

SÜPERKRİTİK CO₂ ile ÖN İŞLEM GÖRMÜŞ
Candida rugosa ve *Candida antarctica*
LİPAZ ENZİMLERİNİN
ÇAPRAZ BAĞLI ENZİM AGREGATLARI

DERYA DİNÇYÜREK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
2011

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SÜPERKRİTİK CO₂ ile ÖN İŞLEM GÖRMÜŞ
Candida rugosa ve *Candida antarctica* LİPAZ ENZİMLERİNİN
ÇAPRAZ BAĞLI ENZİM AGREGATLARI

DERYA DİNÇYÜREK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
DOÇ.DR. UĞUR SALGIN

SİVAS

2011

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

Başkan : Doç.Dr. ŞÜKRÜ ASLAN _____

Üye : Doç.Dr. SEMA SALGIN _____

Üye (Danışman) : Doç.Dr. UĞUR SALGIN _____

ONAY

Bu tez çalışması, 12/08/2011 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir

Prof. Dr. Mustafa Değirmenci
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

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

ÖZET
SÜPERKRİTİK CO₂ ile ÖN İŞLEM GÖRMÜŞ
***Candida rugosa* ve *Candida antarctica* LİPAZ ENZİMLERİNİN**
ÇAPRAZ BAĞLI ENZİM AGREGATLARI
DERYA DİNÇYÜREK

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Uğur SALGIN

2011, 91 sayfa

Çapraz bağlı enzim agregatları (cross-linked enzyme aggregates, CLEA), enzimatik üretim proseslerinde serbest ya da immobilize enzim kullanımındaki darboğazların çözümü için son yıllarda geliştirilen yeni bir immobilizasyon yöntemidir. CLEA'ları diğer taşıyıcısız enzim immobilizasyon yöntemlerine göre alternatif ve yeni ortaya çıkmış bir yöntem olmasına karşın; enzim agregatlarının boyutunun herhangi bir difüzyon kısıtlamasına gitmeden nasıl kontrol edilebileceği, enzim konformasyonunun nasıl daha esnek hale getirilebileceği ve enzim aktivitesi ve seçiciliğinin agregasyon koşullarının farklılaştırılması ile nasıl ayarlanabileceği gibi darboğazların aydınlatılması gerekmektedir. Enzimatik sentezlerde çözücü ortamlarına alternatif olarak süperkritik CO₂ (scCO₂)'in kullanılması enzimlerin bölgesel ve stereo seçimli özelliklerini artırılabilir. Sıcaklık ve basınç gibi biyoproses parametrelerindeki küçük değişimler süperkritik akışkanların fizikokimyasal özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir. Enzimlerin mikro çevresindeki bu değişimler biyokatalizörlerin katalitik aktivite ve yapısal kararlılığını da etkiler. Yüksek lisans tez projesinin temel amacı yaygın uygulamalar için katalitik açıdan oldukça aktif ve yeniden kullanılabilir CLEA'larının tasarımına yönelik esnek bir teknoloji platformu oluşturmaktır. Bu amaç doğrultusunda scCO₂ ortamında ön işlem gören enzimlerin CLEA işlemleri öncesi katalitik performansının geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmada, model enzim olarak *Candida rugosa* lipazı (CRL) ve *Candida antarctica* lipazı B (CALB) kullanılmıştır. scCO₂'in sıcaklık ve basınç koşulları sırasıyla 31-60 °C ve 7.38-40 MPa aralığında değiştirilmiştir. CLEA'ların katalitik performanslarını geliştirmek ve en yüksek immobilizasyon etkinliğine ulaşmak için ön işlem koşulları 40 °C ve 10 MPa olarak seçilmiştir. CLEA işlemlerinde scCO₂ ortamında 15 min süreyle ön işlem görmüş ve görmemiş CRL ve CALB enzimleri kullanılmıştır. CLEA aktivitelerine başlangıç enzim derişimi (C_{E0}=50-200 mg/mL), glutraldehit derişimi (C_{GA}=26.7-100 µL/mL) ve amonyum sülfat derişiminin (C_{(NH₄)₂SO₄}=500-800 mg/mL) etkisi araştırılmıştır. Bunun yanı sıra CLEA aktiviteleri üzerine proteik feeder olarak bovin serum albümin (BSA) ve lizin, ve Triton X-100 katkısı da incelenmiştir. BSA derişimi (C_{BSA}) ve lizin derişimi (C_{Lizin}) 0.88-16.67 mg/mL aralığında ve Triton X-100 derişimi ise (C_{Triton X100}) 1.67-4 µL/mL aralığında değiştirilmiştir. CLEA hazırlama sürecinden önce scCO₂ ile ön işlem görmüş CRL enzimleri kullanılarak; C_{E0}=150 mg/mL, C_{GA}=40 µL/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, C_{Lysine}=1.67 mg/mL and C_{Triton X100}= µL/mL koşullarında gerçekleştirilen immobilizasyon süreçlerinde 2278.9 U/g CLEA olarak belirlenen maksimum CLEA aktivitesine ulaşılmıştır. Ticari olarak üretilen CRL enziminin CLEA aktivitesine göre elde edilen bu aktivite değeri yaklaşık 2.2 kat daha fazladır. Konvansiyonel CLEA hazırlama yöntemi kullanılarak; C_{E0}=150 mg/mL, C_{GA}=40 µL/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, C_{Lysine}=1.67 mg/mL ve C_{Triton X100}=3.33 µL/mL koşullarında elde edilen maksimum CLEA aktivitesi ise 1718.2 U/g CLEA değerine ulaşmıştır. Ancak 40 °C ve 40 MPa koşullarındaki scCO₂ ortamında ön işlem görmüş CALB enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların katalitik aktivitesinde önemli bir artış olmamıştır.

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

ABSTRACT
CROSS LINKED ENZYME AGGRAGATES
of *Candida rugosa* and *Candida antarctica*
PRETREATMENT with SUPERCRITICAL CO₂
DERYA DİNÇYÜREK

Master of Science Thesis, Department of Chemical Engineering

Supervisor : Assoc.Prof.Dr. Uğur SALGIN

2011, 91 pages

Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) has been development to solve drawbacks for used free enzyme or carrier-bound enzyme is a new immobilization method in enzymatic production process, recently. Though CLEA is an alternative and a new immobilization method to others carrier-free immobilization methods, many critical questions still remain to be explored, including how to control the particle size of enzyme aggregates without causing significant diffusion constraints, how to make the enzyme conformation flexible, and how to modulate the enzyme activity and selectivity by altering aggregation conditions. Supercritical CO₂ (scCO₂) as an alternative enzymatic synthesis medium to organic solvents is increased the regional and stereo selectivity properties of enzymes. The alteration of physicochemical characteristics of scCO₂ by process parameters remark influence around the micro environment of enzymes and this also affect catalytic activity and stability of enzyme. This master project is to construct a flexible technology platform for designing highly active and reusable CLEAs for broad applications. For this purpose, we are aim to enhance the catalytic performance of enzyme which treated with scCO₂ medium before the preparation of CLEA of enzyme. *Candida rugosa* lipase (CRL) and *Candida antarctica* lipase B (CALB) are be used as model enzymes in this study. The pressure and temperature conditions of scCO₂ were varied 31-60 °C and 7.38-40 MPa, respectively. To enhance the catalytic performance of CLEAs and reach highest immobilization efficiency, the pretreatment conditions were selected as 40 °C and 10 MPa. CRL and CALB were exposed in neither in scCO₂ medium for 15 min or not before the CLEA preparation process. The effect of initial enzyme concentration (C_{E0} =50-200 mg/mL), glutaraldehyde concentration (C_{GA} =26.7-100 µL/mL), ammonium sulphate concentration ($C_{(NH4)2SO4}$ =500-800 mg/mL) on CLEAs activities were investigated. Addition of the bovine serum albumin (BSA) and lysine as a proteic feeder and also Triton X-100 on CLEAs activities were also investigated. BSA concentration (C_{BSA}) and lysine concentration (C_{Lysine}) varied from 0.88-16.67 mg/mL, and also Triton X-100 concentration ($C_{Triton\ X100}$) varied from 1.67-4 µL/mL. The maximum CLEA activity for CRL enzyme reached to 2278.9 U/g CLEA at C_{E0} =150 mg/mL, C_{GA} =40 µL/mL, $C_{(NH4)2SO4}$ =600 mg/mL, C_{Lysine} =1.67 mg/mL and $C_{Triton\ X100}$ = µL/mL when CRL enzyme exposed to scCO₂ medium before CLEA preparation procedure. This CLEA activity value for CRL enzyme is more than about 2.2-fold increased according to a commercially produced CLEA. The maximum CLEA activity obtained using conventional CLEA preparation procedure reached to 1718.2 U/g CLEA at C_{E0} =150 mg/mL, C_{GA} =40 µL/mL, $C_{(NH4)2SO4}$ =600 mg/mL, C_{Lysine} =1.67 mg/mL and $C_{Triton\ X100}$ =3.33 µL/mL. However, CLEA activities for CALB enzyme did not show a significant increase when the enzyme exposed to scCO₂ medium at 40 °C and 10 MPa.

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

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden sınırsızca yararlandığım ve bu suretle her zaman akademik gelişmeme katkıda bulunan, çalışmalarında bir yol haritası oluşturmam ve sonuca başarılı bir şekilde ulaşmam için bana ışık tutan değerli danışman hocam Sayın Doç.Dr. Uğur SALGIN’a çok teşekkür ederim. Deneysel sonuçlarımın yorumlanmasında ve bazı dar boğazların aşılmasında verdiği fikirlerle çalışmalarına destek olan hocam Doç.Dr. Sema SALGIN’a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen araştırma grubumuzun üyeleri değerli arkadaşlarım yüksek lisans öğrencileri; Hasan APTİŞ, Seda BAHADIR, Cumhur TEMÜNER, Nagihan SOYER ve Ömer ALTINSOY’a çok teşekkür ederim.

Beni bu günlere getiren, benden maddi manevi desteğini esirgemeyen çok sevdiğim aileme özellikle her yaptığım işte fikirlerini aldığım annem Meliha EKEN ve çok sevgili Abim Ömer DİNÇYÜREK’e ve sevgili babam Ferruh Cem DİNÇYÜREK’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

“Süperkritik CO₂ ile Ön İşlem Görmüş *Candida rugosa* ve *Candida antarctica* Lipaz Enzimlerinin Çapraz Bağlı Enzim Agregatları” konulu Yüksek Lisans Tez Projemi, CÜBAP M-403 nolu proje destekleyen Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne ayrıca teşekkür ederim.

Derya DİNÇYÜREK

12/02/2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1 GİRİŞ	1
1.1 Enzimler	6
1.1.1 Enzimlerin sınıflandırılması	10
1.1.2 Lipazlar	10
1.1.2.1 <i>Candida rugosa</i> lipaz enzimi	12
1.1.2.2 <i>Candida antartica</i> lipaz enzimi	14
1.1.3 Enzimlerin katalitik performansına etki eden parametreler	15
1.1.4 Enzim/Proteinlerin üç boyutlu yapısı	17
1.2 Enzimlerin İmmobilizasyonu	18
1.2.1 Taşıyıcısız enzim immobilizasyonu	20
1.2.2 Çapraz bağlı enzim agregatları üretiminde karşılaşılan Darboğazlar	25
1.3 Süperkritik Akışkanlar	25
1.3.1 Süperkritik CO ₂ ’nin fizikokimyasal özellikleri	26
1.3.2 Süperkritik CO ₂ ortamında enzimatik sentezler	28
1.3.3 Süperkritik CO ₂ ortamında enzimlerin katalitik performanslarına etki eden parametreler	29
1.4 Konu Üzerinde Önceki Çalışmalar	30

2 MATERYAL ve METOT	36
2.1 Materyal	36
2.2 Çapraz Bağlı Enzim Agregatlarının Hazırlanması	37
2.2.1 Süperkritik CO ₂ ortamında enzimlerin ön işlemleri	37
2.2.2 Üretim ortamından gelen safsızların giderilmesi	39
2.2.3 Çapraz bağlı enzim agregatlarının üretimi	40
2.3 Enzim Aktivitesinin belirlenmesi	42
3 DENEYSEL BULGULAR	44
3.1 Katı Formdaki Enzimlerin Katalitik Aktivitesine Süperkritik CO ₂ 'in Sıcaklık ve Basınç Etkisi	44
3.2 Enzim Çözeltisinde Serbest Formda Bulunan Enzimlerin Katalitik Aktivitesine Süperkritik CO ₂ 'in Sıcaklık ve Basınç Etkisi	45
3.2 Çapraz Bağlı Enzim Agregatlarının Üretiminde Enzim Aktivitesine Etki Eden Parametrelerin İncelenmesi	46
3.3.1 <i>Candida rugosa</i> lipaz enzimi	46
3.3.1.1 Başlangıç enzim derişimi etkisi	46
3.3.1.2 Gluteraldehit derişimi etkisi	55
3.3.1.3 Amonyum sülfat derişimi etkisi	60
3.3.1.4 Proteik feeder ajan derişimi etkisi	65
3.3.1.4.1 Bovin serum albümin derişimi etkisi	65
3.3.1.4.2 Lizin derişimi etkisi	70
3.3.1.5 Yüzey aktif madde Triton X-100 derişimi etkisi	73
3.3.2 <i>Candida antartica</i> lipaz B enzimi	77
4 SONUÇLAR ve ÖNERİLER	81
KAYNAKLAR	88
ÖZGEÇMİŞ	91

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Çapraz bağlı enzim agregatları biçimindeki taşıyıcısız enzim immobilizasyonu	4
Şekil 1.2	Anahtar kilit modeline göre enzim-substrat kompleksinin oluşumu	7
Şekil 1.3	Enzimatik reaksiyon süresince enerji değişimlerini gösteren bir reaksiyon koordinat diyagramı	9
Şekil 1.4	<i>Candida rugosa</i> lipaz enziminin üç boyutlu yapısı	13
Şekil 1.5	<i>Candida antarctica</i> lipazı B enziminin üç boyutlu yapısı	15
Şekil 1.6	Taşıyıcısız enzim immobilizasyon süreçleri	21
Şekil 1.7	Saf CO ₂ ve H ₂ O için basınç-sıcaklık faz diyagramı	26
Şekil 1.8	Tirosinaz enzimi ile hazırlanan CLEA formlarına amonyum sülfat derişiminin etkisi	33
Şekil 1.9	Tirosinaz enzimi ile hazırlanan CLEA formlarına gluteraldehit derişiminin etkisi	33
Şekil 2.1	Yüksek basınç reaktör sisteminin şematik gösterimi	38
Şekil 2.2	<i>p</i> -Nitrofenilasetat lipaz katalizli enzimatik hidroliz tepkimesi	42
Şekil 3.1	scCO ₂ ortamında ön işlem gören katı formdaki CRL enzim aktivitesinin farklı sıcaklıklarda basınç ile değişimi	44
Şekil 3.2	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş serbest formdaki CRL enzim aktivitesinin farklı sıcaklıklarda basınç ile değişimi	46
Şekil 3.3	CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'nın enzim aktivitesine başlangıç enzim derişimi ve gluteraldehit derişiminin etkisi (C _{(NH₄)₂SO₄} =700 mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)	47
Şekil 3.4	scCO ₂ ortamında 10 MPa ve 40°C koşullarında ön işlem gören CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'nın enzim aktivitesine başlangıç enzim derişimi ve gluteraldehit derişiminin etkisi (C _{(NH₄)₂SO₄} =700 mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)	48

Şekil 3.5	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'nın enzim aktivitesine başlangıç enzim derişiminin etkisi ($C_{GA}=26.7 \mu\text{L/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=700 \text{ mg/mL}$, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)	50
Şekil 3.6	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'nın enzim aktivitesine başlangıç enzim derişiminin etkisi ($C_{GA}=40 \mu\text{L/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=700 \text{ mg/mL}$, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)	51
Şekil 3.7	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'nın enzim aktivitesine başlangıç enzim derişiminin etkisi ($C_{GA}=60 \mu\text{L/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=700 \text{ mg/mL}$, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)	52
Şekil 3.8	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'nın enzim aktivitesine başlangıç enzim derişiminin etkisi ($C_{GA}=80 \mu\text{L/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=700 \text{ mg/mL}$, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)	54
Şekil 3.9	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'nın enzim aktivitesine başlangıç enzim derişiminin etkisi ($C_{GA}=100 \mu\text{L/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=700 \text{ mg/mL}$, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)	55
Şekil 3.10	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'larının katalitik aktivitesine gluteraldehit derişimi etkisi ($C_{E_0}=50 \text{ mg/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=700 \text{ mg/mL}$, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)	56
Şekil 3.11	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'larının katalitik aktivitesine gluteraldehit derişimi etkisi ($C_{E_0}=100 \text{ mg/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=700 \text{ mg/mL}$, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)	57
Şekil 3.12	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'larının katalitik aktivitesine gluteraldehit derişimi etkisi ($C_{E_0}=150 \text{ mg/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=700 \text{ mg/mL}$, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)	59
Şekil 3.13	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'larının katalitik aktivitesine gluteraldehit derişimi etkisi ($C_{E_0}=200 \text{ mg/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=700 \text{ mg/mL}$, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)	60

Şekil 3.14	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'nın enzim aktivitesine amonyum sülfat derişimi etkisi ($C_{GA}=40 \mu\text{L/mL}$, $C_{E0}=150 \text{ mg/mL}$, $\text{pH}=7.2$ 0.1 M fosfat tamponu)	62
Şekil 3.15	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'nın enzim aktivitesine amonyum sülfat derişimi etkisi ($C_{GA}=50 \mu\text{L/mL}$, $C_{E0}=150 \text{ mg/mL}$, $\text{pH}=7.2$ 0.1 M fosfat tamponu)	63
Şekil 3.16	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'nın enzim aktivitesine amonyum sülfat derişimi etkisi ($C_{GA}=60 \mu\text{L/mL}$, $C_{E0}=150 \text{ mg/mL}$, $\text{pH}=7.2$ 0.1 M fosfat tamponu)	64
Şekil 3.17	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine proteik feeder ajan bovin serum albümin derişiminin etkisi ($C_{GA}=40 \mu\text{L/mL}$, $C_{E0}=150 \text{ mg/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=600 \text{ mg/mL}$, $\text{pH}=7.2$ 0.1 M fosfat tamponu)	66
Şekil 3.18	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine proteik feeder ajan bovin serum albümin derişiminin etkisi ($C_{GA}=50 \mu\text{L/mL}$, $C_{E0}=150 \text{ mg/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=600 \text{ mg/mL}$, $\text{pH}=7.2$ 0.1 M fosfat tamponu)	68
Şekil 3.19	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine proteik feeder ajan bovin serum albümin derişiminin etkisi ($C_{GA}=60 \mu\text{L/mL}$, $C_{E0}=150 \text{ mg/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=600 \text{ mg/mL}$, $\text{pH}=7.2$ 0.1 M fosfat tamponu.	69
Şekil 3.20	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine proteik feeder ajan lizin derişiminin etkisi ($C_{GA}=40 \mu\text{L/mL}$, $C_{E0}=150 \text{ mg/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=600 \text{ mg/mL}$, $\text{pH}=7.2$ 0.1 M fosfat tamponu)	70
Şekil 3.21	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine proteik feeder ajan lizin derişiminin etkisi ($C_{GA}=50 \mu\text{L/mL}$, $C_{E0}=150 \text{ mg/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=600 \text{ mg/mL}$, $\text{pH}=7.2$ 0.1 M fosfat tamponu)	72
Şekil 3.22	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine proteik feeder ajan lizin derişiminin etkisi ($C_{GA}=60 \mu\text{L/mL}$, $C_{E0}=150 \text{ mg/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=600 \text{ mg/mL}$, $\text{pH}=7.2$ 0.1 M fosfat tamponu)	73

Şekil 3.23	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine yüzey aktif maddesi Triton X-100 derişiminin etkisi ($C_{E0}=150$ mg/mL, $C_{(NH4)2SO4}=600$ mg/mL, $C_{GA}=40$ µL/mL, $C_{BSA}=3.33$ mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)	75
Şekil 3.24	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine yüzey aktif maddesi Triton X-100 derişiminin etkisi ($C_{E0}=150$ mg/mL, $C_{(NH4)2SO4}=600$ mg/mL, $C_{GA}=40$ µL/mL, $C_{Lizin}=1.67$ mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)	76
Şekil 3.25	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CALB enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine ortam bileşimlerini etkisi	79

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Enzimlerin sınıflandırma sistemi	11
Çizelge 4.1	scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş <i>Candida rugosa</i> lipaz enziminden hazırlanan CLEA'larında ulaşılan en yüksek aktivite değerinin sağladığı koşullarda % aktivite artış oranları ve scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş enzimlerden sentezlenen CLEA'larının ticari CLEA'lara göre % aktivite artış oranları	84
Çizelge 4.2	Çizelge 4.2 scCO ₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş <i>Candida antarctica</i> lipazı B enziminden hazırlanan CLEA'larında ulaşılan en yüksek aktivite değerinin sağladığı koşullarda % aktivite artış oranları	87

SİMGELER DİZİNİ

C_{BSA}	BSA derişimi
C_{Eo}	Başlangıç enzim derişimi
C_{GA}	Gluteraldehit derişimi
C_{Lizin}	Lizin derişimi
$C_{(NH_4)_2SO_4}$	Amonyum sũlfat derişimi
$C_{TritonX100}$	TritonX100 derişimi
P	Mutlak basınç
P_C	Kritik basınç
T	Mutlak sıcaklık
T_c	Kritik sıcaklık

KISALTMALAR DİZİNİ

AGG	Agregat formdaki enzim
BSA	Bovin serum albümin
CALA	<i>Candida antarctica</i> lipazı A
CALB	<i>Candida antarctica</i> lipazı B
CLE	Çapraz bağlı çözünmüş enzim
CLEA	Çapraz bağlı enzim agregatları
CLEC	Çapraz bağlı enzim kristalleri
CRL	<i>Candida rugosa</i> lipazı
CRY	Kristal formdaki enzim
CSDE	Çapraz bağlı püskürterek kurutulmuş enzim
E	Enzim
EP	Ürün geçiş kompleksi
ES	Enzim substrat kompleksi
IL	İyonik sıvı
P	Ürün
S	Substrat
scCO ₂	Süperkritik karbondioksit
SCF	Süperkritik akışkan
SDE	Püskürtülerek kurutulmuş enzim
SDS	Sodyum dodesil sülfat

1 GİRİŞ

Enzimler canlı hücrelerde sentezlenen ve organizmadaki tüm reaksiyonların ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan biyolojik katalizatörlerdir. Uygun koşullar altında katalitik performanslarını doğal ortamlarının dışında da gösterebilen enzimler;

- i) ileri derecede substrat spesifikliğıne sahip olmalarından dolayı istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu engellemesi,
- ii) katalizlediğı reaksiyonlarda yüksek ürün verimliliğı sağlaması ve
- iii) stereospesifik reaksiyonları katalizleyebilmesi

gibi reaksiyon mühendisliğı uygulamalarında kimyasal katalizörler göre büyük avantaj sağlamaktadır. Ayrıca ılımlı koşullarda gerçekleşen enzimatik sentezler ile işletme maliyeti azaltılmakta ve ekolojik problemlerin oluşumu önlenmektedir (Batista-Viera ve Brena, 2006)

Kimya ve biyokimya endüstrisi başta olmak üzere biyoteknolojik proseslerin yer aldığı birçok sektörlerde enzimler yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Endüstriyel uygulamalarda serbest enzimlerin katalitik aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması ya çok zordur ya da hiç mümkün değildir. Aynı zamanda, serbest enzimlerin reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılmasında karşılaşılan darboğazlar nedeniyle kimyasal ya da biyokimyasal sentezlerin kontrolünü zorlaştırır (Guisan, 2006). Çok yaygın kullanım alanına sahip olan enzimlerin, mühendislik uygulamalarında karşılaşılan darboğazların çözümü için geliştirilen en önemli çözüm yöntemlerinden biri enzimlerin immobilizasyonudur. Immobilizasyon; suda çözünen ve çözeltide serbest hareket edebilen enzim moleküllerin, suda çözünmeyen reaktif polimer taşıyıcıya kovalent bağlanarak, yine suda çözünmeyen yüzey aktif taşıyıcılarda adsorplanarak bifonksiyonel reaktifler ile çapraz bağlanarak ve polimer matriste yarı geçirgen membran veya mikrokapsüllerde tutuklanarak hareketinin sınırlandırılması olayı olarak tanımlanabilir

(Topçular, 2006). Enzim immobilizasyonu ilk olarak sürekli sistemlerde enzim kullanımını sağlamak için geliştirilmiştir. Bunun yanı sıra, tepkime ortamından etkin biçimde uzaklaştırılabilmesi sonucu hem prosesin kontrolü kolaylaştırılabilmekte hem de enzimlerin geri kazanımı ile tekrar kullanımı sağlanabilmektedir. Ayrıca enzimlerin immobilizasyon ile katalitik aktivitesi, seçiciliği ve stabilitesi de arttırılabilmektedir (Mateo vd., 2003).

Serbest enzimlerle kıyaslandığında immobilize formdaki enzimlerle;

- i) reaksiyon ortamından kolayca uzaklaştırılabilmesi sağlanmakta,
- ii) tepkime ürününün enzim atığı içermesi önlenebilmekte,
- iii) biyoproses koşullarına karşı dayanım arttırılabilmekte,
- iv) uzun süre reaksiyon ortamlarında yeniden kullanılabilirliği arttırılabilmekte,
- v) seri ve paralel reaksiyonların yer alacağı biyokatalitik reaktör sistemlerin geliştirilmesiyle hem ürün seçiciliği hem de verimliliğin kontrolü sağlanabilmekte,
- vi) doğal enzimlere kıyasla kararlılıkları geliştirilebilmekte,
- vii) bazı durumlarda serbest enzimlere kıyasla daha yüksek aktivite gösterebilmektedir.

Ayrıca bazı enzimlerin immobilize edilmesi sonucu otokatalizi yani kendini parçalama olasılığı da azaltılabilmektedir (Telefoncu, 1997).

Enzimlerin immobilizasyonu süreci ilk olarak 20. yüzyılın ikinci yarısında başlamıştır. Son 60 yıldır enzimlerin immobilizasyonu sürecinde birçok taşıyıcı sistemi enzim immobilizasyon yöntemlerinde geliştirilmiştir. Bu süreçte, mikroküre, membran, film, kapsül gibi değişik immobilizasyon sistemleri taşıyıcı yani destek maddeleri olarak kullanılmıştır. Bu destek maddeleri doğal, yarı sentetik ya da sentetik polimerler ya da biyopolimerlerden oluşmaktadır. Taşıyıcı destek maddelerinin kullanılmasındaki temel amaç;

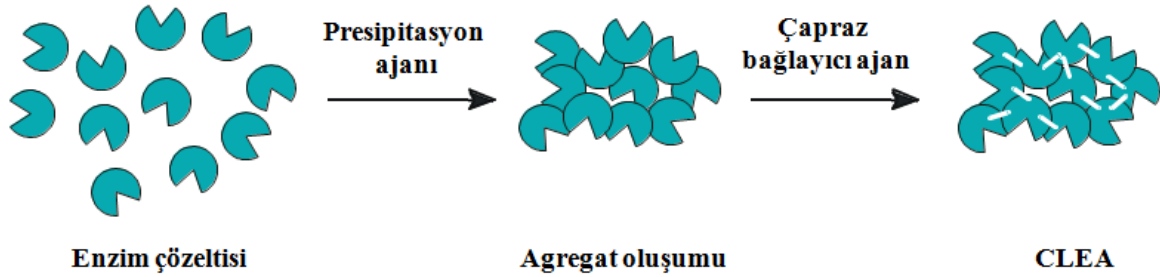
- i) enzimin sıvı (su ya da organik bir bileşik) tepkime ortamında çözünmez duruma getirmek
- ii) taşıyıcıya bağlanmış enzimin ortam koşullarına karşı dayanıklılığını artırmak ve
- iii) enzimin tepkime ortamından ayrılmasını kolaylaştırmaktır(Sheldon vd., 2006).

Taşıyıcılı immobilizasyon sistemlerinde, destek maddesi olarak kullanılan materyalin katalitik olmayan kütlesi, immobilize enzim formundaki biyokatalizörün katalitik aktivitesinde azalmaya neden olur. Immobilizasyon işlemi sonunda elde edilen biyokatalizörün birim kütlesi başına enzim miktarının artırılması–yani daha fazla enzim yüklemesinin yapılması-biyokatalizörün katalitik aktivitesinde serbest enzime göre %50’den fazla azalmaya neden olabilmektedir (Sheldon vd., 2006).

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

immobilizasyon yöntemi geliştirilmeye başlanmıştır. Son yıllarda CLEA formunda gerçekleştirilen enzim immobilizasyon yöntemi ise özel ilgi görmektedir(Sheldon, 2007).

Bu immobilizasyon yönteminde, Şekil 1.1' de gösterildiği gibi çözünmüş enzim molekülleri arasındaki uzaklık, uygun bir presipitasyon ajanı yardımı ile sıklaştırılarak agregat oluşumunun sağlanması ve uygun bir çapraz bağlayıcı ajan yardımı ile agregat formundaki enzimlerin birbirleriyle kovalent bağlanması sürecini kapsamaktadır.



Şekil 1.1 Çapraz bağlı enzim agregatları biçimindeki taşıyıcısız enzim immobilizasyonu (Sheldon, 2007)

Sürelî yayın literatüründe, çapraz bağlı enzim agregatları formunda gerçekleştirilen biyokatalizörlerin katalitik performansı ve kararlılığının, çapraz bağlı enzim kristalleri formundaki biyokatalizörlerin katalitik performansı ve kararlılığına benzer olduğu bildirilmektedir. Çapraz bağlı enzim kristallerinin aksine çapraz bağlı enzim agregatlarında yoğun iş gücü gereksinimine ve yüksek saflıkta kristal formda enzim kullanımına gerek duyulmaz (Sheldon, 2007).

Çapraz bağılı enzim agregatları diğer taşıyıcısız enzim immobilizasyon yöntemlerine alternatif ve 2000'li yıllardan sonra ortaya çıkmış yeni bir yöntem olmasına karşın;

- i) enzim agregat boyutlarının herhangi bir difüzyon kısıtlaması olmadan nasıl kontrol edilebileceği,
- ii) enzim konformasyonunun nasıl daha esnek hale getirilebileceği,
- iii) enzim aktivitesi ve seçiciliğinin agregasyon koşullarının farklılaştırılması ile nasıl ayarlanabileceği gibi darboğazların aydınlatılması gerekmektedir.

Yüksek lisans tez projesinin amacı; *Candida rugosa* lipazı (CRL) ve *Candida antarctica* lipazı B (CALB) enzimlerinin agregasyon öncesi scCO₂ ortamında ön işlem görmesiyle enzim konformasyon yapısında bir tersinir basınç denatürasyonu gerçekleştirilerek, aktif konumların korunmasını sağlamak ve aynı zamanda çapraz bağlayıcı ajan gluteraldehitin, enzimlerde aşırı bağlanmasını önleyerek, katalitik performansı geliştirilmiş, çapraz bağılı enzim agregatları formundaki enzim immobilizasyonunun tasarlanmasıdır. Bu bağlamda, süperkritik CO₂ ortamının basınç ve sıcaklık koşullarına bağlı olarak *Candida rugosa* lipazı ve *Candida antarctica* lipazı B enzimlerinin aktivitelerindeki değişimlerin etkisi araştırılarak, çapraz bağılı enzim agregatlarının oluşturulmasında en uygun ön işlem koşullarının etkisi araştırılmıştır. İmmobilizasyon öncesi enzim konformasyonunda bir esneklik sağlanması amacıyla gerçekleştirilen ve en uygun scCO₂ ortamında ön işlem görmüş enzimler kullanarak gerçekleştirilen çapraz bağılı enzim agregatlarının katalitik performansına etki eden temel ortam bileşimlerinin etkisini araştırmaktır. Yüksek lisans tez projesi kapsamında presipitasyon ajanı olarak amonyum sülfat [(NH)₂SO₄] ve bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajan olarak gluteraldehit kullanılmıştır. *Candida rugosa* lipazı ve *Candida antarctica* lipazı B enzimlerinin çapraz bağılı enzim agregatların katalitik aktivitelerine başlangıç enzim derişimi, bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajan derişimi, presipitasyon ajan derişimi etkisi, proteic feeder olarak bovin serum albümin ve lizin derişim etkisi ile yüzey aktif

maddesi Triton X100 derişiminin etkisi sistematik olarak araştırılmıştır. Elde edilen bulgular süreli yayın literatüründe yer alan ve Serrano vd. (2002) önerilen yöntemle elde edilen çapraz bağı enzim agregatlarının katalitik aktivite değerleri ile kıyaslanmıştır.

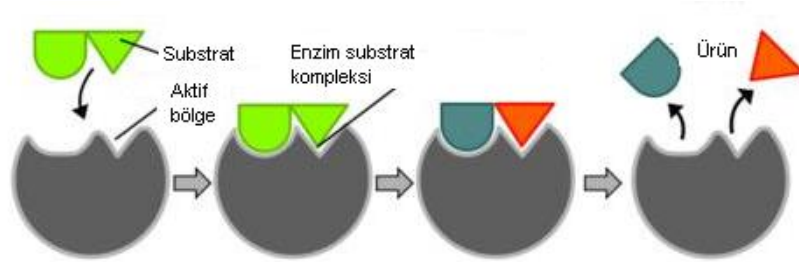
1.1 Enzimler

Enzimler metabolizma reaksiyonların çoğunu hızlandıran protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Enzimler ile kimyasal katalizörler arasındaki en önemli fark enzimlerin substratlara karşı spesifik özellik göstermeleridir. Genel olarak enzimler belirli substratlar arasındaki belirli reaksiyonları katalize ederler. Enzimlerin protein kısmına apoenzim denir. Enzimlerin protein kısmı diğer proteinlerde de olduğu gibi peptit bağlarıyla birbirlerine bağlanmış 20 amino asitten oluşur. Bu kısım ılımlı koşulların üzerindeki sıcaklıklarda kolaylıkla denatüre olan bir yapıya sahiptir. Enzimlerin bazıları basit proteinlerdir. Bunların katalitik etki gösteren kısmı doğrudan doğruya proteinin polipeptit zinciridir. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonunun kararlılığına bağlıdır. Eğer enzim denatüre olursa ya da alt birimlerine ayrılırsa katalitik aktivitesi genellikle kaybolur. Bu nedenle enzimlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısı, katalitik aktivite için önemlidir. Enzimler, proteinlerde olduğu gibi molekül kütleleri 12000–10×10⁶ aralığında değişebilir. Bazı enzimler amino asit kalıntıları dışında aktivite için kimyasal gruplara gereksinim duymazken bazıları ise kofaktör olarak adlandırılan Fe⁺², Mg⁺², Mn⁺² ya da Zn⁺² gibi bir ya da daha fazla inorganik iyon ya da koenzim olarak adlandırılan kompleks organik ve metalloorganik moleküllere gereksinim duyar. Bazı enzimler ise katalitik aktiviteleri için hem koenzime hem de bir ya da daha fazla metal iyonuna gereksinim duyar. Apoenzime çok sıkı ya da kovalent olarak bağlanan bir koenzim ya da metal iyonu, prostetik grup olarak adlandırılır. Metal iyonlarıyla ve/veya koenzimiyle birlikte katalitik olarak aktif olan bir enzim holoenzim denir. Belirtilen özellikteki enzimlerin protein kısmı apoenzim ya da apoprotein olarak adlandırılır. Koenzimler özgül işlevsel grupların geçici taşıyıcısı olarak işleve sahiptir. Bu bağlamda bazı enzim proteinleri fosforillenme, glikozillenme ve diğer

süreçlerle kovalent olarak modifiye edilebilirler. Bu değişimlerin birçoğu enzim aktivitesinin düzenlenmesini de kapsar (Nelson ve Cox, 2005).

Enzimlerin genel özellikleri aşağıda gibi sıralanabilir;

- i) Enzimler reaksiyon ortamlarında inert bir girdi olup sadece reaksiyonun aktivasyon enerjisini azaltan biyolojik katalizörlerdir. Katalizledikleri reaksiyonun denge sabitlerini değiştirmezler.
- ii) Enzimler substrata karşı yüksek spesifiklik özelliği gösterirler. Bu nedenle bir ya da birkaç spesifik substratla etkileşime girmesine karşın sadece bir tip kimyasal reaksiyonu katalizler.
- iii) Enzim molekülleri katalitik uçlunun bulunduğu aktif bir bölgeye sahiptir. Bu bölge substrata komplementer olan aminoasit yan zincirlerini içerir. Aktif bölge substratı bağlar ve Şekil 1.2’ de gösterildiği gibi anahtar kilit modeli şeklinde enzim-substrat kompleksini (ES) oluşturur.



Şekil 1.2 Anahtar kilit modeline göre enzim-substrat kompleksinin oluşumu (<http://wapedia.mobi>)

- iv) Enzim, basit yapıdaki bir protein ise katalitik aktivite için kendi doğal konformasyonu yeterlidir. Ancak konjuge yapıda bir protein ise katalitik aktivite $apoenzim + kofaktör = holoenzim$ şeklinde hem protein konformasyonuna hem de kofaktörlerin varlığına dayanır.
- v) Enzimlerin katalitik aktiviteleri ya aktive ya da inhibe edilebilecek şekilde regüle edilebilir. Böylece biyoteknolojik proseslerde istenilen ürün oluşum hızı, ürün

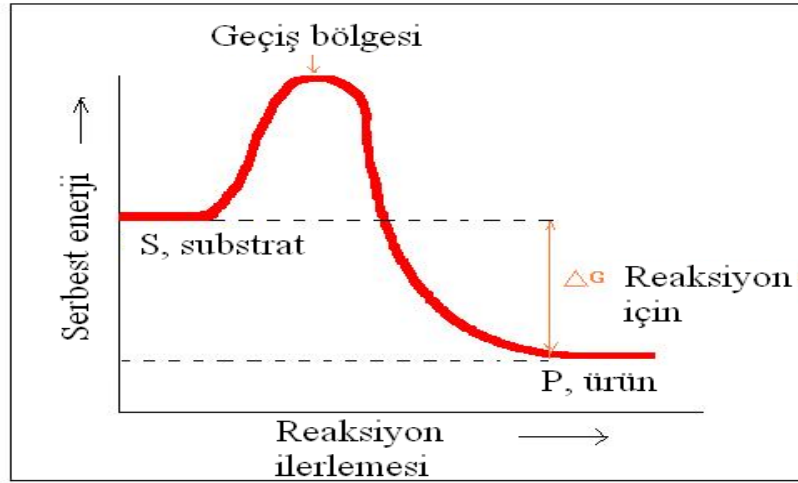
verimliliği ya da ürün seçimliliği için modifiye edilebilir. Birçok enzim hücre içindeki spesifik organellerde lokalize bulunur. Böylece substratın ya da sentez ürünlerinin farklı enzimatik sentezlere karşı izole edilmiştir. Bu sayesinde uygun bir sentez ortamına sahip olurlar. Hücrede bulunan enzimler hücrenin aynı zamanda fonksiyonunu da belirlerler (Kalaycıoğlu vd., 2006).

Enzimler genellikle substrattan daha büyük biyomoleküllerdir. Enzim molekülü üzerindeki kofaktörlerin ve/veya koenzimlerin yer aldığı, enzim substrat kompleksinin oluşturduğu dar bir bölge aktif merkezi oluşturur. Enzimlerin aktif merkezlerinde substratın bağlama bölgesi için bir ya da daha fazla katalitik açıdan aktif bölgeler bulunur. Enzimin aktif merkezlerine, substratların bağlanması üzerine iki hipotez bulunmaktadır. Bunlardan ilki substratla enzim arasındaki anahtar kilit modeli diğeri ise indüklenmiş uyum modelidir (Kalaycıoğlu vd., 2006).

Şekil 1.2' de de görüldüğü basit bir enzimatik tepkimenin stokiyometrik denklemi denklem (1.1)'de gösterildiği gibi yazılabilir. Burada enzim (E) ve substrattan (S) enzim–substrat geçiş kompleksi (ES) oluşumu ve daha sonra enzim–ürün geçiş kompleksinin (EP) oluşumu izler. Bu süreç sonunda da biyokatalizör görevini yapan ve inert özellik gösteren enzim ile ürün (P) oluşur.



Enzimatik sentezlerde tepkime hızı ve tepkimenin termodinamik denge süreci arasındaki farkın belirlenmesi önemlidir. Biyokatalizörün görevi, enzimatik reaksiyonun hızını arttırmak olmasına karşın reaksiyonun dengesini değiştirmez. $S \leftrightarrow P$ gibi bir reaksiyon modelindeki enzimatik reaksiyon süresince enerji değişimlerini gösteren bir reaksiyon–koordinat diyagramıyla tarif edilebilir.



Şekil 1.3 Enzimatik reaksiyon süresince enerji değişimlerini gösteren bir reaksiyon koordinat diyagram ([http:// en.wikibooks.org](http://en.wikibooks.org))

Tepkimenin hızı tamamıyla farklı parametrelere bağlıdır. S ve P arasında reaktif grupların sıralanması, kararlı olmayan geçici yük oluşumu, bağların yeniden düzenlenmesi ve tepkimenin her iki yönde ilerlemesinde gerekli, diğer dönüşümler için gereken bir enerji engeli vardır. Tepkimenin ilerlemesi için moleküler bu engeli aşmalıdır ve böylece daha yüksek bir enerji düzeyi kazanmalıdır. Enerji eğrisinin tepe noktası, S veya P durumuna dönüşme olasılığının eşit olduğu bir noktadır. Bu, geçiş durumu olarak adlandırılır. Geçiş durumu herhangi bir belirgin kararlılıkta kimyasal bir özellik değildir ve tepkimenin ara ürünleriyle karıştırılmamalıdır. Basitçe bağların yıkılması, bağ oluşumu ve yük gelişimi gibi olayların olduğu hızlı moleküler geçiş alanları hem substrat hem de ürüne eşit oranda dönüşmenin olduğu belirli bir noktaya ilerletilir. Zemin durumu ve geçiş durumunun enerji düzeyleri arasındaki fark, aktivasyon enerjisi olarak adlandırılır. Tepkime hızı, bu aktivasyon enerjisini yansıtır; yüksek aktivasyon enerjisi, yavaş bir tepkimeyi gösterir. Tepkime hızı, sıcaklığı artırarak arttırılabilir, böylece enerji engelini aşmak için yeterli enerjiye sahip moleküllerin sayısı artar. Alternatif olarak aktivasyon enerjisi, katalizörün ilavesiyle daha da düşürülebilir. Katalizörler, tepkime hızını, aktivasyon enerjisinin düşürülmesiyle arttırırlar (Nelson ve Cox, 2005).

Aktivasyon enerjileri kimyasal tepkimeler için enerji engelleridir, bu engeller yaşam için oldukça önemlidir. Molekölün kararlılığı kendi aktivasyon enerjilerinin büyüklüğüyle artar. Böyle enerji engelleri olmazsa, kompleks makro moleküller daha basit moleküler formlarına kendiliğinden dönüşür ve kompleks ve yüksek düzendeki yapılar ve hücrelerin metabolik süreçleri var olamaz. Enzimler hücre yaşamı için gerekli olan tepkimeler için seçicilikle düşük aktivasyon enerjileri oluştururlar (Nelson ve Cox, 2005).

1.1.1 Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler, katalizlediği reaksiyona göre sınıflandırılır. Birçok enzim, aktivitesini tarif eden bir deyim, bir kelime ya da substratın adına “-az” son eki ilavesiyle adlandırılır. Örneğin üreaz, ürenin hidrolizini, DNA polimeraz, DNA oluşturmak üzere nükleotitlerin polimerleşmesini katalizler. Pepsin ve tripsin gibi diğer enzimler ise substratlarını ya da reaksiyonlarını belirtmeksizin isimlendirilir. Bazen aynı enzimler iki ya da daha fazla ada ya da iki farklı enzim aynı ada sahip olabilir. Bu gibi belirsizlikler ve yeni keşfedilen enzimlerin sayısındaki sürekli artış nedeniyle enzimlerin sınıflandırılması ve adlandırılması için uluslararası anlaşmayla bir sistem belirlenmiştir. Bu sistemde Çizelge 1.1’ de gösterildiği gibi katalizlediği reaksiyon tipini temel alarak enzimleri her bir alt grubuyla altı temel gruba ayırır (Salgın, 1996).

1.1.2 Lipazlar

Enzimler, katalizledikleri tepkimeye göre oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olmak üzere 6 grupta incelenirler (Çizelge 1.1). Lipazlar, hidrolazlar grubunda yer alır. Lipazlar, bilimsel araştırmalarda ve endüstride geniş kullanım alanına sahiptir. Lipazlar, farklı hayvan, bitki ve mikrobiyal (bakteri ve fungus) kaynaklardan elde edilmektedir. Mantar ve bakteri kullanarak biyo-

Çizelge 1.1 Enzimlerin sınıflandırma sistemi (Salgın, 1996)

Grup	Katalizledikleri tepkime	Katalizlenen grup
1. Oksidoredüktazlar	Yükseltgenme ve indirgenme tepkimeleri	1.1 $>CH-OH$ 1.2 $>C=O$ 1.3 $-CH=CH-$ 1.4 $>CH=NH_2$ 1.5 $>CH-NH-$
2. Transferazlar	Fonksiyonlu grup aktarımı	2.1 Tek $-C'$ lu grup 2.2 Aldehit ve keton grupları 2.3 Asil grubu 2.4 Glikosil grubu 2.5 Fosfat grubu
3. Hidrolazlar	Hidroliz tepkimeleri	3.1 Esterler 3.2 Glukositik bağlar 3.3 Eter bağları 3.4 Peptit bağları
4. Liyazlar	Çift bağlara ekleme/ doyurma	4.1 $>C=C<$ 4.2 $>C=O$ 4.3 $>C=N-$
5. İzomerazlar	İzomerasyon Tepkimeleri	5.1 Rasemazlar
6. Ligazlar	ATP parçalanması ile bağ oluşturma	6.1 $C-O$ 6.2 $C-S$ 6.3 $C-N$ 6.4 $C-H$

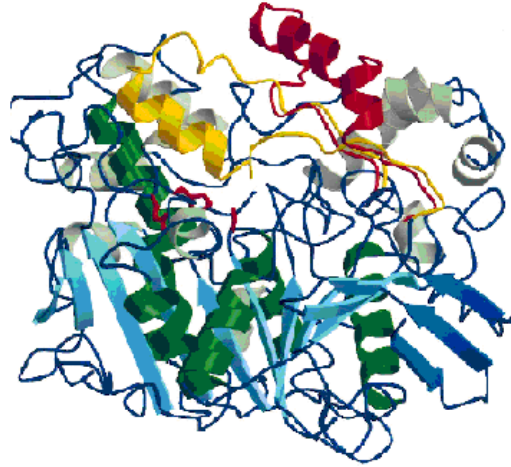
teknolojik reaktör sistemlerinde de üretilebilirler. Bitki, hayvan ve mikrobiyal lipazlar arasında çok geniş uygulama alanı bulan lipazlar ise mikrobiyal lipazlardır. Kimyasal ve biyokimyasal uygulamalarında substrat seçimliliği, ürün verimliliği ve enantiyo seçimliliği yüksektir. Hidrofobik yüzeyleri sayesinde substratlarla kolayca etkileşime girebilirler (Sanchez vd., 1999).

Lipazlar; esterleşme, transesterleşme, interesterleşme, alkoliziz, aminoliziz ve hidroliz tepkimelerini düşük sıcaklıkta katalizleyebilirler. Organik çözücülere karşı toleransı ve sıcaklığa karşı stabilitesi nedeniyle biyoteknoloji uygulamalarında yaygın kullanım alanına sahiptirler (Rua vd., 1997). Ester bağına spesifik olan lipazlar, yüksek sıcaklık koşullarında da aktif özellik gösterir. Enzim substrat ilişkisinden sonra mikrobiyal kontaminasyonu ve yan ürün oluşumunu engeller. Son yıllarda farklı biyolojik kaynaklardan izole edilen lipazlar ile organik çözücülere ve yüksek sıcaklığa karşı kararlılıklarını artırmaya yönelik bilimsel çalışmalar geniş bir spektrumda sürdürülmektedir. Diğer enzimlerin aksine lipazlar, ekonomik ve kolay bulunabilirliğinin yanı sıra hem kimyasal hem de biyoteknolojik proseslerde hızla artan kullanım geniş bir potansiyel sahiptir (Li ve Zhang, 2005).

1.1.2.1. *Candida rugosa* lipaz enzimi

Candida rugosa lipaz (CRL) enzimi; serin, glutamin ve histidin katalitik üçlüsünden oluşan ve bu katalitik üçlüyü kaplayan bir kapağa sahiptir. Bu kapak, α -heliks yapısında olup kapağın aktif bölgeye bakan iç yüzeyi, hidrofobik, dış yüzeyi ise hidrofilik özelliğe sahiptir. CRL enziminin yer aldığı reaksiyon ortamlarında katalitik açıdan aktif olabilmesi için kapağın kapalı formdan çıkıp açık forma geçmesi gerekmektedir. CRL enzimi özellikle farmasötik bileşiklerin rezolüsyonunda, deterjanlarda biyosüpfaktan olarak, biyosensörlerde, karbohidrat ester sentezinde, enantiyomerik saflıkta amin ve amidlerin üretiminde, deri endüstrisinde, kozmetik ve parfümeride geniş kullanım alanına sahiptir. CRL'nin ekonomik kullanımını sağlamak

için tutuklanmış enzimin ticari kullanımı daha yaygındır. CRL enzimlerindeki serin aktif konumu enzimdeki α -heliks ve β -tabaka arasında yer alırken histidin ve glutamin aktif konumları ise α -heliks ve β -tabaka yanında yer alır. Substratla etkileşimi sırasında substrat aktif yüzeyi kaplayan hidrofobik kanala girerek nükleofilik serin üzerinden etkileşim gerçekleşir. Lipazların substrat ile etkileşimi sırasında iki ara ürün oluşur. Serin, substrata nükleofilik etki ederken, bir proton serinden histidine transfer edilir ve böylece serin daha da nükleofilik hale gelir. Serin, substrata nükleofilik olarak etki ederek birinci ara ürünü olan E-S kompleks geçişi oluşturmaktadır. Daha sonra histidin üzerindeki proton alkoksi grubuna bağlanır ve ara üründen alkol ayrılarak açıl-enzim kompleksi meydana gelir. Yüksek reaktif ara yüzey daha sonra su molekülü veya ikinci bir alkolle (transesterleşme) tepkimeye girerek ürünü oluşturmakta ve enzim serbest hale geçmektedir (Bakkal, 2006). CRL enziminin üç boyutlu yapısı Şekil 1.4' de gösterilmiştir.

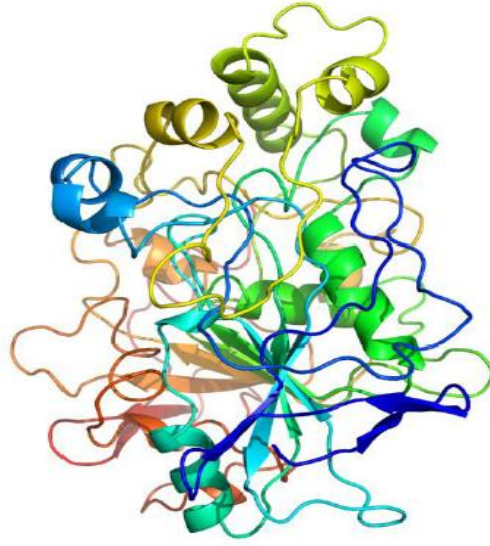


Şekil 1.4 *Candida rugosa* lipaz enziminin üç boyutlu yapısı (İşbakan, 2006)

1.1.2.2 *Candida antarctica* lipaz enzimi

Yüksek ürün dönüşümü için benzersiz uygulanabilirliği olan bir lipaz türüdür. İmmobilizasyonunda ise son derece kararlı parçacıklar üretilmesine olanak sağlar. *Basidiomyceteous* mayasından üretilen A ve B olmak üzere iki çeşit *Candida antarctica* lipazı vardır. *Candida antarctica* lipazı A ve B dayanıklılığı ve üstün özellikleri nedeniyle biyokimyasal süreçlerde olağanüstü avantajlar sağlar. Bu iki lipaz birbirinden çok farklıdır. Enzimlerin stabilitesi onların uygulanabilirliği için kritik bir faktördür. *Candida antarctica* lipazı A (CALA) asidik ortamlarda ve *Candida antarctica* lipazı B (CALB) alkali ortamdaki pH' a karşı dayanıklıdır. CALA enzimi 90 °C gibi yüksek sıcaklık koşullarında, sıcaklığa karşı katalitik stabilitesini korur. Ayrıca CALA lipazının üstün bir özelliği de soğuk ortamlara karşı adaptasyon yeteneğidir. Buna karşın CALB'nin, CALA' ya göre ısı stabilitesi zayıftır. Fakat her iki enzimin immobilize formları, yüksek sıcaklık koşullarında katalitik aktivitesinde önemli bir kayıp olmadan uzun süre biyokimyasal süreçlerde faaliyet gösterirler. Katalitik aktivitesi ve spesifikliğı, enzimlerin katalizör olarak kullanılabilirliğini tanımlayan kritik faktörler arasındadır. Ancak CALA ve CALB enzimlerin yüksek maliyetli olması nedeniyle bu lipazlarla göreceli olarak daha az sayıda bilimsel çalışma yapılmıştır (Kirk ve Christensen, 2002).

CALB enziminin üç boyutlu yapısı Şekil 1.5'de gösterilmiştir. CALB 'nin aktif bölgesi α/β hidrolaz grubu arasındaki kavitede yer alır. Ancak *Candida rugosa* lipazında olduğu gibi aktif bölgeyi kaplayan kapak yapısı bulunmaz. Aktif bölgede katalitik üçlü serin, aspartik asit ve histidinden oluşur. Serin nükleofilik bir gruptur ve aktifliğı aspartik asit ve histidin grupları tarafından sağlanır. Mekanizma serin hidrolaz aktif konumundan başlar (Ericsson vd., 2007).



Şekil 1.5 *Candida antarctica* lipazı B enziminin üç boyutlu yapısı (Ericsson vd., 2007).

1.1.3 Enzimlerin katalitik performansına etki eden parametreler

Enzimlerin katalitik performansı, katalitik aktiviteleri ile tanımlanmaktadır. Enzimin aktivitesi, enzimin yapısı dışında ortam pH'ına, sıcaklığa, basınç ve kesme gerilimlerine, ortamdaki kimyasal ya da biyokimyasal bileşiklerin bileşimine, ışık, ses ve iyonizasyon radyasyonuna bağlıdır. Bu nedenle, aktivite tanımının belli koşullarda yapılması gerekir. Enzimlerin aktiviteleri genellikle katalizledikleri tepkimenin başlangıç hızları tayin edilerek bulunur. Aşağıda belirtildiği gibi iki tür aktivite tanımı yapılmaktadır.

1. Turn-over sayısı: Birim zamanda bir mol aktif enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısı ve
2. Enzim ünitesi: Dakikada bir mikromol substratı ürüne dönüştüren miligram enzim miktarı

olarak tanımlanmaktadır. Molekül içi kuvvetler arasındaki denge enzimlerin bütünlüğü ve kararlılığı açısından çok önemlidir. Enzimlerin mikro ya da makro çevreleri dışındaki değişiklikler, enzimlerin yapısında ve kararlılığındaki dengeyi etkiler. Yani kararlı ya da tersi denatüre (bozunmuş) olmasına neden olur. Doğal enzimler sadece kendi bulundukları ortamlarda kararlıdır. Denatürasyon ya da inaktivasyon koşullarında enzimlerin yapıları değişir. Bunun sonunda enzimler inaktif hale gelir. Çevre etkili denatürasyon değişik fiziksel, kimyasal ve biyolojik bozucu bileşenlerin etkisiyle meydana gelir (Bailey ve Ollis, 1988).

Sıcaklık etkisi: Kimyasal kinetik kurallarına göre reaksiyon hızlarının sıcaklıkla artmasından dolayı enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek oldukça karmaşık bir iştir. Enzim reaksiyonları ise belirli bir sıcaklığa kadar bu kurala uyar. Bu kurala bağlı olarak, enzimlerin katalize ettiği tepkime hızları da optimum sıcaklığa kadar sıcaklıkla orantılı olarak artar. Belli bir sıcaklıktan sonra enzimler yapısal değişmeye ve denatüre olmaya başlar dolayısıyla enzimin aktivitesinde düşüşler saptanır. Bu nedenle optimum sıcaklıktan daha yüksek sıcaklıklarda, enzim tepkime hızları yavaşlamaya başlar. Genelde enzimlerin çoğu 50–60 °C’ de denatüre olurken 80–100 °C’ ye kadar aktivitelerini koruyan enzimlere de rastlanmaktadır (Bailey ve Ollis, 1988).

pH etkisi: Sıcaklık etkisine benzer olarak enzimlerin en yüksek etkinlik gösterdiği belirli pH değerleri vardır. En uygun pH değerinin altında ya da üstünde enzimlerin etken grupları, değişime uğrar ya da denatüre olup etkisiz hale gelirler. Bu olay enzimatik tepkimeye ilişkin bazı sabitlerin pH ile birlikte değişik değerler almasından ileri gelir (Bailey ve Ollis, 1988).

Substrat derişimi etkisi: Enzimli tepkimelerde substrat konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesi de artar. Ancak birçok durumda substrat derişiminin fazlası, enzimin inhibe olmasına neden olduğundan dolayı aktivitede kayıplar olur (Bailey ve Ollis, 1988).

Enzim derişimi etkisi: Enzim tarafından katalize olunan bir reaksiyonun başlangıç hızı, enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bunun nedeni de her enzim molekülünün diğerinden bağımsız olarak çalışmasıdır. Bu nedenle de ne kadar çok enzim molekülü varsa ve çalışıyorsa, reaksiyonda o kadar hızlı olacaktır (Bailey ve Ollis, 1988).

1.1.4 Enzim/Proteinlerin üç boyutlu yapısı

Her protein, işlevini yansıtan bezersiz bir üç boyutlu yapıya sahiptir. Proteinlerin yapısı birçok zayıf etkileşimle sabitlenmektedir. Hidrofobik etkileşimler, çoğu çözünür proteinin küresel yapısının sabitlenmesine büyük katkı sağlar, hidrojen bağları ve iyonik etkileşimler ise termodinamik olarak en kararlı özgül yapının oluşumunu sağlar (Nelson ve Cox, 2005).

Polipeptik zincirindeki kovalent bağların doğası, yapı üzerindeki sınırlamaları belirler. Peptit bağı, kısmi çift bağ karakteri sergiler ve bu yapı, bütün peptit grubunu katı bir düzlemsel konfigürasyonda tutar. Bir polipeptit zincirinin 3D yapısını (üç boyutlu yapısı) açıklayan üçüncül yapı, sık rastlanan değişken olarak; süper ikincil yapılar, motifler ya da katlanmalar olarak isimlendirilen kararlı alt yapıların incelenmesiyle anlaşılabilir (Nelson ve Cox, 2005).

Proteinlerin fibröz ve globüler şeklinde iki genel sınıfı vardır. Başlıca yapısal görevleri olan fibröz proteinler, ikincil yapının basit tekrarlayan elementlerine sahiptir. İkincil yapının ana konformasyonları, α -heliks ve β -kıvrılmalarıdır. Her ikisi de polipeptit iskeletindeki peptit bağları arasında optimal hidrojen bağlarıyla karakterizedir. Keratin ve kollajen gibi fibröz proteinlerde, ikincil yapının tek bir tipi baskındır. Polipeptit zinciri halat şeklinde süper sarmal oluşturur ve daha sonra kuvvet sağlamak için daha büyük sarmallar halinde birleşir. İpek fibroininin β tabakaları güçlü fakat esnek yapıyı oluşturmak için üst üste istiflenmiştir. Küresel proteinler daha karmaşık bir üçüncül yapıya sahiptir ve sıklıkla aynı polipeptit zinciri içinde ikincil yapının birkaç tipini içerir.

X-ışını kırınımı yöntemleri kullanılarak belirlenen ilk küresel protein yapısı miyoglobine aittir. Bu yapı, ön görülen bir ikincil yapının proteinlerdeki varlığını doğruladı. Bir diğer deyişle doğrulanan bu yapıyla, hidrofobik amino asitlerin, proteinin iç kısmında yer aldığı ve küresel proteinlerin sıkı paketlenildiği gösterilmiştir. Daha sonra pek çok küresel protein yapısı üzerinde yapılan araştırmalar bu sonuçları destekledi ve üçüncül yapıda büyük çeşitlilik olabileceğini gösterdi (Nelson ve Cox, 2005).

Dördüncül yapı çoklu alt birimli proteinlerin veya büyük protein topluluklarının alt birimler arasındaki etkileşimi ifade eder. Bazı multimerik proteinler tek alt birimin tekrarlayan birimlerine veya protomer olarak tanımlanan alt birim grubuna sahiptir. Protomerler genellikle rotasyonel veya helikal simetriyle ilişkilidir. Proteinlerin üç boyutlu yapısı, zayıf etkileşimleri bozan işlemlerle bozulabilir, bu süreç denatürasyon olarak adlandırılır. Denatürasyonun, proteinin işlevini bozması, yapı ve işlev arasındaki ilişkiyi kanıtlamaktadır (Nelson ve Cox, 2005).

1.2 Enzimlerin immobilizasyonu

20. yüzyılın ikinci yarısında, enzimlerin sürekli sistemlerde kullanımından yararlanmak amacıyla farklı konfigürasyonlarda taşıyıcılı enzim immobilizasyon sistemleri geliştirilmiştir. Bu süreçte, enzimlerin reaksiyon ortamından verimli bir şekilde ayrılması sağlanarak işletme maliyetleri azaltılmıştır. Ayrıca enzimlerin stabilitesi, seçiciliği ve aktivitesindeki kayıplarda önlenmiştir. Günümüzde immobilizasyon, taşıyıcılı ve taşıyıcısız enzim immobilizasyonu olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır. İlk zamanlarda enzim immobilizasyonu bir destek materyali üzerine enzimlerin fiziksel ya da kimyasal olarak tutuklanmasıyla enzimlerin çözünmez duruma gelmesi sağlanmıştır. Taşıyıcılı immobilizasyon işlemlerinde kullanılan ve katalitik olmayan taşıyıcı sistemlerin seçimi, katalizör görevi yapan enzimlerin, katalitik aktivitelerinin kolay kontrol sağlayacağı düşünülmüştür. Enzimin katalitik aktivitesini

korumak ya da geliştirmek amacıyla taşıyıcı olarak kullanılan bu katalitik olmayan destek maddelerin seçiminde; hidrofobik ve hidrofilik denge, gözeneklilik yapısı, yüzey kimyası, fiziksel ve kimyasal özellikleri oldukça önem taşımış ve enzimler, seçilen taşıyıcı destek maddeleri üzerine değişik yöntemlerle modifiye edilmişlerdir (Cao vd., 2003).

Kovalent bağlı immobilizasyon süreçlerinde enzim ile taşıyıcı arasında kovalent bir bağ oluşturulur. Taşıyıcılı sistemler üzerine kovalent bağlanma, enzim üzerindeki fonksiyonel gruplarla taşıyıcı arasında olmaktadır. Bu yöntemde taşıyıcı üzerindeki grupların kovalent bağlanma için reaktif olması gerekir. Bu reaktivlik ya kendiliğinden ya da farklı yardımcı reaktiflerle gerçekleştirilir. İyonik bağlı immobilizasyon yöntemlerinde ise yine çözünmeyen taşıyıcıya enzimlerin iyonik olarak bağlanması prensibine dayanır. Zayıf biçimde gerçekleşen bu bağlanma sürecinde immobilize enzimin aktif konumlarında önemli kayıplar meydana gelmez. Ancak iyonik bağlı immobilizasyon sistemleri, kovalent bağlı immobilizasyon sistemlerinden daha güçlü olmadığından ayırma işleminde enzim kayıpları söz konusudur. Enzimlerin adsorpsiyon mekanizması ile gerçekleştirilen immobilizasyon işlemleri oldukça basit bir immobilizasyon sürecidir. Bu konfigürasyonda gerçekleştirilmiş bir immobilizasyon yönteminde vander Waals, iyonik ya da hidrojen bağı gibi elektrostatik güçler etkindir. Bu yöntemde taşıyıcı adsorpsiyon özelliklerine sahip olmalıdır. Yöntemin oldukça basit, hızlı, ucuz olması ve çok sayıda taşıyıcı türü seçme olanağı vermesi gibi avantajları olmasına karşın destek maddesi ile enzim molekülleri arasında kuvvetli olmayan bir bağlanma nedeniyle ayırma işleminde önemli enzim kayıplarına neden olmakta ve reaksiyon ortamındaki ürün kirliliği gibi dezavantajlar yaratmaktadır. Taşıyıcılı bir matris sistemlerinin tutuklama yönteminde genellikle jelimsi yapıya sahip doğal makro moleküller kullanılır. Taşıyıcıda aranan en önemli özellik, enzimin dışarı çıkmasını önleyip substratın içeri giriş ve çıkışına izin vermesidir. Bu yöntemde küre, tabaka, silindir veya iplik formunda tutuklama yöntemleri yer almaktadır. Taşıyıcı matriste tutuklama yöntemi, endüstride en yaygın kullanılan tutuklama yöntemleri arasındadır. Membran ile tutuklama yönteminde ise enzimler yarı geçirgen membranlara tutuklanması ve bu membranların enzim dışındaki maddelerin giriş çıkışına izin vermesi temeline

dayanır. Bu süreç enzim kayıplarını önlemeyi amaçlamaktadır. Bu yöntemlerin etkili olabilmesi için en uygun taşıyıcının belirlenmesi gerekir (Batista-Viera ve Brena, 2006).

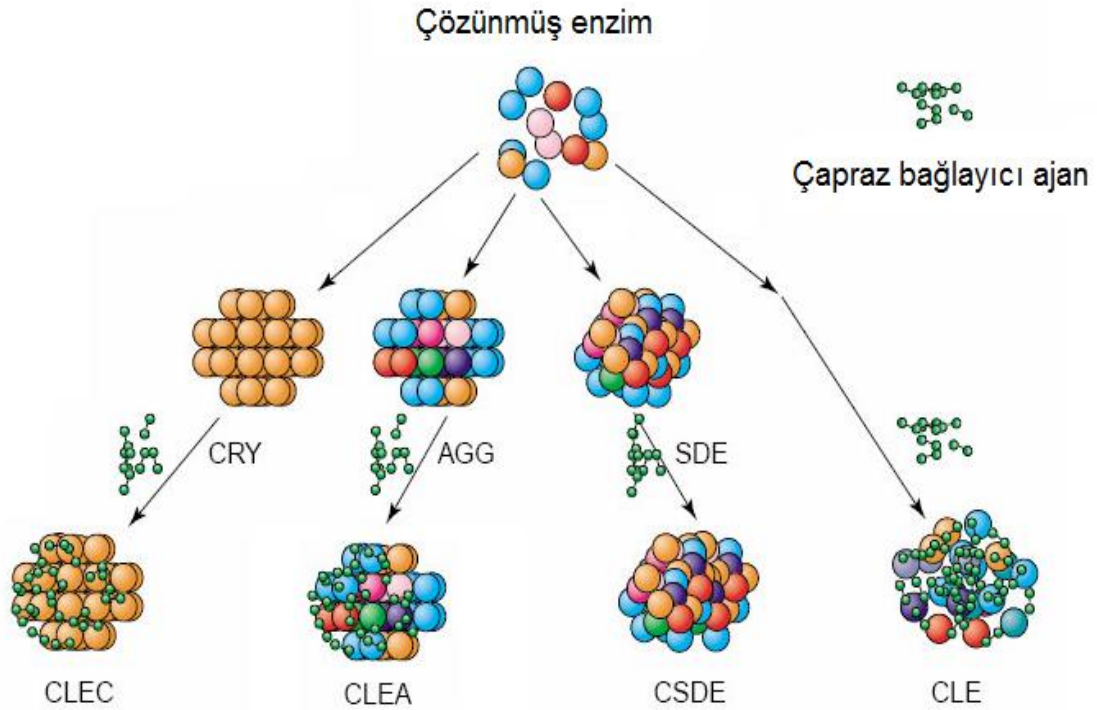
1.2.1 Taşıyıcısız enzim immobilizasyonu

Taşıyıcılı enzim immobilizasyon sistemlerinde enzimin aktivitesi taşıyıcı olarak kullanılan materyalin katalitik olmayan kütlesinden dolayı birim biyokatalizör kütlesi başına aktivite kayıplarına yol açmaktadır. Taşıyıcısız enzim immobilizasyonu geleneksel immobilizasyondaki taşıyıcılı immobilizasyon sistemlerinin yarattığı darboğazları ortadan kaldırmak için alternatif olarak geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu yöntemde taşıyıcıya gerek duyulmaksızın enzimlerin birbirlerine çapraz bağlanması sonucu gerçekleştirilen bir yöntemdir. Bu yöntemin temel amacı, taşıyıcılı immobilizasyon sistemlerine kıyasla enzimlerin katalitik aktivitesini arttırmak, yüksek seçicilik kazandırmak ve daha düşük maliyetli biyokatalizör sistemlerini geliştirmektir (Yu vd., 2006). Taşıyıcısız enzim immobilizasyon sistemlerine yönelik çalışmalar aşağıda belirtildiği gibi dört farklı grupta sınıflandırılabilirler (Mateo vd., 2003).

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

Sulu çözeltilerinden yola çıkılarak taşıyıcısız enzim immobilizasyon sistemlerinin geliştirilmesine yönelik yöntem kısaca Şekil 1.6' da gösterilmiştir. Taşıyıcılı enzim immobilizasyon sistemlerine alternatif olarak geliştirilen ilk taşıyıcısız enzim immobilizasyon yöntemi çapraz bağlı çözünmüş enzimlerdir. Bu yöntemde, uygun bir çapraz bağlayıcı ajan yardımıyla çözünmüş enzim moleküllerinin doğrudan çapraz

bağlanması sonucu taşıyıcısız enzim immobilizasyon sistemleri gerçekleştirilmiştir. Ancak enzimlerin sulu sistemlerdeki yüksek çözünürlüğü ve immobilizasyon sürecinde enzim molekülleri arasındaki yakınlığın etkin olarak ayarlanamamasından dolayı enzim molekülleri arasında zayıf bağlanmalar gerçekleşmektedir. Zayıf bağlanma ise biyokatalizörlerin mekanik dayanıklılığının düşük olmasına neden olmaktadır. Ayrıca kontrolsüz biçimde gerçekleşen aşırı bağlanmalar ise hem aktif konum sayısının azalmasına hem de taşıyıcısız enzim immobilizasyonu formundaki biyokatalizörlerin boyut kontrolündeki zorluklara neden olmaktadır (Sheldon, 2007).



Şekil 1.6 Taşıyıcısız enzim immobilizasyon süreçleri (Sheldon vd., 2003)
CRY: Kristal, AGG: Agregat, SDE: Püskürtülerek kurutulmuş enzim

Çapraz bağılı çözünmüş enzim formundaki taşıyıcısız enzim immobilizasyon yönteminde karşılaşılan darboğazların çözümüne yönelik alternatif çapraz bağılı enzim kristalleri geliştirmiştir. Çapraz bağlayıcı ajan olarak gluteraldehitin yer aldığı ilk çalışma Quioco ve Richards tarafından 1964 yılında yapılmıştır. Ancak bu yöntem ile gerçekleştirilen immobilizasyon işlemlerinde yüksek saflıkta ve kristal formda enzimlere gereksinim duyulması ve boyut kontrolünde karşılaşılan darboğazlar, bu yöntemin en önemli dezavantajlarını oluşturmaktadır (Sheldon vd., 2005). Çapraz bağılı enzim kristalleri hazırlanırken enzimlerin, yüksek saflıkta yani kristal formda olması gerekmektedir. Uygun presipitasyon ajanı yardımıyla kristal formdaki enzim molekülleri birbirlerine yaklaştırılarak enzim moleküllerinin arasındaki uzaklık azaltılır. Birbirlerine yaklaştırılan enzim molekülleri uygun bir çapraz bağlayıcı ajan yardımıyla birbirlerine bağlanarak çapraz bağılı enzim kristalleri şeklindeki taşıyıcısız enzim immobilizasyonu gerçekleştirilir. Çapraz bağılı enzim kristali formundaki biyokatalizörler ile enzimlerin sıcaklığa karşı toleransı ve mekanik dayanımı artırılabilir. Aynı zamanda geniş pH aralığında çalışabilme olanağı sağlanmış ve organik çözücülere karşı toleransları geliştirilmiştir (Sheldon, 2007). Çapraz bağılı enzim kristallerinde, kristalleştirme ortamının koşulları ayarlanarak daha yüksek aktivite gösterebilen ve seçicilik için en doğru kristal boyutu ve geometrisi tasarlanabilir. Biyokatalizörlerin katalitik aktiviteleri; substratın boyutuna, özelliklerine ve reaksiyon ortamındaki bileşiklere ve derişimlerine, enzimatik reaksiyonun gerçekleştirildiği reaktör sistemlerindeki işletme koşullarına da bağlıdır. Bu bağlamda çapraz bağılı enzim kristallerinin boyutu 1-100 µm aralığında tutularak, oldukça aktif ve stabil taşıyıcısız enzim immobilizasyonu gerçekleştirilebilmektedir. 20. yüzyılın sonlarından başlayarak günümüze kadar lipazlar, proteazlar ve amilazlar gibi birçok hidrolaz, asimetrik sentez için kiral biyokatalizör olarak üretilmekte ve biyoteknolojik sektörlere sunulmaktadır. Çapraz bağılı enzim kristallerinin bir başka uygulama alanı ise kromatografide kullanılan mikro gözenekli materyaller ya da protein içerikli ilaçların kontrollü salım sistemleridir (Topçular, 2006).

Çapraz bağılı enzim agregatları ise 20. yüzyılın başlarında ortaya çıkan ve taşıyıcısız enzim immobilizasyon yöntemi olarak bu sınıfa yeni katılmış bir tekniktir. Presipite

edilen enzim bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajanlar ile kovalent bağlanır. Fazladan katalitik kütleye ihtiyaç duymadığından aktivitelerinde önemli düşüş görülmez (Serrano vd., 2002).

Çapraz bağlı enzim agregatları, çapraz bağlı enzim kristallerine alternatif olarak geliştirilmiştir. Bu yöntemde çapraz bağlı enzim kristallerinde olduğu gibi kristal formda yani yüksek saflıkta enzime gerek duyulmaz. Bilindiği gibi organik çözücüler, tuzlar ya da iyonik sıvılar proteinleri çöktürürler. Çapraz bağlı enzim agregatlarında çözünmüş enzim moleküllerinin bu uygun presipitasyon ajanları yardımıyla presipitasyonu sağlanır. Yani enzim moleküllerinin arasındaki uzaklığı etkileyen özellikler değiştirilir (Sheldon, 2007).

Presipitasyon koşullarında, sulu sistemlerde yüksek çözünürlüklü enzim molekülleri bir araya toplanarak doğal enzim konformasyonunda çözünmez enzim agregatları oluşturmak üzere çökelti oluştururlar. Bu fiziksel çözünmez agregatlar, enzim kristallerinin çapraz bağlanmasına benzer şekilde bifonksiyonel çapraz bağlayıcılar ile ardı ardına bağlanır. Çapraz bağlı enzim agregatlarının enzim kristallerine yakın aktiflik ve kararlılık değerlerine sahip olduğu literatürde bildirilmiştir. Çapraz bağlı çözünmez enzimlerin, proteinin çoğunluğunun çöktürüldüğü durumda en yüksek aktiviteye sahip olduğu, herhangi bir çökeltme maddesi katılmadığında CLE ise en düşük aktiviteyi verdiği keşfedilmiştir. Bu gözlemler, çözünmez enzim agregatlarının oluşumunun, çapraz bağlanma boyunca enzim aktivitesini korumak için başlıca basamak olduğunu öne sürmektedir. Açıkçası bu sıkı moleküller, çözünmüş ve dağınık halde bulunan moleküllerden daha kolay çapraz bağlamaktadır. Bu durum, enzim moleküllerinin çözelti içinde glutraldehit eklenmesi halinde bile neden çapraz bağlanmadıklarını açıklamaktadır (Topçular, 2006).

Çapraz bağlı enzim agregatlarının spesifik aktivitesi yüksektir, oda sıcaklığında ve belirli pH aralığında stabil olup yüksek ürün verimliliğine sahiptir. $scCO_2$ ve iyonik sıvılar (IL) gibi konvansiyonel olmayan ortamlarda ise daha aktif olup yüksek saflıkta

enzim gerektirmezler. Ekstrem sıcaklık ve pH değerlerinde denatürasyona uğramazlar, kararlıdırlar. Yeniden kullanılabilirliği yüksek, biyoteknolji ortamlarından filtrasyon gibi basit ayırma süreçleri ile geri kazanımı kolay, kesikli sistemlerde yeniden kullanılabilir, sürekli sistemlerde ise uzun süre ve pratik olarak kullanılabilirler (Fazary vd., 2009).

Çapraz bağlı enzim agregatları hazırlanırken presipitasyon işlemi için genellikle amonyum sülfat kullanılır. Amonyum sülfat tuzunun 0–30°C aralığında çözünürlüğü çok düşük olup, proteinleri stabilize eder. Amonyum sülfatın 4 M doygun çözeltisinin yoğunluğu, çözeltideki protein agregatlarının yoğunluğundan küçüktür. Bu nedenle santrifüj ile proteinlerin ya da enzimlerin amonyum sülfat ortamından ayırma işlemi kolaydır. Tuzun yoğunluğu agregat yoğunluğundan düşük olduğu için agregatın saf halde dibe çöküp tuzun onun üzerinde kalması, yüksek derişim değerlerinde (doygun çözelti) bakteriyel kontaminasyonun engellemesi açısından amonyum sülfat tuzunun kullanımı önemlidir. Çöktürücü yani presipitant derişimi arttıkça agregat boyutu artar. Amonyum sülfat tuzu proteinlere bağlı olan suyu çekeceğinden enzimlerin çökmesi sağlanır. Buna salting out etkisi denir. Çözünmüş enzimlere tuz eklenerek enzimin çözünürlüğü azalır ve enzimler agregat oluşturmaya başlarlar, enzimler çöktükçe agregat boyutları da artar. Yine aynı şekilde glutraldehit derişimi arttıkça agregat boyutu da artar. Fakat agregat boyutunun artması bir süreye kadar aktiviteyi yükseltir. Agregat boyutundaki artışlar her zaman için iyi sonuç vermez (Yu vd., 2006). Çapraz bağlı enzim agregatları hazırlanırken agregat aktivitesini yükseltmek amaçlı proteik feeder ajan kullanılmaktadır. Proteik feeder, ortamda glutraldehitin enzime fazla bağlanmasını önleyerek enzimin aktif konumlarının açık tutulmasını sağlamaktadır. Böylece çapraz bağlı enzim agregatlarının aktivitesinde yükselişe neden olmaktadır (Shah vd., 2005). Agregat boyutu da katalitik aktivite için önemli bir etkidir.

1.2.2 Çapraz bağlı enzim agregatları üretiminde karşılaşılan darboğazlar

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

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

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

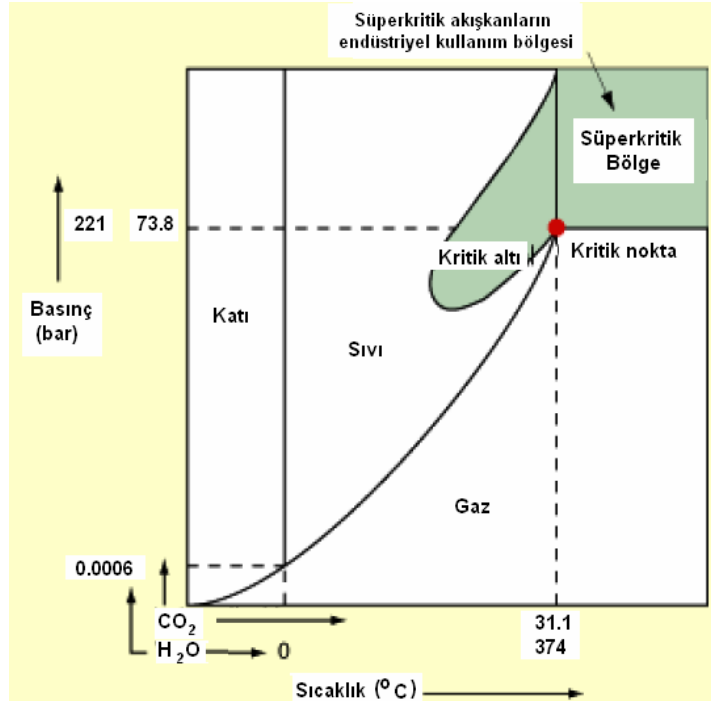
1.3 Süperkritik akışkanlar

Süperkritik akışkanlar (SCF) belli bir sıcaklık ve basınç değerinde, gaz ve sıvı fazları birbirleriyle özdeştir. İki fazlı sistemlerin tek faza dönüştüğü bu nokta kritik nokta olarak adlandırılır. Akışkan sıcaklığı, kritik sıcaklık(T_C) ve basıncı da kritik basınç (P_C)

değeri üzerine çıkartıldığında karşımıza “süperkritik bölge” olarak adlandırılan yeni bir bölge çıkar. Bu bölgede yer alan akışkanlar SCF olarak tanımlanır. Saf CO₂ ve H₂O için iki boyutlu basınç-sıcaklık diyagramı Şekil 1.7’ de gösterilmiştir (Salgın, 2007).

1.3.1 Süperkritik CO₂’in fizikokimyasal özellikleri

Süperkritik akışkanların (SCF) belli bir sıcaklık ve basınç değerinde gaz ve sıvı fazları birbirleriyle özdeşir. İki fazlı sistemlerin tek faza dönüştüğü bu nokta kritik nokta olarak adlandırılırlar. Akışkan sıcaklığı kritik sıcaklık (T_C) ve basıncı da kritik basınç (P_C) değeri üzerine çıkartıldığında karşımıza “süperkritik bölge” olarak adlandırılan yeni bir bölge çıkar. Bu bölgede yer alan akışkanlar SCF olarak tanımlanır. Saf CO₂ ve H₂O için iki boyutlu basınç-sıcaklık diyagramı Şekil 1.7’de gösterilmiştir.



Şekil 1.7 Saf CO₂ ve H₂O için basınç-sıcaklık faz diyagramı (Salgın, 2007)

SCF'ların fizikokimyasal özellikleri dikkate alındığında bu akışkanlar, gaz ve sıvı akışkan özellikleri arasında yer alır. Fiziksel ya da kimyasal kütle aktarımı süreçleri için bu özellik önem kazanır. Süperkritik bölgede saf haldeki bir bileşik sabit basınç koşullarda sıcaklık değişimlerinde ya da sabit sıcaklık koşullarda basınç değişimlerinde herhangi bir faz geçişi gözlenmeksizin sıvı fazdan gaz faza geçebilir. Süperkritik bölgede bir akışkanın belirtilen bu davranışları taşıyıcı akışkan özellikleri için potansiyel bir özelliktir. SCF uygulamalarında bir çok süreç kimyasal/biyokimyasal maddelerin süperkritik CO₂'deki yüksek çözünürlüğüne dayanmaktadır. Gözenekli katı yapılarda genellikle sıvılar için gözlenen kütle aktarım dezavantajları akışkanın süperkritik hale geçmesi ile taşınım özellikleri de yeni performans kazanır. Ayrıca SCF'ların yüzey gerilimlerinin çok düşük olması bir gözenekli katı yapı içine gaza benzeyen penetrasyon özeliğine olanak sağlar. SCF ortamında gerçekleşen enzimatik tepkimelerde ya da fiziksel ayırma süreçlerinde bu taşınım özellikleri önem kazanır. Enzimatik tepkimede, ortam içinde dağılmış olan enzimlerin aktif konumlarına substratların kütle aktarım hızı artar, kütle aktarım kısıtlamalı tepkimeler, SCF içinde sıvılardakinden daha hızlı gerçekleşebilir (Savage vd., 1995; Russel vd., 1994; Nakamura vd., 1989). Bir akışkan P_C ve T_C değerinin üzerindeki basınç ve sıcaklık koşullarında yüksek yoğunluk ve yüksek çözme gücü gibi sıvı fazın özelliklerini gösterir. SCF'ların çözme gücü basınca ve sıcaklığa bağlı olarak değiştirilebilmektedir. Biyokimyasal sentezlerin ayırma ve saflaştırma SCF'de çözülmüş maddeler atmosfer koşulları ile dengeye getirilerek kolayca geri kazanılabilmektedir. Sıcaklığa duyarlı maddeler için bu özellik önem kazanır. SCF'ların viskoziteleri sıvı viskozitelerinden yaklaşık 100 kat daha düşüktür. Bu özellik SFE uygulamalarında yüksek akış hızlarında çalışma olanağı sağlamaktadır. Viskozite, süperkritik koşullarda gerçekleştirilen ayırma süreçlerinde; sistemdeki basınç düşmesini, kütle aktarım hızı ve kapasitesini etkiler. (Brunner, 1994). SCF'larda çözünen moleküllerin yayınma hızları sıvılarınkinden 10 kat daha yüksektir. SCF'ların yüzey gerilimlerinin çok düşük olması gözenekli yapılarda gaz özeliğine benzeyen penetrasyona olanak sağlar. Bu nedenle, SCF ortamında gerçekleşen katalitik/enzimatik tepkimelerde, ortam içinde dağılmış olan katalizör/enzimlerin aktif konumlarına tepkiyen/substratların kütle aktarım hızı artar, kütle aktarım kısıtlamalı tepkime/biyotepkimelerde, SCF içinde

sıvılardakinden daha hızlı gerçekleşebilir (Savage vd., 1995; Russel vd., 1994; Nakamura vd., 1989).

1.3.2 Süperkritik CO₂ ortamında enzimatik sentezler

SCF ortamında gerçekleştirilen enzimatik tepkimeler lipaz dışındaki enzimler ile katalizlenen tepkimeler ve lipaz enzimleri ile katalizlenen tepkimeler olmak üzere 2 grupta sınıflandırılır. SCF ortamında lipaz dışındaki enzimler ile katalizlenen tepkimelerde; alkalın fosfataz, kolesterol oksidaz, polifenol oksidaz, termolizin, subtilisin carlsberg, α -chymotrypsin, α -amilaz, glukoamilaz ve selülaz gibi enzimler kullanılmaktadır. Lipaz enzimleri ile katalizlenen tepkimelerde lipazların SCF ortamında aktif ve kararlı olmaları, yüksek substrat seçicilikleri, hidrofobik substrat çözünürlüğünün yüksek olması, ticari olarak yaygın kullanım alanına sahip olmaları, taşınım özelliklerin yüksek olması ve çözücünün üründen kolaylıkla uzaklaştırılabilir olmasından dolayı kullanımları oldukça yaygındır. Lipaz enzimleri ile katalizlenen tepkimelere lipidlerin düzenlenmesi (esterleşme, interesterleşme, hidroliz, asidoliziz ve alkoliziz tepkimeleri ile), kiral bileşiklerin sentezi (esterleşme, interesterleşme, hidroliz ve alkoliziz tepkimeleri ile), aroma ve kozmetik ürünlerin sentezi (esterleşme ve alkoliziz tepkimeleri ile) örnek olarak verilebilir (Kamat vd., 1995).

Süperkritik akışkanların enzimatik tepkime ortamında kullanımlarının sağladığı avantajları aşağıda özetlenmiştir.

- SCF ile gerçekleştirilen tepkimelerde ürünlerin in-situ olarak ayrılmasına avantaj sağlarlar. Bu SCF'arın çözme güçlerinin sıcaklık ve basınca bağlı olmasından kaynaklanmaktadır.
- SCF'ların düşük viskozite ve yüzey gerilim özellikleri tepkiyenlerin bu ortamlardaki yüksek yayınlılıkları nedeniyle heterojen katalitik sistemlerdeki kütle aktarım kısıtlamalarını azaltır.

- Lipazlar sulu ortamlarda hidroliz tepkimelerini katalizleyebilen enzimlerdir. SCF ortamında su aktivitesinin düşük koşullarda ise tepkimeyi terse çevirerek esterleşme tepkimelerini de katalizleyebilirler.
- Hidrofobik substrat ve ürün çözünürlüğü SCF ortamında yüksektir.
- Polar bileşenlerin çözünürlükleri işletme basıncın artırılması ve/veya polar entrainer (yardımcı çözücü) eklenerek artırılabilir.
- SCF ortamlarında mikrobiyal kontaminasyon gerçekleşmez.
- SCF ortamlarında enzimler çözünmediği için ayrılımları kolaydır. Tutuklanmış enzim formlarının kullanılmasını gerekmez.
- Sıcaklığa duyarlı bileşikler ile gerçekleştirilen tepkimelerde düşük kritik sıcaklığa sahip SCF'lar tepkime ortamı için avantajlıdır.

1.3.3 Süperkritik CO₂ ortamında enzimlerin katalitik performanslarına etki eden parametreler

Enzimlerin konformasyonel yapısında değişimler yaratabilmek için scCO₂ teknolojisi, alternatif bir yöntem olup proteinlerin basınç altında tersinir denatürasyonu immobilizasyon öncesi önemli avantajlar sağlayabilir. Sıcaklık ve basınç parametreleri scCO₂ ortamında enzimlerin katalitik performanslarına etki eder. Her enzimin daha aktif olduğu bir sıcaklık değeri vardır fakat enzimler genellikle yüksek sıcaklıklarda denatürasyona uğrayıp etkisini kaybeder.

Enzimlerin inaktivasyon derecesi scCO₂ koşullarına bağlı olarak değiştirilebilir. scCO₂ hidrofobik özellikteki bir akışkandır ve bu hidrofobiklik basınca bağlı olarak değiştirilebilir. Enzimlerin aktif konumlarının da hidrofobik yapıda olduğu bilinmektedir dolayısıyla akışkanla etkileşimi daha fazla olup kütle aktarım kısıtlamalarını azaltmaktadır. Süperkritik akışkan teknolojisi son yıllarda artan bir potansiyele sahiptir.

Akışkanın hidrofobikliğinin basınca bağlı olup, basıncın artmasıyla akışkanın hidrofobikliği artmaktadır. Artan hidrofobiklikle enzimlerin inaktivasyon derecesi de artar. İnaktivasyon enzimlerin tersinir denatürasyonu anlamına gelmektedir. Amaç immobilizasyon öncesi enzimin inaktivasyonu ile birlikte aktif konumların korunması daha sonra korunan aktif konumların açılarak aktifliğini göstermesidir (Messiano vd., 1999).

1.4 Konu Üzerinde Önceki Çalışmalar

CLEA enzimatik üretim proseslerinde serbest ya da immobilize enzim kullanımındaki darboğazların çözümü için son yıllarda geliştirilen yeni bir immobilizasyon yöntemidir. CLEA'ları diğer taşıyıcısız enzim immobilizasyon yöntemlerine göre alternatif ve yeni ortaya çıkmış bir yöntem olmasına karşın; enzim agregatlarının boyutunun herhangi bir difüzyon kısıtlamasına gitmeden nasıl kontrol edilebileceği, enzim konformasyonunun nasıl daha esnek hale getirilebileceği ve enzim aktivitesi ve seçiciliğinin agregasyon koşullarının farklılaştırılması ile nasıl ayarlanabileceği gibi darboğazların aydınlatılması gerekmektedir. Enzimatik sentezlerde, çözücü ortamlarına alternatif olarak $scCO_2$ 'in kullanılması enzimlerin bölgesel ve stereo seçimli özelliklerini artırılabilir. Sıcaklık ve basınç gibi biyoproses parametrelerindeki küçük değişimler, süperkritik akışkanların fizikokimyasal özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir. Enzimlerin mikro çevresindeki bu değişimler biyokatalizörlerin katalitik aktivite ve yapısal kararlılığını da etkiler. Yüksek lisans tez projesinin temel amacı yaygın uygulamalar için katalitik açıdan oldukça aktif ve yeniden kullanılabilir CLEA'larının tasarımına yönelik esnek bir teknoloji platformu oluşturmaktır. Süreli yayın ve patent literatüründe taşıyıcısız enzim immobilizasyonu öncesi enzimlerin $scCO_2$ ortamında ön işlem görmesi sonucu konformasyon yapısının esnek hale getirilerek CLEA ya da başka bir taşıyıcısız enzim immobilizasyon sürecine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak farklı enzimlerin kullanıldığı CLEA

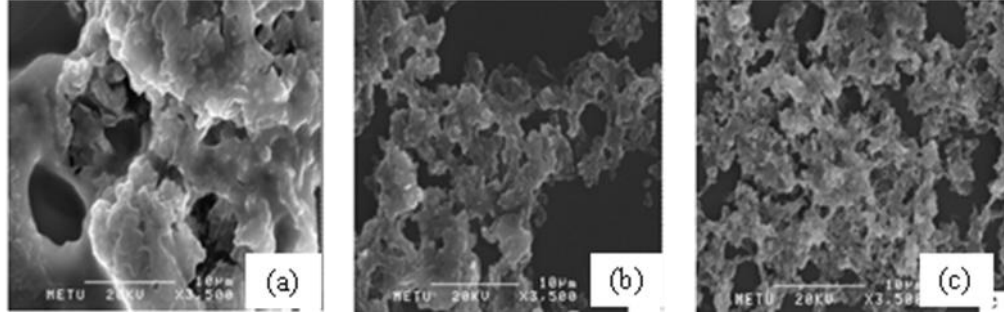
alışmalarına yönelik son yıllarda yapılmış yayımların çalışmamıza ışık tutması açısından aşağıda değerlendirilmiştir.

Cao vd. (2001), β -laktam antibiyotiklerinin sentezinde aktif olarak kullanılan penisilin aılaz enziminin biyoreaksiyon ortam bileşimlerinden ve işletme koşullarından önemli ölçüde etkilendiğini ve prosesin temel darboğazlarını oluşturduğunu bildirmişlerdir. Belirtilen darboğazların çözümüne yönelik penisilin aılaz enziminin fiziksel agregat oluşturması ve daha sonra bunların birbirlerine kimyasal olarak çapraz bağlanması ile yeni bir immobilizasyon yöntemi olan penisilin aılazın, çapraz bağlı enzim agregatlarını geliştirmişlerdir. Araştırmada penisilin aılaz enziminin CLEA'larının reaksiyon ortamında yüksek katalitik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca polar ve apolar organik çözücülere karşı dayanıklılığın yüksek olduğu saptanmıştır.

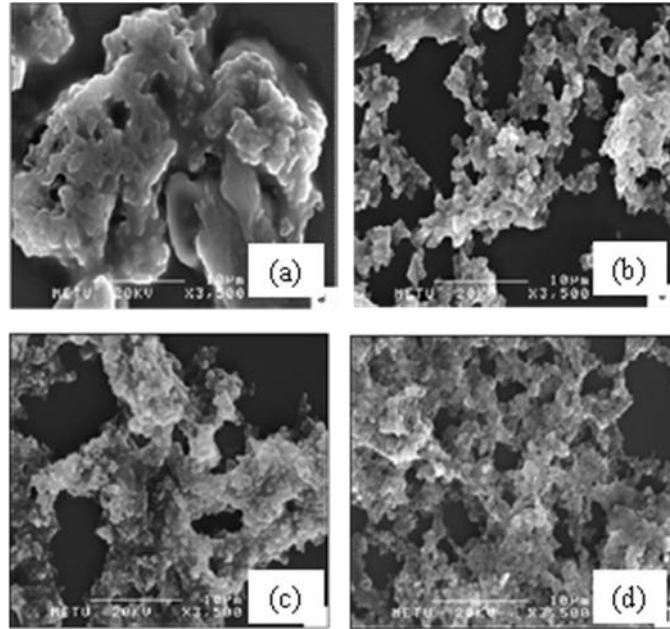
Serrano vd. (2002), 7 farklı ticari lipaz enzimi -*Candida antarctica* lipazı A, *Candida antarctica* lipazı B, *Pseudomonas alcaligenes* lipazı, *Thermomyces lanuginosus* lipazı, *Rhizomucor miehei* lipazı, *Aspergillus niger* lipazı, *Candida rugosa* lipazı- kullanarak hazırladıkları CLEA formundaki taşıyıcısız enzim immobilizasyon sürecine ortam bileşenleri ve bileşimlerinin etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada; 1,2-dimetoksietan, $(NH_4)_2SO_4$ ve aseton gibi farklı presipitasyon ajan türü ve derişimin CLEA formundaki enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir. Bifonksiyonel apraz bağlayıcı ajan olarak gluteralehit kullanılmıştır. Hidrofilik zellik gösteren lipaz enzimlerinin organik çözücü ile presipitasyonunda enzimlerdeki aktivite kayıplarının önlenmesi amacıyla; ta eter (crown ether) ve sodyum dodesil sülfat (SDS) yardımcı katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Presipitasyon ajanı olarak kullanılan organik çözücüler lipaz enzimlerinin aktif konumlarında denatürasyona neden olduğundan CLEA çalışmalarında en uygun presipitasyon ajanının $(NH_4)_2SO_4$ olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, taşıyıcılı ve taşıyıcısız enzim sistemlerinin immobilizasyon süreçlerinde sıklıkla kullanılan bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajan olan gluteralehitin CLEA formundaki enzimlerin birbirine aşırı bağlanmasını önlemek ve serbest enzime göre aktivite geri kazanım oranını

arttırmak için ta eter, SDS ve Triton X100 gibi farklı sürfaktan türü ve derişimlerinin etkisi kapsamlı biçimde incelemişlerdir. Enzimlerin katalitik özellik gösteren aktif konumlarının, sürfaktan molekülleri tarafından vrenmesiyle, aktif konumlar üzerinden gerçekleşebilecek çapraz bağlanmaların şiddetinin azaltıldığını belirtmişlerdir. Özellikle, *Thermomyces lanugiosus* lipazı ve *Rhizomucor miehei* lipazı kullanılarak gerçekleştirilen CLEA formundaki enzimlerin katalitik performansları $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve SDS varlığında doğal enzime göre sırasıyla 2 ve 3 kat oranında arttığını saptamışlardır. Ayrıca, CLEA formunda hazırlanan bu biyokatalizörlerin organik ortamlardaki katalitik aktivitelerinin de yaklaşık 10 kat arttığını bildirmişlerdir.

Aytar ve Bakır'ın (2008), maruldan ekstrakte edilen tirozinaz enziminin CLEA'larını hazırlamak için kullanmışlardır. Araştırmada, proteik feeder olarak BSA, presipitasyon ajanı olarak $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, apraz bağlayıcı ajan olarak da glutraldehit kullanılmıştır. Aminoasit gruplarınca daha zengin olan proteik feeder ajan BSA'nın lizine göre glutraldehit ile daha fazla bağlanarak enzimin aktif konumlarının korunması amaçlanmıştır. Farklı derişimlerdeki $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve glutraldehitin CLEA aktivitesine etkisini incelemişler ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) resimlerinden hazırlanan CLEA'larda oluşan kavitenin enzim aktivitesindeki etkisini tartışmışlardır. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişim aralığının % 40-90 (w/v) olduğu koşullarda presipitasyon ajan derişiminin artması ile azalan partikül büyüklüğü ile birlikte aktivitenin arttığını bildirmişlerdir. şekil 2.8'de gösterildiği gibi, araştırmacılar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişiminin artmasıyla CLEA'larında kavite oluşumunun arttığı ve buna bağlı olarak da kütle aktarım kısıtlamalarının azaldığını vurgulamışlardır. Glutraldehit derişimlerinin CLEA aktivitesine etkisi % 1-4 (v/v) aralığında incelenmiş, glutraldehit derişiminin artmasıyla aktivitenin arttığını ve şekil 1.9'da gösterildiği gibi hazırlanan CLEA çapının ise azaldığını ve kavite sayısının arttığını vurgulamışlardır. Kavite sayısındaki artışın, substratın CLEA'ya kütle aktarım kısıtlamalarını da önlediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, %2 (v/v) glutraldehit derişimi ve %60 (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişimindeki koşullarda hazırlanan CLEA'larda aktivite geri kazanımının yaklaşık %100 olduğunu saptamışlardır.



Şekil 1.8 Tirosinaz enzimi ile hazırlanan CLEA formlarına amonyum sülfat derişiminin etkisi (a) % 40 (w/v) (b) % 60 (w/v) (c) % 80 (w/v)



Şekil 1.9 Tirosinaz enzimi ile hazırlanan CLEA formlarına gluteraldehit derişiminin etkisi (a) % 1 (v/v) (b) % 2 (v/v) (c) % 3 (v/v) (d) %4 (v/v)

Yu vd. (2006) yılında yaptığı bir çalışmada *Candida rugosa* lipazından hazırlanan CLEA'ların partikül büyüklüğüne ve CLEA aktivitesine agregasyon koşullarının etkisini araştırmışlardır. Araştırmada LiCl, NaCl, NH₄Cl, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄ gibi farklı tuzların etkisi incelenmiştir. Presipitasyon ajanının çözelti içerisindeki elektrostatik dengeyi etkileyerek moleküller arasındaki hidratlaşma derecesinin değişmesiyle, enzimlerin birbirlerine yakınlığını vurgulamışlar ve presipitasyon ajanının, çözeltinin çözünürlüğünü azaltarak enzimleri çözünmez durumda birbirine yakınlştırılmasını sağladığını bildirilmişlerdir. Farklı tuzların CLEA çözünürlüğünü nasıl etkilediği incelenmiş ve enzim molekül çözünürlüğünü en fazla azaltan tuzun (NH₄)₂SO₄ olduğunu saptamışlardır. Çalışmada, (NH₄)₂SO₄ derişiminin artmasıyla enzim çözünürlüğün azaldığını, agregasyonun arttığı ve partikül büyüklüğünün de buna bağlı olarak arttığını vurgulanmıştır. Gluteraldehit derişimi, ortam pH'ı ve enzim derişiminin CLEA aktivitesine etkisi incelenmiş ve yüksek derişimlerinde daha büyük partikül çapına sahip CLEA'larının oluştuğu bildirilmiştir. Partikül büyüklüğünün kütle aktarımı açısından önemli olduğu, CLEA boyut kontrolünün aktivite için olumlu sonuç verdiği vurgulanmış ve en yüksek aktivite değerini partikül büyüklüğü 40-50 µm çapındaki CLEA'ların gösterdiği bildirilmiştir.

Perez vd. (2009) kloroperoksidaz enziminin katalitik açıdan kararlılığını ve yüksek sıcaklığa karşı dayanıklılığını arttırmak ve pH'a karşı stabilitesini geliştirmek için enzimin CLEA'larını oluşturmuşlardır. Araştırmacılar, CLEA oluşum sürecini iki adımda gerçekleştirmişlerdir. Bu sürecin ilk adımı enzimlerin fiziksel agregatının oluşumu için enzim presipitasyonu, ikinci adım ise bu agregatların birbirlerine çapraz bağlanmasıdır. Çalışmada, presipitasyon ajanı olarak izopropil alkol, 1,2-dimetoksi etan, *ters*-butil alkol, aseton, asetonitril gibi farklı organik çözücülerin ve amonyum sülfat tuzunun agregat oluşumu üzerine etkisi incelenmiştir. CLEA'lardaki aktivite kayıplarının önlenmesi için proteic feeder olarak bovin serum albümin kullanılmıştır. CLEA oluşum sürecindeki aktivite kayıplarını saptamak için santrifüj işleminden sonra ayrılan çözeltinin aktiviteleri ölçülmüştür. 1,2-Dimetoksietanın, kloroperoksidaz enzim için en iyi

presipitasyon ajanı olduğu saptanmış ve 1,2-dimetoksietan kullanıldığında yıkama çözeltisindeki aktivitenin yok denecek kadar az olduğu gözlemiştir. Bu çalışmada serbest amino grupları eklenerek enzim aktivitesinde artış sağlanması amaçlanmıştır. Serbest amino grupları enzimin yüzeyini kaplayarak gluteraldehitin enzimin aktif konumlarına aşırı bağlanmasını önlemektedir ve oluşturulan biyokatalizörde aktivite artışına neden olmaktadır. Araştırmada proteik feeder olarak polilizin ve polietilenimin kullanılmıştır. %1 (v/v) derişiminde gluteraldehit ve donör grup olarak polilizin ve polietilenimin kullanıldığında oluşturulan CLEA'larda aktivite kaybının en aza indirildiğini saptamışlardır. Oluşturulan CLEA'larını aktivitesini kaybetmeden tepkime ortamlarında defalarca kullanılabileceği vurgulanmıştır.

Kumar vd. (2010) %35'lik amonyum sülfat çözeltisi ve 125 µM derişiminde gluteraldehit kullanıldığında nitrilaz enzimlerinden yola çıkılarak oluşturulan CLEA'larındaki aktivite geri kazanım oranının %70 olduğunu belirlemiştir. Aktivite geri kazanım oranına gluteraldehit derişiminin etkisi 12.5–250 mM derişim aralığında incelenmiştir. Gluteraldehit derişiminin artmasıyla aktivite geri kazanım oranının arttığı daha sonra hemen hemen sabit kaldığını belirlemiştir. Aktivite geri kazanım oranına başlangıç enzim derişiminin etkisi ise 15–150 mM derişim aralığında incelemiştir. Nitrilaz enziminin taşıyıcısız enzim immobilizasyonunda başlangıç enzim aktivitesinin artması ile aktivite geri kazanım oranının azaldığını bildirmiştir. Araştırmacılar değişik pH (5-9) ve sıcaklık (4-45 °C) aralığında gerçekleştirilen taşıyıcısız immobilizasyon sürecinde aktivite geri kazanım oranı açısından en uygun çapraz bağlı nitrilaz enzimi agregatlarının oluşturulmasını amaçlamışlardır.

CLEA üretim sürecinde kullanılan tampon ile gerçekleştirilen yıkama işlemlerinde süpernatantta herhangi bir aktivite olup olmadığına bakılmış ve bu süreçte gluteraldehit derişimi ve başlangıç enzim derişimin artmasıyla aktivite kayıplarının değişimini incelemiştir. Gluteraldehit derişimi ile aktivite kaybında önemli bir değişim olmamasına karşın başlangıç enzim derişiminin artmasıyla önemli ölçüde aktivite kaybı yani enzim kaybının olduğu saptamışlardır.

2 MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

Bu çalışmada, *Candida rugosa* lipazı Type VII (Sigma L1754, Aktivite ≥ 700 U/mg) ve *Candida antarctica* lipazı B (Sigma 65986, Aktivite ≥ 1.09 U/mg) olmak üzere iki farklı lipaz kullanılmıştır. Çapraz bağlı enzim agregatlarının hazırlanması sürecinde ortam bileşimi olarak; bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajan olarak gluteraldehit (Sigma G5882, Grade I %25'lik çözelti), presipitasyon ajanı olarak amonyum sülfat (Merck 1.001217, Saflık $\geq$ %99.5), proteik feeder ajan olarak bovine serum albümin Fraction V (Sigma A9647, saflık ≥ 96) ve L(+)-lizin (Sigma L5501), yüzey aktif maddesi olarak TritonX-100 (Sigma 93429) kullanılmıştır. Enzim çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan tampon sistemleri Na_2HPO_4 (Merck 1.06586) ve $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck 1.06345) ile hazırlanmıştır. Serbest ve çapraz bağlı enzim agregatları biçiminde gerçekleştirilen taşıyıcısız enzim immobilizasyon sistemlerinin aktivitelerinin belirlenmesinde substrat olarak p-nitrofenil asetat (Sigma N8130) kullanılmıştır. p nitrofenil asetat çözeltisi HPLC saflıkta asetonitril (Merck 1.00030) ortamında hazırlanmıştır. Serbest ve çapraz bağlı enzim agregatları formlarındaki enzimlerin aktivitelerinin belirlenebilmesi için kalibrasyon doğrusunun hazırlanmasında tepkime ürünü olan p-nitrofenol (Merck 6798) kullanılmıştır. Ayrıca, *Candida rugosa* lipaz enzimlerinden hazırlanan çapraz bağlı enzim agregatlarının katalitik aktivitelerinin karşılaştırılmasında, ticari olarak sentezi son yıllarda gerçekleştirilmiş *Candida rugosa* lipaz enziminin CLEA formundaki biyokatalizörleri (Fluka 74793 Aktivite ≥ 1.32 U/mg) kullanılmıştır.

Süperkritik akışkan ortamında hem *Candida rugosa* lipazı hem de *Candida antarctica* lipazı B enzimlerinin immobilizasyon öncesi gerçekleştirilen ön işlemlerde saflık derecesi $\geq$ %99.995 olan sıvılaştırılmış CO_2 (HatGrup, Kocaeli) kullanılmıştır.

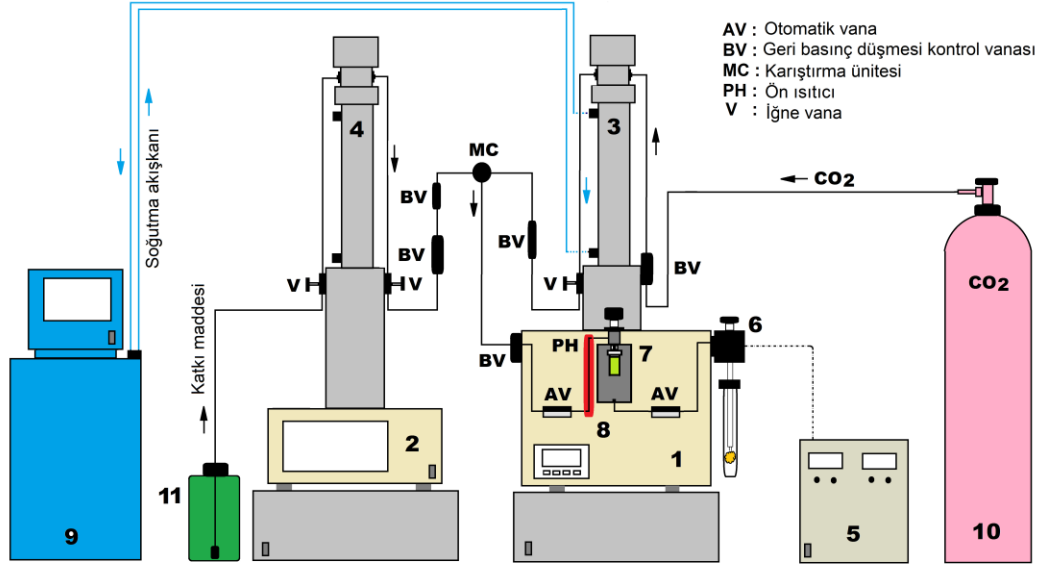
2.2 Çapraz bağlı enzim agregatlarının hazırlanması

2.2.1 Süperkritik CO₂ ortamında enzimlerin ön işleml

Çapraz bağlı enzim agregatları şeklindeki taşıyıcısız enzim immobilizasyon sürecinde *Candida rugosa* lipazı ve *Candida antarctica* lipazı B model enzim olarak kullanılmıştır. ScCO₂ ortamında enzimlerin ön işlem süreci aşağıda açıklanmıştır.

Taşıyıcısız enzim immobilizasyon işlemi öncesi enzimler yüksek basınç koşullarındaki scCO₂ ortamında, tersinir basınç denatürasyon işlemi uygulanmıştır. Bu işlemler akışkan fazına göre yarı sürekli katı faza göre ise kesikli olarak işletilen ISCO SFX 220 Model Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon Sistemi (ISCO SFX Model, Supercritical Fluid Extraction System, NE, Illinois, ABD) olan yüksek basınç sisteminde gerçekleştirilmiştir. Sistemin akım şeması Şekil 2.1’de gösterilmiştir. Sistemde kullanılan ekstraktör kısmı modifiye edilerek yerine yüksek basına dayanıklı bir reaktör ünitesi (7) tasarlanmıştır. Yüksek basına dayanıklı reaktör ünitesinin iç hacmi yaklaşık 5 mL’dir. Yüksek basınç sisteminde ön işlem sonundaki basının yeniden atmosferik koşullara indirgenmesi sırasında liyofilize haldeki enzim partiküllerinin reaktörden taşmasını/kaçmasını önlemek için scCO₂ giriş ve çıkışının aynı olduğu bölüme gözenekliliği 0.2 µm olan sinterleştirilmiş Si-Al karışımından yapılmış bir filtre kullanılmıştır. Sistem 2 adet yüksek basınç şırınga tipi pompa ünitesi içermektedir (3, 4). Pompalardaki vuruntunun önlenmesi ve özellikle sıvı CO₂ tankındaki akışkanın süperkritik koşullara getirilebilmesini sağlamak amacıyla her iki pompanın başında bulunan ısıtma/soğutma ceketlerinden soğutma sirkülatörü (9) yardımıyla +4 °C sıcaklıktaki soğutma akışkanı geçirilerek pompa başlarının soğuması sağlanmıştır. İstenilen basınç koşulu sağlanan scCO₂’in ön işlem sıcaklığına ulaşabilmesi için yüksek basınç reaktör ünitesinin öncesinde ve yüksek basınç reaktör ünitesini içine alan sıcaklık kontrollü basınç ünitesi (8) boru hatlarındaki ısıtma sistemleri yardımıyla otomatik olarak sağlanmıştır. Sistemdeki bu süreç sistem üzerinde yer alan kontrol ünitesi (2)

tarafından otomatik olarak sağlanmaktadır. ScCO_2 ortamında enzimler 15 dakika süre ile statik basınç altında ön işlem görmüşlerdir.



Şekil 2.1 Yüksek basınç reaktör sisteminin şematik gösterimi (Salgın ve Korkmaz, 2011)

- (1) Süperkritik akışkan reaktör ünitesi
- (2) Kontrol ünitesi
- (3) Şırınga tipi yüksek basınç pompası
- (4) Şırınga tipi yüksek basınç pompası
- (5) Restriktör sıcaklık kontrol ünitesi
- (6) Sıcaklık kontrollü akış hızı ayarlanabilir restriktör
- (7) Yüksek basınç reaktör
- (8) Sıcaklık kontrollü basınç ünitesi
- (9) Soğutmalı sirkülasyon
- (10) Sıvı CO_2 tankı
- (11) Katkı maddesi tankı
- (12) Atık ürün toplama kabı

Ön işlem süresi tamamlandığında yüksek basınç sistemindeki akışkan basıncının ani olarak azalmasını engellemek amacıyla CO_2 basıncı, yüksek basınç reaktör sistemi çıkışında yer alan eş merkezli ve akış hızı ayarlanabilir vana (6) (ISCO coaxially heated

adjustable back pressure valve) yardımıyla sağlanmıştır. Yüksek basınç koşullarındaki CO₂, sıcaklık kontrollü akış hızı ayarlanabilir restriktörden çıkışı sırasında meydana gelen ani genleşme kuru buz (katı CO₂) oluşumuna neden olmaktadır. Kuru buz oluşumunu engellemek amacıyla restriktörün sıcaklığı +80 °C sıcaklıkta tutulmuştur. Sıcaklık kontrolü sistemde yer alan sıcaklık kontrol ünitesinde (8) (ISCO Restrictor temperature controller) otomatik olarak sağlanmıştır. Basıncın atmosferik koşullara düşürülmesi sonucu enzimler yüksek basınç reaktör ortamından taşıyıcısız enzim immobilizasyon süreci için uzaklaştırılmıştır.

Candida rugosa lipaz enzim aktivitesine scCO₂ ortam sıcaklığı ve basıncın etkisi sırasıyla 31–60 °C ve 7.38–40 MPa aralığındaki koşullarda hem katı formdaki enzim hem de pH' ı 7.2 olan 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tampon ortamında çözünmüş enzim için araştırılmıştır. Katı formdaki enzimlerle gerçekleştirilen araştırmalarda 0.02 g *Candida rugosa* lipaz enzimi kullanılmıştır. Tampon ortamında çözünmüş enzimler ile gerçekleştirilen araştırmalarda ise enzim derişimi 0.02 g/mL'dir. *Candida antarctica* lipazı B enzim aktivitesine scCO₂ ortam sıcaklığı ve basıncın etkisi ise sadece katı formdaki liyofilize enzim kullanılarak 15 dakika süre ile 40 °C sıcaklık ve 10 MPa basınç koşullarında araştırılmıştır.

2.2.2 Üretim ortamından gelen safsızlıkların giderilmesi

Candida antarctica lipazı B enzimi için herhangi bir safsızlık giderme işlemi uygulanmamasına karşın *Candida rugosa* lipazı enzimi için üretim ortamından gelen aşırı safsızlıkların gidilmesine yönelik immobilizasyon öncesi, bileşimindeki safsızlıkların azaltılması amacıyla bir dizi ayırma işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Birinci adımda, 3 mL hacimdeki pH'ı 7.2 olan 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tampon ortamında eklenen enzimlerden homojen bir çözelti oluşturmak amacıyla vorteks cihazında (IKA Co., VG3 Model, Almanya) karıştırılarak çözülmesi sağlanmıştır. İkinci

adımında ise pH'ı 7.2 olan 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tampon ortamında çözünmüş *Candida rugosa* lipazı enzimi çözeltilerinin +4 °C sıcaklıkta karışmasını sağlamak amacıyla 30 mL hacimli polipropilen tüpün içerisine yerleştirilebildiği özel olarak yapılmış ve çevresinde sıcaklık kontrolünün sağlanabileceği bir ceketli kap içerisine yerleştirilmiştir. Sıcaklık kontrollü soğutmalı sirkülatör yardımıyla (Thermo Elektron Co., HAAKE Phoenix II P2-C25P circulator, Hampshire, İngiltere) +4 °C sıcaklıktaki bir soğutma akışkanı bu ceketten geçirilerek enzim çözeltisinin soğutulması sağlanmıştır. Karıştırma hızı kontrollü orbital karıştırıcı shaker (Selecta Co., Rotabit Model, İspanya) üzerine yerleştirilen enzim çözeltisi 200 rpm karıştırma hızında 2 saat süre ile karıştırılmıştır. Bu işlem sonunda enzim çözeltisi +4 °C sıcaklıkta 10000 rpm' de 30 dakika süreyle soğutmalı bir santrifüjde (Selecta Co., Medifriger BL-S Model, İspanya) santrifüjleşmiştir. Santrifüj tüpü üzerindeki üst faz (süpernatant) benzer hacimdeki yeni bir santrifüj tüpüne alındıktan sonra yukarıdaki işlemler tekrarlanmıştır. Bu işlemler hem scCO₂ ile ön işlem görmüş enzimlerin hem de ön işlem görmemiş enzimlerin yer aldığı immobilizasyon süreçlerinde kullanılacak enzimler için tekrarlanmıştır.

2.2.3 Çapraz bağlı enzim agregatlarının üretimi

Candida rugosa lipazı için safsızlıkların giderilmesine yönelik santrifüjleme yöntemi ile ayırma işlemleri gerçekleştirildikten sonra, *Candida antarctica* lipazı B enzimi için ise safsızlık giderme işlemi uygulanmadan eş anlı olarak hem scCO₂ ortamında ön işlem görmüş hem de görmemiş enzimler kullanılarak çapraz bağlı enzim agregatlarının oluşturulması için aşağıda belirtilen adımlar izlenmiştir.

1. 30 mL hacimli polipropilen santrifüj tüpü bulunan 3 mL hacimdeki belli bir başlangıç enzim derişimine sahip enzim çözeltisi, presipitasyon ajanı amonyum sülfatın katı formunun doğrudan enzim çözeltisine yavaş yavaş eklenerek enzim salting out etkisiyle presipitasyonu karıştırma hızı kontrollü orbital

karıştırılmalı karıştırıcıda (Selecta Co., Rotabit Model, İspanya) 2 saat süre ile +4 °C sıcaklık ve 200 rpm karıştırma hızı koşullarında gerçekleştirilmiştir. Araştırmalarda CLEA formundaki biyokatalizör sistemlerinin katalitik aktivitesine amonyum sülfat derişiminin etkisi; 500–800 mg/mL aralığında incelenmiştir.

2. İyonik kuvvetlerle birbirlerine yakınlaştırılan enzim moleküllerinin birbirlerine çapraz olarak bağlanma işlemi karıştırma hızı kontrollü orbital karıştırılmalı bir karıştırıcıda (Selecta Co., Rotabit Model, İspanya) yarım saat süre ile +4 °C sıcaklık ve 200 rpm karıştırma hızında belli derişimde glutraldehit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Karıştırma işlem sonunda örnekler 2 gün boyunca 4- 8 °C sıcaklıktaki buzdolabında bekletilmiştir. Araştırmalarda CLEA formundaki biyokatalizör sistemlerinin katalitik aktivitesine glutraldehit derişiminin etkisi 26.7–100 µL/mL aralığında incelenmiştir.
3. Çapraz bağlı enzim agregatları biçiminde üretilen biyokatalizörlerin çözelti ortamındaki geri kazanımı ve üretim ortamından gelen safsızlıklardan ayrılması için örnekler +4 °C sıcaklıkta 1000 rpm karıştırma hızında 30 dakika süreyle soğutmalı santrifüjde (Selecta Co., Medifriger BL-S Model, İspanya) gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda üst fazı ayrılan örnekler üzerine pH'ı 7.2 olan 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tampon çözeltiden 3 mL eklenmiş ve vorteks işlemi uygulanmıştır. Belirtilen bu yıkama işlemleri 5 kez tekrarlanmıştır.

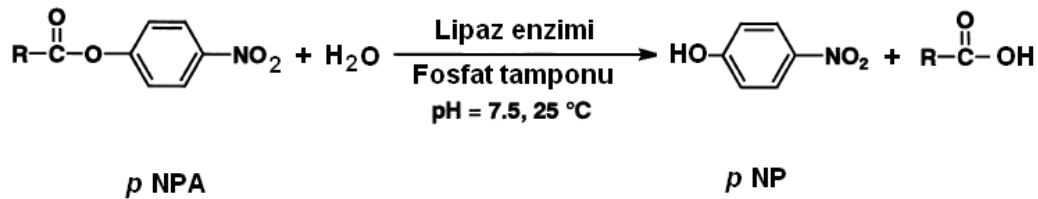
Proteik feeder ajan türü ve derişim etkisi ve yüzey aktif madde derişiminin oluşturulan CLEA formundaki biyokatalizörlerin katalitik aktivitesine etkisinin incelendiği immobilizasyon işlemlerinde; proteik feeder, ajan enzim çözeltisinin saflaştırma işlemi sonrası yüzey aktif maddesi ise enzim çözeltisinin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

Deneylerde *Candida rugosa* enziminin çapraz bağlı enzim agregatlarının aktivitesi üzerine proteik feeder ajan BSA ve lizin derişiminin etkisi 0.88-16.67 mg/mL aralığında, yüzey aktif maddesi Triton X-100 derişiminin etkisi ise 1/10 oranında deiyonize su içerisinde seyreltilmiş Triton X-100 çözeltisinin 1.67-4 µL/mL derişim aralığında incelenmiştir. *Candida antarctica* lipazı B enziminin CLEA biçimindeki enzim immobilizasyon süreci ise *Candida rugosa* enziminin en yüksek katalitik aktivite değerlerinin saptandığı en uygun başlangıç enzim derişimi, amonyum sülfat derişimi ve gluteraldehit derişiminde ve hem BSA ve lizin hem de Triton X-100 için belirlenen en uygun koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans tez projesi kapsamında gerçekleştirilen tüm deneyler, scCO₂ ile ön işlem görmüş ve görmemiş *Candida rugosa* enzimi ve *Candida antarctica* lipazı B enzimleri için eş anlı olarak gerçekleştirilmiştir.

2.3 Enzim aktivitesinin belirlenmesi

Candida rugosa enzimi ve *Candida antarctica* lipazı B enzimleri kullanılarak hazırlanan CLEA formundaki taşıyıcısız enzim sistemlerinin hidrolitik aktivitesi (U), substrat olarak *p*-nitrofenilasetat (*p*NPA)'ın lipaz enzimi ile tepkimesi sonunda üretilen *p*-nitrofenol (*p*NP)'ın üretim hızı ölçülerek belirlenmiştir (Goto vd., 2003; Salgın, 2007). Tepkimenin stokiyometrik denklemi Şekil 2.2'de verilmiştir.



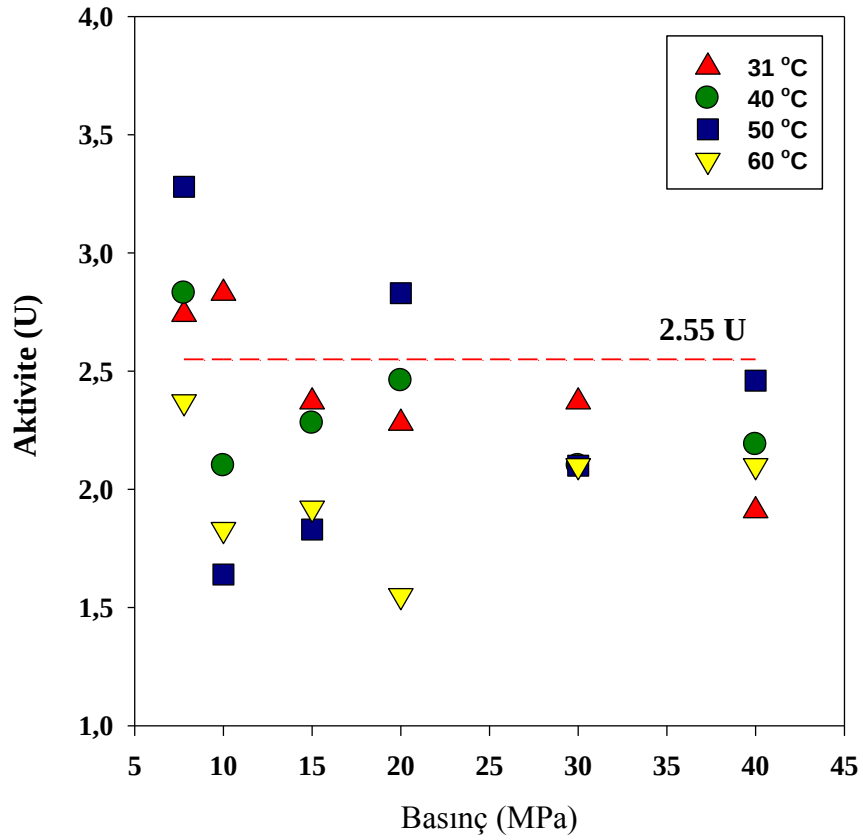
Şekil 2.2 *p*-nitrofenilasetat lipaz katalizli enzimatik hidroliz tepkimesi

p-nitrofenol üretim hızı spektrofotometrik olarak UV-vis spektrofotometre cihazında (Shimadzu, 1800 model Uv-vis spektrofotometre, Japonya) $\lambda=404$ nm dalga boyunda ve 25°C sıcaklıkta, kinetik moda belirli zaman aralığında okunan absorbans değerlerinin farkından yararlanılarak hesaplanmıştır. Kalibrasyon doğrusu için 0.1 M ve pH=7.5 fosfat tamponunda ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$) hazırlanan *p*NP'nin belli derişimlerdeki çözeltileri kullanılmıştır. Her bir *p*NP derişimi için elde absorbans değerleri spektrofotometrik olarak $\lambda=404$ nm için belirlenmiştir. Absorbans ölçümü öncesinde CLEA'lar 0.45 μm gözeneli polivinilidinden florür (PVDF, Millex VV) filtrelerde süzölmüştür.

3 DENEYSEL BULGULAR

3.1 Katı Formdaki Enzimlerin Katalitik Aktivitesine Süperkritik CO₂'in Sıcaklık ve Basınç Etkisi

scCO₂ ortamında enzim konformasyonunun nasıl daha esnek hale getirilebileceğine yönelik çalışmalarda, katı formdaki CRL enzimleri, 31-60 °C sıcaklık ve 7.38-40 MPa basınç aralığı koşullarında 15 dakika süre ile scCO₂ ortamında ön işlem görmüşlerdir. Şekil 3.1'de farklı sıcaklık koşullarında CRL enzim aktivitesine basıncın etkisi gösterilmiştir.

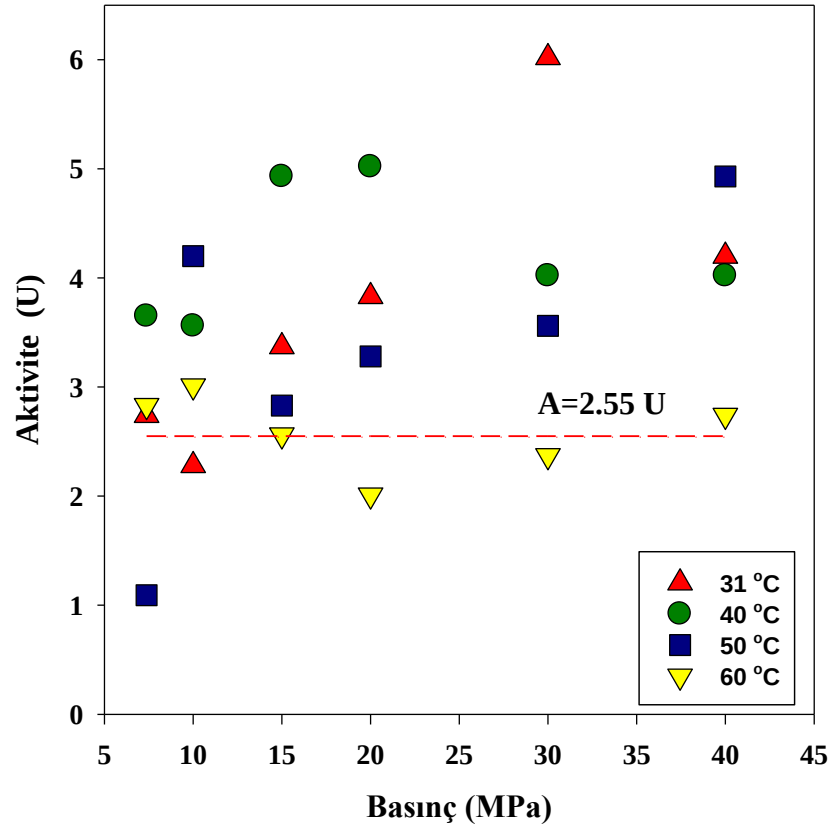


Şekil 3.1 scCO₂ ortamında ön işlem gören katı formdaki CRL enzim aktivitesinin farklı sıcaklıklarda basınç ile değişimi

Katı formdaki CRL enzimlerinin, doğrudan $scCO_2$ ile ön işlem görmesi sonucu enzim konformasyonel yapısında önemli değişimlerin olduğu görülmektedir. 40 °C gibi ılımlı sıcaklık koşullarında gerçekleştirilen çalışmalarda kritik basınç değeri 7.38 MPa olan $scCO_2$ 'in belirtilen basınç değerinin üzerindeki koşullarda aktivitesi, 2.55 U olarak saptanan $scCO_2$ ile ön işlem görmemiş serbest enzim aktivitesinin altında olduğu saptanmıştır. Kullanılan sistemin teknik özellikleri ve yüksek basınç reaktörde $scCO_2$ 'in ani basınçlandırma ve genleştirme süreçlerinde enzim aktivitesine etkileri de dikkate alındığında yüksek lisans tez projesi kapsamında CRL enzimlerinin CLEA formundaki biyokatalizör sistemlerinin hazırlanmasında ön işlem koşulları 40 °C, 10 MPa ve 15 dakika olarak belirlenmiştir.

3.2 Enzim Çözeltilisinde Serbest Formda Bulunan Enzimlerin Katalitik Aktivitesine $ScCO_2$ 'in Sıcaklık ve Basıncının Etkisi

CLEA formundaki enzim sistemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda immobilizasyon süreci öncesi pH'ı 7.5 olan 0.1 M fosfat tamponunda çözünmüş serbest CRL enzimleri 31-60 °C sıcaklık aralığı ve 7.38-40 MPa basınç aralığı koşullarında 15 dakika süre ile $scCO_2$ ortamında ön işlem görmüşlerdir. Şekil 3.2'de farklı sıcaklık koşullarında tampon sisteminde çözünmüş serbest CRL enzim aktivitesine basıncın etkisi gösterilmiştir. Enzimatik sentezlerde çözücü ortamlarına alternatif olarak $scCO_2$ 'in kullanılması, enzimlerin bölgesel ve stereo seçimli özelliklerini artırılabilir. Sıcaklık ve basınç gibi biyoproses parametrelerindeki küçük değişimler süperkritik akışkanların fizikokimyasal özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir. Enzimlerin mikro çevresindeki bu değişimler biyokatalizörlerin katalitik aktivite ve yapısal kararlılığını da etkiler. Enzim çözeltilisinde serbest formda bulunan CRL enzimlerin katalitik aktivitesine $scCO_2$ 'in sıcaklık ve basınç etkisi dikkate alındığında geniş bir sıcaklık ve basınç aralığında serbest enzimlerin katalitik aktivitelerinin arttığı saptanmıştır.



Şekil 3.2 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş serbest formdaki CRL enzim aktivitesinin farklı sıcaklıklarda basınç ile değişimi

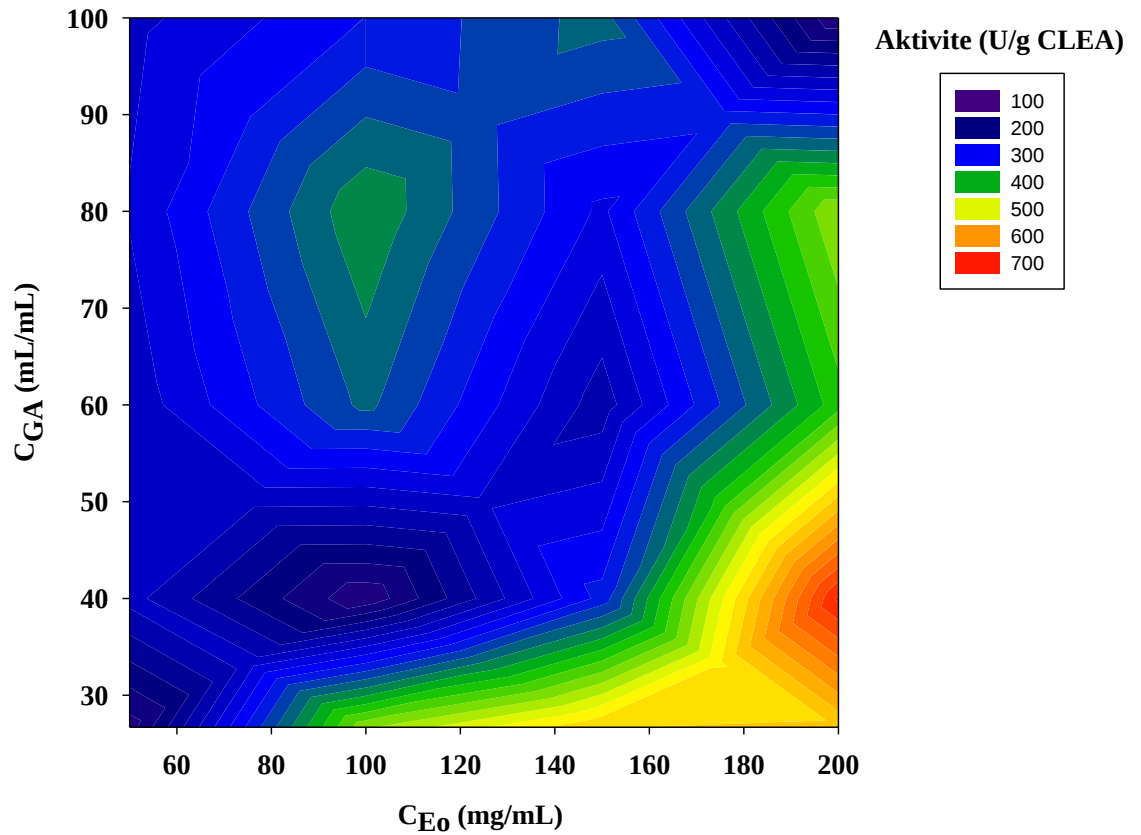
3.3 Çapraz Bağlı Enzim Agregatlarının Üretiminde Enzim Aktivitesine Etki Eden Parametrelerin İncelenmesi

3.3.1. *Candida rugosa* lipaz enzimi

3.3.1.1 Başlangıç enzim derişimi etkisi

Taşıyıcısız enzim immobilizasyon sürecinde 10MPa ve 40 °C koşullarında scCO₂ ortamında ön işlem görmüş CRL enzimi ve ön işlem görmemiş CRL enzimi ile oluşturulan CLEA'larının immobilizasyonu eş anlı olarak gerçekleştirilmiştir. CLEA formunda oluşturulan immobilize enzim sistemlerin, katalitik aktivitesine başlangıç

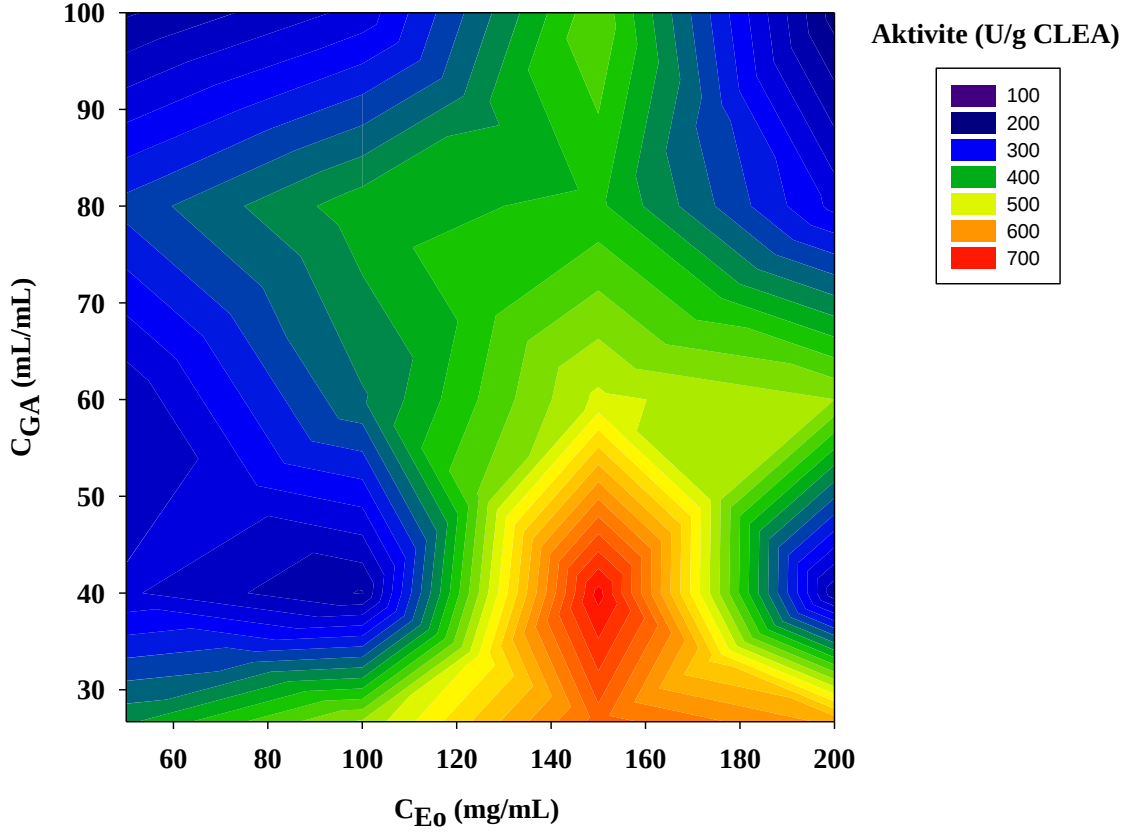
enzim derişiminin (C_{E0}) etkisi $C_{E0}=50, 100, 150$ ve 200 mg/mL koşullarında araştırılmıştır. Bu süreçte bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajan derişimi $26.7\text{--}100$ µL/mL aralığındaki farklı gluteraldehit derişimlerinde (C_{GA}) incelenmiştir. Presipitasyon ajanı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın derişimi ($C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$) ise pH'ı 7.2 olan 0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--NaH}_2\text{PO}_4$ tamponunda 700 mg/mL olarak saptanan doygunluk derişimi koşullarında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3 CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'nın enzim aktivitesine başlangıç enzim deriş ve gluteraldehit derişiminin etkisi ($C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=700$ mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)

Şekil 3.3'de gösterilen 2D grafiklerinde scCO_2 ortamında ön işlem görmemiş CRL enzimi ile oluşturulan CLEA'ların katalitik aktivitelerine, başlangıç enzim derişimi ve gluteraldehit derişim etkisi birlikte gösterilmiştir. Başlangıç enzim derişiminin

150–200 mg/mL ve gluteraldehit derişiminin 26.7–60 µL/mL olduğu koşullarda yüksek aktivite değerlerine ulaşılmıştır. scCO₂ ile ön işlem görmemiş CRL enzimleri kullanılarak oluşturulan CLEA’ların en yüksek aktivite değeri C_{E0}=200 mg/mL ve C_{GA}=40 µL/mL koşullarında elde edilmiş ve aktivite 683.7 U/g CLEA olarak saptanmıştır.

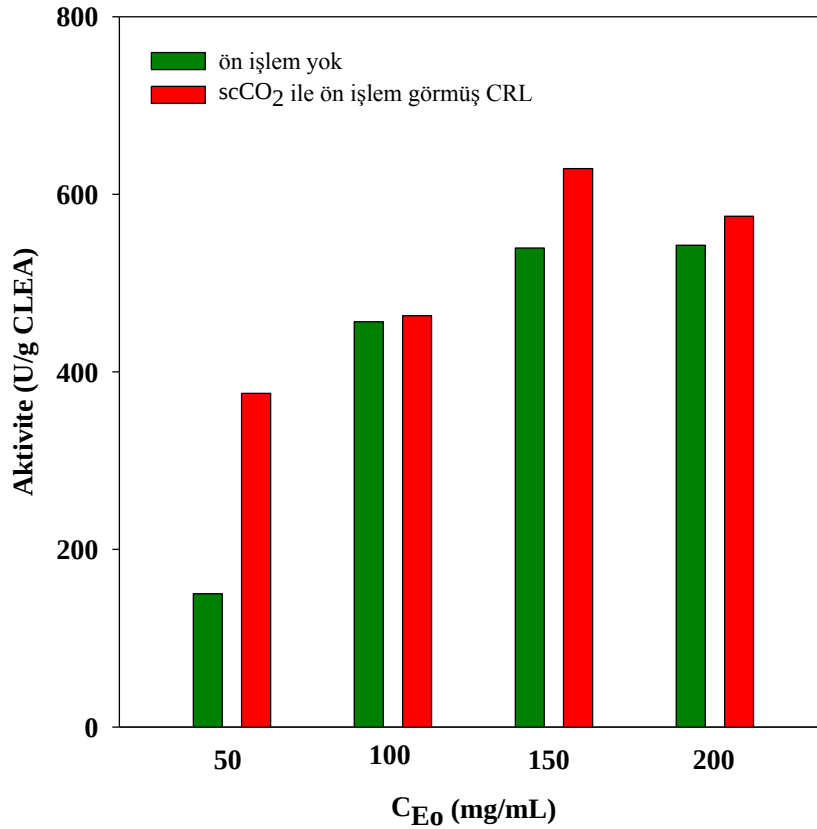


şekil 3.4 scCO₂ ortamında 10 MPa ve 40°C koşullarında ön işlem gören CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA’nın enzim aktivitesine başlangıç enzim derişi ve gluteraldehit derişiminin etkisi (C_{(NH₄)₂SO₄}=700 mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)

10MPa ve 40 °C koşullarındaki scCO₂ ortamında ön işlem gören CRL enzimi ile oluşturulan CLEA’ların katalitik aktivitelerine başlangıç enzim derişimi ve gluteraldehit derişiminin etkisi şekil 3.4’de gösterilmiştir. Başlangıç enzim derişiminin 100–200 mg/mL ve gluteraldehit derişiminin 26.7-40 µL/mL olduğu koşullarda yüksek aktivite değerleri elde edilmiştir. scCO₂ ile ön işlem gören CRL enzimleri kullanılarak oluşturulan

CLEA'ların en yüksek aktivite değerine $C_{E0}=150$ mg/mL ve $C_{GA}=40$ µL/mL koşullarında elde edilmiş ve aktivite 708.1 U/g CLEA olarak saptanmıştır. Bu koşullarda $scCO_2$ ile ön işlem görmemiş CRL enzimleri kullanılarak oluşturulan CLEA'ların en yüksek aktivite değeri ise 307.8 U/g CLEA'dır.

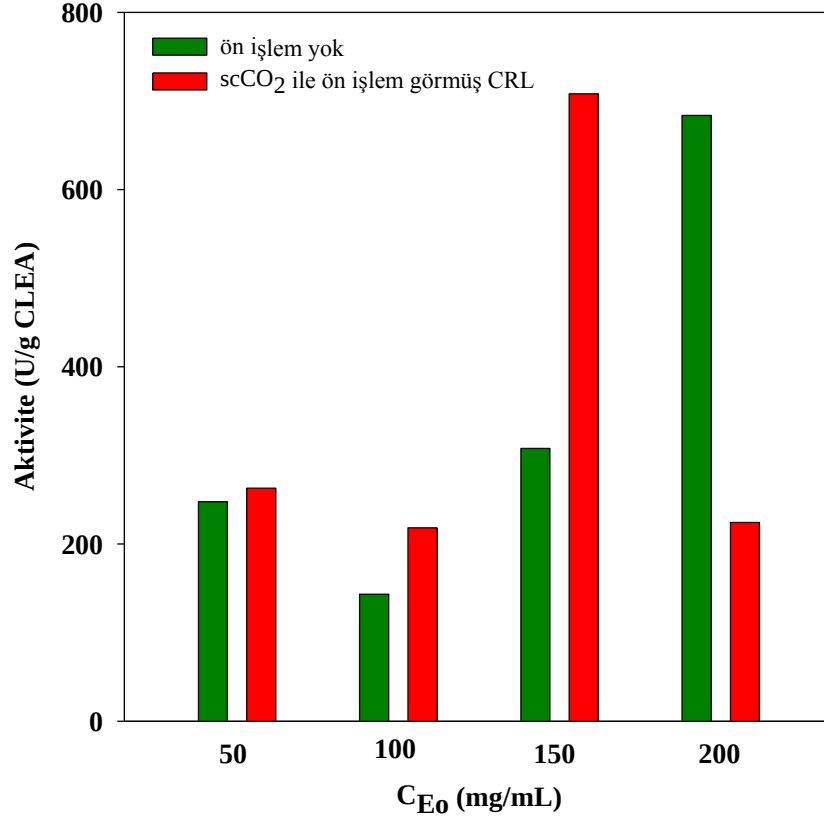
CRL enzimlerinin CLEA şeklindeki taşıyıcısız enzim immobilizasyon sürecinde başlangıç enzim derişiminin enzim aktivitesine etkisi dikkate alındığında, bifonksiyonel ajan derişimine bağılı olarak farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle sabit bir gluteraldehit derişiminde, başlangıç enzim derişiminin aktivite üzerine etkisi aşağıda detaylı biçimde ele alınmıştır. $scCO_2$ ile ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimlerinin pH'ı 7.2 olan 0.1M Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 tampon ortamında, $C_{GA}=26.7$ µL/mL ve $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$ mg/mL koşullarında gerçekleştirilen immobilizasyon sürecinde elde edilen CLEA aktivitelerinin başlangıç enzim derişimi ile değışimi Şekil 3.5'de gösterilmiştir. Belirtilen koşullarda $scCO_2$ ile ön işlem görmüş CRL enzimleri ile elde edilen CLEA aktivitelerinin $scCO_2$ ile ön işlem görmemiş CRL enzimleri ile elde edilen CLEA aktivitelerinden daha yüksek olduğu görölmektedir. $scCO_2$ ile ön işlem görmemiş CRL enzimleri için başlangıç enzim derişiminin 50 mg/mL'den 200 mg/mL'ye artması ile CLEA formundaki biyokatalizör aktivitesinin 150.2 U/g CLEA'dan 542.5 U/g CLEA'a yükselmektedir. Başlangıç enzim derişiminin 5 kat arttırılması, CLEA aktivitesinde yaklaşık % 262'lik bir artışa neden olmuştur. Ancak immobilizasyon öncesi enziminin 10 MPa ve 40 °C koşullarında $scCO_2$ ile ön işlem gördüğü durumda, CRL enzimlerinin CLEA formundaki biyokatalizörlerin katalitik aktiviteleri, başlangıç enzim derişiminin 50 mg/mL'den 150 mg/mL'ye artması ile önce artmakta, 150 mg/mL üzerindeki başlangıç enzim derişimlerinde ise azalmaktadır. Başlangıç enzim derişimin 150 mg/mL olduğu koşullardaki CLEA formundaki enzimlerin katalitik aktivitesi 628.9 U/g CLEA olarak belirlenmiştir. Aynı başlangıç enzim derişiminde ön işlem görmemiş enzimlerin kullanıldığı immobilizasyon işleminde oluşturulan CLEA'ların katalitik aktivitesi ise 539.5 U/g CLEA olarak saptanmıştır.



Şekil 3.5 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'nın enzim aktivitesine başlangıç enzim derişiminin etkisi ($C_{GA}=26.7 \mu\text{L/mL}$, $C_{(NH_4)_2SO_4}=700 \text{ mg/mL}$, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)

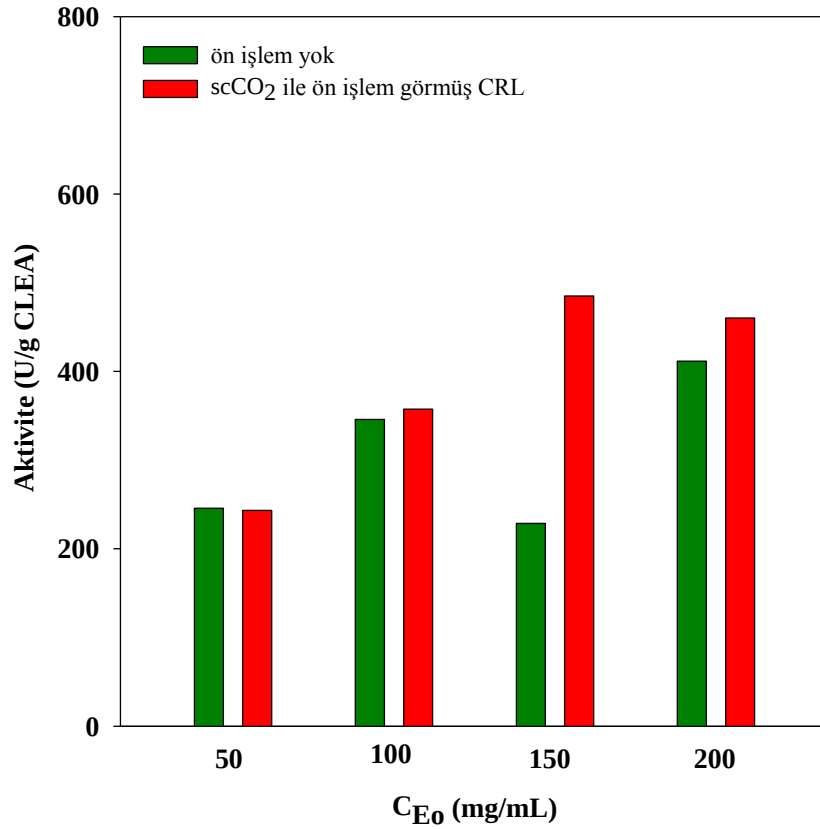
scCO₂ ile ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimlerinin pH'ı 7.2 olan 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tampon ortamında; $C_{GA}=40 \mu\text{L/mL}$ ve $C_{(NH_4)_2SO_4}=700 \text{ mg/mL}$ koşullarında gerçekleştirilen immobilizasyon sürecinde elde edilen CLEA aktivitelerinin başlangıç enzim derişimi ile değişimi Şekil 3.6'da gösterilmiştir. scCO₂ ile ön işlem görmemiş CRL enzimleri için başlangıç enzim derişiminin 100 mg/mL olduğu koşullarda biyokatalizörün katalitik aktivitesi bir minimum değer vermektedir. 100 mg/mL üzerindeki başlangıç enzim derişimlerinde ise aktivite artmaktadır. Ön işlem görmemiş enzimler ile gerçekleştirilen taşıyıcısız immobilizasyon işlemlerinde en yüksek CLEA aktivitesi $C_{Eo}=200 \text{ mg/mL}$ koşullarında 683.7 U/g CLEA'dır. CRL enzimlerinin scCO₂

ile ön işlem görmesiyle oluşturulan taşıyıcısız enzim sistemlerinin katalitik aktivitesi başlangıç enzim derişiminin 150 mg/mL olduğu koşullarında en yüksek değeri olan 708.1 U/g CLEA'ya ulaşmıştır. Ancak yüksek başlangıç enzim derişimindeki CLEA'ların aktivitesinin azaldığı ve yaklaşık %68'lik bir aktivite kaybının olduğu görülmektedir



Şekil 3.6 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'nın enzim aktivitesine başlangıç enzim derişiminin etkisi (C_{GA}=40 µL/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=700 mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)

scCO₂ ile ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimlerinin pH'ı 7.2 olan 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tampon ortamında; C_{GA}=60 µL/mL ve C_{(NH₄)₂SO₄}=700 mg/mL koşullarında gerçekleştirilen immobilizasyon sürecinde elde edilen CLEA aktivitelerinin başlangıç enzim derişimi ile değişimi Şekil 3.7'de gösterilmiştir.

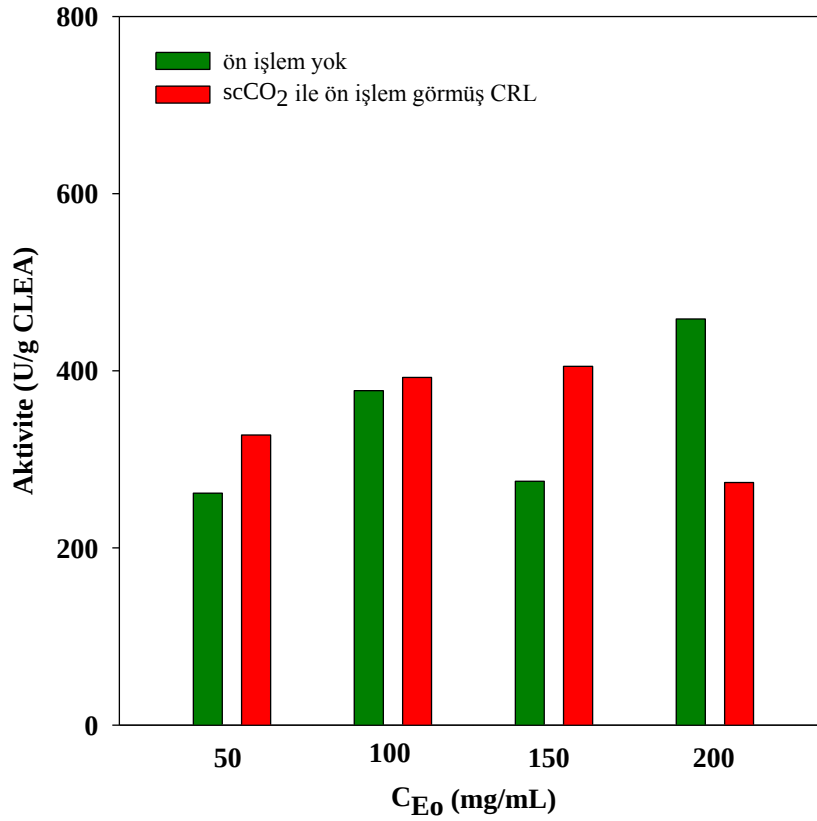


Şekil 3.7 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'nın enzim aktivitesine başlangıç enzim derişiminin etkisi ($C_{GA}=60 \mu\text{L/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=700 \text{ mg/mL}$, $\text{pH}=7.2$ 0.1 M fosfat tamponu)

Başlangıç enzim derişiminin 50 mg/mL üzerindeki koşullarda scCO₂ ile ön işlem gören CRL enzimleri kullanılarak oluşturulan CLEA'larının katalitik aktivite değerleri dikkate alındığında, ön işlem görmemiş enzimler kullanılarak oluşturulan immobilize enzim aktivitelerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. scCO₂ ile ön işlem görmemiş CRL enzimlerinin CLEA'larındaki aktivite değeri başlangıç derişiminin artması ile önce artmakta daha sonra azalmaktadır. Ancak ön işlem görmemiş CRL enzimlerinin CLEA'larının aktiviteleri başlangıç derişiminin artması ile belirgin bir özellik göstermemektedir. scCO₂ ile ön işlem gören CRL enzimlerinin CLEA'ları için en yüksek katalitik aktivite değerleri $C_{E0}=150 \text{ mg/mL}$ koşullarında 485.1 U/g CLEA olarak

saptanmıştır. Aynı derişim koşullarında ön işlem görmemiş enzimler kullanılarak gerçekleştirilen immobilizasyon çalışmasında ise ulaşılan katalitik aktivite değeri 228.6 U/g CLEA olarak gerçekleşmiştir. Enzimlerin scCO₂ ortamında ön işlem görmesi sonucu CLEA formundaki enzimlerin katalitik aktivitelerindeki artış yaklaşık %112'dir. Ön işlem görmemiş enzimlerin kullanıldığı immobilizasyon sürecinde ise en yüksek katalitik aktivite değeri C_{E0}=200 mg/mL koşullarında 411.5 U/g CLEA olarak saptanmıştır.

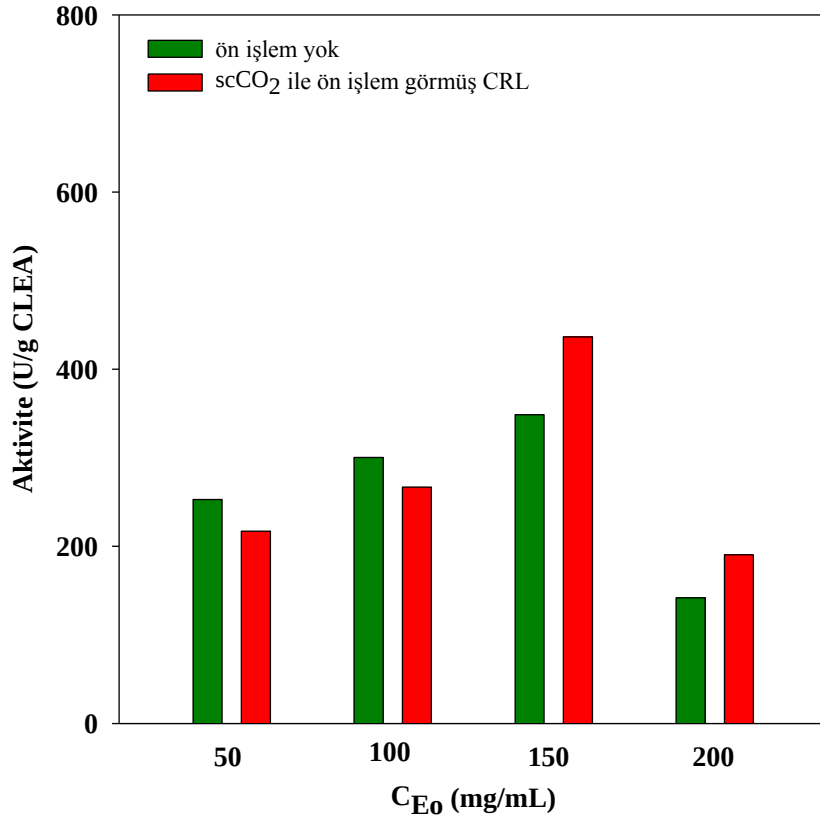
scCO₂ ile ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimlerinin pH'ı 7.2 olan 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tampon ortamında; C_{GA}=80 µL/mL ve C_{(NH₄)₂SO₄}=700 mg/mL koşullarında gerçekleştirilen immobilizasyon sürecinde elde edilen CLEA aktivitelerinin başlangıç enzim derişimi ile değışimi Şekil 3.8'de gösterilmiştir. Immobilizasyon işleminde kullanılan çapraz bağlayıcı ajan derişiminin artması ile CLEA formundaki enzimlerin katalitik aktivitelerinde önemli azalmalar gerçekleşmiştir. Başlangıç enzim derişiminin 200 mg/mL' den küçük olduğu koşullarda, scCO₂ ile ön işlem görmüş enzimler ile oluşturulan CLEA aktivitelerinin ön işlem görmemiş enzimler kullanılarak oluşturulan CLEA aktivitelerinden daha yüksek olduğu görölmektedir. En yüksek CLEA aktivitesi, scCO₂ ile ön işlem görmüş CRL enzimlerinin kullanıldığı immobilizasyon süreçlerinde C_{E0}=150 mg/mL koşullarında 405 U/g CLEA ve ön işlem görmemiş CRL enzimlerinin kullanıldığı immobilizasyon süreçlerinde C_{E0}=200 mg/mL koşullarında 458.6 U/g CLEA olarak saptanmıştır. Ön işlem görmemiş enzimlerin yer aldığı immobilizasyon işlemlerinde başlangıç enzim derişimi ile CLEA aktiviteleri arasında belirgin bir değışim gözlenmemektedir. CRL enzimlerinin 10 MPa ve 40°C koşullarında scCO₂ ile ön işlem görmesi sonucu CLEA aktiviteleri başlangıç enzim derişiminin artmasıyla C_{E0}=150 mg/mL koşullarında bir maksimum vermektedir.



Şekil 3.8 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'nın enzim aktivitesine başlangıç enzim derişiminin etkisi ($C_{GA}=80 \mu\text{L/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=700 \text{ mg/mL}$, $\text{pH}=7.2$ 0.1 M fosfat tamponu)

scCO₂ ile ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimlerinin pH' ı 7.2 olan 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tampon ortamında; $C_{GA}=80 \mu\text{L/mL}$ ve $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=700 \text{ mg/mL}$ koşullarında gerçekleştirilen immobilizasyon sürecinde elde edilen CLEA aktivitelerinin başlangıç enzim derişimi ile değişimi Şekil 3.9'da gösterilmiştir. scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş enzimlerin kullanıldığı taşıyıcısız immobilizasyon sürecinde elde edilen biyokatalizör sistemlerinin katalitik aktiviteleri başlangıç derişiminin artmasıyla önce artmakta ve daha sonra azalmaktadır. En yüksek CLEA aktivitelerine $C_{E0}=150 \text{ mg/mL}$ koşullarında ulaşılmış ve aktive değerleri ön işlemin gerçekleştirildiği

enzimlerde 436.4 U/g CLEA ve ön işlem görmemiş enzimlerde ise 348.7 U/g CLEA olarak saptanmıştır.



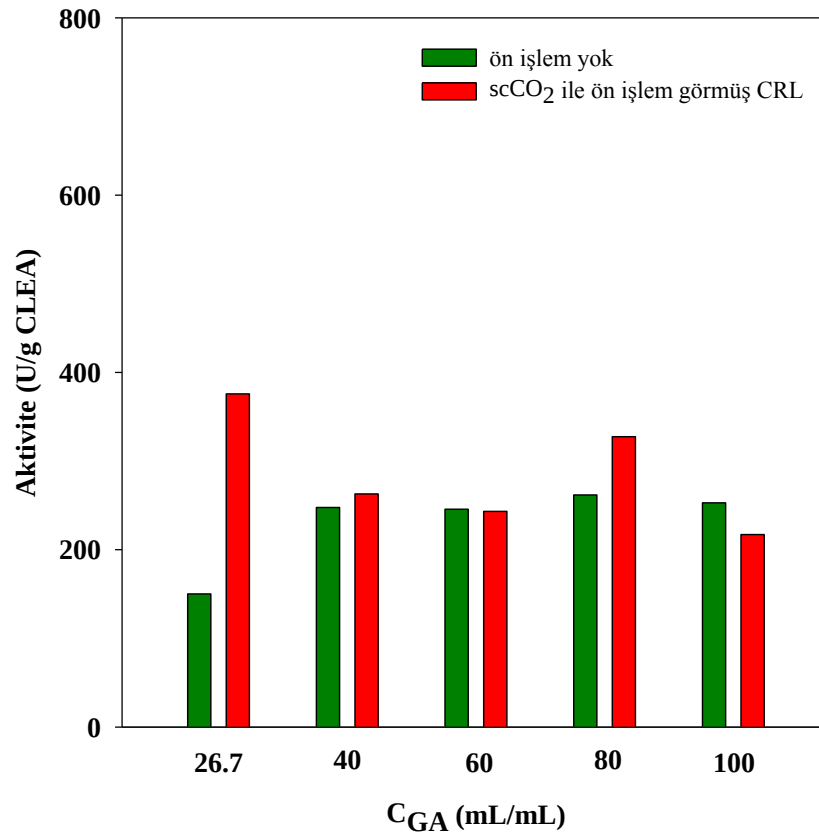
Şekil 3.9 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'nın enzim aktivitesine başlangıç enzim derişiminin etkisi (C_{GA} =100 μ L/mL, $C_{(NH_4)_2SO_4}$ =700 mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)

3.3.1.2 Gluteraldehit derişimi etkisi

CLEA formundaki taşıyıcısız enzim immobilizasyon sürecinde 10 MPave 40 °C koşullarında scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve ön işlem görmemiş CRL enzimi kullanılarak oluşturulan biyokatalizör sistemlerinin katalitik aktivitesine gluteraldehit derişimini etkisi C_{GA} =26.7, 40, 60, 80 ve 100 μ L/mL koşullarında araştırılmıştır. Bu süreçte başlangıç enzim derişim 50–200 mg/mL aralığında incelenmiştir. Presipitasyon ajanı (NH₄)₂SO₄'ın derişimi ($C_{(NH_4)_2SO_4}$) ise pH'ı 7.2 olan 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄

tamponunda 700 mg/mL olarak saptanan doygunluk derişimi koşullarında gerçekleştirilmiştir.

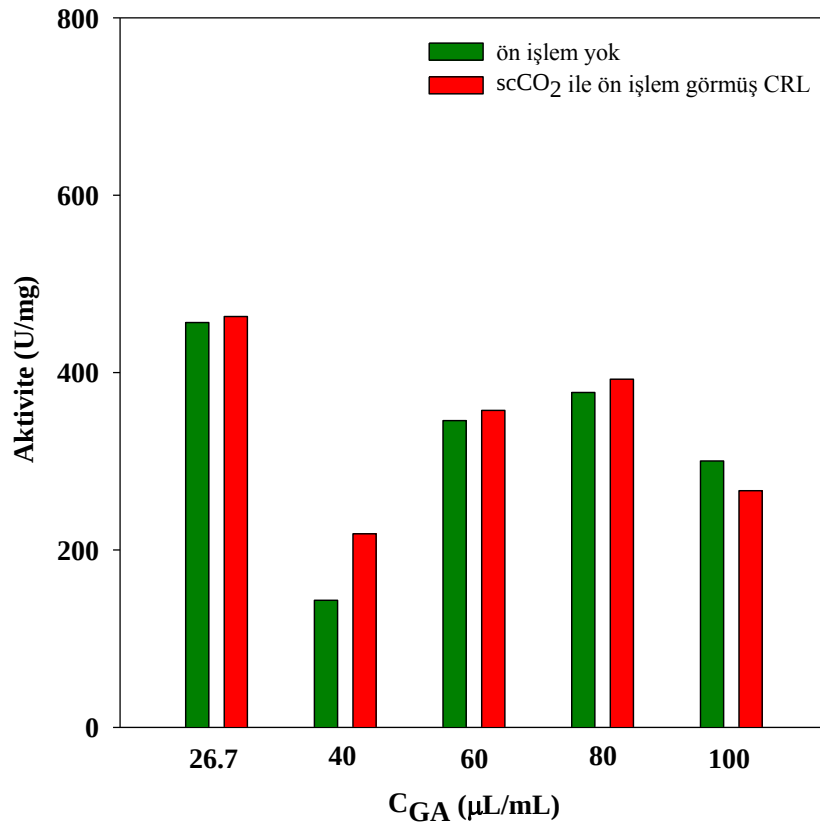
Başlangıç enzim derişiminin 50 mg/mL olduğu koşullarda, scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri kullanılarak farklı gluteraldehit derişimlerinde sentezlenen CLEA'ların katalitik aktivitesindeki değişimler Şekil 3.10'da gösterilmiştir.



Şekil 3.10 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'larının katalitik aktivitesine gluteraldehit derişimi etkisi (C_{E0}=50 mg/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=700 mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)

Reaktif özelliği oldukça yüksek olan bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajan gluteraldehit düşük enzim derişimlerdeki immobilizasyon çalışmalarında enzimlerin aktif konumlarındaki bağlanma şiddetini artırmaktadır. Aşırı bağlanma sonucu CLEA formundaki biyokatalizörlerin katalitik performanslarında önemli azalmalara neden

olmaktadır. Belirtilen koşullarda ulaşılabilen tüm CLEA aktiviteleri 400 U/g CLEA'dan düşüktür. En düşük gluteraldehit derişiminde scCO₂ ortamında ön işlem gören CRL enzimlerinden yola çıkılarak üretilen CLEA'larda 375.7 U/g CLEA olarak saptanan en yüksek katalitik aktivite değerine ulaşılabilmiştir. Gluteraldehit derişiminin 26.7 µL/mL olduğu koşullarda ön işlem görmemiş enzimler ile gerçekleştirilen CLEA aktivitesi ise 150.2 U/g CLEA'dır.

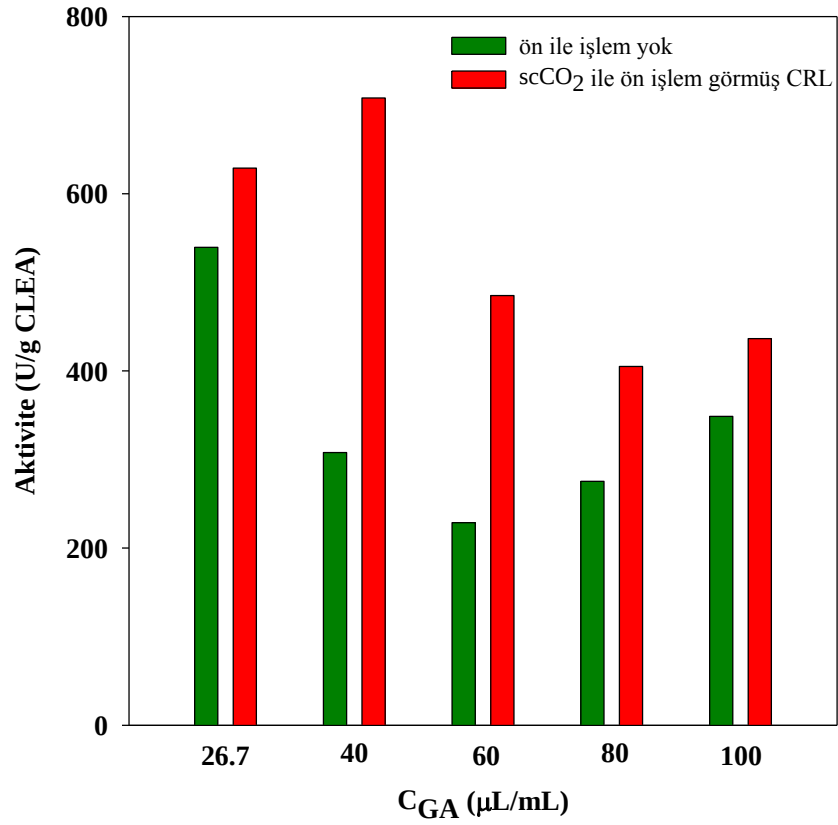


Şekil 3.11 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'larının katalitik aktivitesine gluteraldehit derişimi etkisi (C_{E0}=100 mg/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=700 mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)

Başlangıç enzim derişiminin 50 mg/mL' den 100 mg/mL' ye 2 kat arttırıldığı koşullarda CLEA formundaki biyokatalizörlerin katalitik aktivitesine gluteraldehit derişiminin etkisi Şekil 3.11'de gösterilmiştir. Çapraz bağlayıcı ajan derişiminin

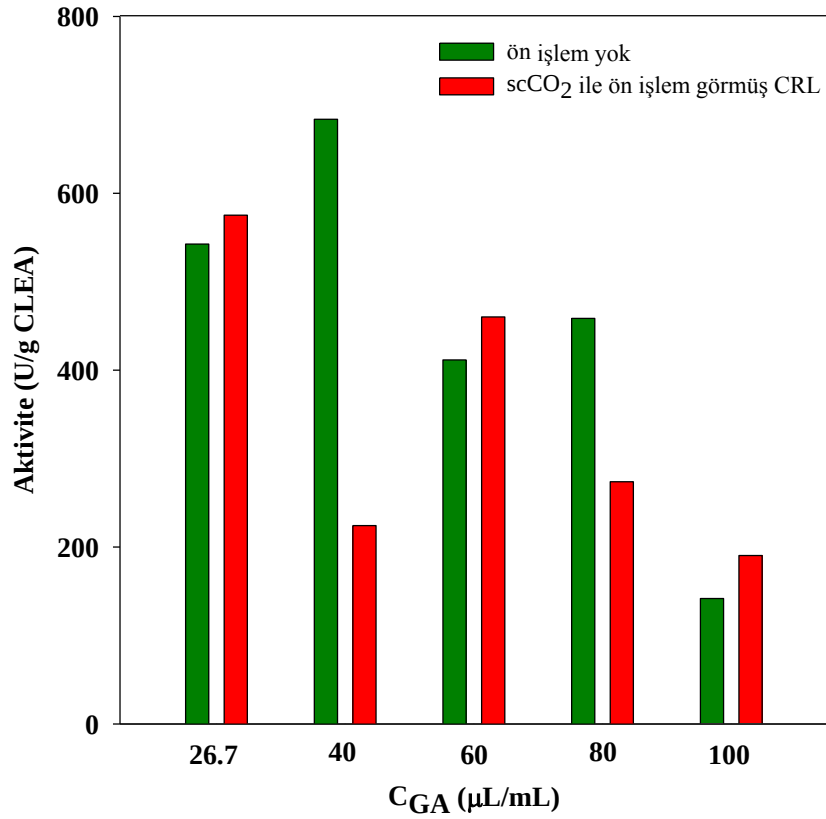
40 $\mu\text{L/mL}$ olduğu koşulların hem scCO_2 ile ön işlem görmüş hem de ön işlem görmemiş CRL enzimlerinden elde edilen taşıyıcısız enzim sistemlerinin katalitik aktivite değerlerinde bir minimuma ulaşılmış olmasına karşın tüm ön işlem görmüş CRL enzimlerinin CLEA formundaki aktivitelerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. En yüksek CLEA aktivitesine gluteraldehit derişiminin 26.7 $\mu\text{L/mL}$ olduğu koşullarda ulaşılmıştır. scCO_2 ile ön işlem görmüş ve görmemiş enzimlerden sentezlenen CLEA'lar için en yüksek katalitik aktivite değeri sırasıyla; 463.2 U/g CLEA ve 456.4 U/g CLEA olarak belirlenmiştir.

Başlangıç enzim derişiminin 150 mg/mL olduğu koşullarda CLEA formundaki enzim sistemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda scCO_2 ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimlerin kullanıldığı süreçlerde CLEA'ların katalitik aktivitesine gluteraldehit derişiminin etkisi şekil 3.12'de gösterilmiştir. Bu süreçte scCO_2 ortamında kullanılan CRL enzimlerinden yola çıkılarak sentezlenen CLEA aktivitelerinin ön işlem görmemiş CRL enzimlerinden yola çıkılarak sentezlenen CLEA aktivitelerinden daha yüksek olduğu görölmektedir. scCO_2 ile ön işlem gören CRL enzimlerinin kullanıldığı taşıyıcısız immobilizasyon sürecinde CLEA aktivitesi gluteraldehit derişiminin artması ile önce artmakta ve daha sonra azalmaktadır. En yüksek CLEA aktivitesi $C_{\text{GA}}=40$ $\mu\text{L/mL}$ koşullarında ulaşılmış ve aktivite değeri 708.1 U/g CLEA olarak saptanmıştır. Ön işlem görmemiş CRL enzimlerinden yararlanarak gerçekteştirilen CLEA çalışmalarında ise gluteraldehit derişimin 60 $\mu\text{L/mL}$ olduğu koşullarda minimum aktivite gözlenmiştir. Ön işlem görmemiş CRL enzimlerinin en yüksek CLEA aktivitesi 539.5 U/g CLEA olarak saptanmış ve bu aktivite değeri $C_{\text{GA}}= 26.7$ $\mu\text{L/mL}$ koşullarında elde edilmiştir.



Şekil 3.12 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'larının katalitik aktivitesine glutaraldehit derişimi etkisi ($C_{E0}=150$ mg/mL, $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$ mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)

Başlangıç enzim derişiminin 200 mg/mL olduğu koşullarda CLEA formundaki enzim sistemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimlerin kullanıldığı süreçlerde CLEA'ların katalitik aktivitesine glutaraldehit derişiminin etkisi Şekil 3.13'de gösterilmiştir. Yüksek enzim derişiminin kullanıldığı bu süreçte en yüksek CLEA aktivitesine glutaraldehit derişimin 40 $\mu\text{L/mL}$ olduğu koşullarda ön işlem görmemiş CRL enzimlerinin kullanıldığı taşıyıcısız enzim sistemlerinde ulaşılmıştır.



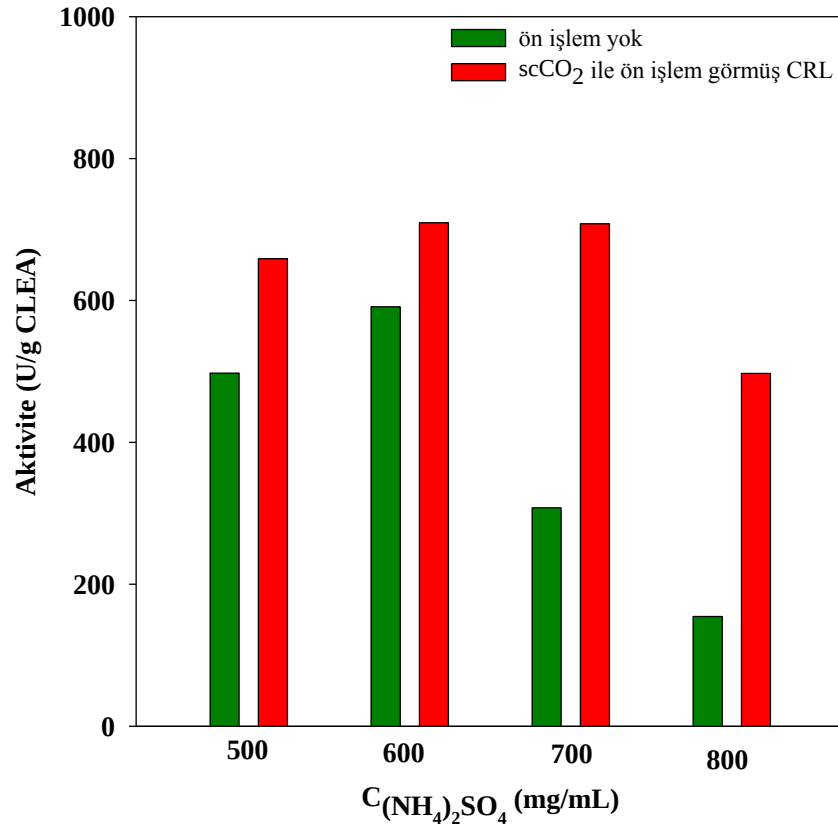
Şekil 3.13 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'larının katalitik aktivitesine gluteralehit derişimi etkisi ($C_{E0}=200$ mg/mL, $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$ mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)

3.3.1.3 Amonyum sülfat derişimi etkisi

Proteinlerin sulu çözeltilerinden, ayırma ya da saflaştırma süreçlerinde kullanılan en yaygın yöntemlerden biri de proteinlerde “salting in” “salting out” etkisi yaratabilen tuzların kullanılmasıyla, proteinlerin presipitasyonunun gerçekleştirilmesidir. Salting in etkisinde, düşük tuz derişimlerdeki tuzlar enzimin çözünürlüğünü artırır ve enzimlerin daha fazla çözünür duruma gelmesini sağlar. Salting out etkisinde ise; yüksek tuz derişimlerdeki tuzlar, enzimin çözünürlüğünü azaltarak, enzimleri çözünmez durumda birbirine yakınlştırarak enzim yüzeyindeki bağlı suyu çeker. Presipitasyon ajanı çözelti içerisindeki elektrostatik dengeyi etkileyerek moleküller arasındaki hidratlaşma

derecesini değiştirir ve iyonik kuvvetler yardımıyla enzimlerin birbirlerine yakınlaşmasını sağlar (Yu vd., 2006). Enzimler katalitik özellik gösterebilen protein yapısındaki biyomoleküllerdir. Enzimlerin presipitasyonu ile enzim molekleri arasındaki uzaklıkların azaltılması ve birbirlerine sulu sistemlerde enzim moleküllerinin znmesini engelleyecek uygun çapraz bağlayıcı ajanlar ile bağlanmasıyla CLEA formundaki taşıyıcısız immobilize enzim sistemleri geliştirilmiştir. Bu bağlamda, immobilize sistemlerin gelişmesi endüstriyel biyoreaktör sistemlerinde işletme koşullarına karşı dayanımı ve kararlılığı arttırılmış biyokatalizörlerin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır. Bu alışmada, CLEA şeklindeki enzim sistemlerinin geliştirilmesinde en uygun presipitasyon ajan olan amonyum sülfat seçilmiştir. scCO_2 ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimlerinden sentezlenen CLEA'ların katalitik aktivitelere presipitasyon ajan derişiminin etkisi; 40, 50 ve 60 $\mu\text{L/mL}$ gibi üç farklı glutraldehit derişiminde ve başlangıç enzim derişiminin 150 mg/mL olduğu koşullarda araştırılmıştır. Taşıyıcısız enzim immobilizasyonu çalışmalarında pH'ı 7.2 olan 0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ tampon ortamı kullanılmıştır.

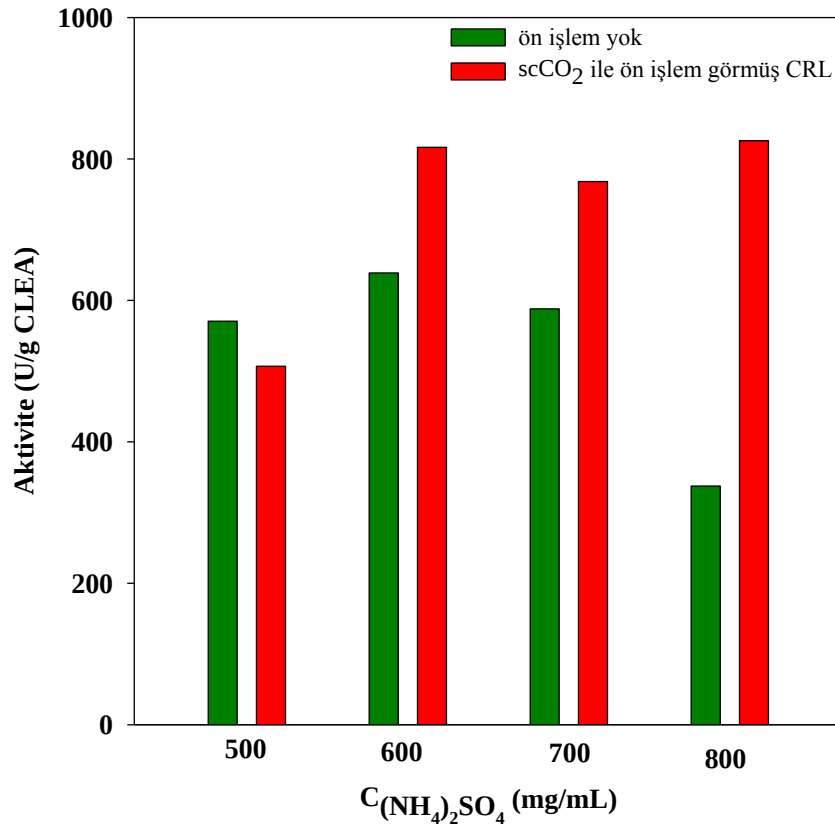
Glutraldehit derişiminin 40 $\mu\text{L/mL}$ ve başlangıç enzim derişiminin 150 mg/mL olduğu koşullarda gerçekleştirilen immobilizasyon çalışmalarında elde edilen CLEA'ların katalitik aktivitelere amonyum sülfat derişiminin etkisi şekil 3.14'de gösterilmiştir. Amonyum sülfat derişiminin artması ile hem scCO_2 ortamında ön işlem görmüş hem de ön işlem görmemiş CRL enzimlerinin kullanıldığı immobilizasyon sürecinde CLEA aktiviteleri amonyum sülfat derişiminin artması ile önce artmakta daha sonra azalmaktadır. Düşük glutraldehit derişiminde scCO_2 ile ön işlem görmüş enzimlerin yer aldığı immobilizasyon sürecinde sentezlenen CLEA'ların katalitik aktivitelerinin tüm amonyum sülfat derişim aralığında daha yüksek aktivite gösterdiği saptanmıştır. Belirtilen koşullarda en yüksek katalitik aktivite değeri 600 mg/mL amonyum sülfat derişiminde scCO_2 ile ön işlem görmüş CLEA'larında ulaşılmış ve aktivite 709.6 U/g CLEA olarak belirlenmiştir. n işlem görmemiş CRL enzimlerinden sentezlenen CLEA aktiviteleri ise 591.1 U/g CLEA olarak saptanmıştır.



Şekil 3.14 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'nın enzim aktivitesine amonyum sülfat derişimi etkisi ($C_{GA}=40 \mu\text{L/mL}$, $C_{E0}=150 \text{ mg/mL}$, $\text{pH}=7.2$ 0.1 M fosfat tamponu)

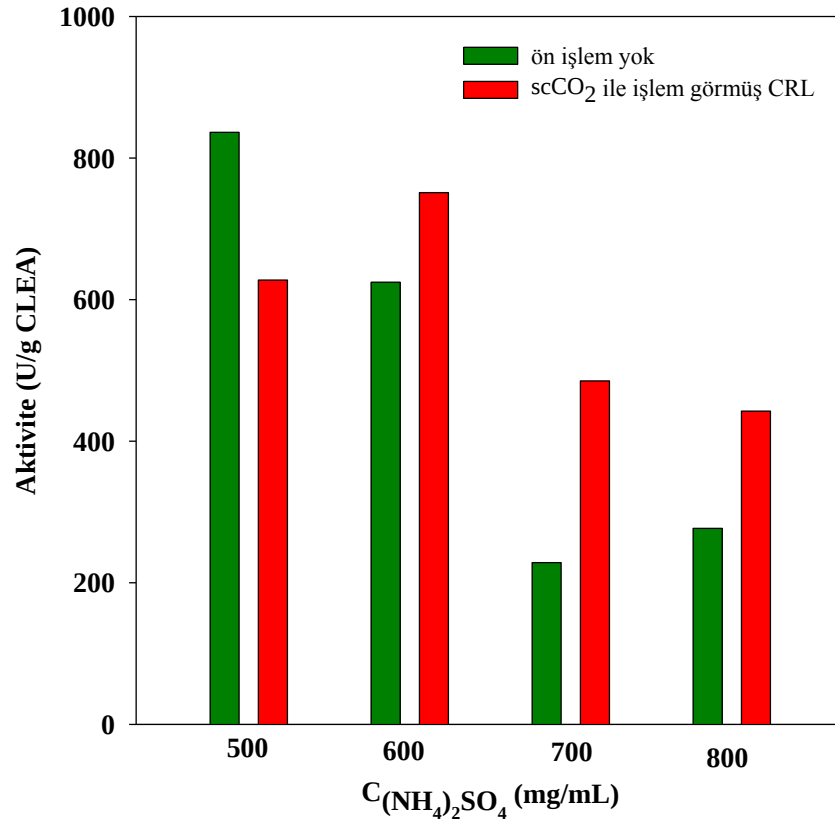
Gluteraldehit derişiminin $50 \mu\text{L/mL}$ ve başlangıç enzim derişiminin 150 mg/mL olduğu koşullarda gerçekleştirilen immobilizasyon çalışmalarında elde edilen CLEA'ların katalitik aktivitelerine amonyum sülfat derişiminin etkisi Şekil 3.15'de gösterilmiştir. Amonyum sülfat derişiminin artması ile scCO₂ ortamında ön işlem görmemiş CRL enzimlerinin kullanıldığı immobilizasyon sürecinden oluşturulan CLEA aktiviteleri önce artmakta daha sonra azalmaktadır. Ancak scCO₂ ile ön işlem görmüş CRL enziminden sentezlenen CLEA aktiviteleri gluteraldehit derişiminin artması ile önce artmakta, 600 mg/mL ve üzerindeki amonyum sülfat derişimlerinde hemen hemen önemli bir değişim göstermemektedir. Amonyum sülfat derişim aralığının $600\text{-}800 \text{ mg}$ olduğu koşullarda

scCO₂ ortamında ön işlem görmüş enzimlerden elde edilen CLEA aktivitelerinin ortalama değeri 803 U/g CLEA'dır. 50 µL/mL gluteraldehit derişiminde gerçekleştirilen CLEA formundaki biyokatalizörün en yüksek katalitik aktivitesine ön işlem gören CRL enzimlerinde ve $C_{(NH_4)_2SO_4}=800$ mg/mL koşullarında elde edilmiş ve aktivite 825.7 U/g CLEA olarak saptanmıştır.



Şekil 3.15 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'nın enzim aktivitesine amonyum sülfat derişimi etkisi ($C_{GA}=50$ µL/mL, $C_{E0}=150$ mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)

Gluteraldehit derişiminin 60 µL/mL ve başlangıç enzim derişiminin 150 mg/mL olduğu koşullarda gerçekleştirilen immobilizasyon çalışmalarında elde edilen CLEA'ların katalitik aktivitelerine amonyum sülfat derişiminin etkisi Şekil 3.16'da gösterilmiştir.



Şekil 3.16 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'nın enzim aktivitesine amonyum sülfat derişimi etkisi ($C_{GA}=60 \mu\text{L/mL}$, $C_{E0}=150 \text{ mg/mL}$, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)

Yüksek çapraz bağlayıcı ajan derişiminde gerçekleştirilen CLEA sentezlerinde 600 mg/mL üzerindeki amonyum sülfat derişiminin katalitik aktivite üzerine olumsuz etki yaptığı görülmektedir. Yüksek gluteraldehit ve amonyum sülfat derişiminde salting out etkisi arttığından CRL enziminin aktif konumları aşırı çapraz bağlanma nedeniyle aktiviteyi azaltmaktadır. Genel olarak salting out etkisinin scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile oluşturulan CLEA'nın enzim aktivitesine etkisini incelediğimizde olumsuz etkilerin scCO₂ ile işlem görmemiş CRL enzimlerden hazırlanan CLEA'ların aktivitesine etkisinin daha fazla olduğu görülmektedir. Ancak bu etki, scCO₂ ile işlem görmüş CRL enzimlerden hazırlanan CLEA'ların aktivitesine oranla

çok daha fazladır. 500 mg/ml amonyum sülfat derişiminde scCO₂ ile ön işlem görmemiş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA'larda maksimum aktivite değerine ulaşılmıştır. Belirtilen koşullar için CLEA aktivitesi 836.4 U/g CLEA olduğu saptanmıştır. 600 mg/mL amonyum sülfat derişiminde ise scCO₂ ile ön işlem görmüş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA'larda en yüksek aktivite değerine ulaşılmış ve aktivite değeri 751.2 U/g CLEA olarak belirlenmiştir.

3.3.1.4 Proteik feeder ajan derişimi etkisi

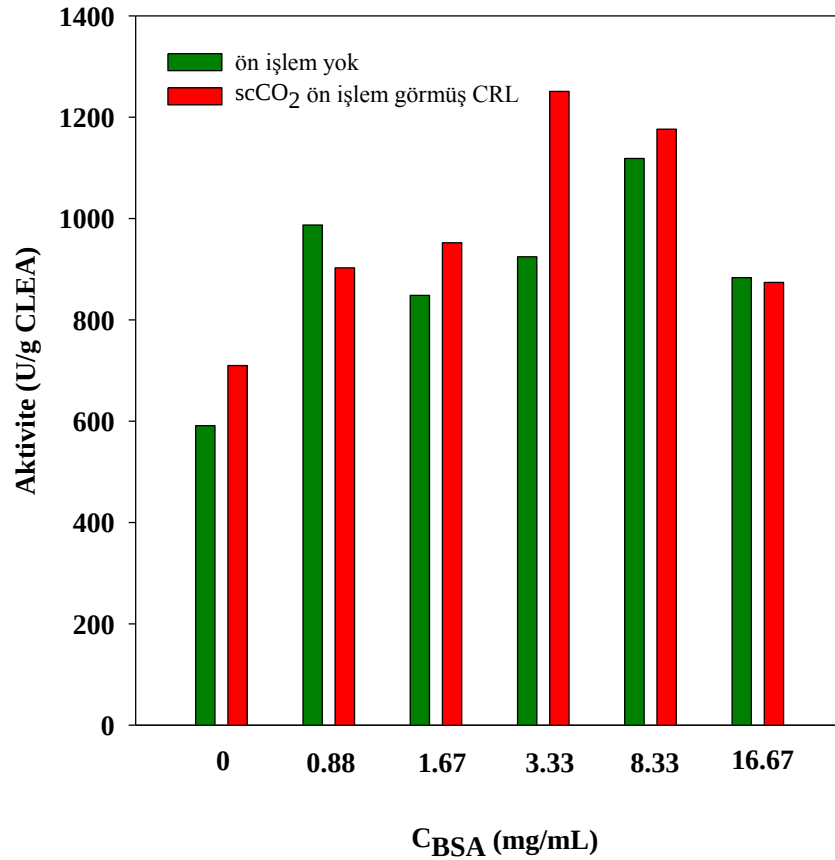
Çapraz bağlı enzim agregatları biçiminde gerçekleştirilen taşıyıcısız enzim immobilizasyon süreçlerinde kullanılan enzimlerin yüksek saflıkta olması gereksimi bulunmamaktadır. Bu özellik CLEA'lar biçimindeki taşıyıcısız enzim immobilizasyon süreçlerinin temel avantajlarından biridir. Ticari olarak satılan birçok lipaz enzimi de üretim ortamından gelen safsızlıklar nedeniyle birim kütlesinde düşük miktarda katalitik özellik gösteren proteine yani lipaz enzimine sahiptir. Bu nedenle ortama fazladan katalitik özellik göstermeyen BSA gibi proteinlerin katılması, CLEA biçiminde hazırlanan biyokatalizör sistemlerinin katalitik performanslarına önemli katkılar sağladığı bildirilmektedir. Aynı zamanda proteinlerin yapı taşıını oluşturan aminoasitlerin de CLEA biçiminde hazırlanan biyokatalizör sistemlerinin katalitik performanslarına önemli katkılar sağlamaktadır (Aytar ve Bakır, 2008). Bu çalışmada da proteik feeder ajan olarak BSA ve lizin kullanılmıştır. Belirtilen proteik feeder ajanların oluşturulan CLEA aktivitelerine etkisi aşağıda tartışılmıştır.

3.3.1.4.1 Bovin serum albümin derişimi etkisi

scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine proteik feeder ajan BSA derişiminin etkisi; C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, ve C_{E0}=150 mg/mL, C_{GA}= 40, 50 ve 60 µL/mL için

0-16.67 mg/mL BSA derişimi (C_{BSA}) aralığında incelenmiştir. Taşıyıcısız enzim immobilizasyonu çalışmalarında pH'ı 7.2 olan 0.1 M Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 tampon ortamı kullanılmıştır.

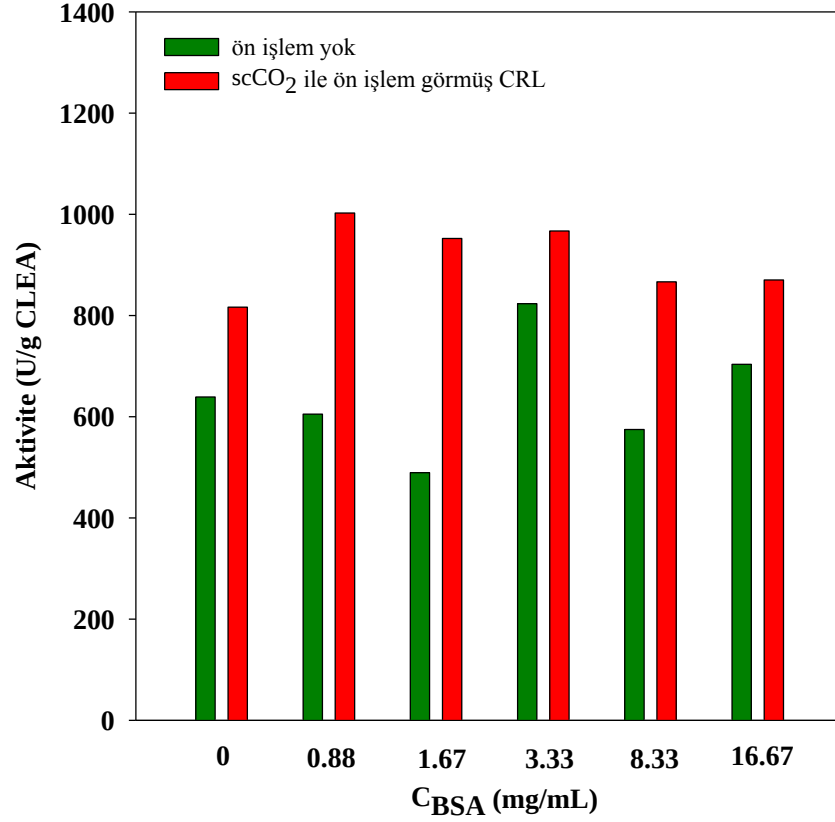
Gluteraldehit derişiminin 40 μ L/mL olduğu koşullarda, $scCO_2$ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine proteik feeder ajan BSA derişiminin etkisi şekil 3.17'de gösterilmiştir.



şekil 3.17 $scCO_2$ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine proteik feeder ajan bovin serum albümin derişiminin etkisi (C_{GA} =40 μ L/mL, C_{E0} =150 mg/mL, $C_{(NH_4)_2SO_4}$ =600 mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)

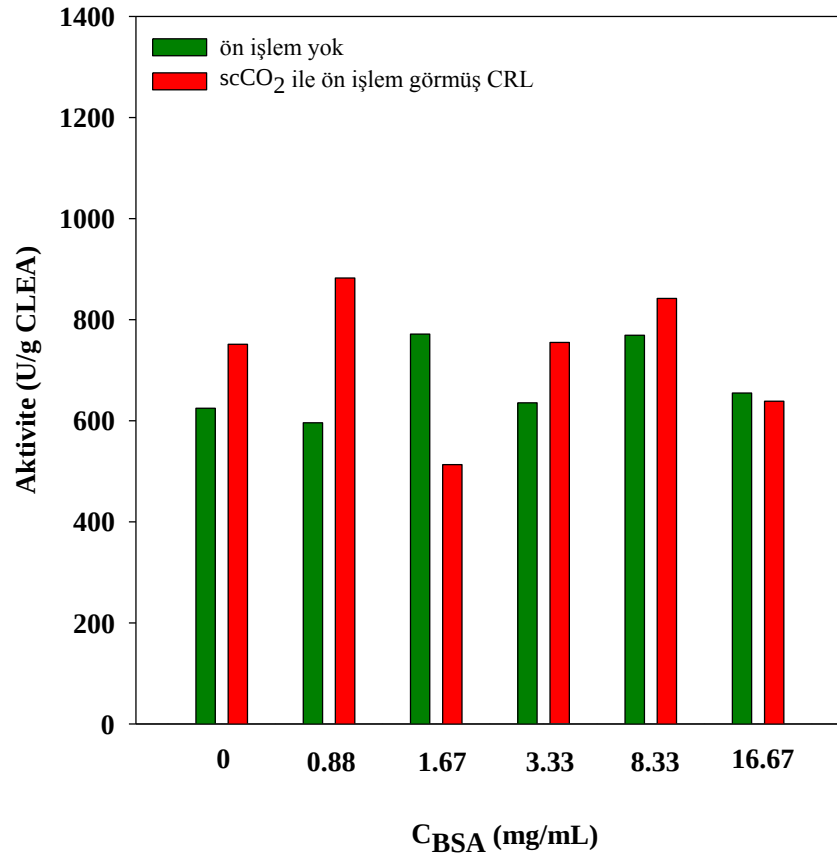
BSA varlığında gerçekleştirilen immobilizasyon sürecinde hazırlanan CLEA aktivitelerinin, incelenen tüm BSA derişim değerlerinde arttığı görülmektedir. CLEA aktivitelerindeki en büyük artış $C_{BSA} = 3.33$ mg/mL derişiminde elde edilmiştir. Bu koşullarda ön işlem görmemiş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA'ların katalitik aktivite değeri, 924.4 U/g CLEA olmasına karşın enzimlerin scCO₂ ortamında ön işlem görmesi sonucu aktivitenin %35 artarak 1250.8 U/g CLEA değerine ulaştığı saptanmıştır. Proteik feeder katkısı olmadan aynı koşullarda elde edilen CLEA aktiviteleri dikkate alındığında, ön işlem görmemiş CLEA aktivitesindeki artış, yaklaşık %56 iken scCO₂ ortamında ön işlem CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA aktivitelerinde ise yaklaşık %76 olarak gerçekleşmiştir. Ön işlem görmemiş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA'larda elde edilen en yüksek aktivite değeri ise $C_{BSA} = 8.33$ mg/mL derişiminde 1118.4 U/gCLEA olarak elde edilmiştir.

Gluteraldehit derişiminin 50 µL/mL olduğu koşullarda, scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine proteik feeder ajan BSA derişiminin etkisi Şekil 3.18'de gösterilmiştir. Bu koşullarda scCO₂ ortamında ön işlem gören CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA'ların katalitik aktiviteleri dikkate alındığında, hem ön işlem görmemiş enzimlerden yola çıkılarak elde edilen biyokatalizör sistemlerinin aktivitelerinin, hem de proteik feeder ajan katkısının olmadığı immobilizasyon sürecinde elde edilen aktivite değerine kıyasla, tüm BSA derişim değerlerinde elde edilen CLEA aktivitelerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. En yüksek CLEA aktivitesi, $C_{BSA} = 0.88$ mg/mL derişiminde ön işlem görmüş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA'larda elde edilmiş ve aktivite değeri 1002.5 U/g CLEA olarak belirlenmiştir. Ön işlem görmüş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA aktivitelerinin BSA derişiminin artması ile önce arttığı ve daha sonra azaldığı görülmektedir. Ancak ön işlem görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların aktiviteleri ile BSA derişimi arasında belirgin bir değişim gözlenmemektedir. Ön işlem görmemiş enzimlerden hazırlanan CLEA'larda ise en yüksek aktive değeri $C_{BSA} = 3.33$ mg/mL koşullarında 823.3 U/g CLEA olarak saptanmıştır.



Şekil 3.18 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine proteik feeder ajan bovin serum albümin derişiminin etkisi (C_{GA}=50 µL/mL, C_{E0}=150 mg/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)

Gluteraldehit derişiminin 60 µL/mL olduğu koşullarda scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine proteik feeder ajan BSA derişiminin etkisi Şekil 3.19'de gösterilmiştir.

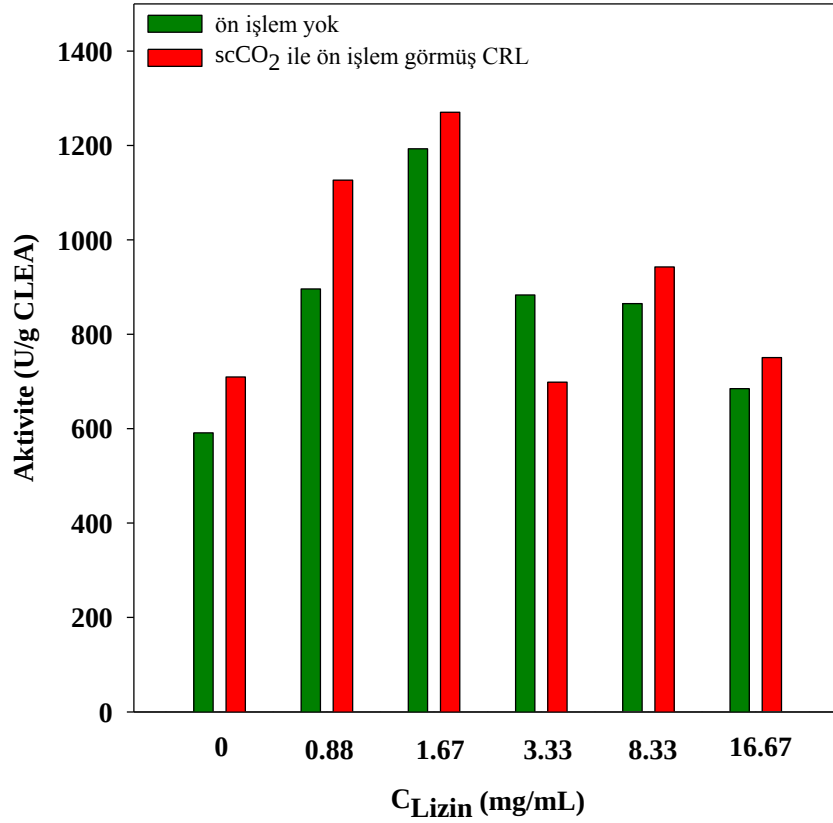


Şekil 3.19 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine proteik feeder ajan bovin serum albümin derişiminin etkisi (C_{GA}=60 µL/mL, C_{E0}=150 mg/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)

Yüksek gluteraldehit derişimlerinde gerçekleştirilen immobilizasyon çalışmalarında proteik feeder ajan BSA'nın enzim aktivitesine etkisinin C_{GA}=40 ve 50 mg/mL derişimlerinde daha düşük olduğu görülmektedir. En yüksek katalitik aktivite değerine C_{BSA}=0.88 mg/mL koşullarında scCO₂ ortamında ön işlem görmüş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA'larda saptanmış ve aktivite değeri 882.3 U/g CLEA olarak ölçülmüştür.

3.3.1.4.2 Lizin derişimi etkisi

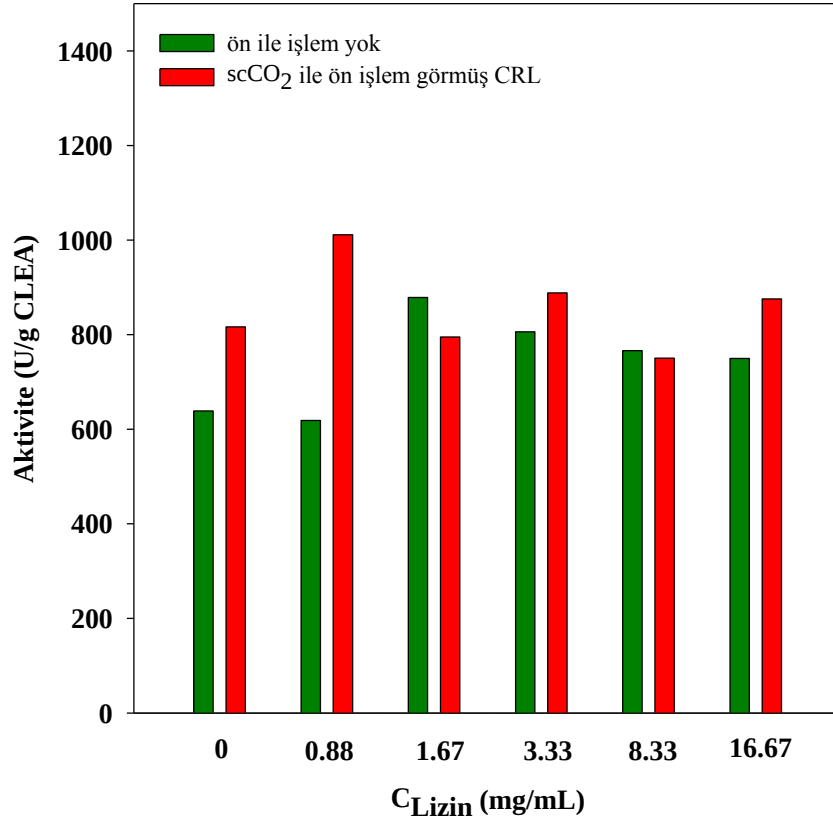
scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine proteik feeder ajan lizin derişiminin etkisi; C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, ve C_{E₀}=150 mg/mL, C_{GA}=40, 50 ve 60 µL/mL için 0-16.67 mg/mL amino asit lizin derişimi (C_{Lizin}) aralığında incelenmiştir. Taşıyıcısız enzim immobilizasyonu çalışmalarında pH'ı 7.2 olan 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ tampon ortamı kullanılmıştır.



Şekil 3.20 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine proteik feeder ajan lizin derişiminin etkisi (C_{GA}=40 µL/mL, C_{E₀}=150 mg/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)

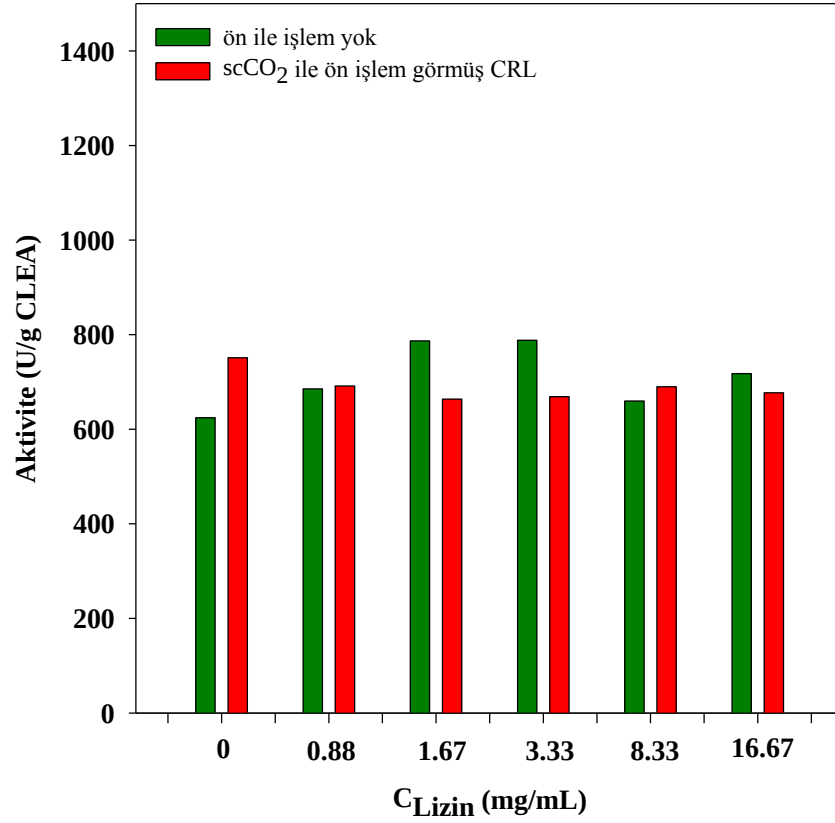
Gluteraldehit derişiminin 40 µL/mL olduğu koşullarda, scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine proteik feeder ajan lizin derişiminin etkisi Şekil 3.20'de gösterilmiştir. Hem ön işlem görmüş hem de ön işlem görmemiş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA aktiviteleri, lizin derişiminin artması ile önce artmakta daha sonra azalmaktadır. Lizin varlığında gerçekleştirilen immobilizasyon sürecinde hazırlanan CLEA aktivitelerinin, incelenen tüm BSA derişim değerlerinde arttığı saptanmıştır. En yüksek CLEA aktivitelerine C_{Lizin}= 1.67 mg/mL derişiminde elde edilmiştir. Bu koşullarda ön işlem görmemiş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA'ların katalitik aktivite değeri 1192.8 U/g CLEA olmasına koşun enzimlerin scCO₂ ortamında ön işlem görmüş CLEA aktiviteleri 1270.2 U/g CLEA'dır. Proteik feeder katkısı olmadan aynı koşullarda elde edilen CLEA aktiviteleri dikkate alındığında ön işlem görmemiş CLEA aktivitesindeki artış yaklaşık %102 iken, scCO₂ ortamında ön işlem CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA aktivitelerinde ise yaklaşık %79 olarak gerçekteşmiştir.

Çapraz bağlayıcı ajan derişiminin 50 ve 60 µL/mL olduğu koşullarda lizin derişiminin scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine etkisi sırasıyla Şekil 3.21 ve Şekil 3.22'de gösterilmiştir. Gluteraldehit derişiminin 40 µL/mL olduğu koşullardaki tüm proteik feeder ajan derişimlerinde elde edilen CLEA aktivite değerlerinin, C_{GA}=40 µL/mL ve C_{Lizin}=1.67 mg/mL koşullarında elde edilen en yüksek aktivite değerlerinin altında kalmıştır.



Şekil 3.21 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine proteik feeder ajan lizin derişiminin etkisi (C_{GA}=50 µL/mL, C_{E0}=150 mg/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)

scCO₂ ortamında ön işlem görmüş CRL enzimleri ile lizin varlığında hazırlanan CLEA'ların en yüksek aktivite değerleri C_{GA}=50 ve 60 µL/mL derişimlerinde lizin derişiminin 0.88 mg/mL olduğu koşullarda ulaşılmış ve katalitik aktivite sırasıyla; 1011.1 U/g CLEA ve 691.5 U/g CLEA olarak saptanmıştır. scCO₂ ortamında ön işlem görmemiş CRL enzimleri ile lizin varlığında hazırlanan CLEA'ların en yüksek aktivite değerleri C_{GA}=50 µL/mL derişiminde lizin derişiminin 1.67 mg/mL ve C_{GA}=50 µL/mL derişiminde ise lizin derişiminin 3.33 mg/mL koşullarda ulaşılmıştır. Bu koşullardaki aktivite değerleri sırasıyla 878.8 U/g CLEA ve 788.2 U/g CLEA olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.22 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine proteik feeder ajan lizin derişiminin etkisi ($C_{GA}=60$ µL/mL, $C_{E0}=150$ mg/mL, $C_{(NH_4)_2SO_4}=600$ mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)

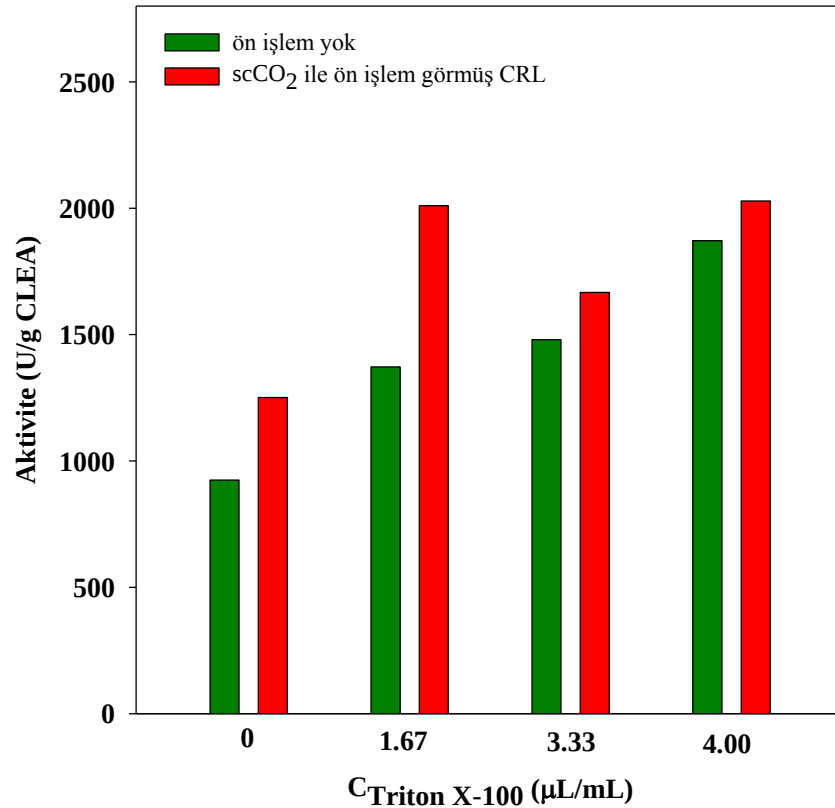
3.3.1.5 Yüzey aktif madde Triton X-100 derişimi etkisi

CLEA formundaki taşıyıcısız enzim immobilizasyon süreçlerinde başlangıç enzim derişimi, bifonksiyonel çapraz bağlayıcı derişimi, presipitasyon ajan derişimi ve proteik feeder ajan türü ve derişimini etkisi Bölüm 3.2.1.1-3.2.1.4'de sistematik biçimde incelenmiştir. Bu bölümde ise 10 MPa ve 40 °C koşullarındaki scCO₂ ortamında ön işlem görmüş CRL enzimlerinden yola çıkılarak elde edilen en yüksek katalitik aktivite değerlerini sağlayan koşullarda yüzey aktif madde Triton X-100 derişiminin CLEA

aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. 1/10 (v/v) oranında deiyonize su içinde seyreltilen Triton X-100 çözeltisinden immobilizasyon ortamındaki derişimi 1.67, 3.33 ve 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ olacak biçimde üç farklı Triton X-100 derişiminin ($C_{\text{TritonX100}}$) CLEA aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Belirtilen derişimlerdeki yüzey aktif maddesi pH=7.2'ı 0.1 M olan fosfat tampon ortamında çözünmüş serbest enzim çözeltisi içerisine immobilizasyon süreci öncesi eklenmiştir. Immobilizasyon sürecinde yüzey aktif maddesinin temel fonksiyonu; serbest halde bulunan enzimlerin katalitik açıdan önem taşıyan aktif konumlarının ve enzimin katalitik açıdan inert yapısını oluşturan aminoasit gruplarının yüzey aktif madde Triton X-100 ile çevrelenmesini sağlamaktır. Böylece, taşıyıcısız immobilizasyon sürecinde kullanılan bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajan gluteraldehitin bu konumlar üzerinden aşırı bağlanması önlenerek katalitik açıdan daha yüksek aktivite gösterebilen CLEA tasarımı hedeflenmektedir. Bu bağlamda, proteik feeder ajan BSA'nın $C_{\text{BSA}}=3.33 \text{ mg}/\text{mL}$ ve proteik feeder ajan lizinin $C_{\text{Lizin}}=1.67 \text{ mg}/\text{mL}$ derişimlerinde 1.67-4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ aralığında Triton X-100 derişiminin CLEA aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Başlangıç enzim derişimi, amonyum sülfat derişimi ve gluteraldehit derişimleri sırasıyla; 150 mg/mL, 600 mg/mL ve 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 'dir.

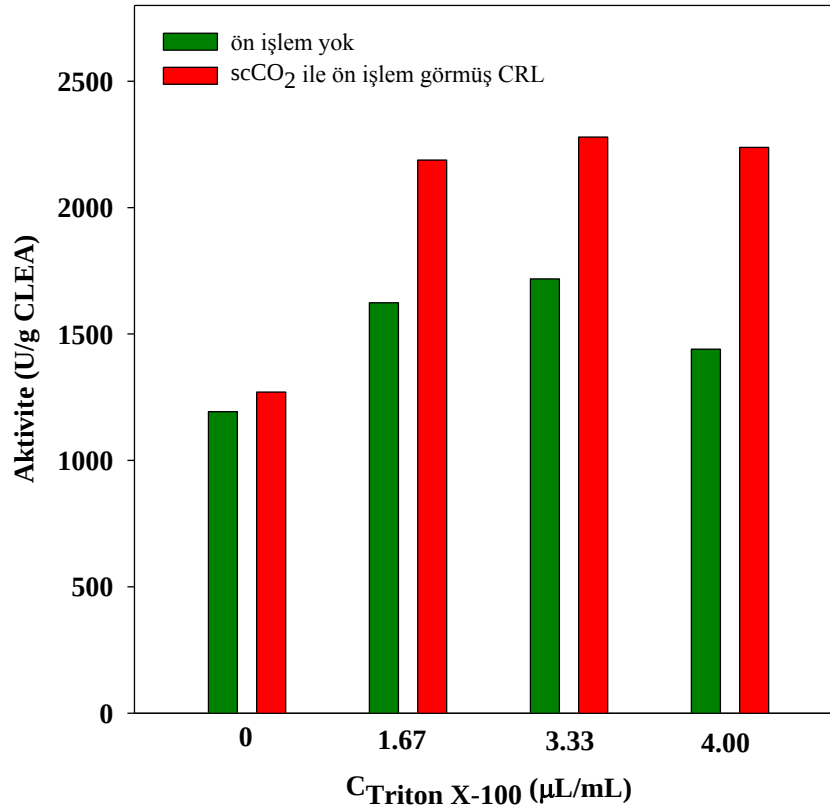
3.33 mg/mL derişiminde BSA'nın katkı maddesi olarak kullanıldığı koşullarda scCO_2 ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine Triton X-100 derişiminin etkisi Şekil 3.23'de gösterilmiştir. Immobilizasyon öncesi tampon ortamında çözünmüş ve serbest haldeki enzim moleküllerinin Triton X-100 ile işlem görmesi sonucu hem scCO_2 ortamında ön işlem görmüş hem de ön işlem görmemiş CRL enzimlerden hazırlanan CLEA'ların katalitik aktivitelerinde önemli artışlar sağlanmıştır. Ön işlem görmemiş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA aktiviteleri Triton X-100 derişiminin artması ile artmaktadır. Belirtilen koşullarda, yüzey aktif maddesinin kullanılmadığı durumda CLEA aktivitesi 924.4 U/g CLEA iken gluteraldehit ile çapraz bağlama işlemi uygulanmadan önce serbest enzim moleküllerinin 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ derişiminde Triton X-100 ile işlem görmesi ile oluşturulan CLEA aktivitesi yaklaşık %103 artarak 1871.5 U/g CLEA değerine ulaşmıştır. scCO_2 ortamında ön işlem görmemiş katı CRL enzimlerinden hazırlanan

CLEA aktivitesi 1250.8 U/g CLEA iken çapraz bağlama işlemi öncesi enzim moleküllerinin 1.67-4 µL/mg derişim aralığında Triton X-100 ile işlem görmesi sonucu CLEA aktivitelerinde Triton X-100 derişimine bağı olarak yaklaşık olarak %33-62 arasında artışlar saptanmıştır. Triton X-100 ile işlem görmesi ile oluşturulan CLEA aktivitesi yaklaşık %103 artarak 1871.5 U/g CLEA değerine ulaşmıştır. 3.33 mg/mL derişiminde BSA'nın katkı maddesi olarak kullanıldığı koşullarda scCO₂ ortamında ön işlem görmüş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA'ların en yüksek katalitik aktivitesi 4 µL/mg derişiminde Triton X-100 kullanıldığı durumda ulaşılmış ve aktivite değeri 2028.8 U/g CLEA olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.23 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine yüzey aktif maddesi Triton X-100 derişiminin etkisi (C_{E0}=150 mg/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, C_{GA}=40 µL/mL, C_{BSA}=3.33 mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)

1.67 mg/mL derişiminde lizinin katkı maddesi olarak kullanıldığı koşullarda, scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine Triton X-100 derişiminin etkisi Şekil 3.24'de gösterilmiştir. İmmobilizasyon öncesi tampon ortamında çözünmüş ve serbest haldeki enzim moleküllerinin Triton X-100 ile işlem görmesi sonucu hem scCO₂ ortamında ön işlem görmüş hem de ön işlem görmemiş CRL enzimlerden hazırlanan CLEA'ların katalitik aktiviteleri Triton X-100 derişiminin artmasıyla önce artmakta daha sonra azalmaktadır. Hem scCO₂ ortamında ön işlem görmüş hem de ön işlem görmemiş CRL enzimlerden hazırlanan CLEA'ların en yüksek katalitik aktiviteleri Triton X-100 derişimimim 3.33 4 µL/mL olduğu koşullarda elde edilmiştir.



Şekil 3.24 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine yüzey aktif maddesi Triton X-100 derişiminin etkisi (C_{E0}=150 mg/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, C_{GA}=40 µL/mL, C_{Lizin}=1.67 mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu)

Belirtilen koşullarda, yüzey aktif maddesi Triton X-100'ün kullanılmadığı durumda CLEA aktiviteleri scCO₂ ile ön işlem görmemiş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA için 1192.8 U/g CLEA iken scCO₂ ile ön işlem görmüş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA için 1270.2 U/g CLEA' dır. Ancak 3.33 µL/mg derişiminde Triton X-100 ile işlem gören serbest CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA aktiviteleri; scCO₂ ile ön işlem görmemiş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA aktivitesi yaklaşık %44 artarak 1718.2 U/g CLEA'ye ve scCO₂ ile ön işlem gören CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA aktivitesi ise yaklaşık %76 artarak 2278.9 U/g CLEA'ye ulaşmaktadır. 1.67 mg/mL derişiminde lizinin katkı maddesi olarak kullanıldığı süreçte Triton X-100 ile çapraz bağlama öncesi sulu çözeltiğinde serbest formda bulunan scCO₂ ortamında ön işlem görmüş enzimlerden hazırlanan CLEA'ların katalitik aktiviteleri bu araştırmada incelenen tüm Triton X-100 derişim aralığında oldukça yüksek katalitik performans göstermekte ve CLEA aktiviteleri 2188.1 – 2278.9 U/g CLEA arasında değişmektedir.

3.3.2 *Candida antarctica* lipaz B enzimi

Taşıyıcısız enzim immobilizasyon sürecinde 10 MPa ve 40 °C koşullarında scCO₂ ortamında ön işlem görmüş CRL enzimleri ve ön işlem görmemiş CRL enzimi ile oluşturulan CLEA'larının immobilizasyon sürecinde oluşturulan biyokatalizör sistemlerinin katalitik aktivitelerine;

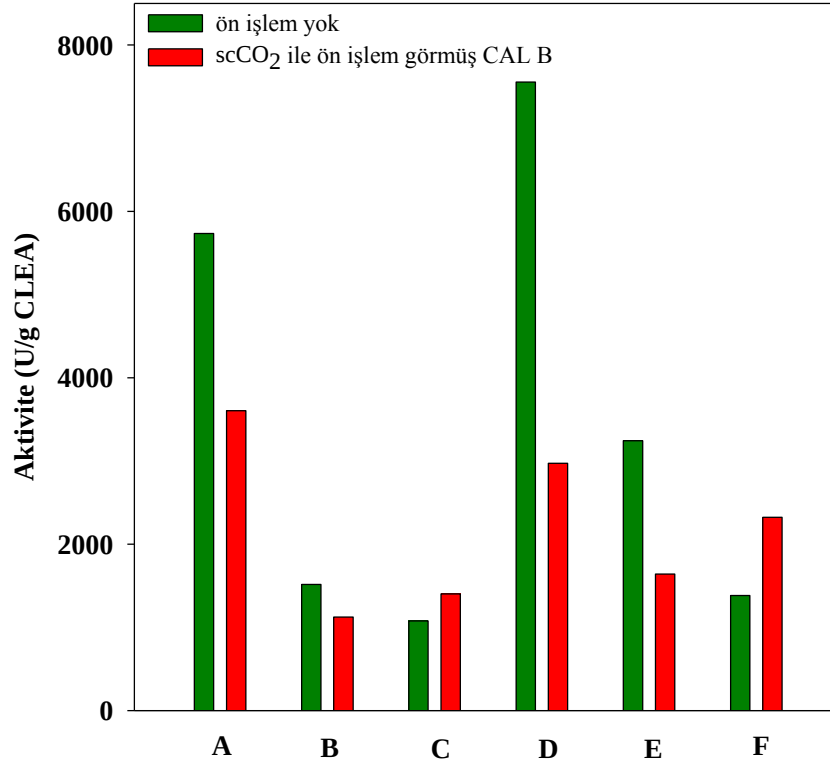
- i. Başlangıç enzim derişimi
- ii. Gluteraldehit derişim
- iii. Amonyum sülfat derişimi
- iv. Proteik feeder ajan türü ver derişimi
- v. Yüzey aktif maddesi Triton-X100 derişimi

gibi ortam bileşimi ve derişimi sistematik biçimde araştırılmıştır. CALB enziminin yüksek birim fiyatı ve proje bütçesindeki darboğazlar nedeniyle Bölüm 3.2.1'de CRL enzimi için belirlenen en uygun ortam bileşimi ve derişimindeki koşullar kullanılmıştır.

Bu koşullarda 10 MPa ve 40 °C’de scCO₂ ortamında ön işlem görmüş CALB enzimleri ve ön işlem görmemiş CALB enzimi ile oluşturulan CLEA’larının immobilizasyon sürecinde oluşturulan biyokatalizör sistemlerin aktivitelerindeki değişimler şekil 3.25’de gösterilmiştir.

pH=7.2 olan 0.1 M fosfat tamponunda 10 MPa ve 40 °C’de scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CALB enzimlerinin başlangıç enzim derişiminin 150 mg/mL, amonyum sülfat derişiminde 600 mg/mL ve glutraldehit derişiminin 40  L/mL olduğu koşullarda gerçekleştirilen taşıyıcısız immobilizasyon sürecinde ön işlem görmemiş CLEA aktivitelerinin daha yüksek olduğu g r lmektedir (şekil 3.25 A). scCO₂ ortamında ön işlem görmemiş ve görmüş CALB enzimlerinin katalitik aktiviteleri sırasıyla; 5734 U/g CLEA ve 3604.6 U/g CLEA olarak saptanmıştır.

Proteik feeder ajan türünün aktivite üzerine etkisi incelendiğinde ise BSA derişimin 3.33 mg/mL olduğu koşullarda hem scCO₂ ortamında ön işlem görmemiş hem de görmüş CALB enzimlerinin katalitik aktivitelerinde oldukça yüksek düşüşler gerçekleşmiştir (şekil 3.25 B). scCO₂ ortamında ön işlem görmemiş ve görmüş CALB enzimlerinin katalitik aktiviteleri sırasıyla; 1515.0 U/g CLEA ve 1123.7 U/g CLEA olarak saptanmıştır. Benzer değişimler proteik feeder ajan lizin derişimin 1.67 mg/mL olduğu koşullarda hem scCO₂ ortamında ön işlem görmemiş hem de görmüş CALB enzimlerinin katalitik aktivitelerinde gerçeklemiştir (şekil 3.25 C). Bu koşullarda scCO₂ ortamında ön işlem görmemiş ve görmüş CALB enzimlerinin katalitik aktiviteleri sırasıyla; 1076.6 U/g CLEA ve 1402.5 U/g CLEA olarak saptanmıştır. CALB enzimleri için başlangıç enzim derişiminin 150 mg/mL, amonyum sülfat derişiminde 600 mg/mL ve glutraldehit derişiminin 40  L/mL olduğu koşullarda hazırlanan CLEA’larının katalitik aktivitelerine proteik feeder ajan türü ve derişiminin C_{BSA}=3.33 mg/mL ve C_{Lizin}=1.67 mg/mL olduğu koşulların immobilizasyon sürecindeki katalitik açıdan aktif konumlarının korunamadığı g r lmektedir.



Şekil 3.25 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CALB enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların enzim aktivitesine ortam bileşimleri etkisi

- A) C_{E0}=150 mg/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, C_{GA}=40 µL/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu
- B) C_{E0}=150 mg/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, C_{GA}=40 µL/mL, C_{BSA}=3.33 mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu
- C) C_{E0}=150 mg/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, C_{GA}=40 µL/mL, C_{Lizin}=1.67 mg/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu
- D) C_{E0}=150 mg/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, C_{GA}=40 µL/mL, C_{Trito X100}=1.67 µL/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu
- E) C_{E0}=150 mg/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, C_{GA}=40 µL/mL, C_{BSA}=3.33 mg/mL, C_{Triton X100}=4 µL/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu
- F) C_{E0}=150 mg/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, C_{GA}=40 µL/mL, C_{Lizin}=1.67 mg/mL, C_{Triton X100}=3.33 µL/mL, pH=7.2 0.1 M fosfat tamponu

Yüzey aktif maddesi Triton X-100'ün CALB enziminden yola çıkılarak hazırlanan CLEA'ların katalitik aktivitesine etkisi, proteik feeder ajanın hem BSA (Şekil 3.25 D) hem de lizin (Şekil 3.235 F) varlığında ve proteik feeder ajanın bulunmadığı durumda; başlangıç enzim derişiminin 150 mg/mL, amonyum sülfat derişimi 600 mg/mL ve gluteraldehit derişiminin 40 µL/mL olduğu koşullarda (Şekil 3.25 D) incelenmiştir. İmmobilizasyon ortamına proteik feeder ajan katkısının olmadığı durumda immobilizasyon sürecinde çapraz bağlama öncesi serbest enzim moleküllerinin Triton X-100 ile ön işlem görmesi scCO₂ ile ön işlem görmemiş CALB enzimlerinden hazırlanan CLEA aktivitelerinin arttırmasına karşın scCO₂ ile ön işlem görmüş CALB enzimlerinden hazırlanan CLEA aktivitelerini azaltmıştır. Bu çalışmada CALB enzimlerinden hazırlanan en yüksek CLEA aktivitesi scCO₂ ortamında ön işlem görmemiş CALB enzimlerinin; C_{E0}=150 mg/mL, C_{(NH₄)₂SO₄}=600 mg/mL, C_{GA}=40 µL/mL, ve C_{Triton X100}=1.67 µL/mL koşullarında hazırlanan CLEA'larında elde edilmiş ve biyokatalizör aktivitesi 7555 U/g CLEA olarak belirlenmiştir. Aynı koşullarda scCO₂ ile ön işlem görmüş CALB enzimleri ile hazırlanan CLEA aktiviteleri ise yaklaşık 2.5 kat daha küçük olup aktivite değeri 2972.4 U/g CLEA'dır. Taşıyıcısız enzim immobilizasyon sürecinde scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CALB enzimlerinin agregat oluşumu ve çapraz bağlama işlemi öncesi yüzey aktif maddesi Triton X-100 ile etkileşiminin olduğu koşullarda immobilizasyon ortamına proteik feeder ajan BSA ve lizin derişiminin C_{BSA}=3.33 mg/mL ve C_{Lizin}=1.67 mg/mL olduğu durumda gerçekleştirilen immobilizasyon sürecinde CLEA aktivitelerinde önemli düşüşler görülmektedir (Şekil 3.25 E ve F). Ancak Triton X-100 ve proteik feeder ajan katkısı ile gerçekleştirilen CLEA aktivitelerinin Triton X-100 eklenmemiş duruma kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir.

4 SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çapraz bağlı enzim agregatları (cross-linked enzyme aggregates, CLEA), enzimatik üretim proseslerinde serbest ya da immobilize enzim kullanımındaki darboğazların çözümü için son yıllarda geliştirilen yeni bir immobilizasyon yöntemidir. CLEA'ları diğer taşıyıcısız enzim immobilizasyon yöntemlerine göre alternatif ve yeni ortaya çıkmış bir yöntem olmasına karşın; enzim agregatlarının boyutunun herhangi bir difüzyon kısıtlamasına gitmeden nasıl kontrol edilebileceği, enzim konformasyonunun nasıl daha esnek hale getirilebileceği ve enzim aktivitesi ve seçiciliğinin agregasyon koşullarının farklılaştırılması ile nasıl ayarlanabileceği gibi darboğazların aydınlatılması gerekmektedir. Enzimatik sentezlerde çözücü ortamlarına alternatif olarak $scCO_2$ 'in kullanılması enzimlerin bölgesel ve stereo seçimli özelliklerini artırılabilir. Sıcaklık ve basınç gibi biyoproses parametrelerindeki küçük değişimler süperkritik akışkanların fizikokimyasal özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir. Enzimlerin mikro çevresindeki bu değişimler biyokatalizörlerin katalitik aktivite ve yapısal kararlılığını da etkiler. Yüksek lisans tez projesinin temel amacı, yaygın uygulamalar için katalitik açıdan oldukça aktif ve yeniden kullanılabilir CLEA'ların tasarımına yönelik esnek bir teknoloji platformu oluşturmaktır. Bu amaç doğrultusunda $scCO_2$ ortamında ön işlem gören enzimlerin CLEA işlemleri öncesi katalitik performansının geliştirilmesi hedeflenmiştir. Model enzim olarak *Candida rugosa* lipazı (CRL) ve *Candida antarctica* lipazı B (CALB) kullanılmıştır.

$scCO_2$ 'in hem katı toz formuna hem de pH' ı 7.5 olan 0.1 M Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 tampon sistemindeki serbest formuna sıcaklık ve basınç etkisi incelenmiştir. 31-60 °C ve 7.38-40 MPa aralığındaki koşullarda gerçekleştirilen işlemlerin enzim aktivitesine etkisi araştırılmıştır. 15 dakika süreyle hem katı hem de sulu sistemdeki serbest enzim aktivitesine sıcaklık ve basınç etkisi sistematik biçimde araştırılmıştır. Katı formdaki CRL enzimlerinin $scCO_2$ ön işlemi sonucu geniş bir sıcaklık ve basınç aralığında enzimn

katalitik aktivite kaybettiği saptanmıştır. Ancak CRL enzimin sulu sistemlerine doğrudan scCO_2 uygulaması yapıldığında enzim aktivitelerinin geniş bir sıcaklık ve basınç aralığında arttığı saptanmıştır.

CRL enzimlerinden hazırlanacak olan CLEA formundaki biyokatalizör sistemlerin katalitik performanslarını geliştirmek ve en yüksek immobilizasyon etkinliğine ulaşmak için ön işlem koşulları $40\text{ }^\circ\text{C}$ ve 10 MPa olarak seçilmiştir. Katı formdaki enzimlerin CLEA işlemleri öncesi scCO_2 ortamında $40\text{ }^\circ\text{C}$ ve 10 MPa koşullarında 15 dakika süreyle basınç denatürasyonuna maruz bırakılması sonucu oluşturulan CLEA'ların katalitik aktivitelerinde ön işlem görmemiş enzimlerin katalitik aktivitelerine kıyasla önemli artışlar sağlanmıştır. Çizelge 4.1'de scCO_2 ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enziminden hazırlanan CLEA'larında ulaşılan en yüksek aktivite değerinin sağladığı koşullar ve bu koşullardaki % aktivite artış oranları ile scCO_2 ortamında ön işlem görmüş enzimlerden sentezlenen CLEA'larının ticari CLEA'lara göre % aktivite artış oranlarındaki değişimler gösterilmiştir. CRL enzimlerinin CLEA aktivitelerine;

- Başlangıç enzim derişimi ($C_{E0}=50\text{-}200\text{ mg/mL}$),
- Gluteraldehit derişimi ($C_{GA}=26.7\text{-}100\text{ }\mu\text{L/mL}$)
- Amonyum sülfat derişiminin ($C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=500\text{-}800\text{ mg/mL}$)

gibi temel ortam bileşimlerini etkisi sistematik biçimde araştırılmıştır.

scCO_2 ile ön işlem görmüş ve görmemiş enzimlerden hazırlanan CLEA'ların katalitik aktivitelerine etki eden başlangıç enzim derişimi, bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajan derişimi ve presipitasyon ajan derişiminin etkisi incelendiğinde hem en yüksek katalitik aktivite değerine; $C_{E0}=150\text{ mg/mL}$, $C_{GA}=40\text{ }\mu\text{L/mL}$ ve $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=600\text{ mg/mL}$ olarak belirlenen koşullarda scCO_2 ile ön işlem görmüş CLEA'larında ulaşılmıştır. Belirtilen bu koşullarda scCO_2 ile ön işlem görmüş ve görmemiş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA aktiviteleri sırasıyla 708.1 U/g CLEA ve 307.8 U/g CLEA 'dır. Ön işlem görmemiş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA formundaki biyokatalizör

sistemlerine göre enzimin scCO_2 ile ön işlem görmesi sonucu katalitik aktivite %130.1 oranında artış sağlanmıştır. Ancak 1076.4 U/g CLEA olarak saptanan ve ticari olarak kullanılan CRL enzimlerini CLEA formudaki katalitik aktivite değerine kıyasla bu çalışmada sentezlenen CLEA aktivitelerinin düşük kaldığı görülmektedir.

Süreli yayın literatüründe CLEA formunda hazırlanan enzimlerin katalitik aktivitesi ve stabilitesini arttırmaya yönelik çalışmalara değişik proteik feeder ajan türünün etkisi incelenmiş ve bu bağlamda önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu çalışmada da, CLEA aktiviteleri üzerine 0.88-16.67 mg/mL derişim aralığında proteik feeder ajan bovin serum albümin (BSA) ve lizinin etkisi incelenmiştir. $C_{E0}=150$ mg/mL, $C_{GA}=40$ $\mu\text{L/mL}$ ve $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=600$ mg/mL koşullarında CLEA hazırlama işlemi öncesi enzim çözeltisine $C_{\text{BSA}}=3.33$ mg/mL derişiminde BSA eklenmesi ya da $C_{\text{Lizin}}=1.67$ mg/mL derişiminde lizin eklenmesi sonucu hem scCO_2 ile öne işlem görmüş hemde görmemiş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA aktivitelerinde önemli artışlar sağlanmıştır. Belirtilen koşullarda BSA katkısının olduğu durumda ulaşılan CLEA aktiviteleri scCO_2 ile ön işlem görmemiş biyokatalizör sistemleri için 924.4 U/g CLEA iken, enzimin scCO_2 ile ön işlem görmesi katalitik aktiviteyi %35.3 oranında arttırarak 1250.8 U/g CLEA değerine ulaştırmıştır. scCO_2 ile ön işlem görmüş CRL enzimlerinden sentezlenen CLEA aktivitelerinin ticari olarak üretilen CLEA aktivitesinde %13.9 daha yüksek olduğu belirlenmiştir. $C_{E0}=150$ mg/mL, $C_{GA}=40$ $\mu\text{L/mL}$ ve $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=600$ mg/mL koşullarında immobilizasyon işleminde enzim çözeltisine $C_{\text{Lizin}}=1.67$ mg/mL derişiminde lizin eklenmesi sonucu ulaşılan katalitik aktivitelerin ticari olarak üretilen CLEA aktivitelerinden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Belirtilen koşullarda lizin katkısının olduğu durumda ulaşılan CLEA aktiviteleri scCO_2 ile ön işlem görmemiş biyokatalizör sistemleri için 1192.8 U/g CLEA iken, enzimin scCO_2 ile ön işlem görmesi katalitik aktiviteyi %6.5 oranında artarak 1270.2 U/g CLEA değerine ulaştırmıştır. scCO_2 ile ön işlem görmüş CRL enzimlerinden sentezlenen CLEA aktivitelerinin ticari olarak üretilen CLEA aktivitesinde %15.3 daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş *Candida rugosa* lipaz enziminden hazırlanan CLEA'larında ulaşılan en yüksek aktivite değerinin sağladığı koşullarda % aktivite artış oranları ve scCO₂ ortamında ön işlem görmüş enzimlerden sentezlenen CLEA'larının ticari CLEA'lara göre % aktivite artış oranları

			Proteik Feeder		Sürfaktant	CLEA Aktivitesi (U/g CLEA)			scCO ₂ ile ön işlem görmemiş CLEA'lara göre % Aktivite artışı	
C _{Eo} (mg/mL)	C _{GA} (μL/mL)	C _{(NH4)2PO4} (mg/mL)	C _{BSA} (mg/mL)	C _{Lizin} (mg/mL)	C _{Triton X100} (μL/mL)	scCO ₂ ile ön işlem görmüş CRL	scCO ₂ ile ön işlem görmemiş CRL	Ticari CLEA	scCO ₂ ile ön işlem görmemiş enzime göre	Ticari enzime göre
								1076.4		
150	40	700				708.1	307.8		130.1	-52.0
150	40	600				709.6	591.1		20.0	-51.7
150	40	600	3.3			1250.8	924.4		35.3	13.9
150	40	600		1.67		1270.2	1192.8		6.5	15.3
150	40	600	3.3		1.67	2028.8	1871.5		8.4	46.9
150	40	600		1.67	3.33	2278.9	1718.2		32.6	52.8

Gluteraldehit ile çapraz bağlama işleminde enzimin mikroçevresindeki reaktif grupların bir yüzey aktif madde ile çevrelenerek aşırı çapraz bağlanmanın önüne geçilmesi sonucu CRL'enzimlerinden oluşturulan CLEA formundaki katalizörlerin katalitik aktivitelerinde artış sağlanması amacıyla; 1.67-4 $\mu\text{L/mL}$ derişim aralığında Triton X-100'ün CLEA aktivitelerine etkisi incelenmiştir. CLEA hazırlama sürecinden önce scCO_2 ile ön işlem görmüş CRL enzimleri kullanılarak; $C_{\text{Eo}}=150 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{GA}}=40 \text{ }\mu\text{L/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=600 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Lysine}}=1.67 \text{ mg/mL}$ and $C_{\text{Triton X100}}= 3.33\mu\text{L/mL}$ koşullarında gerçekleştirilen immobilizasyon süreçlerinde 2278.9 U/g CLEA olarak belirlenen maksimum CLEA aktivitesine ulaşılmıştır. Ticari olarak üretilen CRL enziminin CLEA aktivitesine göre elde edilen bu aktivite değeri yaklaşık 2.2 kat daha fazladır. Konvansiyonel CLEA hazırlama yöntemi kullanılarak; $C_{\text{Eo}}=150 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{GA}}=40 \text{ }\mu\text{L/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=600 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Lysine}}=1.67 \text{ mg/mL}$ ve $C_{\text{Triton X100}}= \mu\text{L/mL}$ koşullarında elde edilen maksimum CLEA aktivitesi ise 1718.2 U/g CLEA değerine ulaşmıştır. CLEA aktivitesi en uygun proteik feeder ajan BSA ve lizin derişimlerinde immobilizasyon öncesi enzim çözeltisine yüzey aktif maddesi Triton X-100 eklenmesi sonucu katalitik aktivite üzerine olumlu sonuçlar vermiştir. Ticari olarak üretilen CRL enzimlerinden hazırlanmış CLEA aktivitesine göre scCO_2 ortamında ön işlem görmüş CRL enzimlerinden hazırlanan CLEA aktivitelerindeki artış; $C_{\text{Eo}}=150 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{GA}}=40 \text{ }\mu\text{L/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=600 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{BSA}}=3.33 \text{ mg/mL}$ and $C_{\text{Triton X100}}=1.673\mu\text{L/mL}$ koşullarında %46.9 iken, $C_{\text{Eo}}=150 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{GA}}=40 \text{ }\mu\text{L/mL}$, $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=600 \text{ mg/mL}$, $C_{\text{Lysine}}=1.67 \text{ mg/mL}$ and $C_{\text{Triton X100}}= 3.33\mu\text{L/mL}$ koşullarında %52.8 olmuştur.

scCO_2 ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş CALB enziminden hazırlanan CLEA'larında ulaşılan en yüksek aktivite değerinin sağladığı koşullar ve bu koşullardaki % aktivite artış oranlarındaki değışimler Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Bu çalışmada, 40 °C ve 10 MPa koşullarındaki scCO_2 ortamında ön işlem görmüş CALB enzimleri ile hazırlanan CLEA'ların katalitik aktivitesinde önemli bir artış kaydedilmemiştir. CALB enzimlerinin birim fiyatlarının çok yüksek olması ve proje bütçesindeki ekonomik darboğazlar nedeniyle scCO_2 'in farklı sıcaklık ve basınç aralığında immobilizasyon öncesi CALB enzimlerine scCO_2 'in ön işlem koşullarının CLEA aktivitesine etkisi

araştırılamamıştır. Bu sürecin daha ayrıntılı biçimde ele alınması sonucu CRL enzimlerinde beklenen aktivite artışlarının CALB enzimlerinde de olabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 4.2 scCO₂ ortamında ön işlem görmüş ve görmemiş *Candida antarctica* lipazı B enziminden hazırlanan CLEA'larında ulaşılan en yüksek aktivite değerinin sağladığı koşullarda % aktivite artış oranları

			Proteik Feeder		Sürfaktant	CLEA Aktivitesi (U/g CLEA)		scCO ₂ ile ön işlem görmemiş CLEA'lara göre % Aktivite artışı
C _{Eo} (mg/mL)	C _{GA} (μL/mL)	C _{(NH4)2PO4} (mg/mL)	C _{BSA} (mg/mL)	C _{Lizin} (mg/mL)	C _{Triton X100} (μL/mL)	scCO ₂ ile ön işlem görmüş CAL B	scCO ₂ ile ön işlem görmemiş CAL B	
150	40	600				3604.6	5734.0	- 59.1
150	40	600	3.33			1123.7	1515.0	-34.8
150	40	600		1.67		1076.6	1402.5	-30.3
150	40	600			1.67	2972.4	7555.1	-154.2
150	40	600	3.33		4.00	3242.7	1639.2	49.5
150	40	600		1.67	3.33	2231.9	1383.0	38.1

KAYNAKLAR

- Aytar, B.U. and Bakır, U. (2008). Preparation of Cross-Linked Tyrosinase Aggregates, *Process Biochemistry*, 43, 125-131.
- Bakkal, M. (2006). Tutuklanmış *Candida rugosa* Lipazı ile Rasemik Naproksen Metil Esterden (S)-Naproksen Üretiminde Proses Parametrelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Batista-Viera, F. and Brena, B.M. (2006). Immobilization of Enzymes, *Immobilization of Enzymes and Cells*, Guisan, J.M. (Ed.), *Methods in Biotechnology*, Humana Pres Inc., Totowa, NJ, 449p.
- Bailey, J.E. and Ollis, D.F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2th ed., McGraww Hill Co., NewYork.
- Brunner, G. (1994). Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes, Steinkopff Darmstadt, 387p.
- Cao L., Van Langen L. M., Van Rantwijk F., Sheldon R.A. (2001). Cross linked aggregates of penicilin acylase: robust catalysts for the synthesis of β -lactam antibiotics, *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 11, 665-670.
- Ericsson, D.J., Kasrayan, A., Johansson, P., Bergfors, T, Sandström, G.A., Backvall, J.E., Mowbray, S.L., (2007). X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase a Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation, *J. Molecular Biology*, 376, 109–119.
- Fazary, A.E., Ismadji, S., Ju, Y.H. (2009).Biochemical Studies on Native and Cross-Linked Aggregates of *Aspergillus awamori* feruloyl esterase, *International Journal of Biological Macromolecules*, 44, 240–248.
- Goto , H., Ogawa, H., Isobe, T., Kawasaki, M. and Kometani, T. (2003). 2-Propanol Treatment of *Candida rugosa* lipase and its Hydrolytic Activity, *J. of Molecular Catalysis: B Enzyme*, 24-25, 67-73.
- Guisan, J.M. (2006). Immobilization of Enzymes as the 21st Centry Begins, *Immobilization of Enzymes and Cells*, Guisan, J.M. (Ed.), *Metods in Biotechnology*, Humana Pres Inc., Totowa, NJ, 449p.
- [http:// en.wikibooks.org](http://en.wikibooks.org)
- <http://wapedia.mobi>
- İşbakan, N. (2006). Lipaz Enzimi Biyokatalizörlüğünde Enantiyomerik Saflıkta 1-Fenil-1-Propanolün Transesterleşme Tepkimesiyle Kinetik Rezolüsyonu, , Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kalaycıolu, L., Serpek, B., Nizamoğlu, M., Başpınar, N. ve Tiftik, A.M. (2006). *Biyokimya*, Nobel Basım Evi, Ankara, 654s.
- Kamat, S., Beckman, E.J. and Russell, A.J. (1995). Enzyme activity in Supercritical Fluids, *Critical Reviews in Biotechnology*, 15, 41-71.
- Kirk, O. and Christensen, M.W. (2002). Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin, *Organic Process Research and Developments*, 6, 446-451.

- Kumar, S., Mohan, U., Kamble, A.L., Pawar, S. and Banerjee U.C. (2010). Cross-Linked Enzyme Aggregates of Recombinant *Pseudomonas putida* nitrilase for Enantioselective Nitrile Hydrolysis, *Bioresource Technology*, 101, 6856–6858.
- Li, H. and Zhang, X. (2005). Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1, *Protein Expression and Purification*, 42, 153–159.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Van Langen, L.M., Van Rantwijk, F. and Sheldon, R.A. (2003). A New Mild Cross-Linking Methodology to Prepare Cross-Linked Enzyme Aggregates, Laboratory of Biocatalysis and Organic Chemistry, Delft University of Technology, Julianalaan 136, 2628 BL Delft, The Netherlands.
- Messiano, A., Beckman, E.J. and Russell, A.J. (1999). Supercritical Biocatalysis, *Chemical Reviews*, Vol. 99, 623-633p.
- Nakamura, K., Chi, Y.M., Yamada, A.Y. and Yano, T. (1989). Lipase Activity and Stability in Supercritical Carbon Dioxide, *Chemical Engineering Communications*, 45, 207-212.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2005). *Biyokimyanın İlkeleri*, Palme Yayıncılık (Çeviri ed. Kılıç, N.), Ankara, 1151p.
- Perez, D.I., Rantwijk, F.V. and Sheldon, R.A. (2009). Cross-Linked Enzyme Aggregates of Chloroperoxidase: Synthesis, Optimization and Characterization, *Adv. Synth. Catal.*, 351, 2133 – 2139.
- Rua, M.L., Dannert, C.S., Wahl, S., Sprauer, A. ve Schmid, R.D. (1997). Thermoalkalophilic Lipase Of *Bacillus Thermocatenulatus* Large-Scale production Purification and Properties: Aggregation Behaviour and its Effect On Activity, *Journal of Biotechnology*, 56, 89–102.
- Russell, A.J., Beckman, E.J. and Chaudhary, A.K. (1994). Studying Enzyme Activity in Supercritical Fluids, *Chemtech*, 3, 33-37.
- Salgın, U., Çalimli, A., Yıldız, N., Salgın, S., Sarı, M. (2007). Süperkritik CO₂ Ortamında Lipaz Enzimlerinin Kararlılığı ve Yapısal Bozunmasının İncelenmesi, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Proje No: 104M388 Aralık, Sivas.
- Salgın, U. and Korkmaz, H. (2011). A Green Separation Process for Recovery of Healthy Oil from Pumpkin Seed, *The Journal of Supercritical Fluids*, 58, 239-248.
- Salgın, U. (1996). Alkali Proteaz Enzimi Üretiminde Oksijen Aktarımının Ürün Verimine ve Seçimliliğine Etkisinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Sanchez, A., Ferrer, P., Serrano, A., Valero, F., Sola, C., Pernas, M., Rua, M.L., Fernandez Lafuente, R., Guisan, J.M., Casa, R.M., Sinisterra, J.V. and Montero J.M. (1999). A Controlled Fed-Batch Cultivation For The Production Of New Crude Lipases from *Candida rugosa* with Improved Properties in Fine Chemistry, *Journal of Biotechnology*, 69, 169–182.
- Savage, P.E., Gopalan, S., Mizan, T.I., Martino, C.J. and Broc, E.E. (1995). Reactions at Supercritical Conditions: Applications and Fundamentals, *AIChE Journal*, 41, 1723-1778.
- Serrano, L.P., Cao, L., Van Rantwijk, F. and Sheldon, R.A. (2002). Cross-Linked Enzyme Aggregates with Enhanced Activity: Application to Lipases, *Biotechnology Letters*, 24, 1379–1383.

- Shah, S., Sharma, A., Gupta, M.N. (2005). Preparation of Cross-Linked Enzyme Aggregates by using Bovine Serum Albumin as a Proteic Feeder, *Analytical Biochemistry*, 35, 207–213.
- Sheldon, R.A. (2007). Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs): Stable and Recyclable Biocatalysts, Department of Biotechnology, 7th International Conference on Protein Stabilization, *Biochemical Society Transactions*, Vol. 35, 1583-1586p.
- Sheldon, R.A., Schoevaart, R. and Van Langen, L.M. (2005). Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs): A Novel and Versatile Method for Enzyme Immobilization, *Biocatalysis and Biotransformation*, 23, 141–147.
- Sheldon, R.A., Schoevaart, R. and Van Langen, L.M. (2006). Cross-Linked Enzyme Aggregates, *Immobilization of Enzymes and Cells*, Guisan, J.M. (Ed.), *Methods in Biotechnology*, Humana Pres Inc., Totowa, NJ, 449p.
- Telefoncu, A. (1997). İmmobilize Enzimler, *Enzimoloji*, Telefoncu, A. (Ed), Lisans Üstü Yaz Okulu, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Kuşadası, Aydın, 446.
- Topçular C. (2006). Taşıyıcılı ve Taşıyıcısız Sistemlerde İmmobilize Peroksidaz Enziminin Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Yu, H.W., Chen, H., Wang, X., Yang, Y.Y. and Ching, C.B. (2006). Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs) with Controlled Particles: Application to *Candida rugosa* lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43, 124–127.
- Wong, V., Wyllie, S.G., Cornwell, C.P. and Tronson, D., (2001). Supercritical Fluid Extraction (SFE) of Monoterpenes from the Leaves of *Melaleuca Alternifolia* (Tea Tree), *Molecules*, 6, 92-103.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Derya DİNÇYÜREK
Doğum Yeri ve Tarihi	Adana, 20/05/1985
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü
E-posta Adresi	deryaDNCYUREK@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Seyhan Rotary Anadolu Lisesi- Mehmet Kemal Tuncel Lisesi
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2008
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2011