

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**TRİPSİN ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU
VE PROTEİN FRAGMENTASYONUNDA
KULLANIM POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Cenk DAĞLIOĞLU

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 405.05.01

Sunuş Tarihi : 23. 06. 2010

Bornova-İZMİR

2010

Sayın Cenk DAĞLIOĞLU tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “Tripsin Enziminin İmmobilizasyonu ve Protein Fragmantasyonunda Kullanım Potansiyelinin Araştırılması ” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 23. 06. 2010 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU	
Raportör Üye	: Doç. Dr. Seçil ÖNAL	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Şenol ALPAT	

ÖZET**TRİPSİN ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU
VE PROTEİN FRAGMENTASYONUNDA
KULLANIM POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

DAĞLIOĞLU, Cenk

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez yöneticisi: Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU

Haziran 2010, 89 sayfa

Tripsin, peptid bağlarını lizin ve arginin artıklarından sonra spesifik olarak yıkıma uğratan bir pankreatik serin endoproteazdır ve çoğunlukla protein yıkımı ve peptid haritalandırılmasında kullanılmaktadır.

Proteazlar arasında en kapsamlı ilgilenilen proteaz olan tripsin endüstriyel ve biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat endüstriyel proseslerde doğal enzim kullanımı, operasyon ve saklama süreci sırasında enzimin biyokatalitik aktivitesini hızlı kaybetmesi ve kararlı olmaması göz önüne alındığında sınırlanmaktadır. Bunun yanı sıra enzimleri substrat çözeltisinden çıkarmak zordur ve bu durum ürün kontaminasyonuna sebep olabilir.

Protein analizlerindeki yoğun ilgi göz önüne alındığında, son yıllarda immobilize tripsin konsepti, geniş enzim-substrat oranı, yüksek yıkım verimliliği, tekrar kullanılabilirliğinin mümkün olması ve serbest enzime göre denatürasyon ve inaktivasyon oranının düşük olması gibi çeşitli avantajları nedeni ile çok fazla dikkat çekmiştir.

Bu çalışmada, ilk olarak silika tabanlı bir taşıyıcı üzerine tripsin immobilizasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra, kovalent bağlanma ile immobilize edilen tripsinin karakterizasyonu için, optimum pH, pH kararlılığı, optimum sıcaklık, termal kararlılığı, depo kararlılığı, operasyonel kararlılığı ve tekrar kullanılabilirliği belirlendi. Bunlara ek olarak, immobilize tripsinin organik çözücülerde çalışılabilirliği ve stabilitesi, ve protein fragmentasyonunda kullanım potansiyeli araştırıldı.

Anahtar kelimeler: Tripsin, Kovalent immobilizasyon, Protein fragmentasyonu, HPLC ayırma

ABSTRACT

**IMMOBILIZATION OF TRYPSIN
AND INVESTIGATION OF POTENTIAL USE
FOR PROTEIN FRAGMENTATION**

DAĞLIOĞLU, Cenk

Master of Science Thesis, Biochemistry Department

Supervisor: Prof.Dr. Figen ZİHNİOĞLU

June 2010, 89 pages

Trypsin, which specifically cleaves peptidic bonds on C-terminal group of lysine or arginine, is a pancreatic serine endoprotease and used mostly for protein digestion and peptide mapping.

Proteases among which trypsin is the most extensively concerned are widely used in industrial and biomedical applications. However utilisation of native enzyme is limited in industrial processes due to the problem of its instability and rapid loss of biocatalytic activity during the operation and prolonged storage periods. Besides that, it is difficult to remove the enzyme from the substrate solution and might lead to a contamination of the product.

In view of the strong interest in protein analysis, the concept of immobilized trypsin has received much attention in recent years because of several advantages, such as: larger enzyme to substrate ratio, high digestion efficiency, the possibility of their repeated use, and the rate of denaturation or inactivation is less than with the free enzyme.

In this study immobilization of trypsin was firstly performed on a silica-based carrier. Afterwards, the parameters of: optimum pH, pH stability, optimum temperature, thermal stability, storage stability, operational stability and re-usability were determined for the characterization of the trypsin immobilized by covalent binding. In addition to these, immobilized trypsin was investigated for function and stability in organic solvents, and in potential uses for protein fragmentation.

Keywords: Trypsin, Covalent immobilization, Protein fragmentation, HPLC separation

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgisi ve deneyimi ile sürekli yanımda olan ve desteğini esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Almanya'daki çalışmalarım sırasında katkılarından dolayı Prof. Dr. Uwe T. BORNSCHEUER'e ve gurubuna teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam sırasında bana her zaman moral veren ve destekçim olan ablam Zeynil Dağlıoğlu ve ağabeyim Davut Dağlıoğlu'na, bana yürekten inanan Annem'e teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XVII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XIX
1.GİRİŞ	1
1.1 Tripsin.....	2
1.1.1 Tripsinin katalitik mekanizması	4
1.2 Enzim İmmobilizasyonu	5
1.2.1 İmmobilizasyon yöntemleri	6
1.2.1.1 Non-kovalent adsorpsiyon	8
1.2.1.2 Kovalent bağlanma	10
1.2.1.3 Tutuklama ve enkapsülasyon.....	13
1.2.1.4 Çapraz bağlama	14
1.2.2 Enzim immobilizasyonunda ara kol (<i>spacer arm</i>) kullanımı	16
1.2.3 Enzim immobilizasyonunda destek seçimi.....	17

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.2.3.1 Silika	18
1.2.4 Enzim immobilizasyonunda glutaraldehit	19
1.3 Organik Çözücülerde Enzim Kullanımı.....	20
1.3.1 Polietilen glikol	21
1.4 Protein Fragmantasyonu	23
2. MATERYAL ve METOD	26
2.1 Materyal	26
2.2 Tripsin Aktivite Tayini.....	26
2.3 Protein Tayini (<i>Bradford Metodu</i>)	28
2.4 Tripsin İmmobilizasyonu	29
2.4.1 (I) Silika-GA üzerine Tripsin immobilizasyonu	29
2.4.2 (II) Silika-GA-DAH üzerine Tripsin immobilizasyonu.....	30
2.4.3 (III) Silika-GA-PEG2000/5000-DAH üzerine Tripsin immobilizasyonu .	32
2.5 Tripsin İmmobilizasyonu için Optimizasyon Çalışmaları	33
2.6 Silika Üzerine İmmobilize Edilen Tripsinin Karakterizasyonu.....	34
2.6.1 Sıcaklık.....	34
2.6.2 pH.....	35

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.6.3 Aktivite üzerine organik çözen etkisi	35
2.7 Kararlılık Testleri.....	36
2.7.1 Termal kararlılık	37
2.7.2 pH kararlılığı.....	37
2.7.3 Depo kararlılığı.....	37
2.7.4 Operasyonel kararlılık	38
2.8 İmmobilize Tripsinin Tekrar Kullanılabilirliği.....	38
2.9 İmmobilize Tripsin ile Protein Fragmentasyonu	39
3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	41
3.1 Tripsinin Silika Destek Üzerine Kovalent İmmobilizasyonu.....	41
3.1.1 Tripsin immobilizasyonu için glutaraldehit miktarının optimizasyonu.....	43
3.1.2 Tripsin immobilizasyonu için 1,6-diaminohekzan miktarının optimizasyonu.....	45
3.1.3 Tripsin immobilizasyonu için bağlı protein miktarının optimizasyonu	46
3.2 İmmobilize Tripsinin Karakterizasyonu	47
3.2.1 Sıcaklık etkisi.....	47
3.2.2 pH etkisi.....	48
3.2.3 Aktivite üzerine organik çözen etkisi	50

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.3 Kararlılık Testleri.....	53
3.3.1 Termal kararlılık	54
3.3.2 pH kararlılığı	56
3.3.3 Depo kararlılığı	57
3.3.4 Operasyonel kararlılık.....	58
3.4 İmmobilize Tripsinin Tekrar Kullanılabilirliği	61
3.5 İmmobilize Tripsin ile Protein Fragmentasyonu	64
4. GENEL DEĞERLENDİRME.....	74
KAYNAKLAR DİZİNİ	77
EKLER.....	87
ÖZGEÇMİŞ.....	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Tripsinojen ve diğer öncü proteazların aktivasyonu	3
1.2 Serin proteazların katalitik mekanizması	5
1.3 İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması	7
1.4 Farklı yöntemler ile immobilize edilen enzimlerin temsili gösterimleri	15
1.5 Kovalent bağlı enzimlerin ara kolsuz ve ara kol kullanılarak yapılan immobilizasyonu.....	16
1.6 Silika jel yapısı	19
1.7 Glutaraldehit yapısı	20
2.1 p-nitro analin oluşumu.....	26
2.2 Glutaraldehit ile aktive edilen silikon dioksit üzerine tripsin immobilizasyonu.....	30
2.3 Aktif silikon dioksit üzerine 1,6-diaminohekzan bağlayarak tripsin immobilizasyonu.....	31
2.4 PEG 2000 ve 5000 kullanılarak tripsin immobilizasyonu.....	33
3.1 Serbest ve immobilize tripsin aktivitelerinin sıcaklığa bağımlı değişimi	48
3.2 Serbest ve immobilize tripsin aktivitelerinin pH'a bağımlı değişimi.....	49
3.3 Serbest ve immobilize tripsinin ön inkübasyon süresine bağımlı termal kararlılıkları	55
3.4 Serbest ve immobilize tripsinin pH kararlılıkları	57

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

3.5	Serbest ve immobilize tripsinin depo kararlılıkları.....	58
3.6	İmmobilize tripsinin operasyonel kararlılığı.....	61
3.7	İmmobilize tripsinin tekrar kullanılabilirliği	63/64
3.8	GuHCl ve DTT ile gerçekleştirilen protein denatürasyonu.....	65
3.9	Serbest tripsin ile BSA fragmentasyonu (Geceboyu / PD10 kolonlu BSA / 65 pik)	67
3.10	Serbest tripsin ile BSA fragmentasyonu (Geceboyu / PD10 kolonsuz BSA / 80 pik)	67
3.11	Silika-GA-Tripsin ile BSA fragmentasyonu (1 saat / PD10 kolonlu BSA / 81 pik)	68
3.12	Silika-GA-Tripsin ile BSA fragmentasyonu (1 saat / PD10 kolonsuz BSA / 98 pik)	68
3.13	Silika-GA-Tripsin ile BSA fragmentasyonu (15 dakika / PD10 kolonlu BSA / 81 pik)	69
3.14	Silika-GA-Tripsin ile BSA fragmentasyonu (15 dakika / PD10 kolonsuz BSA / 96 pik)	69
3.15	HPLC sistemi ile bağlantılı immobilize enzim sisteminin temsili gösterimi.....	70
3.16	Silika-GA-Tripsin ile on-line BSA fragmentasyonu (PD10 kolonlu BSA / 85 pik)	71
3.17	Silika-GA-Tripsin ile on-line BSA fragmentasyonu (PD10 kolonsuz BSA / 115 pik)	72

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Çeşitli immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması	8
1.2 Enzimin kovalent bağlanmasında kullanılan çeşitli aktivasyon metodları ve reaksiyon grupları	12
1.3 Destek materyallerinin kimyasal kompozisyonlarına göre sınıflandırılması.	18
1.4 Polietilen glikolün sahip olduğu bazı özellikler	23
2.1 Serbest tripsin aktivite ölçüm protokolü.....	27
2.2 İmmobilize tripsin aktivite ölçüm protokolü	27
2.3 Protein miktarı tayini (<i>Bradford Metodu</i>)	28
3.1 Tripsin immobilizasyonu için glutaraldehit miktarının optimizasyonu.....	44
3.2 Tripsin immobilizasyonu için 1,6-diaminohekzan miktarının optimizasyonu	45
3.3 Tripsin immobilizasyonu için bağlı protein miktarının optimizasyonu	46
3.4 %5ACN -%0.1TFA çözeltisinde immobilize tripsinin gösterdiği spesifik ve total aktiviteler	51
3.5 %30ACN -%0.1TFA çözeltisinde immobilize tripsinin gösterdiği spesifik ve total aktiviteler	52
3.6 %80ACN -%0.1TFA çözeltisinde immobilize tripsinin gösterdiği spesifik ve total aktiviteler	53

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

3.7	İmmobilize tripsinin farklı zamanlardaki k_D değerleri.....	59
3.8	İmmobilize tripsinin yarı ömürleri ($t_{1/2}$).....	60
3.9	BSA primer yapısı.....	66
Ek1	Karakterizasyon, kararlılık testleri ve protein fragmentasyonunda kullanılan immobilize tripsinin %immobilizasyon verimi, 0.1M pH8 Fosfat Tamponu içerisindeki spesifik ve total aktivitesi.....	87
Ek2	Karakterizasyon, kararlılık testleri ve protein fragmentasyonunda kullanılan immobilize tripsinin %immobilizasyon verimi, %30ACN+%0.1TFA içerisindeki spesifik ve total aktivitesi.....	87

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
kd	Bozunma katsayısı
t _{1/2}	Yarılanma süresi
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ACN	Asetonitril
BAPNA	N-benzoil-L-arginin-p-nitroanalid
BSA	Sığır serum albümin
DAH	1,6-Diaminohekzan
DMSO	Dimetilsülfoksit
DTT	1,4-ditiyoeritrol
GA	Glutaraldehit
Gdn.HCl	Guanidin hidroklorür
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
M	Molar
PEG	Polietilen glikol
TFA	Trifloroasetik asit

1. GİRİŞ

Tripsin birçok endüstriyel proseste yer alması nedeni ile önemli olmakla birlikte protein yapı analizlerinde fragmentasyon amacıyla en yaygın kullanılan enzimdir. Bu amaçla serbest formda kullanılması Tripsinin kendi lizizinden gelen girişimlere neden olabilmekte bunun yanı sıra; 24 saate varan uzun fragmentasyon süreleri, oluşan yan ürünler, düşük enzim substrat oranı ve manuel operasyon gibi sorunları da beraberinde getirmektedir. Son yıllarda protein fragmentasyonu amacı ile immobilize tripsin preparatlarının kullanılması ve katı faz ekstraksiyon/on-line HPLC mantığı ile peptid separasyonu konsepti üzerinde çalışmalar yoğunlaştırılmıştır. Bunun başlıca nedeni klasik enzim immobilizasyon yöntemlerinin getirdiği avantajların yanı sıra protein fragmentasyonu açısından da bazı avantajlara sahip olmasıdır. Bunlar; (1) daha geniş enzim substrat oranı, (2) yüksek fragmentasyon etkinliği, (3) tekrar kullanılabilir olması, (4) denatürasyon ve inaktivasyon oranının serbest enzime göre daha düşük olması, (5) ayırma ve dedeksiyon sistemleri ile kolay bağlantı kurulabilmesidir.

Proteomik alanında, immobilize enzim sistemleri peptid haritalandırmada kullanılan bir araçtır. Peptid haritalandırma, protein identifikasyonu ve karakterizasyonu için çok kuvvetli ve başarılı araçlardan biridir. Peptid haritalandırma, proteinin proteolitik yıkımını sonrası peptid fragmanlarının ayrılması ve sekanslanması ile gerçekleştirilir.

Peptid fragmentasyonunda kullanıma yönelik immobilize tripsin preparatının hazırlanması ve on-line sistemlerde kullanım potansiyelinin araştırılması çalışmanın temel amacını oluşturmaktadır. Immobilize enzimler serbest enzimlere göre avantajlara sahiptirler. Bunlardan başlıcaları; sanrifügasyon, filtrasyon, gibi basit yöntemlerle ortamdan ayrılarak tekrar kullanımının sağlanabilmesi ve artan kararlılıklarıdır (operasyonel, depo, sıcaklık, pH, organik çözügen vb.). Bu temel avantajlar sayesinde enzimlerin endüstriyel proseslerde kullanımları daha az maliyet ile mümkün olabilmektedir.

Tripsin enziminin katı destek materyal olan silika üzerine immobilizasyonu için kovalent bağlama yöntemi kullanıldı. Bunun için çapraz bağlayıcı bir ajan

olan glutaraldehit, organik çözen kararlılığını arttırmak için de polietilenglikolden faydalanıldı. Taşıyıcıya bağlama sonucu enzim molekülünün fiziksel ve kimyasal özellikleri değişmektedir. Bunun başlıca nedenleri: kovalent bağlanma sırasında enzim molekülünün yükü, kimyasal yapısı ve konformasyonunun değişmesi ve hareket yeteneğinin sınırlanmasıdır. Bu nedenle silika üzerine immobilize edilen Tripsin enziminin karakterizasyonunun yapılması gerekmektedir. Karakterizasyon amacı ile serbest ve immobilize enzimin optimum pH ve sıcaklık, aktivite, organik çözüde çalışabilirliği öncelikle test edilerek kararlılık testleri (pH, sıcaklık, depo, operasyonel, tekrar kullanılabilirlik vb.) gerçekleştirildi.

Karakterizasyon sonrasında immobilize tripsin preparatlarının protein fragmentasyonlamada kullanım potansiyellerinin araştırılması amacıyla, katı-faz ekstraksiyonu ve HPLC gibi ayırıcı sistemlerde kullanılarak değerlendirildi.

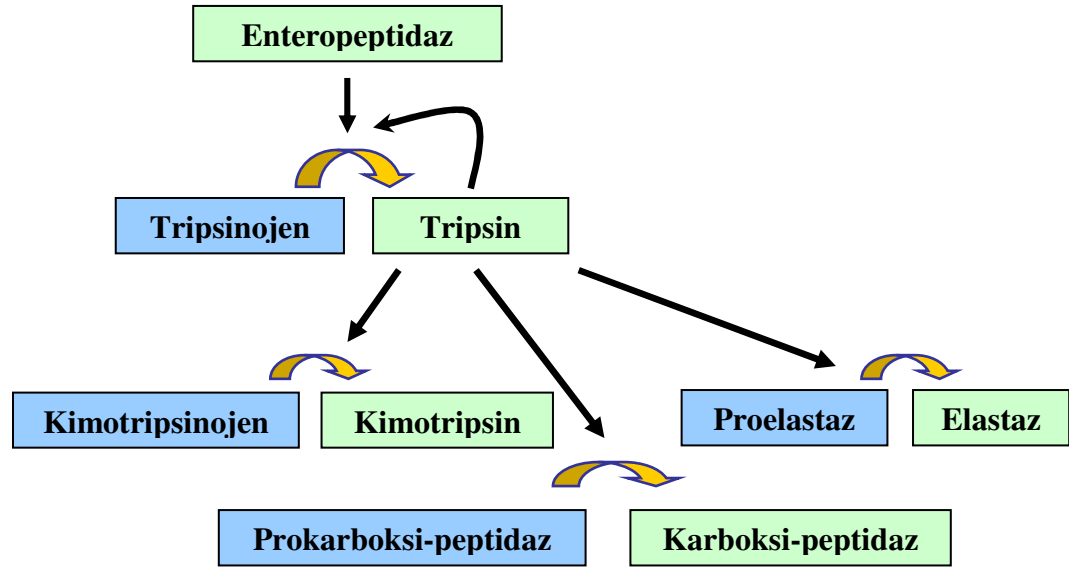
1.1 Tripsin

Tripsin (3.4.21.4), serin proteaz ailesinden endopeptidaz sınıfı bir enzim olup proteinlerin lizin ve arginin artıklarının karbonil uçlarının spesifik hidrolizinden sorumludur.

Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 23.8 kDa olan tripsin, tripsinojen olarak adlandırılan uzun, inaktif öncü protein (zimojen) şeklinde pankreastan salgılanır. Tripsinojen onikiparmak bağırsağına geldiğinde, bağırsak mukozasından salgılanan ve tripsinojenin aktif forma geçmesinde öncü olan “enterokinaz” enzimi tarafından yıkıma uğratılır ve aktif tripsin formuna geçer. Oluşan tripsin daha sonra tripsinojen aktivasyonunu oto-katalitik olarak gerçekleştirirken diğer proteazların aktivitesinden de sorumlu olmaktadır (Şekil 1.1).

Tripsin, (1) kan proteinlerinin kullanımında, (2) kliniklerde inflamasyon ve hazımsızlık tedavisi için bir adjuvan olarak, (3) süt oksidasyonunu engelleyerek lezzet arttırmada, (5) deri bronzlaştırmada ve ham ipek işlenmesinde, (6) biyoaktif peptidler hazırlanması için sınırlı proteoliz gerçekleştirmede, (6) insan serumundaki serin proteinaz inhibitörlerinin dedekte edilmesinde, (7) insan

insülini yarı-sentezinde, (8) tripsin inhibitörlerinin afiniteye dayalı saflaştırılmasında, (8) enantiyomerik O- veya N- türevli amino asitlerin çözünürlüğünde, (9) emülsifiye ajanların üretiminde, (10) peptid sentezinde kullanım gibi çok geniş endüstriyel uygulama alanlarına sahiptir (Bryjak and Kolarz, 1997; Kai Kang et al., 2005).



Şekil 1. 1 Tripsinojen ve diğer öncü proteazların (kimotripsinojen, proelastaz, prokarboksi-peptidaz) aktivasyonu

Tripsin peptid bağlarının parçalanmasını spesifik olarak katalizleyen yüksek verimli bir proteolitik enzimdir. Fakat, tripsin stabilitesi az olan nötr proteazlardan biridir. Çözelti içerisindeki hızlı otolizizi reaksiyon koşullarını kontrol etmeyi güçleştirmekte bunun sonucu olarak da enzimin katalitik etkinliği azalmakta ve kullanım maliyeti artmaktadır (Kai Kang et al., 2005). Bunu engellemek için doğal ve sentetik polimerler üzerine tripsin immobilizasyonu birçok yayında rapor edilmiş, doğal polisakkaritler, sentetik polimerler ve silika temelli taşıyıcılar sürekli olarak çalışılmıştır (Bryjak and Kolarz, 1997).

Tripsin, kütle spektrometresi (MS) aracılığı ile yapılan protein identifikasyonlarında en yaygın olarak kullanılan proteazdır. Hemen hemen tüm peptid haritalandırma yöntemleri, proteolitik parçalama yolu ile üretilen

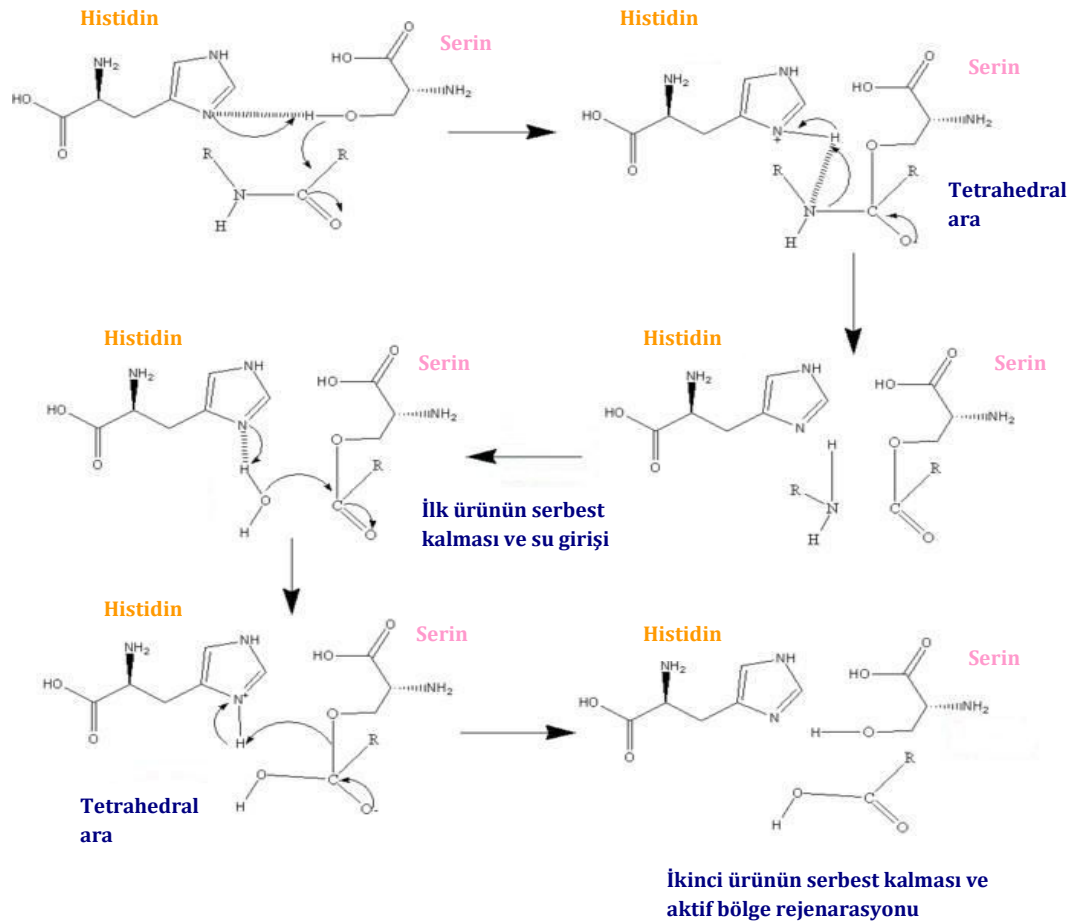
peptidlerin MS aracılığı ile tayini ve identifikasyonuna dayanmaktadır. Proteinlerden çok sayıda küçük peptidler oluşturmak için spesifiteleri bilinen proteolitik enzimlerin (tripsin, kimotripsin, pepsin vb.) sindirim özelliklerinden yararlanılmakta, spesifik bir enzimin kullanıldığı her bir parçalamada eşsiz peptid fragmanları oluşmakta ve proteinin primer yapısı üzerinde farklı bir görünümün elde edilmesi beklenmektedir (He et al., 2002).

Tripsin tabanlı sistemlerin geliştirilmesi için son yıllarda çeşitli çalışmalar yapılmış ve bu süreç içerisinde tripsin, silika ve polimerik tabanlı çeşitli destekler üzerine immobilize edilmiştir (Massolini and Calleri, 2005). İmmobilize enzim sistemleri ile ayırma sistemlerinin on-line bağlanması sonucu, bir analitik süreç içerisinde protein identifikasyonunun mümkün kılınabileceği birçok çalışmada gösterilmiştir (Calleri et al., 2004, 2005; Temporini et al., 2006).

1.1.1 Tripsinin katalitik mekanizması

Serin proteazlar peptid bağlarını kovalent kataliz veya geçiş hali bağlanması ile hidroliz edebilirler. Serin proteazlar birçok proseste önemli roller oynamaktadır (diyet protein sindirimi, kan pıhtılaşma kaskadı, farklılaşma ve gelişmenin çeşitli yollarında, vb.). Tripsin, kimotripsin, elastaz proteaz aktivitesi gösteren enzimlerdir. Bu enzimler zimojenler olarak üretilirler. Zimojenin aktif bölgesi bükülüdür ve yüksek katalitik aktiviteye sahip değildir. Zimojenlerin tam enzimlere dönüşümü sırasında zimojen üzerindeki birkaç bölgede proteolitik yıkım meydana gelir.

Tripsin katalizinin önerilen mekanizması şu sırayı takip etmektedir: (1) Substrat bağlanması (2) Ser195 yan zincir oksijeninin, bir tetrahedral ara oluşturmak suretiyle peptid üzerindeki yarılabilen bağın karbonil karbonuna nükleofilik saldırısı (Ser 195 den proton transferi) (His 57 tarafından desteklenir). (3) His57 tarafından desteklenmesi ile peptid bağının yıkılması (yeni amino uca proton transferi) (4) İlk ürünün serbest kalması. (5) His57 tarafından desteklenen açıl-enzim arasına suyun nükleofilik saldırısı ve tetrahedral aranının oluşması (6) Açıl aranının çözülmesi ve ikincil ürünün serbest kalması (Şekil 1.2) (Perona and Craik, 1994).



Şekil 1.2 Serin proteazların katalitik mekanizması.

1.2 Enzim İmmobilizasyonu

Enzimlerin katalitik aktiviteleri için çok büyük öneme sahip olan moleküler yapıları; (1) yüksek sıcaklık, (2) çok yüksek ya da çok düşük pH ve (3) organik çözücülerin varlığı gibi zorlu ortam ve proses koşullarında yıkılmaya eğilimlidir. Reaksiyonlarda serbest enzimlerin kullanılması, katalizledikleri reaksiyondan sonra ürünü kontamine etmeleri ve tekrar elde edilme süreçlerinin pahalı oluşu gibi problemlere sebep olur. İmmobilizasyon, enzimlerin doğasında mevcut olan bu sorunları ortadan kaldırma metodlarından bir tanesidir.

İmmobilize enzimlerin sahip olduğu avantajlar, enzim mühendisliği olarak da bilinen enzim teknolojisi, analiz, tıp ve ilaç, organik kimya gibi alanlarda kanıtlanmıştır (Mosbach,1976). İmmobilize enzimlerin kullanımı içeren bazı avantajları özetlemek gerekirse:

(1) Tekrar kullanılabilirler.

(2) Katalizörün üründen olağan ayrılma problemi pratik olarak giderilmiştir.

(3) İmmobilize enzimlerin reaksiyonları daha az yer gerektirir.

(4) Daha iyi bir reaksiyonun kontrolü mümkündür.

(5) Sürekli akış sistemlerine uygulanabilirler.

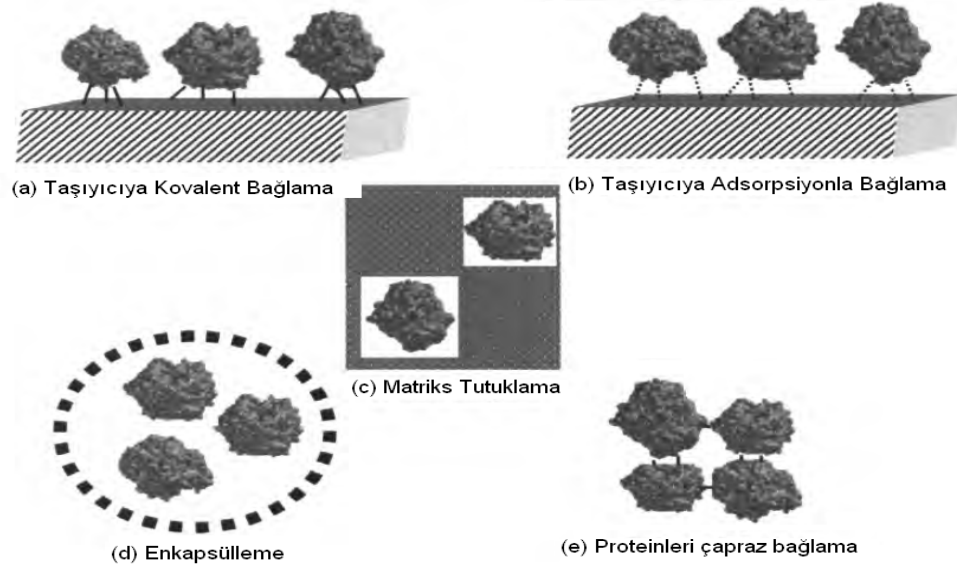
(6) İmmobilize enzimlerin bazı durumlarda çözünür proteinlerden daha kararlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, tıbbi uygulamalarda, olumsuz immünolojik reaksiyonlar sadece enzimlerin enkapsülasyon veya tutuklanması ile önenebilir (Mosbach,1976).

1.2.1 İmmobilizasyon yöntemleri

İmmobilizasyon sonrası enzimlerin istenilen aktiviteyi ve karakteristikleri gösterebilmeleri, enzim immobilizasyonlarındaki en önemli konu olmaktadır. İmmobilizasyon veriminin ve immobilizasyon sonrası enzim aktivitesinin yüksek olabilmesi için, enzime uygun bir taşıyıcının ve immobilizasyon yönteminin seçilmesi gereklidir. Farklı biyokatalizörler için tasarlanan immobilizasyon metotları için sistematik bir yöntem mevcut değildir. Yöntemler kendi içlerinde avantajlara ve dezavantajlara sahip oldukları için taşıyıcı ve yöntem seçimi, tasarlanan amaca, enzimin ve reaksiyonun çeşidine göre yapılır.

Enzimlerin immobilizasyon yöntemleri dört ana grup içinde incelenebilir:

- Enzimin katı bir destek üzerine non-kovalent adsorpsiyonu,
- Enzimin katı bir destek üzerine kovalent bağlanması,
- Enzimin polimerik jel, membran ya da kapsüle tutuklanması,
- Enzimin polifonksiyonel bir ajan ile çapraz bağlanması.



Şekil 1.3 İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Karlheinz and Herbert, 2002).

İlk üç sınıf, enzimin tutuklanması ya da desteklenmesi ve katı taşıyıcının istenen mekanik özelliklerinin sağlanabilmesi için katı bir matriksin kullanımını içerir (Şekil 1.3 a-d). Sonuncusu ise fazladan her hangi bir destek kullanmadan enzimin kendisi ile kovalent bağlanması ile gerçekleştirilen bir yöntemdir (Şekil 1.3 e).

Kovalent bağlama yöntemlerinin uygulanması protein molekülünün doğrudan kimyasal modifikasyonu ile sonuçlanır. Non-kovalent yöntemler; basit fiziksel tutuklama ya da elektrostatik etkileşim, hidrojen bağları, Van der Waals etkileşimleri veya hidrojen bağları gibi zayıf etkileşimler aracılığı ile bir enzim/taşıyıcı kompleksi oluşturulması temeline dayanır. Tutuklama (Şekil 1.3 c) ve enkapsülasyon (Şekil 1.3 d) yöntemlerinin her ikisi de tutuklama yöntemi başlığı altında değerlendirilecektir. Bu dört grubun avantaj ve dezavantajları Çizelge 1.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 1. 1 Çeşitli immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması (Karlheinz and Herbert, 2002)

İmmobilizasyon Metodu	Avantajları	Dezavantajları
Adsorpsiyon	• Kolay • Enzimin kimyasal modifikasyonuna gereksinim yoktur • Tersinirdir • Genellikle ucuzdur	• Zayıf bağlanma ve enzim kaçıışı • Zayıf ya da olmayan stabilite • Spesifik olmayan bağlanma • Kütle transferini önleyebilir
Kovalent	• Sıkı bağlanma • Çok sayıda destek mataryeli ve kovalent bağlayıcı • Enzim miktarının ve mikro çevrenin rasyonel olarak kontrolü	• Enzimlerin kimyasal modifikasyonu • Genellikle pahalı • Taşıyıcı ile aktivitenin seyrelmesi • Kütle transferini önleyebilir
Tutuklama ve enkapsülasyon	• Enzimin kimyasal modifikasyonuna gereksinim yoktur • Basit olabilir • Hücreler için uygundur	• Zayıf ya da olmayan stabilite • Çevresel koşullara bağımlıdır • Genellikle kütle transferinin önlenmesi
Çapraz bağlama	• Yüksek hacimsel aktivite • Yüksek sıcaklık ve organik solventlere uygundur • Taşıyıcı gerektirmez • Sıkı bağlanma • Hücreler için uygundur	• Enzimlerin kimyasal modifikasyonu • Partikül özelliklerinin kontrolünün zor oluşu • Enzimlerin kristalizasyonunu gerektirmesi • Kütle transferini önleyebilir

1.2.1.1 Non-kovalent adsorpsiyon

Enzimin katı bir taşıyıcıya adsorpsiyonu, proteinin katı yüzey ile geri-dönüşümlü non kovalent bağlanma yoluyla etkileşimi olarak karakterize edilir. Adsorpsiyon sürecindeki etkileşim güçleri; göreceli olarak daha güçlü olan iyonik bağlardan ve hidrojen bağlarından daha zayıf Van der Waals bağlarına ve proteinin destek ile hidrofobik etkileşimlerine kadar farklılık gösterebilmektedir. İyonik bağların ve hidrojen bağlarının elektrostatik gücü hidrofobik bağların elektrostatik gücüne kıyasla çok fazladır ve bu nedenle saf sulu ortamda dahi protein ile sıkı bağlar oluşturabilirler. Adsorpsiyon ile immobilizasyon basit ve çoğunlukla masrafsızdır ve genellikle katalitik protein yüzeyine zarar vermez. Ne proteinin ne de desteğin kimyasal modifikasyonu söz konusu değildir fakat

taşıyıcıya bağlanma geri tersinirdir ve enzimin taşıyıcıdan kolaylıkla ayrılması sorunlara yol açabilir. Bunun da ötesinde bağlanma güçlerinin zayıf olduğu durumlarda enzimin çözünür formuna kıyasla tersiyer yapısının kararlılığının düşük olması söz konusudur. Reaksiyon substratı ya da ürün ile destek arasındaki etkileşim adsorplanmış enzimin desorpsiyonuna neden olabilir. Bu bağlanmadaki geri dönüşümlülük bazı durumlarda ise avantaj olabilir. Protein katalizi uzun süre kullanım nedeniyle inaktive olduğunda, pH'ın ya da solventin değiştirilmesi ile enzimin desorpsiyonu ve ardından yeni biyokatalizörün bağlanma koşullarında ilavesi ile reçinenin rejenerasyonu sağlanabilir.

Fiziksel adsorbsiyon; enzim taşıyıcıya hidrojen bağları, hidrofobik etkileşim ve Van der waal's kuvvetleri gibi fiziksel etkileşimlerin birinin veya tümünün kullanılması ile gerçekleştirilmektedir. Bu fiziksel etkileşimler zayıf kuvvetlerdir, fakat uygun bir bağlanmanın gerçekleşebilmesi için yeterli sayıdadır (Bickerstaff, 1997). Adsorpsiyonun en büyük avantajı genellikle bağ ajanına ihtiyaç duymaması ve aktivasyon basamaklarının minimum olmasıdır. Bağlanma fiziksel kuvvetlerle olduğu için enzimin konformasyonel yapısında diğer yöntemlere göre daha az değişikliğe neden olur. Çok sayıda sentetik reçine ve doğal materyaller taşıyıcı olarak kullanılabilmekte ve bu taşıyıcılar rejenere edilerek tekrar kullanılabilir (Bickerstaff, 1997). Bunların yanı sıra fiziksel adsorpsiyon yöntemi bazı dezavantajlara da sahiptir, enzimin taşıyıcıya zayıf bağlarla bağlanmasından dolayı sıcaklık, pH ve iyonik şiddetteki değişimler enzimin taşıyıcıdan sızmasına ve ürünü kontamine etmesine yol açabilir.

İyonik bağlanma; enzimin iyon değiştirici ajanlar içeren ve suda çözünmeyen bir taşıyıcıya iyonik olarak bağlanması esasına dayanır. Genellikle iyon-değiştirici merkezlere sahip olan polisakkaritler ve sentetik polimerler taşıyıcı olarak kullanılır. Enzimin taşıyıcıya bağlanması kolaylıkla gerçekleştirilebilir. Ayrıca iyonik bağlanma yöntemindeki immobilizasyon koşulları kovalent bağlanmaya göre daha ılımlı olduğu için enzimin konformasyonel yapısında ve aktif bölgelerinde çok az değişiklik gözlenir. Bu yüzden immobilize olmuş enzimin aktivitesi çoğu durumda yüksektir (Bickerstaff, 1997).

İyonik bağlanma ile fiziksel adsorpsiyon arasındaki ana fark iyonik bağlanmada enzim ve taşıyıcı arasındaki bağların fiziksel adsorpsiyona göre daha güçlü olmasıdır. Bunun yanı sıra iyonik bağlar kovalent bağlanma yöntemindeki bağlara kıyaslandığında ise daha zayıftır. Kovalent bağlanmaya kıyasla bağların daha zayıf olması, yüksek iyonik şiddet ya da pH değişimi gibi durumlarda enzimin taşıyıcıdan sızmasına neden olur.

Afinite bağlama iyonik protein adsorpsiyon yöntemlerinin önemli bir alt dalıdır. Hedef enzim ve immobilize ligand arasındaki spesifik elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler istenen proteinin seçici ve sıkı bir şekilde bağlanmasını sağlar. Ligand küçük bir molekül olabileceği gibi antikor gibi büyük bir protein de olabilir. Buna rağmen bağlama kapasitesi, ligandın efektif molekül ağırlığının artışı ile düşme eğilimi göstermektedir. En sık kullanılan afinite bağlama sistemlerinden biri biyotinın avidin ile kombine kullanımıdır. Avidin disosiyasyon katsayısı 10^{-15} M civarında olan spesifik iyon çifti etkileşimi aracılığıyla dört adet biyotin ligandı bağlayan tetramerik bir proteindir. Bu tip immobilizasyonda reaktif fonksiyonel gruba bağlı biyotin türevleri hem katı yüzeye hem de proteine kovalent bağlı konumdadır. Biyotinlenmiş katı öncelikle avidin ile ardından da biyotinlenmiş enzim ile mualeme edilir (Linquiu, 2005). Kapsamlı manipülasyonların kullanılmasının gerekliliği ve maliyet yüksekliği nedeniyle bu yöntem sadece sulu sistemlerde ve pahalı enzimlerin kullanıldığı durumlarda uygun olmaktadır.

1.2.1.2 Kovalent bağlanma

Kovalent bağların oluşumuna dayalı protein immobilizasyonları en çok kullanılan immobilizasyon metodlarından biridir. Enzim ve matris arasında oluşan bağların stabil doğası sayesinde enzimler kullanıldıklarında çözelti ortamına geçmezler. Fakat, yüksek düzeylerde bağlanma aktivitesine ulaşmak için, katalitik aktivitede gerekli olan amino asit artıkları desteğe kovalent bağlanmada yer almamalıdır (Mattiasson and Kaul, 1991). Üründe enzimin olmaması gerektiği sıkı koşullarda immobilizasyon için kovalent metodlar kullanılmaktadır. Matriks üzerindeki fonksiyonel grup mevcudiyetine bağlı olarak çok çeşitli reaksiyonlar

geliştirilmiştir. Aktivasyon işlemleri genellikle destek üzerinde elektrofilik gruplar oluşturmak için tasarlanmıştır, bu gruplar bağlanma adımı sırasında protein üzerindeki güçlü nükleofiller ile reaksiyon verirler (Scouten, 1987).

Kovalent bağlanma ile enzim immobilizasyonu, proteinin yan zincirlerindeki kalıntılarla destek yüzeyindeki reaktif gruplar arasında kovalent bağ oluşumu ile gerçekleştirilmektedir. Kovalent bağlanma çoğunlukla proteinin değerli olduğu durumlarda desorpsiyonun istenmediği koşullarda tercih edilir. Taşıyıcı ve protein arasındaki bağ oldukça güçlü olduğundan hazırlanan bileşik adsorpsiyon ya da enkapsülasyon ile elde edilenlere kıyasla çok daha kararlıdır. Kovalent bağlanmada en çok yer alan fonksiyonel gruplar arasında nükleofilik amino (lizin, histidin ve arginin), tiol (sistein), hidroksil grupları (serin, treonin ve tirozin) ve elektrofilik karboksilat grupları (aspartik asit ve glutamik asit) sayılabilir. Bu fonksiyonel grupların reaktivitesi kimyasal modifikasyonla regüle edilebilir fakat bu aynı zamanda enzimatik aktiviteye zarar verebilir.

İmmobilize enzimin özellikleri destek üzerindeki reaktif grupların seçimi ve dağılımının kontrolü ile değiştirilebilir. Bu sayede protein modifikasyonunun derecesi ve immobilizatın mikro çevresi ayarlanabilir. Bağlanmanın enzimin aktif merkezi dışında kalan kalıntılar üzerinden gerçekleştirilmesi ile aktivite kaybının minimuma indirgenmesi sağlanır. Çoğunlukla proteinin yüzeyindeki primer amino asitler destek yüzeyindeki elektrofilik gruplar ile eşleştirilir. Yüzeyde bulunan lizin ve arginin kalıntıları alkilleme, konjugat ilavesi, imin formasyonu ve açılma yolu ile reaksiyon vermeye müsaittir. Alkilleme ve konjugat ilavesi süreçlerinin sonucunda proteinin net yükü korunmaktadır (James and Alexey, 2002).

Reaktif grubun seçimi önemlidir; çok reaktif grupların tercih edilmesi sonucunda non-spesifik aşırı-modifikasyon ve proteinin aktivitesini ya da kararlılığını etkileyebilecek kimyasal fonksiyonallizasyon (yük ilavesi ya da kaybı) meydana gelebilir. Yaygın olmayan amino asitlere spesifik ajanların kullanıldığı pek çok kısıtlı ve spesifik bağlanma yöntemi mevcuttur.

Çizelge 1. 2 Enzimin kovalent bağlanmasında kullanılan çeşitli aktivasyon metodları ve reaksiyon grupları (matris hidroksil gruplarının aktivasyonu)

Aktivasyon metodu	Reaksiyon grupları	Referanslar
Tresil klorür, Sülfonil klorür	tiyol, amin	Lawson et al., 1983
Siyonojen bromür	amin	Axén et al., 1967
Bisoksiranlar(epoksidler)	tiyol, amin	Porath and Axén, 1976
Epiklorhidrin	tiyol, amin	Porath and Axén, 1976
Glutaraldehit	amin	Porath and Axén, 1976
Glysidol-Glyoxyl	amin	Guisán, 1988
N-hidroksi-süksinimid	amin	Wilchek and Miron, 1982; Drobníck et al., 1982

Kovalent bağlı immobilize enzimin oluşturulması için protein solüsyonu reaktif destek ile muamele edilir. Enzim konsantrasyonu, pH ve iyon şiddeti gibi çeşitli koşulların optimizasyonu ile bağlanma verimi artırılabilir. Bağlanma sırasında aktif bölgenin ve aktif konformasyonun korunabilmesi için kompetitif bir inhibitör ya da yüksek konsantrasyonda substrat kullanılabilir. İnkübasyonun ardından reçine bağlanmamış proteinin uzaklaştırılması amacıyla yıkanır ve uygun bir nükleofilik ya da elektrofilik ajanın (glisin ya da asetik anhidrat) kullanımı ile serbest reaktif bölgeler bloklanır. Katı destek ya da enzimden herhangi biri aktive edilebilir fakat enzimin tersiyer yapısının korunması için genellikle destek materyali aktive edilir. Aktivasyon eşleşme reaksiyonundan önce gerçekleşebilir ya da protein ile destek arasında bağ oluşturmak için bi-fonksiyonel bir bağlayıcı ajan kullanılabilir.

1.2.1.3 Tutuklama ve enkapsülasyon

Prensip olarak tutuklama hücreyi ya da enzim molekülünü belli bir ortamda durmaya zorlamaktır. Hücre ya da enzim bulunduğu çevreden dışarı çıkamaz. Bu işlem için polimer içerisindeki kafeslerde tutuklama ya da hollow-fiber ultrafiltrasyon membranlarında ya da lipozomlarda enkapsülasyon gerçekleştirilebilir. Bu yöntemleri kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel ya da kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır. Tutuklama matrisinin yoğunluğuna göre proteinin mikro çevresi çok az değişebilir ve bu sayede katalitik aktivitedeki kayıp minimize edilebilir. Tutuklama için kullanılan gözenek yapısı substrat ya da ürün gibi küçük moleküllerin geçmesine izin verirken enzimin difüzyonuna izin vermeyecek şekildedir. Gözenek çapının hassas kontrolü yoğunlukla mümkün olmadığından kütle transferinin kısıtlanması tutuklanmış enzim ve hücreler için önemli bir problem olabilmektedir.

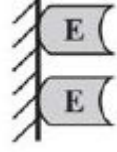
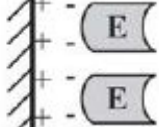
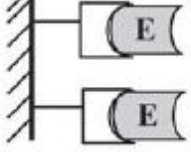
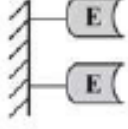
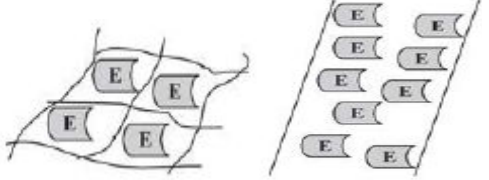
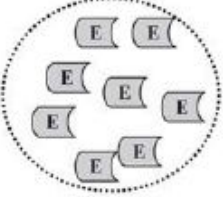
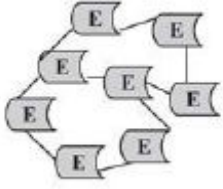
Polimer matrikste tutuklama, yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içerisinde oluşturulması temeline dayanan bir yöntemdir. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece enzim moleküllerinin ana çözeltiye geçmeleri engellenmektedir. Hem hücrelerin hem de enzimin tutuklanmasında poliakrilamit jellerin kullanımı oldukça avantajlıdır. Bu jeller sulu fazdaki çevreye benzer bir çevre oluşturabilecek kadar hidrofilitiktir ve gözenek çapları çapraz bağlayıcı miktarı ve tipi değiştirilerek ayarlanabilir.

Enkapsülasyon terimi biyokatalistin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanmasını ifade etmektedir. Enzimler ya da hücreler mikroskobik yarı geçirgen membranlar (mikro enkapsülasyon) ya da hollow-fiber membranlar içerisinde tutuklanabilir. Mikro enkapsülasyon ile enzim immobilizasyonu, sürekli ve sürekli olmayan yarı geçirgen membran mikro kapsüllerde tutuklama olarak iki grupta incelenebilir. Sürekli mikro kapsüllerde çerçeve membran katı, sürekli olmayan mikro kapsüllerde ise (lipozom) sıvı bir tabakadır (James and Alexey, 2002).

1.2.1.4 Çapraz baēlama

Enzimlerin immobilizasyonu bir taşıyıcı üzerindeki fonksiyonel gruplarla saēlanabildiēi gibi proteinin moleküller arası çaprazlanmasıyla da saēlanabilir; bu yönteme çapraz bağlanma yöntemi denir. İnert taşıyıcı ya da matriks ilavesi olmadan kimyasal çapraz bağlama ile gerçekleştirilen immobilizasyon sürecinde hacimsel aktivitede kayıp olmaksızın biyokatalistin tekrar kullanımı ve kararlılıēının saēlanması mümkündür. Daha önce bahsedilen immobilizasyon yöntemlerinin temel eksikliēi önemli miktarda biyokatalistin ya da inert'in biyokataliste bağlanma amacıyla kullanılmasıdır. oēu durumda kullanılan taşıyıcı miktarı kullanılan proteine oranla en az iki kat fazladır. Ne yazık ki enzimin doērudan çapraz bağlanması ve ardından elde edilen amorf katının çöktürülmesi oēunlukla aktivitede önemli ölçüde düşüş ile sonuçlanmaktadır ve bu nedenle bu yöntem pek tercih edilmemektedir. Bununla birlikte son zamanlarda yapılan çalışmalar çapraz baēlı enzim kristallerinin destek materyaline gereksinim duymaksızın immobilize enzimlerden istenen oēu  zelliēi karřılayabildiēini göstermektedir.

Enzimin konakçı hücre içerisinde kimyasal çapraz bağlanması tutuklanmış ya da enkapsüle edilmiş biyokatalist eldesi için uygulanan basit ve ekonomik bir yöntemdir ve enzimin izolasyonunu ve saflaştırılmasını gerektirmemektedir. Çapraz bağlanma için en çok kullanılan baē ajanı glutaraldehittir. Çapraz baē ajanı olarak kullanılan diēer kimyasallar; toluen diizosiyanat, hekzametilen diizosiyanat, hekzametilen diamin, siyanojen bromür ve karbodiimidlerdir. Bu tarz preparatların mekanik özellikleri zayıftır fakat ortama jelatin ya da sentetik organik polimer ilavesi ile yükseltilebilir. Tüm hücrenin çapraz bağlanması destek materyali aracılıēı ile kararlılıēın arttırılmasının gerekli olmadığı göreceli olarak daha yüksek kararlılıktaki enzimler için etkili bir tutuklama yöntemidir. En önemli endüstriyel biyokatalitik süreçlerden birisi olan fruktoz mısır şurubunun elde edilmesinde çapraz baēlı tüm hücre preparatları kullanılmaktadır. (Linqiu, 2005).

Adsorbsiyon	
İyonik bağlama	
Afinite bağlama	
Kovalent bağlama	
Tutuklama (boncuk ve fiberlere)	
Mikrokapsülleme	
Çapraz bağlama	

Şekil 1.4 Farklı yöntemler ile immobilize edilen enzimlerin temsili gösterimleri.

1.2.2 Enzim immobilizasyonunda ara kol (*spacer arm*) kullanımı

İmmobilizasyon yöntemleri arasında kovalent bağlama en çok çalışan yöntemdir. Polimer ile enzim arasında kovalent bağlama yöntemi ile sağlam bağlar oluşturulduğundan dolayı polimer-enzim konjugatları diğer yöntemlere göre daha stabil olmaktadır. Fakat kovalent bağlanan enzimlerin aktivitesi, konformasyonel değişimlerden ve aktif bölgeye substrat girişi engellenebildiğinden dolayı düşük olabilmektedir. Ara kolların kullanılmasıyla, hem immobilize enzimlerin hareket özgürlüklerinin artması hem de kovalent bağlanmanın yarattığı olumsuz sterik engellemelerin önüne geçilmesi planlanmakta böylece bağlı enzimlerin katalitik aktivitelerinin artırılması beklenmektedir (Yuhong and You-Lo, 2004). Fakat, enzim immobilizasyonu sırasında enzime esneklik kazandırmak için kullanılan ara kolların enzimin aktivitesinin koruması üzerindeki etkisini yorumlamak çoğu zaman karmaşık olabilmektedir. Çünkü ara kolun varlığı genellikle enzimin konformasyonel esnekliğini, yönelimini ve mikroçevresini değiştirmektedir. Uygun bir ara kol seçildiği takdirde genellikle aktivitenin büyük bir kısmı korunmaya devam etmektedir (Şekil 1.5). Özellikle büyük moleküler ağırlığa sahip substratlar için uygun ara kol kullanıldığı takdirde genellikle enzim daha iyi bir esneklik kazanmakta, ara kol kullanılmadan yapılan enzim immobilizasyonu ile karşılaştırıldığında ise sterik engellemeler azaldığından dolayı enzim aktivitesinde önemli bir artış görülebilmektedir (Drobnik et al., 1979; Yodoya et al., 2002).



Şekil 1.5 Kovalent bağlı enzimlerin ara kolsuz (a) ve ara kol (b) kullanılarak yapılan immobilizasyonu.

1.2.3 Enzim immobilizasyonunda destek seçimi

Matriksin sahip olduğu özellikler immobilize enzim sisteminin performansını belirlemede çok önemlidir. İdeal bir destek şu özellikleri içermelidir: (1) basınca karşı fiziksel direnç, (2) hidrofilitiklik, (3) enzimleri türevlendirme kolaylığı doğrultusunda inertlik, (4) biouyumluluk, (5) mikrobiyel ataklara karşı direnç ve (6) düşük maliyette bulunma (Trevan, 1980; Brodelius and Mosbach, 1987; Buchholz and Klein, 1987)

Destek materyalleri kimyasal kompozisyonlarına göre inorganik ve organik olarak sınıflandırılabilen (Çizelge 1.3), organik destekler ise kendi içerisinde doğal ve sentetik polimerler olarak iki kısma ayrılabilir (Cabral and Kennedy, 1991).

Matrikslerin fiziksel özellikleri (ortalama partikül çapı, şişme davranışı, mekanik dayanıklılık, sıkıştırma davranışı gibi) immobilize sistemlerin performansında büyük bir öneme sahip olmakla beraber teknik koşullar altında (karıştırmalı tank, akışkan ve sabit yataklar vb.) kullanılan reaktör tipini de belirlemektedir. Özellikle, gözenek parametreleri ve partikül boyutu toplam yüzey alanını belirlemekte bu durum ise enzimlerin bağlanma kapasitelerini önemli ölçüde etkilemektedir.

Non-poroz destekler çok az difüzyonal sınırlama göstermelerine rağmen düşük yükleme kapasitesine sahiptirler. Bu yüzden poroz destekler genel olarak tercih edilmektedir. Çünkü yüksek yüzey alanı daha çok enzim yükleme olanağı sağlamakta bunun yanı sıra immobilize enzim ortamdan daha iyi korunabilmektedir. Kapasite ve akış özelliklerini optimize etmek için poroz destekler kontrollü bir gözenek dağılımına sahip olmalıdırlar.

İnorganik taşıyıcılarının pek çok avantajı olmasına rağmen (fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal degradasyona karşı yüksek stabilite vs.) endüstriyel uygulamaların birçoğu organik taşıyıcılar ile yapılmakta ayrıca hidrofilitik karakter immobilize enzimlerin aktivite düzeylerini belirlemede en önemli faktörlerden biri olmaktadır (Gemeiner, 1992).

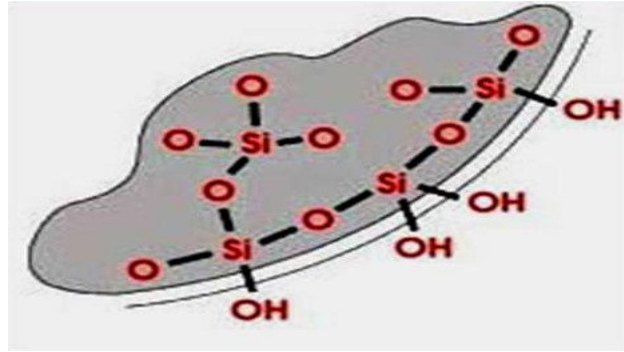
Çizelge 1.3 Destek materyallerinin kimyasal kompozisyonlarına göre sınıflandırılması.

Organik Destekler	<i>Doğal polimerler</i>	1- Polisakkaritler: Selüloz, dekstran, agar, agaroz, kitin, aljinat
		2- Proteinler: Kollojen, albümin
		3- Aktif Karbon
	<i>Sentetik polimerler</i>	1- Polistiren
		2- Diğer polimerler: Poliakrilat, polimetakrilat, poliakrilamid, poliamidler, vinil, alil-polimerler
İnorganik Destekler	1- Doğal mineraller: Bentonit, silika 2- İşlenmiş materyaller: Cam (nonporoz ve kontrollü gözenekli), metaller, kontrollü gözenekli metal oksitler	

1.2.3.1 Silika

Silika (silikon dioksit), tetrahedral veya oktahedral SiO_4 'lerin bağlanması ile oluşan inorganik bir polimerdir. Polimerlerin sonundaki silisyum atomları hidroksil gruplarına bağlıdır. Yüzey hidroksil grupları pK_a 'sı yaklaşık 7,0 olan zayıf Bronsted asitleridir. Ancak, tayin yöntemine göre pK_a değerlerinin 2 ile 10 arasında değişebildiği rapor edilmiştir. pK_a değerlerinin geniş aralıkta değişmesinin nedeni silikadaki metal safsızlıklardır. Silika camdan ya da önemli ölçüde sodyum, alüminyum, titanyum vb. içeren koloidal silikadan üretilmiştir. Silika süspansiyonu pH 3'ten 8'e çıktıkça yüzey giderek artan negatif yük ile yüklenir. Yüzey hidroksil gruplarının deprotonlanması hızlı gerçekleşen bir prosesken, protonlanma nispeten daha yavaştır. pH 8'in üzerinde silika, silikatlar halinde çözünür. Çözünürlük, pH 10'un üzerine çıktıkça üstel olarak artar.

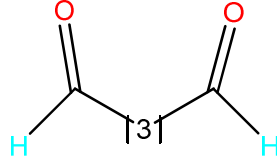
Silika tabanlı stasyonel fazlar, tekrarlanabilirliğin yüksek seviyede olması nedeni ile HPLC alanında yaygın olarak kullanılırlar. Bu yüzden, Wainer ve arkadaşları tarafından tripsinin ilk olarak silika materyal üzerine immobilize edilmesi şaşırtıcı olmamalıdır (Schaefer, 2005). HPLC’de sıklıkla kullanılan silika matriksler sodyum silikatın asitle muamelesi sonucu elde edilirler. Silika yüzeyindeki silanol grupları (Si-OH) silikaya çok hidrofilik ve kolaylıkla modifiye edilebilen bir yapı kazandırır (Şekil 1.6). Ayrıca, silika matriksler sıkıştırılmazlar, organik çözümlerden etkilenmezler ve mekanik olarak kararlılırlar.



Şekil 1. 6 Silika jel yapısı.

1.2.4 Enzim immobilizasyonunda glutaraldehit

Glutaraldehit, immobilizasyon uygulamalarında çapraz bağlayıcı bir ajan olarak kullanılan, $\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CHO})_2$ formülüne sahip bir organik bileşiktir (Şekil 1.7). Glutaraldehit aracılığıyla yapılan kovalent immobilizasyon, enzim immobilizasyonunda çok sık kullanılan teknolojilerden biridir. Glutaraldehit çok yönlü bir reaktiftir. Sahip olduğu yüzey katyonik doğa sayesinde düşük iyonik güç kullanarak proteinlerin hızlı immobilizasyonuna izin vermektedir. Enzim immobilizasyonunda glutaraldehit kullanımının çeşitli yolları bulunmaktadır. En sık kullanılan iki yöntem: (1) daha önce glutaraldehit ile aktive edilmiş destek üzerine enzimlerin immobilizasyonu ve (2) glutaraldehit ile muamele edilen proteinlerin, primer amino gruplarına sahip yüzey üzerine absorpsiyonudur (Betancor et al., 2006).



Şekil 1. 7 Glutaraldehit yapısı.

1.3 Organik Çözücülerde Enzimlerin Kullanımı

Enzimler, organik sentezlerdeki spesifik biyotransformasyonlar için yeni araçlar haline gelmeye başlamıştır. Organik çözücülerde enzimlerin kullanımı organik sentezlerdeki potansiyel uygulamaları büyük ölçüde genişletmektedir. Son yıllarda, susuz ortamlarda enzimlerin kullanımı bu tür ortamlarda enzim aktivitesinin keşfedilmesini sağlamıştır (Klibanov, 1997). Sulu ve organik ortamlar arasında enzim aktivitesi ile ilgili çok sayıda karşılaştırma yapılması mümkün olmamasına rağmen (çünkü enzimler genellikle farklı ortamlarda farklı reaksiyonları katalizlerler), reaksiyon oranlarındaki büyük fark bu iki farklı koşul altında moleküler esneklik ve enzim konformasyonunun tamamen farklı olabileceğini göstermektedir. Birkaç yöntem organik çözücülerde enzim aktivitesini arttırmak için kullanılmaktadır:

- (1) Organik çözünebilen yüzey-enzim komplekslerinin oluşturulması (difüzyon sınırlamasının azaltılması),
- (2) Polimer ile modifiye edilmiş enzimlerin kullanımı (ör: pegile edilmiş enzimler)
- (3) Diğer enzim-polimer komplekslerinin kullanımı ve
- (4) Liyofilize enzim katkı maddelerinin (tuz, polimerler veya diğer yardımcı maddeler gibi) kullanımı (Triantafyllou, 1997).

Proteinler sahip oldukları yapısal ve kimyasal doğal istikrarsızlıkları nedeni ile fiziksel ve/veya kimyasal strese maruz kaldıklarında kısalan yaşam süreçleri göz önüne alındığında biyokatalizör ve terapötik ajan olarak kullanımları

sınırlanmaktadır (Wang, 2005; Polizzi et al., 2007). Bu durumun iyileştirilmesi için, çeşitli metodların geliştirilmesi amaçlanmıştır. Örnek olarak, (1) yardımcı maddelerin eklenmesiyle farmasötik proteinlerin sıvı ve katı faz stabilitesini arttırabilir, (2) geliştirilmiş termodinamik stabiliteye sahip veya kimyasal olarak reaktif olan amino asitleri eksiltmiş mutant paroteinler yaratılabilir, (3) proteinlerin hem *in vitro* hem de *in vivo* stabilitelelerini geliştirmek için proteinler kimyasal olarak modifiye edilebilir (Frokjaer and Otzen, 2005). Belkide bu bağlamda en yaygın kimyasal modifikasyon, proteinlerin yüzeyine poli(etilen glikol) moleküllerinin bağlanmasıdır, bu süreç genellikle PEGilasyon olarak anılmaktadır (Inada et al., 1995; Veronese and Mero, 2008; Pasut et al., 2008). Bununla birlikte PEGilasyon bazı dezavantajlara da sahiptir. Örnek olarak, protein pegilasyonuna genellikle bir aktivite kaybı eşlik etmektedir (Pasut et al., 2008). Bu kaybın büyüklüğü enzime bağlanan PEG moleküllerinin sayısı, lokasyonu ve boyutuna bağlıdır. Belirli bir uygulamada en uygun PEG-protein konjugatlarını seçmek için, PEG moleküllerinin boyutunun ve modifikasyon derecesinin enzim aktivitesi üzerindeki etkileri sistematik olarak incelenmek zorundadır.

1.3.1 Polietilen glikol

Organik çözenlerde enzimleri çözünür kılmak için, enzim molekülleri ile amfipatik moleküllerin hibridizasyonu gerçekleştirilmekte ve bu sayede sıklıkla enzim çözünür hale getirilebilmektedir (Takahashi et al., 1988; Yang et al., 1996). Biyoteknolojik proseslerde yeni bir yaklaşım, enzimlerin hidrofilik ve hidrofobik özelliğe sahip bir makromolekül olan PEG ile modifikasyonu olmuştur. PEG ile modifiye edilen enzimler organik çözenler içerisinde çözünür ve aktif olabilmektedir. Papain, peroksidaz, katalaz, lipaz, kimotripsin gibi modifiye edilen enzimlerin hepsi organik çözeltiler içerisinde çözünmekte ve geri hidroliz reaksiyonlarını, peptid bağı oluşumunu, ester sentez ve değişim reaksiyonlarını etkili bir biçimde katalizleyebilmektedir (Sakurai, 1990). Bu bulgular, biyoteknolojik ve biyomedikal proseslerdeki gelişmelere yeni bir yol açmıştır.

Pegile enzimler 1970'li yıllarda geliştirilmiş ve kullanımının ilk amacı, bazı protein ilaçların antijenitesini ve immünojenitesini azaltmak olmuştur. Daha sonra

Pegile enzimlerin kullanımı ile 1980'lerde biyotransformasyonda kullanılan susuz enzim sistemleri gelişmiştir. PEG ile modifiye edilen enzimler çoğu organik çözeltilerde çözünebilmekte ayrıca organik çözücülerde az çözünen substratlar üzerinde de rol oynayabilmektedirler (Bovara et al., 1994). 1984 yılında Matsushima ve arkadaşları, PEG-kimotripsin konjugatının organik çözücülerde ters proteoliz reaksiyonu ile amid bağı oluşumunu katalizleyebildiğini gösterdikten sonra organik çözücülerde peptid sentezi için yapılan PEG-proteaz çalışmaları Gaertner ve arkadaşları tarafından kapsamlı olarak incelenmiştir. Bu çalışmalarda kimotripsin, papain, subtilisin, termolizin ve tripsin (Kodera et al., 1998) gibi proteolitik enzimler kullanılmıştır. Bu modifiye proteazların substrat spesifiteleri modifiye edilmeyen proteazlarla aynıdır.

Polietilen glikol (PEG) suda ve birçok organik çözeltide yüksek çözünürlüğe sahip olan lineer bir polimerdir. PEG, $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ genel formülüne ve tipik olarak birkaç yüzle- yaklaşık 20.000 arasında değişen moleküler ağırlığı sahiptir. Amfipatik bir makromolekül olan PEG'in hidrofilik doğası sulu çözeltilerde enzimleri modifiye etmeyi mümkün kılarken, hidrofobik doğası modifiye edilmiş enzimleri hidrofobik bir ortamda çözünür yapmaktadır. PEG polimeri toksik, immünojenik ve antijenik özellik göstermemekte ayrıca kolaylıkla kimyasal modifikasyona uğrayabildiğinden kolaylıkla diğer moleküllere ve yüzeylere bağlanabilmektedir. PEGilasyon aktif proteinlere zarar vermemekle birlikte proteinin boyut ve çözünürlük gibi fiziksel özelliklerini düzenlemektedir. Bunun yanı sıra PEG polimerinin bazı enzimlere bağlandığında enzim üzerinde stabilize edici etki gösterdiği belirtilmiştir (Manta et. al., 2003), PEGilasyon proteazların termodinamik stabilitesini arttırmaktadır (Rodríguez-Martínez et al., 2008). PEG konjugatları proteinlerin yüzeylerini maskelemekte ve polipeptidlerin moleküler boyutunu arttırmaktadır. Böylece, renal ultrafiltrasyon azaltılmakta, antikör veya antijen işleyen hücrelerin yaklaşımı önlenmekte, proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilen degradasyon azaltılmaktadır (Veronese, 2001).

Çizelge 1. 4 Polietilen glikol'ün sahip olduğu bazı özellikler (Kodera et al., 1998).

• Amfipatik özelliğe sahiptir sulu çözeltilerde ve bir birçok organik çözeltilerde çözünür
• Non-toksiktir
• Son derece zayıf immünojenik davranış gösterir
• Yüksek konsantrasyonda kullanımı hücrelerin kaynaşmasına sebep olur
• Protein ve nükleik asitleri çöktürmek için kullanılabilir
• Biyoaktif maddeleri ve enzimleri organik veya sulu çözeltilerde çözünürleştirir
• Proteinleri non-immünojenik ve tolerojenik hale dönüştürür
• In vivo PEG-protein ilaçların atılım süresini uzatır
• Biyoaktif maddelerin ve proteinlerin fizyolojik fonksiyonlarının stabilizasyonu sağlar
• Çeşitli ilaçların farmakokinetiğini değiştirir
• Biyolojik makromolekülleri, membranları, hücre partiküllerini ve hücreleri ayırır

1.4 Protein Fragmentasyonu

İnsan serum ve plazma proteomunun kapsamlı analizi, mevcut tahminlere göre yaklaşık 100.000 proteinin (izoformlarda dahil) ekspresyonu rapor edildiği göz önüne alındığında büyük bir zorluk içermektedir. Daha da önemlisi, düşük miktarlarda bulunan proteinlerin analizini yapmak çok zor olmaktadır (Issaq et al., 2007; Anderson and Anderson, 2002). Bu bağlamda bir biyolojik sistemde

ilgilenilen proteinin olası rolüne ışık tutabilmek için izolasyonu, karakterizasyonu ve identifikasyonu adımlarının çok iyi çalışılmış olması gerekir.

Peptid haritalandırma uzunca bir süredir protein analizi için güçlü bir araç olarak kullanılmaktadır. 1970'lerin sonlarından bu yana, bu teknik post-translasyonel modifikasyon tespiti, genetik varyantların belirlenmesi, genetik olarak tasarlanmış protein ürünlerinin kalitesi ile ilgili değerli bilgileri araştırmacılara sunmaktadır (Huberman and Aguilar, 1988; Pohl et al., 1984; Garnick et al., 1988).

Top-down ve Bottom-up yaklaşımlarını kapsayan modern protein identifikasyon yöntemlerinde, peptid kütle haritalama ve MS/MS tabanlı peptid sekanslama anahtar metodlardır. Güvenilir peptid haritaları ve MS / MS tarafından anlamlı sekans verileri elde etmek için sadece ayırma optimizasyonu değil ayrıca proteolitik yıkım koşullarının optimizasyonu da gerekmektedir (Domon and Aebersold, 2006)

Ne amaçla olursa olsun protein yıkımı vazgeçilmezdir. Kimyasal yıkım ile karşılaştırıldığında, enzimatik yıkım sahip olduğu çok yönlülüğü nedeniyle popülerdir (Massolini and Calleri, 2005).

Protein fragmentasyonu, kütle spektrometresi (MS) aracılığıyla yapılan protein identifikasyonlarında önemli bir rol oynamaktadır. Tripsin proteinlerin identifikasyonu ve karakterizasyonu için protein fragmanlamada kullanılan en popüler enzimdir. Tripsin seçiçi olarak lizin ve arginin artıklarından sonra peptid bağlarını yıkarak, kütle spektrometresi (MS) aracılığıyla yapılan yüksek çözünürlük ve duyarlılıkta kütle haritalandırmaları için uygun kütle aralığında peptidler sağlar. Tripsin immobilize enzim sistemleri oluşturabilmek için, nanopartiküller, membranlar, plakalar, birleşik silika kapillerleri, ticari boncuklar ve monolitik materyaller gibi çeşitli yüzeyler üzerine kovalent bağlanabilmekte, tutuklanabilmekte veya fiziksel olarak adsorblanabilmektedir (Junfeng et al., 2008).

Proteoliz iki yolla yapılabilir, bunlardan birincisi klasik çözelti içerisinde gerçekleştirilen homojen yıkım, ikincisi ise katı-faz heterojen yıkımdır. Çözelti içerisinde yapılan tripsin yıkımı ile ilgili hazırlanan protokollerde çok sayıda dezavantajdan bahsedilmektedir; (1) yüksek verimlilik protein identifikasyon teknolojilerindeki (high-throughput protein identification technology) ilerlemeleri sınırlayabilmekte, (2) kapsamlı manuel örnek hazırlama adımları içermekte, (3) uzun inkübasyon süresi gerektirmekte (6-24saat), (4) düşük proteolitik yıkım oranı sağlamakta ve (5) yüksek konsantrasyonda kullanılan tripsin, otolitik fragmentler oluşturarak gözlenen kütle spektrumunu karmaşık hale getirebileceğinden tripsin-substrat oranı düşük tutulmak zorundadır (1:50) (Matsudaira, 1993). Protein analizlerindeki yoğun ilgi göz önüne alındığında, son yıllarda immobilize tripsin konsepti eski protokoller üzerindeki çeşitli avantajları nedeni ile çok fazla dikkat çekmiştir. (1) Geniş enzim-substrat oranı, (2) yüksek yıkım verimliliği, (3) tekrar kullanılabilirliğinin mümkün olması, (4) serbest enzime göre denatürasyon ve inaktivasyon oranının düşük olması bu avantajların başında gelmektedir (Guibault, 1984; Krogh et al., 1999).

Geleneksel biyo-analitik strateji 2D-jel elektroforezi ile kütle spektrometresinin (MS) kombinasyonlarına dayalıdır. Proteinlerin görselleştirilmesi ve ayrıştırılmasında oldukça verimli bir teknik olmasına rağmen 2D-jel elektroforezi kanıtlanmış bazı dezavantajlara sahiptir (Hidrofobik ve membran proteinlerinin sınırlı çözünürlüğü, yüksek asidik ve bazik proteinlere odaklanma güçlüğü, düşük duyarlılık ve otomasyon sorunları). Bu nedenle, günümüzde, 2D-jel elektroforezi alternatif yöntemlerle değiştirilmeye başlanmıştır. Bu yöntemler, sıvı kromatografisi (LC) ve/veya kapiler elektroforez (CE) gibi yüksek verimlilikli ayırma teknikleri kullanarak protein ve peptidlerin ayrılmasını içermektedir. Kapiler elektroforez ve yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) yüksek hassasiyet, hızlı analiz, küçük örnek boyutu, çok sayıda ayırma mekanizması gibi özelliklere sahiptir ve otomasyona müsaittir (Massolini and Calleri, 2005).

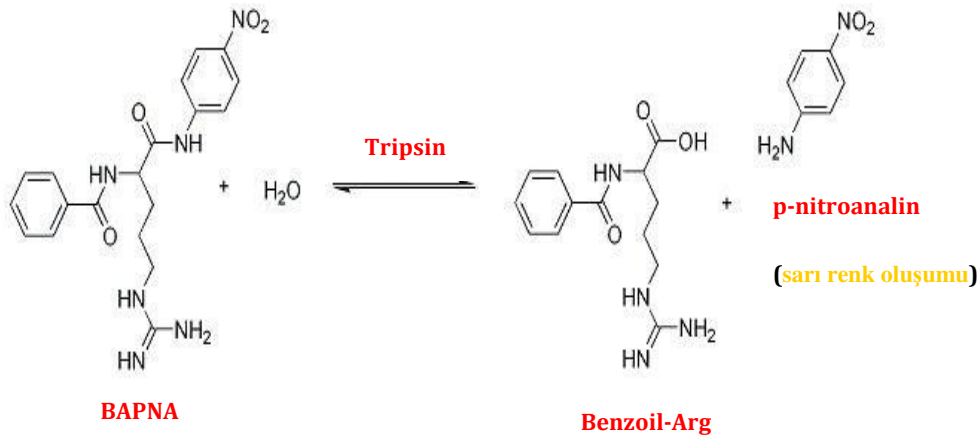
2. MATERYAL ve METOD

2.1 Materyal

Kullanılan kimyasal maddeler; silikon dioksit, glutaraldehit, Coomassie Brilliant Blue G250, N-benzoil-L-arginin-p-nitroanalid (BAPNA), tripsin (1550 U/mg katı, 88 µg protein/mg katı), 1,6-diaminohekzan ve HPLC grade asetronitril ve trifloroasetik asit Sigma Chemical Co. (St. Louis, CA)'den, polietilen glikol (PEG) 2000 ve 5000 Fluka'dan temin edilmiştir. Kullanılan diğer kimyasallar analitik saflıktadır.

2.2 Tripsin Aktivite Tayini

Tripsin aktivitesi, sentetik bir substrat olan N-benzoil-L-arginin-p-nitroanalid (BAPNA) kullanılarak tayin edildi. Prosödürün temeli, reaksiyon sonucu açığa çıkan p-nitro anilinin 410 nm'de spektrofotometrik ölçümüne dayanır (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1 p-Nitro analin oluşumu.

Serbest tripsin aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı; 160 µl 0.1 M pH 7,5 fosfat tamponu, aynı tamponda hazırlanan 20 µl tripsin (10 mg/ml) (27,7 Unit/mg), 20 µl % 0,9'luk NaCl, ve % 0,1'lik 100 µl BAPNA (10 mg BAPNA + 0,2 ml DMSO + 9,8 ml destile du) içermektedir. Kör olarak aynı reaksiyon karışımında tripsin çözeltisi yerine 20 µl 1 mM HCl kullanıldı (Çizelge 2.1).

Çizelge 2. 1 Serbest tripsin aktivite ölçüm protokolü.

	KÖR	ÖRNEK
Fosfat Tamponu	160 µl	160 µl
HCl	20 µl	-
Tripsin	-	20 µl
NaCl	20 µl	20 µl
BAPNA	100 µl	100 µl
<i>28°C'de 10 dakika inkübasyon</i>		
<i>410 nm'de köre karşı absorbans okunur.</i>		

İmmobilize enzim aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı; 360 µl 0.1 M pH 7,5 fosfat tamponu, 50 mg immobilize tripsin preparatı, 40 µl % 0,9'luk NaCl, ve % 0,1'lik 200 µl BAPNA (10 mg BAPNA + 0,2 ml DMSO + 9,8 ml D.Su) içermektedir. Köre olarak aynı reaksiyon karışımında tripsin ile immobilize edilmemiş katı silika preparatları kullanıldı (Çizelge 2.2).

Çizelge 2. 2 İmmobilize tripsin aktivite ölçüm protokolü.

	KÖR	ÖRNEK
Fosfat Tamponu	320 µl	360 µl
HCl	40 µl	-
İmmobilize Tripsin	-	50 mg
NaCl	40 µl	40 µl
BAPNA	200 µl	200 µl
<i>28°C'de 10 dakika 200 rpm de inkübasyon</i>		
<i>410 nm'de üst fazın köre karşı absorbansı okunur.</i>		

Serbest enzim mikropilaka içerisinde 28°C deki ortam sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra mikropilaka okuyucu ile açığa çıkan p-nitro anilin'in 410 nm'de absorbansı okundu. İmmobilize enzim 28°C deki çalkalayıcı inkübatörde 200 rpm de 10 dakika boyunca inkübe edildikten sonra immobilize enzim

preparatı 4°C deki soğutuculu santrifüjde 10,000 rpm de çöktürüldü, daha sonra 200 µl üst faz alınarak mikroplaka okuyucu ile açığa çıkan p-nitro anilin'in 410 nm'de absorbansı okundu. 2-50 nmol/300 µl konsantrasyon aralığında hazırlanan p-nitro anilin standart grafiği kullanılarak enzim aktivitesi sonucu oluşan p-nitro anilin konsantrasyonları hesaplandı.

Bir tripsin aktivite birimi, optimum koşullarda dakikada 1 µmol p-nitro analin açığa çıkaran enzim miktarı olarak ifade edilir (Unit).

2.3 Protein Tayini (*Bradford Metodu*)

Tripsin preparatlarının ve immobilizasyon sonrası yıkama sularının tayini Bradford (Bradford, 1976) metodu ile gerçekleştirildi. Boya bağlama temelli yöntemlerin en yaygını, Bradford tarafından gerçekleştirilen ve Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanıldığı yöntemdir. Yöntem, organik boyaların asidik grupları ile proteinlerin bazik gruplarının (Lys, Arg) etkileşerek renk oluşturması esasına dayanmaktadır.

Sığır serum albümininin (BSA), destile suda hazırlanmış 10 mg/ml'lik stok çözeltisinden 20-200 µl/ml konsantrasyon aralığında hazırlanan standart grafiği kullanılarak örnek protein konsantrasyonları hesaplandı (Çizelge 2.3).

Bradford reaktifi hazırlanışı, 40 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, % 95'lik 50 ml etanolde çözülür, üzerine 55 ml % 88'lik fosforik asit ilave edilerek destile su ile 1 lt'ye tamamlanır ve filtre edilir.

Çizelge 2. 3 Protein miktar tayini (*Bradford Metodu*).

	Standart	Kör	Örnek
Destile su	-	10 µl	-
Standart	10 µl	-	-
Örnek	-	-	10 µl
Reaktif	200 µl	200 µl	200 µl
<i>Tüpler karıştırılır oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir</i>			
<i>595 nm'de köre karşı absorbans okunur.</i>			

2.4 Tripsin İmmobilizasyonu

Ticari olarak temin edilen tripsin enziminin katı destek materyal olan silika (Si-OH) üzerine immobilizasyonunda kovalent bağlama yöntemi tercih edildi. Tripsin immobilizasyonu, glutaraldehit ile aktive edilen silikaya direkt bağlama, 1,6- diaminohekzan ve PEG varlığında bağlama ile üç farklı sistem kullanılarak gerçekleştirildi.

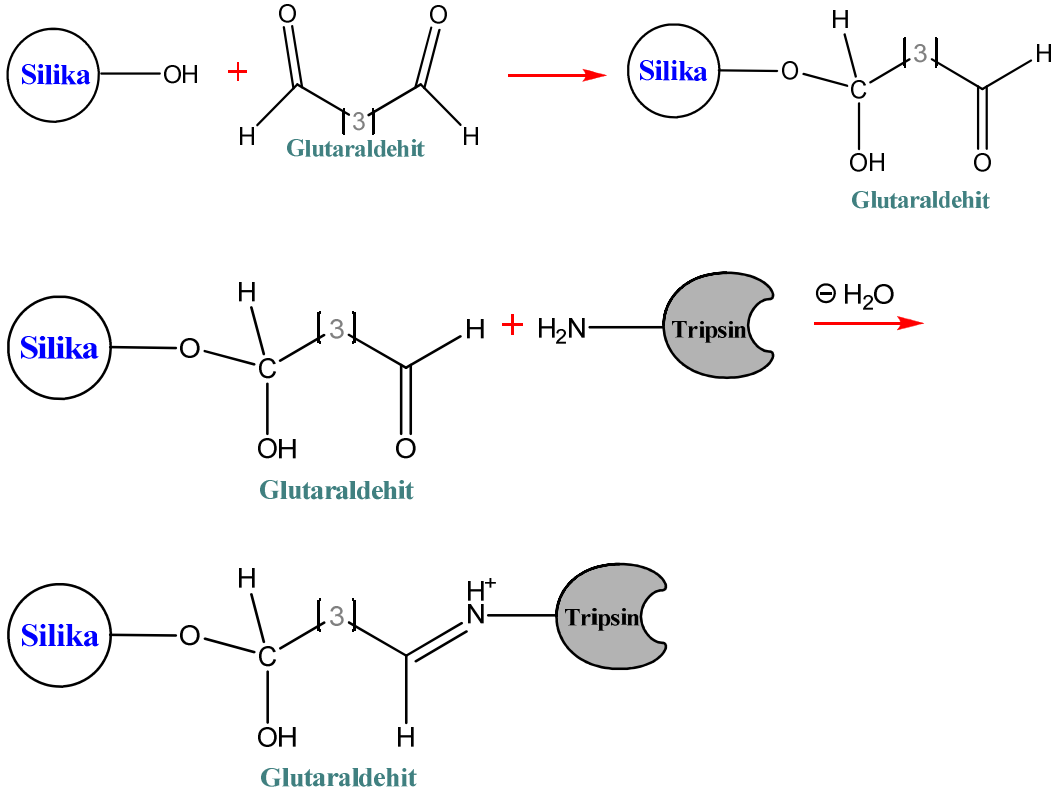
2.4.1 (I) Silika-Gutaraldehit üzerine Tripsin immobilizasyonu

(1) 10 g silikon dioksit, 1 saat boyunca 100 ml % 1'lik glutaraldehit içeren 0.1 M pH 4 asetat tamponu içerisinde, oda sıcaklığında, 200 rpm de orbital karıştırıcıda inkübe edildi.

(2) Glutaraldehit'in aşırısı aktivasyon sonrası destile su ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı.

(3) Yıkama sonrası aktif silikon dioksit, 20 ml tripsin (10mg/ml) (10mg preparat ortalama 0,88 mg protein içermektedir) ve 80 ml 0.1 M pH 7,5 fosfat tamponunda 4°C de 200 rpm de 1 saat orbital karıştırıcıda inkübe edildi.

(4) Enzim immobilizasyonu sonrası immobilize preparat yıkama sularında protein gözlenmeyinceye kadar 0.1 M pH 7,5 fosfat tamponu ile yıkandı ve yıkama sularında protein tayini yapılarak immobilize olan enzim miktarı belirlendi (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2 Glutaraldehit ile aktive edilen silikon dioksit üzerine tripsin immobilizasyonu.

2.4.2 (II) Silika-GA-DAH üzerine Tripsin immobilizasyonu

(1) 10 g silikon dioksit, 1 saat boyunca 100 ml % 1'lik glutaraldehit içeren 0.1 M pH 4 asetat tamponu içerisinde, oda sıcaklığında, 200 rpm de orbital karıştırıcıda inkübe edildi.

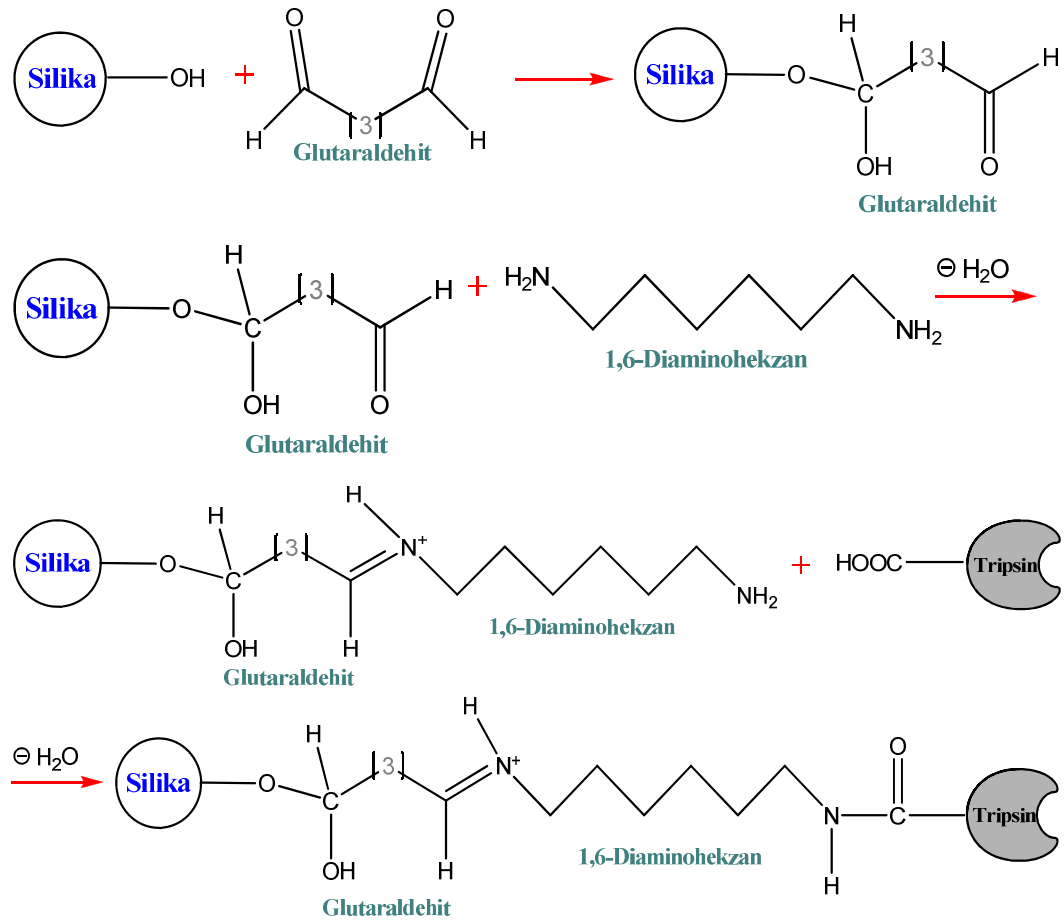
(2) Glutaraldehit'in aşırısı aktivasyon sonrası destile su ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı.

(3) Glutaraldehit ile aktivasyon sonrası silikon dioksit üzerine 0,1 M pH 8,5 bikarbonat tamponunda hazırlanan 100 ml % 0,1'lik 1,6-diaminohekzan ilave edilerek, oda sıcaklığında 2,5 saat süre ile 200 rpm de orbital karıştırıcıda inkübe edildi.

(4) 1,6-diaminohekzan'ın aşırısı destile su ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı.

(5) 1,6-diaminohekzan bağlanan silikaya 20 ml tripsin (10mg/ml) ve 80 ml 0.1 M pH 7,5 fosfat tamponu ilave edilerek 4°C deki orbital karıştırıcıda 200 rpm de 1 saat süreyle enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi.

(6) Enzim immobilizasyonu sonrası immobilize preparat yıkama sularında protein gözlenmeyinceye kadar 0.1 M pH 7,5 fosfat tamponu ile yıkandı ve yıkama sularında protein tayini yapılarak immobilize olan enzim miktarı belirlendi (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Aktif silikon dioksit üzerine 1,6-diaminohekzan bağlayarak tripsin immobilizasyonu.

2.4.3 (III) Silika-GA-PEG2000/5000-DAH üzerine Tripsin immobilizasyonu

(1) 10 g silikon dioksit, 1 saat boyunca 100 ml % 1'lik glutaraldehit ve % 1'lik PEG (PEG2000 ve PEG5000) içeren 0.1 M pH 4 asetat tamponu karışımı içerisinde, oda sıcaklığında, 200 rpm de orbital karıştırıcıda inkübe edildi.

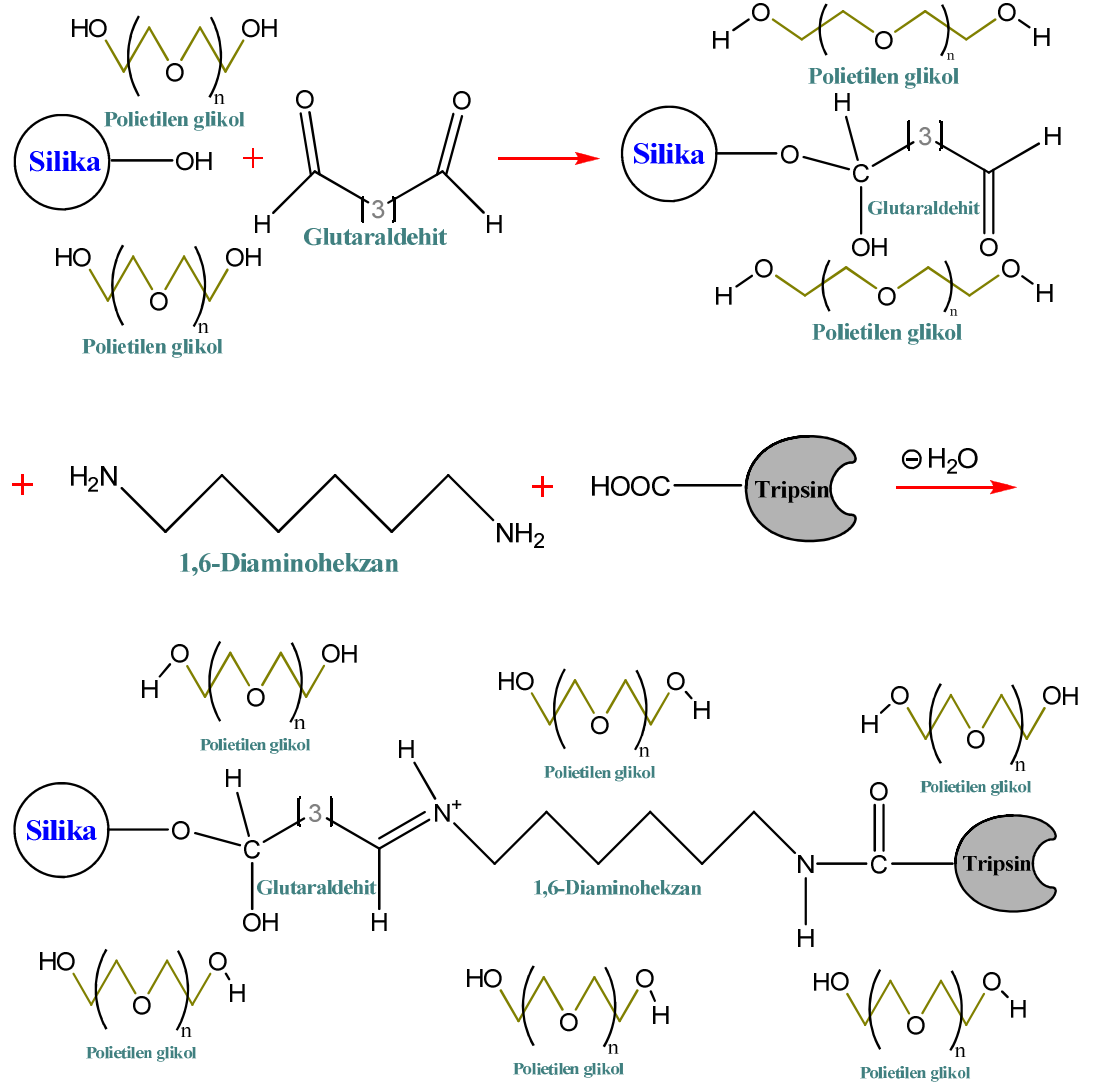
(2) Glutaraldehit ve polietilen glikol'ün aşırısı aktivasyon sonrası destile su ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı.

(3) Silika/Glutaraldehit/PEG üzerine 0,1 M pH 8,5 bikarbonat tamponunda hazırlanan 100 ml % 0,1'lik 1,6-diaminohekzan ilave edilerek, oda sıcaklığında 2,5 saat süre ile 200 rpm'de orbital karıştırıcıda inkübe edildi.

(4) 1,6-diaminohekzan'ın aşırısı destile su ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı.

(5) Elde edilen preparata 20 ml tripsin (10mg/ml) ve 80 ml 0.1 M pH 7,5 fosfat tamponu ilave edilerek 4°C deki orbital karıştırıcıda 200 rpm'de 1 saat süreyle enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi.

(6) Enzim immobilizasyonu sonrası immobilize tripsin preparatı yıkama sularında protein gözlenmeyinceye kadar 0.1 M pH 7,5 fosfat tamponu ile yıkandı ve yıkama sularında protein tayini yapılarak immobilize olan enzim miktarı belirlendi (Şekil 2.4).



Şekil 2. 4 PEG 2000 ve 5000 kullanarak tripsin immobilizasyonu.

2.5 Tripsin İmmobilizasyonu İçin Optimizasyon Çalışmaları

Tripsin'in silikaya immobilizasyonunda kullanılan üç yöntem için öncelikle, en uygun immobilizasyon koşullarının araştırılması amacı ile glutaraldehit konsantrasyonu (% 0.5, % 1, % 1.5, % 2), 1,6-diaminohekzan konsantrasyonu (% 0.1, % 1) ve protein miktarları (0.77 / 1.25 / 2 / 2.58 mg) değiştirilerek tripsin immobilizasyonunun optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.6 Silika Üzerine İmmobilize Edilen Tripsinin Karakterizasyonu

Taşıyıcıya bağlama sonucu enzim molekülünün fiziksel ve kimyasal özellikleri değişmektedir. Bunun başlıca nedenleri; kovalent bağlanma sırasında enzim molekülünün yükü, kimyasal yapısı ve konformasyonunun değişmesi, hareket yeteneğinin sınırlanmasıdır. Bu nedenle silika üzerine immobilize edilen tripsin enziminin karakterizasyonunun yapılması gerekmektedir. Karakterizasyon amacı ile immobilize tripsinin serbest enzime kıyasla optimum pH ve sıcaklığı, uygun enzim miktarı ve organik çözümlerde çalışabilirliği test edildi.

İmmobilize ve serbest enzimlerin aktivitelerinin kıyaslanabilmesi için taşıyıcıya bağlanan enzim miktarının belirlenmesi gerekir. Bu amaçla ilk olarak, immobilizasyon öncesi serbest enzimin protein miktarı ile immobilizasyon sonrası yıkama sularındaki protein miktarları tayinleri Bradford yöntemi ile yapıldı, ilave edilen protein ile yıkama sularındaki bağlanmayan protein miktarları arasındaki farktan immobilizasyon verimi hesaplandı. Ayrıca immobilizasyon öncesi (serbest enzim) ve immobilizasyon sonrası enzim aktiviteleri belirlendi.

2.6.1 Sıcaklık

Enzimlerin katalitik aktivitesi sıcaklığa bağlıdır ve reaksiyon hızı sıcaklıkla beraber bir artış göstermektedir, fakat belirli sıcaklık limitlerinin üzerindeki değerlerde enzim proteininin denatürasyonundan dolayı enzim aktivitesinde düşme gözlenir.

Serbest ve immobilize enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi genellikle optimum eğriler çizilerek izlenir. Bu grafik bağıl aktivitenin sıcaklık ile değişimini gösterir. Genellikle inkübasyon süresi arttıkça termal denatürasyon nedeniyle optimum sıcaklık düşmekte, immobilize edilen enzimin optimum sıcaklığı ise genellikle değişmektedir.

Serbest ve immobilize tripsinin sıcaklığa bağımlı aktivitelerini belirlemek amacı ile 4-85°C sıcaklık aralığında (4, 15, 25, 37, 45, 55, 70, 85°C) çalışıldı ve her iki formun optimum sıcaklık değerleri belirlendi.

2.6.2 pH

Enzimler protein yapısındaki moleküller olduklarından katalitik aktiviteleri çevre koşullarından oldukça etkilenmektedir. Bunlardan biriside ortamın pH'ıdır. İnkübasyon ortamının pH'ı protein molekülünün yük ve dissosiasyon durumuyla beraber aktif merkezi de etkilemektedir. Bu nedenle pH-aktivite ilişkisinin incelenmesi, immobilizasyonun neden olduğu pH-aktivite davranışlarındaki değişimler hakkında bilgi vermekte ayrıca enzim proteinlerinin yapı fonksiyon ilişkilerinin anlaşılması açısından da yol gösterici olmaktadır.

pH'ın serbest ve immobilize enzim aktivitelerine etkisini incelemek için inkübasyon tamponunun pH'ı pH 4-11 aralığında değiştirilerek standart koşullarda aktiviteler ölçüldü. İnkübasyon karışımlarının içerdiği tampon türü ve pH değerleri: Asetat (pH 4-6), fosfat (pH 6-8), tris (pH 8-9) ve bikarbonat (pH 9-11) olarak seçildi.

2.6.3 Aktivite üzerine organik çözen etkisi

Organik çözenlerde, spesifik biodönüşümler için enzimler önemli bir araç olmaktadır, fakat birçok enzim organik çözeltiler içerisinde aktivitelerinin büyük bir kısmını kaybetmektedir. Son yıllarda yapılan kapsamlı çalışmalar sonucunda aktivite kayıplarının nedenleri anlaşılmaya başlamıştır; (1) azalan konformasyonel mobilite, (2) elverişsiz substrat enerjetliği, (3) dönüşüm durum destabilizasyonu ve (4) konformasyonel değişimler bu nedenlerin başında gelmektedir.

Aktif merkezden su moleküllerinin uzaklaştırılması susbtrata yer sağlamak ve spesifik substrat-enzim etkileşimini sağlamak açısından çok önemlidir. Su içerisinde, translasyonel ve rotasyonel entropideki artıştan dolayı aktif merkezden su moleküllerinin çıkarılması enerjetik olarak elverişli olmaktadır. Fakat organik çözenler içerisinde bu durum dramatik bir biçimde değişmektedir çünkü su

moleküllerinin çıkarılması termodinamiksel olarak uygun olmamaktadır ayrıca organik çözümlerdeki düşük dielektrik sabiti yüzünden lizin artıklarının ϵ -amino grupları aspartik ve glutamik asit gibi anyonik artıklar ile tuz köprüleri oluşturarak konformasyonel değişime veya aktif bölge blokajına neden olabilir (Kotzia et al., 2007; Sola' et al., 2006; Rodríguez-Martínez et al., 2009).

Bu durumu düzeltmek için birçok yöntem geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu yöntemlerden belki de en yaygın olarak kullanılanı proteinlerin yüzeylerine polietilen glikol (PEG) moleküllerini bağlayarak protein yüzeylerini kimyasal modifikasyona uğratmaktır.

Organik çözümlerin serbest ve immobilize enzim aktivitelerine etkisini incelemek için farklı oranlarda asetonitril içeren (% 5 ACN-% 0.1 TFA / % 30 ACN-% 0.1 TFA / % 80 ACN-% 0.1 TFA) organik çözeltilerde standart koşullarda aktiviteler ölçüldü. Protein fragmentasyonu sırasında oluşan peptidlerin ayırımı asetonitril gradient elüsyonu ile gerçekleştirileceği için organik çözümler olarak asetonitril seçildi.

2.7 Kararlılık Testleri

İmmobilize enzim preparatları özellikle endüstriyel proseslerde kullanılacaklarsa en önemli kriterlerden birisi bu preparatların kararlılığıdır. İmmobilize enzim kararlılığından anlaşılan, belirli çalışma koşullarında enzim aktivitesinin zamana bağımlı olarak korunmasıdır. Bu sıradaki enzimin aktivite kaybı çeşitli nedenlere dayanır. Bunlar, mikrobiyal yıkım ve termal, pH veya kimyasal inaktivasyon olarak sıralanabilir. Bunun dışında taşıyıcının parçalanması veya başka sebepler ile matriksten enzim kaçıışı da aktivite kaybına neden olur.

İmmobilize enzimin depo ve operasyonel kararlılıkları da önemli parametrelerdir. Genellikle immobilize enzimlerin depo kararlılıkları serbest enziminkinden daha iyidir. Ancak tersi durumlarla da karşılaşılabilir. Depo kararlılığı, uzun süreli saklama koşullarında enzimin aktivite kaybının bir ölçüsüdür. Bu süre içerisinde enzimin katalitik potansiyelinden yararlanılmaz yani enzim iş yapmaz. Operasyonel kararlılık ise enzimin iş yapma sürecinde

aktivitesindeki değişmeyi gösteren bir parametredir. Operasyonel kararlılık ne kadar yüksek ise enzimin katalitik potansiyelinden o ölçüde yararlanılabilir. Operasyonel kararlılığın ölçüsü, enzimin reaktördeki yarı ömrü ($t_{1/2}$) yani enzimin aktivitesinin yarısının kaybolması için geçen süredir.

2.7.1 Termal kararlılık

Enzimler protein yapıda oldukları ve ısıya karşı duyarlı olduklarından, sıcaklık yükseldikçe inkübasyon süresine bağımlı olarak aktivite kaybı hızlanır. Sıcaklık sabit tutulursa bile yalnız inkübasyon süresinin uzaması bile denatürasyon sonucu aktivite kaybına neden olur. Eğer bir enzimin termal kararlılığı immobilizasyon ile değişiyorsa böyle enzimlerin kullanımı pek çok alanda yaygın olacaktır.

Serbest ve immobilize enzim preparatlarının ısı kararlılıklarını yani zamana bağımlı termal kararlılıklarını belirlemek için, 35°C, 45°C ve 55°C de farklı süreler (30, 60, 90 ve 120 dakika) inkübe edilen serbest ve immobilize enzim preparatlarının aktiviteleri standart koşullarda ölçüldü.

2.7.2 pH kararlılığı

Ortamin pH'ının serbest ve immobilize enzimin aktivitesi üzerine etkisini incelemek amacı ile serbest ve immobilize enzim preparatları farklı pH'lardaki (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,) tamponlarda oda sıcaklığında 1 saat boyunca bekletildi ve optimum koşullarda aktivite ölçüldü.

2.7.3 Depo kararlılığı

Depo kararlılığı, immobilize enzim uygulamalarını ilgilendiren önemli bir parametre olup uzun süre saklama durumunda enzimin aktivite kaybının bir ölçüsüdür.

Depo kararlılığını belirlemek için 4 °C’de aynı koşullar altında saklanan serbest ve immobilize enzimlerden belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak aktiviteleri optimum koşullarda tayin edildi.

2.7.4 Operasyonel kararlılık

Enzimlerin operasyonel kararlılığı, immobilize sistemlerin endüstriyel uygulamalarında önemli bir parametredir. İmmobilize enzimlerin operasyonel kararlılıkları, kesikli karıştırmalı bir tank reaktörden çeşitli zaman aralıklarında alınan örneklerin standart koşullarda aktivitesinin ölçülmesi ile belirlendi. Operasyon zamanı ile enzim aktivitesindeki azalma arasındaki ilişki belirlenerek biyokatalizatörün yarı ömrü ($t_{1/2}$) hesaplandı.

İmmobilize tripsin operasyonel kararlılığını ölçmek için hazırlanan kesikli karıştırmalı reaktör; 900 µl 0,1 M pH 8 fosfat tamponu, 100 µl NaCl (% 0,9), 500 µl BAPNA (% 0,1) ve 10 mg immobilize tripsin içerir. Operasyon sıcaklığı 35°C olarak seçilmiştir. Reaktörden farklı zaman aralıklarında örnekler alınarak standart koşullarda aktiviteler ölçüldü.

2.8 İmmobilize Tripsinin Tekrar Kullanılabilirliği

Enzim immobilizasyonundaki en önemli amaçlardan biri taşıyıcıya immobilize edilmiş olan enzimin bir proseste kullanıldıktan sonra geri kazanımı ve tekrar kullanılabilmesidir.

İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliğinin belirlenebilmesi için optimum koşullarda aktivitesi ölçülür. Daha sonra immobilize enzim, immobilizasyon prosesi esnasında kullanılan uygun tampon çözelti ile yıkanır ve tekrar aktivite ölçümü yapılır. Bu işlemler ardarda tekrarlanarak enzimin kaçınıcı ölçümde ne kadar aktivite kaybettiği tespit edilir.

Enzim immobilizasyonu sonrasında, organik çözen içerisinde immobilize enzimin protein fragmentasyon potansiyeli çalışılması hedeflendiği için immobilize enzimlerin organik çözenler içerisinde tekrar kullanılabilir olup

olmadığının araştırılması gerekmektedir, bu nedenle tekrar kullanılabilirlik denemesi hem uygun tampon çözeltide, hemde farklı yüzdelere sahip organik çözümler içerisinde gerçekleştirildi.

2.9 İmmobilize Tripsin ile Protein Fragmentasyonu

Hızlı protein identifikasyonundaki en önemli gelişmelerden birisi peptid haritalandırmadır. Peptid haritalandırma, proteinin proteolitik yıkımını sonrası peptid fragmanlarının ayrılması ve sekanslanması ile gerçekleştirilir.

Bu teknik proteinlerin primer yapılarını çalışmak için kullanıldığı gibi, (1) proteinlerin patolojik değişikliklerinin tesbiti (Petricoin et al., 2003; Patton, 2002), (2) ilaç etkileşimleri için potansiyel hedeflerin görüntülenmesi (He et al., 2003), (3) post-translasyonel modifikasyonların tespiti, (4) genetik değişikliklerin identifikasyonu ve (5) rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen proteinlerin kalite kontrolü (Garnick et al., 1988) gibi geniş bir amaca hizmet etmektedir.

Üretilen peptidlerin dedeksiyonu genellikle, MALDI TOF (matrix-assisted laser desorption ionization/ time-of-flight) kütle spektrometresi (Bienvenut et al., 2002) veya sıvı kromatografi (LC) sistemi ile birleştirilen ESI-MS/MS (electrospray ionization tandem mass spectrometry) sistemleri ile yapılmakta (Frohlich et al., 2006) ve her iki stratejide de protein identifikasyonu; elde edilen peptid kütlelerinin proteomic veritabanlarındakiler ile karşılaştırılması yolu ile gerçekleştirilmektedir.

Peptid haritalandırma stratejilerinde protein yıkımı vazgeçilmezdir. Güvenilir peptid haritaları ve MS tarafından anlamlı sekans verileri elde etmek için yıkım koşullarının optimizasyonu şarttır. Bu amaç ile çalışmanın son aşaması olarak immobilize edilen tripsin'in BSA (sığır serum albümin) proteinini fragmanlama potansiyeli araştırıldı. Bu süreçte ilk olarak, fragmentasyonu öncesi yıkım etkinliğini arttırmak için klasik protokole göre bir ön muamele işlemi yapılarak protein denatürasyonu ve sistein köprülerinin indirgenmesini sağlandı (Nicoli et al., 2008). Çalışma sırasında hızlı ve etkili protein fragmentasyonu ve peptid ayırımı sağlamak amacı ile immobilize enzimlerle iki farklı sistem kuruldu.

Birinci sistemde, immobilize enzimlerle çözelti ortamında protein fragmentasyonu gerçekleştirilerek HPLC ile protein fragmanlarının ayrılması sağlandı, ikinci sistemde ise on-line immobilize enzim sistemi geliştirmek amacıyla, immobilize enzimler kolon dolgu materyali olarak kullanılarak HPLC kolonu dolduruldu ve protein fragmentasyon kolonu olarak kullanılmak üzere HPLC sisteminde ayırım kolonunun öncesine bağlandı, böylece aynı anda protein fragmentasyonu ve peptid ayırımı gerçekleştirilmeye çalışıldı.

3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

3.1 Tripsinin Silika Destek Üzerine Kovalent İmmobilizasyonu

Proteazlar endüstriyel ve biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Fakat endüstriyel proseslerde doğal enzim kullanımı, operasyon ve saklama süreci sırasında enzimin otoliziz etkisi, proteinde meydana gelen yanlış katlanmalar ve agregasyon sonucunda biyokatalitik aktivitelerini hızlı kaybetmeleri ve stabil olmamaları göz önüne alındığında sınırlanmaktadır. Bunun yanı sıra enzimleri substrat çözeltisinden çıkarmak zordur ve bu durum, ürün kontaminasyonuna sebep olabilir (Villalonga et al., 2000; Zhang et al., 2001; Ruckenstein and Guo, 2001).

Yüzey tipinin (biçim, partikül boyutu, porozite, kimya, mekanik güç vb.) ve amino asitlerin kimyasal modifikasyonuna yol açtığı için immobilizasyon metodunun, bağlı enzimlerin biyolojik aktiviteleri üzerinde büyük etkileri olduğu açıkça gösterilmiştir. Seçilen immobilizasyon tekniği enzimin katalitik aktivitesini sürdürmesine izin vermeli ayrıca kullanılan materyalin hidrofobisitesi, yükü ve kimyasal karakteri protein stabilitesini etkileyebildiği unutulmamalıdır (Martin and Anders, 2000; Podgornik and Tennikova, 2002).

Tripsin ile yapılan yıkımların çoğu çözelti içerisinde yapılmaktadır. Çok sayıda dezavantajı beraberinde getiren bu durum yüksek platformlu protein identifikasyon teknolojisindeki ilerlemeleri sınırlayabilmektedir. Otolizizden kaçınmak için tripsin-substrat oranı düşük tutulmakta bunun sonucunda ise uzun yıkım sürelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Çözelti içerisinde gerçekleştirilen yıkımlarda, yıkım oranı substrat konsantrasyonu ile sınırlıdır. Bu yüzden, düşük mikromolar substrat konsantrasyonlarını içeren çözeltilerde uygun protein identifikasyonu elde etmek için gerekli peptidlerin üretimi sorunlu olmaktadır (Quadroni and James, 1999). Uzun inkübasyon sürelerinin kullanılması, kaçınılmaz olarak transpeptidasyon ve nonspesifik yarıma (Schaefer et al., 2005), deaminasyon ve oksidasyon, tripsin otoliz ürünleri gibi çok sayıda yapay yıkımlara yol açmakta ayrıca manüel örnek hazırlama ve bununla beraber oluşan ekstra adımlar peptid kayıplarına neden olabileceği gibi insan keratini gibi

kontaminasyon girişimlerine neden olabilmektedir (Hunyadi-Gulyas and Medzihradszky, 2004; Karty et al., 2002; Lundell and Schreitmuller, 1999).

Proteomik alanında, immobilize enzim sistemleri peptid haritalandırmada kullanılan bir araçtır. Bu süreçte proteoliz sonrası oluşan peptid fragmanlarının identifikasyonu ile proteinler kimliklendirilir. Günümüzde bu analizlerin birçoğu limitasyonlarına rağmen 2D jel elektroforezi aracılığıyla yapılmaktadır. Bu prosedürde en çok zaman harcanan adım proteaz kullanılarak proteinlerin yıkımıdır.

Yüksek platformlu analizler (high throughput analysis) üzerindeki yoğun ilgi sonucu, katı-faz parçalama konsepti (tripsinin katı destek üzerine immobilizasyonu gibi) sunduğu çeşitli avantajlar sayesinde son yıllarda çok fazla ilgi toplamıştır (Matsudaira, 1993; Dogruel et al., 1995; Gao et al., 2001). Enzim immobilizasyonu sayesinde enzimin denatürasyon veya inaktivasyon oranı azalmakta böylece enzim katalitik aktivitesini uzun süre sürdürmekte ve bunun sonucunda iyi tekrarlanabilirlik sağlamaktadır. Böylece immobilize tripsinin kullanımı, iz seviyedeki örnekler için daha uygun olup, yüksek platformlu otomasyona (high-throughput automation) uyum sağlamak ve toplamda düşük maliyetli olmaktadır.

Günümüzde, triptik parçalama uygulanan analitik protokolünün zaman sınırlayıcı adımı olarak kabul edilmektedir. Çözelti içerisinde yapılan protein fragmentasyonunun; çok sayıda dezavantajı da beraberinde getirdiği göz önüne alındığında fragmentasyon etkinliği önemli derecede düşmektedir. Bu bağlamda, çalışma sırasında katı destek üzerine tripsin immobilizasyonu yapılarak sürecin hızlanması sağlandı. Bunun için ilk olarak, katı destek olarak seçilen silikaya enzim immobilizasyonu, glutaraldehit aracılığıyla farklı yöntemler denenerek gerçekleştirildi. İmmobilizasyon veriminin belirlenmesinden sonra karakterizasyon çalışmalarına geçildi. Bunun için, serbest ve immobilize enzim preparatlarının optimum sıcaklığı, optimum pH'ı, kararlılığı (termal, pH, depo, operasyonel, tekrar kullanılabilirlik) araştırıldı. Karakterizasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan preparatın organik çözügede kullanılabilme etkinliği test edildi. Son aşama da ise immobilize sistem otomatize hale getirilmeye çalışılarak

protein fragmentasyonunda yenilikçi bir strateji geliştirilmeye çalışıldı, bunun için öncelikle seçilen protein örneğinin (BSA) fragmentasyonu öncesi yıkım etkinliğini arttırmak için klasik protokole göre bir ön muamele işlemi yapılarak denatürasyonu ve sistein köprülerinin indirgenmesini sağlandı (Nicolini et al., 2008), daha sonra immobilize sistemin online HPLC sisteminde kullanım potansiyelleri araştırıldı. İmmobilizasyon ve fragmentasyon ile ilgili sonuçlar bu bölümde alt başlıklar halinde çizelge ve şekillerde verilerek çalışma ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

3.1.1 Tripsin immobilizasyonu için glutaraldehit miktarının optimizasyonu

Taşıyıcıya kovalent bağlama ile enzim immobilizasyonunda ilk adım, taşıyıcının aktivasyonudur. Taşıyıcının aktivasyonu çeşitli reaktifler (Glutaraldehit, CNBr, CDI, Tirazin, Epoksit vb.) ile gerçekleştirilebilmektedir. Bu çalışmada glutaraldehit tercih edilmiştir, çünkü çok yönlü bir reaktif olan glutaraldehit sahip olduğu yüzey katyonik doğa sayesinde düşük iyonik güç kullanarak proteinlerin hızlı immobilizasyonuna izin vermektedir. Bunun için, aktive edilen taşıyıcının aktivasyon düzeyi optimize edilmelidir.

Taşıyıcı aktivasyonu için kullanılacak uygun glutaraldehit miktarını belirlemek için değişen miktarlarda (% 0.5, % 1, % 1.5, % 2) glutaraldehit kullanılarak aktivasyon gerçekleştirildi. Farklı miktarlarda glutaraldehit ile aktive edilen 500mg'lık taşıyıcılara tripsin preparatı (2.24 mg protein içeren) immobilize edilerek % immobilizasyon verimleri ve aktivite hesaplandı. Sonuçta, 500 mg taşıyıcı başına yapılan aktivasyonda en yüksek aktivite verimi % 1'lik glutaraldehit ile elde edildi (Çizelge 3.1).

Taşıyıcının aktivasyon derecesine bağımlı olarak immobilize enzimin spesifik aktivitesinin önce artması ve belirli bir değerden sonra azalması beklenen bir durumdur. Çünkü taşıyıcı üzerindeki reaktif grup düzeyi belirli bir değeri aştıktan sonra, enzim moleküllerinin birçok noktadan taşıyıcıya bağlar, istenmeyen bu durum enzimin üç boyutlu yapısını değiştirebildiği gibi aktif merkeze substrat ulaşımında engelleyerek enzim aktivitesinde düşüşe neden olur.

İmmobilizasyon sırasında ortama eklenen PEG moleküllerinin enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelendiğinde, PEG moleküllerinin molekül büyüklükleri enzim immobilizasyonu sırasında enzimin aktif yüzeye ulaşmasını zorlaştırmakta, yüksek seviyede hidrojen bağı yapma kapasiteleri sayesinde enzimi sararak stabilitesini arttırmakta fakat bu sırada aktif merkeze substrat ulaşımı engellendiğinden diğer immobilizasyon yöntemine göre aktivitede düşüş görülmektedir. PEG 2000'den PEG 5000'e çıkıldığında molekül büyüklüğü ile paralel olarak aktivite düşüşü beklenen bir durumdur.

Çizelge 3. 1 Tripsin immobilizasyonu için glutaraldehit miktarının optimizasyonu.

GA (%)	İmmobilizasyon Yöntemi	Bağlanan Protein (mg)	İmmobilizasyon Verimi (%)	Spesifik Aktivite (nmol/dkmg)	Total Aktivite (nmol/dk)
0,5	Silika-GA	1,48	66,0	19,8	29,3
	Silika-GA-Peg2000	1,03	46,0	9,6	9,9
	Silika-GA-Peg5000	1,07	47,8	8,0	8,6
1,0	Silika-GA	1,54	68,4	23,5	36,1
	Silika-GA-Peg2000	1,03	45,8	9,8	10,1
	Silika-GA-Peg5000	1,04	46,2	9,0	9,4
1,5	Silika-GA	1,94	86,0	17,7	34,3
	Silika-GA-Peg2000	1,13	50,0	9,3	10,5
	Silika-GA-Peg5000	0,88	39,1	8,4	7,4
2,0	Silika-GA	1,61	71,5	9,7	15,6
	Silika-GA-Peg2000	1,20	53,3	9,4	11,3
	Silika-GA-Peg5000	1,04	46,2	5,3	5,5

(İmmobilizasyon sırasında: 2,24 mg protein/500 mg silika, % 1'lik PEG 2000 ve 5000 kullanıldı)

3.1.2 Tripsin immobilizasyonu için 1,6-diaminohekzan miktarının optimizasyonu

İmmobilizasyon sırasında özellikle BSA gibi büyük moleküler ağırlığa sahip substratlar için uygun ara kol (*spacer arm*) kullanıldığında, genellikle enzim daha iyi bir esneklik kazanmakta, ara kol kullanılmadan yapılan enzim immobilizasyonu ile karşılaştırıldığında ise sterik engellemeler azaldığından dolayı enzim aktivitesinde önemli bir artış görülebilmektedir. Bu nedenle uzatıcı kolun immobilizasyon aktivite verimliliği üzerindeki etkinliği çalışıldı. % 1 Glutaraldehit ile aktive edilen taşıyıcı üzerine farklı konsantrasyonlarda (% 0.1, % 1) 1,6-diaminohekzan takılarak % immobilizasyon verimleri ve aktivite hesaplandı. Sonuçta, takılan kol ile en iyi aktivite verimi % 0.1'lik 1,6-diaminohekzan konsantrasyonu kullanılan immobilizasyonda bulundu (Çizelge 3.2). Kol takılmadan yapılan immobilizasyonlar ile karşılaştırıldığında hemen hemen aynı immobilizasyon ve aktivite verimine ulaşıldı, fakat BSA gibi çok büyük substratlar yerine BAPNA gibi küçük bir sentetik substrat kullanıldığı için büyük bir farklanma gözlenmemesinin normal olduğu düşünüldü.

Çizelge 3. 2 Tripsin immobilizasyonu için 1,6-diaminohekzan miktarının optimizasyonu.

Dah (%)	İmmobilizasyon Yöntemi	Bağlanan Protein (mg)	İmmobilizasyon Verimi (%)	Spesifik Aktivite (nmol/dkmg)	Total Aktivite (nmol/dk)
0,1	Silika-GA-Dah	1,08	72,3	19,2	28,0
	Silika-GA-Peg2000-Dah	0,75	50,3	16,7	21,4
	Silika-GA-Peg5000-Dah	0,72	48,0	8,3	10,0
1,0	Silika-GA-Dah	0,97	64,6	14,2	18,0
	Silika-GA-Peg2000-Dah	0,71	47,3	15,8	20,7
	Silika-GA-Peg5000-Dah	0,64	42,6	13,8	17,0

(İmmobilizasyon sırasında: 1,5 mg protein/500 mg silika, % 1'lik GA ve % 1'lik PEG 2000 ve 5000 kullanıldı)

3.1.3 Tripsin immobilizasyonu için bağı protein miktarının optimizasyonu

Tripsin immobilizasyonu için uygun GA ve Dah oranı belirlendikten sonra immobilizasyon etkinliğine protein miktarının etkisini incelemek amacı ile taşıyıcıya, aktifleyici ajan ve ara kol miktarı sabit tutularak farklı protein konsantrasyonlarındaki tripsin preparatlarının (0.77 / 1.25 / 2 / 2.58 mg) aynı koşullarda immobilizasyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 3. 3 Tripsin immobilizasyonu için bağı protein miktarının optimizasyonu.

Protein Miktarı (mg)	İmmobilizasyon Yöntemi	Bağlanan Protein (mg)	İmmobilizasyon Verimi (%)	Spesifik Aktivite (nmol/dkmg)	Total Aktivite (nmol/dk)
0,77	Silika-GA	0,56	72	10,7	6,0
	Silika-GA-Dah	0,44	57	18,2	8,0
	Silika-GA-Peg2000-Dah	0,24	31	14,2	3,4
	Silika-GA-Peg5000-Dah	0,14	18	16,3	2,2
1,25	Silika-GA	0,8	64	9,4	7,6
	Silika-GA-Dah	0,63	50	13,5	8,4
	Silika-GA-Peg2000-Dah	0,49	39	10,4	5,1
	Silika-GA-Peg5000-Dah	0,37	30	6,5	2,4
2,00	Silika-GA	1,10	55	9,1	9,6
	Silika-GA-Dah	1,00	50	11,0	10,9
	Silika-GA-Peg2000-Dah	0,67	33	9,9	6,7
	Silika-GA-Peg5000-Dah	0,67	33	6,7	4,5
2,58	Silika-GA	1,50	58	7,5	11,2
	Silika-GA-Dah	1,00	39	13,8	13,8
	Silika-GA-Peg2000-Dah	1,20	46	8,0	9,8
	Silika-GA-Peg5000-Dah	1,15	45	3,7	4,2

(İmmobilizasyon sırasında: 500 mg silika, % 1'lik GA, % 0,1'lik Dah ve % 1'lik PEG 2000 ve 5000 kullanıldı)

Protein miktarı arttıkça % immobilizasyon veriminde çok büyük bir değişiklik olmamasının yanında aktivitede düşme gözlemlendi (Çizelge 3.3). Taşıyıcının birim kütlesi başına bağlanan protein miktarı arttıkça enzimlerin sıklıkla bağlanması nedeni ile enzim molekülleri birbirlerine sterik engel oluşturmakta, sonuç olarakta enzim moleküllerinin gösterdiği aktivite düşmektedir. Bunun yanı sıra bu çalışma sonucunda ara kol kullanımının aktiviteyi iyileştirdiği gözlemlenmiştir.

Takip eden immobilizasyon çalışmalarında immobilize edilen optimum protein miktarı olarak yaklaşık 0,77 mg'a denk gelen 10 mg/ml tripsin preparatı kullanıldı.

3.2 İmmobilize Tripsinin Karakterizasyonu

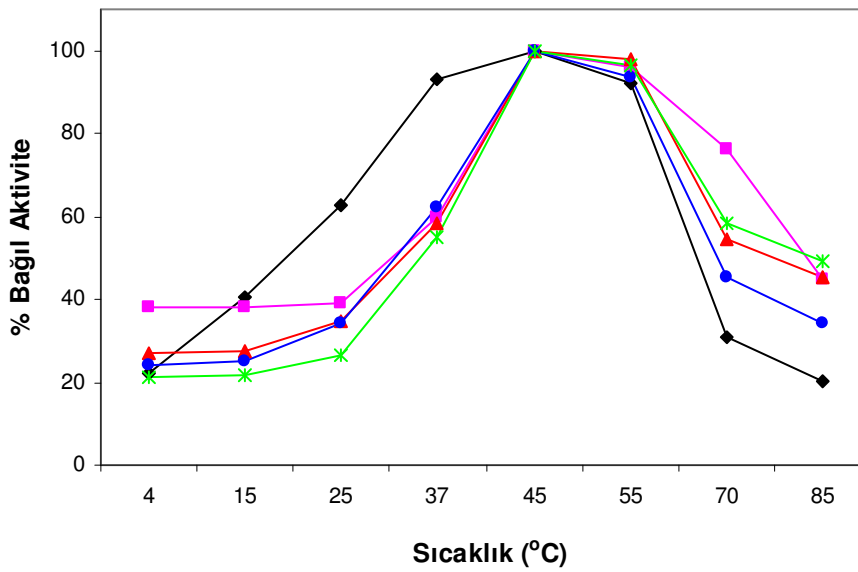
3.2.1 Sıcaklık etkisi

Enzimlerin katalitik aktivitesi sıcaklığa bağlıdır. Serbest ve immobilize enzimlerin aktivitelerine sıcaklığın etkisi genellikle optimum eğriler çizilerek izlenmektedir. Bağlı aktivitenin sıcaklıkla değişimini gösteren bu grafikten enzim için 'optimum sıcaklık' değeri belirlenir.

Sıcaklığın serbest ve immobilize tripsin aktivitesine etkisi bölüm 2.5.2'de açıklandığı gibi serbest ve immobilize enzimin aktivitelerinin farklı sıcaklıklarda standart koşullarda ölçülmesi ile belirlenmiştir (Şekil 3.1).

Genellikle hayvansal kaynaklı tripsinlerin optimum sıcaklık değerleri 40-65°C arasında değişmektedir (Guyonnet et al., 1999; Ahsan, 2001; Venkatesh et al., 1998; Kishimura et al., 2002). Şekil 3.1'de görüldüğü gibi serbest ve immobilize enzimler için optimum sıcaklık değeri 45°C olarak bulundu. Bu sonuç immobilizasyon işleminin tripsinin optimum sıcaklığında bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Enzimler protein yapıdaki büyük ve oldukça komplike moleküllerdir. Aktivitesinin korunması için üç boyutlu yapısı korunmalıdır. Aktiviteye etki eden en önemli parametrelerden biri sıcaklıktır. Reaksiyon hızı

sıcaklık arttıkça artar, fakat belirli bir sıcaklıktan sonra enzimde meydana gelen protein denatürasyonundan dolayı aktivitede düşme olur. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık olan optimum sıcaklık, özellikle operasyonel bir parametre olması açısından önemlidir. Literatürlerde çeşitli taşıyıcılarda immobilize edilmiş glukoz izomerez, lösin aminopeptidaz, kimotripsin, tripsin ve asparaginaz gibi bazı enzimlerin optimum sıcaklıklarının immobilizasyon sonrasında değişmediği örnekler mevcuttur (Önal, 2000).

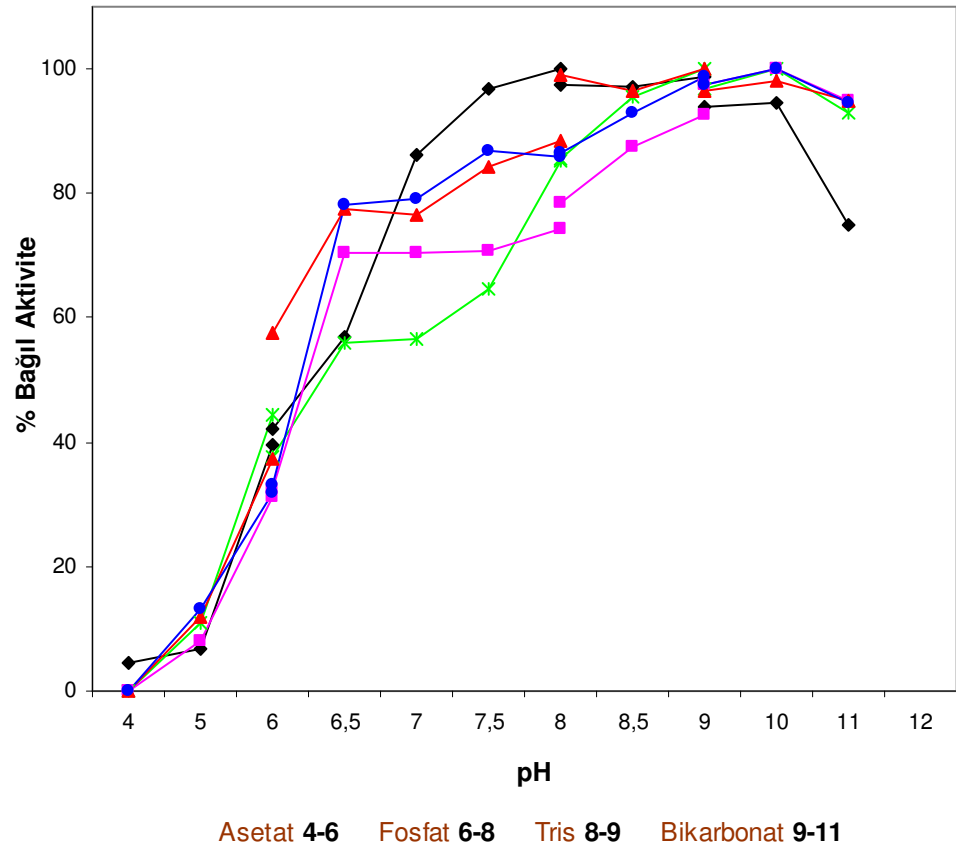


Şekil 3.1 Serbest ve immobilize tripsin aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimi [(◆): Serbest Tripsin (■): Silika-GA-Trypsin (▲): Silika-GA-Dah-Trypsin (●): Silika-GA-Peg2000-Dah-Trypsin (*): Silika-GA-Peg5000-Dah-Trypsin]

3.2.2 pH etkisi

Enzim aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden birisi de pH etkisidir. Bir enzimin pH optimumu; reaksiyon süresi, sıcaklık, substrat yapısı ve konsantrasyonu, ortamın iyonik şiddeti, enzimin saflığı gibi bir seri deneysel parametreye bağlı bir değişkendir. Biyokimyasal reaksiyonlar ‘*in vivo*’ koşullarda sulu ortamda gerçekleştiğinden pH enzimin yük durumunu dolayısı ile aktivitesini çok etkiler. Hayvansal kaynaklı tripsinlerin optimum pH değerleri genellikle 7,0-9,5 arasında değişmektedir (Asgeirsson et al., 1989; Kishimura et

al., 2002; Fengna et al., 2004). Serbest ve immobilize tripsin aktivitesine pH etkisi ve optimum pH bölüm 2.5.3'te açıklandığı gibi belirlenerek (Şekil 3.2), serbest enzim için optimum pH 8,0 olarak bulunurken immobilize enzimlerde, Silika-Ga-Dah-Tripsin yönteminde optimum pH 9,5 diğerlerinde ise optimum pH 10,0 olarak bulundu.



Şekil 3.2 Serbest ve immobilize tripsin aktivitelerinin pH'a bağlı değişimi [(♦): Serbest Tripsin (■): Silika-GA-Tripsin (▲): Silika-GA-Dah-Tripsin (●): Silika-GA-Peg2000-Dah-Tripsin (*): Silika-GA-Peg5000-Dah-Tripsin]

Enzim immobilizasyonundan sonra pH değişimi üç faktör ile açıklanabilir: (1) destek materyalinin polianyonik veya polikasyonik karakteri, (2) enzim molekülünün immobilizasyon sırasında modifikasyonu, (3) enzimatik reaksiyon sonrası ürünlerin asidik ya da bazik olması (Zihnioğlu, 1992).

İmmobilize enzimlerin optimum pH değerlerinin bazık bölgeye kayması, taşıyıcıya amino gruplarından bağlanan enzimin sahip olduğu pozitif yüklü grup sayısında immobilizasyon sonrasında meydana gelen azalma nedeniyle, enzimin daha polianyonik karakter kazanmasından kaynaklanmaktadır (Vasudevan et al., 2004).

3.2.3 Aktivite üzerine organik çözen etkisi

Organik çözücülerde enzimlerin kullanımı organik sentezlerdeki potansiyel uygulamaları büyük ölçüde genişletmekte, fakat birçok enzim organik çözeltiler içerisinde aktivitelerinin büyük bir kısmını kaybetmektedir. Bu çalışma sırasında immobilize enzim ile gerçekleştirilecek olan protein fragmentasyonu, online HPLC ayırım sistemleri ile kombine edileceğinden, enzime organik çözen stabilitesi kazandırılması gerekmektedir. Bu amaç ile farklı immobilizasyon yöntemleri çalışılarak organik çözen stabilitesi incelendi.

Organik çözenlerde elde edilen immobilize enzim aktivitesi tamponlu ortamda elde edilen ile karşılaştırıldığında, % 5'lik organik çözen içerisindeki aktivite tamponlu ortamdaki aktivite ile hemen hemen aynı sonucu verirken, % 30'luk organik çözenin aktiviteyi 2 kattan fazla arttığı görüldü, fakat organik çözen miktarı % 80 gibi yüksek bir seviyeye çıkarıldığında aktivitenin tamponlu ortamdaki aktiviteye göre düşüş gösterdiği belirlendi (Çizelge 3.4, Çizelge 3.5, Çizelge 3.6). Literatüre bakıldığı zaman, immobilize tripsin kullanılarak yapılan protein yıkımlarında, proteinlerin yıkım verimliliği yıkım sırasında organik çözücülerin kullanımı ile artabildiği görülmüştür (Slysz and Schriemer, 2003, 2005). Çünkü asetonitril gibi organik çözeltilerin varlığında proteinler denatüre olma eğiliminde oldukları için aktif bölge ulaşılabilirliği artmaktadır (Slysz and Schriemer, 2003).

Organik çözen stabilitesini arttırmak için immobilizasyon sırasında kullanılan PEG molekülleri, immobilize enziminin aktivitesini diğer immobilizasyon yöntemlerine göre % 30'luk organik çözen içerisinde en yüksek seviyeye taşıdığı belirlendi (Çizelge 3.5).

Serbest enzim ile gerçekleştirilen organik çözen çalışmalarında hiçbir organik çözen yüzdesinde serbest tripsin aktivite göstermemiştir. Bu sonuç organik çözen stabilitesi için enzim immobilizasyonun ne kadar önemli olduğunu vurgulamaktadır.

Çizelge 3. 4 % 5 Asetonitril-% 0.1 Trifloroasetikasit çözeltisinde immobilize tripsinin gösterdiği spesifik ve total aktiviteler.

Protein Miktarı (mg)	İmmobilizasyon Yöntemi	Bağlanan Protein (mg)	İmmobilizasyon Verimi (%)	Spesifik Aktivite (nmol/dkmg)	Total Aktivite (nmol/dk)
0,77	Silika-GA	0,56	72	14,8	8,3
	Silika-GA-Dah	0,44	57	20,3	8,9
	Silika-GA-Peg2000-Dah	0,24	31	17,3	4,2
	Silika-GA-Peg5000-Dah	0,14	18	13,1	1,8
1,25	Silika-GA	0,80	64	13,2	10,6
	Silika-GA-Dah	0,63	50	18,3	11,5
	Silika-GA-Peg2000-Dah	0,49	39	11,1	5,4
	Silika-GA-Peg5000-Dah	0,37	30	5,8	2,1
2,00	Silika-GA	1,10	55	12,2	13,4
	Silika-GA-Dah	1,00	50	13,7	13,7
	Silika-GA-Peg2000-Dah	0,67	33	8,5	5,7
	Silika-GA-Peg5000-Dah	0,67	33	4,2	2,8
2,58	Silika-GA	1,50	58	9,7	14,6
	Silika-GA-Dah	1,00	39	15,1	15,1
	Silika-GA-Peg2000-Dah	1,20	46	7,1	8,5
	Silika-GA-Peg5000-Dah	1,15	45	2,8	3,2

(İmmobilizasyon sırasında: 500 mg silika, % 1'lik GA, % 0,1'lik Dah ve % 1'lik PEG 2000 ve 5000 kullanıldı)

Çizelge 3. 5 % 30 Asetonitril-% 0.1 Trifloroasetikasit çözeltisinde immobilize tripsinin gösterdiği spesifik ve total aktiviteler.

Protein Miktarı (mg)	İmmobilizasyon Yöntemi	Bağlanan Protein (mg)	İmmobilizasyon Verimi (%)	Spesifik Aktivite (nmol/dkmg)	Total Aktivite (nmol/dk)
0,77	Silika-GA	0,56	72	26,4	14,8
	Silika-GA-Dah	0,44	57	30,0	13,2
	Silika-GA-Peg2000-Dah	0,24	31	33,2	8,0
	Silika-GA-Peg5000-Dah	0,14	18	18,0	2,5
1,25	Silika-GA	0,80	64	20,8	16,6
	Silika-GA-Dah	0,63	50	25,0	15,8
	Silika-GA-Peg2000-Dah	0,49	39	20,4	10,0
	Silika-GA-Peg5000-Dah	0,37	30	7,3	2,7
2,00	Silika-GA	1,10	55	18,6	20,5
	Silika-GA-Dah	1,00	50	19,1	19,1
	Silika-GA-Peg2000-Dah	0,67	33	15,5	10,4
	Silika-GA-Peg5000-Dah	0,67	33	6,3	4,2
2,58	Silika-GA	1,50	58	13,9	20,9
	Silika-GA-Dah	1,00	39	21,9	21,9
	Silika-GA-Peg2000-Dah	1,20	46	12,0	14,4
	Silika-GA-Peg5000-Dah	1,15	45	4,0	4,6

(İmmobilizasyon sırasında: 500 mg silika, % 1'lik GA, % 0,1'lik Dah ve % 1'lik PEG 2000 ve 5000 kullanıldı)

Çizelge 3. 6 % 80 Asetonitril-% 0.1 Trifloroasetikasit çözeltisinde immobilize tripsinin gösterdiği spesifik ve total aktiviteler.

Protein Miktarı (mg)	İmmobilizasyon Yöntemi	Bağlanan Protein (mg)	İmmobilizasyon Verimi (%)	Spesifik Aktivite (nmol/dkmg)	Total Aktivite (nmol/dk)
0,77	Silika-GA	0,56	72	11,5	6,4
	Silika-GA-Dah	0,44	57	8,9	3,9
	Silika-GA-Peg2000-Dah	0,24	31	5,9	1,4
	Silika-GA-Peg5000-Dah	0,14	18	9,5	1,3
1,25	Silika-GA	0,80	64	5,8	4,6
	Silika-GA-Dah	0,63	50	7,9	5,0
	Silika-GA-Peg2000-Dah	0,49	39	6,0	3,0
	Silika-GA-Peg5000-Dah	0,37	30	5,2	1,9
2,00	Silika-GA	1,10	55	5,0	5,5
	Silika-GA-Dah	1,00	50	5,9	5,9
	Silika-GA-Peg2000-Dah	0,67	33	5,5	3,7
	Silika-GA-Peg5000-Dah	0,67	33	2,7	1,8
2,58	Silika-GA	1,50	58	3,8	5,7
	Silika-GA-Dah	1,00	39	5,2	5,2
	Silika-GA-Peg2000-Dah	1,20	46	4,0	4,8
	Silika-GA-Peg5000-Dah	1,15	45	1,6	1,8

(İmmobilizasyon sırasında: 500 mg silika, % 1'lik GA, % 0,1'lik Dah ve % 1'lik PEG 2000 ve 5000 kullanıldı)

3.3 Kararlılık Testleri

Enzim preparatlarının kararlılığı, belirli çalışma koşullarında enzim aktivitesinin zamana bağımlı olarak korunmasıdır. İmmobilizasyon sonucunda, bazen enzimlerin kararlılığı artmakta, bu olumlu değişme özellikle endüstriyel proseslerde kullanılacak olan immobilize enzimler için önemli bir avantaj olmaktadır. Enzimlerin kararlılığı denince genellikle proteinin konformasyonel

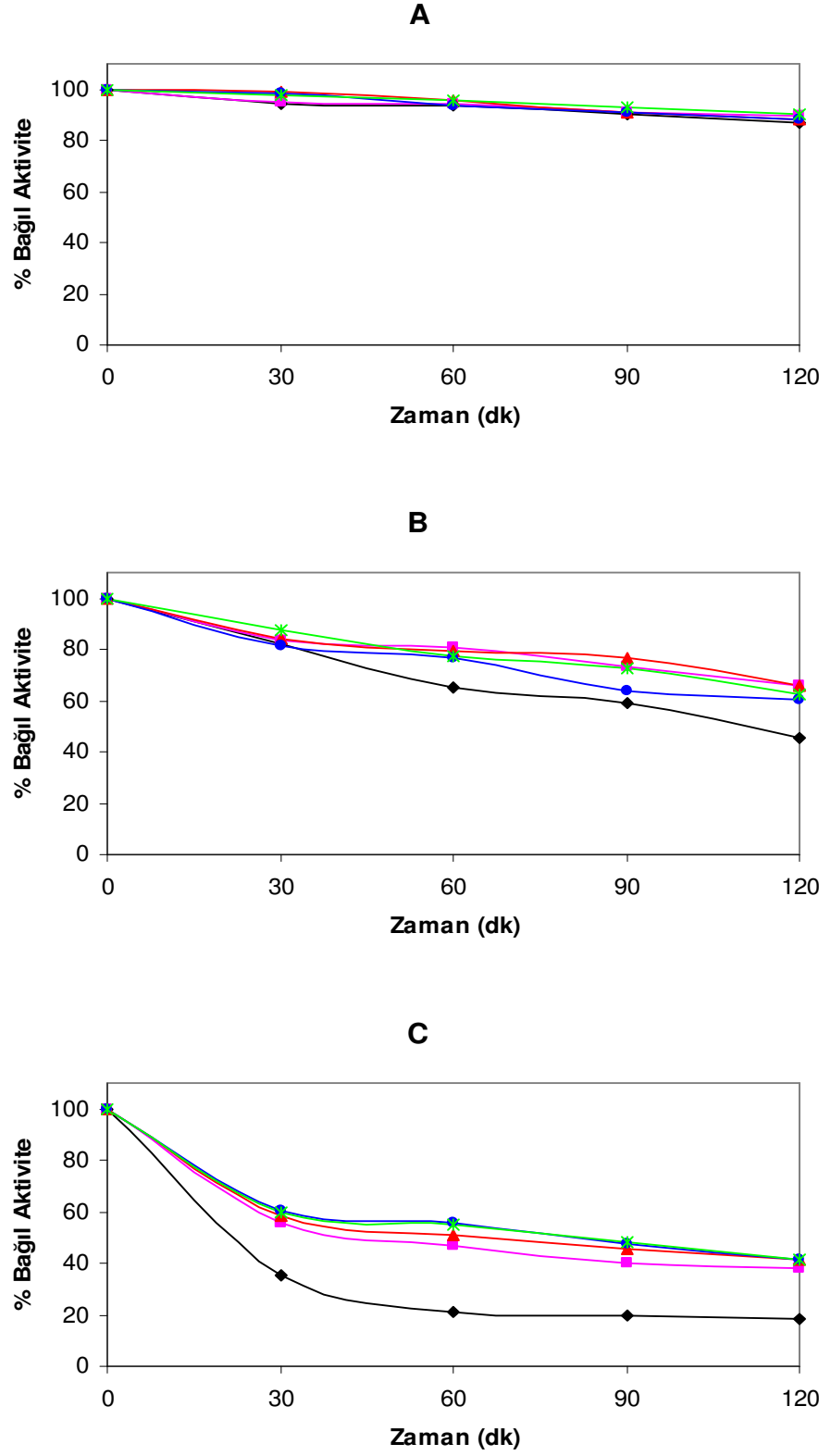
kararlılığından söz edilir. Enzimin termal, pH ve depo kararlılıkları büyük ölçüde konformasyonel kararlılığı ile belirlenir ve denatürasyon sonucunda inaktivasyon gerçekleşir. Bir enzimin kararlılığı, sıcaklık, pH, iyon şiddeti, tampon türü, substratın varlığı ve yokluğuna bağlı olarak değişim gösteren önemli bir parametredir. Çünkü enzimler oldukça karmaşık yapıli proteinlerdir. Enzimin üç boyutlu yapısına etki edecek bir faktör, enzimin aktivitesine de etki eder (Telefoncu, 1997).

3.3.1 Termal kararlılık

Enzimlerin kararlılığına etki eden parametrelerden en önemlisi sıcaklıktır. Genellikle enzimler düşük sıcaklıklarda daha kararlı olurken yüksek sıcaklıklarda hızlı termal denatürasyona uğrar.

İmmobilizasyon sonrasında enzimin termal kararlılığı artabilir, azalabilir yada hiç değişmez, fakat genellikle kovalent bağıli suda çözünmez enzimlerin ısıya ve denatüre edici ajanlara karşı serbest forma göre daha dayanıklı olduğı ve termal kararlılığın daha iyi olduğı bilinmektedir. İmmobilize enzimlerin termal kararlılığı endüstriyel uygulamalar açısından en önemli kriterlerden birisidir. Yüksek sıcaklıklarda kararlı kalabilen enzimlerin özellikle yüksek sıcaklık gerektiren bir çok endüstriyel proseste kullanım imkanı söz konusudur (Telefoncu, 1997; Mitsutomi et al., 1985; Hayashi et al., 1993).

Enzimler protein yapılarından dolayı ısıtmaya dayanıklı değillerdir ve pratik olarak enzim reaksiyonu yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilemez. Bölüm 2.6.1’de açıklandığı gibi serbest ve immobilize tripsinin ısı kararlılıkları yani zamana bağımlı termal kararlılıkları 35, 45 ve 55°C için belirlendi. (Şekil 3.3). Bunun için aynı miktar protein içeren serbest ve immobilize enzimler önce 35, 45 ve 55°C’de farklı süreler (30, 60, 90 ve 120 dakika) inkübe edilip ardından standart koşullarda aktiviteleri ölçüldü.

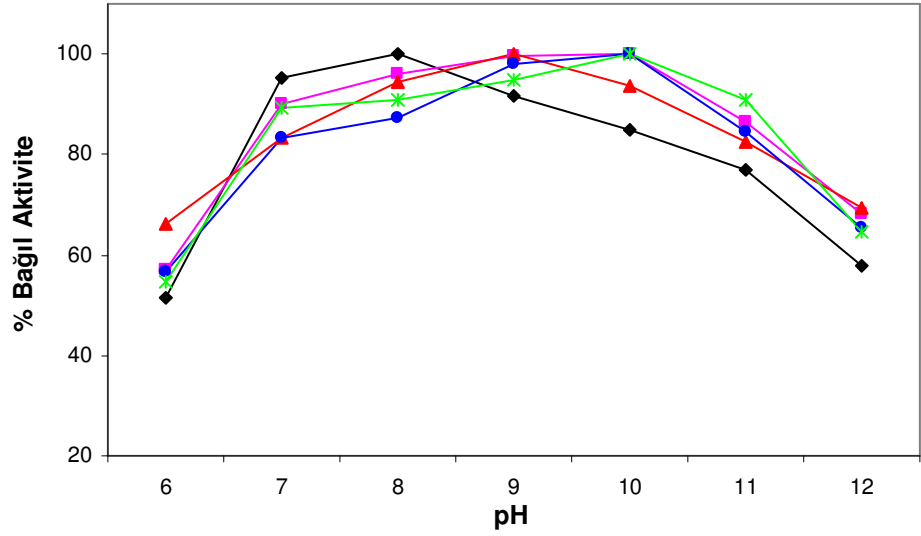


Şekil 3.3 Serbest ve immobilize tripsinin ön inkübasyon süresine bağımlı termal kararlılıkları [(♦): Serbest Tripsin (■): Silika-GA-Tripsin (▲): Silika-GA-Dah-Tripsin (●): Silika-GA-Peg2000-Dah-Tripsin (*) : Silika-GA-Peg5000-Dah-Tripsin] [A: 35°C'deki Termal Stabilité B: 45°C'deki Termal Stabilité C: 55°C'deki Termal Stabilité]

Şekil 3.3’de görüldüğü gibi serbest ve immobilize tripsin arasındaki termal kararlılık farklanması sıcaklık arttıkça artmaktadır. Serbest enzimin 120 dakika boyunca 35, 45 ve 55°C’deki inkübasyonlarının ardından standart koşullarda aktivite ölçümü yapıldığında, enzimin 35°C’de kararlı bir yapıya sahip olduğu (% 87) fakat sıcaklık arttıkça, 45°C sıcaklıkta 120 dakikanın sonunda aktivitesinin yarısını (% 45) koruyabildiği, sıcaklık 55°C’ye çıkarıldığında ise 120 dakikanın sonunda ancak aktivitesinin % 18’lik kısmını koruyabildiği belirlenmiştir. Immobilize tripsin ise serbest enzime göre daha iyi bir kararlılığa sahip olup, immobilizasyon yöntemleri arasında büyük bir fark olmaksızın, aynı süre ve sıcaklıklarda sırasıyla aktivitelerinin ortalama, 35°C’de % 89’unu, 45°C’de % 65’ini ve 55°C’de % 40’ını korumaktadırlar. Düşük sıcaklıklarda ürün oluşumu daha sabit bir hızda olurken, reaksiyon zamanına bağlı olarak yüksek sıcaklıklarda hız azalır. Bu da ortamdaki enzim miktarındaki azalmadan kaynaklanır. Çünkü enzim, zaman ve sıcaklığa bağlı olarak denatüre olmaya başlar. Düşük sıcaklıklarda enzim daha karardır fakat sıcaklık arttıkça denatürasyon artar ve moleküllerin birçoğu denatüre hale geçmek için yeterli enerjiye sahip olurlar (Chibata, 1978). Sığır pankreatik tripsini için yapılan denemelerde enzimin 50°C’ye kadar aktivitesinin büyük bir kısmını koruduğu, bu sıcaklığın üzerindeki sıcaklıklarda aktivitesinin hızla kaybettiği belirtilmiştir (Fernandez et al., 2005). Çeşitli immobilize tripsin preparatlarının da 70-80°C’ye kadar kararlı olduğu belirtilmiştir (Montero et al., 2007; Fernandez et al., 2005).

3.3.2 pH kararlılığı

Enzimler protein yapıda olduklarından, kararlılıklarına etki eden her faktör proteinin sekonder, tersiyer ve/veya kuarter yapılarını da etkiler. Çoğu enzim, aşırı asidik yada bazik koşullarda tersinmez denatürasyona uğrar. Bir enzimin pH kararlılığı: inkübasyon koşulları, sıcaklık, inkübasyon süresi, tampon türü ve konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, iyonik şiddet gibi birçok faktör ile modifiye edilebilir. Serbest ve immobilize tripsinin pH kararlılığı bölüm 2.6.2’de açıklandığı gibi belirlendi. Bunun için serbest ve immobilize enzim farklı pH’lardaki tamponlarda 1 saat boyunca bekletildi ardından standart koşullarda altivite ölçüldü.



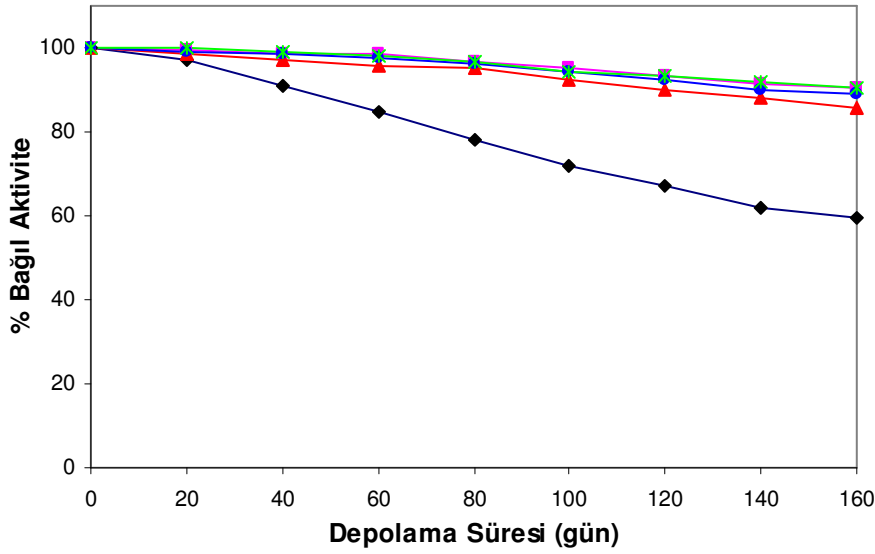
Şekil 3.4 Serbest ve immobilize tripsinin pH kararlılıkları [(◆): Serbest Tripsin (■): Silika-GA-Tripsin (▲): Silika-GA-Dah-Tripsin (●): Silika-GA-Peg2000-Dah-Tripsin (*): Silika-GA-Peg5000-Dah-Tripsin]

Şekil 3.4’de görüldüğü gibi, immobilizasyon yöntemleri arasında büyük bir farklanma görülmeksizin immobilize enzimlerin pH kararlılıkları arasında paralel sonuçlar elde edildi, immobilize enzimler serbest enzim ile karşılaştırıldığında serbest enzim pH 7-9 aralığında stabilitesini korurken immobilize enzimlerin bazik bölgede (pH 7-11) daha kararlı bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. Hayvansal kaynaklı tripsin genelde pH 6-9 aralığında karardır (Kishimura et al., 2002; Fengna et al., 2004). Silika jel ile desteklenmiş kitosan boncuklara immobilize edilen tripsinin serbest enzime kıyasla bazik bölgede daha yüksek kararlılık gösterdiği belirtilmiştir (Fengna et al., 2004).

3.3.3 Depo kararlılığı

Depo kararlılığı, özellikle immobilize enzimlerin uygulama alanı ile ilgili önemli bir faktördür. Depo kararlılığı, enzimin saklama koşullarına bağlı bir parametredir. Genellikle, suda çözünmez enzim preparatları, liyofilize edilerek yada süspansiyon şeklinde 4-5°C’de saklanabilirler.

Serbest ve immobilize tripsinlerin depo kararlılıkları bölüm 2.6.3’de açıklandığı gibi belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 3.5’de verilmiştir.



Şekil 3.5 Serbest ve immobilize tripsinin depo kararlılıkları [(♦): Serbest Tripsin (■): Silika-GA-Tripsin (▲): Silika-GA-Dah-Tripsin (●): Silika-GA-Peg2000-Dah-Tripsin (*): Silika-GA-Peg5000-Dah-Tripsin]

Şekil 3.5’de görüldüğü gibi 160. günün sonunda immobilize enzimlerin depo kararlılıkları serbest enzim ile karşılaştırıldığında immobilize enzimlerde aktivitenin önemli oranlarda korunduğu belirlendi. Buna göre sırasıyla, Silika-GA-Tripsin immobilizasyonunda % 90.3, Silika-GA-Dah-Tripsin immobilizasyonunda % 85.6, Silika-GA-PEG2000-Dah-Tripsin immobilizasyonunda % 89.1, Silika-GA-PEG5000-Dah-Tripsin immobilizasyonunda % 90.4’lük aktivite korunumu sağlanırken serbest enzimin aktivite korunumu % 59,5’de kalmıştır. Enzimleri uzun süre saklama durumlarında, enzim immobilizasyonunun enzimdeki aktivite kaybını önemli bir ölçüde azalttığı görülmektedir.

3.3.4 Operasyonel kararlılık

Operasyonel kararlılık enzimin iş yapma süresince aktivitesindeki değişmeyi gösteren bir parametredir ve operasyon süresi ile operasyon sıcaklığına bağlı olarak değişir. Ayrıca bir enzimin katalitik potansiyeli operasyonel kararlılığı ile orantılıdır. Operasyonel kararlılığın ölçüsü enzimin reaktördeki yarı ömrüdür ve $t_{1/2}$ ile ifade edilir. Daha doğru bir tanımlama ile enzimin aktivitesinin yarısının yitirilmesi için geçen zamandır ve şu eşitlik ile hesaplanır:

$$t_{1/2} = 0,693 k_D \quad k_D = 2,303 / t \times \log(A_0/A)$$

t: operasyon süresi, k_D : bozunma katsayısı, A_0 ve A sırası ile başlangıç ve t anındaki enzimatik aktiviteyi göstermektedir (Telefoncu, 1997).

İmmobilize tripsinler için operasyonel kararlılık bölüm 2.6.4’de açıklandığı gibi belirlendi. Operasyon sıcaklığı 35°C olarak seçildi. Belirli zaman aralıklarında reaktörden alınan immobilize enzim örneklerinin aktiviteleri standart koşullar altında ölçüldü. Bozunma katsayıları (k_D), her bir immobilizasyon yöntemi için yukarıdaki formül kullanılarak hesaplandı. Çizelge 3.7’de her bir immobilizasyon yöntemi için hesaplanan k_D değerleri ve ortalamaları verilmiştir.

Çizelge 3. 7 İmmobilize tripsinin farklı zamanlardaki k_D değerleri.

<i>Operasyon Süresi (dakika)</i>	<i>Silika-GA-Tripsin</i> k_D	<i>Silika-GA-Dah-Tripsin</i> k_D	<i>Silika-GA-PEG2000-Dah-Tripsin</i> k_D	<i>Silika-GA-PEG5000-Dah-Tripsin</i> k_D
60	0,0013	0,0064	0,007	0,00041
90	0,0023	0,0072	0,0052	0,00092
120	0,0037	0,0088	0,0051	0,0016
150	0,0031	0,0071	0,0055	0,0014
180	0,0033	0,007	0,0053	0,0017
210	0,0061	0,012	0,0061	0,0022
240	0,0054	0,011	0,0053	0,0021
270	0,0053	0,01	0,0056	0,0024
300	0,0048	0,011	0,0055	0,0022
330	0,0055	0,01	0,0061	0,0023
360	0,0051	0,01	0,0058	0,0027
390	0,0074	0,01	0,0047	0,003
420	0,011	0,01	0,0048	0,0029
Ortalama k_D	0,0049	0,009	0,0055	0,00198

Çizelge 3.7’de verilen k_D değerlerinin ortalamaları dikkate alınarak, immobilize enzimlerin yarı ömürleri ' $t_{1/2}=0,693k_D$ ' formülüne göre hesaplandığında; Silika-GA-Tripsin immobilizasyonunun yarı ömrü ($t_{1/2}$) 141 dakika, Silika-GA-Dah-Tripsin immobilizasyonunun yarı ömrü ($t_{1/2}$) 77 dakika, Silika-GA-PEG2000-Dah-Tripsin immobilizasyonunun yarı ömrü ($t_{1/2}$) 126 dakika, Silika-GA-PEG5000-Dah-Tripsin immobilizasyonunun yarı ömrü ($t_{1/2}$) ise 350 dakika olarak bulundu (Çizelge 3.8).

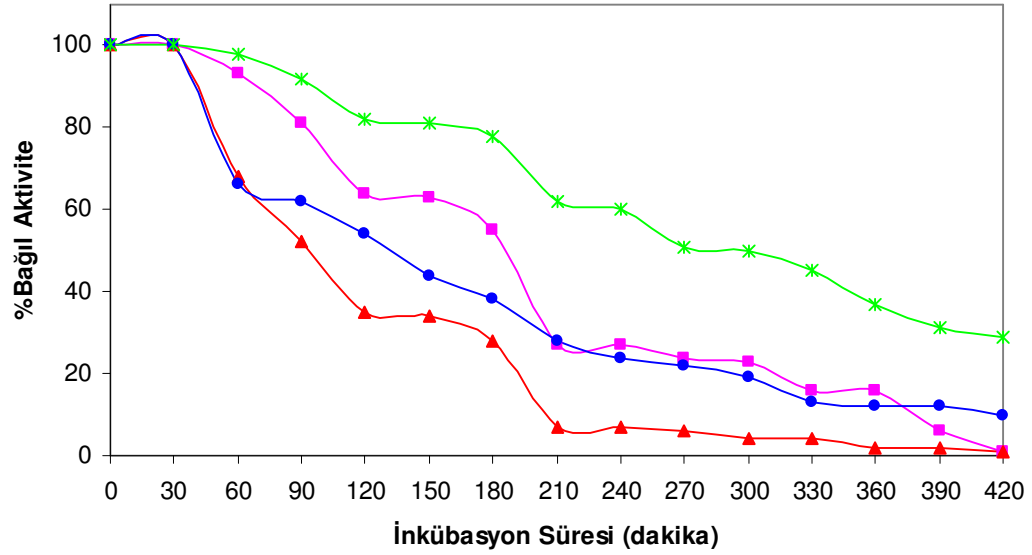
Çizelge 3. 8 Immobilize tripsinin yarı ömürleri ($t_{1/2}$).

	<i>Silika-GA-Tripsin</i>	<i>Silika-GA-Dah-Tripsin</i>	<i>Silika-GA-PEG2000-Dah-Tripsin</i>	<i>Silika-GA-PEG5000-Dah-Tripsin</i>
İmmobilize Enzimlerin Yarı Ömürleri ($t_{1/2}$) (dakika)	141	77	126	350

İmmobilizasyon yöntemleri arasında karşılaştırma yapıldığında en iyi operasyonel kararlılığa diğer bir deyişle yarılanma ömrüne ($t_{1/2}$) Peg 5000 ile yapılan immobilizasyon yöntemi sahiptir. PEG polimerinin bazı enzimlere bağlandığında enzim üzerinde stabilize edici etki gösterdiği (Manta et al., 2003), bunun yanı sıra proteazların termodinamik stabilitesini arttırdığı daha önce gösterilmiştir (Rodríguez-Martínez et al., 2008). PEG konjugatları proteinlerin yüzeylerini maskelemekte ve polipeptidlerin moleküler boyutunu arttırarak denatürasyona karşı korumaktadır, bu özellikler göz önüne alındığında elde edilen operasyonel kararlılık sonucu beklenendir.

Şekil 3.6’da görüldüğü gibi, sürekli bir sistemde immobilize tripsin kullanıldığında, immobilizasyon yöntemlerine göre farklı aktivite değişimleri bulundu. 420 dakika sonunda PEG5000 ile gerçekleştirilen immobilizasyon yönteminde enzim aktivitesinin % 29’luk kısmı korunurken PEG2000 ile gerçekleştirilen immobilizasyon yönteminde enzim aktivitesinin % 10’luk kısmı korunmuştur, PEG kullanılmadan gerçekleştirilen immobilizasyon yöntemlerinde ise 420 dakika sonunda tripsin hemen hemen aktivitesini kaybetmiştir.

İmmobilize enzimlerin operasyonel kararlılıkları nadir olarak araştırılmıştır. Fakat gözlenen en önemli nokta, enzimlerin operasyonel kararlılığının genel yapılarına bağlı olarak farklılık gösterdiği olmuştur.



Şekil 3.6 İmmobilize tripsinin operasyonel kararlılığı [(■): Silika-GA-Tripsin (▲): Silika-GA-Dah-Tripsin (●): Silika-GA-Peg2000-Dah-Tripsin (*): Silika-GA-Peg5000-Dah-Tripsin]

3.4 İmmobilize Tripsinin Tekrar Kullanılabilirliği

İmmobilize enzimlerin endüstriyel açıdan değerini etkileyen bir parametre de bu preparatların birçok kez ve uzun süre kullanılabilmesidir. Bu amaç ile bölüm 2.7’de açıklandığı gibi, yapılan denemeler sonucunda immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği hem uygun tampon çözeltisinde (0.1 M pH 8 fosfat tamponu) hemde farklı yüzdelerdeki (% 30 ACN+% 0.1 TFA, % 40 ACN+% 0.1 TFA ve % 50 ACN+% 0.1 TFA) organik çözümler içerisinde tespit edildi. 35°C de 10 dakikalık inkübasyonlar sonrasında, immobilize enzimler 4°C’de santrifüjlenerek üst faz alındı ve aktiviteler ölçüldü. Daha sonra immobilize enzim, immobilizasyon prosesi esnasında kullanılan uygun çözelti ile yıkanarak tekrar aktivite ölçümü yapıldı. Bu işlemler ardarda tekrarlanarak enzimin kaçınıcı ölçümde ne kadar aktivite kaybettiği tespit edildi. Bu denemeler

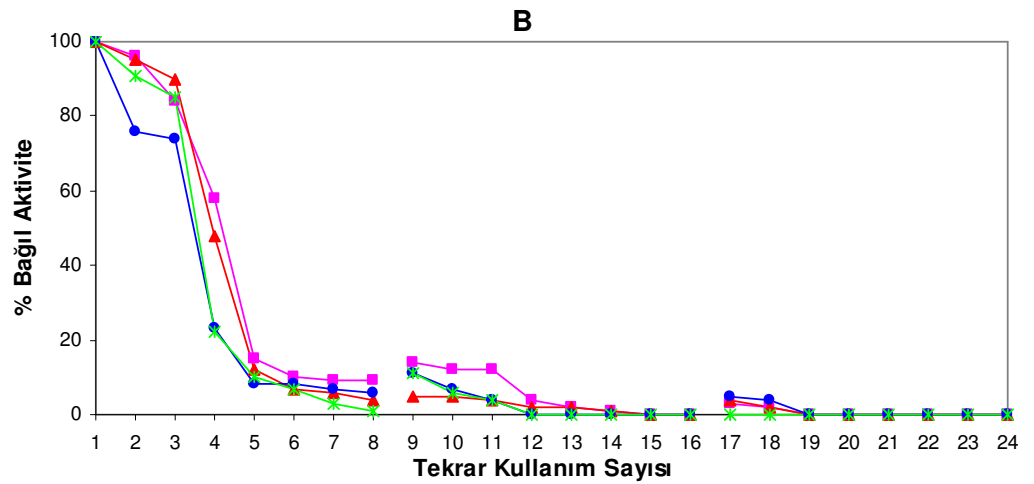
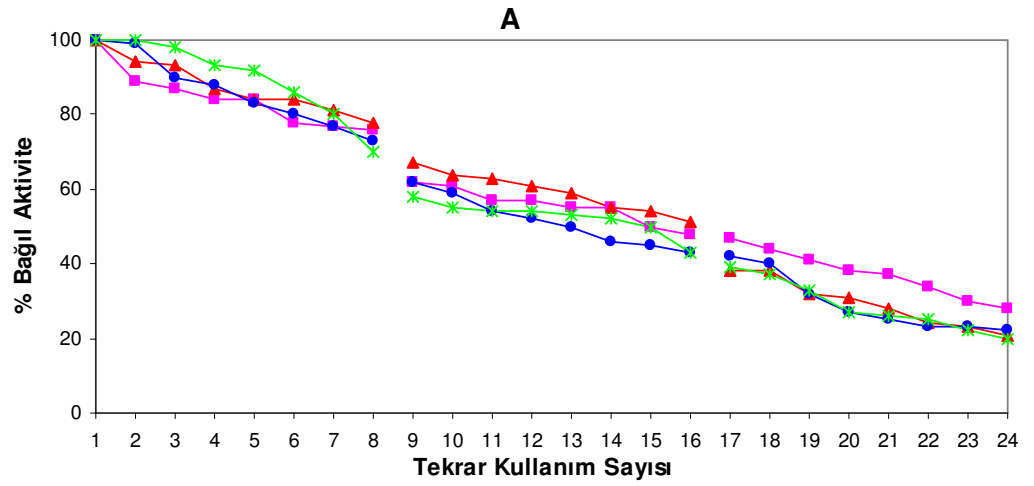
sırasında bir gün boyunca çalıştırılan enzim, diğer günkü aktivite ölçümüne kadar 4 C’de saklandı. Bir günde aynı enzim preparatı ile 8 ölçüm alındı ve 3 gün boyunca aktivite ölçümüne devam edildi.

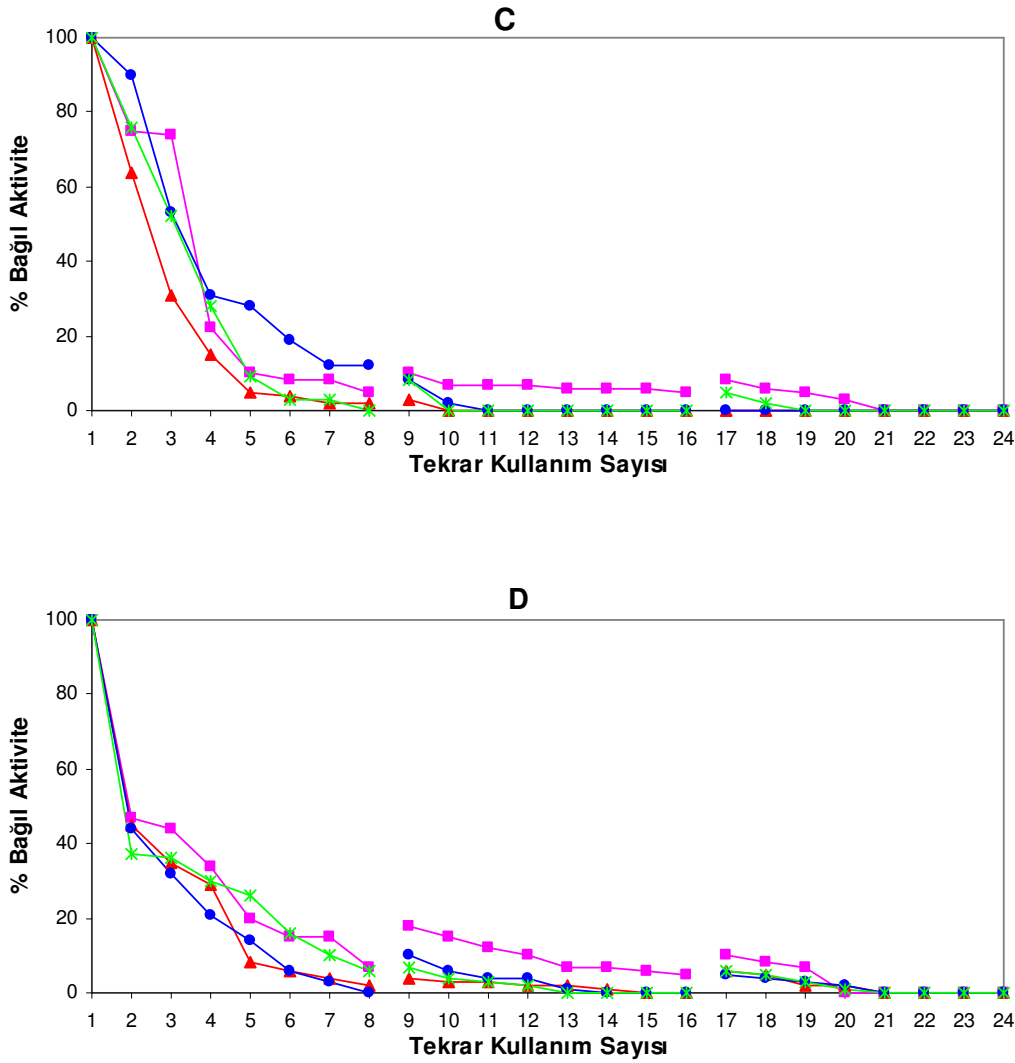
Şekil 3.7’de immobilize enzimlerin, fosfat tamponu ve organik   z enler içerisindeki tekrar kullanılabilirlik sonuçları verilmiştir. Bu sonuçlara göre ilk olarak immobilizasyon yöntemleri birbirleri ile kar ıla tırıldı ında; immobilize enzimlerinin 24 kez tekrar kullanımı sonucunda hemen hemen birbirleri ile benzer sonuçlar verdikleri belirlenmiştir. İkinci olarak kullanılan tampon ve organik   z enler birbirleri ile kar ıla tırıldı ında ise; immobilize enzimler ile tampon içerisinde gerçekleştirilen aktivite ölçümleri 24 kez tekrarın sonucunda ortalama olarak enzimlerin aktivitelerinin % 20’sini koruduğu belirlenmiştir. Fakat farklı yüzdelerdeki organik   z enler içerisinde yapılan aktivite ölçümlerinde, % 30 ACN içerisinde 4.tekrardan sonra immobilize enzim aktivitesinin yarisını kaybederken % 40 ve % 50’lik ACN içerisinde bu kayıp 2. veya 3. tekrardan sonra düşmektedir. Bundan sonraki tekrarlarda immobilize enzimin tüm organik   z en y zdelерinde de aktivitesini hızlı bir şekilde yitirdiği belirlenmiştir.

Elde edilen bu sonuçlar değerlendirildiğinde, immobilize enzimlerin organik   z enler içerisinde kararlılıkları tamponlu ortama göre çok düşük seviyede olduğu görülmektedir. Bu  alı ma sırasında daha önce immobilize enzimler ile yapılan aktivite ölçümlerinde, organik   z enlerde elde edilen immobilize enzim aktivitesi tamponlu ortamda elde edilen ile kar ıla tırıldı ında, % 5’lik organik   z en içerisindeki aktivite tamponlu ortamdaki aktivite ile hemen hemen aynı sonucu verirken, % 30’luk organik   z enin aktiviteyi 2 kattan fazla arttığı görülmüştü! Bunun yanı sıra asetonitril gibi organik çözeltilerin varlığında proteinlerin denatüre olma eğiliminde oldukları ve bu süreçte enzim aktif bölgesine ula ılabilirli inde arttığı (Slysz and Schriemer, 2003) bilinmektedir. Bu bilgi ışığında immobilize enzimin organik   z en içerisinde denatürasyon işlemi gerçekleştiği sırada öncelikle tamponlu ortama göre daha iyi bir aktivite verdiği fakat daha sonra organik   z en içerisinde denatürasyon hızlı gerçekleştiği için aktivitesini hemen yitirdiği belirlenmiştir. Fakat diğer açıdan bakıldığında çalışma

sırasında serbest enzim ile gerçekleştirilen organik çözen çalışmalarında hiçbir organik çözen yüzdesinde serbest tripsin aktivite göstermemiştir.

Tüm bu değerlendirmeler sonucunda, serbest enzimin organik çözgende aktivite göstermezken immobilize enzimin aktivite gösterdiği fakat tekrarlanabilir sonuçlar veremediği belirlenmiştir. Organik çözen stabilitesini artırmak için kullanılan farklı immobilizasyon metodları da maalesef tekrarlanabilir sonuçlar vermemiştir. Bu sonuçlar dikkate alınarak immobilize enzimlerin protein fragmentasyon potansiyeli araştırılacaktır.





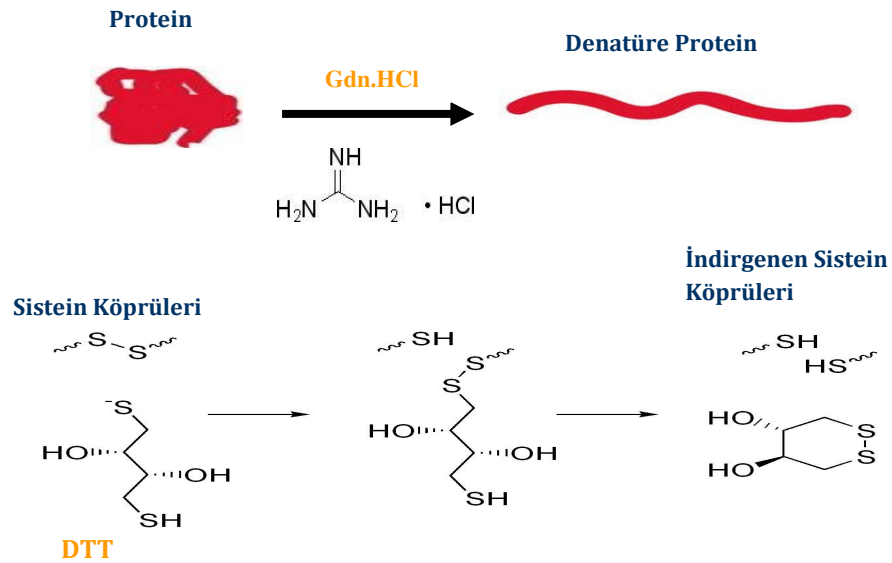
Şekil 3.7 İmmobilize tripsinin tekrar kullanılabilirliği [(■): Silika-GA-Tripsin (▲): Silika-GA-Dah-Tripsin (●): Silika-GA-Peg2000-Dah-Tripsin (*): Silika-GA-Peg5000-Dah-Tripsin] [A: 0.1 M pH 8 Fosfat Tamponu, B: % 30 ACN+% 0.1 TFA C: % 40 ACN+% 0.1 TFA D: % 50 ACN+% 0.1 TFA]

3.5 İmmobilize Tripsin ile Protein Fragmentasyonu

Farklı yöntemler ile immobilize edilen Tripsin'in kararlılık testleri incelendiğinde en kararlı yapıya Silika-GA-Tripsin immobilizasyon yönteminde ulaşıldı. Bu sonuç ile bağlantılı olarak BSA proteininin fragmentasyonu bu immobilizasyon sistemi kullanılarak yapıldı. Hızlı ve etkili protein fragmentasyonu ve peptid ayırımı sağlamak amacı ile Bölüm 2.8'de açıklandığı gibi ilk olarak, BSA proteininin fragmentasyonu öncesi yıkım etkinliğini arttırmak

için bir ön muamele işlemi yapılarak protein denatürasyonu ve sistein köprülerinin indirgenmesini sağlandı. Bu aşamada, 1 mg/ml'lik BSA çözeltisine, protein denatürasyonu için 6 M guanidin hidroklorür (Gdn.HCl) ve sistein köprülerinin indirgenmesi için de 10 mM 1,4-ditiyoteritrol (DTT) eklenerek 37°C'lik su banyosunda 1 saat bekletildi.

BSA'nın denatürasyon işlemi sonrasında ortamdaki tuzları uzaklaştırmak ve immobilize enzimin ömrünü uzatmak için desanilizasyon işlemi yapılmalıdır. Fakat desalinizasyon için kullanılacak olan PD10 kolon adsorbsiyon nedeniyle protein verimliliğini azaltmaktadır. Aradaki farkın anlaşılabilmesi için denatürasyon sonrası protein fragmentasyonu ve peptidlerin ayırım işlemi PD10 kolonlu BSA ve PD10 kolonsuz BSA olmak üzere iki yolla gerçekleştirildi.



Şekil 3.8 Guanidin hidroklorür (Gdn.HCl) ve 1,4-ditiyoteritrol (DTT) ile gerçekleştirilen protein denatürasyonu

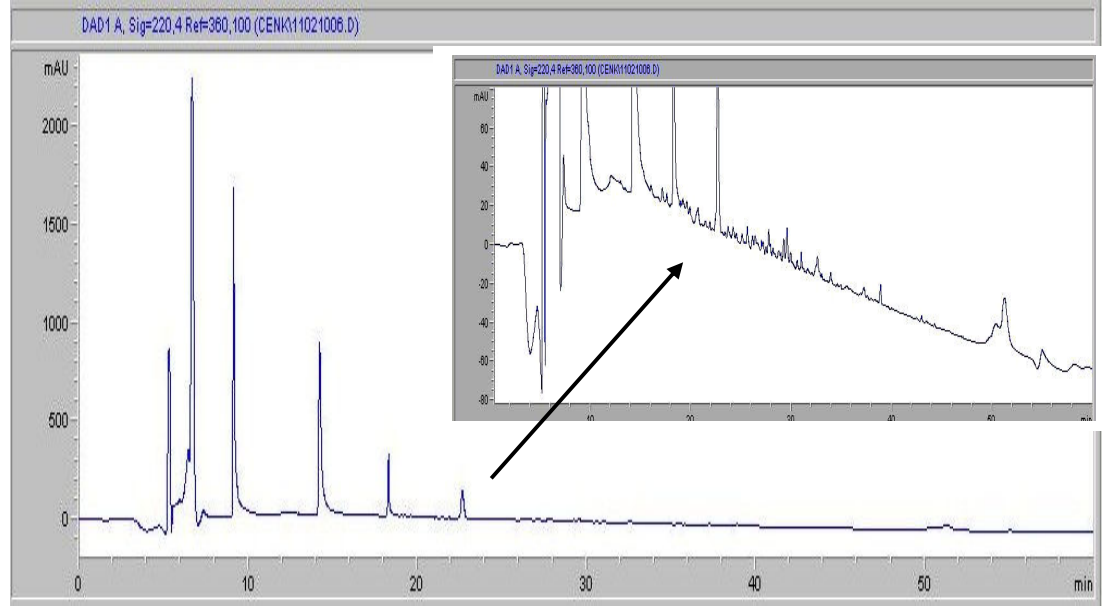
BSA proteini 607 amino asit'ten oluşmaktadır (Çizelge 3.9), bunlardan 26'sı arginin (R) 60'ı lizin (K) artıdır. Tripsin, BSA'yı bu lizin ve arginin artıklarından sonra parçalayarak fragmanlara ayırır.

Çizelge 3. 9 BSA primer yapısı (607 amino asit, 60Lys, 26Arg) (Swiss Prot, 2010)

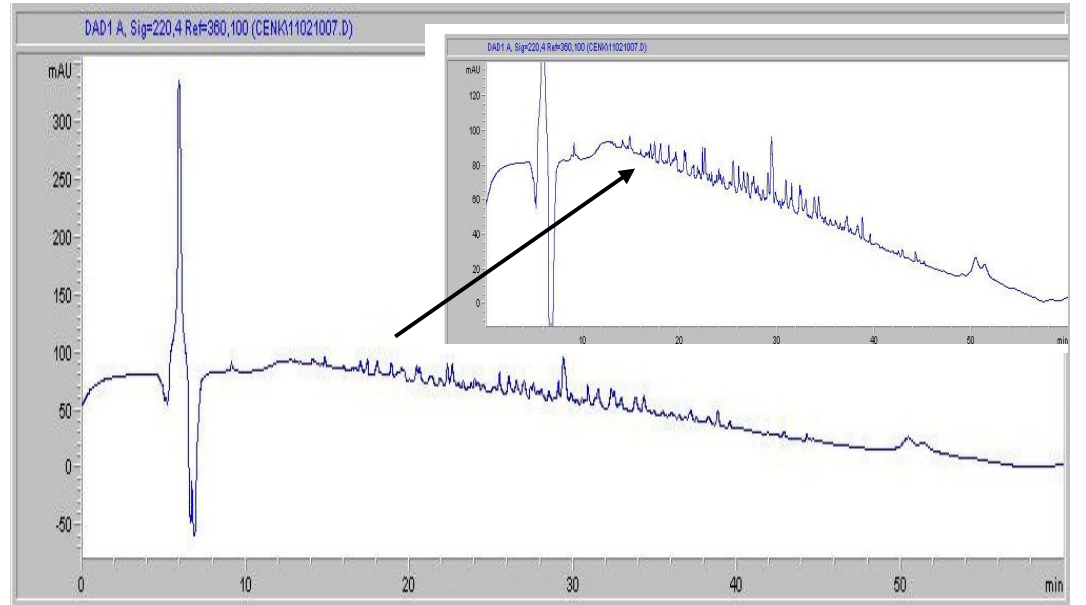
10	20	30	40	50	60
MKVVTFISLL	LLFSSAYSRG	VFRRDTHKSE	IAHRFKDLGE	EHFKGLVLIA	FSQYLQQCPF
70	80	90	100	110	120
DEHVKLVNEL	TEFAKTCVAD	ESHAGCEKSL	HTLFGDELCK	VASLRETYGD	MADCCEKQEP
130	140	150	160	170	180
ERNECFLSHK	DDSPDLPKLK	PDPNTLCDEF	KADEKKFWGK	YLYEIAARRHP	YFYAPELLYY
190	200	210	220	230	240
ANKYNGVFQE	CCQAEDKGAC	LLPKIETMRE	KVLASSARQR	LRCAISIQKFG	ERALKAWSVA
250	260	270	280	290	300
RLSQKFPKAE	FVEVTKLVT	LTKVHKECCH	GDLLECADD	ADLAKYICDN	QDTISSKLKE
310	320	330	340	350	360
CCDKPLLEKS	HCIAEVEKDA	IPENLPPLTA	DFAEDKDVCK	NYQEAQDAFL	GSFLYEYSRR
370	380	390	400	410	420
HPEYAVSVLL	RLAKEYEATL	EECCAADDPH	ACYSTVFDKL	KHLVDEPQNL	IKQNCQDFEK
430	440	450	460	470	480
LGEYGFQNAL	IVRYTRKVPQ	VSTPTLVEVS	RSLGKVGTRC	CTKPESERMP	CTEDYLSLIL
490	500	510	520	530	540
NRLCVLHEKT	PVSEKVTKCC	TESLVNRRPC	FSALTPDETY	VPKAFDEKLF	TFHADICTLP
550	560	570	580	590	600
DTEKQIKKQT	ALVELLKHKP	KATEEQLKTV	MENFVAFVDK	CCAADDKEAC	FAVEGPCLVV
STQTALA					

Bölüm 2.8’de açıklandığı gibi protein fragmentasyonu ve peptid ayırımı kurulan iki ayrı sistemde gerçekleştirildi.

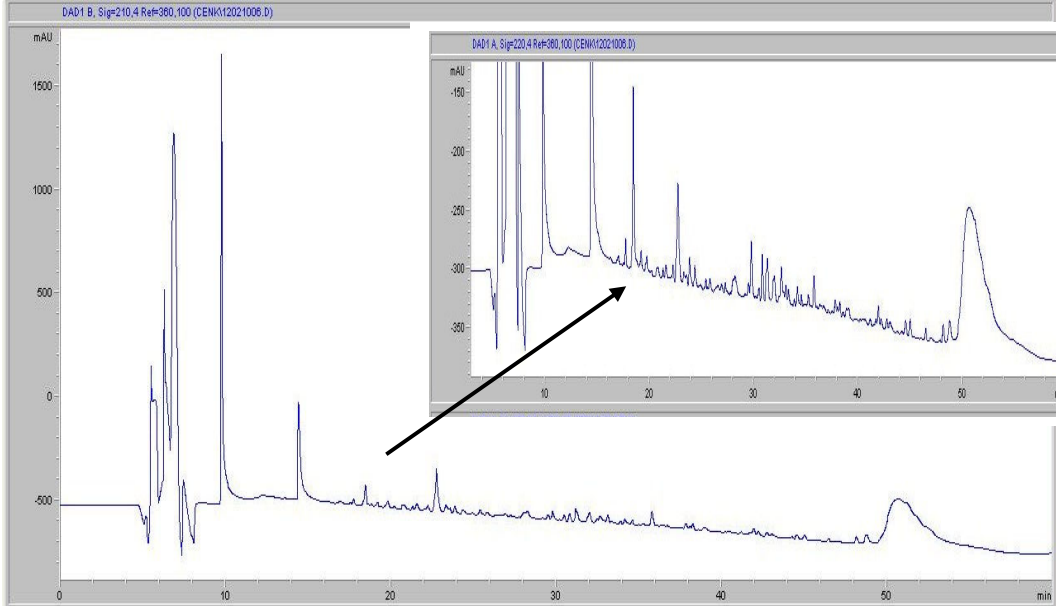
Kurulan birinci sistemde, serbest ve immobilize enzimler ile protein fragmentasyonu 0.1 M pH 8 fosfat tamponlu ortamda, farklı zaman aralıkları süresince (serbest enzim için gece boyu, immobilize enzim için 15 dakika ve 1 saat) gerçekleştirildi. Protein fragmentasyonu sonrası oluşan peptid fragmanlarının separasyonu HPLC sisteminde yapıldı [Agilent 1100 Series kromatografi sistemi, 250 mm x 4 mm Merck CH-18/2 (5 µm) kolon, 100 µl enjeksiyon hacmi, DAD dedektör 220 nm dalgaboyu] (Şekil 3.9; 3.10; 3.11; 3.12; 3.13; 3.14).



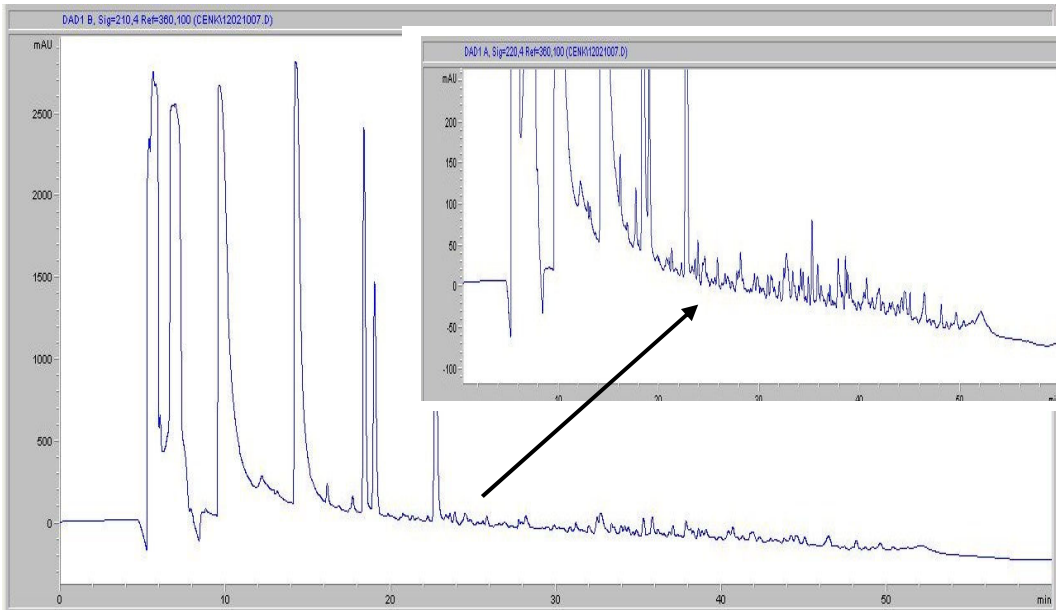
Şekil 3.9 Serbest Tripsin ile BSA Fragmentasyonu (Geceboyu / PD10 Kolonlu BSA / 65 pik)
(Akış Hızı: 0.4 ml/dk, Kolon Sıcaklığı: 50°C, Mobil Faz A: % 0.1 TFA B: ACN, Elüsyon: % 1-% 50 ACN Gradient, Dalga Boyu: 220 nm)



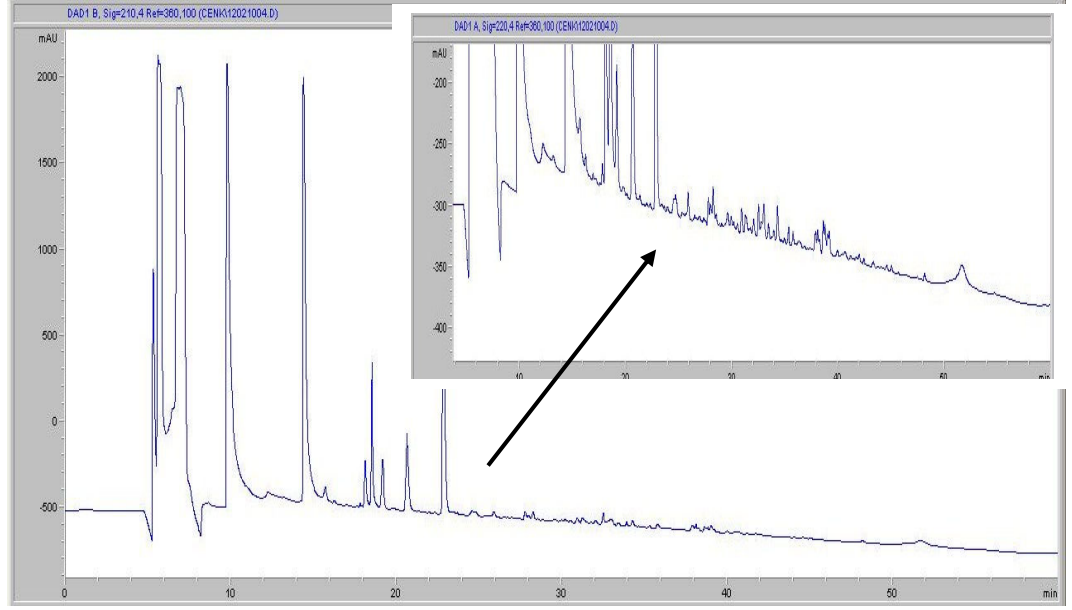
Şekil 3.10 Serbest Tripsin ile BSA Fragmentasyonu (Geceboyu / PD10 Kolonsuz BSA / 80 pik)
(Akış Hızı: 0.4 ml/dk, Kolon Sıcaklığı: 50°C, Mobil Faz A :% 0.1 TFA B: ACN, Elüsyon: % 1-% 50 ACN Gradient, Dalga Boyu: 220 nm)



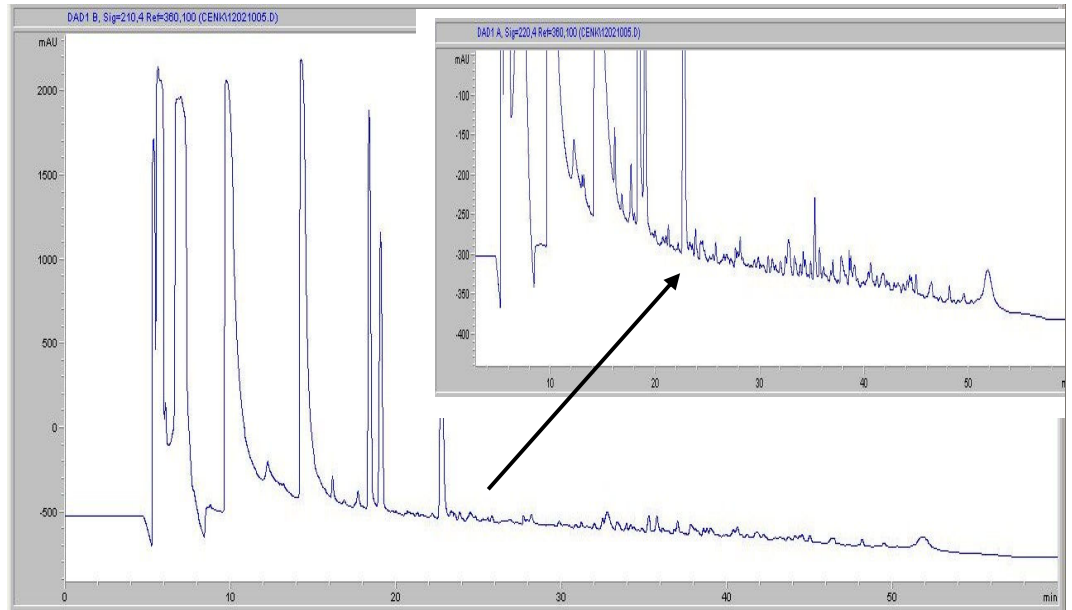
Şekil 3.11 Silika-GA-Tripsin ile BSA Fragmentasyonu (1 saat / PD10 Kolonlu BSA / 81 pik)
(Akış Hızı: 0.4 ml/dk, Kolon Sıcaklığı: 50°C, Mobil Faz A: % 0.1 TFA B: ACN, Elüsyon: % 1-%
50 ACN Gradient, Dalga Boyu: 220 nm)



Şekil 3.12 Silika-GA-Tripsin ile BSA Fragmentasyonu (1 saat / PD10 Kolonsuz BSA / 98 pik)
(Akış Hızı: 0.4 ml/dk, Kolon Sıcaklığı: 50°C, Mobil Faz A: % 0.1 TFA B: ACN, Elüsyon: % 1-%
50 ACN Gradient, Dalga Boyu: 220 nm)

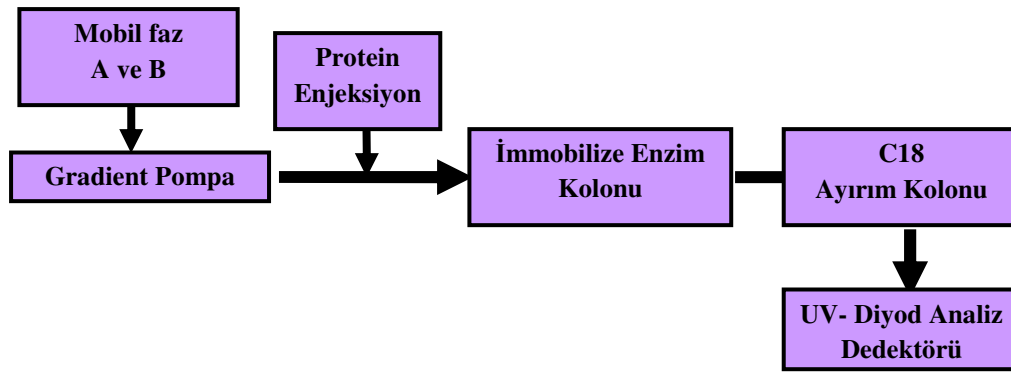


Şekil 3.13 Silika-GA-Tripsin ile BSA Fragmentasyonu (15 dakika / PD10 Kolonlu BSA / 81 pik) (Akış Hızı: 0.4ml/dk, Kolon Sıcaklığı: 50°C, Mobil Faz A: % 0.1 TFA B: ACN, Elüsyon: % 1-50 ACN Gradient, Dalga Boyu: 220 nm)

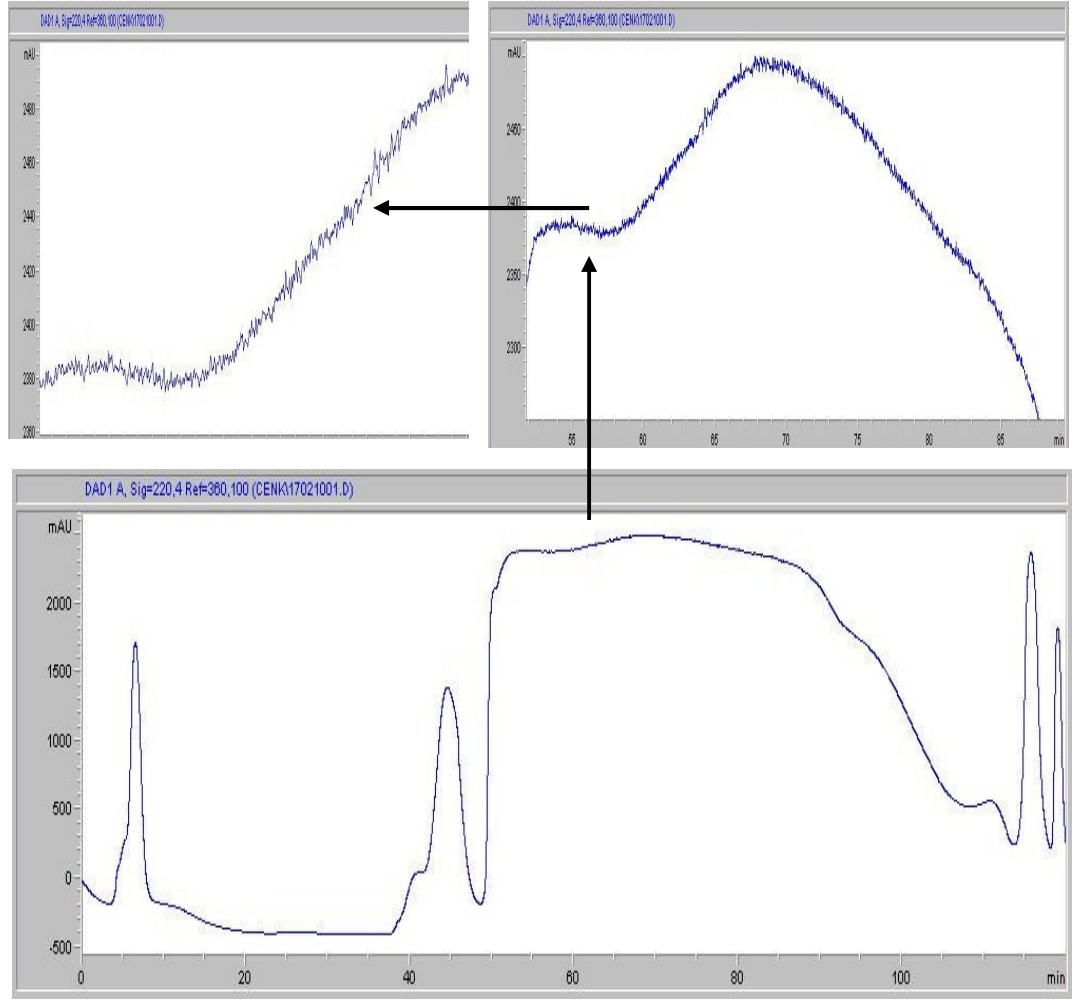


Şekil 3.14 Silika-GA-Tripsin ile BSA Fragmentasyonu(15 dakika / PD10 Kolonsuz BSA / 96 pik) (Akış Hızı: 0.4ml/dk, Kolon Sıcaklığı: 50°C, Mobil Faz A: % 0.1 TFA B: ACN, Elüsyon: % 1-50 ACN Gradient, Dalga Boyu: 220 nm)

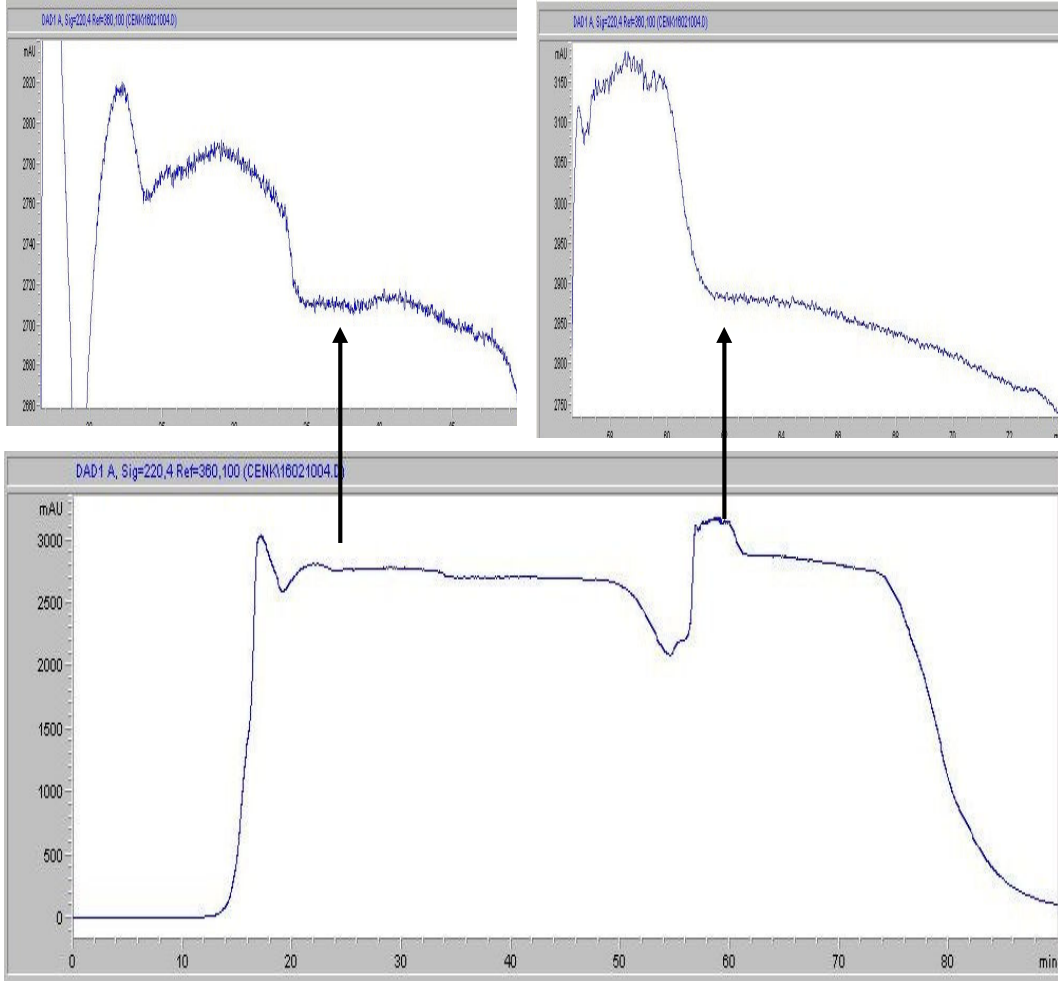
Kurulan ikinci sitemde ise on-line immobilize enzim sistemi geliştirmek amacıyla, immobilize enzimler kolon dolgu materyali olarak kullanılarak HPLC kolonu dolduruldu ve protein fragmentasyon kolonu olarak kullanılmak üzere HPLC sisteminde ayırım kolonunun önüne bağlandı (Şekil 3.15). Böylece sisteme protein enjeksiyonu sonrası proteinler immobilize enzim kolonundan geçerken yıkıma uğramakta, hemen arkasından oluşan peptidler ise ayırım kolonundan geçerken birbirlerinden ayrılmaktadır (Şekil 3.16 ve 3.17).



Şekil 3.15 HPLC sistemi ile bağlantılı immobilize enzim sisteminin temsili gösterimi.



Şekil 3.16 Silika-GA-Tripsin ile on-line BSA Fragmentasyonu (PD10 Kolonlu BSA / 85 pik)
 (Akış Hızı: 0.4 ml/dk, Kolon Sıcaklığı: 40°C, Mobil Faz A: % 0.1 TFA B: ACN, Elüsyon: % 1-% 50 ACN Gradient, Dalga Boyu: 220 nm)



Şekil 3.17 Silika-GA-Tripsin ile on-line BSA Fragmentasyonu (PD10 Kolonsuz BSA / 115 pik) (Akış Hızı: 0.4 ml/dk, Kolon Sıcaklığı: 40°C, Mobil Faz A: % 0.1 TFA B: ACN, Elüsyon: % 1-% 50 ACN Gradient, Dalga Boyu: 220 nm)

Protein fragmentasyonu ve peptid ayırımı sonucu elde edilen kromatogramlar değerlendirildiğinde, serbest enzimle gerçekleştirilen protein fragmentasyonunda immobilize enzimlerle gerçekleştirilen fragmentasyona göre düşük peptid verimi elde edildi bunun yanı sıra uzun inkübasyon süresi zaman kaybına neden oldu. İmmobilize enzimler ile gerçekleştirilen degradasyon işlemine 1 saat ve 15 dakika olmak üzere iki ayrı zaman süreci boyunca devam edildi. Bunun sonucunda ise iki zaman sürecinde de aynı degradasyon verimi elde edildi. İmmobilize enzim ile gerçekleştirilen degradasyon serbest enzim ile

karşılaştırıldığında zaman ve peptid verimi göz önüne alındığında enzimler için immobilizasyon işleminin ne kadar önemli olduğu görülmektedir.

Protein denatürasyonu sonrasında desalinizasyon işlemi için kullanılan PD10 kolunun adsorbsiyon nedeniyle protein verimini düşürdüğü, elde edilen kromotogramlar sonucu görülmektedir. PD10 kolonundan geçirilen ve geçirilmeyen protein örneklerinin degradasyon kromotogramları incelendiğinde, PD10 kolonu kullanıldıktan sonra yapılan degradasyon işleminde yaklaşık 15 peptidlik bir kayıp söz konusudur.

Literatürde immobilize enzimler ile gerçekleştirilen on-line protein fragmentasyonu ve identifikasyonu çalışmalarına bakıldığında, kurulan sistemlerde immobilize enzim kolonları sisteme ayrı bağlanmakta ve iki ayrı pompalama sistemi içermektedir. Birinci pompa ile sisteme protein enjeksiyonu uygun tampon çözeltiler ile sağlanmakta, bu süreçte degradasyon işlemi için protein immobilize enzim kolonunda bekletilmektedir. Belirli bir süre sonunda oluşan peptidler ise sisteme organik çözgen eşliğinde ikinci pompalama sistemi ile verilerek peptid ayırımı sağlanmakta ve sonrasında MS aracılığı ile bu peptidlerin identifikasyonu gerçekleştirilmektedir. Fakat bu çalışma sırasında diğer on-line fragmentasyon sistemlerinden farklı olarak yenilikçi bir strateji geliştirmeye çalışıldı. Bunun için immobilize enzim kolonu sisteme direkt bağlanarak protein degradasyon sonrası peptid ayırımı organik çözgen içerisinde gerçekleştirildi. Bu süreç öncesinde farklı immobilizasyon yöntemleri denenerek immobilize enzimin organik çözgen stabilitesi arttırılmaya çalışıldı. Fakat her ne kadar immobilize enzimlerle aktivite ölçümünde tamponlu ortamdaki aktiviteye göre yüksek değerler elde edildiyse de maalesef tekrarlanabilir sonuçlar elde edilemedi. Bununla bağlantılı olarak on-line protein degradasyonu ve peptid ayırımı için kurulan sistemde ilk elüsyon sonrasında (60 dakika sonunda) organik çözgen enzimde büyük miktarda aktivite kaybına neden olduğu için tekrarlanabilir sonuçlar elde edilemedi.

4. GENEL DEĞERLENDİRME

Bu çalışmada, tripsinin farklı yöntemler kullanılarak silika tabanlı taşıyıcıya immobilizasyonu başarıyla gerçekleştirildi. Kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilen enzimlerin karakterizasyonları yapılarak kararlılıkları incelendi. Elde edilen sonuçlar ışığında uygun optimizasyon şartları yaratılarak immobilize enzim preparatlarının protein fragmentasyon potansiyeli araştırıldı.

Optimum immobilizasyon için gerekli olan, aktivasyon miktarı, ara kol oranı ve son olarakta protein miktar çalışmaları sırasında kimyasal israfından kaçınmak amacı ile küçük ölçekte (5 ml toplam hacimde 1 ml tripsin ve 500 mg silika) enzim immobilizasyonu çalışılmıştır. Optimum immobilizasyon koşulları belirlendikten sonra karakterizasyon, kararlılık testleri ve protein fragmentasyonunda kullanmak amacı ile büyük ölçekte (100 ml toplam hacimde 20 ml tripsin ve 10 g silika) enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Büyük ölçekte yapılan immobilizasyon küçük ölçekte yapılan immobilizasyon ile karşılaştırıldığında immobilizasyon yöntemleri ve verimleri paralel sonuçlar gösterirken, enzim aktivitesine bakıldığında büyük ölçekteki immobilizasyondan küçük ölçekte elde edilen immobilizasyon aktivitelerinin çok üstünde aktiviteler elde edildi (Çizelge Ek1 ve Ek2). Bunun nedeni olarak, kullanılan örnek miktarı azaldıkça hata payı oranının artması olarak görülmektedir.

Karakterizasyon işlemlerinde, serbest ve immobilize enzim için optimum pH sırasıyla 8 ve 10 olarak belirlendi. Immobilizasyon sonucunda enzimin kararlı olarak çalışabileceği pH aralığı genişlemiştir. Serbest ve immobilize enzim için optimum sıcaklık değeri 45°C olarak bulundu. Immobilizasyon işleminin tripsinin optimum sıcaklığında bir etkisinin olmadığını görüldü.

Organik çözümlerde enzim aktivitesi çalışmalarında, tamponlu ortamdaki aktivite ile karşılaştırıldığında % 30'luk organik çözümler içerisindeki enzim aktivitesinin 2 kattan fazla arttığı görüldü. Bunun yanı sıra organik çözümler stabilitesini arttırmak için immobilizasyon sırasında kullanılan PEG molekülleri, kendi immobilize enziminin aktivitesini diğer immobilizasyon yöntemlerine göre % 30'luk organik çözümler içerisinde en yüksek seviyeye taşıdığı belirlendi. Fakat

organik çözen içerisindeki tekrarlanabilir sonuçlar elde edilemedi. Serbest enzim ile gerçekleştirilen organik çözen çalışmaları, hiçbir organik çözen yüzdesinde serbest tripsin aktivite göstermemiştir. Bu sonuç organik çözen stabilitesi için enzim immobilizasyonun nedenli önemli olduğunu vurgulamaktadır.

Kararlılık testleri sırasında, serbest ve immobilize enzimin termal kararlılıklarına 35, 45 ve 55°C’de bakıldığında immobilize tripsinin kararlı olduğu sıcaklık aralığı serbest enziminkine kıyasla genişlemiştir. Serbest enzim 120. dakikanın sonunda, 35, 45 ve 55°C’de, aktivitesinin sırası ile % 87, % 45 ve % 18’lik kısmını koruyabilirken, immobilizasyon yöntemleri arasında büyük farklanma olmaksızın immobilize tripsin aktivitesinin ortalama % 89, % 65 ve % 40’ını koruyabildiği belirlendi. Serbest ve immobilize enzimin pH kararlılıkları incelendiğinde, immobilize enzimlerin pH 7-11 aralığında serbest enzimin ise pH 7-9 aralığında kararlı olduğu görüldü. İmmobilizasyon işleminin enzimin pH kararlılığını arttırdığı belirlendi.

Serbest ve immobilize enzimlerin depo kararlılıkları incelendiğinde, 160. günün sonunda immobilize enzimlerin depo kararlılıkları serbest enzim ile karşılaştırıldığında immobilize enzimlerde önemli bir aktivite korunumu elde edildi. İmmobilizasyon yöntemlerinde; Silika-GA-Tripsin immobilizasyonunda % 90.3, Silika-GA-Dah-Tripsin immobilizasyonunda % 85.6, Silika-GA-PEG2000-Dah-Tripsin immobilizasyonunda % 89.1, Silika-GA-PEG5000-Dah-Tripsin immobilizasyonunda % 90.4’lük aktivite korunumu sağlanırken serbest enzimin aktivite korunumu % 59,5 olarak belirlendi.

İmmobilize enzimlerin operasyonel kararlılığına bakıldığında Silika-GA-Tripsin immobilizasyonunun yarı ömrü 141 dakika, Silika-GA-Dah-Tripsin immobilizasyonunun yarı ömrü 77 dakika, Silika-GA-PEG2000-Dah-Tripsin immobilizasyonunun yarı ömrü 126 dakika, Silika-GA-PEG5000-Dah-Tripsin immobilizasyonunun yarı ömrü ise 350 dakika olarak bulundu. İmmobilizasyon yöntemleri arasında karşılaştırma yapıldığında en iyi operasyonel kararlılığa diğer bir deyişle yarılanma ömrüne ($t_{1/2}$) PEG 5000 ile yapılan immobilizasyon yöntemi

ile elde edildi. PEG molekülerinin immobilize enzimlerin stabilitesini arttırdığı belirlendi.

İmmobilize enzimlerin tampon ve organik çözgenli ortamda tekrar kullanılabilirliklerine bakıldığında, immobilize enzimler organik çözgen içerisinde her ne kadar ilk aktivite ölçümünde tamponlu ortama göre yüksek aktiviteler göstermiş olsalarda tekrarlanabilir sonuçlar elde edilemedi. Tamponlu ortamda immobilize enzimler 24 kez tekrarın sonucunda ortalama olarak aktivitelerinin % 20'sini korurken % 30 ACN içerisinde 4.tekrardan sonra % 40 ve % 50'lik ACN içerisinde ise 2. veya 3. tekrardan sonraya aktivitelerinin yarısını kaybettiği belirlendi.

Serbest ve immobilize enzimler ile gerçekleştirilen protein fragmentasyonlarında, serbest enzimle gerçekleştirilen protein fragmentasyonunda immobilize enzimlerle gerçekleştirilen fragmentasyona göre düşük peptid verimi elde edildi. Bunun yanı sıra serbest enzimin uzun inkübasyon süreci zaman kaybına neden oldu. İmmobilize enzimler ile gerçekleştirilen degradasyon işlemine 1 saat ve 15 dakika olmak üzere iki ayrı zaman süreci boyunca devam edildi. Bunun sonucunda ise iki zaman sürecinde de aynı degradasyon verimi elde edildi. İmmobilize enzim ile gerçekleştirilen degradasyon serbest enzim ile karşılaştırıldığında zaman ve peptid verimi göz önüne alındığında enzimler için immobilizasyon işleminin ne kadar önemli olduğu görülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahsan, M. N., Watabe, S.,** 2001, Kinetic and structural properties of two isoforms of trypsin isolated from the viscera of Japanese anchovy, *Engraulis japonicus*, *Journal of Protein Chemistry* 20, pp. 49-58.
- Anderson, N.L., Anderson, N.G.,** 2002, The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects, *Mol. Cell. Proteomics* 1 pp. 845-567
- Asgeirsson, B., Fox, J. W., Bjarnason, J. B.,** 1989, Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*, *European Journal of Biochemistry* 180, pp. 85-94
- Axén, R., Porath, J. and Ernback, S.,** 1967, Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides, *Nature* 214, pp. 1302–1304.
- Bradford, M. M.,** 1976, *Analytical Biochemistry* 72, pp. 248-254
- Betancor, L., López-Gallego, F., Alonso-Morales, N., Dellamora, G., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R., and Guisan, J. M.,** 2006, Glutaraldehyde in protein immobilization: A versatile reagent, *Methods in Biotechnology* 22, pp 57-64
- Bickerstaff, G.F.,** 1997, Immobilization of Enzymes and Cells, *Humana Press, Totowa, New Jersey*, pp 61-66
- Bienvenut, W.V., Deon, C., Pasquarello, C., Campbell, J.M., Sanchez, J.C., Vestal, M.L., Hochstrasser, D.F.,** 2002, Matrix-assisted laser desorption/ionization-tandem mass spectrometry with high resolution and sensitivity for identification and characterization of proteins, *Proteomics* 2, pp. 868-876.
- Bovara, R., Ottolina, G., Carrea, G., Ferruti, P., Veronese, F.M.,** 1994, Modification of lipase from *Pseudomonas* sp., with poly(acryloyl morpholine) and study of its catalytic properties in organic solvents, *Biotechnol Lett.* 16 1069–1074
- Brodellius, P. and Mosbach, K.,** 1987, Immobilization Techniques for Cells/Organelles. In: *Methods in Enzymology*, volume 135, Academic Press, London, pp. 173–454.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bryjak, J. and Kolarz B. N.**, 1998, Immobilisation of trypsin on acrylic copolymers, *Process Biochem.* 33, 409.
- Buchholz, K. and Klein, J.**, 1987 Characterization of Immobilized Biocatalysts. In: *Methods in Enzymology* volume 135, Academic Press, London, pp. 3–30.
- Cabral, J.M.S. and Kennedy, J. F.**, 1991 Covalent and coordination immobilization of proteins. In: *Protein immobilization. Fundamentals and Applications*, Marcel Dekker, New York, NY, pp. 73-138.
- Calleri, E., Temporini, C., Perani, E., De Palma, A., Lubda, D., Mellerio, G., Sala, A., Galliano, M., Caccialanza, G., Massolini, G., J.**, 2005, Trypsin-based monolithic bioreactor coupled on-line with LC/MS/MS system for protein digestion and variant identification in standard solutions and serum samples, *Proteome Res.*, 4, 481 – 490.
- Calleri, E., Temporini, C., Perani, E., Stella, C., Rudaz, S., Lubda, D., Mellerio, G., Veuthey, J. L., Caccialanza, G., Massolini, G.**, 2004, Development of a bioreactor based on trypsin immobilized on monolithic support for the on-line digestion and identification of proteins, *J. Chromatogr. A*, 1045, 99 – 109.
- Chibata, I.**, 1978, Immobilized Enzymes, edited by Chibata, I., Halsted Press, 1-144
- Dogruel, D., Williams, P., Nelson, R.W.**, 1995, Rapid tryptic mapping using enzymically active mass spectrometer probe tips, *Anal. Chem.* 67, pp. 4343-4348.
- Domon, B., Aebersold, R.**, 2006, Mass spectrometry and protein analysis *Science* 312, 212 – 217.
- Drobnik, J., Saudek, V., Svec, F., Kalal, J., Vojtisek, V., Barta, M.**, 1979, Enzyme immobilisation techniques on poly(glycidyl methacrylate co-ethylene dimethacrylate) carrier with penicillin amidase as model *Biotechnol. Bioeng.* 21, 1317-1332.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Drobníck, J., Labsky, W., Kudlvasrová, H., Saudek, V., Svec, F.,** 1982, The activation of hydroxyl groups of carriers with 4-nitrophenyl and *N*-hydroxysuccinimidyl chloroformates, *Biotechnol. Bioeng.* 24, pp. 487–493.
- Fengna, X., Jianmin, W., Zhishen, J., Xianfu, L.,** 2004, Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead, *Process Biochemistry* 40, pp. 2833-2840.
- Fernandez, L., Gomez, L., Ramirez, H. L., Villalonga, M. L., Villalonga, R.,** 2005, Thermal stabilization of trypsin with glycol chitosan, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 34, pp. 14-17.
- Frokjaer, S., Otzen, D.E.,** 2005, Protein drug stability: a formulation challenge, *Nat Rev Drug Discov* 4, pp 298–306.
- Fröhlich, T., Arnold, G. J.,** 2006, Proteome research based on modern liquid chromatography-tandem mass spectrometry: separation, identification and quantification, *Journal of neural transmission*, 113(8):973-94.
- Garnick, R.L., Solli, N., Papa, P.A.,** 1988, The role of quality control in biotechnology: an analytical perspective, *Anal. Chem.* 60, 2546-2557.
- Gao, J., Xu, J., Locascio, L.E., Lee, C.S.,** 2001, Integrated microfluidic system enabling protein digestion, peptide separation, and protein identification, *Anal. Chem.* 732 pp 2648–2655.
- Gemeiner, P.,** 1992, Materials for enzyme engineering. In: *Enzyme Engineering*, Ellis Horwood, New York, NY, pp. 13–119.
- Guibault, G.,** 1984, Analytical Uses of Immobilized Enzymes, *Modern Monographs in Analytical Chemistry II*, Marcel Dekker Inc., New York
- Guisán, J. M.,** 1988, Agarose-aldehyde gels as supports for immobilization-stabilization of enzymes, *Enzyme Microb. Technol.* 10, pp. 375–382.
- Guyonnet, V., Tluscik, F., Long, P. L., Polanowski, A., Travis, J.,** 1999, Purification and partial characterization of the pancreatic proteolytic enzymes trypsin, chymotrypsin and elastase from the chicken, *Journal of Chromatogr A*, 852(1):217-225.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hayashi, T., Hyan, S., Cha, W., Ikada, Y.,** 1993, Immobilization of thiol proteases onto porous poly(vinyl alcohol) beads, *Polymer Journal* 25, pp. 489-497.
- He, Q.Y., Chiu, J.F.,** 2003, Proteomics in biomarker discovery and drug development, *J. Cell. Biochem.* 89, pp. 868–886.
- He, Y., Zhong, W., Yeung, E. S.,** 2002, Multiplexed on-column protein digestion and capillary electrophoresis for high-throughput comprehensive peptide mapping *J. Chromatogr. B* 782, pp. 331 – 341.
- Huberman, A. and Aguilar, M. B.,** 1988 Single-step purification of hyperglycemic neurohormones from the sinus gland of *Procambarus bouvieri*: Comparative peptide mapping by means of high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 443, 337-342.
- Hunyadi-Gulyas, E. and Medzihradszky, K. F.,** 2004, Factors that contribute to the complexity of protein digests, *Drug Discovery Today* 3: S3-S10.
- Inada, Y., Furukawa, M., Sasaki, H., Kodera, Y., Hiroto, M., Nishimura, H., Matsushima, A.,** 1995, Biomedical and biotechnological applications of PEG- and PM-modified proteins, *Trends Biotechnol* 13, 86-91.
- Issaq, H.J., Xiao, Z., Veenstra, T.D.,** 2007, Serum and plasma proteomics, *Chem. Rev.* 107 3601-3620.
- James, L., Alexey H.,** 2002, Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp 163-181.
- Junfeng, M., Zhen, L., Xiaoqiang, Q., Qiliang, D., Dingyin, T., Lihua, Z., and Yukui, Z.,** 2008, Organic-Inorganic hybrid silica monolith based immobilized trypsin reactor with high enzymatic activity, *Anal. Chem.* 80, pp 2949-2956.
- Kang, K., Kana, C., Yeung, A., Liu, D.,** 2006, The immobilization of trypsin on soap-free P(MMA-EA-AA) latex particles *Materials Science and Engineering: C Volume 26, Issue 4*, 664-669.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Karlheinz, D., Herbert, W.**, 2002, Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 196s-266s-165s.
- Karty, J. A., Ireland, M. M., Brun, Y. V., Reilly, J. P.**, 2002, Artifacts and unassigned masses encountered in peptide mass mapping, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 782, 363-383.
- Kishimura, H., Hayashi, K.**, 2002 Isolation and characteristics of trypsin from pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*, *Comparative Biochemistry and Physiology* 132, 485-490.
- Klibanov, A.M.**, 1997, Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends Biotechnol* 15, 97–101.
- Kodera, Y., Matsushima, A., Hiroto, M., Nishimura, H., Ishii, A., Ueno, T., Inada, Y.**, 1998, Pegylation of proteins and bioactive substances for medical and technical applications, *Prog. Polym. Sci.*, Vol. 23, 1233–1271.
- Kotzia, G. A., Lapa, K., Labrou, N. E.**, 2007, Tailoring structure function properties of L-asparaginase: engineering resistance to trypsin cleavage. *Biochem J* . 404 pp 337–343.
- Krogh, T.N., Berg, T., Hojrup, P.**, 1999, Protein analysis using enzymes immobilized to paramagnetic beads, *Anal. Biochem.* 274, 153–162.
- Lawson, T. G., Regnier, F. E., Wieth, H. L.**, 1983, Separation of synthetic oligo-nucleotides on columns of microparticulate silica coated with crosslinked polyethylene-imine. *Anal. Biochem.* 133, pp. 85–93.
- Lingiu, C.** 2005, Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Applications and Design, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 475-481.
- Lundell, N., Schreitmuller, T.**, 1999, Sample preparation for peptide mapping-A pharmaceutical quality-control perspective, *Anal Biochem* 266, 31-47.
- Manta, C., Ferraz, N., Betancor, L., Antunes, G., Batista-Viera, F., Carlsson, J., Caldwell, K.**, 2003, Polyethylene glycol as a spacer for solid-phase enzyme immobilization, *Enzyme and Microbial Technology* 33, pp 890–898.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Martin, M., Anders, L.,** 2000, Immobilization of trypsin on porous glycidyl methacrylate beads: effects of polymer hydrophilization. *Coll. Surf. B-Biointerf.* 18, 277–284.
- Massolini, G., Calleri, E. J.,** 2005, Immobilized trypsin systems coupled on-line to separation methods: recent developments and analytical applications, *Journal of separation science* 28, 7 – 21.
- Matsudaira, P.,** 1993, A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, *Academic Press* pp. 1–13 San Diego, CA.
- Matsudaira, P.,** 1993, A Pratical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, 2nd edition, pp. 1–13, Academic Press, San Diego, CA.
- Mattiasson, B. and Kaul, R.,** 1991 Determination of coupling yields and handling of labile proteins in immobilization technology. In: *Protein immobilization. Fundamentals and Applications*, Marcel Dekker, New York, NY, pp. 161–179.
- Mitsutomi, M. and Ohtakara, A.,** 1985, Immobilization of thermostabil α -galactosidase from *Pycnopus Cinnabarinus* on chitin and some properties of the immobilized enzyme, *Journal of Fermentation Technology*, 63(4):325-329.
- Montero, F. M. F., Silva, G. M. M., Silva, J. B. R.,** 2007, Immobilization of trypsin on polysaccharide film from *Anacardium occidentale L.* And its application as cutaneous dressing, *Process Biochemistry* 42, pp. 884-888.
- Mosbach, K.,** 1976, Immobilised Enzymes, *Biochemical Division, Chemical Center, P.O. Box 740, S- 220 07 Lund* 7.
- Nicoli, R., Gaud, N., Stella C., Rudaz, S., Veuthey J. L.,** 2008, Trypsin immobilization on three monolithic disks for on-line protein digestion, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48, 398-407.
- Önal, S.,** 2000, Karpuz (*Citrullus vulgaris*) α -galaktozidazının doğal ve sentetik polimerlerde immobilizasyonu, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pasut, G., Sergi, M., Veronese, F.M.,** 2008, Anti-cancer PEGenzymes: 30 years old, but still a current approach, *Adv Drug Deliv Rev* 60, pp 69–78.
- Patton, W. F.,** 2002, Detection technologies in proteome analysis, *J Chromatogr B* 771:3-31.
- Perona, J. J. and Craik, C. S.,** 1995, Structural basis of substrate specificity in the serine proteases *Protein Science* 4, 337-360.
- Petricoin, E.F., Liotta, L.A.,** 2003, Clinical Applications of Proteomic, *Journal of Nutrition* 133: 2476S–2484S.
- Podgornik, A., Tennikova, T. B.,** 1999, Chromatographic reactors based on biological activity. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 76, 165–210.
- Pohl, G., Källström, M., Bergsdorf, N., Wallén, P., Jörnvall, H.,** 1984, Tissue plasminogen activator: peptide analyses confirm an indirectly derived amino acid sequence, identify the active site serine residue, establish glycosylation sites, and localize variant differences, *Biochemistry* 16, pp 3701–3707.
- Polizzi, K. M., Bommarius, A. S., Broering, J. M., Chaparro-Riggers, J. F.,** 2007 Stability of biocatalysts, *Curr Opin Chem Biol* 11, pp 220–225.
- Porath, J. and Axén, R.,** 1976, Immobilization of enzymes to agar, agarose, and Sephadex supports, *Methods in Enzymology*, volume XLIV, pp. 19–45.
- Quadroni, M., James P.,** 1999, Proteomics and automation, *Electrophoresis* 20, pp. 664-677.
- Rodríguez-Martínez, J. A., Solá, R. J., Castillo, B., Cintro'n-Colo'n, H. R., Rivera-Rivera, I., Barletta, G., Griebenow, K.,** 2008, Stabilization of alpha chymotrypsin upon PEGylation correlates with reduced structural dynamics, *Biotechnol Bioeng.* 101, pp 1142–1149.
- Rodríguez-Martínez, J. A., Rivera-Rivera, I., Solá, R. J., Griebenow, K.,** 2009, Enzymatic activity and thermal stability of PEG-alpha-chymotrypsin conjugates, *Biotechnology letters* 31 (6):883-887.
- Ruckenstein, E., Guo, W.,** 2001, Cross-linking mercerized cellulose membranes and their application to membrane chromatography, *J. Membrane Sci.* 187, 277–286.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sakurai, K., Kashimoto, K., Kodera, I. Y., Inada, Y., 1990**, Solid phase synthesis of peptides with polyethylene glycol-modified protease in organic solvents, *Biotechnology Letters* 12, pp. 685-688.
- Schaefer, H., Chamrad, D. C., Marcus, K., Reidegeld, K. A., Bluggel, M., Meyer, H. E., 2005**, Tryptic transpeptidation products observed in proteome analysis by LC-MS/MS, *Proteomics* 5, 846-852.
- Scouten, W. H., 1987** A Survey of Enzyme Coupling Techniques. In: *Methods in Enzymology*, volume 135, Academic Press, London, pp. 30–65.
- Slysz, G. W. and Schriemer D. C., 2003**, On-column digestion of proteins in aqueous-organic solvents, *Rapid Commun Mass Spectrom* 17, 1044-1050.
- Slysz, G. W. and Schriemer, D. C., 2005**, Blending protein separation and peptide analysis through real-time proteolytic digestion, *Anal Chem* 77, 1572-1579.
- Sola', R. J., Griebenow, K., 2006**, Influence of modulated structural dynamics on the kinetics of alpha-chymotrypsin catalysis. Insights through chemical glycosylation, molecular dynamics and domain motion analysis, *FEBS J* 273 pp 5303–5319.
- Swiss-Prot, 2010**, <http://www.uniprot.org/uniprot/P02769.html>
- Takahashi, K., Saito, Y., Inada, Y., 1988**, Lipase made active in hydrophobic media, *J Am Oil Chem Soc*, 65, pp 911–916.
- Telefoncu, A., 1997**, İmmobilize Enzimler, Enzimoloji (yaz okulu), Editör: A. Telefoncu.
- Temporini, C., Perani, E., Mancini, F., Bartolini, M., Calleri, E., Lubda, D., Felix, G., Andrisano, V., Massolini, G., 2006**, Optimization of a trypsin-bioreactor coupled with high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for quality control of biotechnological drugs, *J. Chromatogr. A*, 1120, 121 – 131.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Thelohan, S., Jadaud, P., Wainer, I.W.**, 1989, Immobilized enzymes as chromatographic phases for HPLC: The chromatography of free and derivatized amino acids on immobilized trypsin, *Chromatographia* 28, 551–555.
- Treva, M.**, 1980, Techniques of Immobilization. In: Immobilized Enzymes. An Introduction and Applications in Biotechnology, Wiley, Chichester-New York, pp. 1–9.
- Triantafyllou, A.O., Wehtje, E., Adlercreutz, P., Mattiasson, B.**, 1997, How do additives affect enzyme activity and stability in nonaqueous media? *Biotechnol Bioeng* 54, 67–76.
- Vasudevan, P.T., López-Cortés, N., Caswell H., Reyes-Duarte, D., Plou, F.J., Ballesteros, A., Como, K. and T. Thomson**, 2004, A novel hydrophilic support, CoFoam, for enzyme immobilization, *Biotechnology Letters*, 26: 473-477.
- Venkatesh, R., Sundaram, P. V.**, 1998, Modulation of stability properties of bovine trypsin after in vitro structural changes with a variety of chemical, *Protein Engineering* 11, pp. 691-699.
- Veronese, F. M.**, 2001, Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions, *Biomaterials* 22, pp 405-417.
- Veronese, F.M. and Mero, A.**, 2008, The impact of PEGylation on biological therapies, *BioDrugs* 22, 315–329.
- Villalonga, R., Villalong, M. L., Gomez, V.**, 2000, Preparation and functional properties of trypsin modified by carboxymethylcellulose. *J. Mol. Catal. B-Enzym* 10, 483–490.
- Wang, W.**, 2005, Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics, *Int J Pharm* 289, 1–30.
- Wilchek, M. and Miron, T.**, 1982, A spectrophotometric assay for soluble and immobilized *N*-hydroxysuccinimide esters, *Anal. Biochem* 126, pp 433–435.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yang, Z., Domach, M., Auger, R., Yang, F. X., Russell, A.,** 1996, Polyethylene glycol-induced stabilization of subtilisin. *Enzyme Microbial Technol*, pp 1882–1889.
- Yodoya, S., Takagi, T., Kurotani, M., Hayashi, T., Furuta, M., Oka, M., Hayashi, T.,** 2002, Immobilisation of bromelain on to porous copoly (α-methyl-l-glutamate/ l-leucine) beads. *Eur Polym J*, 39:173–180.
- Yuhong, W., You-Lo, H.,** 2004, Enzyme immobilization to ultra-fine cellulose fibers via amphiphilic polyethylene glycol spacers, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, Vol. 42, pp 4289–4299.
- Zhang, Z., He, Z., He M.,** 2001, Stabilization mechanism of MPEG modified trypsin based on thermal inactivation kinetic analysis and molecular modeling computation, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 14, 85–94.
- Zihnioğlu, F.,** 1992, Isolation, purification and immobilization of UDP-glucuronyl transferase, PhD Thesis, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

EKLER

Çizelge Ek 1 Karakterizasyon, kararlılık testleri ve protein fragmentasyonunda kullanılan immobilize tripsinin % immobilizasyon verimi, 0.1 M pH 8 Fosfat Tamponu içerisindeki, spesifik ve total aktivitesi.

İmmobilizasyon Yöntemi	Bağlanan Protein (mg)	İmmobilizasyon Verimi (%)	Spesifik Aktivite (nmol/dkmg)	Total Aktivite (nmol/dk)
Silika-GA	11,1	63,1	91,8	1019,0
Silika-GA-Dah	10,6	60,2	102,9	1090,7
Silika-GA-Peg2000-Dah	8,8	50,0	114,3	1005,8
Silika-GA-Peg5000-Dah	11,1	63,1	78,9	875,8

(İmmobilizasyon sırasında: 17,6 mg protein/10 g silika, % 1'lik GA, % 0,1'lik Dah ve % 1'lik PEG 2000 ve 5000 kullanıldı)

Çizelge Ek 2 Karakterizasyon, kararlılık testleri ve protein fragmentasyonunda kullanılan immobilize tripsinin % immobilizasyon verimi, % 30 ACN +% 0.1 TFA içerisindeki, spesifik ve total aktivitesi.

İmmobilizasyon Yöntemi	Bağlanan Protein (mg)	İmmobilizasyon Verimi (%)	Spesifik Aktivite (nmol/dkmg)	Total Aktivite (nmol/dk)
Silika-GA	11,1	63,1	105,7	1173,3
Silika-GA-Dah	10,6	60,2	115,3	1222,2
Silika-GA-Peg2000-Dah	8,8	50,0	117,7	1035,8
Silika-GA-Peg5000-Dah	11,1	63,1	102,4	1136,6

(İmmobilizasyon sırasında: 17,6 mg protein/10 g silika, % 1'lik GA, % 0,1'lik Dah ve % 1'lik PEG 2000 ve 5000 kullanıldı)

ÖZGEÇMİŞ

	Cenk DAĞLIOĞLU <i>Doğum Tarihi ve Yeri</i> : 01/09/1984 - İskenderun <i>Ev Adresi</i> : Alaybey Mah. 1671 Sok. No:69/1 Daire:4 Karşıyaka-İzmir <i>Tel.</i> : 0506 240 0005 / 0532 240 3335 <i>E-Mail</i> : cenkdaglioglu@hotmail.com
EĞİTİM DURUMU	DERECE
1990 - 1995	Mithat Paşa İlkokulu, İskenderun Diploma
1995 - 1998	Beş Temmuz Ortaokulu, İskenderun Diploma
1998 - 2001	Demir Çelik Anadolu Lisesi, İskenderun -
2001 - 2002	İskenderun Lisesi, İskenderun Diploma
2003 - 2008	Ege Üniversitesi, İzmir B.Sc. (Biyokimya)
2008 - (-)	Ege Üniversitesi, İzmir M.Sc (Biyokimya)
ARAŞTIRMA DENEYİMİ	SÜRE
2010	Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald, Greifswald/Almanya 3 ay Institut für Biochemie Dept. of Biotechnology & Enzyme Catalysis *Yüksek Lisans Tez Çalışması
MESLEK EĞİTİMİ	SÜRE
2008	Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir 1.5 ay Sağlık Bilimleri Enstitüsü Araştırma Laboratuvarı (Arlab) *Staj

2007	Yeditepe Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Bölümü *Staj	1.5 ay
ARAŞTIRMA PROJELERİ		
2010	“Tripsin Enziminin İmmobilizasyonu ve Protein Fragmantasyonunda Kullanım Potansiyelinin Araştırılması” Cenk Dağlıoğlu, Ege Üniversitesi Araştırma Fonu, (M.Sc. Tezi), 2010	
YAZ OKULU ve KURSLAR		
20-26 Eylül 2009	“ Protein Analitiği ” Lisans Üstü Yaz Okulu, Bodrum Tubitak	