaktadır. Günümüzde enzimatik sentezlerde yaygın olarak kullanılan SCF'ler Çizelge 2.3'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.3 Ekstraksiyon uygulamalarında kullanılan bazı akışkanların kritik sıcaklık ve basınç değerleri [59]

Bileşik	T _c (°C)	P _c (bar)
Su	374.1	221.2
CO ₂	31	73.8
Propan	96.7	42.5
Etanol	240.8	61.4
Hekzan	234.4	30.1
Dietil eter	193.55	36.4
Aseton	235.0	47.0
İzopropil alkol	235.2	47.6

Süperkritik akışkan teknolojisi uygulamalarında CO₂ en popüler SCF olarak başta ekstraksiyon olmak üzere, kromatografi, reaksiyon, mikro ya da nano partikül sentezi gibi uygulamalarında çözücü ya da antiçözücü akışkan ortamı olarak rol oynamaktadır. Çizelge 2.4'de de görüldüğü gibi düşük kritik sıcaklık ve basınç değerlerine sahip olan CO₂ bu özelliği nedeniyle özellikle biyoteknoloji sektöründe potansiyel öneme sahiptir. Bunun yanı sıra düşük toksik özelliği, inert olması, yanıcı ve patlayıcı özellik göstermemesi, ucuz ve yaygın bulunabilirliği önemli diğer önemli avantajları arasındadır. Süperkritik CO₂ (scCO₂) akademik ve endüstriyel ölçekte karşılaşılan uygulamalarındaki darboğazlara pozitif yönde katkı sağlamasına karşın birçok kimyasal ve biyokimyasal madenin scCO₂ ortamındaki çözünürlükleri düşüktür. Ayrıca yüksek basınç ekipmanlardan oluşan süperkritik akışkan teknolojilerinin endüstriyel uygulanabilirliği günümüzde yaygın biçimde gelişmesinde önemli sınırlamalar getirmektedir. Burada en önemli faktör yüksek basınç teknolojilerinin yüksek yatırım maliyetleridir. Yüksek yatırım maliyetlerinden kaynaklanan endüstriyel uygulamalarında yatırım açısından darboğazlar görülmesine karşın kimyasal ve biyokimyasal reaksiyon mühendisliği uygulamalarında sağlanan yüksek seçicilik ve verimlilik nedeniyle özel ilgi görmektedir. Enzimlerin organik çözücü ortamlarına kıyasla scCO₂ ortamında ulaştığı yüksek katalitik performans ve stabilite nedeniyle scCO₂ ortamında enzim katalizli reaksiyonlar üzerine sürekli yayın literatüründe

yayımlanan araştırmaların sayısında son yıllarda hızla artan bir paya sahip olmuştur. Enzimler ılımlı reaksiyon koşullarında ve substrat spesifikliğine sahip reaksiyonları katalizlerler. Atmosferik basınç koşulları üzerinde kritik altı ya gerçekleştirilen da süperkritik koşullarda bir akışkan ile agresif reaksiyon koşulları altında gerçekleştirilen reaksiyonlarda yan ürün oluşumu minimize edilebilmektedir. Serbest enzim formlarının yanı sıra farklı mühendislik uygulamaları ile geliştirilmiş biyokatalizör sistemlerindeki çeşitlilik sayesinde ürün spesifik enzimlerin katalitik aktivite ve stabilite özellikleri süperkritik basınç ve sıcaklık gibi operasyonel işletim koşullarına karşı modifiye edilebilir. Bununla birlikte hem reaksiyon ortam koşulları hem de bu koşulların değiştirilmesiyle birlikte eş anlı değişimler gösterebilen SCF ortamlarının fizikokimyasal ve taşınım özellikleri sayesinde enzimatik reaksiyonlarda yer alan enzimin aktivite, stabilite ve spesifik özellikleri de kontrol edilebilir. Reaksiyon ve sistem mühendislikleri açısından bu tür enzimlerin yapısal-fonksiyonel-mikroçevre arasındaki etkileşimler geliştirilerek gelecekte enzimlerinin kimyasal ve biyokimyasal mühendislik uygulamalarında önemli değişimlere adım atacağı ön görülmektedir [60-61]. İçinde bulunduğumuz yüzyılda her alanda gelişen bilim ve teknoloji sayesinde SCF'lerin henüz gerçekleştirilememiş reaksiyonların katalizlenmesinde enzimlerle birlikte önemli rol alacaktır.

Çizelge 2.4 Süperkritik karbondioksitin suda çözünürlüğü [60]

Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	Su Çözünürlüğü (wt %)	Su Çözünürlüğü (mol %)
105.0	344.8	0.19	0.90
50.0	344.8	0.31	0.75
75.0	344.8	0.55	1.33

2.3.1 Süperkritik Akışkanların Uygulamaları

Günümüzde 150'ye endüstriyel proseste süperkritik akışkan bir çözücü ya da anti çözücü ajan olarak görev almaktadır. Gelişen teknoloji ve yüksek basınç sistemlerin ekonomik maliyetlerindeki düşüşe paralel olarak proses sayılarındaki yıllık artış %10 olduğu bildirilmektedir. Süperkritik akışkanların yer aldığı proseslerin ekonomik açıdan stratejik önemleri nedeniyle proseslere ilişkin bilgi sürekli yayın ve patent literatüründe

kapsamlı biçimde yer almamaktadır. 1990'lı yıllara kadar süperkritik akışkanların endüstriyel uygulamalarına yönelik proseslere örnekler aşağıda sunulmuştur [62].

- i) Ham yağlardan ağır bileşenlerin uzaklaştırılması (ROSE Prosesi)
- ii) Yağ geri kazanımı
- iii) Yüksek basınç koşullarda polietilen üretimi
- iv) Asetonun antibody yapılarından uzaklaştırılması
- v) Süperkritik su ile organik kirliliklerin atık sulardan uzaklaştırılması
- vi) Sprey boyama prosesi (UNICARB)
- vii) Süperkritik akışkan kromatografisi
- viii) Çay ve kahveden kafein ve değerli biyomoleküllerin geri kazanımı ve kafeinsiz çay ve kahve üretimi
- ix) Farmasötik açıdan öneme sahip bitkilerden değerli biyomoleküllerin ekstraksiyon proses ile geri kazanımı
- x) Reaksiyon ve reaksiyon ürünlerinin geri kazanımının yer aldığı eş anlı prosesler (Klorobenzen → Fenol + Difenil oksit, İzobüten → ikincil bütıl alkol, Aminasyon (etilen ve trietil alüminyum)

Bunun yanı sıra SFE'lerin gelişmekte olan endüstriyel uygulamaları arasında; presipitasyon prosesleri (RESS, GAS, PCA), ters misel ayırma prosesleri, adsorbentlerin dejenerasyonu, yarı iletkenler sistemlerindeki organik kirliliklerin temizlemesi, organik kirliliklerin topraktan geri kazanımı, şelat oluşumu ile ağır metallerin uzaklaştırılması, gıdalardan yağ ve kolesterolün uzaklaştırılması, sudan etanol ve diğer organiklerin uzaklaştırılması, yağların fraksiyonlarına ayrılması yer almaktadır [62].

2.3.2 Süperkritik Akışkan Ortamında Enzimlerin Katalitik Performanslarını Etkileyen Faktörler

Su İçeriği: Süperkritik akışkan ortamlarında gerçekleştirilen enzim katalizli reaksiyon uygulamalarından önce, enzimlerin sadece sulu ya da organik çözücü ortamda bir işleve sahip olabileceği düşüncesi hakimdi. Su enzimlerin katalitik aktivitesi ve stabilitesinin sürdürülebilirliği açısından çok kritik rol oynamaktadır. Ancak su dışındaki başka çözücü sistemlerinde çeşitli enzimlerin katalitik açıdan aktif rol

oynayabileceği saptanmıştır [62,63,64]. Hidrofilik özellikteki enzimlerin katalitik performanslarındaki sürekliliği sağlayabilmesi için enzimin mikro çevresindeki su içeriğinin kontrolünün de sağlanması gerekmektedir. Enzimlerin mikro yapılarını aydınlatmaya yönelik araştırma bulgularında bir enzim molekülünün yüzeyini çevreleyen tek tabaka halinde lokalize olmuş suyun enzimin katalitik aktivite göstermesinde önemli bir rol oynadığı ve bunun yanı sıra enzimlerin denatürasyonunu engellediği vurgulanmaktadır. Su enzimlerin doğal konformasyonlarını korumak için kovalent olmayan etkileşimlerde kritik role sahiptir. Gereksinim duyulan su içeriği çözücü türüne ve enzim–substrat ilişkisine bağlı olarak değişir. Ancak dikkat edilmesi gereken nokta, enzimatik sentezi katalizleyebilecek ve enzimin katalitik performansını koruyabilecek kritik su içeriğinin saptanmasıdır. Süperkritik akışkan ortamlarında gerçekleştirilecek bir enzimatik reaksiyonda ise suyun seçilen SCF içerisinde bir çözünme potansiyeline sahip olmasıdır. Bunun yanı sıra enzim ve substratın yer aldığı faz dışında suyun başka bir fazda bulunmaması gerekmektedir. SCF ortamında gerçekleştirilen bazı enzimatik sentezlerde su, substrat ve ürünün çözünürlüğünde artırıcı rol oynayabilir ve yerel derişimlerinde değişimlere neden olabilir. Enzimlerin yer aldığı sistemlere su beslemesi yapıldığında reaksiyona bağlı olarak SCF ortamında enzimlerin katalitik aktivitelerinde bir atış olduğu saptanmıştır. Esterleşme reaksiyonlarında ürün ve esterleşme reaksiyonlarında ise girdi olarak yer alan su, transesterifikasyon reaksiyonlarında ise önemli bir darboğazdır. Bu nedenle reaksiyona bağlı olarak optimum su içeriğinin saptanması hem enzimin katalitik performansı hem de reaksiyon kinetiği açısından hayati önem taşımaktadır.

Randolph vd. $scCO_2$ ortamında kolesterol oksidaz enzimi aktivitesine su içeriği etkisini incelemişlerdir. Sulu sistemlerde kolesterol oksidaz enziminin kuru $scCO_2$ ortamına kıyasla 10 kata daha fazla katalitik aktiviteye sahip olduğunu saptamışlardır. Çalışmada, susuz ortama %1 (v/v) oranında su eklemesinin enzim aktivitesin tamamen geri kazanılabileceği belirlenmiştir [65]. Miller vd. kuru ve suyla doymuş $scCO_2$ ortamlarında trilaurin ile miristik asit interesterifikasyonunu 95 bar ve 35 °C koşullarında immobilize formdaki lipaz enzimi kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada, suyla doymuş $scCO_2$ beslemesinin trilaurin çözünürlüğünde azalmaya neden olduğunu belirlenmiştir [66]. Ancak Dumont vd. etanol ile miristik asit esterleştirme tepkimesinde reaksiyon ortamında yeterli miktarını su içeriği sağlandığı durumda maksimum reaksiyon hızına ulaştıklarını bildirmişlerdir [67].

Süperkritik akışkan ortamında gerçekleştirilen enzimatik reaksiyonlarda yer alan immobilize formdaki enzimlerin destek maddesi özelliklerine ve enzim ya da çözücü türüne bağlı olarak optimum su içeriği değişebilmektedir. Gözenekli bir immobilize enzim sistemindeki gözeneklilik, aktif yüzey alanı ve destek materyalinin hidrofobik özelliği de immobilize formdaki materyalinin su tutma kapasitesini etkilemekte ve böylece enzim mikro çevresindeki yerel su derişimini etkilenebilmektedir. Marty vd. , ticari olarak üretilen ve Lipozyme olarak adlandırılan makro gözenekli anyonik reçine boncuklarına immobilize edilen *Mucor miehei* lipaz enzimi ile oleik asit ile etanolün lipaz katalizli esterifikasyonunu gerçekleştirmişlerdir [68]. Araştırmacılar maksimum katalitik aktivite için immobilize sistemin kütesine bağlı olarak reaksiyon ortamındaki su içeriğinin yaklaşık %10 (w/w) olması gerektiğini bildirilmiştir. SCF ortamında gerçekleştirilen enzimatik reaksiyonlarda optimum su içeriğini belirlenmesinin gerekliliğinin nedeni enzimlerin hidrofobik çözücüler içinde daha yüksek katalitik aktivite göstermeleridir.

Sürelili yayınlarda yer alan bazı araştırmalarda, reaksiyon ortamına suyun doğrudan beslenmesi yerine immobilize formdaki enzimler ile doldurulmuş bir dolgulu kolonda tipi reaktörlere reaksiyon öncesi ekleme yapılmasının enzimde daha yüksek bir katalitik aktiviteye sahip olabileceği yönde stratejik yöntemler geliştirilmiştir. Halling vd. SCF'lerinde bulunduğu susuz ortamlarda su aktivitesinin enzimlerin katalitik performanslarına etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar gözeneksiz biyokatalizör sistemlerinde enzim mikro çevresindeki su aktivitesini kontrol etmek stratejik yaklaşımlar geliştirilmiştir. Reaksiyon ortamına doğrudan tuz hidrat eklemesi ile su aktivitesinin korunmasında tampon görevi yaptığını bildirmişlerdir [69-70].

Basınç: Daha önce de belirtildiği gibi SCF'ler sıkıştırılabilir akışkanlar sınıfında yer aldığından akışkan basıncındaki küçük değişimler ile akışkanın başta yoğunluk olmak üzere fizikokimyasal özellikleri kontrol edilebilir. Süperkritik çözücünün fizikokimyasal özelliklerindeki değişiklik enzimin özellikle gözlenen reaksiyon hızına doğrudan bir etki yapmadığı bilinmektedir [71]. Süperkritik koşullar altında reaksiyon hız sabiti üzerine basıncın direkt etkisi Eyring Geçiş Hal Teorisi ile açıklanabilir. Klasik geçiş hal teorisine göre bir kimyasal reaksiyon tepkiyenler ile dengedeki bir geçiş hal kompleksinin oluşumuyla gerçekleşir. Reaksiyon hızı geçiş hal kompleksinin derişimiyle orantılı olup reaksiyon hız sabiti denklem (1) ile ifade edilebilir.

$$k = r (k_B T/h) K^* \quad (1)$$

Burada; k, gözlenen reaksiyon hız sabiti; k_B , Boltzmann sabiti (J/K); h, Planck sabiti (J/s); T, mutlak sıcaklık (K); r, basınç ve sıcaklıktan bağımsız bir ve K^* ise geçiş hal kompleksi ve tepkiyenlerin serbest enerjisi arasındaki serbest enerji farkıdır.

$$\Delta G^* = RT \ln K^* \quad (2)$$

Standart termodinamik ilişkilerden, serbest aktivasyon enerjisi ve aktivasyon hacmi türetilenir.

$$(\Delta G^* / dp)_T = \Delta V^* \quad (3)$$

Burada; ΔV^* , aktive edilmiş kompleks ve tepkiyenlerin kısmi molar hacimleri olup aktivasyon hacmi olarak tanımlanmaktadır. Aktivasyon hacmi ve reaksiyon hız sabiti arasında denklem (4)'de gösterildiği gibi bir ilişki kurulabilir.

$$\partial \ln k / \partial P = - \Delta V^* / RT \quad (4)$$

Aktivasyon hacmi denklem (5) ile tanımlanabilir.

$$\Delta V^* = V_c - v_A V_A - v_B V_B \quad (5)$$

Denklemden V_c , aktif kompleksin kısmi molar hacmi (m^3/mol); v, tepkiyenlerin stokiometrik denklemede sahip olduğu stokiometrik katsayılarını ve V ise her bir tepkiyenin kısmi molar hacmi (m^3/mol) göstermektedir. Denklem (4)'de verilen reaksiyon hız sabitinin derişim ile ilişkisinin tanımlanabilmesi için denkleme β çözücü sıkıştırabilirlik katsayısının eklenmesi gerekmektedir. Çünkü Süperkritik konların civarında SCF'lerin sıkıştırabilirliği çok yüksektir.

$$\Delta \ln k / \partial P = - \Delta V^* / RT + \Sigma \beta v_i \quad (6)$$

Basınç SCF ortamında gerçekleştirilen reaksiyonların kinetiğini ve aynı zamanda SCF'in fizikokimyasal özelliklerini etkiler. Basıncıdaki küçük bir değişim dielektrik

sabiti, çözücü gücünü karakterize eden ve çözücü yoğunluğun bir fonksiyonu olan Hildebrand çözünürlüğü parametresinde bir değişime neden olur. Süperkritik koşullardaki akışkanları dışında geleneksel çözücü ortamlarında gerçekleştirilen araştırmalarda; dielektrik sabiti, dipol moment, log P değeri ve hidrofobiklik gibi çözücünün fiziksel özelliklerinin enzimlerin katalitik aktivitesini, spesifikliğini ve enantioseçimliliği üzerinde çeşitli etkilere sahip olduğu göstermiştir [72-73]. Çizelge 2.5’de farklı mikrobiyal kaynaklardan sentezlenmiş ticari proteaz enzimlerinin enantioseçimliliği üzerine süperkritik triflormetan (fluoroform) ortam basıncının etkisi gösterilmiştir. Sabit sıcaklıkta basıncın artmasıyla süperkritik koşullardaki triflormetanın hidrofilik özelliği artmakta ve bu özellik proteaz enzimlerin enantioseçimliliğinin de artmasına neden olmaktadır.

Çizelge 2.5 50°C sıcaklık koşullarında proteaz enzimlerinin enantioseçimliliğine süperkritik triflormetan ortam basıncının etkisi

Basınç (bar)	$(k_{cat}/K_m)_L/(k_{cat}/K_m)_D$	
	Subtilisin Carlsberg	Aspergillus proteaz
65	109	5.73
103	100	5.81
124	186	5.68
165	214	6.67
207	229	8.00
289	217	9.17

Kamat vd. lipaz enzimi aktivitesinin süperkritik triflormetan ve etanın dielektrik sabiti ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir [74]. Chaudhary vd. süperkritik triflormetanın basıncı ile Subtilisin Carlsberg proteaz enziminin spesifikliğini değiştirdiğini rapor etmişlerdir [75]. Enzimin katalitik aktivitesi ve spesifikliğini basınç ile değişen süperkritik triklometanın dielektrik sabiti ve log P gibi fiziksel özelliklerinin değişiminden kaynaklandığı araştırmacılara tarafından vurgulanmıştır. Ayrıca bazı araştırmalarda da süperkritik akışkanın ortam basıncının bazı enzimlerin stabilitesini de etkilediği bildirilmektedir [76]. Yang vd. lipaz ve amilaz enzimlerinin scCO₂ ile işlem görmesiyle enzimlerin moleküler yapısı üzerinde bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir [77]. Randolp vd. elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi ile scCO₂ ve sıvı CO₂

ortam basıncının kolesterol oksidaz enzimi konformasyonel yapısına etkisini incelemişlerdir [77]. Araştırmacılar elektron paramanyetik rezonans spektrumları incelendiğinde küçük basınç değişikliklerinden enzim konformasyonunun etkilenmediğini saptanmışlardır. Ancak Kasche vd. tripsin, kimotripsin ve penisilin amidazın konformasyonel yapılarının scCO₂ ile ön işlem görmesi ile değiştiği bildirmişlerdir. Basınçlandırılmış CO₂ ortamında su derişiminin kontrolü bu enzimlerin konformasyonel yapılarındaki değişimlerin kontrol edilebileceği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Ayrıca ani basınç indirgeme işlemi sürecinde kimotripsin ve tripsinde kısmi inaktivasyon olduğu bildirilmektedir. scCO₂ basınç değeri ile indirgeme basıncı koşulları arasındaki farkın artmasıyla inaktivasyon derecesinin de arttığı bildirilmektedir [78].

Çözücü etkisi: Kamat vd. kükürt hekzaflorür, propan, etan, etilen, floroform ve CO₂'nin kullanıldığı süperkritik reaksiyon ortamında metilmetakrilat ile 2-etilhehazaolün lipaz katalizli reaksiyonunda enzim mikro çevresindeki bağlı suyun korunmasının son derece önemli olduğunu vurgulamışlardır. Bu enzimlerin katalitik aktivitelerinin korunması için gerekli olan temel su moleküllerinin enzime bağlı olarak bulunması, hidrofobik özellikteki süperkritik çözücülerde enzimdeki su içeriğinin korunması açısından son derece önemlidir. Araştırmacılar süperkritik CO₂ ortamında lipazların diğer SCF'lere kıyasla daha aktif olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca scCO₂'nin enzim aktivitesi ve kararlılığı açısından popüler bir SCF olduğunu vurgulamışlardır. Zagrobelny vd. *in-situ* olarak floresans spektroskopisini ile tripsin enziminin konformasyon yapısına scCO₂ yoğunluğunun etkisini araştırmışlardır [80]. Bu çalışmada basınçlandırma sürecinde protein yapısında önemli değişiklikler saptanmıştır. Benzer amaca yönelik bir çalışma Randolph vd. tarafından spin-etiketli ve elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi kullanılarak kolesterol oksidaz enzimi için gerçekleştirilmiştir [81]. Enzim konformasyon yapısı üzerine scCO₂ termodinamik parametrelerinin hiç bir etkisinin olmadığı bu araştırmada da saptanmıştır. Yukarıda açıklandığı belirtildiği gibi SCF'lerin fizikokimyasal özelliklerindeki değişimler türüne bağlı olarak enzimlerin aktivitesi ve/veya stabilitesi üzerine olumsuz etkileri olabilir. Hidrofilik ya da hidrofobik özelliklerine bağlı olarak enzimlerin çözünmeden yani dispersiyon halde bulunan biyokatalizör sistemleri çözücü açısından bir heterojen sistem oluşturur. Çözücü türüne bağlı olarak enzimlerin homojen ya da heterojen sistemler oluşturması enzim katalizli reaksiyonlarda iç ve dış kütle aktarım mekanizmalarını etkiler. Kütle

aktarım hızı; çözücünün fizikokimyasal özelliklerine, enzimin formasyonel yapısı ve morfolojisi gibi özelliklerine bağlı olarak değişir. Ancak SCF'lerin fizikokimyasal özelliklerinin basınç ve sıcaklık gibi proses işletme koşullarının değiştirilmesiyle kütle aktarım hızının kontrolü manipüle edilebilir. Difüzyon kısıtlayıcı enzim katalizli reaksiyonlarda bu durum avantaj haline getirilebilir. Çünkü sıvılara ortamlara göre SCF ortamlarında yayınlılık daha yüksektir. Kamat vd. çözünmemiş enzimlerin yer aldığı heterojen katalizli tepkimelerde difüzyon kontrolü SCF ortamında avantaj sağlandığı saptamışlardır [82]. Araştırmacılar SCF ortamında dış kütle aktarım dirençlerinin söz konusu olduğu durumlarda kütle transfer hızının artırılabilirdiğini bildirmişlerdir. Sürekli işletim sistemlerde dış kütle aktarım direnci akış hızına bağlı iken kesikli sistemlerde ise yığın fazın karıştırma hızına bağlıdır. Enzim morfolojisine bağlı olarak gözenek içi ya da kavite boşluklarındaki kütle aktarım hızı enzim sisteminin bulunduğu yığın fazın fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Enzimin yer aldığı homojen ya da heterojen sistemin su ya da organik çözücü özelliklerine bağlı olarak enzimlerin agregasyonu derecesi değişebilmektedir. Süperkritik akışkan ortamlarında ise enzimlerin morfolojik özellikleri sıcaklık ve basınca bağlı olabilir.

Aktif konum içeriği: Enzimin çözünmemiş halde bulunduğu ortamlarda çözücü türünün değişmesiyle enzimin aktif konumlarının durumu da değişebilir. Bu nedenle enzimler organik ortamda çözünmediklerinden enzimin moleküller yapısındaki aktif konumlarının bir bölümü reaksiyon sürecinde aktif halde olmayabilir. Bu nedenle aktif bölge sayısı ya da derişim bilgisi enzimlerin heterojen sistemler oluşturduğu enzim katalizli reaksiyonlarda için önemlidir. Wangikar vd. enzimlerde aktif konum derişiminin enzim türüne ve süperkritik çözücünün hidrofobik özelliğine bağlı olduğunu bildirmişlerdir [83].

2.4 Konu Üzerinde Önceki Çalışmalar

Sürekli yayın ve patent literatüründe taşıyıcısız enzim immobilizasyonu öncesi enzimlerin scCO₂ ortamında ön işlem görmesi sonucu konformasyon yapısının esnek hale getirilerek CLEA ya da başka bir taşıyıcısız enzim immobilizasyon sürecine yönelik sadece bir çalışma Dinçyürek vd. tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada; *Candida rugosa* lipaz (CRL) enzimlerinden hazırlanan CLEA formundaki biyokatalizör sistemlerinin katalitik performanslarını geliştirmek ve en yüksek immobilizasyon

etkinliğine ulaşmak için en uygun scCO₂ ön işlem koşulları; 40 °C ve 10 MPa olarak seçilmiştir. Katı formdaki enzimlerin CLEA işlemleri öncesi scCO₂ ortamında 40 °C ve 10 MPa koşullarında 15 min süreyle basınç denatürasyonuna maruz bırakılması sonucu oluşturulan CLEA'ların katalitik aktivitelerinde ön işlem görmemiş enzimlerin katalitik aktivitelerine kıyasla önemli artışlar sağlanmıştır. CLEA hazırlama sürecinden önce scCO₂ ile ön işlem görmüş CRL enzimleri kullanılarak; C_{E0}=150 mg/mL, C_{GA}=40 µL/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, C_{Lysine}=1.67 mg/mL ve C_{Triton X-100}= µL/mL koşullarında gerçekleştirilen immobilizasyon süreçlerinde maksimum CLEA aktivitesine ulaşılmış ve aktivite 2279 U/g CLEA olarak saptanmıştır. Ticari olarak üretilen CRL enziminin CLEA aktivitesine göre elde edilen bu aktivite değeri yaklaşık 2.2 kat daha fazladır. Konvansiyonel CLEA hazırlama yöntemi kullanılarak; C_{E0}=150 mg/mL, C_{GA}=40 µL/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, C_{Lysine}=1.67 mg/mL ve C_{Triton X-100}=3.33 µL/mL koşullarında elde edilen maksimum CLEA aktivitesi ise 1718 U/g CLEA değerine ulaşmıştır. Serbest enzim immobilizasyonunda CLEA formunda biyokatalizörlerin sentezinde *Candida rugosa* lipaz enzimlerinin scCO₂ ortamında ön işlem görmesi sonucu biyokatalizörlerin katalitik performanslarında genel olarak önemli artışlar sağlanmıştır. Ayrıca scCO₂ kullanımıyla biyokatalizör üretimindeki enzim kaybı azaltılmıştır [84].

Sürelî yayın literatüründe farklı enzimlerin kullanıldığı ve süperkritik akışkanlar dışında su gibi ortamlarında gerçekleştirilen CLEA çalışmalarına yönelik son yıllarda yapılmış yayımların çalışmamıza ışık tutması açısından aşağıda değerlendirilmiştir.

Cao vd., β penisilin açılaz enziminin fiziksel agregat oluşturması ve daha sonra bunların birbirlerine kimyasal olarak çapraz bağlanması ile yeni bir immobilizasyon yöntemi çapraz bağlı enzim agregatlarını geliştirmişlerdir. Araştırmada sentezlenen CLEA'larının reaksiyon ortamında yüksek katalitik aktivite gösterdiği ve ayrıca polar ve apolar organik çözücülere karşı dayanıklılığın yüksek olduğu saptanmıştır [85].

Serrano vd., 7 farklı ticari lipaz enzimi -*Candida antarctica* lipazı A, *Candida antarctica* lipazı B, *Pseudomonas alcaligenes* lipazı, *Thermomyces lanuginosus* lipazı, *Rhizomucor miehei* lipazı, *Aspergillus niger* lipazı, *Candida rugosa* lipazı kullanarak hazırladıkları CLEA formundaki taşıyıcısız enzim immobilizasyon sürecine ortam bileşenleri ve bileşimlerinin etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada; 1,2-dimetoksietan, (NH₄)₂SO₄ ve aseton gibi farklı presipitasyon ajan türü ve derişimin CLEA formundaki enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir. Bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajan olarak glutraldehit kullanılmıştır. Hidrofilik özellik gösteren lipaz enzimlerinin organik

çözücü ile presipitasyonunda enzimlerdeki aktivite kayıplarının önlenmesi amacıyla; taç eter (crown ether) ve sodyum dodesil sülfat (SDS) yardımcı katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Presipitasyon ajanı olarak kullanılan organik çözücüler lipaz enzimlerinin aktif konumlarında denatürasyona neden olduğundan CLEA çalışmalarında en uygun presipitasyon ajanının $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, taşıyıcılı ve taşıyıcısız enzim sistemlerinin immobilizasyon süreçlerinde sıklıkla kullanılan bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajan olan gluteraldehitin CLEA formundaki enzimlerin birbirine aşırı bağlanmasını önlemek ve serbest enzime göre aktivite geri kazanım oranını arttırmak için taç eter, SDS ve Triton X-100 gibi farklı sürfaktan türü ve derişimlerinin etkisi kapsamlı biçimde incelemişlerdir. Enzimlerin katalitik özellik gösteren aktif konumlarının, sürfaktan molekülleri tarafından çevrelenmesiyle, aktif konumlar üzerinden gerçekleşebilecek çapraz bağlanmaların şiddetinin azaltıldığını belirtmişlerdir. Özellikle, *Thermomyces lanugiosus* lipazı ve *Rhizomucor miehei* lipazı kullanılarak gerçekleştirilen CLEA formundaki enzimlerin katalitik performansları $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve SDS varlığında doğal enzime göre sırasıyla 2 ve 3 kat oranında arttığını saptamışlardır. Ayrıca, CLEA formunda hazırlanan bu biyokatalizörlerin organik ortamlardaki katalitik aktivitelerinin de yaklaşık 10 kat arttığını bildirmişlerdir [86].

Aytar ve Bakır'ın, tirozinaz enziminin CLEA'larını hazırlamak için proteik feeder olarak BSA, presipitasyon ajanı olarak $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, çapraz bağlayıcı ajan olarak da gluteraldehit kullanılmıştır. Aminoasit gruplarınca daha zengin olan proteik feeder ajan BSA'nın lizine göre gluteraldehit ile daha fazla bağlanarak enzimin aktif konumlarının korunması amaçlanmıştır. Farklı derişimlerdeki $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve gluteraldehitin CLEA aktivitesine etkisini incelemişler ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) resimlerinden hazırlanan CLEA'larda oluşan kavitenin enzim aktivitesindeki etkisini tartışmışlardır. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişim aralığının % 40-90 (w/v) olduğu koşullarda presipitasyon ajan derişiminin artması ile azalan partikül büyüklüğü ile birlikte aktivitenin arttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar gluteraldehit derişimlerinin CLEA aktivitesine etkisi % 1-4 (v/v) aralığında incelenmiş, gluteraldehit derişiminin artmasıyla aktivitenin arttığını, sentezlenen CLEA'larının çapının ise azaldığını ve kavite sayısının arttığını belirlemişlerdir. Kavite sayısındaki artışın kütle aktarım kısıtlamalarını da önlediğini bildirilmektedir. %2 (v/v) gluteraldehit derişimi ve %60 (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişiminde ki koşullarda hazırlanan CLEA'larda aktivite geri kazanımının yaklaşık %100 olduğunu saptamışlardır [87].

Yu vd. CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA'ların partikül büyüklüğüne ve CLEA aktivitesine agregasyon koşullarının etkisini araştırmışlardır. Çalışmada LiCl, NaCl, NH₄Cl, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄ gibi farklı tuzların enzim agregat boyut kontrolüne etkisi araştırılmış ve belirtilen tuzların çözelti içerisindeki elektrostatik dengeyi etkileyerek moleküller arasındaki hidratlaşma derecesinin değişmesiyle, enzimlerin birbirlerine yakınlaştığını vurgulanmıştır. Presipitasyon ajanı çözeltinin çözünürlüğünü azaltarak enzimleri çözünmez durumda birbirine yakınlaştırılmasını sağlamaktadır. Farklı tuzların CLEA çözünürlüğünü nasıl etkilediği incelenmiş ve enzim molekül çözünürlüğünü en fazla azaltan tuzun (NH₄)₂SO₄ olduğunu saptamışlardır. Çalışmada, (NH₄)₂SO₄ derişiminin artmasıyla enzim çözünürlüğün azaldığını, agregasyonun arttığı ve partikül büyüklüğünün de buna bağlı olarak arttığını vurgulanmıştır. Gluteraldehit derişimi, ortam pH'ı ve enzim derişiminin CLEA aktivitesine etkisi incelenmiş ve yüksek derişimlerinde daha büyük partikül çapına sahip CLEA'larının oluştuğu bildirilmiştir. Partikül büyüklüğünün kütle aktarımı açısından önemli olduğu, CLEA boyut kontrolünün aktivite için olumlu sonuç verdiği vurgulanmış ve en yüksek aktivite değerini partikül büyüklüğü 40-50 µm çapındaki CLEA'ların gösterdiği bildirilmiştir [88].

Perez vd., kloroperoksidaz enziminin katalitik açıdan kararlılığını ve yüksek sıcaklığa karşı dayanıklılığını arttırmak ve pH'a karşı stabilitesini geliştirmek için enzimin CLEA'larını oluşturmuşlardır. Bu çalışmada serbest amino grupları eklenerek enzim aktivitesinde artış sağlanması amaçlanmıştır. Serbest amino grupları enzimin yüzeyini kaplayarak gluteraldehitin enzimin aktif konumlarına aşırı bağlanmasını önlemektedir ve oluşturulan biyokatalizörde aktivite artışına neden olmaktadır. Araştırmada proteik feeder olarak polilizin ve polietilenimin kullanılmıştır. %1 (v/v) derişiminde gluteraldehit ve donor grup olarak polilizin ve polietilenimin kullanıldığında oluşturulan CLEA'larda aktivite kaybının en aza indirildiğini saptamışlardır. Oluşturulan CLEA'larını aktivitesini kaybetmeden tepkime ortamlarında defalarca kullanılabileceği vurgulanmıştır [89].

Kumar vd., farklı pH (5-9) ve sıcaklık (4-45 °C) aralığında gerçekleştirilen taşıyıcısız immobilizasyon sürecinde aktivite geri kazanım oranı açısından en uygun çapraz bağlı nitrilaz enzimi agregatlarının oluşturulmasını amaçlamışlardır. %35'lik amonyum sülfat çözeltisi ve 125 µM derişiminde gluteraldehit kullanıldığında nitrilaz enzimlerinden yola çıkılarak oluşturulan CLEA'larındaki aktivite geri kazanım oranının %70 olduğunu belirlemişlerdir. Aktivite geri kazanım oranına gluteraldehit derişiminin

etkisi 12.5–250 mM derişim aralığında incelenmiş ve gluteraldehit derişiminin artmasıyla aktivite geri kazanım oranının arttığı ve daha sonra hemen hemen sabit kaldığını bildirilmektedir. Araştırmacılar nitrilaz enziminin taşıyıcısız enzim immobilizasyonunda başlangıç enzim aktivitesinin artması ile aktivite geri kazanım oranının azaldığını saptamışlardır. Araştırmacılar CLEA üretim sürecinde kullanılan tampon ile gerçekleştirilen yıkama işlemlerinde süpernatantta herhangi bir aktivite olup olmadığına bakılmış ve bu süreçte gluteraldehit derişimi ve başlangıç enzim derişimin artmasıyla aktivite kayıplarının derişimini incelemişlerdir. Gluteraldehit derişimi ile aktivite kaybında önemli bir derişim olmamasına karşın başlangıç enzim derişiminin artmasıyla önemli ölçüde aktivite kaybı yani enzim kaybının olduğu saptamışlardır [90].

CLEA enzimatik üretim proseslerinde serbest ya da immobilize enzim kullanımındaki darboğazların çözümü için son yıllarda geliştirilen yeni bir immobilizasyon yöntemidir. CLEA'ları diğer taşıyıcısız enzim immobilizasyon yöntemlerine göre alternatif ve yeni ortaya çıkmış bir yöntem olmasına karşın; enzim agregatlarının boyutunun herhangi bir difüzyon kısıtlamasına gitmeden nasıl kontrol edilebileceği, enzim konformasyonunun nasıl daha esnek hale getirilebileceği ve enzim aktivitesi ve seçiciliğinin agregasyon koşullarının farklılaştırılması ile nasıl ayarlanabileceği gibi darboğazların aydınlatılması gerekmektedir. Enzimatik sentezlerde, çözücü ortamlarına alternatif olarak $scCO_2$ 'nin kullanılması enzimlerin bölgesel ve stereo seçimli özelliklerini artırılabilir. Sıcaklık ve basınç gibi biyoproses parametrelerindeki küçük derişimler, süperkritik akışkanların fizikokimyasal özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir. Enzimlerin mikro çevresindeki bu derişimler biyokatalizörlerin katalitik aktivite ve yapısal kararlılığını da etkiler.

Yüksek lisans tez projesinin temel amacı yaygın uygulamalar için katalitik açıdan oldukça aktif ve yeniden kullanılabilir CLEA'larının tasarımına yönelik esnek bir teknoloji platformu oluşturmaktır. Bu amaç doğrultusunda, $scCO_2$ ortamının basınç ve sıcaklık gibi koşullarına bağlı olarak bu ortamlarda ön işlem görmüş fosfat tamponunda çözünmüş CRL enzimlerinin aktivitelerindeki derişimlerin etkisi araştırılarak CLEA'larının oluşturulmasında en uygun ön işlem koşullarının etkisi araştırılmıştır. Immobilizasyon öncesi enzim konformasyonunda bir esneklik sağlanması amacıyla gerçekleştirilen ve en uygun $scCO_2$ ortamında ön işlem görmüş enzim çözeltisi kullanarak gerçekleştirilen CLEA'larının katalitik performansına etki eden temel ortam bileşimlerinin etkisini araştırmaktır. Yüksek lisans tez projesi kapsamında presipitasyon

ajanı olarak amonyum sülfat $[(\text{NH})_2\text{SO}_4]$ ve bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajan olarak gluteraldehit kullanılmıştır. *Candida rugosa* lipazı enzimlerinin CLEA'ların katalitik aktivitelerine başlangıç enzim derişimi, bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajan derişimi, presipitasyon ajan derişimi etkisi, proteic feeder olarak bovin serum albümin (BSA) ve lizin derişim etkisi ile yüzey aktif maddesi Triton X-100 derişiminin etkisi sistematik olarak araştırılmıştır. Elde edilen bulgular süreli yayın literatüründe yer alan ve Serrano vd. önerilen yöntemle elde edilen CLEA'larının katalitik aktivite değerleri ile kıyaslanmıştır [91].

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyaller

Yüksek Lisans tez projesi kapsamında CLEA'larını oluşturmak için *Candida rugosa* lipaz (Sigma L1754, Type VII Aktivite ≥ 700 U/mg) enzimi kullanılmıştır. Çapraz bağlayıcı ajan olarak gluteraldehit (Sigma G5882, Grade I % (v/v) 25), presipitasyon ajanı olarak amonyum sülfat (Merck 1217, saflık $\geq$ %99.5), proteik feeder ajan olarak BSA (Sigma A9647, Fraction V, saflık $\geq$ 96) ve/veya L(+)-lizin (Sigma L5501), yüzey aktif maddesi olarak TritonX-100 (Sigma, 93429) taşıyıcısız immobilize enzim sistemlerinin hazırlanmasında yer almıştır. Serbest enzim ya da CLEA formundaki biyokatalizörlerin katalitik stabilitesini korumak amacıyla tampon çözeltisinin hazırlanmasında $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck 6345) ve Na_2HPO_4 (Merck 6586) kullanılmıştır. Hem serbest hem de CLEA formundaki biyokatalizörlerin katalitik aktivitelerini belirlemek amacıyla asetronitril (Merck 100030) içerisinde hazırlanmış *p*-nitrofenil asetat (Sigma N8130) substrat olarak kullanılmıştır. Serbest ve çapraz bağlı enzim agregatları formlarındaki enzimlerin aktivitelerinin belirlenebilmesi için kalibrasyon doğrusunun hazırlanmasında tepkime ürünü olan *p*-nitrofenol (Merck 6798) kullanılmıştır.

Süperkritik koşullardaki akışkan ortamının sağlanması için saflık derecesi %99.995'dan büyük olan 55 bar basınç koşullarında sıvı CO_2 (Hat Grup, Kocaeli) hem presipitasyon ajanı hem de enzimin basınç denatürasyonunun gerçekleştirilmesinde kullanılmıştır.

Yüksek lisans tez çalışmasında hazırlanan tüm sulu çözeltilerde iletkenlik değeri $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ olan Milli-Q su (Milli-Q Gradient Model, Millipore, A.B.D) kullanılmıştır. Deiyonize su için gerekli saf su ise Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetleri ve Uygulama Hastanesi Hemodiyaliz Bölümü'nden sağlanmıştır.

3.2 Çapraz Bağlı Enzim Agregatlarının Hazırlanması

3.2.1 Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması

Hidrojen iyonu derişimi 6 ile 8 aralığında olan 0.2 M derişimdeki sodyum fosfat tampon sistemlerinin hazırlanmasında asit tuzu olarak $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve baz tuz olarak Na_2HPO_4 kullanılmıştır. İstenilen pH değerinde NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 tamponlarının hazırlanması için gerekli basamaklar aşağıda belirtilmiştir.

- i. 100 mL hacminde derişimi 0.2 M olan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($M_w=156.01$) ve Na_2HPO_4 ($M_w=141.96$) stok çözeltileri hazırlamak için balon jojeler içerisine sırasıyla; 3.1202 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 2.8392 g Na_2HPO_4 eklenerek deiyonize su ile hacimleri 100 mL'ye tamamlanır.
- ii. 0.1 M derişiminde ve istenilen pH koşulundaki tampon sistemini hazırlamak için Çizelge 3.1'de belirtilen miktarlarda $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ya da Na_2HPO_4 stok çözeltilerin biri -genellikle daha fazla hacimli olan stok çözelti- 150 mL hacimli bir beher içerisine eklenir. Sodyum fosfat tampon çözeltisinin pH değeri diğer stok çözeltilerden belirtilen miktarda kontrollü biçimde çözelti içine eklenir. Çözelti içerisine daldırılmış bir pH probu yardımıyla çözeltinin pH değeri eş anlı olarak pH metreden (pH ve iletkenlik ölçer, Sartorius A.G Professional 50PP Model, Almanya) sürekli olarak kontrol edilir.
- iii. Tampon sistemin pH değerinin doğru biçimde hazırlanabilmesi için tampon ortamları bir sıcaklık kontrollü manyetik karıştırıcıda (IKA Co., RH-D-KT/C Model, Almanya) sürekli olarak karıştırılır. Tampon sistemleri 25 °C sıcaklıkta hazırlanmıştır. 0.1 M derişimde sodyum fosfat tamponunu hazırlamak için 0.2 M tampon çözeltisine eş hacimde deiyonize su eklenerek derişimi 0.1 M'a seyreltilir.

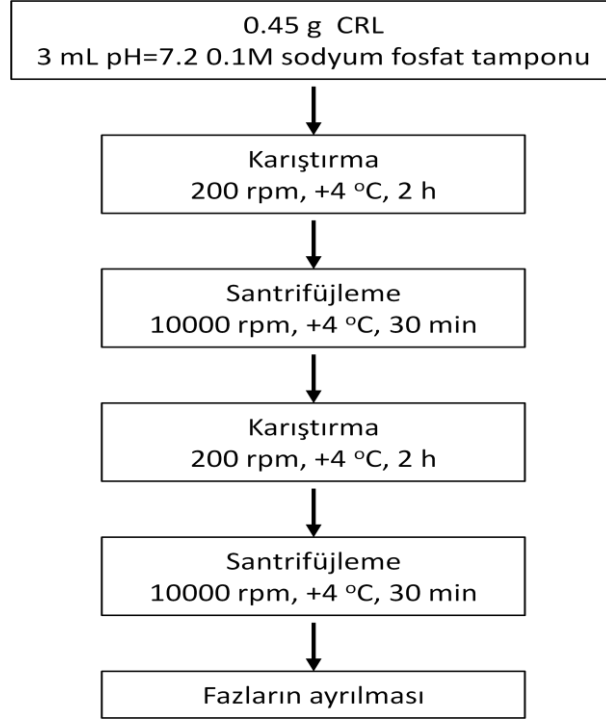
Çizelge 3.1 Tampon sisteminin hazırlanması için gerekli ortam bileşimi [51]

pH,	x mL	y mL
	0.2 M Na_2HPO_4	0.2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
6.0	6.15	43.85
7.0	30.5	19.5
7.2	36.0	14.0
7.5	42.0	8.0
8.0	47.35	2.65

3.2.2 Üretim Ortamından Gelen Safsızlıkların Giderilmesi

Enzimin saflaştırma işleminde, Liou vd. (1998) tarafından gerçekleştirilen saflaştırma işlemi süreci modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir [52]. Bu süreçte CLEA formunda

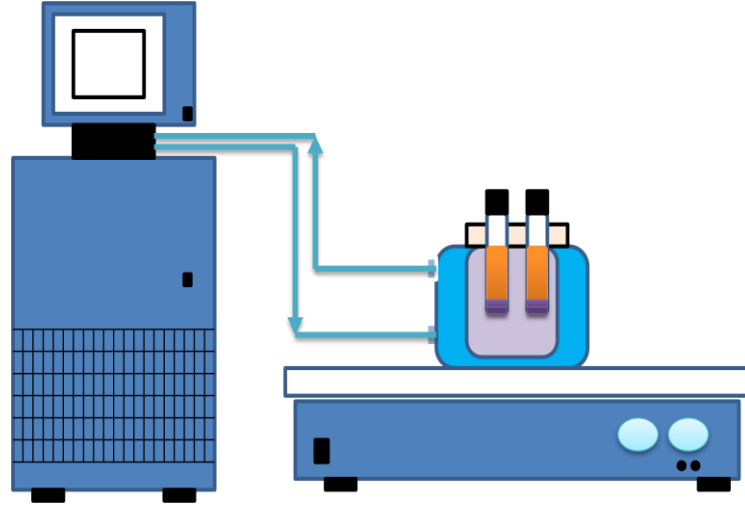
biyokatalizör sistemleri oluşturmak için 30 mL iç hacimli polipropilen santrifüj tüpleri kullanılmıştır. Enzimin saflaştırma sürecinde gerçekleştirilen basamaklar Şekil 3.1’de özetlenmiş ve aşağıda açıklanmıştır.



Şekil 3.1 *Candida rugosa* lipazı enziminin saflaştırma basamakları

- i. Derişimi 0.15 g/mL olacak şekilde CRL enzimi ve pH'ı 7.2 olan 0.1 M sodyum fosfat tamponu 30 mL hacimli polipropilen santrifüj tüp içerisine eklenir. Karışım bir vorteks cihazında (IKA Co., VG3 Model, Almanya) yaklaşık 5 min süreyle homojen bir enzim çözeltisi oluşuncaya kadar karıştırılır.
- ii. Sodyum fosfat tamponunda hazırlanan enzim çözeltisi karıştırma hızı kontrollü bir orbital karıştırma hızı çalkalayıcı (Selecta Co., Rotabit Model, İspanya) ile 200 rpm karıştırma hızında 2 h süre ile karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi Şekil 3.2’de gösterildiği gibi polipropilen santrifüj tüplerinin yerleştirilmesine uygun olacak şekilde dizayn edilmiş 4 °C sıcaklıktaki ısı banyosu içerisine daldırılmıştır. Isı banyosu çevresi ceket tipi bir ısı değiştirici ile çevrelenmiş olup banyo ortamının sıcaklığı 4 °C sıcaklıkta bir soğutma akışkanının sürekli olarak sirkülasyonu ile

gerçekleştirilmiştir. Soğutma, akışkan sıcaklık kontrolü ve sirkülasyonu bir sıcaklık kontrollü soğutmalı sirkülatörü yardımıyla (Thermo Elektron Co., HAAKE Phoenix II P2-C25P Model circulator, Hampshire, İngiltere) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2 Soğutma sirkülatörlü, orbital karıştırma sistemi

- iii. Sodyum fosfat tamponunda 4 °C sıcaklıktaki doymuş CRL enzim çözeltisini elde etmek ve ortamdaki safsızlıkları çözeltiden ayırabilmek için Şekil 3.3’de gösterilen sıcaklık ve karıştırma hızı kontrollü santrifüj cihazı (Selecta Co., Medifriger BL-S Model, İspanya) ile 4 °C ve 10000 rpm koşullarında 30 min süre santrifüjleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj tüpü üzerindeki düşük yoğunluklu sıvı -süpernatant- 30 mL hacimli başka bir santrifüj tüpüne dikkatlice alınmıştır.
- iv. Süpernatant ortamına ii. ve iii. basamaklara yer alan süreçler yeniden uygulanır.



Şekil 3.3 Santrifüj cihazı

3.2.3 Süperkritik CO₂ Ortamında Enzimlere Ön İşlem Uygulanması

3.2.3.1. Yüksek Basınç Reaktör Sistemi

Candida rugosa lipazının aktivite ve yapısal kararlılığına süperkritik CO₂ (scCO₂) ortamının etkisi 100 mL iç hacimli safır cam pencereli mekanik karıştırırmalı yüksek basınç reaktör sisteminde (Thar, R100WS Model, PA, U.S.A) incelenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Safır cam pencereli ve mekanik karıştırırmalı yüksek basınç reaktör sistemi

Sistem maksimum 100 °C sıcaklık ve 650 bar basınç koşullarında çalışabilme potansiyeline sahiptir. Yüksek basınç reaktör ortamındaki değişimlerin *on-line* olarak gözlenebilmesi için reaktörde aydınlatmalı bir kamera sistemi bulunmaktadır. Ortam

sıcaklığı reaktör gövdesine monte edilmiş bir termočift yardımıyla ölçülmektedir. Reaktör gövdesinin altında bulunan bir elektrikli ısıtıcı yardımıyla istenilen ortam sıcaklığı termočiftten alınan bilgiler doğrultusunda ± 1 °C duyarlılıkla sağlanabilmektedir. Reaktör ortamındaki basınç, reaktör gövdesine monte edilmiş bir basınç sensörü yardımıyla kontrol panelinden izlenebilmektedir. Yüksek basınçlı sistemin üzerinde ayrıca 1 adet basınç göstergesi de monte edilmiş olup buradan da ortam basıncı ayrıca görsel olarak izlenebilmektedir. Reaktör ortamının karıştırma hızı reaktör üst gövdesine monte edilmiş bir 4-bıçaklı 45° açılı eğik türbin tipi mekanik karıştırıcı (CROSCOP, PM6015 Model, U.S.A.) ile sağlanmaktadır. Karıştırma hızı, kontrol paneli üzerinde bulunan potansiyometre yardımıyla 0-2400 rpm aralığında istenilen değere ayarlanabilmektedir.

Yüksek basınç reaktör sistemine istenilen sıcaklık ve basınç koşullarındaki süperkritik CO₂, şırınga tipi yüksek basınç pompası (ISCO, 100 DX Model, NE, Linhon, A.B.D.) yardımıyla sağlanmaktadır. Süperkritik akışkanın yüksek basınç reaktör ortamına girişi reaktör üzerine monte edilmiş besleme hattından gerçekleştirilmektedir. 100 mL hacim kapasitesine sahip silindir ortamındaki CO₂'in ısıtılması/soğutulmasını sağlamak için piston başlıklarının dış yüzeyi ceket tipi bir ısı değiştirici ile çevrelenmiştir. Süperkritik CO₂'in sıcaklığı ısı değiştiriciye sürekli olarak beslenen ısıtma ya da soğutma akışkanın sirkülasyonu ile sağlanmıştır. Bu işlem sıcaklık kontrolü bir sirkülatör yardımıyla (Thermo Elektron Co., HAAKE Phoenix II P2-C25P Model circulator, Hampshire, İngiltere) gerçekleştirilmiştir. Şırınga pompa sistemi ile bağlantılı bir kontrol ünitesi yardımıyla istenilen basınç ve akış hızında süperkritik CO₂ beslemesi yüksek basınç reaktöre sağlanabilmektedir. Deneylerde saflık derecesi ≥ 99.995 olan 55 bar basınç koşullarında sıvı CO₂ (Hat Grup, Kocaeli) kullanılmıştır.

3.2.3.2 Enzimlerin Süperkritik CO₂ ile Tersinir Basınç Denatürasyonu

Saflaştırılma işlemi gerçekleştirilerek hazırlanan çözelti halindeki CRL enzimleri reaktör içerisinde 15 min süre ile statik basınç altında CO₂ ile ön işlem görmüş ve bu süreç yüksek basınç reaktörünün kamera sisteminden *on-line* olarak izlenilmiştir. CO₂ ile ön işlem süresi tamamlanmış enzimler, yüksek basınç reaktör sistemindeki akışkan basıncının ani olarak azalmasını ve numune kaybını engellenmesi için basınç kontrolü, yüksek basınç reaktör sisteminin kontrol vanası (HIP, Erla Model, PA, U.S.A.) yardımıyla sağlanmıştır. Kontrol vanasından CO₂ gazının ani çıkışı genişlemeye neden

olduğundan kuru buz oluşumuna neden olmaktadır. Kuru buz oluşumu hem kontrol vanasının tıkanmasına hem de enzim çözeltilerinin katalitik aktivitesinin değişmesine neden olacağından sıcaklık kontrollü elektrikli ısıtıcı (Brisk-Heat Corporation, SDC240KC-A-E Model, U.S.A.) ile ortalama 50°C ye kadar ısıtılarak kontrol vanasının buz tutması engellenmiştir.

scCO₂'nin *Candida rugosa* lipaz enzim aktivitesine ortam sıcaklığı ve basıncın etkisi sırasıyla 31, 40 ve 50 °C sıcaklık, 73.8,100,150, 200 ve 300 bar basınç koşullarda pH=7.2 olan 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄.2H₂O tampon ortamında çözünmüş enzim için araştırılmıştır.

3.2.4 Çapraz Bağlı Enzim Agregatlarının Üretimi

Çapraz bağlı enzim agregatlarının (CLEA) üretimi hem yüksek basınç reaktör sisteminde ön işlem görmüş CRL enzim çözeltileri için hem de işlem görmemiş CRL enzim çözeltileri için oluşturulmuştur. CLEA üretim aşamaları adım adım aşağıda sunulmuştur.

i. Çöktürme işlemi; hacmi 30 mL olan polipropilen santrifüj tüpüne 3 mL hacimdeki belli bir başlangıç enzim derişimine sahip enzim çözeltisi konulmuş ve presipitasyon ajanı amonyum sülfat enzim çözeltisine yavaş yavaş eklenmiş ve karışım düşük bir hızda vorteks cihazında karıştırılarak homojenize edilmiştir. Enzimin yüksek derişimdeki tuz etkisiyle presipitasyonu (salting out) karıştırma hızı kontrollü orbital karıştırıcıda (Selecta Co., Rotabit Model, İspanya) 2 h süre ile +4 °C sıcaklık ve 200 rpm karıştırma hızı koşullarında gerçekleştirilmiştir.

ii. Çapraz bağlama işlemi; enzim moleküllerinin birbirlerine çapraz olarak bağlanma işlemi karıştırma hızı kontrollü orbital karıştırıcıda (Selecta Co., Rotabit Model, İspanya) 30 min süre ile +4 °C sıcaklık ve 200 rpm karıştırma hızında belirli derişimlerde glutraldehit çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Karıştırma işlemi sonunda CLEA'ların oluşumu için örnekler 4-8 °C sıcaklıktaki buzdolabında 48 h boyunca bekletilmiştir.

iii. Yıkama işlemi; oluşturulan CLEA'ların çözelti ortamından geri kazanımı ve üretim ortamından gelen safsızlıklardan ayrılması için örnekler 48 h sonunda +4 °C sıcaklıkta 1000 rpm karıştırma hızında 30 min süreyle soğutmalı santrifüjde (Selecta Co., Medifriger BL-S Model, İspanya) santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonunda üst fazı ayrılan örnekler üzerine pH'ı 7.2 olan 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄.2H₂O tampon

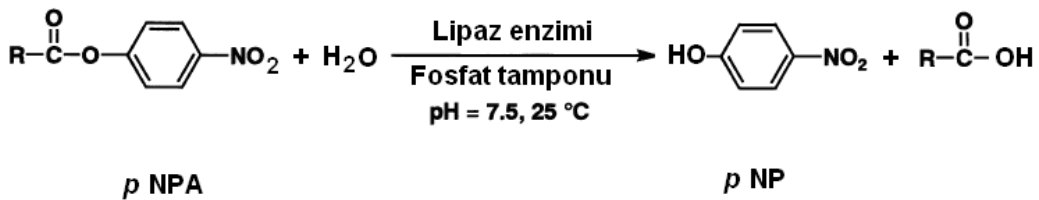
çözeltiden 3 mL eklenmiş ve vorteks işlemi uygulanmıştır. Belirtilen bu yıkama işlemi kirliliğin en aza indirilmesi için 3 kez tekrarlanmıştır.

Proteik feeder ajan türü ve derişim etkisi ve yüzey aktif madde derişiminin oluşturulan CLEA formundaki biyokatalizörlerin katalitik aktivitesine etkisinin incelendiği immobilizasyon işlemlerinde; proteik feeder ajan enzim çözeltisinin saflaştırma işlemi sonrası, yüzey aktif maddesi ise enzim çözeltisinin saflaştırma işlemi öncesi eklenmiştir.

Deneylerde *Candida rugosa* lipazı enziminin çapraz bağlı enzim agregatlarının aktivitesi üzerine proteik feeder ajan BSA ve lizin derişiminin etkisi, yüzey aktif maddesi TritonX-100 derişiminin etkisi (1/10 oranında deiyonize su içerisinde seyreltilerek) incelenmiştir.

3.3 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Candida rugosa lipazı enzimi kullanılarak hazırlanan CLEA formundaki taşıyıcısız enzim sistemlerinin aktivitesi (U), substrat olarak *p*-nitrofenilasetat (*p*-NPA)'ın lipaz enzimi ile tepkimesi sonunda üretilen *p*-nitrofenol (*p*NP)'in üretim hızı ölçülerek belirlenmiştir (Goto vd., 2003; Salgın, 2007). Tepkimenin stokiyometrik denklemi Şekil 3.5' de verilmiştir.



Şekil 3.5 *p*-nitrofenilasetat lipaz katalizli enzimatik hidroliz tepkimesi

Candida rugosa lipazı ile oluşturulan çapraz bağlı enzim agregatlarının aktivitesini belirlemek için belirli bir miktar CLEA erlen içerisine alınmıştır. 25 ml 0.1 M ve pH=7.5 olan Na₂HPO₄-NaH₂PO₄.2H₂O tamponunda 10 min karıştırılıp çözünmesi sağlandıktan sonra çözeltiliye 125 µL *p*-nitrofenol substrat çözeltisinden eklenerek tepkime başlatılır. *p*-nitrofenol üretim hızı, spektrofotometrik olarak UV-vis spektrofotometre cihazında (Shimadzu, 1800 model Uv-vis spektrofotometre, Japonya) λ=404 nm dalga boyunda ve 25 °C sıcaklıkta, kinetik modda 1.5-3.0 ve 4.5 min'de

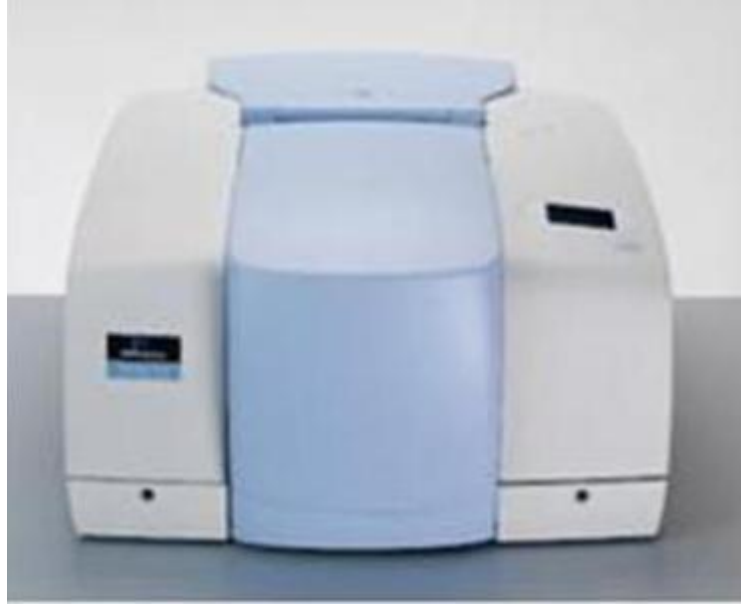
çözültiden alınan örneklerin absorbans değerlerinin belirlenmesi ile hesaplanmıştır. Absorbans ölçümü öncesinde oluşturulan CLEA'lar 0.45 µm gözenekli polivinilidinden florür (PVDF, Millex VV) filtrelerde süzölmüştür. Her bir *p*-NP derişimi için okunan absorbans değerleri spektrofotometrik olarak $\lambda=404$ nm için belirlenmiştir.

3.4 Enzimin Konformasyonel Yapısındaki Değişimler

Protein yapısında olan enzimlerin konformasyonel yapısındaki değişimler belirlenmesi işleminde FTIR-ATR spektrofotometresi (Spectrum 100, Perkin Elmer) kullanılmıştır (Şekil 3.6). FTIR spektrofotometresi ile amid bölgesindeki ışın absorpsiyonunun gözlenmesi ile proteinin ikincil yapısındaki değişimler saptanabilmektedir. Amid grubu, amid A, B ve I-VII olmak üzere 9 titreşim modu göstermektedir. Proteinin ikincil yapısındaki değişimlerin belirlenmesi için tercih edilen spektral bileşenler amid I, amid II ve amid III bandlarıdır [94].

scCO₂ ile işlem sonrasında *Candida rugosa* lipazının ikincil yapısında meydana gelebilecek değişimler, CRL'nin kuru toz formu ve üretimden gelen safsızlıkların giderildiği saflaştırılmış formu ile incelenmiştir. Saflaştırma işleminin aşamaları bir önceki bölümde açıklanmıştır. scCO₂ işlemi için 0.010g kuru enzim ve 20 µL saflaştırılmış enzim ayrı vialler içerisine alınarak safir cam pencereleli mekanik karıştırılmalı yüksek basınç reaktör sistemine yerleştirilmiştir. Kuru ve saflaştırılmış formadaki CRL enzimlerine yüksek basınç reaktör sisteminde 31, 40 ve 50 °C sıcaklık ve 73.8, 100, 150, 200 ve 300 bar basınç koşullarda scCO₂ işlemi uygulanmıştır.

Proteinlerin ikincil yapısındaki değişimlerin infrared spektrofotometresi ile belirlenmesi işleminde özellikle sulu çözelti içinde bulunan proteinler için suyun 1600-1700 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında -belirtilen bu aralık proteinlerin ikincil yapısı ile ilgili olan amid I bandına karşılık gelmektedir- infrared ışınını absorplaması problem yaratmaktadır. Bu nedenle bu tip analizlerde amid I ve amid II bölgesinde absorpsiyon yapmayan D₂O çözeltisinin kullanılması önerilmektedir [95]. Bu nedenle scCO₂ ile işlem gören sıvı formdaki CRL enzim örneklerine 0.5 mL D₂O (Sigma 151882) eklenerek FTIR-ATR spektrumları alınmıştır.



Şekil 3.6 FTIR-ATR spektrofotometresi

3.5 Enzim Boyutundaki Değişimler

Saflaştırma işlemi uygulanmış enzimlerin 31, 40 ve 50 °C sıcaklık ve 73.8, 100, 150, 200 ve 300 bar basınç koşullarda scCO_2 ile işlem görmesinden sonra fiziksel olarak enzim yapısında meydana gelen değişimler, Zetasizer cihazı ile (NanoZS, Malvern, UK) (Şekil 3.7) enzimlerin hidrodinamik boyutları/yarıçapları ölçülerek belirlenmiştir.



Şekil 3.7 Zetasizer cihazı

Zetasizer cihazında hidrodinamik boyut analizleri DLS (Dynamic Light Scattering) tekniği ile yapılmaktadır. Bu teknik ile sıvı içinde disperse olmuş Brownian hareketi yapan partikül/moleküllerin difüzyonu ölçülmektedir. Ölçülen değerler yardımı ile Stokes-Einstein denklemi (Eşitlik 3.1) kullanılarak partiküllerin hidrodinamik boyut değerleri cihazın software programı tarafından hesaplanmaktadır.

$$d(H) = \frac{k_B \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \quad [3.1]$$

Eşitlik 3.1’de d(H); hidrodinamik yarıçap/boyut (nm), k_B ; Boltzmann sabiti ($1.38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), T; sıcaklık (K), η ; viskozite, D; difüzyon katsayısını göstermektedir [96].

4 DENEYSEL BULGULAR ve TARTIŞMA

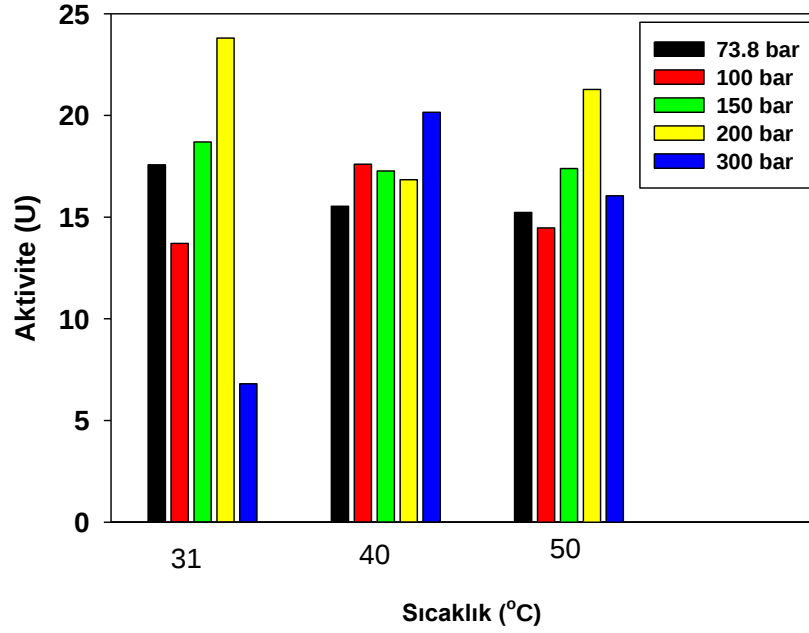
4.1 Süperkritik CO₂ Ortamında Termodinamik Değişkenlerin *Candida Rugosa* Lipaz Enzimi Aktivitesine Etkileri

Bölüm 3.2.2’de belirtilen şekilde CRL’nin üretim ortamından gelen safsızlıkların giderilmesi işleminden sonra saflaştırılan, 0.1 M derişim ve pH=7.2 olan NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponu içinde bulunan enzim çözeltileri kullanılarak yüksek basınç reaktör sisteminde CRL aktivitesine scCO₂’nin sıcaklık ve basınç gibi termodinamik değişkenlerinin etkisi incelenmiştir. Süperkritik CO₂’nin belirtilen termodinamik değişkenlerin tampon sisteminde çözünmüş serbest formundaki enzim aktivitesine etkisi; 31-50 °C sıcaklık ve 73.8-300 bar basınç aralığında sistematik bir biçimde araştırılmıştır. Deneyler 100 mL hacime sahip safır cam pencerele ve mekanik karıştırmalı yüksek basınç reaktör sisteminde V_{SCCO₂}/V_{CRL} oranı 20/1 olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve 15 min süre ile enzim çözeltisi statik basınç altında tutulmuştur. Bu süreç sonunda ortam basıncının atmosferik koşullara indirgenmesi işleminde ani basınç düşmesinden kaçınılmış ve bu süreç 30-45 min arasında gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.1’de yukarıda belirtilen işlemler sonunda, scCO₂ termodinamik değişkenlerinin atmosferik koşullara indirgenmiş enzim çözeltisinin katalitik aktivitesine etkisi gösterilmiştir.

Süperkritik CO₂’nin kritik sıcaklık değeri (31.1 °C) yakınında gerçekleştirilen ön işlemlerde enzim aktivitesinin basınçla değişimi kritik basınç değerinin (73.8 bar) üzerindeki koşullarda ortam basıncının artması ile önce artmakta ve 200 bar koşullarında bir maksimum aktiviteye (23.80 U) ulaşıldıktan sonra azalmaktadır. Ortam sıcaklığının 40 °C olduğu koşulda basıncın artması ile enzim aktivitelerinde 100,150 ve 200 bar basınç değerlerinde fazla bir değişim olmamış; en yüksek aktivite 300 bar basınç değeri için 20.16 U olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu değer 73.8 bar basınç değerindeki CRL aktivitesinin yaklaşık 1.29 katıdır. Ortam sıcaklığının 50 °C olduğu koşulda ise basıncın artması ile aktivite değerleri yine salınım göstermiş 200 bar değerinde maksimum aktivite (21.28 U) değeri elde edilmiştir.

scCO₂’de işlem gören CRL enziminin aktivite değerleri incelendiğinde, 31 °C sıcaklığında 73.8, 150 ve 200 bar basınç değerlerinde, diğer iki sıcaklık değerlerine göre CRL aktivitelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. CO₂’nin kritik konlarına yakın değerlerdeki CRL aktivitesi 17.57 U olarak belirlenmiştir. 31 °C ve 200 bar değerlerinde elde edilen aktivite 23.80 U yani 73.8 bar’daki değerin 1.35 katıdır. 31 °C

ve 200 bar koşullarında daha yüksek aktivite elde edilmesine rağmen kullanılan sistemin teknik özellikleri, yüksek basınç reaktörde scCO_2 'in ani basınçlandırma ve genişletme süreçleri ve dolayısıyla işletme maliyetleri de göz önüne alındığında yüksek lisans tez projesi kapsamında CRL enzimlerinin CLEA formundaki biyokatalizör sistemlerinin hazırlanmasında scCO_2 ile ön işlem koşulları 31 °C sıcaklık ve 100 bar basınç ve 15 min işlem süresi olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1 scCO_2 ile ön işlem görmüş serbest formadaki CRL enzimlerinin aktivitesine termodinamik değişkenler sıcaklık ve basıncın etkisi

Araştırma projesi kapsamında serbest formdaki CRL enzimlerinin belirtilen sıcaklık ve basınç aralığında scCO_2 ile ön işlem gördükten sonra atmosferik koşullara indirgenmesi işlemini takiben hidrodinamik boyutundaki değişimler Zetasizer cihazında belirlenerek Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4.1 Saflaştırılmış CRL enzimlerinin hidrodinamik boyutunun scCO₂ ortamında farklı sıcaklık ve basınç değerleriyle değişimi

Sıcaklık (°C)	Basınç (bar)	Hidrodinamik boyut (nm)
31	73.8	287
31	100	135
31	150	199
31	200	84
31	300	95
40	73.8	73
40	100	149
40	150	154
40	200	199
40	300	205
50	73.8	77
50	100	87
50	150	192
50	200	219
50	300	168

scCO₂ ortamında işlem görmemiş CRL enziminin hidrodinamik boyutu 291 nm olarak belirlenmiştir. 31 °C sabit sıcaklıkta CRL hidrodinamik boyutunun basıncın artması ile salınım gösterdiği ancak genelde azaldığı söylenebilir. 40 ve 50 °C sıcaklıklarda basıncın artması ile CRL hidrodinamik boyutunun genelde arttığı gözlenmiştir. scCO₂ ortamında işlem gören enzimlerin hidrodinamik boyutunun, scCO₂ ortamında işlem görmemiş CRL enzimine kıyasla daha küçük olduğu belirlenmiştir.

Yüksek basınç proteinleri denatüre etme eğilimindedir ve denatüre olmuş durumdaki protein-çözücü sistemi doğal durumdaki hacmine göre daha küçük hacim kaplar. Aynı zamanda basınç oligomerik proteinlerin çözünmesine sebep olur ve böylece sistemin net hacmi azalır. Bu etkiler birçok faktörün kombinasyonundan kaynaklanır. Katlanmış protein yapısı içinde veya oligomer arayüzeyinde kaviteelerin varlığı protein çözünmesini ve katlanmış yapının açılmasını sağlar. Protein üzerine basınç uygulanması kısmen ya da tamamen dengedeki protein yapısını katlanmış

protein yapısının değiştiği konformasyonlara kaydırabilir. Doğal protein yapısının kısmen veya tamamen bozulmasına bağlı olarak protein hacmindeki azalma polar olmayan amino asit kalıntılarının açığa çıkması, açığa çıkan yüklerin elektriksel büzülmesi ve serbest hacmin azalması ile açıklanabilir [97-98].

Basınç sadece protein-c sisteminin hacmini etkilerken, sıcaklık hem hacmi hem de ısıl enerji değişimlerini etkiler. Birçok protein için basınç denatürasyonunun tersinir olduğu, sıcaklık denatürasyonunun sıcaklıkla birlikte hidrofobik etkileşimlerin artmasından dolayı tersinmez agregasyon ile sonuçlandığı belirlenmiştir [99]. Dolayısı ile 31 °C sıcaklıkta basıncın artması ile CRL hidrodinamik boyutunun azalması protein hacminin azalmasına yani basınç denatürasyonuna bağlı olarak yorumlanabilir. 40 ve 50°C sıcaklıklarda ise basınçla birlikte genelde hidrodinamik boyutun artması dolayısı ile enzim agregatların oluşumu sıcaklık denatürasyonu varlığına bağlı olarak yorumlanabilir.

4.2 Süperkritik CO₂ Ortamında Termodinamik Değişkenlerin *Candida rugosa* Lipaz Enziminin Konformasyonel Yapısına Etkileri

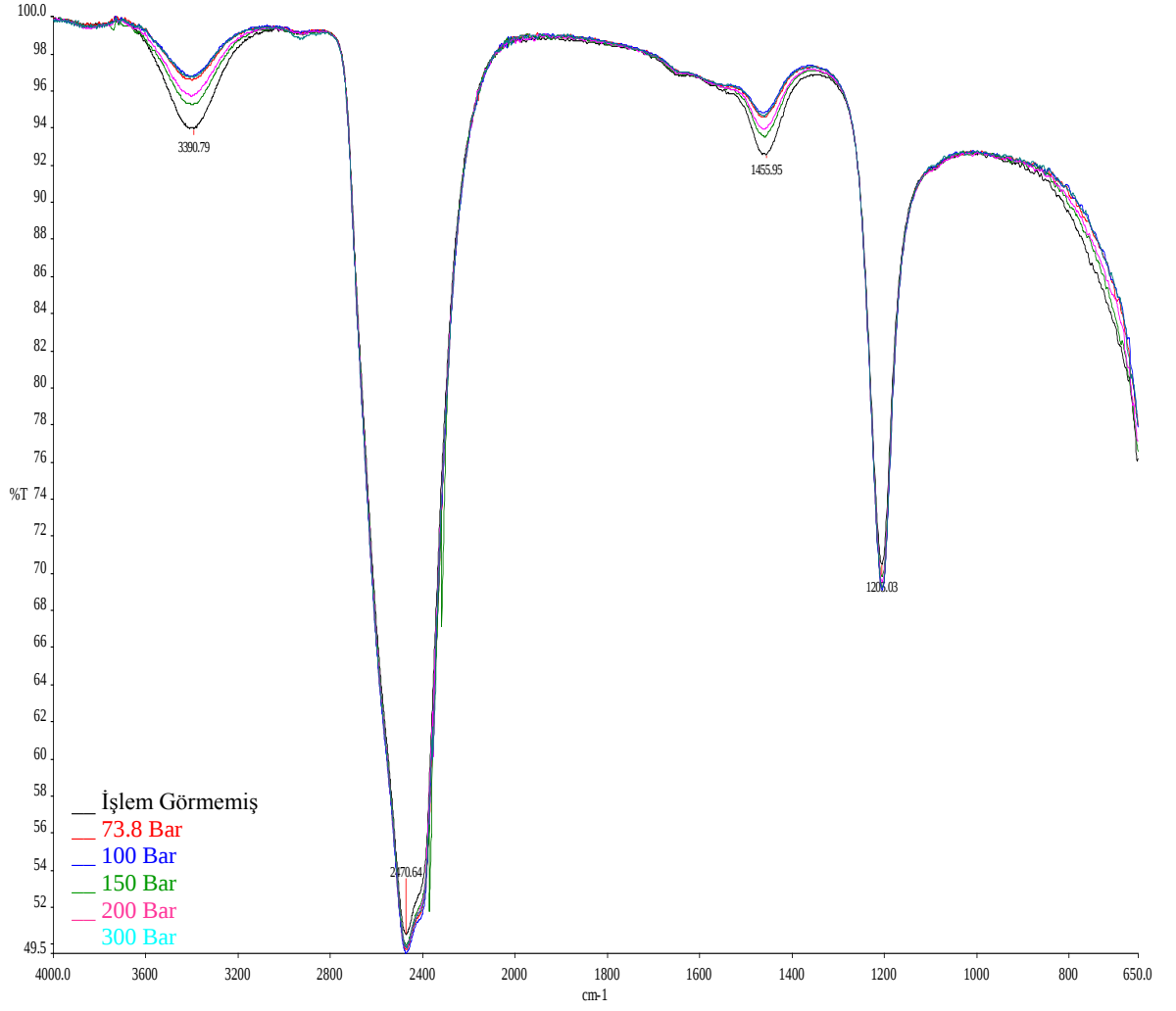
CRL enzimlerinin konformasyonel yapısındaki değişimler belirlenmesi için FTIR-ATR spektrofotometresi kullanılmıştır. FTIR spektrofotometresi ile amid bölgesindeki değişimlerden proteinin ikincil yapısındaki farklılıklar saptanabilmektedir.

scCO₂ ile işlem sonrasında CRL'nın ikincil yapısında meydana gelebilecek değişimler, CRL'nin üretimden gelen safsızlıkların giderildiği saflaştırılmış sıvı formu için incelenmiştir. Sıvı formun FTIR-ATR ile incelenmesinde örnekler içine D₂O eklenmiştir.

4.2.1 Saflaştırılmış CRL Enziminin Konformasyonel Yapısındaki Değişimler

Saflaştırma işlemi gerçekleşmiş olan sıvı formdaki 20L hacmindeki CRL enzimlerine scCO₂ ortamında 15 min süre ile 31, 40 ve 50 °C sıcaklık ve 73.8,100, 200 ve 300 bar basınç değerlerinde ön işlemler uygulanmış ve 0.5 mL D₂O eklenerek FTIR-ATR spektrumları alınmıştır.

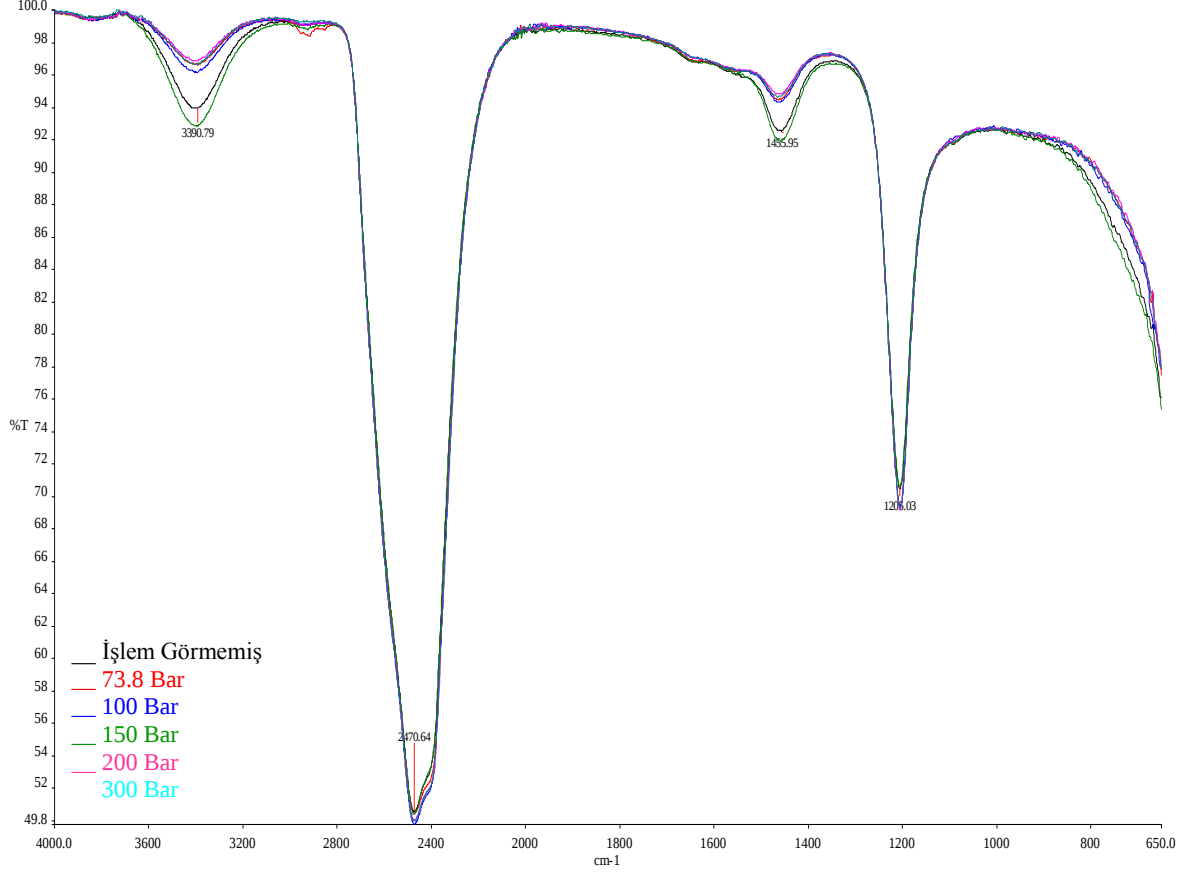
şekil 4.2'de 31 °C sıcaklığında farklı basınç değerlerinde scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve scCO₂ ortamında ön işlem görmemiş sıvı formdaki CRL enzimlerinin FTIR-ATR spektrumları verilmiştir.



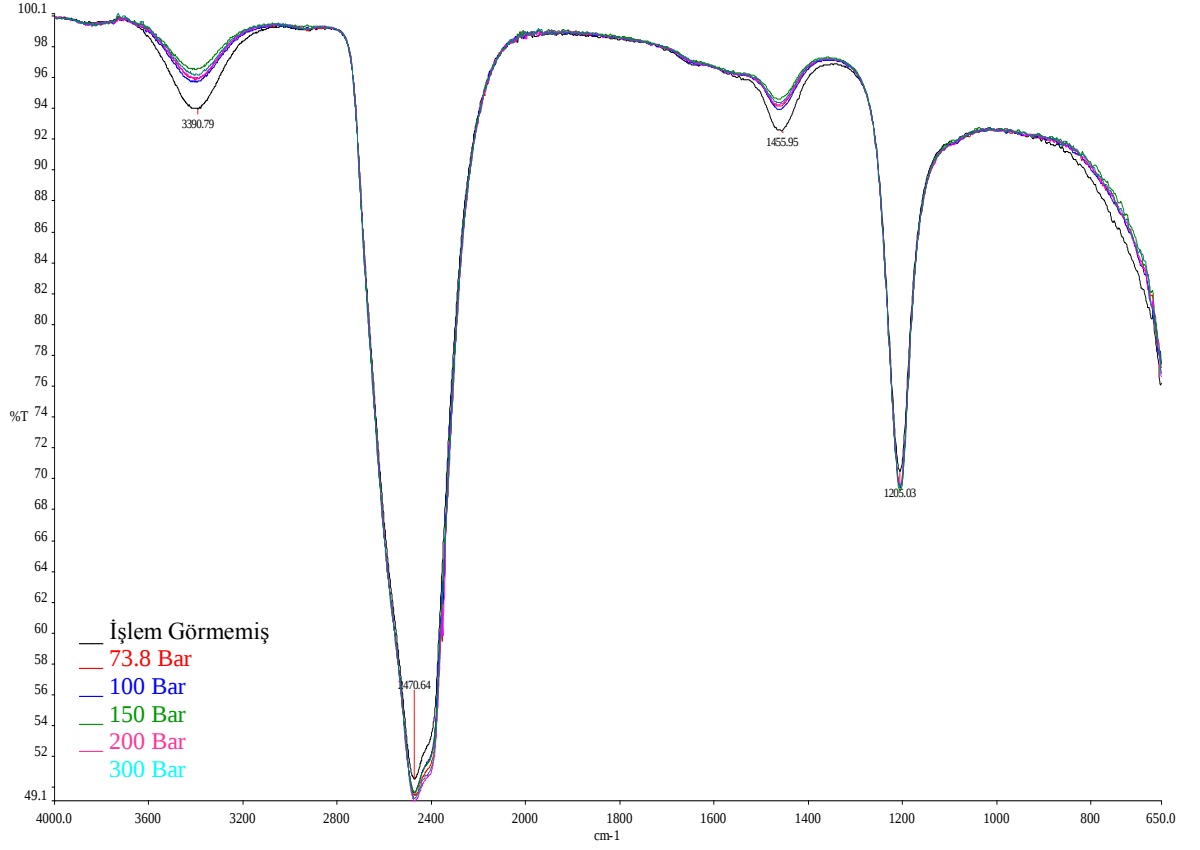
Şekil 4.2 scCO_2 ortamında farklı basınç değerlerinde ön işlem uygulanan saflaştırılmış CRL enzimlerinin, scCO_2 ortamında ön işlem görmeyen CRL enzimi ile karşılaştırmalı spektrumları: $T=31\text{ }^{\circ}\text{C}$

Çalışılan tüm koşullar için gözlenen 3390.79 cm^{-1} dalga sayısındaki pikler protein yapısındaki N-H gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. Ayrıca 1455.95 cm^{-1} dalga sayısında tüm koşullarda protein yapısına ait C-N gerilme titreşimi ve N-H gerilme titreşiminden kaynaklanan amid II bandları gözlenmiştir. Normalde amid II bandları $1480\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısında yer almaktadır. Amid II bandlarının frekansının daha düşük bir değere kaymasının sebebi amid bağlarındaki hidrojen-döteryum değişiminin gerçekleşmesidir [95]. Çalışılan tüm koşullarda amid II bandının şiddetinde, scCO_2 ile işlem görmemiş CRL enzime kıyasla azalma olması enzimin konformasyonel yapısının scCO_2 ile işlem görmesiyle değiştiğini göstermektedir.

Benzer sonuçlar scCO_2 ortamında 40 °C ve 50 °C sıcaklıklarında 73.8, 100, 200 ve 300 bar basınç değerlerinde ön işlem görmüş CRL enzimleri için de elde edilmiş ve FTIR-ATR spektrumları scCO_2 ortamında ön işlem görmemiş CRL enzimleri ile kıyaslamalı olarak sırası ile Şekil 4.3 ve 4.4’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3 scCO_2 ortamında farklı basınç değerlerinde ön işlem uygulanan saflaştırılmış CRL enzimlerinin, scCO_2 ortamında ön işlem görmeyen CRL enzimi ile karşılaştırmalı spektrumları: T=40 °C



Şekil 4.4 scCO₂ ortamında farklı basınç değerlerinde ön işlem uygulanan saflaştırılmış CRL enzimlerinin, scCO₂ ortamında ön işlem görmeyen CRL enzimi ile karşılaştırmalı spektrumları: T=50 °C

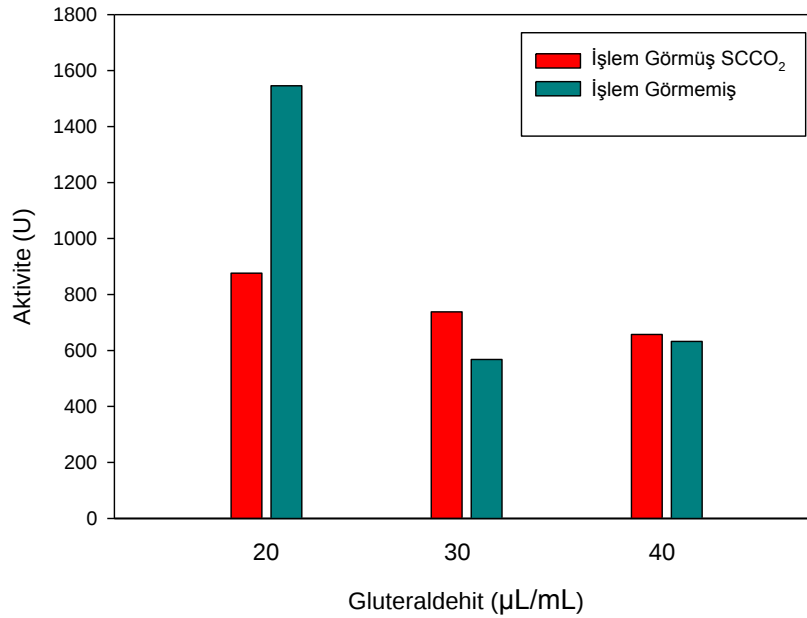
4.3 Çapraz Bağlı Enzim Agregatlarının Üretiminde Enzim Aktivitesine Etki Eden Parametrelerin İncelenmesi

4.3.1 Gluteraldehit ve Lizin Derişimi Etkisi

Taşıyıcısız enzim immobilizasyonu sürecinde CRL enzimlerinin kovalent olarak bağlanabilmesi için bifonksiyonel bir reaktif olan gluteraldehit (GA) kullanılmıştır. CLEA üretimi için 100 bar basınç ve 31 °C sıcaklık koşullarında scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve ön işlem görmemiş CRL enzimleri kullanılarak oluşturulan biyokatalizör sistemlerinin katalitik aktivitesine GA derişimi etkisi C_{GA} = 20, 30 ve 40 µL/mL derişim değerlerinde incelenmiştir. Ayrıca GA derişimi etkisi incelenirken aynı zamanda CLEA aktiviteleri üzerine proteik feeder ajan olarak kullanılan ve bir amino asit olan lizin derişimi etkisi de C_{Lizin} =1.67, 3.34, 5.01, 6.68 ve 8.35 mg/mL değerlerinde incelenmiştir.

CLEA üretiminde GA ve lizin derişimi etkisinin incelendiği deney setinde başlangıç enzim derişimi $C_{E0}=150$ mg/mL, presipitasyon ajanı $(NH_4)_2SO_4$ derişimi $C_{(NH_4)_2SO_4}=600$ mg/mL (pH=7.2, 0.1 M Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 tamponunda hazırlanmıştır) ve katkı maddesi olarak kullanılan yüzey aktif maddesi Triton X-100 derişimi $C_{TritonX-100}=6.66$ μ L/mL değerlerinde kullanılmıştır.

şekil 4.5’de başlangıç lizin derişiminin 1.67 mg/mL olduğu durumda CLEA formundaki enzim sistemlerinin geliştirilmesine yşnelik çalışmalarda scCO₂ ortamında řn işlem gşrmüş ve gşrmemiş CRL enzimlerin kullanıldığı süreçlerde CLEA’ların katalitik aktivitesine GA derişiminin etkisi gşsterilmiştir.

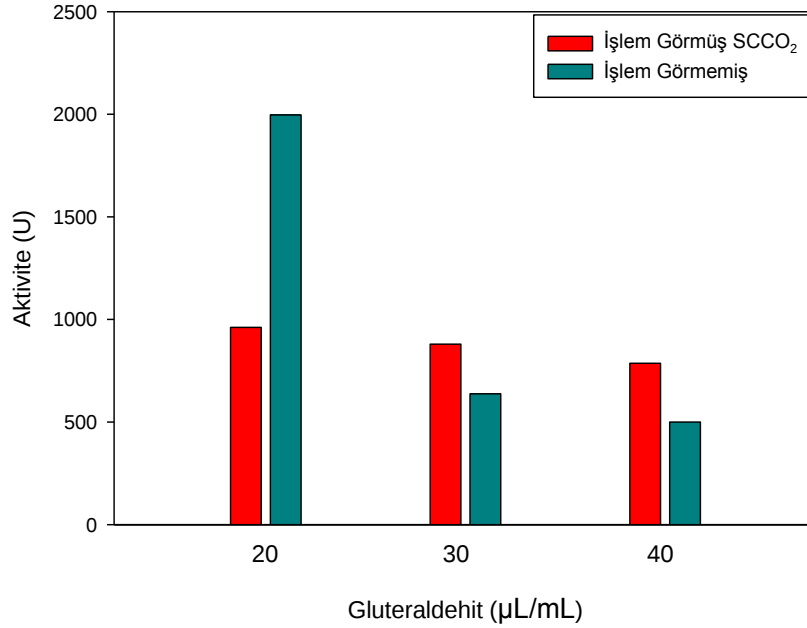


şekil 4.5 scCO₂ ortamında řn işlem gşrmüş ve gşrmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA’ların aktivitesine GA derişimi etkisi: $C_{Lizin}=1.67$ mg/mL

GA derişiminin artması ile hem scCO₂ ortamında řn işlem gşrmüş hem de işlem gşrmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA’ların aktivite değerlerinde genelde azalma gşzlenmiştir. Bifonksiyonel apraz bağlayıcı ajan olan GA derişiminin artması, CRL enziminin aktif konumlarının bağlama şiddetini arttırmış ve aşırı çapraz bağlanma oluşturulan CLEA’ların aktif konumlarını kapatarak katalitik aktivitelerinin azalmalarına neden olmuştur. $C_{GA}=20$ μ L/mL olduğu koşullarda řn işlem gşrmemiş enzimler ile oluşturulan CLEA aktivitesi 1545.67 U, scCO₂ ile řn işlem gşren CLEA

aktivitesi ise 876.34 U olarak tespit edilmiştir. $C_{GA}=30$ ve $40 \mu\text{L/mL}$ olduğu koşullarda ise scCO_2 ile ön işlem gören CLEA aktiviteleri daha yüksektir.

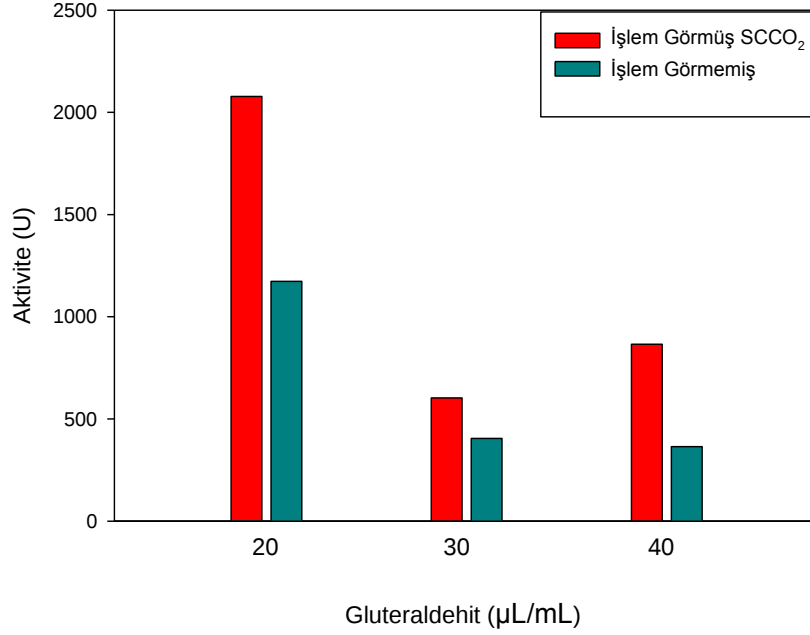
Lizin derişiminin $C_{Lizin}=3.34 \text{ mg/mL}$ olduğu koşulda scCO_2 ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri kullanılarak üretilen CLEA'ların aktivitesinin GA derişimi ile değişimi Şekil 4.6'de gösterilmiştir.



Şekil 4.6 scCO_2 ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine GA derişimi etkisi: $C_{Lizin}= 3.34 \text{ mg/mL}$

Lizin derişimin $C_{Lizin}=1.67 \text{ mg/mL}$ olduğu durumda elde edilen aktivitelerle kıyaslandığında $C_{Lizin}=3.34 \text{ mg/mL}$ değerine arttırıldığı durumda scCO_2 ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş enzimlerle hazırlanan CLEA'ların aktiviteleri artmıştır. GA derişiminin $20 \mu\text{L/mL}$ olduğu koşulda scCO_2 ile ön işlem görmemiş enzim aktivitesi, scCO_2 ile ön işlem görmüş enzim aktivitesine göre yaklaşık 2 kat artış göstererek en yüksek ön işlem görmemiş katalitik enzim aktivitesine ulaşılmıştır. scCO_2 ile ön işlem görmemiş CRL enzimlerinin, ön işlem görmüşlere göre aktivitelerinin artmasının sebebi; süperkritik koşullarda CO_2 'in enzimin hidrofilik ve hidrofobik kalıntılarını çözerek kolaylıkla hidrofobik katalitik konumuna ulaşması ve tüm yapıyı pertürbe etmesi olarak yorumlanabilir [100].

Şekil 4.7’de lizin derişiminin $C_{Lizin}=5.01$ mg/mL olduğu durumda ise -lizin derişimlerinin $C_{Lizin}=1.67$ ve 3.34 mg/mL olduğu durumda elde edilen sonuçlardan farklı olarak- $scCO_2$ ile işlem görmüş CLEA’ların, $scCO_2$ ile işlem görmemiş CLEA’ların aktivitelerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

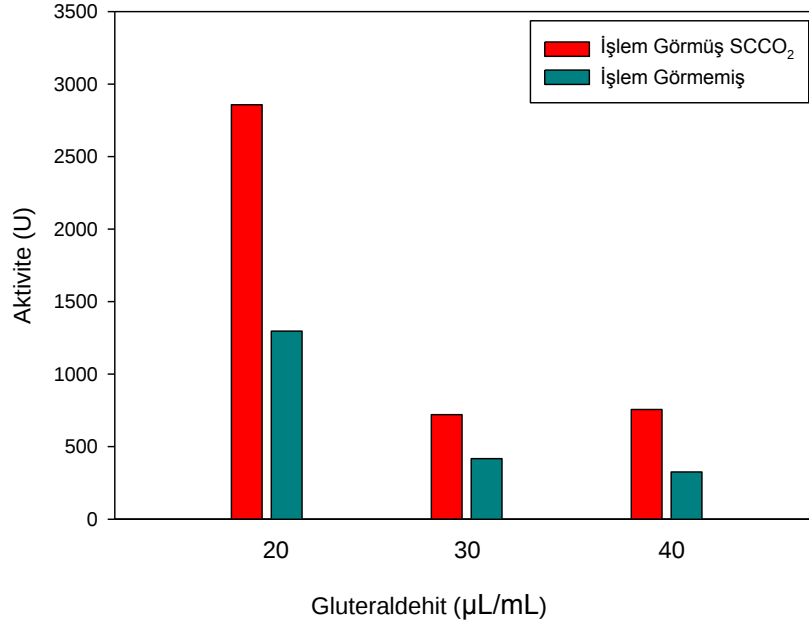


Şekil 4.7 $scCO_2$ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA’ların aktivitesine GA derişimi etkisi: $C_{Lizin}= 5.01$ mg/mL

GA derişiminin artması ile $scCO_2$ ortamında işlem görmüş CRL enzimlerinden yola çıkılarak hazırlanan CLEA aktivitelerinin önce azaldığı sonra ise arttığı, $scCO_2$ ortamında işlem görmemiş CRL ile hazırlanan CLEA aktivitelerinin ise azaldığı gözlenmiştir. En yüksek aktivite değerine GA derişiminin $20 \mu\text{L/mL}$ koşulda ulaşılmıştır ve bu koşuldaki $scCO_2$ ile ön işlem görmüş ve $scCO_2$ ile ön işlem görmemiş aktivite değerleri sırasıyla 2077.43 U ve 1173.03 CLEA olarak tespit edilmiştir.

Lizin derişiminin 6.68 mg/mL olduğu koşulda üretilen CLEA’ların katalitik aktivitesine GA derişiminin etkisi Şekil 4.8’de gösterilmiştir. $C_{Lizin}=6.68$ mg/mL değerinde iken $scCO_2$ ortamında işlem gören CRL enzimlerinden sentezlenen CLEA aktivitelerinin, $scCO_2$ ile ön işlem görmemiş CRL enzimlerinden sentezlenen CLEA aktivitelerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. $scCO_2$ ile ön işlem sonucunda hazırlanan CLEA aktivitesi GA derişiminin $30 \mu\text{L/mL}$ değerine arttırılması ile azalırken, $40 \mu\text{L/mL}$ GA derişiminde aktivitenin pek fazla değişmediği gözlenmiştir.

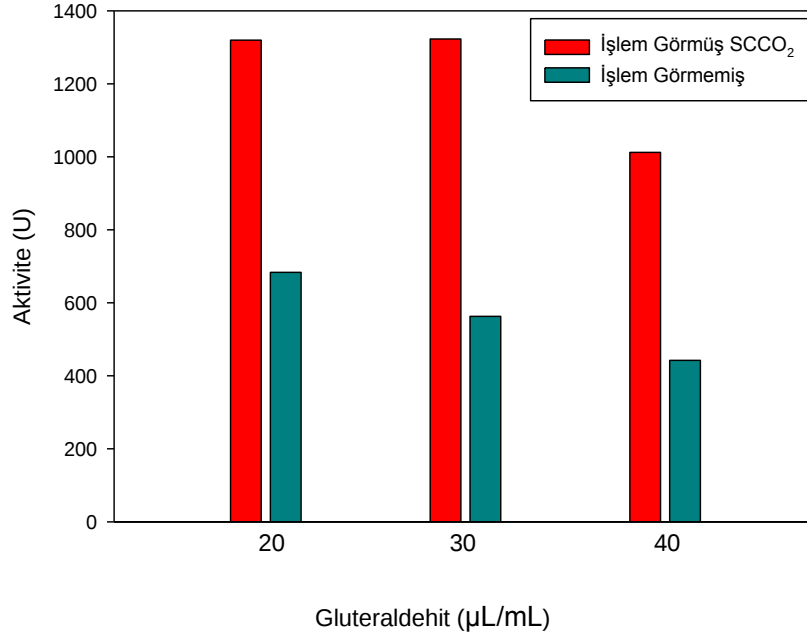
scCO₂ ile ön işlem görmeyen CRL enzimlerinden sentezlenen CLEA aktiviteleri GA derişiminin artmasıyla azalmıştır. scCO₂ ile ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların en yüksek aktivite değerleri C_{GA}=20 µL/mL koşullarında sırasıyla 2857.32 U ve 1296.16 U olarak saptanmıştır.



Şekil 4.8 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine GA derişimi etkisi: C_{Lizin}= 6.68 mg/mL

Şekil 4.9'da lizin derişiminin C_{Lizin}=8.35 mg/mL olduğu koşulda, scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimlerin kullanıldığı süreçlerde CLEA'ların katalitik aktivitesine GA derişiminin etkisi sunulmuştur. scCO₂ ile ön işlem görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA aktiviteleri GA derişiminin artması ile azalırken, scCO₂ ile ön işlem gören CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA aktivitesi GA derişiminin artması ile önce değişmemekte sonra azalmaktadır. Lizin derişiminin 8.35 mg/mL koşulda, scCO₂ ortamında ön işlem görmüş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların katalitik aktiviteleri, scCO₂ ortamında ön işlem görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların katalitik aktivitelerinden çalışılan tüm GA derişimlerinde yaklaşık 2 kat artış göstermiştir. scCO₂ ile ön işlem görmüş CRL enzimleri ile sentezlenen CLEA'ların katalitik aktivitelerinin en yüksek değeri GA derişiminin 20 ve 30 µL/mL olduğu değerlerde ortalama 1320 U olarak saptanmıştır. scCO₂ ile ön işlem

görmemiş CRL enzimleri ile sentezlenen CLEA'ların katalitik aktivitelerin en yüksek değeri $C_{GA}=20 \mu\text{L/mL}$ derişimde 683.35 U olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.9 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine GA derişimi etkisi: $C_{Lizin}= 8.35 \text{ mg/mL}$

Genelde, proteinler dış yüzeyleri üzerinde yer alan ve amin gruplarının polaritesi nedeniyle sulu ortamla temas halinde bulunan lizin kalıntıları içermektedir. Bir amino asit olan lizin kalıntıları genelde enzimin katalitik özelliğini sağlayan grup içinde yer almaz, ancak çapraz bağlanma yaparak protein konformasyonunu dolayısıyla katalitik aktivitesini korurlar. GA sulu çözelti içinde farklı formlarda –momomerik, polimerik ve siklik yapılar- bulunmaktadır ve bu formların hepsi proteinlerin lizin kalıntıları (ϵ -amino grup) ile tepkime verebilmektedir [101].

Lizin derişiminin artırılması ile GA, enzimin aktif konumlarındaki katalitik görev yapan amino asitler yerine lizin ile çapraz bağlanarak aktif konumlarda bulunan amino asitlerin çapraz bağlanmasını engellemiştir. Dolayısıyla lizin derişiminin artması CLEA aktivitesini arttırmıştır. Süperkritik koşullardaki CO₂'in enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerine olumlu ya da olumsuz etkileri olabilir. Bu etkiler enzimin türüne, çözeltideki su miktarına ve uygulanan basınç ve sıcaklık değişkenlerine bağlıdır [102]. Lizin derişiminin 1.67 ve 3.34 mg/mL ve GA derişiminin 20 $\mu\text{L/mL}$ olduğu durumlarda

scCO₂ ile işlem gören CRL ile hazırlanan CLEA aktiviteleri, işlem görmeyen CRL ile hazırlanan CLEA aktivitelerinden düşük çıkarken, diğer tüm çalışılan koşullarda CRL'nin scCO₂ ile işlem görmesiyle üretilen CLEA aktiviteleri yüksek çıkmış ve scCO₂ ile ön işlemin olumlu etkisi gözlenmiştir. Lizin derişiminin etkisinin incelendiği deney setinde CLEA aktivitesinin en yüksek olduğu koşullar 20 µL/mL GA derişimi ve 6.68 lizin derişimi olup aktivite değeri 2857.32 U olarak belirlenmiştir.

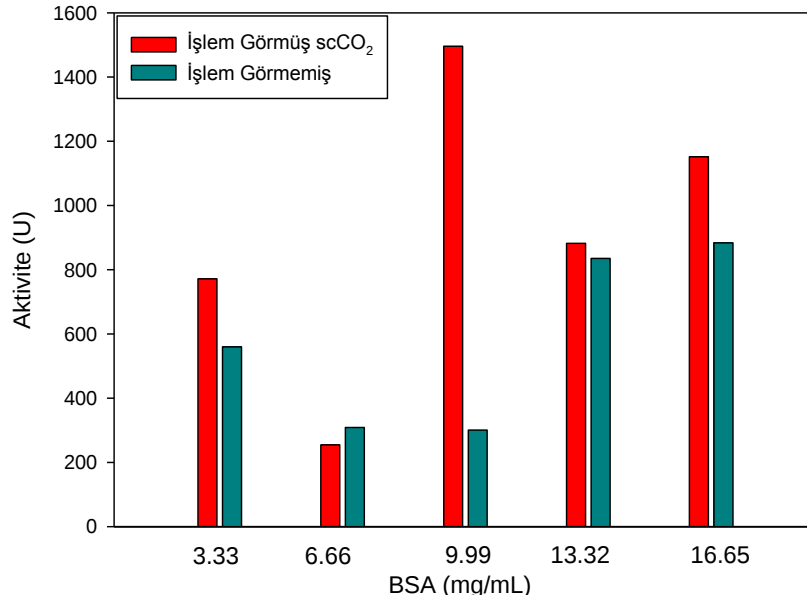
4.3.2 Katkı Maddesi Triton X-100 ve BSA Derişimi Etkisi

Noniyonik bir deterjan olan Triton X-100 hem polar hem de nonpolar gruplar içerir. Triton X-100 tuzlu ortamlara ve çözeltinin pH'ına karşı diğer yüzey aktif maddelere göre daha az duyarlıdır. İmmobilizasyon sürecinde Triton X-100, enzimin katalitik açıdan önem taşıyan aktif konumlarının korunması amacıyla kullanılmıştır.

Çapraz bağlı enzim agregatları biçiminde gerçekleştirilen taşıyıcısız enzim immobilizasyon süreçlerinde kullanılan enzimlerin yüksek saflıkta olma gereksinimlerinin olmaması bu prosesin önemli bir avantajıdır. Ticari olarak satılan birçok lipaz enzimi de üretim ortamından gelen safsızlıklar nedeniyle birim kütlelerinde düşük miktarda katalitik özellik gösteren proteine yani lipaz enzime sahiptir. Bu nedenle ortama fazladan katalitik özellik göstermeyen proteik feeder ajan olarak BSA gibi proteinlerin katılması, CLEA biçiminde hazırlanan biyokatalizör sistemlerinin katalitik performanslarına önemli katkılar sağladığı bildirilmektedir [86].

scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine BSA derişiminin etkisi; Triton X-100'ün $C_{\text{TritonX-100}}=3.33-6.66$ µL/mL değerlerinde; presipitasyon ajanı (NH₄)₂SO₄'ın $C_{\text{(NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4}=600$ mg/mL değerinde, başlangıç enzim derişiminin $C_{E_0}=150$ mg/mL ve GA derişiminin $C_{GA}=40$ µL/mL olduğu değerlerde incelenmiştir. Bu koşullarda ise BSA derişiminin CLEA aktivitesine etkisi 3.33, 6.66, 9.99, 13.32 ve 16.65 mg/mL değerlerinde incelenmiştir. Tüm immobilizasyon işlemleri pH=7.2 ve 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tamponunda gerçekleştirilmiştir.

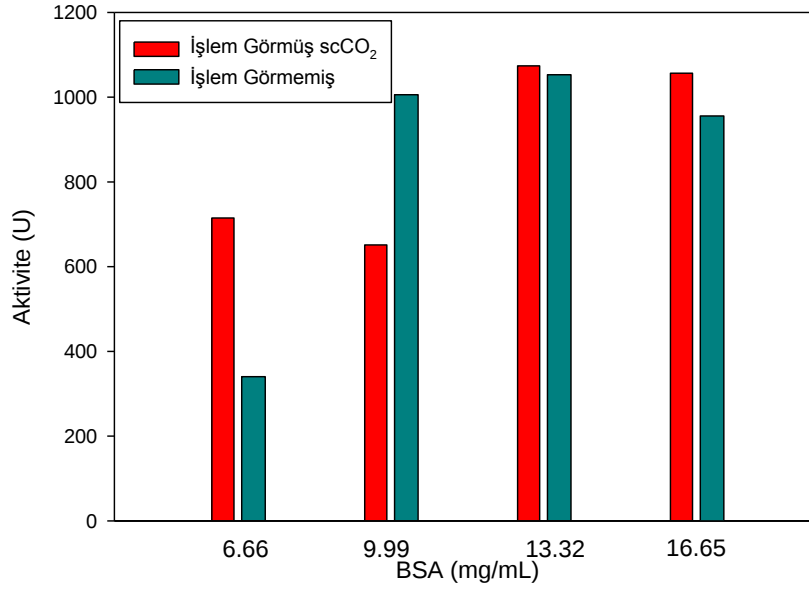
GA derişiminin 40 µL/mL ve yüzey aktif madde Triton X-100 derişiminin 3.33 µL/mL olduğu koşullarda scCO₂ ile ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri kullanılarak hazırlanan CLEA'ların aktivitesine BSA derişimi etkisi Şekil 4.10'de sunulmuştur.



Şekil 4.10 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine BSA derişimi etkisi: C_{Triton X-100}=3.33 µL/mL; C_{GA}=40 µL/mL

Proteik feeder ajan BSA derişiminin artması ile scCO₂ ortamında işlem görmüş ve görmemiş CRL ile oluşturulan CLEA aktiviteleri azalma ve artma şeklinde salınım gözlenmiştir. Genelde scCO₂ ortamında ön işlem gören CRL'den sentezlenen CLEA aktiviteleri daha yüksek değerler vermiştir. CLEA aktivitelerinde en yüksek değer 1495.9 U olup, scCO₂ ortamında ön işlem gören CRL'den sentezlenen ve BSA derişiminin 9.99 mg/mL olduğu koşulda elde edilmiştir. Belirlenen bu aktivite değeri, aynı koşullarda scCO₂ işlemi uygulanmamış CRL ile oluşturulan CLEA aktivitesinin yaklaşık 5 katıdır. İşlem görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'ların en yüksek aktivitesi ise BSA'nın C_{BSA}=16.65 mg/mL varlığında 883.60 U olarak belirlenmiştir. scCO₂ ortamında GA derişiminin 40 µL/mL ve yüzey aktif madde Triton X-100 derişiminin 6.66 µL/mL olduğu koşullarda scCO₂ ile ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri kullanılarak hazırlanan CLEA'ların aktivitesine BSA derişimi etkisi Şekil 4.11'de sunulmuştur. Genelde, yüzey aktif madde Triton X-100 derişiminin 2 katına çıkarılması ile scCO₂ ortamda ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri kullanılarak hazırlanan CLEA'ların aktivitesinde artış- BSA'nın 9.99 mg/mL derişim değerinde scCO₂ ile ön işlem görmüş CRL hariç- gözlenmiştir. BSA'nın C_{BSA}=9.99 mg/mL derişim değerinde C_{TritonX-100}=3.33 µL/mL olduğu koşullarda scCO₂ ortamında ön işlem görmüş CRL ile oluşturulan CLEA'ların enzim aktivitesi 1495.90 U iken,

$C_{\text{TritonX-100}}=6.66 \mu\text{L/mL}$ derişiminde CLEA aktivitesi azalarak 651.30 U değerine düşmüştür. scCO_2 ile ön işlem görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'lar da ise bu durum tam tersidir; $C_{\text{Triton X-100}}=3.33 \mu\text{L/mL}$ olduğu koşulda CLEA aktivitesi 300.40 U iken, $C_{\text{TritonX-100}}=6.66 \mu\text{L/mL}$ olduğu koşulda önemli bir artış göstererek 1005.80 U değerine yükselmiştir.



Şekil 4.11 scCO_2 ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine BSA derişimi etkisi: $C_{\text{Triton X-100}}=6.66 \mu\text{L/mL}$; $C_{\text{GA}}=40 \mu\text{L/mL}$

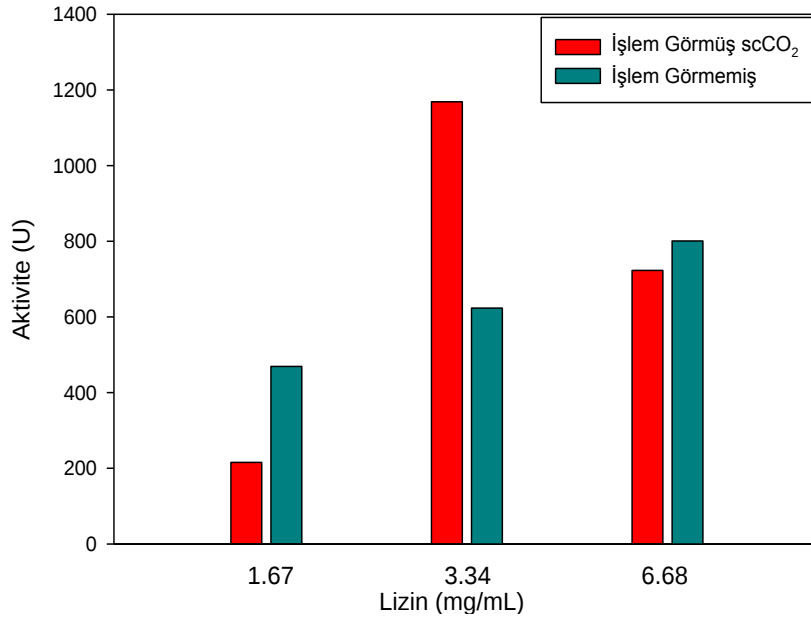
Yüzey aktif madde Triton X-100, lipazın konformasyonel yapısındaki değişimlere sebep olmaktadır. Triton X-100 enzim yapısı içinde gömülü olarak bulunan hidrofobik grupları açığa çıkararak konformasyonel değişimi sağlar. Böylece substratın enzimin aktif konumlarına ulaşımı kolaylaştırılmış olur. Triton 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. Triton X-100'ün bu karakteristik özellikleri lipaz enzimlerinin aktivasyonu için önemlidir [103]. Dolayısı ile scCO_2 ile işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesinde genelde Triton X-100 derişiminin artması ile artış meydana gelmesi Triton X-100'ün hidrofobik grupları açığa çıkararak yapısal değişim yaratma özelliğinden kaynaklanmaktadır. Süperkritik CO_2 ortamında da enzimler yapısal değişimlere uğramakta enzimlerin katlanmış doğal yapısı açılarak, hidrofilik ve hidrofobik amino asit kalıntıları ortaya çıkmaktadır. Triton X-100

ve scCO_2 'de her ikisi de farklı mekanizmalarla enzimin konformasyonel yapısı üzerine etki etmektedir.

4.3.3 Katkı Maddesi Triton X-100 ve Lizin Derişimi Etkisi

Bölüm 4.3.1'de proteik feeder lizin derişiminin ($C_{\text{Lizin}}=1.67, 3.34, 5.01, 6.68$ ve 8.35 mg/mL) etkisi sabit Triton X-100 derişiminde ($C_{\text{TritonX-100}}=6.66$ $\mu\text{L/mL}$) farklı GA ($C_{\text{GA}}=20, 30$ ve 40 $\mu\text{L/mL}$) derişimleri için incelenmiştir. Bu bölümde ise lizin etkisi Triton X-100'ün derişiminin 3.33 $\mu\text{L/mL}$ olduğu durumda farklı GA derişimleri ($C_{\text{GA}}=20, 30$ ve 40 $\mu\text{L/mL}$) için incelenerek elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.1'de elde edilen sonuçlarla karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Bu bölümde ise lizin etkisi Triton X-100'ün derişiminin 3.33 $\mu\text{L/mL}$ olduğu durumda farklı GA derişimleri ($C_{\text{GA}}=20, 30$ ve 40 $\mu\text{L/mL}$) için incelenerek elde edilen sonuçlar Bölüm 4.3.1'de elde edilen sonuçlarla karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Bu deney setinde başlangıç enzim derişimi $C_{\text{E}_0}=150$ mg/mL, presipitasyon ajanı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişimi $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=600$ mg/mL ($\text{pH}=7.2, 0.1$ M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ tamponu) olarak hazırlanmıştır.

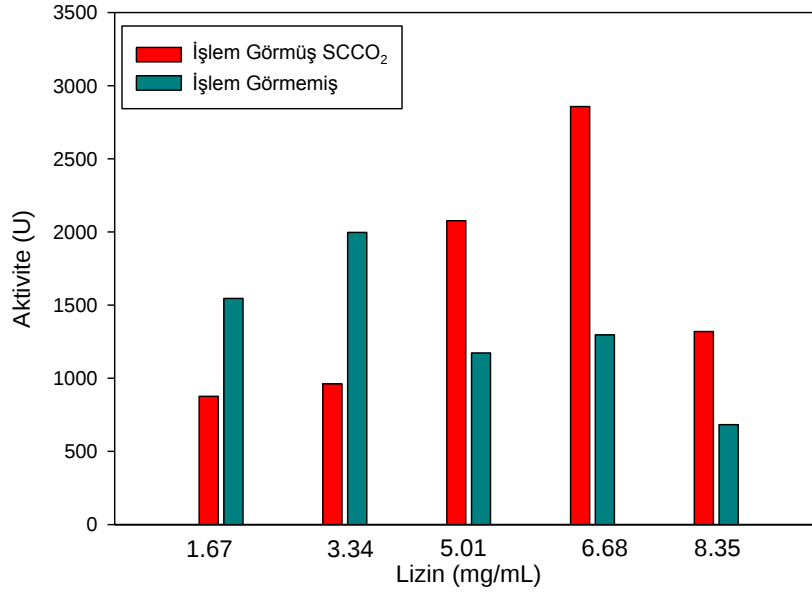
$C_{\text{GA}}=20$ $\mu\text{L/mL}$ ve $C_{\text{Triton X-100}}=3.33$ $\mu\text{L/mL}$ olduğu koşullarda, CLEA formundaki enzim sistemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda scCO_2 ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimlerin kullanıldığı süreçlerde CLEA'ların katalitik aktivitesine proteik feeder ajan lizin derişiminin etkisi Şekil 4.12'da gösterilmiştir.



Şekil 4.12 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine lizin derişiminin etkisi: C_{Triton X-100}=3.33 µL/mL; C_{GA}=20 µL/mL

Bu koşullarda scCO₂ ile ön işlem görmüş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA aktiviteleri, lizin derişiminin artması artmakta ve sonra azalmaktadır. Ön işlem görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA aktiviteleri ise lizin derişiminin artması ile artmaktadır. CLEA aktivitelerinin en yüksek değeri scCO₂ ile ön işlem görmüş için C_{Lizin}=3.34 mg/mL derişiminde 1168.46 U, scCO₂ ile ön işlem görmemiş için C_{Lizin}=6.68 mg/mL derişiminde 800.95 U olarak tespit edilmiştir. C_{Lizin}=3.34 mg/mL olduğu koşulda scCO₂ ile ön işlem görmüş CLEA aktivitesi, scCO₂ ile ön işlem görmemişine kıyasla %100'lük bir artış göstererek bu koşullar için en iyi değer olarak saptanmıştır.

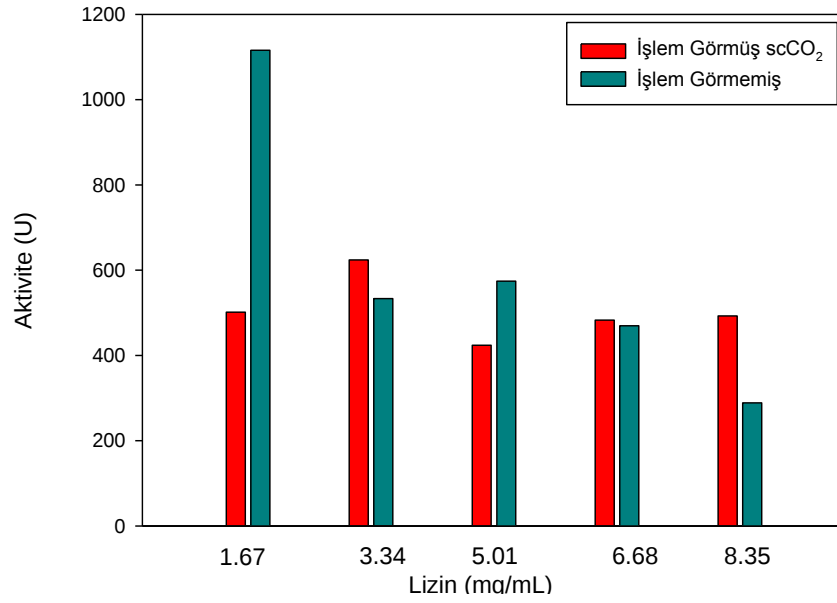
C_{GA}=20 µL/mL ve C_{Triton X-100}=6.66 µL/mL olduğu koşullarda, CLEA formundaki enzim sistemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimlerin kullanıldığı süreçlerde CLEA'ların katalitik aktivitesine proteik feeder ajan lizin etkisi Bölüm 4.3.1'de elde edilen sonuçlardan yararlanarak hazırlanmış ve Şekil 4.13'da sunulmuştur.



Şekil 4.13 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine lizin derişiminin etkisi: $C_{\text{Triton X-100}}=6.66 \mu\text{L/mL}$; $C_{\text{GA}}=20 \mu\text{L/mL}$

Triton X-100 derişiminin: $C_{\text{Triton X-100}}=6.66 \mu\text{L/mL}$ olduğu koşul için scCO₂ ile ön işlem gören CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA aktivitesi $C_{\text{Lizin}}=6.68 \text{ mg/mL}$ derişimin değerinde maksimum değerine ulaşmış ve 2857.32 U aktivite değeri elde edilmiştir. Ön işlem görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların katalitik aktiviteleri önce artan daha sonra azalan salınım hareketi göstermiş ve en yüksek katalitik enzim aktivitesi $C_{\text{Lizin}}=3.34 \text{ mg/mL}$ varlığında 1996 U olarak tespit edilmiştir.

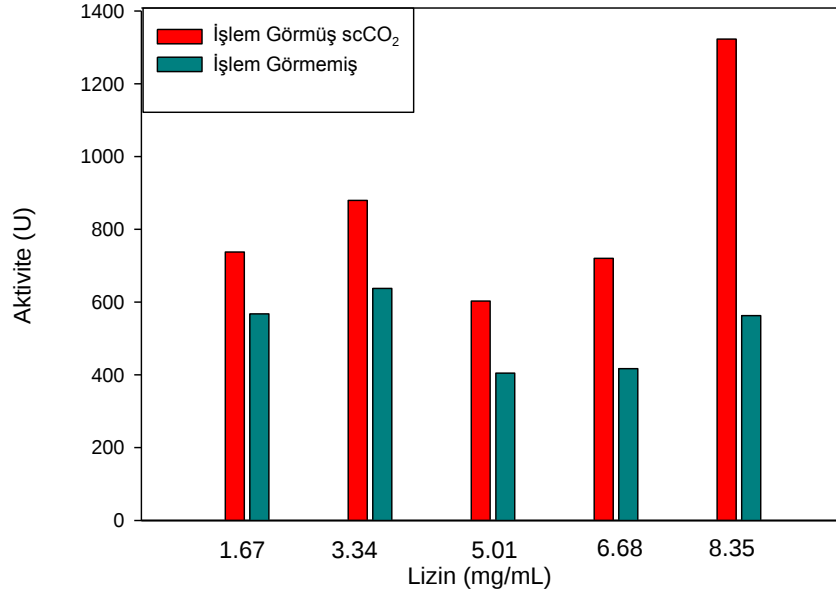
GA derişiminin $C_{\text{GA}}=30 \mu\text{L/mL}$ ve Triton X-100 derişiminin $C_{\text{Triton X-100}}=3.33 \mu\text{L/mL}$ olduğu koşullarda, CLEA üretiminde scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimlerin kullanıldığı süreçlerde CLEA'ların katalitik aktivitesine farklı derişimlerde lizin etkisi Şekil 4.14'de gösterilmiştir.



Şekil 4.14 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine lizin derişiminin etkisi: C_{Triton X-100}=3.33 µL/mL; C_{GA}=30 µl/mL

scCO₂ ortamında ön işlem görmüş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların en yüksek aktivite değerleri C_{GA}=30 µL/mL ve C_{Triton X-100}=3.33 µl/mL derişiminde lizin derişiminin 3.34 mg/mL olduğu koşullarda ulaşılmıştır ve katalitik aktivite değeri 623.90 U olarak saptanmıştır. scCO₂ ortamında ön işlem görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların en yüksek aktivite değeri ise lizin derişiminin 1.67 mg/mL olduğu koşulda 1115.88 U olarak saptanmıştır.

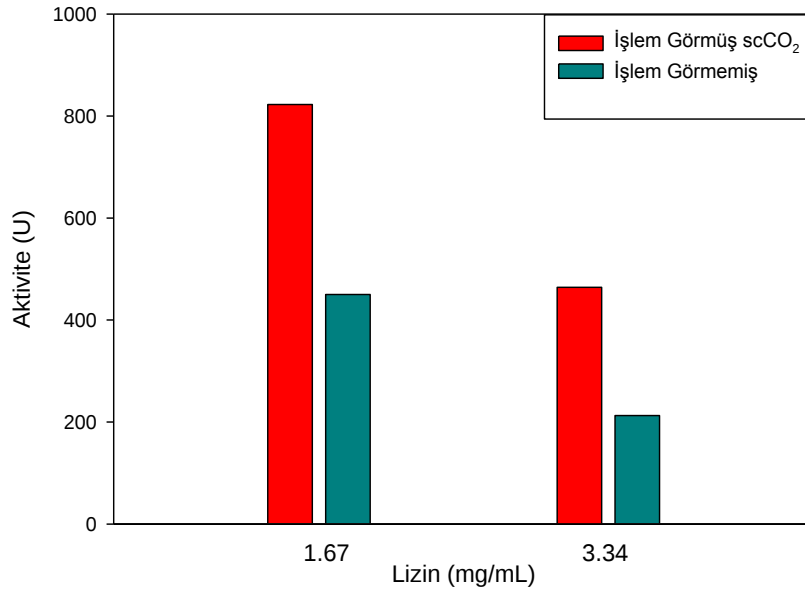
C_{GA}=30 µl/mL ve C_{Triton X-100}=6.66 µl/mL olduğu koşullarda, CLEA formundaki enzim sistemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimlerin kullanıldığı süreçlerde CLEA'ların katalitik aktivitesine proteik feeder ajan lizin etkisi Şekil 4.15'de gösterilmiştir.



Şekil 4.15 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine lizin derişiminin etkisi: C_{Triton X-100}=6.66 µL/mL; C_{GA}=30 µL/mL

scCO₂ ortamında ön işlem görmüş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların en yüksek aktivite değeri, lizin derişiminin 8.35 mg/mL olduğu koşulda 1322.81 U olarak saptanmıştır. scCO₂ ortamında ön işlem görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların en yüksek aktivite değeri ise lizin derişiminin 3.34 mg/mL olduğu koşulda 637.74 U olarak saptanmıştır. C_{GA}=30 µL/mL ve C_{Triton X-100}=6.66 µL/mL derişiminde farklı miktarlarda lizin kullanılarak sentezlenen ve scCO₂ ile ön işlem gören CLEA katalitik aktivitelerinin, scCO₂ ile ön işlem görmeden hazırlanan CLEA aktivite değerlerinden fazla olduğu tespit edilmiştir dolayısıyla süperkritik koşullarda CO₂ kullanımının CLEA aktivitelerine olumlu etkiler yaptığı saptanmıştır.

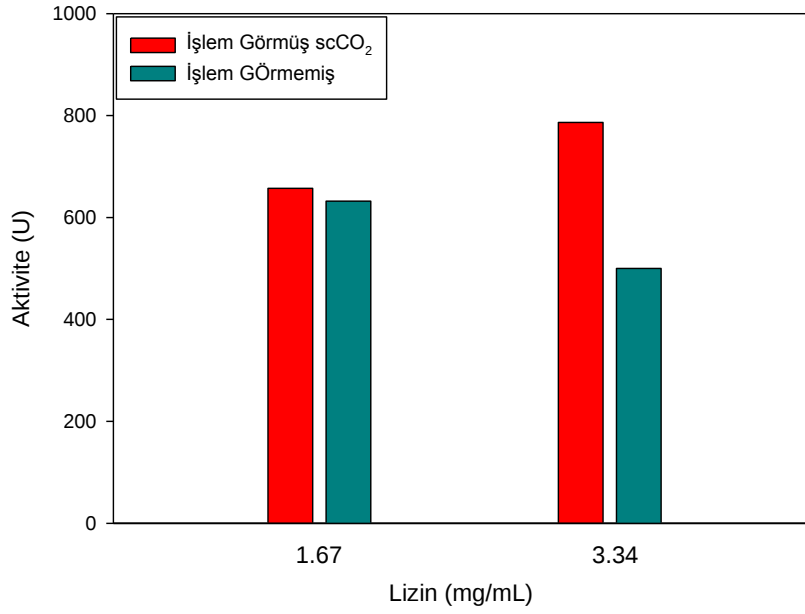
C_{GA}=40 µL/mL ve C_{TritonX-100}=3.33 µL/mL olduğu koşullarda, CLEA formundaki enzim sistemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimlerin kullanıldığı süreçlerde CLEA'ların katalitik aktivitesine proteik feeder ajan lizin etkisi sadece iki değer için incelenmiş ve sonuçları Şekil 4.16'da sunulmuştur.



Şekil 4.16 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine lizin derişiminin etkisi: C_{Triton X-100}=3.33 µL/mL; C_{GA}=40 µl/mL

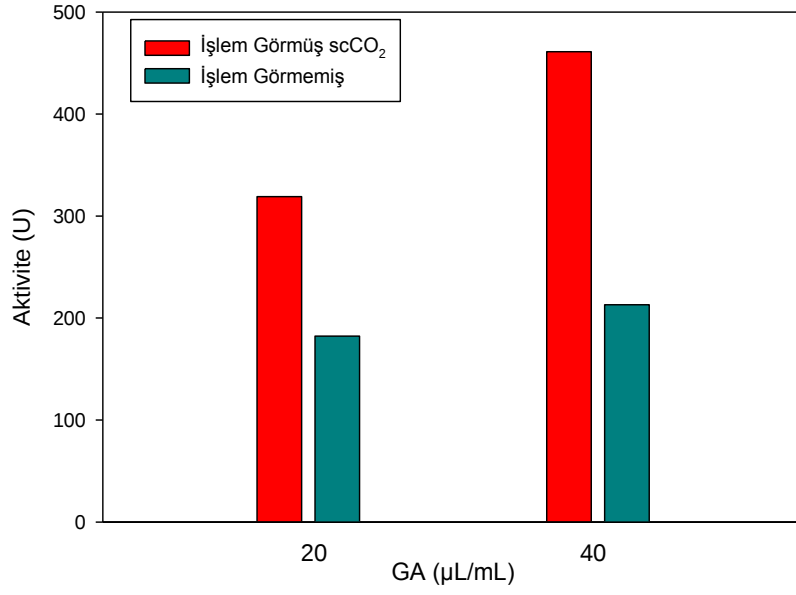
Lizin derişiminin artması ile hem scCO₂ ortamında ön işlem görmüş hem de görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA aktivitelerinde azalma gözlenmiştir. Lizin derişiminin 1.67 mg/mL olduğu koşulda scCO₂ ortamında ön işlem görmüş CRL ile hazırlanan CLEA aktivitesi 822.55 U, scCO₂ ortamında ön işlem görmüş CRL ile hazırlanan CLEA aktivitesi 450.11 U olarak belirlenmiş ve her iki lizin derişimi için scCO₂ ortamında ön işlem görmüş CRL ile hazırlanan CLEA aktivitelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

C_{GA}=40 µl/mL ve C_{TritonX-100}=6.66 µL/mL olduğu koşullarda, CLEA formundaki enzim sistemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimlerin kullanıldığı süreçlerde CLEA'ların katalitik aktivitesine lizin derişimi etkisi sonuçları Şekil 4.17'de sunulmuştur. Triton X-100 derişiminin artması ile 1.67 mg/mL lizin derişiminde hem scCO₂ ortamında ön işlem görmüş hem de görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA aktivitelerinde azalma gözlenmiştir. 3.34 mg/mL lizin derişiminde ise Triton X-100 derişiminin 3.33 µL/mL olduğu koşula göre artış saptanmıştır.



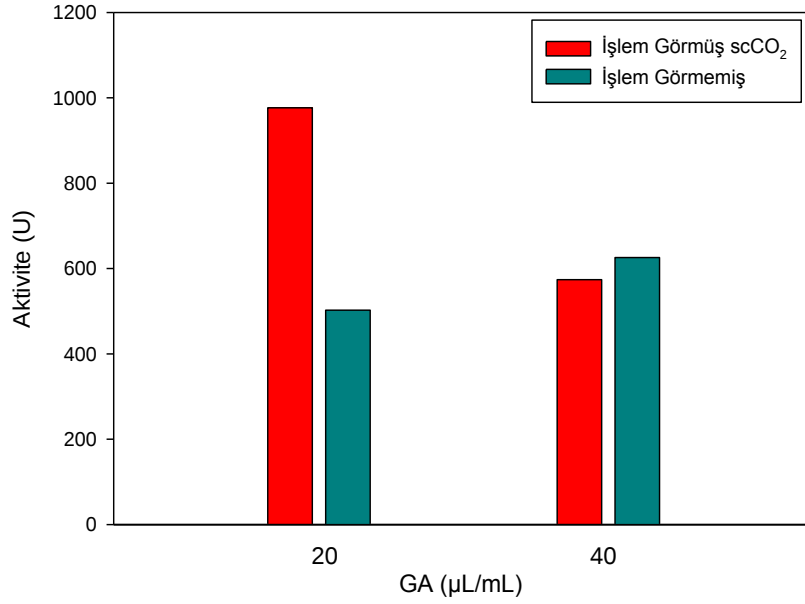
Şekil 4.17 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesine lizin derişiminin etkisi: C_{Triton X-100}=6.66 µL/mL; C_{GA}=40 µL/mL

Katkı maddesi Triton X-100 ve proteik feeder ajan lizin içermeyen ortamlarda scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesinin GA derişimi ile değişimi Şekil 4.18'de verilmiştir. Katkı maddesi ve proteik feeder ajan olmadan CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların katalitik enzim aktiviteleri C_{GA}=20-40 µL/mL için incelenmiştir. scCO₂ ile ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimlerinden sentezlenen CLEA aktiviteleri GA derişiminin artması ile artmaktadır. GA derişiminin 40 µL/mL olduğu koşullarda scCO₂ ile ön işlem görmüş CLEA'ların katalitik aktiviteleri C_{GA}=20 µL/mL olduğu koşullara göre %44.56'lık artış göstermiştir.



Şekil 4.18 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesinin GA derişimi ile değışimi: C_{E0}=150 mg/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu

CRL enzimleri saflaştırlarak hazırlanan CLEA'lara proteik feeder ajan olarak BSA ve lizinin birlikte etkisini incelemek amacıyla C_{Lizin}=1.67 mg/mL ve C_{BSA}=3.33 µL/mL derişim değeriinde eş anlı olarak ortamlara eklenmiştir. scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesinin GA ile değışimi Şekil 4.19'da sunulmuştur.



Şekil 4.19 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktivitesinin GA derişimi ile değişimi: C_{E0}=150 mg/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, C_{Triton X-100}=3.33 µL/mL, C_{BSA}=3.33 µL/mL C_{Lizin}=1.67 mg/mL ve pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu

C_{GA}=20 µL/mL için elde edilen katalitik aktivite değerleri ön işlem görmüş ve görmemiş CLEA'lar için sırasıyla 976.74 U ve 502.39 U olarak tespit edilmiştir. C_{GA}=40 µL/mL için elde edilen katalitik aktivite değerleri ön işlem görmüş ve görmemiş CLEA'lar için sırasıyla 554.03 U ve 625.85 U olarak tespit edilmiştir. Gluteraldehit derişiminin C_{GA}=20 µL/mL olduğu koşullarda proteik feeder ajan eklenmeden oluşturulan CLEA'ların katalitik aktivitelerine göre scCO₂ ile ön işlem görmüş CLEA aktivitelerinde %306.16, scCO₂ ile ön işlem görmemiş CLEA aktivitelerine ise %124.46 değerlerinde artış gözlenmiştir. C_{GA}=40 µL/mL olduğu koşullarda ise scCO₂ ile ön işlem görmüş CLEA aktivitelerinde %275.58, scCO₂ ile ön işlem görmemiş CLEA aktivitelerinde ise %293.86 değerinde artış belirlenmiştir. Bu değerler sonucunda proteik feeder ajan olarak kullanılan lizin ve BSA'nın CLEA aktivitesi üzerine etkisinin GA derişiminin 20 µL/mL olduğu durumlarda daha olumlu olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak bifonksiyonel bir reaktif olan GA'in yüksek derişimlerde aşırı çapraz bağlanma yaparak aktif konumları kapatması ve düşük aktive değerlerine sebep olmasıdır.

4.3.4 Yüksek Basınç Reaktör Sisteminde CLEA Üretimi

Önceki bölümlerde verilen sonuçlar; saflaştırılmış enzimlere süperkritik koşulların yüksek basınç reaktör sistemi içinde uygulandığı ancak CLEA üretim işleminin yüksek basınç reaktörü dışında gerçekleştirildiği deney sonuçlarına ait verilerdi. Bu bölümde ise CLEA üretim işlemi yüksek basınç reaktör sistemi içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Saflaştırma işlemi gerçekleştirilen CRL enzimleri yüksek basınç reaktör sistemi içerisine alınarak istenilen sıcaklık ve basınç koşulunda 30 min süre ile süperkritik koşullardaki CO₂ ile muamele edilmiştir. Bu sürenin sonunda sistem içerisindeki gaz boşaltılarak kapak açılmış ve içerisine (NH₄)₂SO₄ tuzu eklenerek sistem istenen koşullarda tekrar basınçlandırılmıştır. Reaktörün üst gövdesine monte edilmiş 4-bıçaklı 45° açılı eğik türbin tipi mekanik karıştırıcı ile 400 rpm karıştırma hızında 30 min karıştırma işlemi uygulanmış ve bu işlemi takiben sistemin basıncı boşaltılarak tekrar açılmış ve enzim agregatların oluşturulması için içerisine çapraz bağlayıcı ajan olan gluteraldehit eklenmiştir. Sistem belirtilen koşullarda tekrar basınçlandırılarak 30 min karıştırma işlemi uygulanmış, belirtilen sürenin sonunda karıştırma işlemi durdurularak CO₂ akışı kesilmiş ve istenen basınç değerinde yüksek basınç reaktör sistemi içinde CLEA üretimi gerçekleştirilmiştir.

Yukarıda açıklanan yöntemle ilgili olarak 2 adet deney yapılmıştır, deneylere ait koşullar Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Yüksek basınç reaktör sisteminde CLEA oluşumunda kullanılan parametre ve değerler

Parametre	Değer
Sıcaklık (°C)	31
Basınç (bar)	73.8-300
CRL (mg/mL)	3000
G.A. (µL/mL)	800
(NH ₄) ₂ SO ₄ (mg/mL)	12000
Karıştırma Süresi (min)	30
Bekleme Süresi (h)	20

Tüm parametreler aynı kalıp, sadece basınç koşulu değiştirilerek 2 farklı değer için 73.8 ve 300 bar olarak denenmiştir. 73.8 bar basınç değerinde oluşturulan CLEA’ların katalitik aktivite değeri 235.37 U olarak saptanırken, 300 bar basınç için

değerinde oluşturulan CLEA'ların katalitik aktivitesi 206.33 U CLEA olarak saptanmıştır. Yüksek basınç reaktör sisteminin iç hacmi 100 ml olup tüm immobilizasyon işlemleri reaktör içerisinde gerçekleştirilmiştir. Reaktör hacmine bağlı olarak içerisine konulan madde miktarları da arttırılmıştır. Oluşan büyük moleküllü CLEA reaktör çıkış hattında tıkanmalara neden olmuştur. Tıkanmalar özellikle 300 bar basınç koşulları için ciddi boyutlara ulaşmaktadır. Ayrıca CLEA üretim işleminin yüksek basınç reaktörü dışında gerçekleştirildiği durumda üretilen CLEA aktiviteleri, CLEA üretim işleminin yüksek basınç reaktöründe gerçekleştirildiği durumuna kıyasla daha yüksektir. Belirtilen nedenlerden dolayı bu yöntem kullanılarak CLEA üretiminin gerçekleştirilmesi uygun görülmemiştir

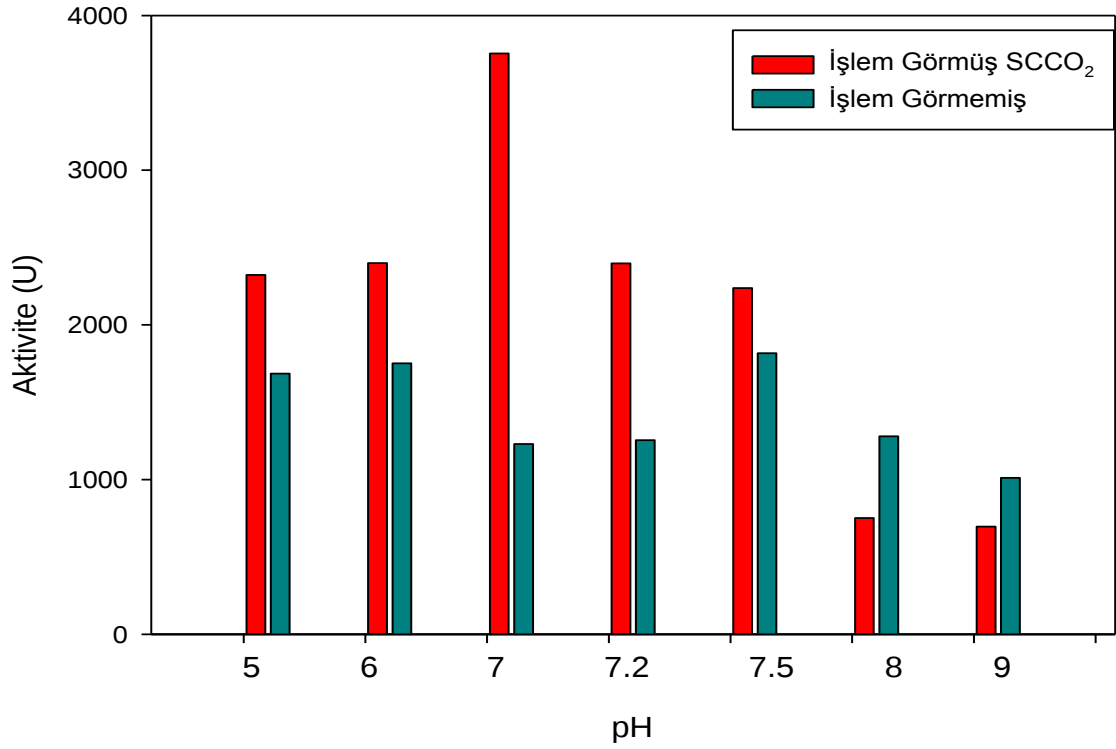
4.3.5 CLEA Aktivitesine $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ Tampon pH'nın Etkisi

$\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ tamponu CLEA üretiminde, CRL enzimlerinin saflaştırma basamağında kullanılmaktadır. scCO_2 ortamında ön işlem gören CRL enzimleri kullanılarak oluşturulan CLEA'lar için 0.1 M derişim ve pH=7.2 değerine sahip $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ tamponunda belirlenen en uygun koşullar Tablo 4.3'de verilmiştir..

Çizelge 4.3 CLEA üretimi için belirlenen en uygun koşullar

Parametre	Uygun Koşul
Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	31
Basınç (bar)	100
CRL (mg/mL)	150
G.A. ($\mu\text{L/mL}$)	20
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (mg/mL)	600
Lizin (mg/mL)	6.68
Triton X-100 ($\mu\text{L/mL}$)	6.66

Çizelge 4.3'de verilen koşullarda CLEA aktivitesine tampon pH'nın etkisi pH=5-9 aralığında 0.1 M tampon derişiminde incelenerek elde edilen sonuçlar Şekil 4.20'de sunulmuştur.



Şekil 4.20 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA aktivitelere tampon pH'ının etkisi

Saflaştırma basamağı belirtilen pH değerlerinde gerçekleştirilen CRL enzimleri ile hazırlanan ve scCO₂ ile ön işlem görmüş CLEA'ların katalitik aktiviteleri pH=7'ye kadar artan sonra ise azalan bir eğilim göstermiştir. pH=5, 6, 7.2 ve 7.5 değerlerinde CRL enzimleri kullanılarak hazırlanan scCO₂ ile ön işlem görmüş CLEA'ların katalitik aktiviteleri hemen hemen aynı aktivite değerine sahiptir. pH=8 ve 9 değerlerinde oluşturulan CLEA'ların katalitik aktivitelerinde önemli bir düşüş saptanmıştır. Bu pH değerlerine kadar scCO₂ ile ön işlem görerek oluşturulan CLEA'ların katalitik aktiviteleri scCO₂ ile ön işlem görmeden oluşturulan CLEA'ların katalitik aktivitelerinden daha yüksek çıkmıştır. scCO₂ ile ön işlem görerek oluşturulan CLEA'ların en yüksek katalitik aktivite değeri pH=7.0 değerinde 3754.72 U, scCO₂ ile ön işlem görmeden oluşturulan CLEA'ların en yüksek aktivite değeri pH=7.5 değerinde 1817 U olarak tespit edilmiştir.

GA ile çapraz bağlama işlemi asidik ortamlarda, nötral veya bazik ortamlara göre daha yavaş gerçekleşmektedir. Ticari olarak satılan GA çözeltileri asidik pH değerine sahiptir ve bu çözeltiler içinde GA monomer, oligomer, polimer ve bazı halkalı

yapı formlarında bulunabilmektedir. Bu formların her biri immobilizasyon sürecinde etkili olabilmektedir [104]. Dolayısıyla elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, asidik pH değerlerinde CLEA aktivitesinin düşük çıkmasının nedeni GA'nın çapraz bağlama reaksiyonunun yavaş olmasına, bazik pH değerlerinde CLEA aktivitesinin düşük çıkmasının nedeni GA'nın bazik koşullarda polimerize olarak farklı formlar oluşturmaya bağlanabilir.

5 SONUÇLAR

Çapraz bağlı enzim agregatları (cross-linked enzyme aggregates, CLEA), enzimatik üretim proseslerinde serbest ya da immobilize enzim kullanımındaki darboğazların çözümü için son yıllarda geliştirilen yeni bir immobilizasyon yöntemidir. CLEA'ları diğer taşıyıcısız enzim immobilizasyon yöntemlerine göre alternatif ve yeni ortaya çıkmış bir yöntem olmasına karşın; enzim agregatlarının boyutunun herhangi bir difüzyon kısıtlamasına gitmeden nasıl kontrol edilebileceği, enzim konformasyonunun nasıl daha esnek hale getirilebileceği ve enzim aktivitesi ve seçiciliğinin agregasyon koşullarının farklılaştırılması ile nasıl ayarlanabileceği gibi darboğazların aydınlatılması gerekmektedir. Enzimatik sentezlerde çözücü ortamlarına alternatif olarak $scCO_2$ 'in kullanılması enzimlerin bölgesel ve stereo seçimli özelliklerini artırılabilir. Sıcaklık ve basınç gibi biyoproses parametrelerindeki küçük değişimler süperkritik akışkanların fizikokimyasal özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir. Enzimlerin mikro çevresindeki bu değişimler biyokatalizörlerin katalitik aktivite ve yapısal kararlılığını da etkiler. "Süperkritik Akışkan Ortamında Lipazların Taşıyıcısız Enzim Immobilizasyonu" konulu yüksek lisans tez projesinin temel amacı, CLEA biçimindeki taşıyıcısız enzim immobilizasyon yönteminde karşılaşılan darboğazların çözümü için yeni bir teknoloji platformu oluşturmaktır. Ayrıca bu yöntem süreli yayım ve patent literatüründe hiç yer almamış olup araştırma orijinalliliği açısından bir ilki de oluşturmaktadır. Bu temel amaç doğrultusunda endüstriyel önemi yüksek olan ve *Candida rugosa* lipaz (CRL) enzimi model enzim olarak seçilmiştir. Enzimin sulu çözeltisitiksek basınç altında CO_2 ile basınçlandırılması sonucu protein yapısında morfolojik ve konformasyonel değişimler yaratarak katalitik performansı geliştirilmiş CLEA'ların tasarımı gerçekleştirilmiştir.

$scCO_2$ 'in sıcaklık ve basınç koşulları sırasıyla; 31-50 °C ve 7.38-300 bar aralığında incelenmiştir. Belirtilen ön işlem koşullarında gerçekleştirilen ön denemeler sonucu CLEA'ların katalitik performanslarını geliştirmek için en uygun ön işlem koşulları; 31 °C, 100 bar ve 15 min olarak belirlenmiştir. CRL enzimlerinin CLEA aktivitelerine;

- Enzim derişimi
- Gluteraldehit derişimi
- Amonyum sülfat derişimi
- Proteik feede ajan (BSA ve lizin) derişimi

- Yüzey aktif madde (Triton X-100) derişimi
- pH

gibi temel ortam bileşenlerini etkisi sistematik biçimde araştırılmıştır.

scCO₂ ile ön işlem görmüş ve görmemiş enzimlerden hazırlanan CLEA'ların katalitik aktivitelerine etki eden başlangıç enzim derişimi, bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajan derişimi ve presipitasyon ajan derişiminin etkisi incelendiğinde hem en yüksek katalitik aktivite değerine; C_{E0}=150 mg/mL, C_{GA}=40 µL/mL ve C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL olarak belirlenen koşullarda scCO₂ ile ön işlem görmüş CLEA'larında ulaşılmıştır. Belirtilen bu koşullarda scCO₂ ile ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA aktiviteleri sırasıyla 461 U CLEA ve 212 U CLEA'dır. Ön işlem görmemiş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA formundaki biyokatalizör sistemlerine göre enzimin scCO₂ ile ön işlem görmesi sonucu katalitik aktivite %117 oranında artış sağlanmıştır. Ancak 1076.4 U CLEA olarak saptanan ve ticari olarak kullanılan CRL enzimlerini CLEA formundaki katalitik aktivite değerine kıyasla bu çalışmada sentezlenen CLEA aktivitelerinin düşük kaldığı görülmektedir.

Sürelî yayın literatüründe CLEA formunda hazırlanan enzimlerin katalitik aktivitesi ve stabilitesini arttırmaya yönelik çalışmalara değişik proteik feeder ajan türü ile yüzey aktif madde etkisi incelenmiş ve bu bağlanmada önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu çalışmada da, CLEA aktiviteleri üzerine proteik feeder ajan bovin serum albümin (BSA) 3.33-16.65 mg/mL ve lizin 1.67-8.83 mg/mL derişim aralığında yüzey aktif madde triton X-100'ün ise 3.33-6.66 µL/mL derişim aralığında etkisi incelenmiştir.

CLEA aktivitesine yüzey aktif madde triton X-100 (C_{Triton X-100}) ve katkı maddesi BSA derişimi (C_{BSA}) etkisinde; C_{E0}=150 mg/mL, C_{GA}=40 µL/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, C_{Triton X-100}=3.33 µL/mL koşullarında CLEA hazırlama işlemi öncesi enzim çözeltisine C_{BSA}=9.99 mg/mL derişiminde eklenmesi sonucu scCO₂ ile ön işlem görmüş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA aktivitelerinde scCO₂ ile ön işlem görmeden CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA aktivitelerine göre önemli artışlar sağlanmıştır. Belirtilen koşullarda BSA katkısının olduğu durumda ulaşılan CLEA aktiviteleri scCO₂ ile ön işlem görmemiş biyokatalizör sistemleri için 883 U CLEA iken, enzimin scCO₂ ile ön işlem görmesi katalitik aktiviteyi 5 kat oranında arttırarak 1495 U CLEA değerine ulaştırmıştır. scCO₂ ile ön işlem görmüş CRL enzimlerinden sentezlenen CLEA aktivitelerinin ticari olarak üretilen CLEA aktivitesinde %69.30 daha yüksek olduğu

belirlenmiştir. $C_{E0}=150$ mg/mL, $C_{GA}=20$ µL/mL, $C_{(NH_4)_2SO_4}=600$ mg/mL, $C_{Triton X-100}=6.66$ µL/mL immobilizasyon işleminde enzim çözeltisine $C_{Lizin}=6.68$ mg/mL derişiminde lizin eklenmesi sonucu ulaşılan katalitik aktivitelerin ticari olarak üretilen CLEA aktivitelerinden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Belirtilen koşullarda lizin katkısının olduğu durumda ulaşılan CLEA aktiviteleri scCO₂ ile ön işlem görmemiş biyokatalizör sistemleri için 1996 U CLEA iken, enzimin scCO₂ ile ön işlem görmesi katalitik aktiviteyi %43.13 oranında artarak 2857 U CLEA değerine ulaştırmıştır. scCO₂ ile ön işlem görmüş CRL enzimlerinden sentezlenen CLEA aktivitelerinin ticari olarak üretilen CLEA aktivitesinde %65.52 daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

CRL enzimlerinin saflaştırma basamağında kullanılan Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tamponu yapılan tüm deneylerde en yüksek aktivitenin gerçekleştirildiği koşullar için pH 5-9 aralığında $C_{E0}=150$ mg/mL, $C_{GA}=20$ µL/mL, $C_{(NH_4)_2SO_4}=600$ mg/mL, $C_{Triton X-100}=6.66$ µL/mL ve $C_{Lizin}=6.68$ mg/mL gerçekleştirilmiş ve pH: 7’de scCO₂ ile ön işlem görmemiş CRL enzimlerinden sentezlenen CLEA aktiviteleri scCO₂ ile ön işlem görmemiş biyokatalizör sistemleri için 1817 U CLEA iken, enzimin scCO₂ ile ön işlem görmesi katalitik aktiviteyi 3 kat arttırarak 3754 U CLEA değerine ulaştırmıştır. Serbest enzim immobilizasyonunda CLEA formunda biyokatalizörlerin sentezinde *Candida rugosa* lipaz enziminin scCO₂ ortamında ön işlem görmesi sonucu biyokatalizörlerin katalitik performanslarında ticari enzime göre 3.5 kat artış sağlamaktadır.

2000’li yılların başlarından günümüze kadar biyokimyasal süreçlerde yer alan tepkimerde kullanımı hızla artan CLEA formundaki biyokatalizör sistemlerinin bu çalışmada arttırılmış katalitik performansı sonucu potansiyel önemi açısından endüstriyel proseslerde ürün verimliliği ve proses ekonomisi açısından önemli avantajlar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] (www.konceptanalytics.com)
- [2] Wiseman, A. (1987). Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry p. 274-373.
- [3] Balcao, V. M.; Malcata, FX. (1998). Interesterification and acidolysis of butterfat with oleic acid by *Mucor javanicus* lipase: changes in the pool of fatty acid residues. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, n. 6, p. 511-519,
- [4] Paiva AL, Bacao V, Malcata FX. (2000). Kinetic and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 27: 187–204.
- [5] Cygler, M. and Schrag, J.D. (1999). Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1441, 205-214.
- [6] Jaeger K.E., Schneidinger B., Rosenau F., Werner M., Lang D., Dijkstra B.W., Schimossek K., Zonta A., Reetz M.T., (1997). “Bacterial lipases for biotechnological applications”, *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, 3, 3-12.
- [7] Villeneuve, P., Muderhwa, J. H., Graille, J. and Haas, M. J. (2000). Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9, 113-148.
- [8] CEREN TOPÇULAR, A0306865, (2005-2006). Taşıyıcılı ve Taşıyıcısız Sistemlerde İmmobilize Peroksidaz Enziminin Karakterizasyonu, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ABD.
- [9] R.A. Sheldon, L. Cao, L. van Langen, (2003). Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free *Curr. Opin. Biotechnol.* 14-387.
- [10] Sheldon, R.A., Schoevaart, R. and Van Langen, L.M. (2006). Cross-Linked Enzyme Aggregates, *Immobilization of Enzymes and Cells*, Guisan, J.M. (Ed.), *Methods in Biotechnology*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 449p.
- [11] Schoevaart, R., Wolbers, M.W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A.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
- [12] Sheldon, R.A. (2007). Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs): Stable and Recyclable Biocatalysts, *Department of Biotechnology, 7th International Conference on Protein Stabilization, Biochemical Society Transactions*, Vol. 35, 1583-1586p.
- [13] R. Verger, (1997). 'Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts, *Trends Biotechnol.* 15, *Biotechnology & Applied Microbiology* 32-38.
- [14] Sharma, R., Chisti Y. Banerjee, U.C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627-662
- [15] SUCKLING, C. J., GIBSON, C. L. (1998). Blackie Academic and Professional Press, *Enzyme Chemistry*, UK, Pp: 234.
- [16] Rua, M.L., Dannert, C.S., Wahl, S., Sprauer, A. ve Schmid, R.D. (1997). Thermoalkalophilic Lipase Of *Bacillus Thermocatenuatus* Large-Scale production Purification and Properties: Aggregation Behaviour and its Effect On Activity, *Journal of Biotechnology*, 56, 89–102.
- [17] Li, H. and Zhang, X. (2005). Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1, *Protein Expression and Purification*, 42, 153–159.

- [18] İşbakan, N. (2006). Lipaz Enzimi Biyokatalizörlüğünde Enantiyomerik Safılıkta 1-Fenil-1-Propanolün Transesterleşme Tepkimesiyle Kinetik Rezolüsyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [19] H. van Tilbeurgh, M.P. Egloff, C. Martinez, N. Rugani, R. Verger, C. Cambillau (1993). Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*, *Nature* 362, 814-820.
- [20] Öztürk, B. (2001), Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports, İzmir Institute of Technology, İzmir, Turkey, 1.
- [21] www.sinica.edu.tw
- [22] SCHMID, R.D., VERGER, R., (1998). *Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Application*, Angewandte Chemie International Edition, 37 Pp:1608.
- [23] BORNSCHEUER U.T., BESLER C., SRINIVAS R., KRISHNA S.H., (2002). Optimizing lipases and related enzymes for efficient application, *Trends Biotechnol.*, 20, 433-37.
- [24] PLEISS J., FISCHER M., SCHMID R.D., (1998). Anatomy of Lipase Binding Sites: The Scissile Fatty Acid Binding Site, *Chem. Phy. Lipids*, 93, 67-80.
- [25] F.K. Winkler, A. D'Arcy, W. Hunziker, (1990). Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism, *Nature* 343, 771-774.
- [26] H. van Tilbeurgh, M.P. Egloff, C. Martinez, N. Rugani, R. Verger, C. Cambillau, (1993). Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*, *Nature* 362, 814-820.
- [27] Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2005). Biyokimyanın İlkeleri, Palme Yayıncılık (Çeviri ed. Kılıç, N.), Ankara, 1151p.
- [28] I.M. Silaman, E. Katchalski, (1966). Improved biocatalysts based on *Candida antarctica* lipase B immobilization, *Annu. Rev. Biochem.* 35, 873-908
- [29] T. Tosa, T. Mori, N. Fuse, I. Chibata, (1969). Industrial application of immobilized enzyme systems, *Agr. Biol. Chem.* 33 1047-1056.
- [30] Banu ÖZTÜRK, (2001). Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports, İzmir Institute of Technology, İzmir, Turkey, November 32-33.
- [31] W. Tischer, V. Kasche, (1999). *Trends Biotechnol.* 17, 326-335.
- [32] H.R. Luckarift, J.C. Spain, R.R. Naik, M.O. Stone, (2004). Enzyme immobilization in a biomimetic silica support., *Nat. Biotechnol.* 22, 211-213.
- [33] E.N. Vulfson, P.J. Halling, H.L. (2001). in: *Enzymes in nonaqueous solvents: methods and protocols*, Humana Press, Totowa, Holland, pp. 151-172.
- [34] J.M. Palomo, G. Munoz, G. Fernandez-Lorente, C. Mateo, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 19-20 (2002) 279-286.
- [35] J.C. Santos, G.F.M. Nunes, A.B.R. Moreira, V.H. Perez, H.F. de Castro, (2007). *Chem. Eng. Technol.* 30, 1255-1261.
- [36] W. Warmuth, E. Wenzig, A. Mersmann, *Bioprocess Eng.* 12 (1995) 87-93. 68. A.E. Ivanov, M.P. Schneider, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 3 (1997) 303-309.
- [37] G. Fernandez-Lorente, M. Terreni, C. Mateo, A. Bastida, R. Fernandez-Lafuente, P. Dalmases, J. Huguet, J.M. Guisan, (2001). *Enzyme Microb. Technol.* 28 389-396.
- [38] Z. Knežević, G. Kukić, M. Vuković, B. Bugarski, B. Obradović, (2004). Improved biocatalysts based on *Candida antarctica* lipase B immobilization, *Process Biochem.* 39, 1377-1385.

- [39] V.M. Balcao, C. Mateo, R. Fernandez-Lafuente, F. Xavier Malcata, J.M. Guisan, (2001). Improved biocatalysts based on *Candida antarctica* lipase B immobilization, *Process Biochem Enzyme Microb. Technol.* 28, 696-704.
- [40] N. Miletić, Z. Vuković, A. Nastasović, K. Loos, *J. Mol.* (2009). Improved biocatalysts based on *Candida antarctica* lipase B immobilization, *Catal. B: Enzym.* 56, 196-201.
- [41] W. Warmuth, E. Wenzig, A. Mersmann, (1995). Selection of a support for immobilization of a microbial lipase for the hydrolysis of triglycerides, *Bioprocess Eng.* 12, 87-93.
- [42] A.E. Ivanov, M.P. Schneider, *J. Mol.* (1997). Improved biocatalysts based on *Candida antarctica* lipase B immobilization, *Catal. B: Enzym.* 3, 303-309.
- [43] C. Bertucci, A. Petri, G. Felix, B. Perini, P. Salvadori, (1999). Improved biocatalysts based on *Candida antarctica* lipase B immobilization, *Tetrahedron: Asymmetry* 10, 4455-4462.
- [44] A. Dyal, K. Loos, M. Noto, S.W. Chang, C. Spagnoli, K. Shafi, A. Ulman, M. Cowman, R.A. Gross, (2003). Bio-inorganic Hybrid Nanomaterials, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 1684-1685.
- [45] C. Bertucci, A. Petri, G. Felix, B. Perini, P. Salvadori, (1999). Improved biocatalysts based on *Candida antarctica* lipase B immobilization. *Tetrahedron: Asymmetry* 10, 4455-4462.
- [47] S.G. Hedin, 1915. Grundzüge der Physikalischen Chemie in ihrer Beziehung zur Biologie, J.F. Bergmann Verlag, Wiesbaden.
- [48] Villeneuve P., Muderhwa J.M., Graille J., Haas M.J., (2000). Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches., *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*, 9, issues 4-6, 113-148.
- [49] Yu, H.W., Chen, H., Wang, X., Yang, Y.Y. and Ching, C.B. (2006). Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs) with Controlled Particles: Application to *Candida rugosa* lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43, 124–127.
- [50] Mateo, C., Palomo, J.M., Van Langen, L.M., Van Rantwijk, F. and Sheldon, R.A. (2003). A New Mild Cross-Linking Methodology to Prepare Cross-Linked Enzyme Aggregates, Laboratory of Biocatalysis and Organic Chemistry, Delft University of Technology, Julianalaan 136, 2628 BL Delft, The Netherlands.
- [51] Sheldon, R.A. (2007). Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs): Stable and Recyclable Biocatalysts, Department of Biotechnology, 7th International Conference on Protein Stabilization, Biochemical Society Transactions, Vol. 35, 1583-1586p.
- [52] Sheldon, R.A., Schoevaart, R. and Van Langen, L.M. (2005). Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs): A Novel and Versatile Method for Enzyme Immobilization, *Biocatalysis and Biotransformation*, 23, 141–147.
- [53] Serrano, L.P., Cao, L., Van Rantwijk, F. and Sheldon, R.A. (2002). Cross-Linked Enzyme Aggregates with Enhanced Activity: Application to Lipases, *Biotechnology Letters*, 24, 1379–1383.
- [54] Fazary, A.E., Ismadji, S., Ju, Y.H. (2009). Biochemical Studies on Native and Cross-Linked Aggregates of *Aspergillus awamori* feruloyl esterase, *International Journal of Biological Macromolecules*, 44, 240–248.
- [55] Randolph, T. W.; Blanch, H. W.; Prausnitz, J. M.; Wilke, C. R. (1985). Chemistry Under Extreme and Non-Classical Conditions, *Biotechnol. Lett.* 7 (5), 325.

- [56] Dordick, J. S. (1989). Enzymatic Reactions in Organic Media, *Enzyme Microb. Technol.* 11, 194.
- [57] Klibanov, A. M. (1997). Enzymatic Reactions in Organic Media, *Trends in Biotechnology* 15 (3), 97.
- [58] Salgın, U., Çalimli, A., Yıldız, N., Salgın, S., Sarı, M. (2007). Süperkritik CO₂ Ortamında Lipaz Enzimlerinin Kararlılığı ve Yapısal Bozunmasının İncelenmesi, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Proje No: 104M388 Aralık, Sivas.
- [59] Brunner, G. (1994). Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes, Steinkopff Darmstadt, 186-195.
- [60] Braker, W.; Mossman, A. L. (1980). *Matheson Gas Data Book*; Matheson Company: Lyndhurst, NJ.
- [61] Randolph, T. W. (1990). Supercritical fluid extractions in biotechnology, *Trends Biotechnol.* 8, 78, U.S.A.
- [62] Klibanov, A. M. (1997). Why are enzymes less active in organic solvents than in water?, *Trends in Biotechnology* 15 (3), 97 U.S.A.
- [63] Zaks, A.; Klibanov, A. M. (1985). Enzyme-catalyzed processes in organic solvents, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 3192, U.S.A.
- [64] Kazandjian, R. Z.; Klibanov, A. M., (1985). Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents, *J. Am. Chem. Soc.* 107, 5448.
- [65] Randolph, T. W. Ph.D. Thesis, University of California, Berkeley, (1987).
- [66] Miller, D. A.; Blanch, H. W.; Prausnitz, J. M. (1991). Enzyme-catalyzed interesterification of triglycerides in supercritical carbon dioxide, *Ind. Eng. Chem. Res.* 30, 939.
- [67] Dumont, T.; Barth, D.; Perrut, M. (1991). *Proceedings of the 2nd International Symposium on Supercritical Fluids*; Johns Hopkins University, Baltimore, MD; McHugh, M. A., Ed.; p 150.
- [68] Marty, A.; Chulalaksananukul, W.; Willemot, R. M.; (1992). Kinetics of lipase-catalyzed esterification in supercritical CO₂, Condoret, J. S. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 273.
- [69] Halling, P. J. (1994). Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, test, and recommendations for experimental design and analysis, *Enzyme Microb. Technol.* 16, 178.
- [70] Halling, P. J., (1990). Biocatalyst behaviour in low-water systems, *Biochim. Biophys. Acta* 1040, 225.
- [71] Morild, E. (1981), The Theory of Pressure Effects on Enzymes, *Adv. Protein Chem.* 34, 91.
- [72] Tawaki, S.; Klibanov, A. M., (1992). Inversion of enzyme enantioselectivity mediated by the solvent, *J. Am. Chem. Soc.* 114, 1882.
- [73] Sakurai, T. S.; Margolin, A. L.; Russell, A. J.; Klibanov, A. M., (1988). Control of enzyme enantioselectivity by the reaction medium, *J. Am. Chem. Soc.* 110, 7236.
- [74] Kamat, S.; Iwaszkewycz, B.; Beckman, E. J.; Russell, A. J., Biocatalytic synthesis of acrylates in supercritical fluids: tuning enzyme activity by changing pressure, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1993), 90, 2940 U.S.A.
- [75] Chaudhary, A. K.; Kamat, S. V.; Beckman, E. J.; Nurok, D.; Kleyale, R. M.; Hajdu, P.; Russell, A. J. J., (1996). Control of Subtilisin Substrate Specificity by

- Solvent Engineering in Organic Solvents and Supercritical Fluoroform, *Am. Chem. Soc.* 118 (51), 12891 Indiana.
- [76] Penniston, J. T., (1971). High hydrostatic pressure and enzymic activity: inhibition of multimeric enzymes by dissociation, *Arch. Biochem. Biophys.* 142, 322.
- [77] Yang, J. C.; Yang, X. M. The 4th International Symposium on Supercritical Fluids, May 11-14, (1997), Sendai, Japan.
- [78] Kasche, V.; Schlothauer, R.; Brunner, G., (1988), Enzyme denaturation supercritical CO₂: Stabilizing effect of SS bonds during the depressurization step, *Biotechnol. Lett.* 10 (8), 569.
- [79] Kamat, S.; Beckman, E. J.; Russell, A. J., (1993). Control of enzyme enantioselectivity with pressure changes in supercritical fluoroform, *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 265.
- [80] Zagrobelny, J.; Bright, F. V., (1992). Supercritical fluid technology for drug product development, *Biotechnol. Prog.*, 8, 421.
- [81] Randolph, T. W. Ph.D., (1987). Chemical and Biological Engineering, Thesis, University of California, Berkeley.
- [82] Kamat, S.; Beckman, E. J.; Russell, A. J., (1993). Stability and Stabilization of Biocatalysts, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (19), 8845.
- [83] Wangikar, P.; Carmichael, D.; Clark, D. S.; Dordick, J. S. (1996). *Biotechnol. Bioeng.* 50, 329.
- [84] Cao L., Van Langen L. M., Van Rantwijk F., Sheldon R.A. (2001). Cross linked aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of β -lactam antibiotics, *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 11, 665-670.
- [85] Serrano, L.P., Cao,L., Van Ratwijk, F. and Sheldon, R.A. (2002). Cross-Linked Enzyme Aggregates with Enhanced Activity: Application to Lipases, *Biotechnology Letters*, 24, 1379–1383.
- [86] Aytar, B.U. and Bakır, U. (2008). Preparation of Cross-Linked Tyrosinase Aggregates, *Process Biochemistry*, 43, 125-131.
- [87] Yu, H.W., Chen, H., Wang, X., Yang, Y.Y. and Ching, C.B. (2006). Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs) with Controlled Particles: Application to *Candida rugosa* lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43, 124–127.
- [88] Perez, D.I., Rantwijk, F.V. and Sheldon, R.A. (2009). Cross-Linked Enzyme Aggregates of Chloroperoxidase: Synthesis, Optimization and Characterization, *Adv. Synth. Catal.*, 351, 2133 – 2139.
- [89] Kumar, S., Mohan, U., Kamble, A.L., Pawar, S. and Banerjee U.C. (2010). Cross-Linked Enzyme Aggregates of Recombinant *Pseudomonas putida* nitrilase for Enantioselective Nitrile Hydrolysis, *Bioresource Technology*, 101, 6856–6858.
- [90] Serrano, L.P., Cao,L., Van Ratwijk, F. and Sheldon, R.A. (2002). Cross-Linked Enzyme Aggregates with Enhanced Activity: Application to Lipases, *Biotechnology Letters*, 24, 1379–1383.
- [91] Dinçyürek, D., (2011). Süperkritik CO₂ İle Ön İşlem Görmüş *Candida rugosa* ve *Candida antarctica* Lipaz Enzimlerinin Çapraz Bağlı Enzim Agregatları, Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- [92] R.M.C. Dawson, D.C. Elliott, W.H. Elliott, W.H. Elliott, K.M. Jones, (1986). Data for Biochemical Research, 18 pH, buffers, and physiological media, 432

- [94] Juan C. Cruz, Peter H. Pfromm, John M. Tomich, Mary E. Rezac, (2010). Conformational changes and catalytic competency of hydrolases adsorbing on fumed silica nanoparticles: II. Secondary structure, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 81, 1–10.
- [95] Jilie KONG and Shaoning YU, (2007). Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures Acta Biochimica et Biophysica Sinica 39(8): 549–559.
- [96] Bahadır, S., (2012). Ligand Destekli Ultrafiltrasyon ile Rasemik Amino Asit Karışımların Ayrılması, Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- [97] Sarah Perrett, Jun-Mei Zhou, (2002). Expanding the pressure technique: insights into protein folding from combined use of pressure and chemical denaturants, Biochimica et Biophysica Acta 1595, 210-223
- [98] Jerson L. Silva, Yraima Cordeiro, Debora Foguel, (2006). Protein folding and aggregation: Two sides of the same coin in the condensation of proteins revealed by pressure studies, Biochimica et Biophysica Acta 1764 443– 451.
- [99] Sarah Perrett, Jun-Mei Zhou, (2002). Expanding the pressure technique: insights into protein folding from combined use of pressure and chemical denaturants, Biochimica et Biophysica Acta 1595 210-223.
- [100] Rodrigo L. Silveira, Julian Martínez, Munir S. Skaf, and Leandro Martínez, J. Phys. Chem. B (2012). Enzyme Microheterogeneous Hydration and Stabilization in Supercritical Carbon Dioxide 116, 5671–5678.
- [101] Isabelle Migneault, Catherine Dartiguenave, Michel J. Bertrand, and Karen C. Waldron, (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, BioTechniques 790-802, Vol. 37, No. 5.
- [102] Zdeněk Wimmer and Marie Zarevúcka, (2010), A Review on the Effects of Supercritical Carbon Dioxide on Enzyme Activity, *Int. J. Mol. Sci.* 11, 233-253
- [103] Helenius, A., Simons, K. (1975). Solubilization of membranes by detergents. Biochim. Biophys. Acta, 415, 29-79
- [104] Aziz Tanriseven, Zehra Ölçer, (2008). A novel method for the immobilization of glucoamylase onto polyglutaraldehyde-activated gelatin, Biochemical Engineering Journal 39, 430–434.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Hasan APTİŞ
Doğum Yeri ve Tarihi	BURSA, 17/10/1987
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 58140-Sivas
E-posta Adresi	hasan.aptis@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Bursa Çelebi Mehmet Liseli, 2004
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2010
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2012

Bilimsel Yayınlar ve Projeler

1. Derya Dinçyürek, Hasan Aptiş, Sema Salgın, Uğur Salgın, ***Candida rugosa* Lipazının Çapraz Bağlı Enzim Agregatlarının Katalitik Aktivitesinin Geliştirilmesinde Yeni Bir Yöntem**, Uluslararası Katılımlı 25. Ulusal Kimya Kongresi, 27 Haziran- 2 Temmuz 2011, Erzurum, (Sözlü sunum olarak kabul edildi).
2. Derya Dinçyürek, Hasan Aptiş, Sema Salgın, Uğur Salgın, **A New Application of Supercritical CO₂ Technology for Cross Linked Enzyme Aggregates** 15th European Congress on Biotechnology Ecb15, September 23-26 2012, Istanbul TURKEY
3. Derya Dinçyürek, Hasan Aptiş, Sema Salgın, Uğur Salgın, **Süperkritik CO₂ Ortamında Ön İşlem Görmüş *Candida rugosa* Lipazının Çapraz Bağlı Enzim Agregatları ve Katalitik Aktivitesinin Geliştirilmesi**, Ulusal Katılımlı

10. Kimya Mühendisliği Kongresi, 3-6 Eylül 2012, Koç Üniversitesi İstanbul,
(Sözlü sunum olarak kabul edildi).