



**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TAŞIYICISIZ PROTEAZ ENZİMİ İMMOBİLİZASYONDA  
ENZİM İKİNCİL YAPILARINDAKİ  
DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Nagihan SEZİ  
(201592121107)**

**Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı: Prof.Dr. Uğur SALGIN**

**SİVAS  
OCAK 2019**

**NAGİHAN SEZİ**'nin hazırladığı ve “**Taşıyıcısız Proteaz Enzimi İmmobilizasyonda Enzim İkincil Yapılarındaki Değişimlerin İncelenmesi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı :** **Prof. Dr. Uğur SALGIN** .....

Cumhuriyet Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :** **Dr. Öğr. Üyesi Onur DÖKER** .....

Mersin Üniversitesi

**Dr. Öğr. Üyesi Berna SARAÇOĞLU KAYA** .....

Cumhuriyet Üniversitesi

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

**Prof. Dr. İsmail ÇELİK**

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

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



*Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından M-638 Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.*



Bütün hakları saklıdır.

Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Nagihan SEZİ, 2019

## ETİK

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

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

17.01.2019

Nagihan SEZİ

## ÖZET

# TAŞIYICISIZ PROTEAZ ENZİMİ İMMOBİLİZASYONDA ENZİM İKİNCİL YAPILARINDAKİ DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ

**Nagihan SEZİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Uğur SALGIN**

**2019, 76+xv sayfa**

Bu çalışmada, çapraz bağlı proteaz agregatları biçiminde taşıyıcısız immobilize enzim sistemlerinin katalitik aktivitesine immobilizasyon ortam bileşimlerinin (başlangıç enzim derişimi, presipitasyon ajanı derişimi, çapraz bağlayıcı bifonksiyonel ajan derişimi, proteik feeder ajan türü ve derişimi) etkisi araştırılmıştır. Bunun yanı sıra, geliştirilen biyokatalizörün değişik çözücü sistemlerindeki katalitik performanslarıda araştırılmıştır. Enzim ikincil yapısındaki değişimler, Fourier transform infrared spektroskopiden elde edilen spektrumların moleküler düzeyde analizi ile gerçekleştirilmiştir. Gürültü/sinyal oranının minimizasyonu için 256 eş-tarama sayısı ile gerçekleştirilen analizlerdeki tarama hızı 0.2 cm/s ve çözünürlük değeri 4 cm<sup>-1</sup> olarak ayarlanmış ve elde edilen spektrumların karakterizasyonunun değerlendirilmesi bir bilgisayar yazılım programı olan PeakFit aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Immobilize enzim sisteminin katalitik performansındaki değişimler, moleküler düzeyde düzenli ya da düzensiz  $\alpha$ -heliks ve  $\beta$ -sheet yapılarının yüzde alan değişimleri ile karşılaştırılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Proteaz enzimi, Çapraz bağlı enzim agregatları, İkincil yapı analizi, FTIR-ATR Spektroskopisi.

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF CHANGES IN ENZYME SECONDARY STRUCTURES IN CARRIER-FREE PROTEASE ENZYME IMMOBILIZATION**

**Nagihan SEZİ**

**Master of Science Thesis**

**Department of Chemical Engineering**

**Supervisor: Prof. Dr. Uğur SALGIN**

**2019, 76+xv pages**

In this study, the effect of immobilization media compositions (initial enzyme concentration, precipitating agent concentration, cross-linker bifunctional agent concentration and protein feeder agent types and concentrations) on the catalytic activity of the cross-linked protease aggregates which are a carrier-free immobilized enzyme system was investigated. In addition, the catalytic performance of the developed biocatalysts in different solvent systems was also investigated. The changes in the secondary structure of the enzyme were performed by molecular analysis of the spectra obtained from Fourier transform infrared spectroscopy. The analysis conditions for minimization of noise/signal ratio were performed with the scanning number of 256 at the scan rate of 0.2 cm/s and the resolution of 4 cm<sup>-1</sup>, and the evaluation of the characterization of the obtained spectra was carried using the Peakfit software program. The changes in the catalytic performance of the immobilized enzyme system were compared with the percent field changes of the regular or irregular  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet structures at the molecular level.

**Key Words:** Protease enzyme, cross linked enzyme aggregates, Secondary structure analysis, FTIR-ATR Spectroscopy.

## KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimlerinden sürekli yararlandığım, tezin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli Danışman Hocam Prof.Dr.Uğur SALGIN'a ve tez çalışması süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren Biyomühendislik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr.Sema SALGIN'a çok teşekkür ederim. Yüksek lisans tez çalışmalarım süresinde her türlü yardımlarını benden esirgemeyen Cumhuriyet Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalında Doktora çalışmalarını tamamlayan Sayın Dr. Derya DİNÇYÜREK EKİCİ ve Dr. Nagihan SOYER TUZLA'lıya sağladıkları destekler için çok teşekkür ederim.





# İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
<b>ÖZET</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR</b> .....	viii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xi
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xii
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	xiv
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xv
<b>1. GENEL BİLGİLER</b> .....	1
1.1 Proteaz Enzimi.....	3
1.2 Proteaz Enziminin Endüstriyel Boyutta Üretimi ve Kullanım Alanları Lipozomlar.....	7
1.3 Enzimlerin İmmobilizasyonu.....	10
1.3.1 İmmobilizasyonun avantajlar.....	11
1.3.2 İmmobilizasyon parametreleri.....	11
1.3.3 İmmobilizasyonda kullanılan taşıyıcılar.....	12
1.3.4 İmmobilizasyonda genel olarak kullanılan taşıyıcıların sınıflandırılması.....	13
1.3.5 Taşıyıcısız enzim immobilizasyonu.....	14
1.4 Enzimlerin Üç Boyutlu Yapıları.....	15
1.5 Enzimlerin İkincil Yapı Analizleri.....	17
1.6 FTIR ile İkincil Yapı Analizleri.....	20
1.7 Konu Üzerinde Önceki Çalışmalar.....	25
<b>2. MATERYALVE YÖNTEM</b> .....	30
2.1 Materyaller.....	30
2.2 Enzim Sistemlerinin Katalitik Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	30
2.3 Enzim hidrolitik aktivitesinin belirlenmesi.....	32
2.4 Çapraz Bağlı Enzim Agregatlarının Hazırlanması.....	32
2.5 Enzim Aktivitesine ve Katalitik Performansına Etki Eden Parametreler.....	34
2.6 Enzim Aktivitesine Substrat Değişimi Etkisi.....	35
2.7 Enzim Konformasyonel Yapısındaki Değişimlerin Analizi	35
<b>3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI</b> .....	37
3.1 CLEA Aktivitesine Ortam Bileşimlerinin Etkisi ve Enzim Konformasyonel Yapılarındaki Değişimler .....	37
3.1.1 Başlangıç enzim derişimi ve çapraz bağlayıcı ajan derişimlerinin etkisi.....	37
3.1.2 Presipitasyon ajan derişiminin etkisi.....	46

3.1.3	Proteik feeder ajan derişimi etkisi.....	51
3.1.3.1	Sığır serum albümin derişimi etkisi.....	51
3.1.3.2	Lizin derişimi etkisi.....	57
3.1.4	Çözücü türü etkisi.....	63
<b>4.</b>	<b>TARTIşMA VE SONUÇ.....</b>	<b>69</b>
	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>74</b>
	<b>ÖZGEÇMİş</b>	



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 1.1</b>	Peptid bağı oluşum reaksiyonu..... 1
<b>Şekil 1.2</b>	Enzim-substrat anahtar kilit uyumu..... 2
<b>Şekil 1.3</b>	Proteolizin şematik olarak gösterimi..... 4
<b>Şekil 1.4</b>	İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması..... 14
<b>Şekil 1.5</b>	Taşıyıcısız enzim immobilizasyon süreçleri..... 15
<b>Şekil 1.6</b>	Proteinlerde birincil (a), ikincil (b), üçüncül (c) ve dördüncül yapıları (d) ..... 16
<b>Şekil 1.7</b>	Alfa sarmal ve beta katman yapıları..... 17
<b>Şekil 1.8</b>	Gerilme, döndürme ve burkulma titreşimleri..... 19
<b>Şekil 1.9</b>	Tipik ATR ışını analiz yöntemi..... 20
<b>Şekil 1.10</b>	ATR kristali üzerine numunelerin yerleştirme ve basınçlandırma işlem..... 23
<b>Şekil 1.11</b>	Amid badlarının FTIR-ATR spektrumları..... 24
<b>Şekil 1.12</b>	BSA'nın IR spektrumunun Fourier kendinden çözülmüş 2. ve 4. türevleri..... 26
<b>Şekil 1.13</b>	Çözünmemiş IR spektrumlarının amid I ve amid II bölgeleri için eğri uydurma (boş BSA, 25mg / ml) (a), kymotripsin ile sindirilmiş BSA (b) ..... 28
<b>Şekil 1.14</b>	Aktif bölgede Ser195-His57-Asp102 kalıntılarını içeren top ve çubuk modellerinde gösterilmiş bir katalitik triad..... 29
<b>Şekil 2.1</b>	Uv-vis spektrofotometre cihazı..... 31
<b>Şekil 2.2</b>	Tirozin için kalibrasyon doğrusu (25 °C, $\lambda=274$ nm) ..... 31
<b>Şekil 2.3</b>	FTIR-HATR spektroskopi cihazı..... 35
<b>Şekil 3.1</b>	$C_E=50$ mg/mL ve $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$ mg/mL için CLEA'ların amid I bantları ve ikincil yapı analizleri: a) $C_{Glu}=40$ $\mu$ L/mL, b) $C_{Glu}=60$ $\mu$ L/mL, c) $C_{Glu}=80$ $\mu$ L/mL, d) $C_{Glu}=100$ $\mu$ L/mL..... 39
<b>Şekil 3.2</b>	$C_E=100$ mg/mL ve $C_{(NH_4)_2SO_3}=700$ mg/mL için CLEA'ların amid I bantları ve ikincil yapı analizleri: a) $C_{Glu}=40$ $\mu$ L/mL, b) $C_{Glu}=60$ $\mu$ L/mL, c) $C_{Glu}=80$ $\mu$ L/mL, d) $C_{Glu}=100$ $\mu$ L/ mL..... 40
<b>Şekil 3.3</b>	$C_E=150$ mg/mL ve $C_{(NH_4)_2SO_3}=700$ mg/mL için CLEA'ların amid I bantları ve ikincil yapı analizleri: a) $C_{Glu}=40$ $\mu$ L/mL, b) $C_{Glu}=60$ $\mu$ L/mL, c) $C_{Glu}=80$ $\mu$ L/mL, d) $C_{Glu}=100$ $\mu$ L/mL..... 41
<b>Şekil 3.4</b>	$C_E=200$ mg/mL ve $C_{(NH_4)_2SO_3}=700$ mg/mL için CLEA'ların amid I bantları ve ikincil yapı analizleri: a) $C_{Glu}=40$ $\mu$ L/mL, b) $C_{Glu}=60$ $\mu$ L/mL, c) $C_{Glu}=80$ $\mu$ L/mL, d) $C_{Glu}=100$ $\mu$ L/ mL..... 42

<b>Şekil 3.5</b>	$C_E=250$ mg/mL ve $C_{(NH_4)_2SO_3}=700$ mg/mL için CLEA'ların amid I bantları ve ikincil yapı analizleri: a) $C_{Glu}=40$ µL/mL, b) $C_{Glu}=60$ µL/mL, c) $C_{Glu}=80$ µL/mL, d) $C_{Glu}=100$ µL/mL.....	43
<b>Şekil 3.6</b>	Farklı $(NH_4)_2SO_4$ derişimlerinde $C_E=200$ mg/mL ve $C_{Glu}=60$ µL/mL için CLEA'ların amid I bantları ve ikincil yapı analizleri: a) $C_{(NH_4)_2SO_4}=500$ mg/mL, b) $C_{(NH_4)_2SO_4}=600$ mg/mL c) $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$ mg/mL, d) $C_{(NH_4)_2SO_4}=800$ mg/ mL.....	48
<b>Şekil 3.7</b>	Farklı BSA derişimlerinde $C_E=200$ mg/mL, $C_{Glu}=60$ µL/mL ve $C_{(NH_4)_2SO_3}=500$ mg/mL koşullarında hazırlanan CLEA'ların amid I bantları ve ikincil yapı analizleri: a) BSA yok, b) $C_{BSA}=1$ mg/mL, c) $C_{BSA}=2$ mg/mL, d) $C_{BSA}=4$ mg/mL, e) $C_{BSA}=8$ mg/mL, f) $C_{BSA}=16$ mg/mL.....	53
<b>Şekil 3.8</b>	Farklı BSA derişimlerinde $C_E=200$ mg/mL, $C_{Glu}=60$ µL/mL ve $C_{(NH_4)_2SO_3}=700$ mg/mL koşullarında hazırlanan CLEA'ların amid I bantları ve ikincil yapı analizleri: a) BSA yok, b) $C_{BSA}=1$ mg/mL, c) $C_{BSA}=2$ mg/mL, d) $C_{BSA}=4$ mg/mL, e) $C_{BSA}=8$ mg/mL, f) $C_{BSA}=16$ mg/mL.....	54
<b>Şekil 3.9</b>	Farklı lizin derişimlerinde $C_E=200$ mg/mL, $C_{Glu}=60$ µL/mL ve $C_{(NH_4)_2SO_3}=500$ mg/mL koşullarında hazırlanan CLEA'ların amid-I bantları ve ikincil yapı analizleri: a) Lizin yok, b) $C_{Lys}=1$ mg/mL, c) $C_{Lys}=2$ mg/mL, d) $C_{Lys}=4$ mg/mL, e) $C_{Lys}=8$ mg/mL.....	59
<b>Şekil 3.10</b>	Farklı lizin derişimlerinde $C_E=200$ mg/mL, $C_{Glu}=60$ µL/mL ve $C_{(NH_4)_2SO_3}=700$ mg/mL koşullarında hazırlanan CLEA'ların amid-I bantları ve ikincil yapı analizleri: a) Lizin yok, b) $C_{Lys}=1$ mg/mL, c) $C_{Lys}=2$ mg/mL, d) $C_{Lys}=4$ mg/mL, e) $C_{Lys}=8$ mg/mL.....	60
<b>Şekil 3.11</b>	Değişik organik çözücü sistemlerine maruz bırakılan CLEA'ların amid I bantları ve ikincil yapı analizleri: a) Tampon ortamı, b) Serbes proteaz, c) Etilasetat, d) Metanol, e) Sikloheksan, f) <i>n</i> -Hekzan, g) <i>i</i> -Oktan, ğ) Dimetilformamit, h) Etanol, ı) Deiyonize su, i) Dimetilsülfoksit.....	65

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Çizelge 1.1</b>	Proteazların sınıflandırılması..... 5
<b>Çizelge 1.2</b>	Hidrolitik enzimler..... 7
<b>Çizelge 1.3</b>	Bazı proteolitik enzimlerin endüstriyel uygulamaları..... 8
<b>Çizelge 1.4</b>	Proteazların değişik endüstri ve proseslerde potansiyel kullanımları..... 9
<b>Çizelge 2.1</b>	Proteaz enziminin ikincil yapı karakterizasyonunda amid I bandını oluşturan bileşenler ve bunların dalga sayıları..... 36
<b>Çizelge 3.1</b>	CLEA'ların aktivitesine başlangıç enzim ve glutraldehit derişimlerinin etkisi: Konformasyonel yapılarındaki derişimler ( $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$ mg/mL)..... 44
<b>Çizelge 3.2</b>	CLEA'ların aktivitesine başlangıç enzim ve glutraldehit derişimlerinin etkisi: Konformasyonel yapılarındaki derişimler ( $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$ mg/mL)..... 45
<b>Çizelge 3.3</b>	CLEA'ların aktivitesine $(NH_4)_2SO_4$ derişimlerinin etkisi: Konformasyonel yapılarındaki derişimler..... 49
<b>Çizelge 3.4</b>	CLEA 'ların aktivitesine $(NH_4)_2SO_4$ derişimlerinin etkisi: Konformasyonel yapılarındaki derişimler..... 50
<b>Çizelge 3.5</b>	CLEA'ların aktivitesine BSA erişimlerinin etkisi: Konformasyonel yapılarındaki derişimler..... 55
<b>Çizelge 3.6</b>	CLEA 'ların aktivitesine BSA derişimlerinin etkisi: Konformasyonel yapılarındaki derişimler ..... 56
<b>Çizelge 3.7</b>	CLEA'ların aktivitesine lizin derişiminin etkisi: Konformasyonel yapılarındaki derişimler..... 61
<b>Çizelge 3.8</b>	CLEA'ların aktivitesine lizin derişiminini etkisi: Konformasyonel yapılarındaki ortalama % derişimler..... 62
<b>Çizelge 3.9</b>	Değişik çözücü sistemlerine maruz bırakılan CLEA'ların katalitik aktivitesi ve konformasyonel yapılarındaki derişimler ( $C_E=200$ mg/mL, $C_{Glu}=60$ µL/mL ve $C_{(NH_4)SO_3}=700$ mg/mL)..... 67
<b>Çizelge 3.10</b>	CLEA'ların aktivitesine çözücü türü etkisi: Konformasyonel yapılarındaki derişimler ( $C_E=200$ mg/mL, $C_{Glu}=60$ µL/mL ve $C_{(NH_4)SO_3}=700$ mg/mL) ..... 68

## SİMGELER DİZİNİ

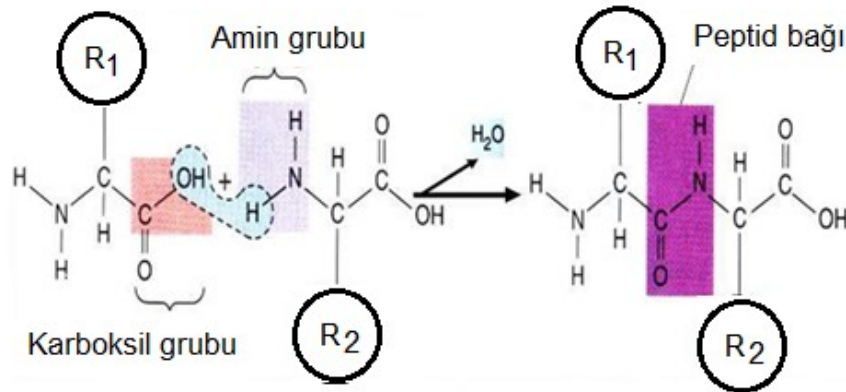
<b>C</b>	: Derişim ( $\text{kmol/m}^3$ )
<b>C<sub>E</sub></b>	: Enzim Derişimi ( $\text{kg/m}^3$ )
<b>C<sub>BSA</sub></b>	: Sığır Serum Albumin Derişimi ( $\text{kg/m}^3$ )
<b>C<sub>Lys</sub></b>	: Lizin Derişimi ( $\text{kg/m}^3$ )
<b>C<sub>(NH4)2SO4</sub></b>	: Amonyum Sülfat Derişimi ( $\text{kg/m}^3$ )
<b>C<sub>Glu</sub></b>	: Gluteraldehit Derişimi ( $\text{m}^3/\text{m}^3$ )
<b>C<sub>Tyr</sub></b>	: Tirozin Derişimi ( $\text{kmol/m}^3$ )
<b>pH</b>	: Hidrojen İyonu Aktivitesi
<b>U</b>	: Hidrolitik Aktivite ( $\text{kmol/kg s}$ )
<b><math>\alpha</math></b>	: Alfa
<b><math>\beta</math></b>	: Beta
<b><math>\epsilon</math></b>	: Absorptivite ( $\text{m}^3/\text{kmol m}$ )
<b><math>\lambda</math></b>	: Dalga boyu (nm)

## KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Asp</b>	: Aspartik Asit
<b>BSA</b>	: Sığır Serum Albumini
<b>CLEA</b>	: Çapraz Bağlı Enzim Agregatı
<b>-COOH</b>	: Karboksil Grubu
<b>EC</b>	: Avrupa Birliği Komitesi
<b>EDTA</b>	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
<b>FTIR</b>	: Fourier Transform Infrared Spektrometresi
<b>His</b>	: Histidin
<b>Lys</b>	: Lizin
<b>-NH<sub>2</sub></b>	: Amin Grubu
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	: Amonyum sülfat
<b>-OH</b>	: Hidroksil Grubu
<b>Ser</b>	: Serin
<b>UV</b>	: Ultra Viole
<b>TCA</b>	: Trikloroasetik asit
<b>Tyr</b>	: Tirozin

## 1. GENEL BİLGİLER

Enzimler canlı organizmalar tarafından üretilen, spesifik reaksiyonları katalizleyebilen, reaksiyon ortamında bozulmadan ve herhangi bir değişime uğramadan çıkabilen protein yapısında moleküllerdir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004). Proteinler, düz bir zincir halinde düzenlenmiş ve küresel formda katlanmış amino asitlerden oluşan organik bileşiklerdir. Protein zincirindeki amino asitler karboksilik asit ve amin grupları arasında kurulan peptid bağlarıyla birbirlerine bağlanır (Şekil 1.1). Doğada 20 değişik amino asit bulunur. Tüm proteinler bu 20 amino asitin farklı dizilimlerinden türemektedir. Bu amino asitlerin çoğunluğu L formundadır. Protein içerisindeki amino asitler birbirlerine peptid bağları ile bağlanır. İki amino asit yan yana geldiğinde karboksil grupları ( $-COOH$ ) ve amin grupları ( $-NH_2$ ) arasında bir bağlanma gerçekleşir ve bu bağ peptid bağı adı adlandırılır. Bağlanma sırasında bir  $H_2O$  molekülü açığa çıkar. İki amino asitin yanyana gelmesiyle oluşan peptid bağına dipeptid, üç ya da daha fazla amino asitin yan yana gelmesiyle oluşan zincirdeki peptid bağına ise polipeptid adı verilir.

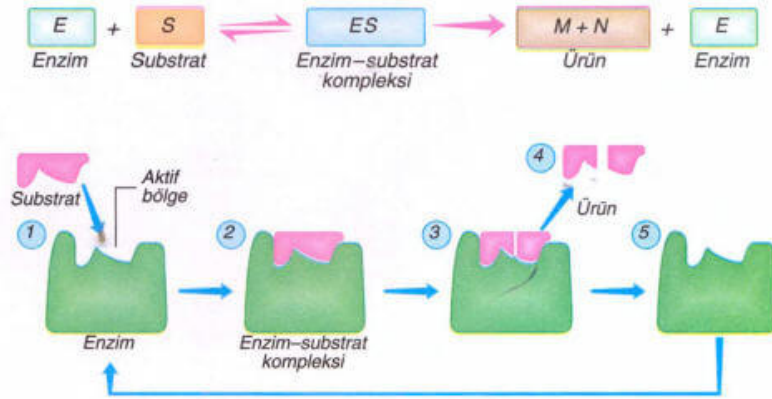


Şekil 1.1 Peptid bağı oluşum reaksiyonu (Çelik, 2006).

Kimyasal reaksiyonlar ile kıyaslandığında, enzimler biyokimyasal reaksiyonların hızını daha da artırabilir. Enzimler etki ettikleri maddeye ya da madde karışımlarına enzimin substratı adı verilir. Enzimler, substratlarına karşı mükemmel spesifikliğe sahip olduğundan kendine spesifik ve uyumlu substratlara bağlanarak ürün oluşturur (Kaya, 1993). Her enzim en az bir aktif konuma sahiptir. Bu aktif konum ya da konumlarda bulunan katalitik gruplar ürün oluşumunda önemli işleve sahiptir.



Aktif konumlarda enzim (E) ile substrat (S) arasında geçici olarak bir enzim-substrat kompleksi (ES) oluşturur. Oluşan ES sayesinde biyokimyasal ürün sentezlenir ve bu süreçte enzim substrattan ayrılarak başlangıçtaki haline döner. ES üzerinden enzimatik sentez sonunda ürünün oluşum mekanizması Şekil 1.2’de gösterilen anahtar-kilit modeli ile gösterilmiştir. Bu modelde E molekülünün sadece belirli bir kısmı S’ye bağlanır. Aktif bölge olarak adlandırılan bu kısımda, apoenzim kısmındaki bir cep ya da oluk görünümündedir. E’nin S’ye etkisi aktif bölgenin özgün şekli ile belirlenir. E ve S arasında anahtar–kilit uyumu vardır. Bu yüzden her E spesifik bir S’ye etki edebilir. S, enzime geçici olarak aktif bölgeden bağlanır ve ES oluşur. Enzimin etkisi ile S ürüne (M+N) dönüşür. E ise hiç bir değişikliğe uğramadan reaksiyondan ayrılır. Bu nedenle enzimler aynı reaksiyon için defalarca kullanılabilirler. Canlı sistemlerinde yapısı bozulan E’ler ise parçalanır ve yeniden sentezlenir. E’ler genelde belirli bir reaksiyona özgüdür. Bu nedenle her hücrede reaksiyon çeşidi kadar E çeşidi bulunur. Enzimatik tepkimler genellikle tersinirdir yani reaksiyonları çift yönlü gerçekleşir. Aktif enzimler substratın sonuna –az eki getirilerek adlandırılır (maltaz, lipaz, peptidaz, proteaz gibi). Pasif enzimler ise genel olarak –jen ekiyle biter (pepsinojen, tripsinojen gibi). Her enzimin yapımından bir gen sorumludur. Genin mutasyona uğraması ilgili enzimin sentezini engeller.



**Şekil 1.2** Enzim-substrat anahtar kilit uyumu  
(<http://www.nkfu.com/enzimlerin-ozellikleri-maddeler-halinde>).

Enzimatik reaksiyonların yer aldığı birçok endüstri, enzim kullanımından kaynaklı bazı darboğazlarla karşılaşır. Örneğin serbest enzim kullanımından kaynaklı ürün kontaminasyonu ve reaksiyon ortamından geri kazanımı proseslerin ekonomik açıdan rekabet edebilirliğini olumsuz yönde etkiler. Ayrıca, doğal ortamlarından izole edilen

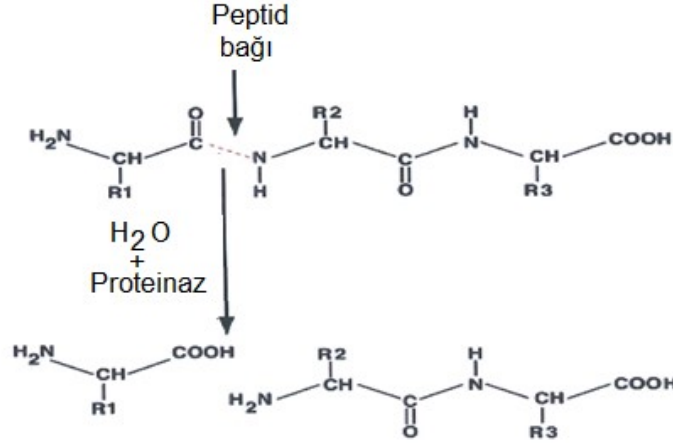
enzimlerin endüstriyel platformlardaki kullanımında katalitik aktivitelerinde azalma görülebilmektedir. Enzimlerin kararsız olmaları ve ayrıca kısıtlı olan substrat özgünlüğü de önemli darboğazlar arasındadır (Taşdelen, 2006).

Enzimler bitki, hayvan ve mikrobiyal kaynaklı tüm canlı hücreler tarafından üretilir. Hayvan hücresinden elde edilen enzimlerin maliyeti daha yüksektir. Hayvan hücreleri ile kıyaslandığında bitki hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen enzim üretimi daha kolaydır. Mikrobiyal hücreler kullanılarak gerçekleştirilen enzim üretimleri daha kısa sürede gerçekleştirilebilir. Mikroorganizmalar yardımıyla gerçekleştirilen enzim üretimleri genellikle gıda ve farmasötik endüstrisinde yaygın olarak kullanılır. Enzimler buldukları konuma göre *intracellular enzimler* (hücre içinde sentezlenen enzimler) ve *extracellular enzimler* (hücre dışına sentezlenen enzimler) olmak üzere sınıflandırılabilirler (Trevan ve ark., 1993). Enzimler katalizledikleri reaksiyonlara göre yükseltgenme ya da indirgenme reaksiyonlarını gerçekleştiren *oksidoredüktazlar*, fonksiyonlu grup aktarımını sağlayan *transferazlar*, hidrolitik reaksiyonları gerçekleştiren *hidrolazlar*, çift bağlara ekleme ve çift bağların parçalanmasını sağlayan *liyazlar*, izomerizasyon reaksiyonları gerçekleştiren *izomerazlar* ve ayrıca yeni bağ oluşturma işlevine sahip olan *ligazlar* olmak üzere altı grupta sınıflandırılırlar. Proteaz enzimleri hidrolaz sınıfında yer almaktadır. Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %75'i hidrolitik enzimlerden oluşmaktadır

### 1.1 Proteaz Enzimi

Proteazlar (EC 3.4.21–24) protein moleküllerindeki peptid bağlarını hidrolizleme potansiyeline sahip enzimlerdir (Wiseman, 1993). Peptid bağları su varlığında proteazlar tarafından hidrolizi proteoliz olarak adlandırılıp Şekil 1.3'de gösterilmiştir. Burada; R1, R2 ve R3 herbir amino asitte bulunan yan zincirleri temsil etmektedir. Proteolizin ürünü proteinler ise peptid fragmentleri ve serbest amino asitlerden oluşur. Proteolitik enzimler canlı organizmaların gelişiminde ve farklılaşmasında önemli fonksiyonlara sahiptir. Günümüzde proteolitik enzim çalışmaları, sadece organizmaların metabolik faaliyetlerdeki enzimatik süreçleri ile sınırlı kalmamış aynı zamanda biyoteknoloji sektöründeki yaygın potansiyel kullanımı üzerine de yoğunlaşmıştır (Gupta ve ark., 2002). Global boyutta enzim satışlarının %60'ını proteaz enzimleri oluşturmaktadır. 20. Yüzyılın sonlarında global boyutta endüstriyel

enzim satışlarının hacmi yaklaşık 1 milyar \$'a ulaşmıştır (Rao ve ark., 1998). Freedonia Group Inc. tarafından yayınlanan bir raporda, enzim pazarının her yıl ortalama %7.6 artış göstereceği ve 2011 yılına kadar global boyutta endüstriyel enzim satış hacminin 6 milyar \$'a yükseleceğini ön görmüşlerdir.



**Şekil 1.3** Proteolizin şematik olarak gösterimi.

(<http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh27-4/317-324.htm>)

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Adlandırma Komitesi'ne (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1992) göre proteazlar üçüncü enzim grubu olan hidrolazların dört alt grubuna ayrılırlar. Proteazlar; katalizlenen reaksiyonun tipi, katalitik bölgenin kimyasal yapısı ve yapılarına göre evrimsel akrabalıkları olmak üzere üç temel kritere göre sınıflandırılırlar. Etki bölgelerine bağlı olarak proteazlar, substratın uçlarına uzak bölgeden peptid bağını kesen endopeptidazlar ve substratın amino veya karboksil ucundan kesen ekzopeptidazlar ve olmak üzere iki gruba ayrılır. Aminoasit dizilimlerine ve evrimsel akrabalıklarına göre proteazlar farklı familya ve gruplara ayrılırlar. Bunun yanı sıra proteazlar optimum aktivite gösterdikleri pH değerine göre asidik, nötral ve alkali proteazlar şeklinde de sınıflandırılmaktadır (Rao ve ark., 1998). Çizelge 1.1'de substrata karşı proteazların etki bölgesine göre endopeptidazlar ya da ekzopeptidazlar şeklinde sınıflandırılması ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

**Çizelge 1.1** Proteazların sınıflandırılması (Rao ve ark., 1998)

Proteazlar	EC Numarası
Ekzopeptidazlar	3.4.11
<i>Amino</i> peptidazlar	3.4.14
<i>Dipeptidil Peptidaz</i>	3.4.14
<i>Tripeptidil Peptidaz</i>	3.4.16-3.4.18
<i>Karboksi</i> peptidazlar	3.4.16
<i>Serin tipi</i> proteazlar	3.4.17
<i>Metallo</i> proteazlar	3.4.18
<i>Sistein tipi</i> Proteazlar	3.4.15
<i>Peptidil dipeptidaz</i>	3.4.13
<i>Dipeptidazlar</i>	3.4.19
<i>Omega peptidazlar</i>	3.4.19
Endopeptidazlar	3.4.21-3.4.34
<i>Serin</i> proteazlar	3.4.21
<i>Sistein</i> proteazlar	3.4.22
<i>Aspartik</i> proteazlar	3.4.23
<i>Metallo</i> proteazlar	3.4.24
<i>Katalitik mekanizması bilinmeyen endopeptidazlar</i>	3.4.99

Hem fizyolojik proseslerde hem de biyoteknoloji sektöründe potansiyel işlevleri proteazları stratejik enzimler arasında yer almasını sağlayarak özellikle proteinlerin polipeptit yapıları içerisindeki amid bağlarının hidrolizinde kullanılmaktadır. Memelilerin mide ve pankreas ortamında sentezlenen proteazlar, sindirim sisteminde proteinlerin yapı taşlarına ayrılmasını sağlar. Bunun yanısıra proteaz enzimleri katalitik aktif bölgelerinde yer alan fonksiyonel gruplara bağlı olarak; serin (Ser) proteazlar, sistein (Cys) proteazlar, aspartil (Asp) proteazlar ve metalloproteazlar olmak üzere dört gruba ayrılırlar (Hartley, 1960). Serin proteazlar, aktif konumlarındaki serin grupları reaksiyonların katalizlenmesinde rol oynar. Bu grupta yer alan proteazların molekül kütleleri 18.5–35 kDa arasındadır ve  $\text{pH} \geq 7$  koşullarında aktiftirler. Optimum pH'ları 7–11 ve izoelektrik noktaları ise  $\text{pH} = 4.4$ –6.2 arasındadır. Serin proteazlar da kendi aralarında tripsin benzeri proteazlar, alkali proteazlar, miksobakter  $\alpha$ -litik proteazlar ve stafilokokkal proteazlar olarak dört alt gruba ayrılırlar (Kalisz, 1988). Serin alkali proteazlar çeşitli bakteri, fungus ve maya türleri tarafından üretilir ve protein zinciri üzerindeki tirozin, fenilalanin, lözin gibi

aromatik ya da hidrofobik gruplara karşı spesifiktirler. Bu enzimler diizopropilflorofosfata karşı hassas olmalarına karşın azotosil-L-lizinklorometilketon ve L-1-tosilamid-difenilchlorometilketon gibi tripsin inhibitöründen etkilenmezler. Optimum pH değeri 10 civarında olup izoelektrik noktaları  $pH=9$ 'dur. Serin alkali proteazlar tahıl, bira, şarap, hayvan yemi, balık, et, süt endüstrilerinde kullanılmaktadırlar. Gıda endüstrisinde proteazlar ve diğer enzimlerle yapılan üretim, fiziksel ve kimyasal yöntemlerle yapılan üretimden üstündür. Enzimatik üretimin avantajları; ılımlı koşullarda gerçekleşmesi, istenmeyen yan reaksiyonların olmaması, sadece spesifik reaksiyonların gerçekleşmesi sonucu yan ürün oluşumunun görülmemesidir.

Sistein proteazlar funguslar tarafından hem hücre içi hem de hücre dışı şekilde sentezlenir. Katalitik açıdan aktif oldukarı pH aralığı 5-8'dir. İyodoasetik asit, metal iyonları ve sülfidril bileşiklerine karşı oldukça duyarlıdır. Potasyum siyanat, sistein ve EDTA gibi maddeler sayesinde aktive edilebilirler. Sistein proteazlar aktif konumlarına göre klostripain ve streptokokal proteazlar şeklinde sınıflandırılırlar.

Genellikle funguslar tarafından sentezlenen aspartik proteazlar nispeden  $3 \leq pH \leq 4$  aralığında yüksek katalitik aktivite sahiptir. Bakır iyonları varlığında epoksi ve diazoketon bileşiklerine karşı duyarlıdır. Molekül kütleleri 30-45 kDa, izoelektrik noktaları  $pH=3.4-4.6$  aralığındadır. Birçok fungal proteaz  $pH \geq 7$  koşullarında kararsızdır. Endüstriyel üretimleri nötral ve alkali pH koşullarında gerçekleşmemektedir. Rennin ve pepsin benzeri proteazlar şeklinde sınıflandırılırlar.

Metalloproteazların optimum pH değeri 5-9 arasındadır. Metal iyonları ile kompleksler veren EDTA gibi bileşiklere karşı duyarlıdır. Serin proteazlar inhibitörlerinden ve sülfidril bileşiklerinden etkilenmez. EDTA ile inhibe edilen bu grup enzimlerin çoğu çinko, kalsiyum, kobalt iyonları ile yeniden aktive edilebilir. Bakteri ya da fungus kökenli metalloproteazların birçoğunda bir enzim molekülü bir atom çinko içerir. Çinko atomu enzimin katalitik aktivitesi için önemli işleve sahiptir. Metalloproteazların protein yapısını kararlı tutmak için 1 enzim molekülü 0.2-4 atom kalsiyum miktarına gereksinim duyar. Metalloproteazlar; asit proteazlar, nötral proteazlar, alkali proteazlar, miksobakter proteaz-I ve -II şeklinde sınıflandırılırlar.

Proteaz enzimleri peptit bağlarını hidrolize ettikleri için hidrolazlar grubuna yer alır. Hidrolitik enzimler yani hidrolazlar Çizelge 1.2’de gösterildiği gibi başlıca ester, glikosidik ve azot bağlarını hidrolizleyen enzimler olarak üç gruba ayrılırlar (Bailey ve Ollis. 1986). Peptit bağlarını hidrolizleyen proteolitik enzimler de proteazlar (proteinaz) ve peptidazlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Proteazların fizikokimyasal ve katalitik özellikleri dikkate alındığında peptidazlardan daha kompleks yapıya sahiptir.

**Çizelge 1.2** Hidrolitik enzimler

Enzim	Substrat	Hidroliz ürünü
<i>Esterazlar</i>		
Lipaz	Gliseridler	Gliserol+ yağ asitleri
Pektin esteraz	Pektin metilester	Metanol+poligalakturonik asit
<i>Karbohidrazlar</i>		
Fruktosidaz	Sukroz	Fruktoz+glukoz
$\beta$ -Glukosidaz(Sellobiyaz)	Sellobiyoz	Glukoz
$\beta$ -Galaktosidaz(Laktaz)	Laktoz	Galaktoz+glukoz
<i>Amilaz</i>	Nişasta	Maltoz/glukoz+ maltooligosakkarit
<i>Azotlu bileşikler</i>		
Proteaz	Proteinler	Polipeptidler
Polipeptidaz	Proteinler	Amino asitler
<i>Desaminazlar</i>		
Deaminaz	Amino asit	NH <sub>3</sub> +organik asit
Üreaz	Üre	NH <sub>3</sub> +CO <sub>2</sub>

## 1.2 Proteaz Enziminin Endüstriyel Boyutta Üretimi ve Kullanım Alanları

Proteazlar katalitik aktivitelerine göre yukarıda da belirtildiği gibi ekzoproteazlar ve endoproteazlar şeklinde sınıflandırılmaktadır. Ekzoproteazlar bir peptit substratının ayırdığı ucuna göre aminopeptidaz ve karboksipeptidazlar olmak üzere endopeptidazlar ise substratın peptit zincirini uçtan uzakta bir yerde ayırır. Endüstriyel boyutta hücre dışı enzimlerin üretimi mikroorganizmaların biyodönüşüm süreçlerinden elde edilir. Bu süreci ardışık şekilde gerçekleştirilen ayırma ve saflaştırma prosesleri izler. Tüm bu süreç kısa işletim süresi içinde yüksek ürün

verimliliği ile gerçekleşir. Ekonomik proses girdisi ve ayrıca ikincil enzim ya da ikincil metabolit ürünlerin minimum ürün seçimliliği sayesinde proteaz üretim proseslerinin avantajları arasındadır. Bazı proteolitik enzimlerin endüstriyel uygulamaları Çizelge 1.3’de gösterilmiştir. .

**Çizelge 1.3** Bazı proteolitik enzimlerin endüstriyel uygulamaları

Enzim	Uygulama alanı
Bakteriyal proteaz	Deterjan endüstrisi, Et yumuşatma işlemleri Kuru temizleme Fotoğraf filminden gümüşün uzaklaştırılması
Fungal proteaz	Et yumuşatma
Papain	Et yumuşatma
Pepsin	Bebek yiyeceklerinin hazırlanması
Rennin	Peynir üretimi

Endüstriyel boyutta proteaz enzimi üretimi yarı katı ya da sıvı ortam koşullarında gerçekleştirilir (Keay ve ark., 1972). Geleneksel üretim ortamları arasında yer alan yarı katı üretim ortamı yaygın olarak uygulanan mikrobiyal enzim üretim sürecidir. Günümüzde halen *Aspergillus oryzae* ve *Mucor* proteazların üretimleri yarı katı üretim ortamı ile yapılmaktadır. Ancak kontaminasyon geleneksel üretim ortamlarının en büyük darboğazıdır. Çünkü yarı katı üretim ortamının sterilizasyon süreci ve steril ortamın kontaminasyonunun engellenmesi çok zordur. Sıvı kültür ortamlarında proteaz enzimlerinin üretimi maliyetin düşük olması, kontaminasyon problemlerinin daha az olması, kolay proses kontrolü gibi üstünlükler sunar. Çizelge 1.4’de endüstriyel boyutta üretimleri gerçekleştirilen proteaz enzimleri değişik proses ve endüstrilerde potansiyel kullanım alanları özetlenmiştir (Wiseman, 1993; Gerze, 2003; Taşdelen, 2006).

**Çizelge 1.4** Proteazların değişik endüstri ve proseslerde potansiyel kullanımları

Endüstri	Uygulama alanı
Deterjan endüstrisi	Katalitik aktiviteleri 1 yıl süresince koruyabilen mikrobiyel serin proteazlar yüksek katalitik performansları sayesinde pH=9–11 aralığında 1 h süreyle 95 °C'ye ulaşan koşullarda aktivite gösterebilir.
Deri endüstrisi	Hayvan postu ve deri proteinlerden oluşur. Epidermal bazal membran yapısındaki proteinler ile saç ve kılların yapısındaki keratinler, alkaliler ve sülfürler kullanılarak kolayca yok edilebilir. Bu nedenle kıl ve yünden arındırma proseslerinde geleneksel olarak kalsiyum oksit ve sodyum sülfür kullanılmaktadır. Hayvan derilerinin özellikle taze kısımlarının kalsiyum oksit ve sodyum sülfür ile muameleleri elle yapılır. Bu sayede kıl ve yünler hızlı bir şekilde temizlenir. Fakat atık suda biriken organik maddelerin oksitlenmesi işleminin maliyeti yüksektir ve sülfürler atık sudan oksidasyon ve çöktürme ile azaltılmalarına rağmen tamamen uzaklaştırılamayan sülfürler ciddi tehlikeler yaratmaktadır. Enzimlerin bu proseslerde kullanılmaları gerekli kalsiyum oksit miktarını yarıya indirgemektedir. Gerekli olan enzim miktarı ise derinin tipine ve kalitesine bağlıdır.
Peynir üretimi	Proteazlar peynir üretiminde sütün kesilmesi ya da pıhtılaşması için kullanılır.
Bira yapımı	Proteinler düşük kaliteli malt içerisinde yetersiz oranda sindirilirler. Bu da bira mayalarının besinleri olan amino asitlerin yetersiz miktarda olmasına yol açar. Bununla beraber amino asitlere indirgenmemiş proteinler bira kalitesini bozar ve stabilite problemleri yaratırlar. Bira proseslerinde alkali proteazların kullanımı bira kalitesinin artırılmasında önemli rol oynar.
Membran temizlenmesi	Membranların üzerinde biriken ve film tabakası oluşturarak membranın çalışmasını engelleyen protein molekülleri, proteaz enzimi içeren membran temizleme formülasyonları yardımıyla giderilir.
Atık işleme	Alkalin proteazlar, gıda endüstrisindeki çeşitli proseslerden ortaya çıkan atıkların ve evsel atıkların işlenmesinde potansiyel uygulamalara sahiptir.
İlaç endüstrisi	Sindirim sistemini desteklemek için üretilen ilaçlarda proteaz enzimleri kullanılmaktadır.
Klinik uygulamalar	Proteazlar kan ve dokulardaki uyuşturucu madde tanısında kullanılmaktadır. Uyuşturucu maddelerin ara ürünleri vücuttaki proteinleri bağladıkları için kan ve doku örneklerine proteaz enzimi uygulandığında proteinlerin yıkılmasını sağlayarak uyutucu maddeler açığa çıkmaktadır.



### 1.3 Enzimlerin İmmobilizasyonu

1916 yılında Nelsen ve Griffin odun kömürü üzerine adsorbe edilmiş maya invertaz enziminin sukrozun hidrolizini katalizleyebildiğini gözlemlemişlerdir. Bu gelişmenin ardından fizyolojik olarak aktif proteinlerin kovalent bağlanma ile çeşitli taşıyıcılar üzerine immobilizasyonu konusunda çok sayıda yayın yayımlanmıştır. Bütün bu çalışmalara rağmen 1953 yılında Grubhofer ve Schleith'in karboksipeptidaz, diastaz, pepsin ve ribonükleaz gibi enzimleri kovalent bağlanma metoduyla diazolanmış poliaminostiren reçinesi üzerine immobilize etmişlerdir. 1956 yılında katalaz enziminin DEAE-selüloz üzerine iyonik bağlanmayla immobilizasyonu, 1963 yılında tripsin, papain, amilaz ve ribonükleazın tutuklama yöntemiyle poliakrilamit jel içerisine immobilizasyonu, 1964 yılında karboksipeptidaz A enziminin glutraldehitte çapraz bağlanması ve karbonik anhidraz enziminin mikrokapsüllemesi, 1971 yılında ise amiloglukozidaz içeren lipozomların hazırlanması çalışmaları yapılmıştır. 1969 yılında Chibata ve arkadaşları fungal amino açilaz enzimini DEAE Sephadex üzerine iyonik bağlanma metodu ile immobilize etmişlerdir. Bu yöntem immobilize enzimlerin endüstriyel uygulamalarının ilki olmuştur. Chibata ve arkadaşları 1973 yılında mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonunun ilk endüstriyel uygulamalarını gerçekleştirmişlerdir. Chibata ve arkadaşları yüksek aktiviteye sahip aspartaz içeren *Escherichia coli* hücrelerinin poliakrilamit jel içine tutuklanmasını sağlayarak amonyum fumarattan L-aspartat üretmişlerdir (Taşdelen, 2006).

İmmobilize enzimler katalitik aktivitelerini koruyarak, sınırları belli bir bölgeye fiziksel olarak hapsedilmiş, tekrarlı ve sürekli kullanılabilen enzimler olarak tanımlanabilir. İmmobilize enzimler serbest enzimlerin dezavantajlarını ortadan kaldır ve kararlı olmalarına olanak sağlar. İmmobilizasyon prosesinin en önemli avantajı, enzimin katalizlediği reaksiyon ürünlerinden kolayca ayrılabilmesidir. İmmobilize enzimler, filtrasyon ve santrifüjleme prosesleri ile tekrar kullanılmak üzere kolayca geri kazanılabilmeleri ve sabit yatak, akışkan yatak ya da karıştırmalı tank reaktör gibi sürekli proseslerde kullanılabilmeleri gibi klasik heterojen katalizörlerin sağladığı avantajların tümüne sahiplerdir. İmmobilize enzimlerin bir diğer avantajları ise tekrar kullanılabilir olmaları, enzimin reaksiyon ortamından çekilmesiyle reaksiyonun hızlı bir şekilde sonlandırılması (ya da tam tersi) ve reaksiyonlardan sonra aktivitelerindeki kaybın az olmasıdır. Diğer fiziksel ve

kimyasal proseslerde olduğu gibi immobilizasyonun hızı ve verimi özellikle taşıyıcının cinsine, immobilizasyon yöntemine, derişimine, pH'a, sıcaklığa ve reaksiyon süresine bağlıdır (Taşdelen, 2006).

Serbest enzimler ile kıyaslandığında immobilize formdaki enzimler sayesinde; reaksiyon ortamından kolayca uzaklaştırılabilmekte, tepkime ürününün enzim atığı içermesi önlenebilmekte, biyoproses koşullarına karşı dayanım artırılabilmekte, uzun süre reaksiyon ortamlarında yeniden kullanılabilirliği artırılabilmekte, seri ve paralel reaksiyonların yer alacağı biyokatalitik reaktör sistemlerin geliştirilmesiyle hem ürün seçimliliği hem de verimliliğin kontrolü sağlanabilmekte, doğal enzimlere kıyasla kararlılıkları geliştirilebilmekte ve ayrıca bazı durumlarda serbest enzimlere kıyasla daha yüksek aktivite gösterebilmektedir.

### **1.3.1 İmmobilizasyonun avantajları**

İmmobilizasyon prosesinin en önemli avantajı enzimin katalizlediği reaksiyon ürünlerinden kolayca ayrılabilmesidir. Böylece enzim kontamine olmaktan korunur ve enzimi saflaştırma işlemleri azalır (Aehle, 2004). İmmobilize enzimler klasik heterojen katalizörlerin sağladığı avantajların tümüne sahiptir. Bunlar filtrasyon ve santrifüjleme prosesleri ile tekrar kullanılmak üzere kolayca geri kazanılabilmeleri ve sabit yatak, akışkan yatak ya da karıştırmalı tank reaktör gibi sürekli proseslerde kullanılabilmesidir. İmmobilize enzimlerin diğer avantajları tekrarlı kullanılabilir olmaları, enzimin reaksiyon ortamından çekilmesiyle reaksiyonun hızlı bir şekilde sonlanması (ya da tam tersi) ve reaksiyonlardan sonra aktivitelilerindeki kaybın az olmasıdır (Taşdelen, 2006).

### **1.3.2 İmmobilizasyon parametreleri**

Fiziksel ve kimyasal proseslerde olduğu gibi, immobilizasyonun hızı ve verimi özellikle taşıyıcının cinsine, immobilizasyon yöntemine, derişime, pH'a, sıcaklığa ve reaksiyon süresine bağlıdır. Çözünmez gözenekli taşıyıcılar kullanılarak enzimlerin bağlanması yöntemi, laboratuvar çalışmaları ve endüstriyel uygulamalar için standart bir yöntemdir. Enzim dış yüzeyinin ve taşıyıcının fonksiyonel gruplarının özellikleri taşıyıcılara kimyasal bağlanma esnasında çok önemli rol oynar. Adsorpsiyon yüzeyin hidrofilik ve hidrofobik olma karakteristiğine bağlıdır. Hakim olan iyonik gruplar ve bu grupların amino asitlerle olan etkileşimleri çözeltinin pH'ı ile değişen ve tüm

yüzeyin karakteristiğini belirleyen elektriksel yüke ve iyonik grupların yoğunluğuna bağlıdır. Kovalent bağlanmada, protein yüzeyine erişebilir olan çok sayıda fonksiyonel grup kullanılabilir. Bunun yanı sıra, özellikle lizin ve arjininin amino grupları, aspartik ve glutamik asitin karboksil grupları gibi az sayıda amino karboksil grup pratik olarak kullanılabilir. Enzim ile taşıyıcı yüzeyi arasındaki iyonik, hidrofilik veya hidrofobik ve hidrojen bağlar ile olan güçlü etkileşimler enzimin kararlılığını etkiler. Çok sayıdaki güçlü etkileşimler taşıyıcı yüzeyinde tersinmez adsorpsiyona neden olabilir. Bunun sonucu olarak enzim aktivitesinde kayba neden olur. Bu istenmeyen durum ayrıca proteinin üçüncül yapısında da konformasyonel değişikliklere neden olabilir. Ortaya çıkan bu etkiler özellikle katı taşıyıcı yüzeylerindeki çoklu etkileşimlerde gözlenebilir. Bazı durumlarda uygun bir miktarda boşluk yaratıcı ajan olarak bilinen kimyasalların kullanılması taşıyıcıyı immobilizasyona elverişli hale getirerek enzimi korur ve enzimin inaktivasyonunu engeller. Enzimin korunması için belli miktarda pasif ve ucuz bir protein adsorbe edilir (Taşdelen, 2006).

### **1.3.3 İmmobilizasyonda kullanılan taşıyıcılar**

İmmobilize enzimlerin özellikleri hem enzimin hem de taşıyıcı maddenin özelliklerine bağlıdır. İmmobilize edilmiş enzimin pratik uygulamaları için enzim ile taşıyıcı arasındaki etkileşimler, enzimin tespit edilmesi gereken fizikokimyasal ve kinetik özellikleri hakkında katkı sağlar. Taşıyıcı, immobilize enzimin operasyonel performansını önemli ölçüde artırabilmesi için çok akıllıca seçilmelidir (Krajewska, 2004). Tüm enzimler ve enzim uygulamaları için genel bir taşıyıcı bulunmazken taşıyıcı olarak kullanılacak maddelerde aranılan birçok özellik olmalıdır. Bunlar:

- i. Proteinlere karşı yüksek ilgi kimyasal modifikasyonlar ve enzimle direkt olarak reaksiyona girebilmesi için gerekli fonksiyonel grupların varlığı
- ii. Hidrofiliklik
- iii. Yenilenebilirlik
- iv. Mekanik kararlılık ve rijitlik
- v. Seçilen biyotransformasyon için farklı geometrik şekillerde ve istenilen yüzey alanlarında hazırlanabilme kolaylığı
- vi. Geniş yüzey alanı
- vii. Kimyasal kararlılığının yüksek olması
- viii. Uygun tanecik çapı / boyutu (0.2-1 mm / 30-60 mm)

- ix. İyon değiştirebilme kapasitesinin yüksek olması
  - x. şisme kabiliyetinin düşük olması
  - xi. Mikrobiyel kararlılığının yüksek olması
  - xii. İnsan ve çevre sağlığına zarar vermemesi
  - xiii. Elastikiyetinin yeterli olması
  - xiv. Maliyetinin düşük olması
  - xv. Doğal ortamlara zarar vermeyecek maddelere indirgenebilmesi
- gibi birkaç madde halinde sayılabilir (Krajewska, 2004).

#### **1.2.4 İmmobilizasyonda genel olarak kullanılan taşıyıcıların sınıflandırılması**

Enzim immobilizasyonunda yukarıdaki özelliklerin büyük bir kısmına sahip inorganik, doğal kaynaklardan elde edilen organik ve organik+sentetik taşıyıcılar gibi çok çeşitli taşıyıcılar kullanılabilir (Taşdelen, 2006).

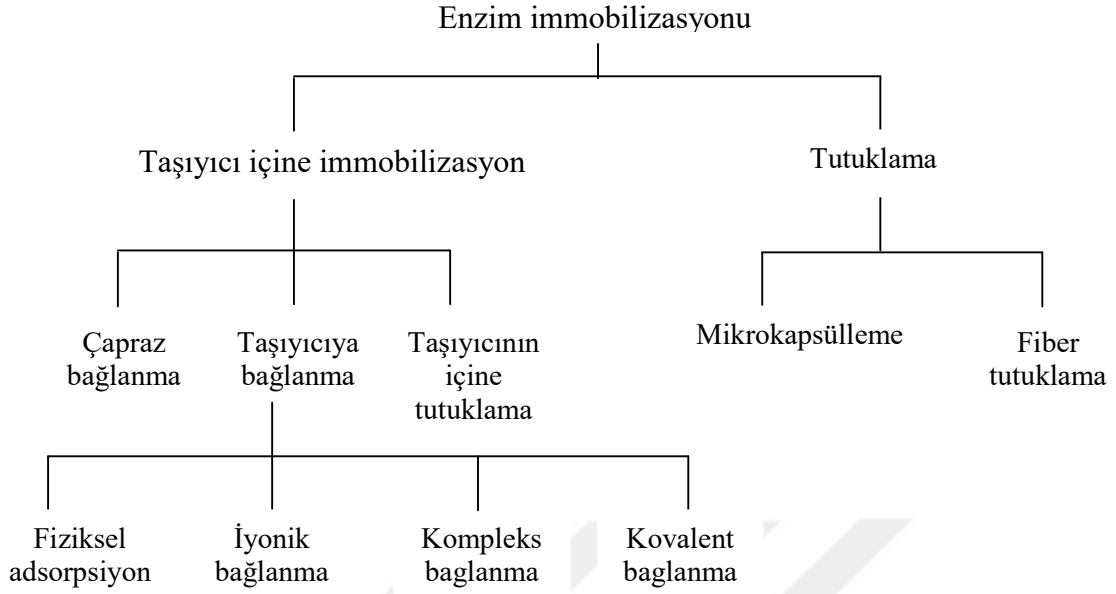
İnorganik taşıyıcılar:

- i. Gözenekli cam
- ii. Gözenekli silika
- iii. Alümosilika doğal kaynaklı organik taşıyıcılar
- iv. Polisakkaritler
- v. Çaprazlanmış dekstranlar
- vi. Proteinler

Organik+sentetik taşıyıcılar:

- i. Metilakrilat türevleri
- ii. Akrilamid türevleri
- iii. Vinilasetat türevleri
- iv. Maleik asit anhidrit-türevleri
- v. Poliamitler
- vi. Polistiren türevleri
- vii. Polipropilen
- viii. Sepatanecikleri

Bazı enzimler, immobilizasyon işleminin sonrasında otokataliz yani kendini parçalamaya olasılığını da azaltılabilmektedir (Telefoncu, 1997). şekil 1.4'de immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması gösterilmiştir.



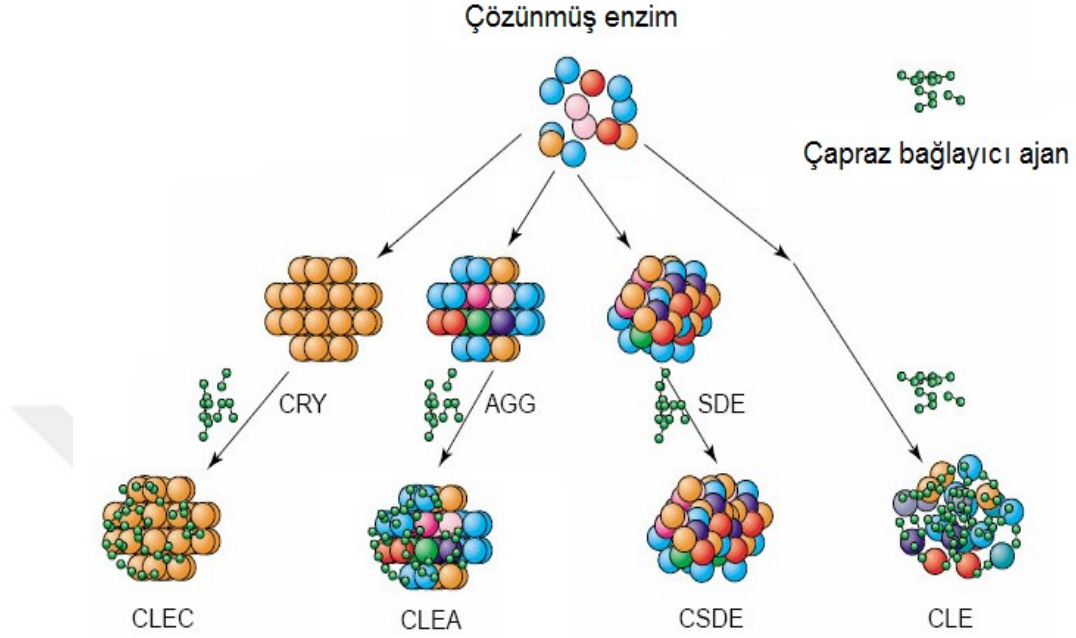
**Şekil 1.4** İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Taşdelen, 2006).

### 1.3.5 Taşıyıcısız enzim immobilizasyonu

Taşıyıcılı enzim immobilizasyon sistemlerinde enzimin aktivitesi taşıyıcı olarak kullanılan materyalin katalitik olmayan kütesinden dolayı birim biyokatalizör kütesi başına aktivite kayıplarına yol açmaktadır. Taşıyıcısız enzim immobilizasyonu, taşıyıcılı enzim immobilizasyon sistemlerinin yarattığı olumsuzlukları ortadan kaldırmak için alternatif olarak geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu yönteme göre taşıyıcıya ihtiyaç olmaksızın enzimlerin birbirlerine çapraz bağlanması ile immobilizasyon gerçekleştirilir. Bu yöntemin temel amacı; diğer immobilizasyon yöntemlerine kıyasla enzimlerin katalitik aktivitesini arttırmak, yüksek seçicilik kazandırmak ve daha düşük maliyetli biyokatalizör sistemlerini geliştirmektir (Yu ve ark., 2006). Taşıyıcısız enzim immobilizasyon sistemlerine yönelik çalışmalar aşağıda belirtildiği gibi dört farklı grupta sınıflandırılabilirler (Mateo ve ark., 2003).

1. Çapraz bağlı çözülmüş enzim (CLE, Cross-linked enzymes)
2. Çapraz bağlı enzim kristalleri (CLEC., Cross-linked enzyme crystals)
3. Çapraz bağlı püskürtülerek kurutulmuş enzim (CSDE, Cross-linked spray dried enzyme)
4. Çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA, Cross-linked enzyme aggregates)

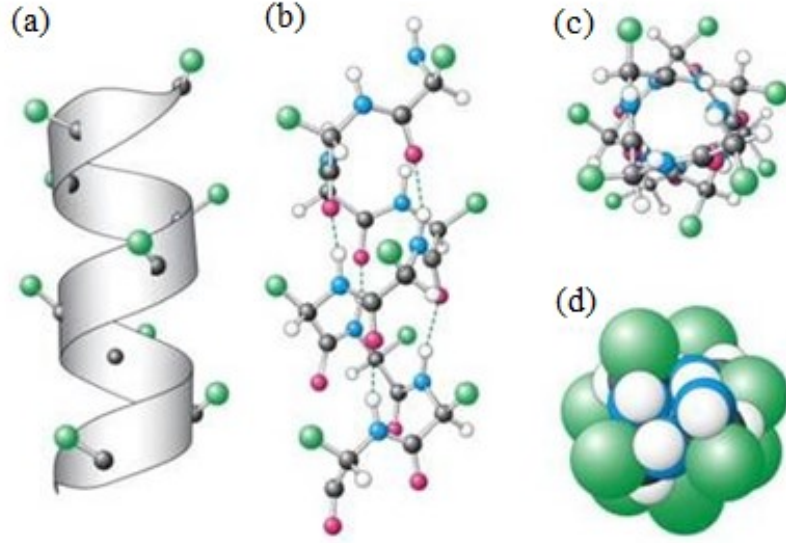
Sulu çözeltilerden yola çıkılarak taşıyıcısız enzim immobilizasyon sistemlerinin geliştirilmesine yönelik adımlar Şekil 1.5’de görülmektedir.



**Şekil 1.5** Taşıyıcısız enzim immobilizasyon süreçleri (Sheldon ve ark., 2005).  
CRY: Kristal. AGG: Agregat. SDE: Püskürtülerek kurutulmuş enzim

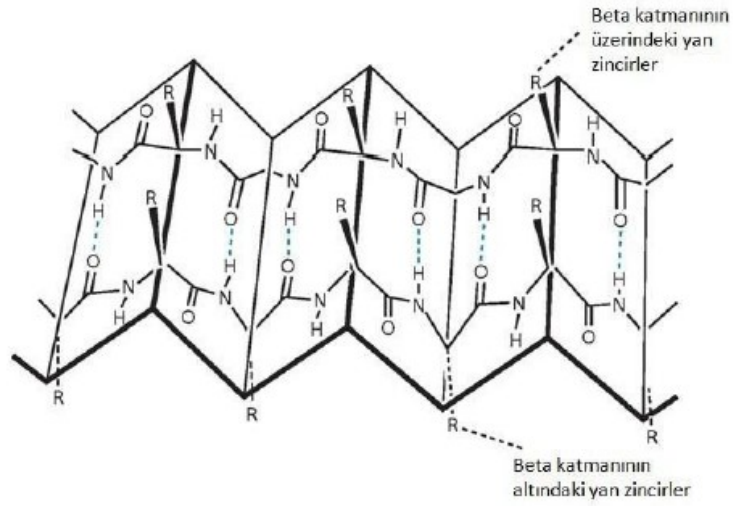
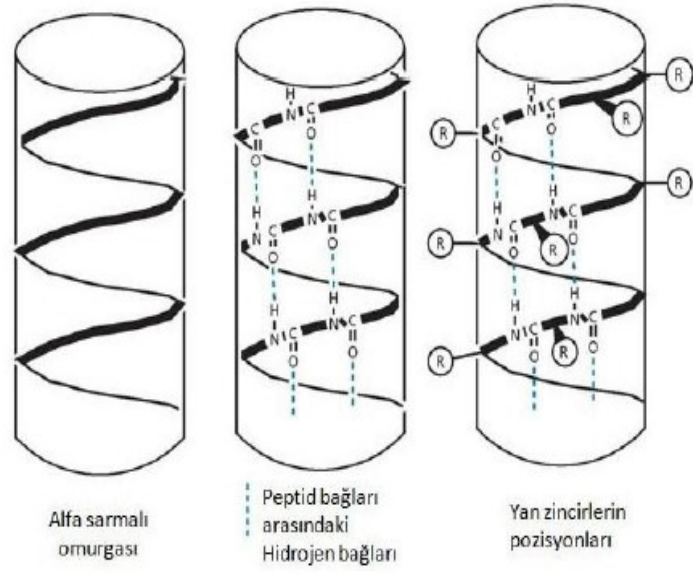
#### 1.4 Enzimlerin Üç Boyutlu Yapıları

Proteinleri yapısal ve işlevsel olarak birbirlerinden farklı kılan, amino asit dizilimleri ve konformasyonlarının farklılığıdır. Çoğu protein Şekil 1.6’da gösterildiği gibi benzersiz 3 boyutlu yapılarına katlanır. Proteinin kendiliğinden katlandığı yapısı doğal (native) konformasyonu olarak bilinir. Genellikle zaman protein yapıları dört bölümde inceler:



**Şekil 1.6** Proteinlerde birincil (a), ikincil (b), üçüncül (c) ve dördüncül yapıları (d).

- Birincil yapı: *Aminoasit düz zincirine verilen addır. Proteinin 3 boyutlu yapısı veya fonksiyonu hakkında bilgi vermez.*
- İkincil yapı: *Hidrojen bağları ile kararlı kılınmış düzenli olarak yinelenen lokal yapılardan meydana gelir. En yaygın örnekleri alfa sarmalı, beta katmanı ve kıvrımlardır. İkincil yapılar lokal olduğu için aynı proteinin içinde farklı ikinci yapılara sahip pek çok bölge bulunabilir. Alfa sarmal ve beta katmanı yapıları Şekil 1.7’de gösterilmiştir.*
- Üçüncül yapı: *Tek bir proteinin tamamının şeklidir. İkincil yapıların birbirleriyle olan uzaysal ilişkisini içerir. Proteinin üçüncül yapısı genelde lokal olmayan etkileşimler tarafından stabilize edilir. Bunlar hidrofobik çekirdekler, tuz köprüleri, hidrojen bağları ve translasyon sonrası modifikasyonlardır. Üçüncül yapı terimi genellikle eş anlamlı olarak katlanma terimi yerine kullanılır.*
- Dördüncül yapı: *Proteinlerin genellikle protein alt birimleri adı verilen polipeptid zincirleri tarafından oluşturulan ve tek bir protein kompleksi halinde fonksiyon gösteren yapılarına verilen addır.*



Şekil 1.7 Alfa sarmal ve beta katman yapıları.

### 1.5 Enzimlerin İkincil Yapı Analizleri

Enzimlerin üç boyutlu yapısı, onların denatürasyonuna ve aktivite kaybına neden olan ekstrem koşullar altında önemli ölçüde değişebilir (Liu ve ark., 2013). Peptit gruplarının titreşimlerinden kaynaklanan Amid bantları polipeptitler ve proteinlerin ikincil yapısı üzerinde bilgi sağlar. Protein yapısal çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bantlar Amid I, II ve III bantlarıdır (Haris ve Severcan, 1999).



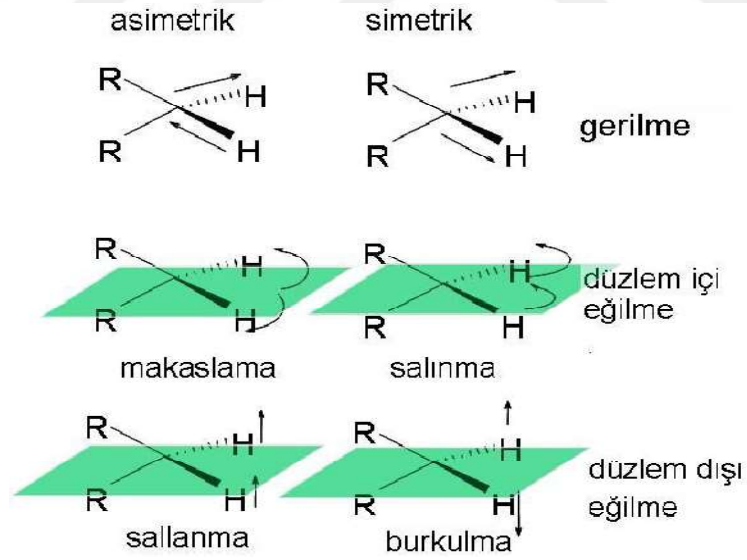
Amid I bandı genel olarak peptit gruplarının C=O gerilme titreşimlerinden ortaya çıkar (Dzwolak ve ark., 2001). Amid II bandı C-N gerilme titreşimlerinin katkısı ile ilk olarak N-H eğilmesinden kaynaklanır. Amid III adsorpsiyonu ilk olarak N-H eğilmesi ve C-N gerilme titreşimlerinden oluşan normale göre oldukça zayıf infrared banttır (Haris ve Severcan, 1999). Amid I bandı absorpsiyonu 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinde oluşur. Hidrojen bağları ve geçiş dipolleri arasındaki eşleşme, amid bantlarının konformasyonel hassaslığı yönetmede en önemli faktörler arasındadır. Amid I bantlarının 1620-1640  $\text{cm}^{-1}$  spektral aralığı  $\beta$ -sheet yapısı olarak adlandırılır. Bazı proteinler için  $\beta$ -sheet yapısı 1620  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısından daha da aşağısında gözlemlenebilir. Homopolipeptit poli-L-lizin için  $\beta$ -sheet yapısı 1610  $\text{cm}^{-1}$  gözlemlenmiştir. Anti paralel  $\beta$ -sheet yapısı ise 1670-1695  $\text{cm}^{-1}$  civarındaki diğer bantların varlığında tespit edilebilir (Haris ve Severcan, 1999).

Protein ikincil yapıların belirlenmesinde kullanılan geleneksel yöntemler arasında nükleer manyetik rezonans (NMR), sirküler dikroizm (CD), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve Raman/Raman optik aktivite spektroskopisi gelmektedir (Lewis ve ark., 2013). Bunun yanı sıra, x-ışını kırınımı (XRD) proteinin üç boyutlu yapısının belirlenmesi için mükemmel bir teknik olmasına karşın birçok dezavantaja sahiptir. Bu dezavantajlar şu şekilde sıralanabilir. Kristalografik çalışmalar, membran proteinlerinde olduğu gibi birçok protein için geçerli olmayan yüksek kaliteli kristal form gerektirir ve kristal halindeki proteinin yapısı çözelti içindeki yapısıyla benzer olmayabilir. X-ışını kırınım verisi, biyolojik sistemlerde dinamik doğası ile protein yapısını yansıtmadığı gibi protein yapısını doğuran sunar. Yöntemin yavaşlığıda ayrı bir dezavantajdır.

NMR spektroskopisi çözelti içindeki protein yapı çalışması için daha iyi esnekliğe sahiptir. Ancak büyük molekül ağırlıklı proteinlerin NMR spektrumlarının yorumu çok karmaşıktır ve teknik küçük proteinler ile (~30 kDa) şimdilik kısıtlıdır.

FTIR, proteinlerin yapısal karakterizasyon için son dönemde popüler hale gelen tekniklerden biridir. Moleküler titreşimleri baz alır. Bu titreşimler genel olarak Şekil 1.8'de görüldüğü gibi döndürme, burkulma ve gerilme titreşimleridir. FTIR cihaz kullanımının gelişimi ile su içinde seyreltilmiş protein çözeltilerinden gelen yüksek kalitede spektrum elde etmek şuanda mümkündür. Protein çözeltilerinin spektrumlarından gelen örtüşmüş su moleküllerinin adsorpsiyon pikleri

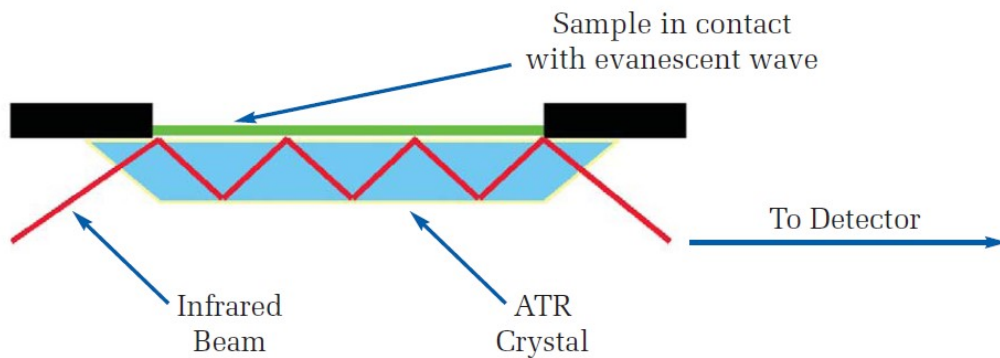
dekonvolüsyon yöntemi ile ortamdan uzaklaştırılabilir. Ayrıca proteinlerin spektrumlarında geniş kızılötesi bantlar dekonvolüsyon prosedürleri ve ikincil sapmalar kullanılarak detaylı olarak analiz edilebilir. FTIR tekniğinin diğer avantajları ise şu şekilde sıralanabilir. Gereksinim duyulan protein miktarı nispeten azdır (10 µg). Proteinin boyutu önemli değildir. Floresan etkileri veya ışık saçılması yoktur. Kinetik veya zamana bağımlı çalışmalar mümkün olabilir ve diğer cihazlar ile kıyaslandığı zaman ekipmanlarının maliyeti düşüktür. Aynı zamanda yaklaşık 1 mg/mL gibi daha düşük protein derişimi kullanıldığı zaman yüksek kalitede spektrum elde etmek mümkündür. Su içinde çözündürülmüş bir protein için yüksek gürültü/sinyal oranını elde etmek için 200-400 tarama yeterli iken döteryum içinde çözündürülmüş bir proteinde 100-150 tarama yeterlidir. Su içinde çözündürülmüş proteinlerde ortamlardaki su piki nedeniyle tarama sayısındaki artış sonucunda daha net pikler elde edilebilir. Düşük gürültü/sinyal oranı elde edebilmek için spektrometrenin örnek bölümünden gelen su buharının giderilmesi gereklidir. Çünkü hassas Amid I pik konformasyonu ile dar su buharı pikleri çakışır (Haris ve Severcan, 1999).



**Şekil 1.8** Gerilme, döndürme ve burkulma titreşimleri.

## 1.6 FTIR ile İkincil Yapıların Analizi

FTIR spektroskopisi kullanılarak proteazların doğal ikincil ve üçüncül yapılarını koruyan kovalent olmayan kuvvetlerinin (hidrojen bağları iyonik , hidrofobik ve Van der Waals etkileşimleri) değişimlerini bilmek çok kolaydır (Liu ve ark., 2013). FTIR moleküler bağların niteliğini belirlemek amacıyla maddelerin yapısındaki bağları araştırmak için kullanılan temel bir spektroskopik cihazdır. FTIR tekniği genel olarak organik moleküller arasında işlevsel grupların tanımlanması için kullanılmaktadır. FTIR tekniğinde geleneksel olarak bir iletim hücresi ya da bir KBr (potasyum bromür) pellet ile birlikte kullanılır. Zayıflatılmış toplam yansıma (ATR) yüzey hassasiyetini anlamlı bir şekilde artırır ve FTIR tekniği ile ikincil yapılarının aydınlatılmasında kullanılan donanımdır. Adından da anlaşılacağı gibi ATR, yansıma geometrisinin belirli bir türünü ifade eder. FTIR iletiminde kızılötesi ışın bir numunenin kalınlığı boyunca düz bir yolda hareket etmesine karşın ATR’de kızılötesi ışın bir kristal boyunca yansır. Işın toplam iç yansımayı sağlayan bir açıyla kristal içinde sıçrama odaklıdır. ATR’nin tipik analiz yöntemi Şekil 1.9’da gösterilmiştir. Numunenin enerjiyi absorpladığı kızılötesi spektrum bölgelerinde, genliği azalan dalga zayıflatılmış ya da değişmiş olacaktır. Genliği azalan dalgadan gelen zayıflatılmış enerji IR ışınından geri geçerek kristalin öteki ucundan çıkar ve IR spektrometro dedektörüne aktarılır. Sistem daha sonra bir kızılötesi spektrum oluşturur ([http://shop.perkinelmer.com/content/TechnicalInfo/TCH\\_FTIRATR.pdf](http://shop.perkinelmer.com/content/TechnicalInfo/TCH_FTIRATR.pdf)).



Şekil 1.9 Tipik ATR ışını analiz yöntemi.

Sıvı ve katı içeren numuneler basitçe ATR kristali yüzeyine belli bir basınç uygulanarak bastırılır. ATR kristali ilgili bölgede numuneyi asgari miktarda absorbe eder. ATR tekniği ile analizlerin seçiminde ön plana çıkan çeşitli faktörler vardır. Ancak bu kriterler içerisinde en baskın olanı yüzey hassasiyetidir. Dönüşümlü kızılötesi ışını hem parçacığın yüzeyini hem de içeriğini inceler. ATR, sadece kristal yüzeyine yaklaşık olarak bir mikrometre kalınlığındaki maddelerin IR spektrumlarının alınmasında kullanılır. Gaz ile çalışılan türlerde doğal durumunda ölçüm (ya da reaksiyon devam ederken yapılan ölçümler) yalnızca tipik bir iletim hücresi ile gerçekleştirilebilir. Doğal konumunda (*in-situ*) ölçümler ATR ile de gerçekleştirilebilir. Yukarıdaki kurulumu sıvı veya gazların akışını sağlayacak bir üst plaka eklenerek *in situ* hücre şekline dönüştürülebilir. Özellikle ATR tekniği ile katalitik sistemlerin kinetik analizlerinde de kullanım potansiyeli bulunmaktadır (<http://www.temple.edu/strongin/atr.html>).

FTIR sistemlerinde Nernst çubuğu, global çubuğu, tungsten-flaman lambası, cıva ark lambası ve nikrom teli kullanılan ışık kaynaklarıdır. Nernst çubuğu, uzunluğu 20 mm ve çapı 1-2 mm olan nadir toprak metali oksitlerinden yapılmıştır. Global çubuğu 5 mm çapında ve 500 mm uzunluğunda silisyum karbürden oluşmuş bir silindirdir. Tungsten-flaman lambası dalga boyu 0.78-2.5  $\mu\text{m}$  (yakın infrared) arasındaki bölgesinde ışımaya yapan bir ışık kaynağıdır. Cıva ark lambası uzak infrared (50 $\mu\text{m}$  den büyük) bölgesi için kullanılan bir ışık kaynağıdır. Nikrom teli ise ışık kaynağı uzun ömürlüdür.

FTIR cihazlarında kullanılan detektör tipleri IR cihazlarında kullanılan detektörlere benzerdir. İlk çıkarılan cihazlarda diğer IR detektörlere göre algılama zamanı daha kısa olan triglisin sülfat piroelektrik dedektörler kullanılırdı. Günümüzde ise hassasiyeti daha yüksek olan sıvı azotla soğutulmuş cıva/kadmiyum tellürür ya da indiyum antimonür fotoiletken dedektörler kullanılmaktadır. Analizlerdeki hassasiyetin geliştirilmesine yönelik değişik tipte dedektörler üzerinde bilimsel araştırmalar sürdürülmektedir. 650-4000  $\text{cm}^{-1}$  aralığını kapsayan temel FTIR spektrum alma uygulamalarında bazı enerji sınırlamalarının neden olduğu özel sorunlar en düşük düzeye iner. Örneğin, absorpsiyonun çok düşük olduğu mikro miktarlardaki örneklerle çalışılabilir ve ayrıca 100  $\mu\text{m}$  gibi küçük çaplı taneciklerin spektrumları alınabilir. Spektrumların çok hızlı biçimde alınmasını gerektiren kararsız meddeler için de benzer yöntem uygundur.

Katılar için örnek hazırlamanın en yaygın iki formu ince bir toz halinde malzemeyi öğütme ve bir matris içinde dispersiyon haline getirmeyi amaçlar. Bir kızıl ötesi ışın belirli bir açıdaki yüksek kırılma endeksi ile birlikte optik olarak yoğun kristal üzerine yönlendirilir. Bu iç yansıma kristal ile temas halinde tutulan numune içine kristal yüzeyinin ötesine uzanarak genliği azalan bir dalga oluşturur. Sonuç olarak numune ve kristal yüzeyi arasında iyi bir temas olması gerekir. Tekniğin başarılı olabilmesi için aşağıdaki iki gereksinim karşılanmalıdır.

1. Numune ATR kristali ile doğrudan temas halinde olmalıdır. Çünkü genliği azalan dalga sadece 0.5-5 mikronluk kristalin ötesine kadar uzanmaktadır.
2. Başka bir iç yansıma gerçekleşmemesi için kristalin kırılma indeksi numuneninkinden önemli ölçüde daha büyük olması gerekir. Işın kristal içinde dahili olarak yansıtılmaktan ziyade direkt iletilecektir.

En sık kullanılan ATR kristal materyali elmadır. Elmas yüksek dayanıklılığa ve kimyasal açıdan inert özelliğe sahiptir. Çinko Selenür (ZnSe) ve Germanyum gibi kristaller ATR donanımında kristal materyaller olarak kullanılmaktadır. Bu ATR kristalleri arasında ZnSe daha düşük maliyetli materyal olup sıvı örneklerin analizinde yaygın bir şekilde kullanılmasına karşın pH'ın 5-9 olduğu aralıktaki ölçüm çalışmaları için uygun değildir. Germanyum daha geniş bir pH aralığında kullanılabilme potansiyeline sahip olup zayıf asit ya da baz ortamının analizinde kullanılabilir. Germanyum kristalinin yer aldığı ATR sistemlerinde kırılma indisleri yüksektir. Bu nedenle düşük enerjili bir spektrum elde edilir. Bu yüksek absorptivite materyallerin analizinde avantaj sağlar. Elmas ATR kristali yüksek dayanıklılığı ve mukavemeti ile uzun süre kullanım olanağı sağlar. Genellikle uygun bir çözücü yardımıyla kolaylıkla temizlenir. Temizlik işlemi için genellikle su, metanol ya da propanol kullanılır.

ATR tekniği kullanılarak gerçekleştirilecek spektrum alımları öncesi yüzeyde herhangi bir kirliliğin bulunmaması önemlidir. Sulu sistemlerin analizinde kristal temizlendikten sonra background alınır ve daha sonra örnek kristal üzerine homojen biçimde dağıtılır. Yatay ATR üniteleri nitel çalışmalarda en yaygın kullanılan konfigürasyondur. Katı numuneler ile ATR kristali üzerinde belli bir kuvvette basınçlandırma işlemi uygulanır (Şekil 1.10).



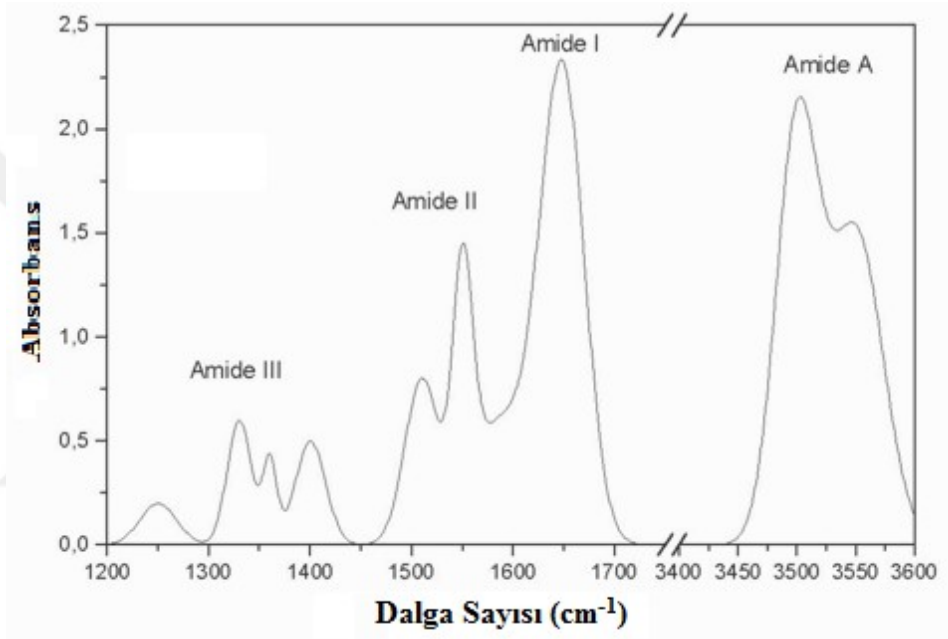
**Şekil 1.10** ATR kristali üzerine numunelerin yerleştirme ve basınçlandırma işlemi.

Katı örneklerin analizinde, örneğin kristal üzerindeki yüksekliği birkaç milimetreden daha fazla olmamalıdır. Katı ya da sıvı örneklerden elde edilen spektrum verilerinin değerlendirilmesinde aşağıdaki belirtilen süreçler gerçekleştirilir.

- i. Absorbans spektrumlarının pürüzsüzleştirilmesi: *Binominal 11 noktadan pürüzsüzleştirilmesi yani smooth işlemi gerçekleştirilir. Bu işlem için genellikle Savitsky-Golay metodu kullanılır. 5 noktadan pürüzsüzleştirme sağlanarak üçüncü derece polinomal işlemleri gerçekleştirilir.*
- ii. Ters evrişim: *Amid I bandı bileşenlerinin saptanabilmesi için gerçekleştirilen smooth adımı sonrası ters evrişim (Fourier Self Deconvoluntion. FSD) işlemi gerçekleştirilir.*

iii. İkincil türev: *Ters evrişimi gerçekleştirilen analizin ikincil türevi alınarak geniş spektrum altındaki spektrumu oluşturan pikler elde edilir* ([http://shop.perkinelmer.com/content/TechnicalInfo/TCH\\_FTIRATR.pdf](http://shop.perkinelmer.com/content/TechnicalInfo/TCH_FTIRATR.pdf)).

Proteinlerin yapısal tekrar birimini oluşturan peptid grubu Amid A, B, I, II, III, IV, V, VI ve VII olarak adlandırılan 9 karakteristik bandtan oluşur ve bu karakteristik bandların yer aldığı dalga sayıları Şekil 1.11’de gösterilmiştir. Amid I ve Amid II bandları protein yapısal karakterizasyonunda en çok kullanılan iki bandtır.



Şekil 1.11 Amid badlarının FTIR-ATR spektrumları.

Amid A bandı, %95’in üzerinde N-H gerilme titreşiminden kaynaklanır. Hidrojen bağ uzunluklarının 2.69-2.85 Å olduğu durum IR spektrumunda 3225 ve 3280  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısında yer alır. Amid I bandı, proteinlerin en yoğun adsorpsiyon verdiği bandtır. Bu band C=O (%70-85) ve C-N (%10-20) gruplarının gerilme titreşimleri ile yönetilmektedir. Proteaz enziminin de Amid I bandının yer aldığı dalga sayısı aralığı 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$ ’dir. Amid II bandı, 1510-1580  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığındaki bölgeyi kapsar. Amid II bandı Amid I bandından daha komplekstir. Amid II bandı düzlemsel N-H bükülmesinden kaynaklanır ve potansiyel enerjisinin %40-60’ını oluşturur. Potansiyel enerjisinin geri kalanı C-N (%18-40) ve C-C (yaklaşık %10) gerilme titreşimlerinden ortaya çıkar. Amid III ve Amid V bantları ise yan zincirlerin ve hidrojen bağlarının doğasından kaynaklanır. Bu yapıların aydınlatılması çok

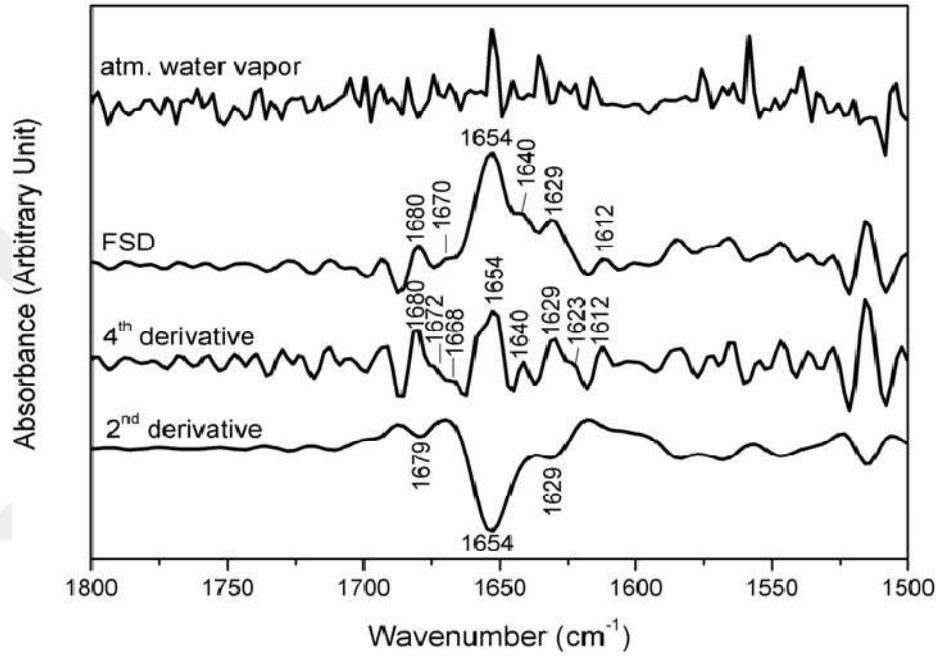
kompleks olduğundan dolayı bu bağların yapısal bilginin aydınlatılmasındaki kullanımını ise sınırlıdır (Harding ve Haris, 2009).

### 1.7 Konu Üzerinde Önceki Çalışmalar

Güler ve ark., (2016), çeşitli konsantrasyonlarda serin proteazlar (tripsin ve  $\alpha$ -kymotripsin) ile sığır serum albümininin (BSA) enzimatik olarak indüklenen bozunmasını FTIR tekniği vasıtasıyla incelemiştir. Çalışmada, gerçek zamanlı olarak proteoliz sürecini izlemek için spektroskopinin uygulanabilirliğini proteoliz ürünleri gibi BSA'nın ikincil yapı analizi ile birlikte spektral değişimlerin izlenmesi ile kanıtlanmıştır. FTIR spektrumlarına ve amid I bandı bölgesindeki değişikliklere dayanarak,  $\alpha$ -helikslerin ( $1654\text{ cm}^{-1}$ ) sırasız yapılara dönüştürülmesiyle proteoliz işleminin ilerlemesini ve serbest karboksilat konsantrasyonunda bir artış ( $1593\text{ cm}^{-1}$  ve  $1402\text{ cm}^{-1}$  emiliminde) görülmüştür. Bu çalışma ile ilk kez hidroliz derecesi FTIR spektroskopisi ile ölçülen karboksil gruplarının konsantrasyonu arasındaki korelasyon da ortaya çıkarılmıştır. İleri ultraviyole CD spektrumu sayesinde ikincil yapı analizleriyle birlikte,  $\alpha$ -sarmal içeriğinin sırasız yapının bir artışıyla birlikte azaldığı bildirilmektedir. Proteoliz ilerledikçe büyük biyomoleküllerin çoklu bağlarla hidrolize edilmesi, küçük boyutlu sentetik substratların hidrolizinden çok daha karmaşık olması nedeniyle bir proteoliz modeli için parça mekanizmalarını ve basamaklar dizisini karakterize etmenin olanaksız olduğu vurgulanmaktadır. Proteoliz sırasında serbest bırakılmış polipeptit fragmanlarının izlenmesi ve bozulmamış proteinlerin konformasyonel ve ikincil yapıların ( $\alpha$ -heliks ve  $\beta$ -tabakalı) rastgele değişikliklerin izlenmesi bu karmaşıklığı çözmeye yardımcı olabilir. Geleneksel olarak, hidroliz derecesini belirlemek için amino gruplarının miktarı kullanılır. Bir  $-\text{NH}_2$  grubunun ve bir  $-\text{COOH}$  grubun bir peptid bağının hidrolizinin sonucunda serbest bırakılmasından ötürü, karboksilat gruplarının sayısı amino gruplarının sayısına eşittir. Bu nedenle karboksil gruplarının konsantrasyonu ( $1593\text{ cm}^{-1}$ 'de), peptid bağlarının hidrolizinin izlenmesi için kullanılabilir. Böylece FTIR spektroskopisi parçalanmış peptid bağlarını titizlikle "sayar". Önceki çalışmalarda (Güler ve ark., 2011) FTIR spektroskopisini kullanarak proteoliz işleminin doğrudan izlenmesi için kesin bir gösterge olan yaklaşık  $1593\text{ cm}^{-1}$ 'de proteoliz ürünlerinin algılanışı gösterilmiştir Yaklaşık  $1593\text{ cm}^{-1}$ 'de absorbe eden bu IR sinyali, bölünmüş peptid gruplarının serbest COO-gruplarına karşılık gelmektedir. Güler ve ark. (2011)'lerinin ikincil yapı analizi için OPUS 4.2 yazılımında dahili bir



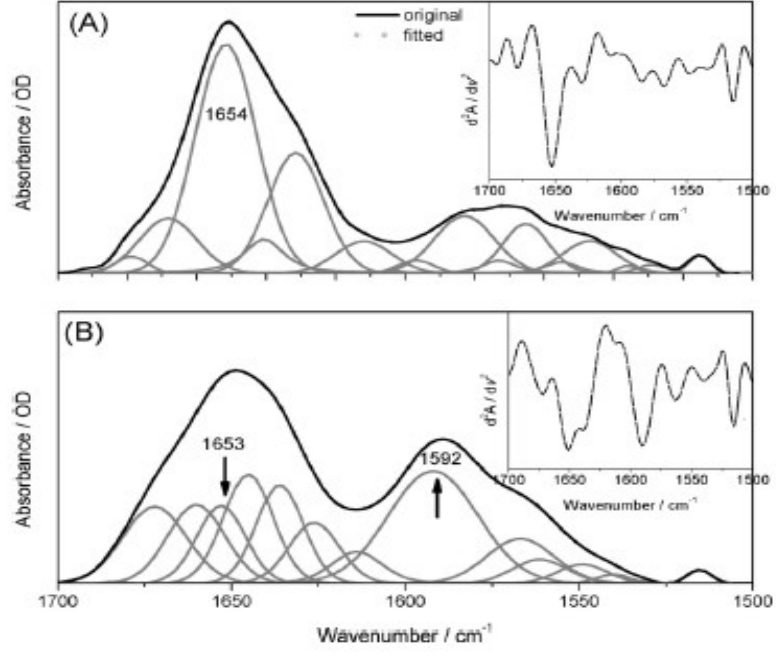
iteratif makroda uygulanan dekonvolüsyonlu spektrumların amid I bölgesi ( $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ ) için eğri uydurma yöntemi özenle gerçekleştirilmiştir. Fourier self-deconvolution (FSD),  $28\text{ cm}^{-1}$  bant genişliği ile bir Lorentz çizgi şekli kullanılarak gerçekleştirmişlerdir. Alt bantların sayısı ve konumları, Fourier kendinden çözülmüş spektrumlarından ve aynı zamanda spektrumların ikinci türevlerinden tespit edilmiştir. Şekil 1.12 'de görüldüğü gibi farklı ikincil yapılardan kaynaklanan çakışan bantları çözmek için bant daraltma teknikleri dikkate alınmıştır.



**Şekil 1.12** BSA'nın IR spektrumunun Fourier kendinden çözülmüş 2. ve 4. türevleri (Güler ve ark., 2011).

Tüm bu bant daraltma teknikleri, alt bantların sayısını ve eğri uydurma için konumlarını belirlemek için dikkate alınmıştır. Karşılaştırma için atmosferik su buharı IR spektrumu tayfıda da ayrıca eklenmiştir. Burada, orijinal bant genişliğini karşılaştırarak protein sinyallerini atmosferik su buharının katkısından kolayca ayırdedebiliriz. Doğal BSA, D20'da 1679, 1672, 1668, 1654, 1640, 1629 ve 1623  $\text{cm}^{-1}$  emici IR sinyallerine sahiptir (Şekil 1.12). Özellikle IR spektrumlarının 4. türevi, ayrıştırılmış olup 2. türev spektrumlarında açıkça görülemeyen üst üste binen bantların iyi çözümediği görülmektedir. Bu bantları çözmek ve spektrumlarda sıkça görülen frekanslardan kaçınmak için eğri uydurma yöntemi seçilmiştir. Eğri uydurmadan önce spektrumlar,  $1485\text{ ve }1725\text{ cm}^{-1}$  aralığında olup daha sonra amid I

bantları için düzeltilmiştir. Temel düzeltmeyi gerçekleştirmek için  $1600\text{ cm}^{-1}$  ve  $1700\text{ cm}^{-1}$  arasında düz çizgiler oluşturulmuş ve orijinal spektrumdan çıkartılmıştır. İlk eğri uydurma için alt bantların sayısı ve konumu ile tepe yükseklikleri ve genişlikleri gibi başlangıç girdi parametreleri girilmiştir. Nihai uyanlar için bant aralıkları, genişlikleri ve tüm bantların şekilleri eş zamanlı olarak değiştirilmiştir. Ancak pozisyonların yinelemeler sırasında değişmesine izin verilmemiştir. Orijinal ve uydurulmuş eğrinin ikinci türevleri, eğri uydurma doğruluğunu sağlamak için karşılaştırılmıştır. Son olarak, en uygun eş anlamlı türevler kullanılmıştır. Münferit bantların kesirli alanları daha sonra farklı ikincil yapı elemanlarının ( $\alpha$ -sarmal,  $\beta$ -tabaka, dönüş ve rasgele bobinler) yüzdesini hesaplamak için kullanılmıştır. Bu çalışmada BSA'nın ikincil yapısal içeriği tahmin etmek için basitlik açısından düzenli ve düzensiz  $\alpha$ -sarmalın yüzdelik değerleri toplam  $\alpha$ -helis içeriğini elde etmek için toplanıp ortalama değeri alınmıştır. Düzenli ve düzensiz  $\beta$ -tabakası da toplam  $\beta$ -tabakalı içerik elde etmek için toplanıp ortalama değeri alınmıştır. Dolayısıyla ikincil yapısal içeriğin nihai sonucu için yapı elemanlarının değerlerinin ortalaması alınmıştır. Proteoliz sırasında aynı spektrum değişiklikleri gözlemlense de bozulmamış proteinin bozunum gücü,enzim konsantrasyonunun yanı sıra proteaz türüne göre de farklılık göstermektedir. Her durumda  $1654\text{ cm}^{-1}$  civarındaki amid I bandının protein enzimatik parçalanması sırasında kuvvetli bir şekilde azaldığı (negatif bant), bu da  $\alpha$ -helislerden daha düşük bir katkıyı işaret etmektedir. Buna ek olarak, düzensiz yapıdan ve/veya parçalanmış polipeptidin kısa zincirlerinden kaynaklanan  $1637\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$  civarında bir omuz proteoliz işlemi sırasında açık bir şekilde arttığı aşikardır (Şekil 1.13). Öte yandan serbest karboksilat anyonlarının antisimetrik ve simetrik germe modlarına atfedilebilen yaklaşık  $1593\text{ cm}^{-1}$  ve  $1402\text{ cm}^{-1}$  aralığında yoğunluğun artmasına (pozitif bant) ve proteolizden salınan ürünleri daha da teyit etmektedir. Bununla birlikte, bu serbest karboksilat sinyalleri doğal BSA için büyümektedir. Bu da proteolizin yokluğunu ortaya koymaktadır.

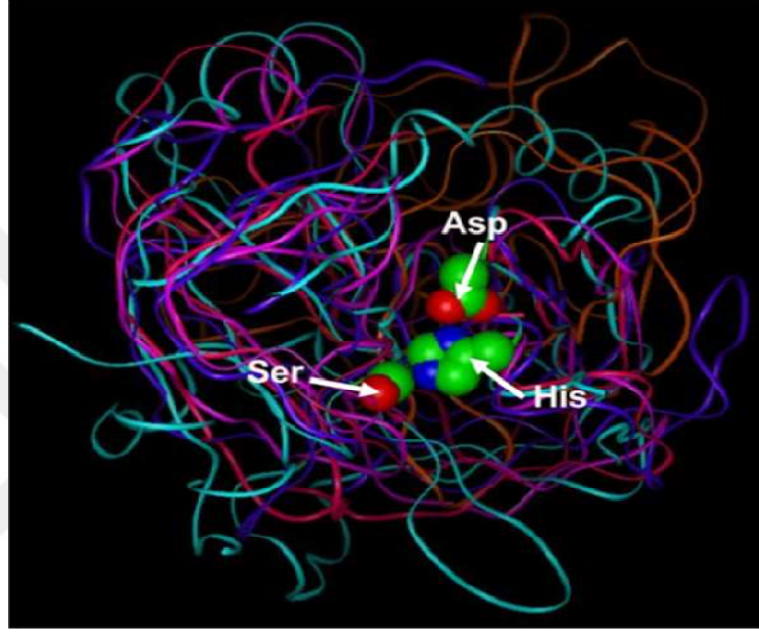


**Şekil 1.13** Çözünmemiş IR spektrumlarının amid I ve amid II bölgeleri için eğri uydurma (boş BSA, 25mg/mL) (A), kymotripsin ile parçalanmış BSA (B).

Tespit şeritleri tarafından oluşturulan her iki zarf bandı da noktalı çizgilerle gösterilmiş ve orijinal spektrumlar somut çizgilerle gösterilmiştir. Orijinal spektrumların ve takılmış zarfın, eğri uydurma başarısını karşılaştırmak için ikinci türevleri, eğri uydurmadan önce, boş BSA'dan D<sub>2</sub>O tamponu çıkarılmış ve parçalanmış BSA'dan enzim çözeltisi çıkartılmıştır.

Bu çalışmada BSA ve Lizin, iyi bilinen yapısından dolayı bir alt tabaka olarak seçilmiştir. Tripsin ve kimotripsin biyoteknoloji ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu proteolitik enzimler, sindirim sisteminde bulunan serin proteaz familyasının üyeleridir ve burada büyük protein moleküllerini küçük parçalara ayırırlar. Tripsin, pozitif yüklü lizin ve arginin artıklarının bağlanmasından sorumlu aktif bir siteye sahiptir (Stryer, 1988). Tripsin gibi, kimotripsin de aktif bölgede Ser195-His57-Asp102 kalıntılarını içeren bir katalitik triad içerir. Her iki proteolitik enzim benzer bir amino asit dizisine (yaklaşık% 40) sahiptir ve substrat özgüllükleri farklı olmakla birlikte çok benzer 3-B yapıları sahiptir. Kimotripsin peptid bağlarının karboksil ucunu, enzimde bir hidrofobik cebe uyan aromatik ve büyük hidrofobik kalıntılar (tirozin, triptofan, fenilalanin, metiyonin ve lösin) ile tripsin ağırlıklı olarak

lisin karboksil kısmındaki polipeptitleri parçalamaktayken kesme tercihine sahiptir (Polgar, 2005). PA klanının seçilmiş proteazlarının X-ışını ve modellenmiş üst üste binmiş yapıları Şekil 1.14’de Tek ücreli canlı eflatun (*Plasmodium falciparum*), arkenin mavi (*Pyrococcus furiosus*), mantarın mor (*Neurospora crassa, mor*), bitkinin fuşya pembesi (*Arabidopsis thaliana*) ve insan proteazları turuncu renkte (1SGI, *Homo sapiens*) gösterilmiştir



**Şekil 1.14** Aktif bölgede Ser195-His57-Asp102 kalıntılarını içeren top ve çubuk modellerinde gösterilmiş bir katalitik triad (Aparna ve ark., 2012).

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

Yüksek lisans tez projesi kapsamında, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından 2013-2016 yılları arasında desteklenen “Çapraz Bağlı Enzim Agregatları Formundaki Proteaz Enziminin Taşıyıcısız İmmobilizasyonu” başlıklı ve CÜBAP M-512 nolu araştırma projesi (Salgın ve Gökalp, 2015) kapsamında sentezlenen CLEA formundaki taşıyıcısız immobilize enzim sistemlerinin FTIR-HATR spektrometresi ile ikincil yapılarının karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

### 2.1 Materyaller

CLEA'ların hazırlanmasında *Bacillus* sp. (Sigma P0029) türü mikroorganizmalarından sentezlenerek izole edilen proteaz enzimi kullanılmıştır. CLEA'ların hazırlanmasında; bifonksiyonel çapraz bağlayıcı ajan olarak gluteraldehit (Sigma G5882, Grade I %25'lik çözelti), presipitasyon ajanı olarak amonyum sülfat (Merck 1217, Saflık  $\geq$  %99.5), proteik feeder ajan olarak sığır serum albümin (BSA: bovine serum albümin Fraction V (Sigma A9647, saflık  $\geq$  96) ve L(+)-lizin (Sigma L5501) ve yüzey aktif maddesi olarak da TritonX-100 (Sigma 93429) ortam bileşiminin tasarımında kullanılmıştır. Enzim çözeltisinin hazırlanmasında  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck 1.06586) ve  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck 1.06345) ile hazırlanan sodyum fosfat tamponu kullanılmıştır. Serbest ve CLEA biçimindeki enzimlerin hidrolitik aktiviteleri ölçümünde substrat olarak sığır sütünden izole edilen kazein (Sigma C6554) ve hidroliz tepkimesi sonunda açığa çıkan ürün DL-tirozin (Aldrich 145726) ise kalibrasyon doğrusunun hazırlanmasında kullanılmıştır. Bu süreçte trikloasetik asit (Sigma T9159) ise hidroliz tepkimesinin sonlandırılmasında kullanılmıştır. Tüm sulu çözeltilerin hazırlanmasında. iletkenlik değeri 18.2 m $\Omega$  olacak şekilde Milli-Q Gradient Model (Millipore Co., MA, ABD) üretilen ve 0.45  $\mu\text{m}$  gözenekli membranlardan filtre edilen deiyonize su kullanılmıştır.

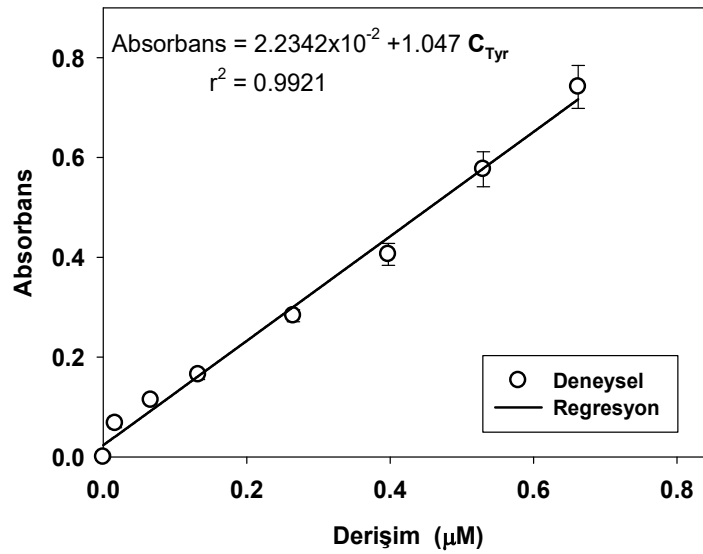
### 2.2 Enzim Sistemlerinin Katalitik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Enzimlerin hidrolitik aktivitesini belirlemek için 50 mM ve pH=7 koşullarında sodyum fosfat tamponunda derişim aralığı 0.0165-0.6622  $\mu\text{M}$  olan tirozin çözeltileri

hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerin her birine % 10 (w/v) derişiminde triklorasetik asit (TCA) eklenmiştir. Çözeltilerin Uv-vis spektrofotometre cihazında (Shimadzu UV1800A Model. Japonya) 200-800 nm dalga boyunda spektrum taraması Şekil 2.1’de yapılarak bir aminoasit olan tirozinin analizi için en uygun dalga boyu belirlenmiştir. Tirozin derişiminin ( $C_{Tyr}$ ) spektrometrik olarak analizi için en uygun dalga boyu  $\lambda=274$  nm belirlenmiş olup tirozinin belirtilen koşullardaki absorptivite değeri  $\epsilon=1.0223 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  olarak saptanmıştır (Salgın ve Gökalp, 2015). Tirozin için hazırlanan kalibrasyon doğrusu Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Uv-vis spektrofotometre cihazı.



Şekil 2.2 Tirozin için kalibrasyon doğrusu (25 °C,  $\lambda=274$  nm).

### 2.3 Enzim hidrolitik aktivitesinin belirlenmesi

Enzimin hidrolitik aktivitesi (U), birim dakikada birim mg enzim kütlesi (serbest ya da immobilize formda) başına sentezlenen µmol ürün tirozin derişimi olarak tanımlanmıştır. Aktivite için matematiksel ifade Denklem [2.1]'de verilmiştir.

$$\text{Hidrolitik aktivite (U)} = \frac{[\mu\text{mol substrat}]}{[\text{mg enzim}] [\text{dakika}]} \quad [2.1]$$

Enzim hidrolitik aktivitesini belirlemek için 50 mM ve pH=7 koşullarındaki tampon çözeltisi 2.5 mL eş hacimli iki farklı deney tüpüne eklenir. Daha sonra bu tüplerin her birine sırasıyla; 50 mg enzim sistemi (serbest ya da CLEA formunda) ve 100 mg kazein eklenip 20 dakika süreyle 25 °C (oda sıcaklığında) ve 150 rpm koşullarında manyetik karıştırılmalı (IKA RH Digital KT/C Model, Almanya) sistemde homojenize edilir. Bu çözelti/dispersiyonların birbirine eklenmesi ile kazeinin enzimatik hidrolizi gerçekleştirilir. Enzimatik hidroliz tepkimesi 20 dakika süre ile 37 °C sıcaklık ve 200 rpm karıştırma hızındaki bir orbital karıştırıcıda (Lab-line, MAXQ 4000 Model, ABD) gerçekleştirilir. Belirtilen süre sonunda reaksiyon ortamı 4 °C'deki buz banyosuna alınır ve daha sonra reaksiyon ortamına derişimi %10 (w/v) olan 5 mL hacminde TCA eklenerek katalitik olmayan proteinin parçalanma reaksiyonu sonlandırılır. Reaksiyon sonunda oluşan tirozin derişiminin spektrofotometrik olarak belirlenebilmesi için biyokimyasal reaksiyon ortamının 4 °C sıcaklık ve 9000 rpm koşullarında santrifüjleme işlemi gerçekleştirilir. Santrifüjleme işlemi 20 dakika süre ile gerçekleştirilmiş ve sonunda biyokimyasal reaksiyon ortamının üst fazının 2 mL'si yine eş hacimdeki 50 mM ve pH=7 koşullarındaki tampon çözeltisine alınarak vorteks cihazında homojenize edilmiştir. Homejen hale getirilen çözeltinin 25 °C sıcaklık ve 274 nm dalga boyunda spektrofotometrik analizi gerçekleştirilmiştir. Absorbans değişimlerinden yararlanarak enzimin hidrolitik aktivitesi Denklem [2.1]'den hesaplanır (Salgın ve Gökalp, 2015).

### 2.4 Çapraz Bağlı Enzim Agregatlarının Hazırlanması

Proteaz enziminin üretim işleminde ortamdan kaynaklı ve suda çözünmeyen safsızlıkları elimine edilebilmesi amacıyla immobilizasyon öncesi bir dizi ayırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada, 5 mL ve 50 mM ve pH'ı 7 olan

sodyum fosfat tamponu ortamında belli bir başlangıç enzim derişimine sahip enzimin 25 °C ve 150 rpm koşullarında manyetik karıştırıcıda homojen bir çözeltisi hazırlanır. İkinci aşamada ise enzim çözeltisi 25 mL polipropilen santrifüj tüpü içine eklendikten sonra özel olarak tasarlanmış deney düzeneği (yanal yüzeylerinden ısıtma/soğutma yapabilen ceketli bir cam reaktör) içerisine yerleştirilir. Sıcaklık kontrollü için soğutmalı sirkülatör yardımıyla 4 °C'deki soğutma akışkanı bu ceketten geçirilerek enzim çözeltisinin soğuması sağlanmıştır. Enzim çözeltisi kontrollü orbital karıştırmalı shaker üzerine yerleştirilen bu düzenekte 200 rpm karıştırma hızında 2 saat süre ile karıştırılır. Enzim çözeltisi belirtilen süre sonunda, 4 °C ve 9000 rpm'de 20 dakika süreyle soğutmalı bir santrifüjde santrifüjlenir. Daha sonra bu çözeltinin üst fazından 4 mL enzim çözeltisi alınarak eş hacimdeki yeni bir santrifüj tüpüne aktarılır. Proteaz agregatlarının oluşturulması amacıyla serbest formdaki enzim sistemlerinin presipitasyonu sonucu belli derişimde katı formdaki amonyum sülfat doğrudan enzim çözeltisine yavaş yavaş eklenerek katalitik özellikteki proteinin "salting out" etkisiyle presipitasyonu gerçekleştirilir. Deneyler yukarıda tanımlanan aynı düzenekte 4 °C ve 200 rpm koşullarında 2 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Enzim moleküllerinin birbirlerine iyonik kuvvetlerle yaklaştırılıp çapraz olarak bağlanma işlemi, %25 (v/v)'lik gluteraldehit kullanılarak 4 °C sıcaklık ve 200 rpm karıştırma 2 saat süreyle yine yukarıda tanımlanan aynı düzenekte gerçekleştirilmiştir. Belirtilen bu süre sonunda 4 °C sıcaklıktaki buzdolabında 1 gün süreyle bekletilir. Üretilen çapraz bağlı enzim agregatlarından üretim ortamından gelen safsızlıklardan ayrılması ve biyokatalizörlerin çözelti ortamındaki geri kazanımı için örnekler 4 °C sıcaklıkta 9000 rpm karıştırma hızında 20 dakika süreyle soğutmalı santrifüjü gerçekleştirilir. Bu santrifüjleme işlemi sonunda üst fazı ayrılan örnekler üzerine 50 mM ve pH'ı 7 olan mM sodyum fosfat tampon çözeltiden 8 mL eklenerek vorteks işlemi uygulanarak homojenize edildikten sonra belirtilen koşullarda en az 3 kez yeniden santrifüjleme işlemi tekrar edilir. Bu yıkama işlemi sonucunda. elde edilen katı formdaki örneklere yaklaşık -85 °C sıcaklıkta ve 0.02 mPa koşullarında liyofilizatörde (Telstar Lyoquest-85 PLUS ECO Model. İspanya) dondurarak kurutma yöntemi uygulanır. Absorbans ölçümü öncesinde CLEA'lar 0.45 µm gözeneli polivinilidin florür (PVDF, Millex VV) filtrelerde süzülerek kurutulmuş örneklerin katalitik aktiviteleri belirlenir (Salgın ve Gökalp, 2015).



## 2.5 Enzim Aktivitesine ve Katalitik Performansına Etki Eden Parametreler

Taşıyıcısız enzim immobilizasyon sürecinde;

- i. Başlangıç enzim derişiminin etkisi (50, 100, 150, 200 ve 250 mg/mL)
- ii. Çapraz bağlayıcı ajan derişimi etkisi (40, 60, 80 ve 100 µL/mL)
- iii. Presipitasyon ajan derişimi etkisi (500, 600, 700 ve 800 mg/mL)
- iv. Proteik feder ajan türü (BSA ve lizin) ve derişimin etkisi (1, 2, 4, 8 ve 16 mg/mL)

gibi immobilizasyon ortam bileşimlerinin etkisi incelenmiştir.

Sentezlenen CLEA'ların katalitik aktiviteleri incelenmiş olup proteik feeder ajanlar agregasyon öncesi immobilizasyon ortamlarına katılmıştır. Bunun yanı sıra, belirtilen ortam koşullarında sentezlenen CLEA'ların katalitik performanslarına etki eden en yüksek katalitik performansın sağlandığı immobilizasyon koşullarında; çözücü türü etkisi (dimetilformamit, proteaz, dimetilsülfoksit, etanol, etilasetat, *n*-hekzan, *i*-oktan, metanol, siklohekzan, sodyum fosfat tamponu ve saf su) araştırılmıştır.

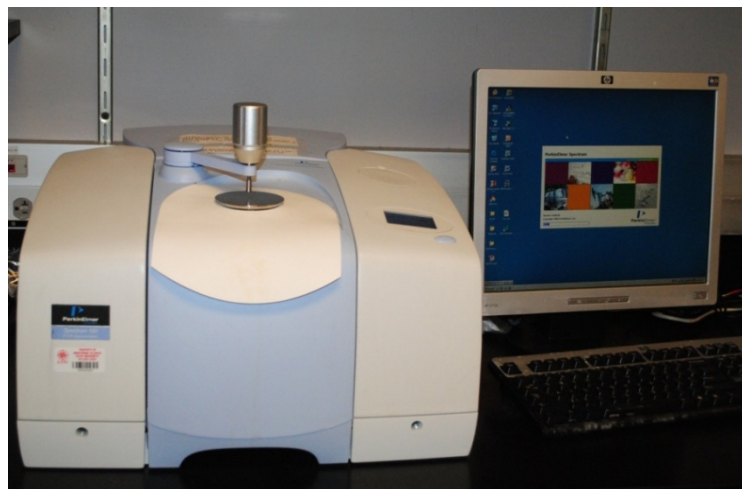
Katalitik aktivite açısından en uygun immobilizasyon koşullarında sentezlenen CLEA'ların katalitik aktivitelerine organik çözücü türünün etkisi; dimetilformamit, dimetilsülfoksit, etanol, etilasetat, *n*-hekzan, *i*-oktan, metanol, siklohekzan, 50 mM pH=7 sodyum fosfat tamponu ve saf su ortamlarında araştırılmıştır. 25 mL'lik amber cam şişelerin içerisine hacimleri yaklaşık 15 mL olacak şekilde belirtilen çözücü sistemlerinden 150 mg CLEA'ları eklenmiştir. Enzim sistemleri amber cam şişelerin hava sızdırmaz kapakları kapatıldıktan sonra oda sıcaklığında 2 gün süreyle belirtilen çözücü sistemlerinde alı konulmuştur. Belirtilen süresi sonunda CLEA'lar santrifüjleme ve ardından 50 mM pH=7 koşullarındaki sodyum fosfat tampon sistemi yıkama işlemi ile 3 kez tekrarlanarak gerçekleştirildikten sonra liyofilizatörde kurutulmuştur. Katalitik aktivite ölçümleri için 50 mg enzim kullanılmıştır (Salgın ve Gökalp. 2015).

## 2.6 Enzim Aktivitesine Substrat Derişimi Etkisi

En uygun immobilizasyon koşullarında sentezlenen CLEA'ların katalitik aktivitesine substrat derişiminin etkisi; kazein derişiminin son derişimleri 0.8, 2, 4, 6, 8, 16, 24 ve 32 mg/mL olduğu koşullarda incelenmiş ve bunun için enzimin hidrolitik aktivitesinin belirlenmesinde olduğu gibi 50 mg serbest ya da immobilize enzim sistemi 50 mM ve pH'ı 7 olan sodyum fosfat tamponuna eklenmiştir. Yukarıda tanımlanan ve son derişimi belirlenecek olan kazeinden 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300 ve 400 mg eklenerek 20 dakika süreyle 25 °C ve 150 rpm koşullarında manyetik karıştırmalı (IKA RH Digital KT/C Model, Almanya) sistemde kazein çözeltili homojen hale getirilir. Bu dispersiyonların birbirine eklenmesi ile kazeinin enzimatik hidrolizi gerçekleştirilmiştir. Enzimatik hidroliz tepkimesi 37 °C ve 200 rpm karıştırmaya hızındaki bir orbital karıştırmacıda (Lab-line, MAXQ 4000 Model, ABD) 20 dakika süre ile gerçekleştirilir. Belirtilen süre sonunda reaksiyon ortamı 4 °C'deki buz banyosuna alınıp hemen ardından reaksiyon ortamına derişimi %10 (w/v) olan 5 mL hacminde TCA eklenerek katalitik olmayan proteinin biyokimyasal parçalanma reaksiyonu sonlandırılır (Salgın ve Gökalp. 2015).

## 2.7 Enzim Konformasyonel Yapısındaki Değişimlerin Analizi

Proteaz enziminin konformasyonel yapısındaki değişimler yatay konumlu zayıflatılmış toplam yansıma (HATR: Horizontal Attenuated Total Reflection) ile donatılmış olan ve Şekil 2.3'de gösterilen FTIR spektroskopisi (Spectrum 100, Perkin Elmer Inc., ABD) ile analizlenmiştir.



Şekil 2.3 FTIR–HATR spektroskopi cihazı.

Bu yöntem katı ya da sıvı örneklerin az miktarlardaki ya da düşük derişimlerdeki örneklerin analizlerinde cihazın yüksek enerji verimi, yüksek sinyal/gürültü oranı ve yüksek spektral kaliteye sahip olması nedeniyle maksimum hassasiyet ile analiz yapmaya olanak sağlar. Ayrıca FTIR spektrumların elde edilmesinde pellet yapımı ya da herhangi bir destek malzemesine ihtiyaç duyulmaksızın pratik ve kısa süreli analizlere olanak sağlar. 25 °C ortam koşullarında ön işlem görmüş liyofilize edilmiş toz formdaki proteaz enzimlerinin 4000–400 cm<sup>-1</sup> dalga sayısı aralığındaki FTIR-HATR spektrumları; 256 eş-ılave tarama sayısında ve 4 cm<sup>-1</sup> spektral çözünürlükte elde edilmiştir. Elde edilen spektrum verilerinin analizi (Spectrum Software Version 6.3.5, Perkin Elmer Inc., ABD) sırasıyla; Savitsky–Golay yöntemi ile smooth işlemi, Fourier otomatik dekonvolüsyonu (Fourier self-deconvolution) ile Fourier ters evreşimi ve ikinci türev (secondary derivate) işlemleri uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Uygulanan süreçler sonunda modifiye edilmiş spektrumların taban çizgisi 1700–1600 cm<sup>-1</sup> dalga sayısı aralığında (baseline correction) düzeltilmiştir. Bu işlemler sonrasında elde edilen spektrumların karakterizasyonunun değerlendirilmesi ise bir bilgisayar yazılım programı (PeakFit™ Version 4.12. SeaSolve Software Inc., İngiltere) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir (Akçay, 2014). Elde edilen spektrumların karakterizasyon Natalello ve ark. (2005) tarafından gerçekleştirilen Proteaz enziminin ikincil yapısının karakterizasyonunda amid I bandını oluşturan bileşenler ve dalga sayıları FTIR spektroskopisi ile belirledikleri çalışmada yer alan ve Çizelge 2.1’de gösterilen amid I bandının bileşenlerine karşılık gelen dalga sayıları kullanılmıştır (Alsan, 2014).

**Çizelge 2.1** Proteaz enziminin ikincil yapı karakterizasyonunda amid I bandını oluşturan bileşenler ve bunların dalga sayıları (Natalello ve ark., 2005).

İkincil yapı bileşenleri	Dalga sayısı (cm <sup>-1</sup> )
β–Tabaka/kıvrılmalar	1691.8±0.7
Kıvrılmalar	1682.2±0.3
Kıvrılmalar	1670.3±0.4
α–Sarmal	1658.1±0.4
α–Sarmal/düzensiz	1647.6±0.6
β–Tabaka	1638.3±0.7
β–Tabaka	1629.4±0.5
Agrega yapılar/yan zincirler	1620.0±0.5

### 3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

#### 3.1 CLEA Aktivitesine Ortam Bileşimlerinin Etkisi ve Enzim Konformasyonel Yapılarındaki Değişimler

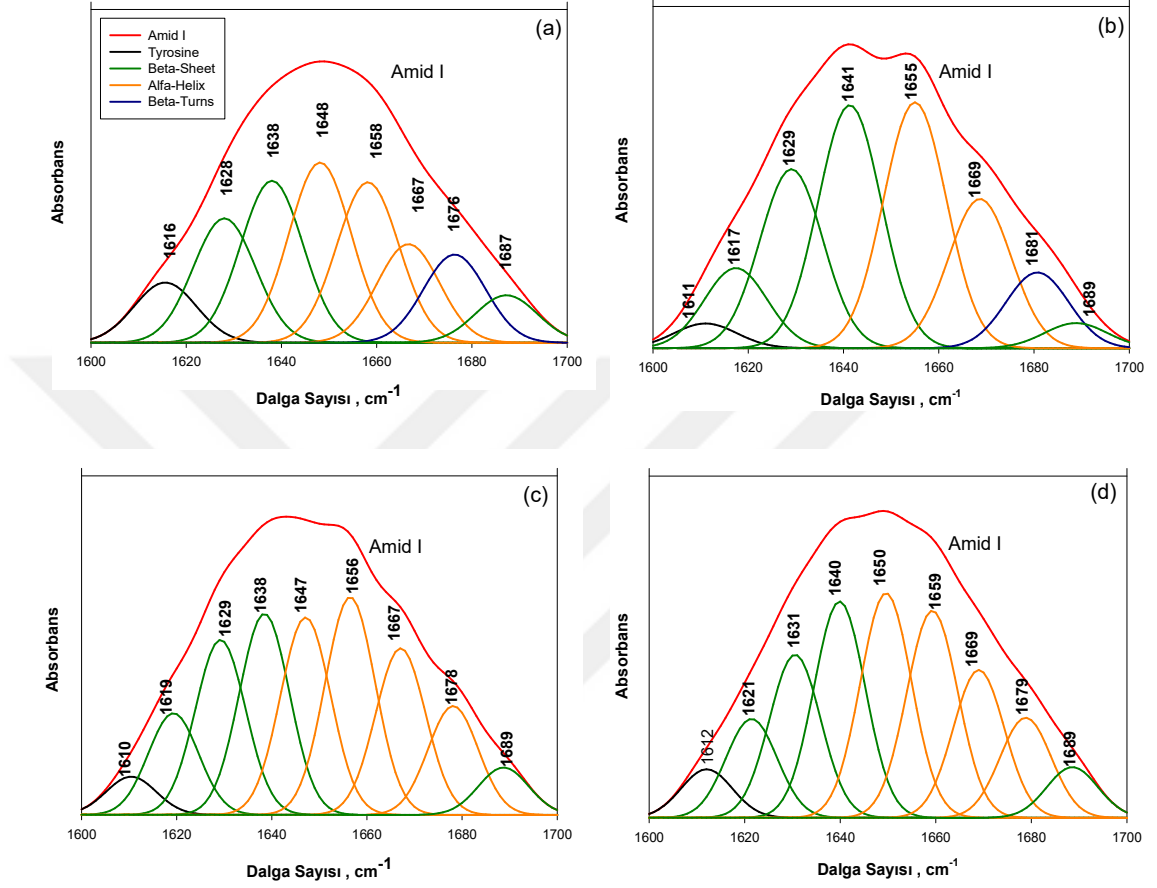
##### 3.1.1 Başlangıç enzim derişimi ve çapraz bağlayıcı ajan derişimlerinin etkisi

Taşıyıcısız enzim immobilizasyon sürecinde; başlangıç enzim derişiminin  $C_E=50-250$  mg/mL ve çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan gluteraldehit derişiminin  $C_{Glu}=40-100$  µL/mL olduğu koşullarda oluşturulan CLEA'ların hidrolitik aktivitesine  $(NH_4)_2SO_4$  derişiminin etkisi  $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$  mg/mL olduğu koşullarda Salgın ve Gökalp (2015) tarafından incelenmiştir. Bu sürece paralel olarak yüksek lisans tez projesi kapsamında gerçekleştirilen ikincil yapı analizleri yardımıyla da enzimin hidrolitik aktivitesindeki değişimler moleküler düzeyde araştırılmıştır. Elde edilen deneysel bulgular ve üretilen CLEA'ların FTIR-HATR spektrumlarının  $1600-1700$   $cm^{-1}$  dalga sayısı aralığındaki amid I bandının bilgisayar ortamında gerçekleştirilen ikincil yapı analizleri Şekil 3.1-3.5'de gösterilmiştir. Amid I bandı içinde yer alan ve ikincil yapıları oluşturan bileşenlerin yüzde değişimleri ise Çizelge 3.1'de sunulmuştur.

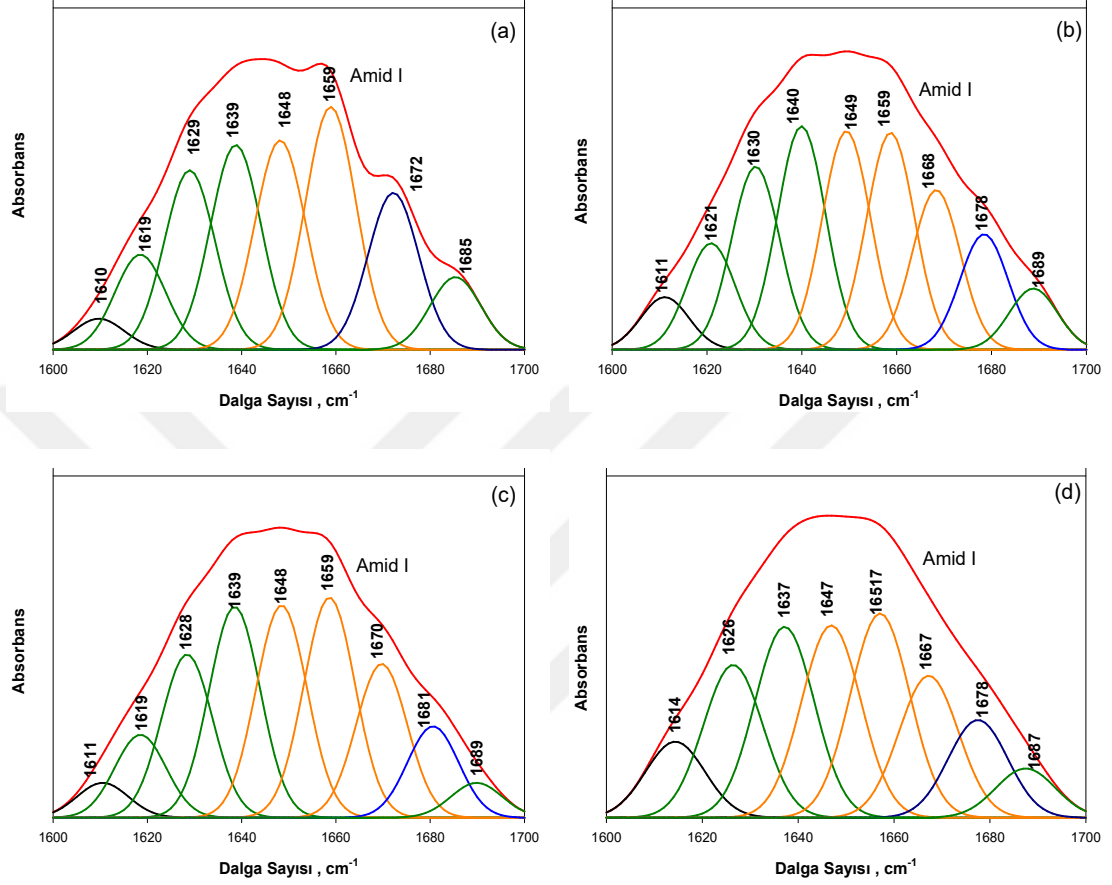
Gluteraldehit derişiminin  $C_{Glu}=100$  µL/mL olduğu koşul hariç olmak üzere sabit bir çapraz bağlayıcı ajan derişimi dikkate alındığında oluşturulan CLEA formundaki biyokatalizör sistemlerinin katalitik aktivitelerinin başlangıç enzim derişimi ile belirgin bir biçimde değişim göstermediği görülmektedir. En yüksek gluteraldehit derişiminde ( $C_{Glu}=100$  µL/mL) ise oluşturulan CLEA formundaki biyokatalizör sistemlerinin katalitik aktivitelerinin başlangıç enzim derişiminin artmasıyla arttığı görülmektedir. Çalışmada ulaşılan en yüksek iki katalitik aktivite değerlerine;  $C_E=200$  mg/mL ve  $C_{Glu}=60$  µL/mL koşullarında ve  $C_E=250$  mg/mL ve  $C_{Glu}=40$  µL/mL koşullarında ulaşılmış ve bu koşullarda aktivite değerleri sırasıyla 9.58 U ve 9.69 U olarak saptanmıştır. Ancak en yüksek katalitik aktivitenin elde edildiği  $C_E=250$  mg/mL,  $C_{Glu}=40$  µL/mL ve  $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$  mg/mL koşulda ise üretilen CLEA veriminin düşük olduğu saptanmıştır. Bu bağlamda, immobilizasyon verimi açısından en uygun koşullar  $C_E=200$  mg/mL,  $C_{Glu}=60$  µL/mL ve  $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$  mg/mL olarak belirlenmiştir (Salgın ve Gökalp, 2015).

Bu çalışmada, ikincil yapı içeriğinin nihai sonucu için her bileşenin ortalaması alınmış ve enzimatik dalgalanmayı açıklığa kavuşturmak için  $1700-1600\text{ cm}^{-1}$  arasında CLEA formundaki biyokatalizör sistemlerinin katalitik aktivitelerinin başlangıç enzim derişimleri (50-250) için eğri uydurma işlemi gerçekleştirilmiştir. İlk eğri uydurma sürecinde alt bantların sayısı, konumu ile tepe yükseklikleri ve genişlikleri gibi başlangıç girdi parametreleri girilmiştir. Nihai uyanlar için bant aralıkları, genişlikleri ve tüm bantların şekilleri eşzamanlı olarak değiştirilmiştir. Ancak pozisyonların yinelemeler sırasında değişmesine izin verilmemiştir. Orijinal ve uydurulmuş eğrinin ikinci türevleri, eğri uydurma doğruluğunu sağlamak için karşılaştırılmıştır. Son olarak da en uygun eşanlamlı türevler onaylanmıştır. Takılan bileşenlerin kesirli alanları, münferit bantların ve daha sonra farklı ikincil yapı elemanlarının ( $\alpha$ -sarmal yani  $\alpha$ -heliks,  $\beta$ -tabaka yani  $\beta$ -sheet, dönüş yani turns ve rasgele bobinler yani diğer ikincil yapı bileşenleri) yüzdesini hesaplamak için kullanılmıştır. Başlangıç enzim derişimlerinin ikincil yapısal içeriğini tahmin etmek için basitlik açısından düzenli ve düzensiz  $\alpha$ -sarmalın yüzdelik değerleri toplam  $\alpha$ -heliks içeriğini elde etmek için toplanıp ortalaması alınmıştır. Ayrıca düzenli ve düzensiz  $\beta$ -tabakası da toplam  $\beta$ -tabakalı içerik elde etmek için yüzdelik değerleri toplanıp ortalama değerleri Çizeige 3.2’de gösterilmiştir.

Daha kesin olarak, CLEA formundaki biyokatalizör sistemlerinin katalitik aktivitenin artmasıyla sarmal içeriğinin marjinal olarak azalmasına neden olurken,  $\beta$ -tabakaları ve sırasız yapıları aynı anda artmaktadır. Bu bağlamda CLEA'ların ikincil yapı içeriğini tahmin etmek için  $C_E = 200\text{ mg/mL}$ ,  $C_{\text{Glu}} = 60\text{ }\mu\text{L/mL}$  ve  $C_{(\text{NH}_4)\text{SO}_4} = 700\text{ mg/mL}$  koşullarında en yüksek katalitik aktivitenin görüldüğü başlangıç enzim derişiminde  $\alpha$ -heliks içeriğinin azalmasına,  $\beta$ -tabakaları ve sırasız yapıların ise aynı anda artmasına neden olmaktadır.

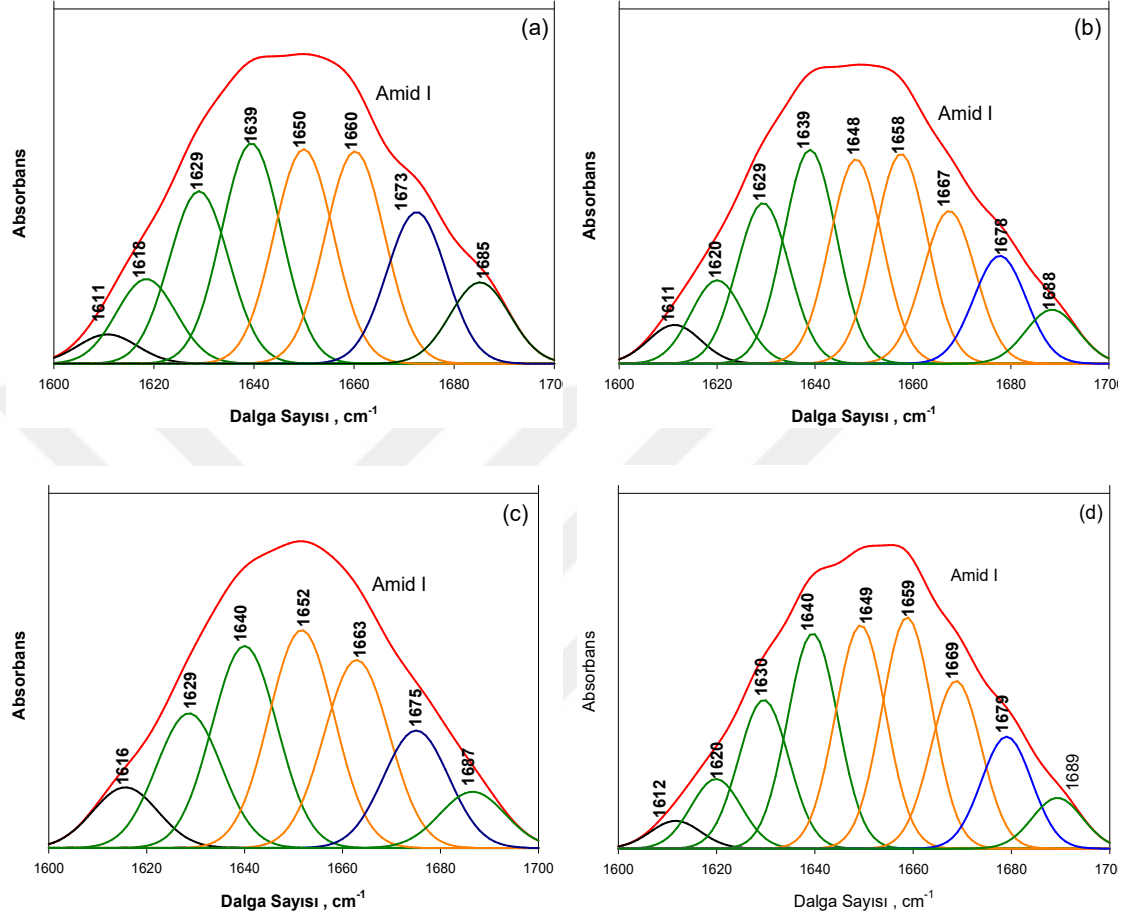


**Şekil 3.1**  $C_E = 50 \text{ mg/mL}$  ve  $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} = 700 \text{ mg/mL}$  için CLEA'ların amid I bantları ve ikincil yapı analizleri:  
a)  $C_{\text{Glu}} = 40 \text{ } \mu\text{L/mL}$   
b)  $C_{\text{Glu}} = 60 \text{ } \mu\text{L/mL}$   
c)  $C_{\text{Glu}} = 80 \text{ } \mu\text{L/mL}$   
d)  $C_{\text{Glu}} = 100 \text{ } \mu\text{L/mL}$ .



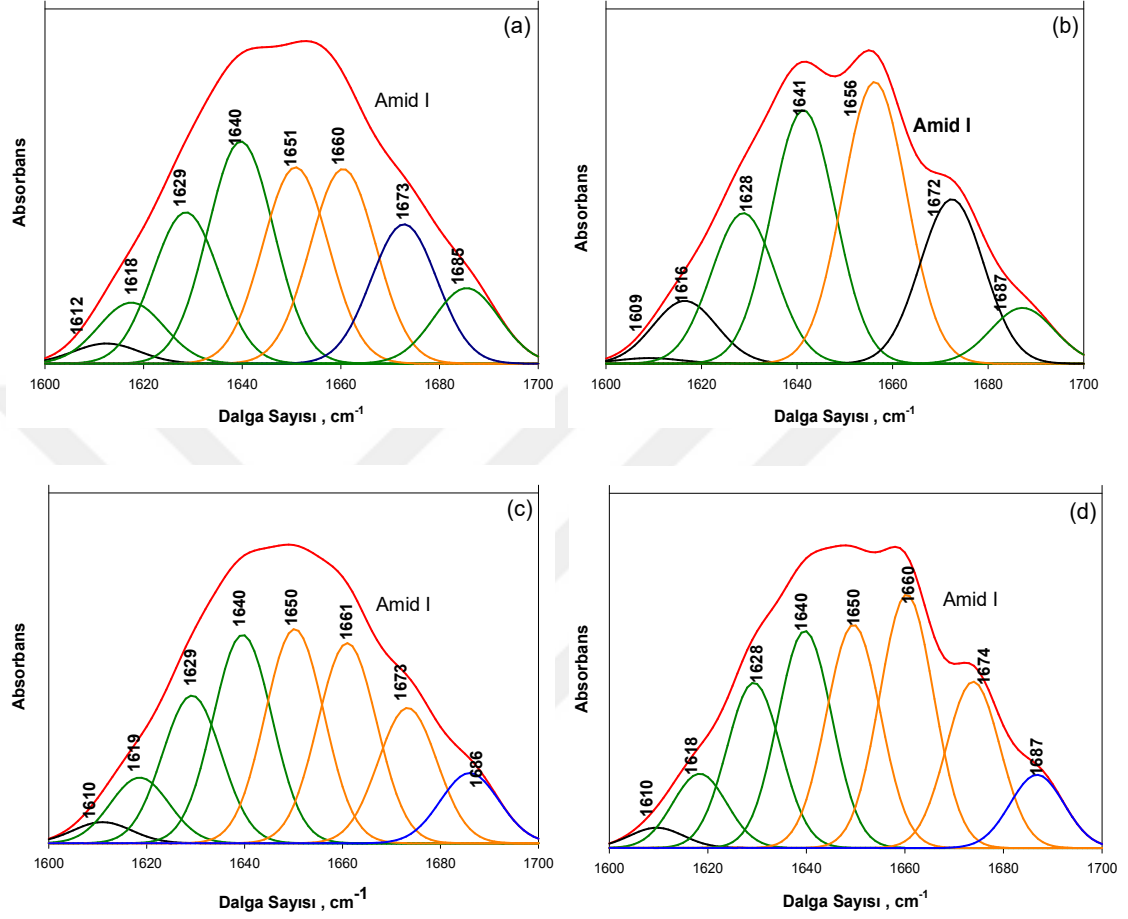
**Şekil 3.2**  $C_E = 100 \text{ mg/mL}$  ve  $C_{(NH_4)_2SO_4} = 700 \text{ mg/mL}$  için  
CLEA'ların amid-I bantları ve ikincil yapı analizleri:

- a)  $C_{Glu} = 40 \mu\text{L/mL}$
- b)  $C_{Glu} = 60 \mu\text{L/mL}$
- c)  $C_{Glu} = 80 \mu\text{L/mL}$
- d)  $C_{Glu} = 100 \mu\text{L/mL}$ .

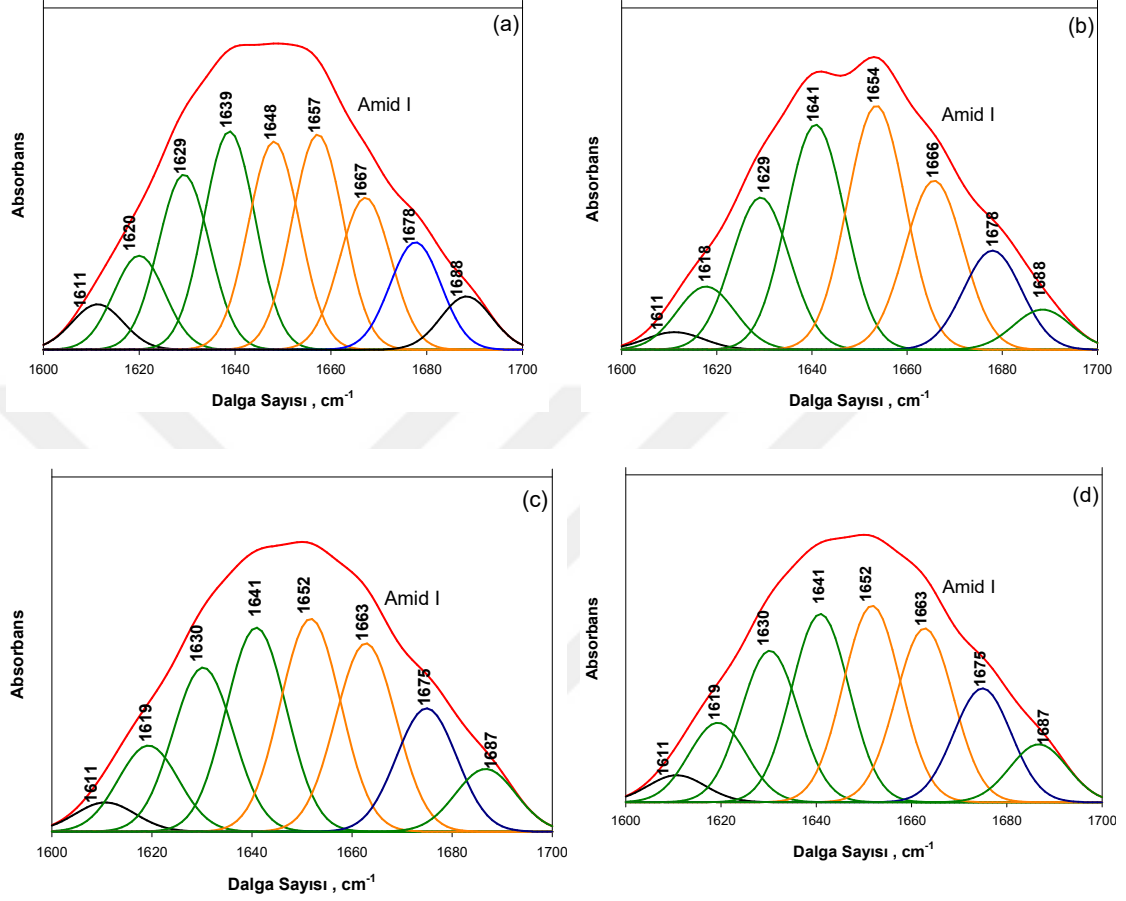


**Şekil 3.3**  $C_E=150$  mg/mL ve  $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$  mg/mL için  
 CLEA'ların amid-I bantları ve ikincil yapı analizleri:  
 a)  $C_{Glu}=40$   $\mu$ L/mL  
 b)  $C_{Glu}=60$   $\mu$ L/mL  
 c)  $C_{Glu}=80$   $\mu$ L/mL  
 d)  $C_{Glu}=100$   $\mu$ L/mL.





**Şekil 3.4**  $C_E=200$  mg/mL ve  $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$  mg/mL için CLEA'ların amid-I bantları ve ikincil yapı analizleri:  
a)  $C_{Glu}=40$   $\mu$ L/mL  
b)  $C_{Glu}=60$   $\mu$ L/mL  
c)  $C_{Glu}=80$   $\mu$ L/mL  
d)  $C_{Glu}=100$   $\mu$ L/mL.



**Şekil 3.5**  $C_E=250$  mg/mL ve  $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$  mg/mL için  
 CLEA'ların amid I bantları ve ikincil yapı analizleri:  
 a)  $C_{Glu}=40$   $\mu$ L/mL  
 b)  $C_{Glu}=60$   $\mu$ L/mL  
 c)  $C_{Glu}=80$   $\mu$ L/mL  
 d)  $C_{Glu}=100$   $\mu$ L/mL.

**Çizelge 3.1** CLEA'nın aktivitesine başlangıç enzim ve glutaraldehit derişimlerinin etkisi:  
Konformasyonel yapılarındaki değişimler ( $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$  mg/mL)

		Enzim konformasyonel yapı analizi (%)											
$C_E$ (mg/mL)	$C_{am}$ ( $\mu$ L/mL)	Aktivite (U)	Tyrosine residues (1610-1613 $cm^{-1}$ )	Aggregated strands /side chains (1619-1921 $cm^{-1}$ )	$\beta$ -Sheet (1627-1632 $cm^{-1}$ )	$\beta$ -Sheet (1635-1641 $cm^{-1}$ )	$\beta$ -Sheet (1643-1646 $cm^{-1}$ )	$\alpha$ -Helix (unordered) (1647-1653 $cm^{-1}$ )	$\alpha$ -Helix (1655-1660 $cm^{-1}$ )	Left-handed $\alpha$ -Helix (1663-1669 $cm^{-1}$ )	$\beta$ -Turns (1671-1979 $cm^{-1}$ )	$\beta$ -Turns (1680-1684 $cm^{-1}$ )	$\beta$ -Sheet (antiparallel $\beta$ -sheet) (1686-1992 $cm^{-1}$ )
50	40	7.35	4.34	13.49	15.65	20.39	18.09	15.49	8.05	4.50			
	60	8.36	4.78	7.73	18.31	20.24	13.67	22.01	8.66	4.60			
	80	8.40	6.32	8.06	18.64	20.24	11.82	11.31	10.13	8.69			
	100	4.01	3.52	4.05	14.03	14.91	19.18	21.33	14.43	6.15			
100	40	8.86	8.23	9.33	14.91	17.39	14.39	15.50	13.04	7.21			
	60	8.67	4.17	7.07	14.68	16.95	16.67	15.97	12.50	3.52			
	80	7.98	2.56	6.44	14.50	16.67	17.95	17.95	12.82	7.94			
	100	6.33	2.19		13.56	16.95	19.95	19.64	17.56	7.69			
150	40	8.52	6.17	7.21	13.41	20.73	15.52	15.52	12.96	8.48			
	60	8.05	3.72	5.32	13.24	17.28	16.54	17.58	15.55	3.91			
	80	8.26	6.16		18.99	20.98	16.95	15.51	12.94	8.47			
	100	6.92	2.53	5.06	14.39	16.77	17.72	18.99	13.92	3.80			
200	40	9.01	2.04	6.14	14.19	20.12	19.05	18.81	14.27	5.38			
	60	9.58	4.04	8.27	17.51	26.24	18.15	16.96	16.96	8.83			
	80	8.57	2.02	6.13	13.91	19.63	18.37	20.37	14.24	5.33			
	100	7.45	2.10	5.08	13.99	18.09	20.77	22.16	12.68	5.13			
250	40	9.69	5.36	7.46	15.27	22.13	11.46	11.87	10.93	4.25			
	60	9.36	5.18	7.41	16.96	18.85	18.64	18.86	10.10	4.00			
	80	9.46	5.20	7.51	18.62	18.23	19.43	16.79	10.11	4.11			
	100	8.09	2.27		13.58	17.28	19.47	18.45	18.91	7.66			

**Çizelge 3.2** CLEA'ların aktivitesine başlangıç enzim ve gluteraldehit derişimlerinin etkisi:  
Konformasyonel yapılarındaki değişimler ( $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$  mg/mL)

		Enzim konformasyonel yapı analizi (Ortalama değişimler)							
$C_E$ (mg/mL)	$C_{Gm}$ ( $\mu$ L/mL)	Aktivite (U)	Tyrosine (1610-1613 $cm^{-1}$ )	Aggregated (1619-1921 $cm^{-1}$ )	$\alpha$ -Helix (1647-1669 $cm^{-1}$ )	$\beta$ -Sheet (1627-1646 $cm^{-1}$ )	Turns (1671-1984 $cm^{-1}$ )	Antiparalel (1686-1992 $cm^{-1}$ )	
50	40	7.35	4.34		17.99	14.57	8.05	4.50	
	60	8.36	4.78	7.73	17.84	19.28	8.66	4.60	
	80	8.40	6.32	8.06	11.09	19.44	8.69	4.79	
	100	4.01	3.52	4.05	18.31	14.47	6.15	2.40	
100	40	8.86	8.23	9.33	14.95	16.15	13.04	7.21	
	60	8.67	4.17	7.07	15.05	15.82	8.47	3.52	
	80	7.98	2.56	6.44	16.24	15.59	7.94	3.17	
	100	6.33	2.19	19.05	19.05	15.26	7.69	2.46	
150	40	8.52	6.7	7.21	15.52	17.07	12.96	8.48	
	60	8.05	3.72	5.32	16.56	15.26	6.86	3.91	
	80	8.26	6.16		16.23	19.99	12.94	8.47	
	100	6.92	2.53	5.06	16.88	15.58	6.82	3.80	
200	40	9.01	2.04	6.14	18.93	17.16	14.27	5.38	
	60	9.58	4.04	8.27	18.15	21.88	16.96	8.83	
	80	8.57	2.02	6.13	19.37	16.77	14.24	5.33	
	100	7.45	2.10	5.08	21.47	16.04	12.68	5.13	
250	40	9.69	5.36	7.46	11.42	18.70	11.27	4.25	
	60	9.36	5.18	7.41	18.75	17.91	10.10	4.00	
	80	9.46	5.20	7.51	18.11	18.43	10.11	4.11	
	100	8.09	2.27	18.94	18.94	15.43	7.66	2.38	

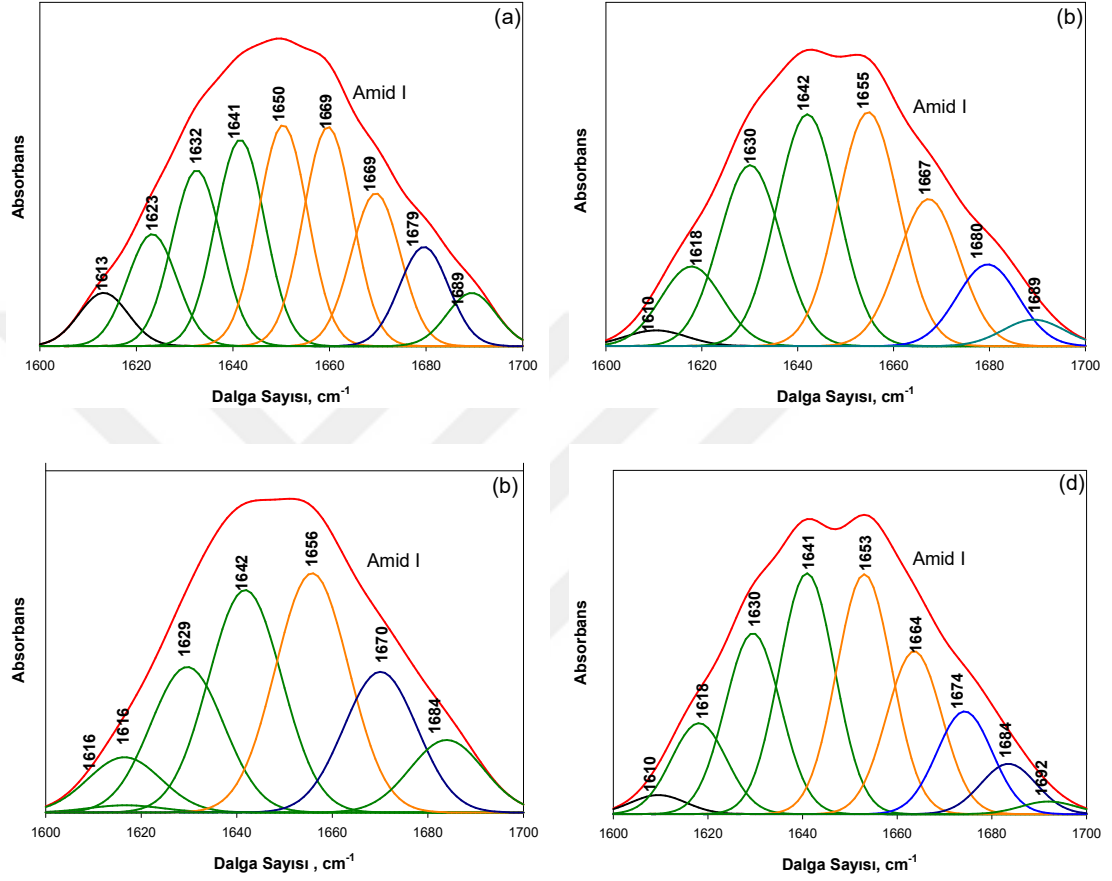
### 3.1.2 Presipitasyon ajan derişiminin etkisi

Proteinlerin sulu çözeltilerinden ayırma işlemlerinde “*Salting in*” ve “*Salting out*” etkisi yaratabilen tuzlar yaygın biçimde kullanılmaktadır. “*Salting in*” etkisinde, düşük tuz derişimindeki tuzlar proteinin çözünlüğünü artırır ve proteinin daha fazla çözünür duruma gelmesini sağlar. “*Salting out*” etkisinde ise yüksek tuz derişimindeki tuzlar proteinin çözünlüğünü azaltarak proteinleri çözünmez durumda birbirine yakınlaştırarak protein yüzeyindeki bağlı suyu çeker (Yu vd., 2006). Bu çalışmada enzim çözeltilerinde “*Salting out*” etkisi oluşturmak amacıyla  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  presipitasyon ajanı olarak kullanılmıştır. Enzim çözeltilerinde kullanılan tuzun derişimine bağlı olarak çözeltilerin elektrotatik dengesi değiştirilerek enzim molekülleri arasındaki hidratlaşma derecesini modifiye edilebilir. Böylece artan iyonik kuvvetler yardımıyla enzimlerin birbirlerine yaklaşması yani agregatlaşması sağlanır. Eş zamanlı olarak gerçekleşen presipitasyon ve agregasyon basamaklarında enzim molekülleri arasındaki uzaklığın azaltılmasıyla sulu çözeltilerdeki enzim moleküllerinin çözünmesini engellenerek bir çapraz bağlayıcı ajanlar yardımıyla CLEA formunda katalitik açıdan daha aktif taşıyıcısız immobilize enzim sistemlerinin üretimi geliştirilebilmektedir.

Taşıyıcısız enzim immobilizasyon sürecinde presipitasyon ajanı olarak kullanılan amonyum sülfat derişiminin  $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=500-800$  mg/mL derişim aralığında oluşturulan CLEA’ların hidrolitik aktivitesine etkisi Salgın ve Gökalp (2015) tarafından başlangıç proteaz derişimi  $C_E=200$  mg/mL ve glüteraldehit derişiminin  $C_{\text{Glu}}=60$  µL/mL olduğu koşullarında araştırılmıştır. Bu sürece paralel olarak yüksek lisans tez projesi kapsamında gerçekleştirilen ikincil yapı analizleri yardımıyla ise enzimin hidrolitik aktivitesindeki derişimler moleküler düzeyde araştırılmıştır. Elde edilen deneysel bulgular ve üretilen CLEA’ların FTIR-HATR spektrumlarının  $1600-1700$   $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığındaki amid I bandının bilgisayar ortamında gerçekleştirilen ikincil yapı analizleri Şekil 3.6’da gösterilmiştir. Amid I bandı içinde yer alan ve ikincil yapıları oluşturan bileşenlerin yüzde derişimleri ise Çizelge 3.3’de sunulmuştur.

Amonyum sülfat derişiminin artması ile üretilen CLEA'ların katalitik aktivitesi önce azalmakta ve daha sonra artarak hemen hemen sabit bir değere ulaşmaktadır. Amonyum sülfat derişiminin  $C_{(NH_4)_2SO_4}=500$  mg/mL olduğu koşulda aktivite 9.57 U,  $C_{(NH_4)_2SO_4}=600$  mg/mL olduğu koşulda aktivite 8.74 U,  $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$  mg/mL olduğu koşulda aktivite 9.57 U ve  $C_{(NH_4)_2SO_4}=800$  mg/mL olduğu koşulda ise aktivite 9.50 U olarak saptanmıştır. Görüldüğü gibi immobilize enzim sistemi en yüksek katalitik performansını hem  $C_{(NH_4)_2SO_4}=500$  mg/mL hem de  $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$  mg/mL olduğu koşullarda göstermiştir. Ancak elde edilen CLEA ürün miktarları dikkate alındığında  $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$  mg/mL amonyum sülfat derişiminin daha uygun olduğu belirlenmiştir.

CLEA formundaki immobilize enzim sistemleri için en uygun amonyum sülfat ortam bileşimi  $C_E=200$  mg/mL,  $C_{Glu}=60$  µL/mL ve  $C_{(NH_4)SO_3}=700$  mg/mL olarak saptanmıştır. Dolayısıyla bu koşulda biyokatalizörün ikincil yapısal içeriğini tahmin etmek için düzenli ve düzensiz  $\alpha$ -sarmalın yüzdelik değerleri toplam  $\alpha$ -heliks içeriğini elde etmek için toplanıp ortalaması alınmıştır. Ayrıca düzenli ve düzensiz  $\beta$ -tabakası da toplam  $\beta$ -tabakalı içerik elde etmek için yüzdelik değerleri toplanıp ortalama değerler Çizeige 3.4'de gösterilmiştir. Bu bağlamda  $\alpha$ -heliks içeriğinin azalması  $\beta$ -tabakaları ve sırasız yapıların ise aynı anda artması gözlenmiştir.



**Şekil 3.6** Farklı  $(NH_4)_2SO_4$  derişimlerinde  $C_E=200$  mg/mL ve  $C_{Glu}=60$   $\mu$ L/mL için CLEA'ların amid-I bantları ve ikincil yapı analizleri:

- $C_{(NH_4)_2SO_4}=500$  mg/mL
- $C_{(NH_4)_2SO_4}=600$  mg/mL
- $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$  mg/mL
- $C_{(NH_4)_2SO_4}=800$  mg/mL



**Çizelge 3.3** CLEA 'ların aktivitesine (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> derişimlerinin etkisi: Konformasyonel yapılarındaki değişimler

		Enzim konformasyonel yapı analizi (%)												
C <sub>E</sub> (mg/mL)	C <sub>Gm</sub> (µL/mL)	C <sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub> (mg/mL)	Aktivite (U)	Tyrosine residues (1610-1613 cm <sup>-1</sup> )	Aggregated strands /side chains (1619-1921 cm <sup>-1</sup> )	β-Sheet (1627-1632 cm <sup>-1</sup> )	β-Sheet (1635-1641 cm <sup>-1</sup> )	β-Sheet (1643-1646 cm <sup>-1</sup> )	α-Helix (unordered) (1647-1653 cm <sup>-1</sup> )	α-Helix (1655-1660 cm <sup>-1</sup> )	Left-handed α-Helix (1663-1669 cm <sup>-1</sup> )	β-Turns (1671-1979 cm <sup>-1</sup> )	β-Turns (1680-1684 cm <sup>-1</sup> )	β-Sheet (antiparalel β-sheet) (1686-1992 cm <sup>-1</sup> )
200	60	500	9.57	1.58	6.85	15.46	15.21	17.17	17.13	11.96	11.96	8.19	8.19	6.45
		600	8.74	1.05	6.79	13.11	16.35	25.46	25.46	25.75	25.75	8.18	8.18	3.31
		700	9.57	3.34	8.45	18.15	23.24		21.85			16.81	16.81	8.16
		800	9.50	1.15	6.82	13.95	16.11	20.52	20.52	21.65	21.65	8.19	8.19	3.42



**Çizelge 3.4** CLEA'ların aktivitesine  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  derişimlerinin etkisi: Konformasyonel yapılarındaki değişimler

Enzim konformasyonel yapı analizi (Ortalama değişimler)									
$C_E$ (mg/mL)	$C_{GM}$ ( $\mu$ L/mL)	$C_{\text{NH}_4\text{SO}_4}$ (mg/mL)	Aktivite (U)	Tyrosine (1610-1613 $\text{cm}^{-1}$ )	Aggregated (1619-1921 $\text{cm}^{-1}$ )	$\alpha$ -Helix (1647-1669 $\text{cm}^{-1}$ )	$\beta$ -Sheet (1627-1646 $\text{cm}^{-1}$ )	Turns (1671-1984 $\text{cm}^{-1}$ )	Antiparalel (1686-1992 $\text{cm}^{-1}$ )
200	60	500	9.57	1.58	6.85	15.42	15.34	8.19	6.45
		600	8.74	1.05	6.79	25.61	14.73	8.18	3.31
		700	9.57	3.34	8.45	21.15	20.70	16.81	8.16
		800	9.50	1.15	6.82	21.09	15.03	8.19	3.42

### 3.1.3 Proteik feeder ajan derişimi etkisi

Endüstriyel ölçekte kullanılan pek çok enzimde olduğu gibi proteaz enzimlerinin de üretim ortamlarından gelen safsızlıklar söz konusudur. Bu safsızlık nedeniyle genel olarak kullanılan birim enzim kütlelerinde oldukça düşük miktarda katalitik aktivite gösteren proteine yani aktif konum bulunur. CLEA formunda immobilize enzim sistemlerinin üretiminde immobilizasyon ortamına fazladan ve katalitik özellik göstermeyen BSA gibi bir makro proteinlerin eklenmesi hazırlanan CLEA'ların katalitik performanslarına önemli katkılar sağlamaktadır. Bunun yanı sıra, proteinlerin yapı taşı olan aminoasitler de CLEA'ların katalitik aktivitelerinin performanslarına önemli katkılar sağlamaktadır (Aytar ve Bakır, 2008). Bu çalışmada da BSA ve lizin gibi proteik feeder ajanların CLEA aktivitelerine ve enzim konformasyonel yapıları üzerine etkileri araştırılmıştır.

#### 3.1.3.1 Sığır serum albümin derişimi etkisi

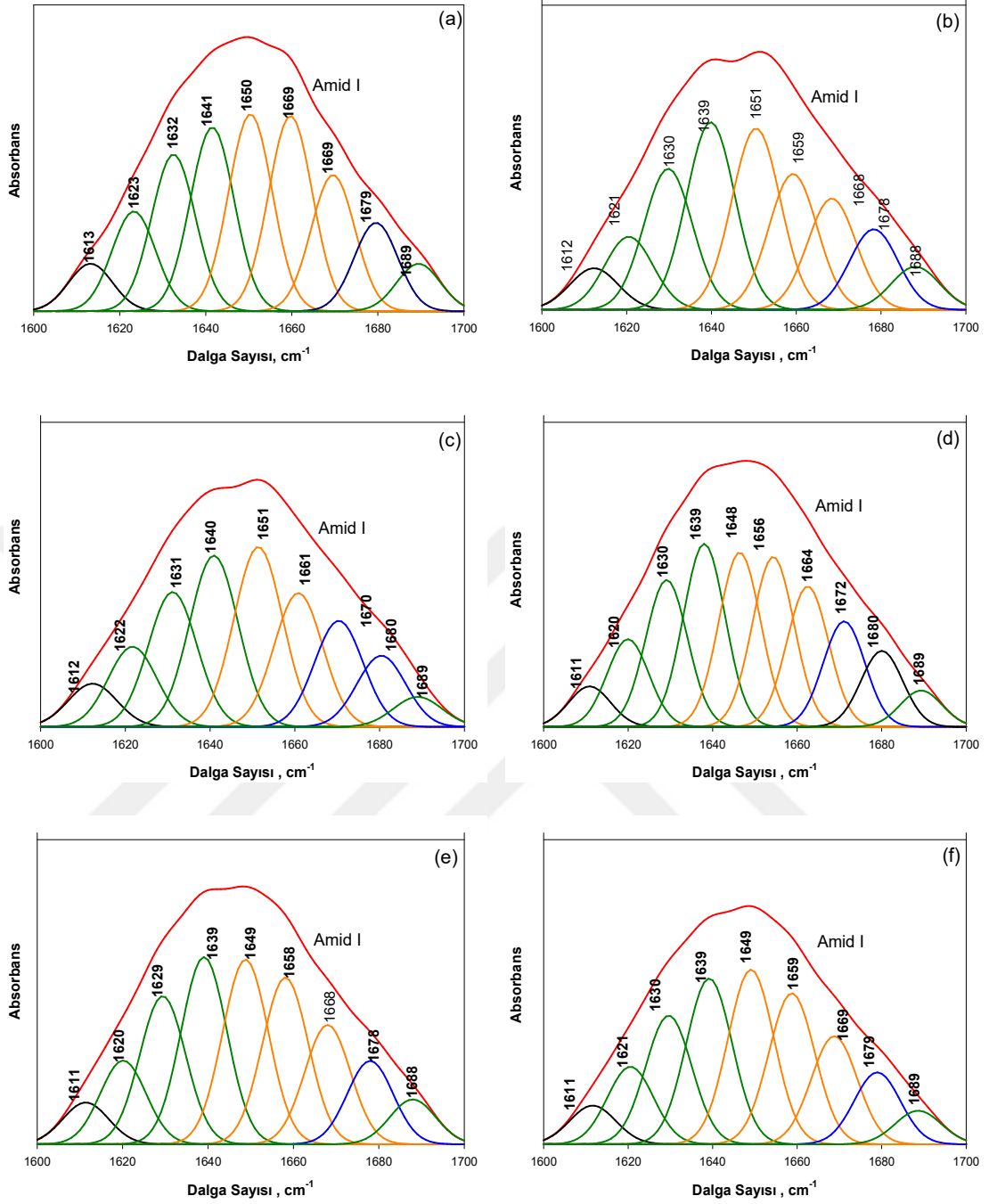
CLEA formundaki enzim sisteminin katalitik aktivitesine BSA derişiminin etkisi;  $C_E=200$  mg/mL başlangıç enzim derişimi,  $C_{Glu}=60$  µL/mL çapraz bağlayıcı ajan glutraldehit derişimi ve hem  $C_{(NH_4)_2SO_4}=500$  hem de  $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$  mg/mL gibi iki farklı presipitasyon ajanı amonyum sülfat derişim koşullarında incelenmiştir.

BSA katkısının gerçekleştirilmediği CLEA formundaki enzim immobilizasyon sürecinde ulaşılan katalitik aktivite değeri ile kıyaslandığında BSA katkısının katalitik aktivite üzerine olumsuz bir etkisi saptanmıştır. Ancak bu etkiler presipitasyon koşullarına bağlı olarak farklı etkilere sahip olduğu görülmektedir.  $C_{(NH_4)_2SO_4}=500$  mg/mL gibi düşük presipitasyon ajan derişiminde gerçekleştirilen taşıyıcısız immobilize enzim sistemlerinde BSA derişiminin artmasıyla katalitik aktivitelerde sürekli bir artış gözlenirken,  $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$  mg/mL gibi yüksek presipitasyon ajan derişiminde gerçekleştirilen taşıyıcısız immobilize enzim sistemlerinde BSA derişiminin artmasıyla katalitik aktivitelerde sürekli bir azalma eğilimi görülmektedir.  $C_{BSA}=16$  mg/mL'den daha yüksek derişimlerinde BSA katkısının oluşturulan biyokatalizörün sisteminin katalitik performansında bir gelişme sağlayabileceği öngörülebilir. Ancak bu durumda da oluşturulan immobilize sistem bir taşıyıcılı immobilize enzim sistemine doğru eğilim gösterebileceğinden daha yüksek derişimlerde çalışılması bu çalışmanın amaç ve

kapsamına uygun olmayacaktır.

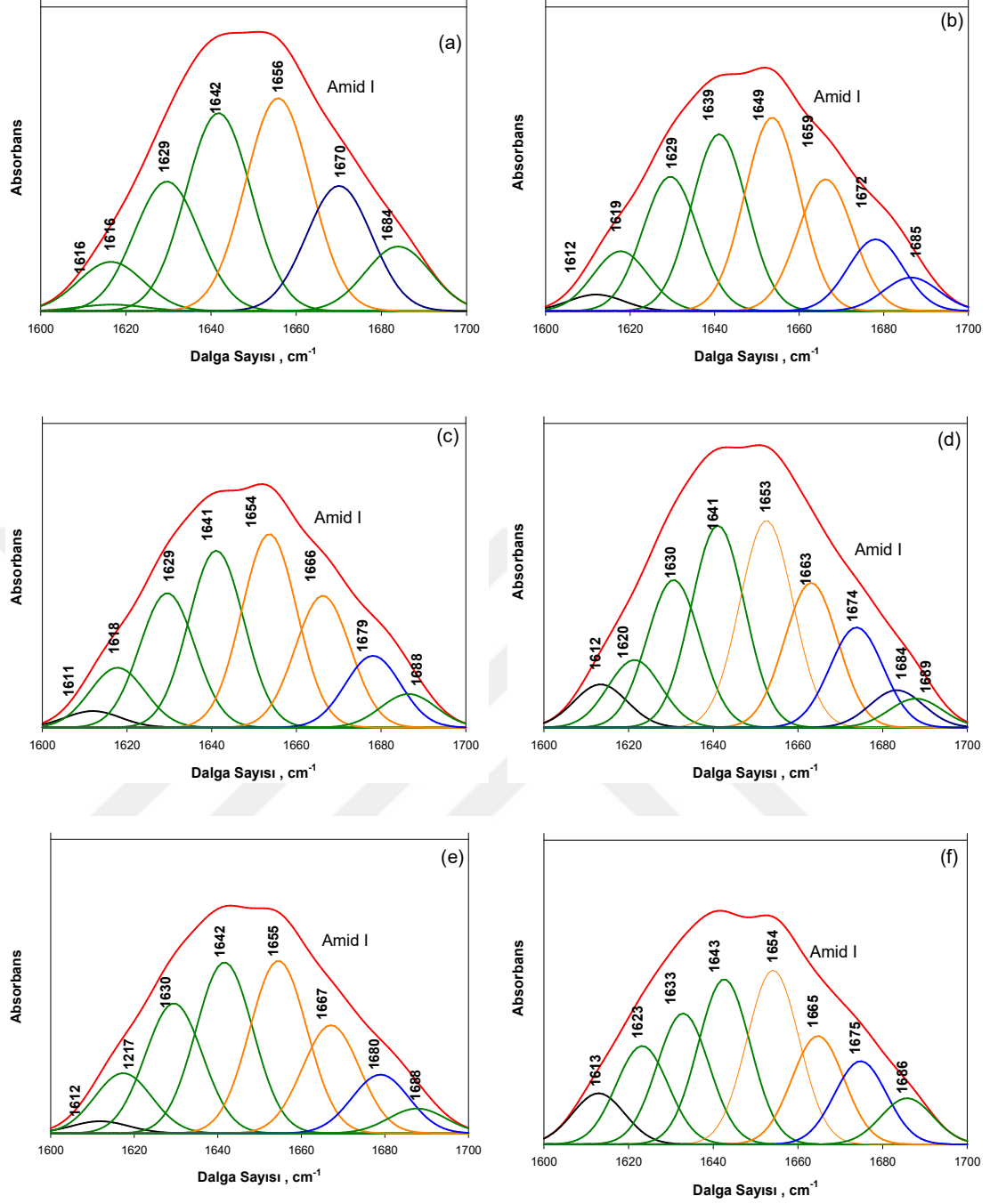
Bu çalışmada, ikincil yapısal içeriğin nihai sonucu için her bileşenin ortalaması alınmış ve enzimatik dalgalanmayı açıklığa kavuşturmak için 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$  arasında BSA katkısı gerçekleştirilmiş biyokatalizör için eğri uydurma işlemi yapılmıştır. İlk eğri uydurma süreci için alt bantların sayısı ve konumu ile tepe yükseklikleri ve genişlikleri gibi başlangıç girdi parametreleri girilmiştir. Nihai uyanlar için bant aralıkları, genişlikleri ve tüm bantların şekilleri eşzamanlı olarak değiştirilmiştir. Ancak pozisyonların yinelemeler sırasında değişmesine izin verilmemiştir. Orijinalin ve uydurulmuş eğrinin ikinci türevleri, eğri uydurma doğruluğunu sağlamak için karşılaştırılmıştır. Son olarak da en uygun eşanlamli türevler onaylanmıştır. Takılan bileşenlerin kesirli alanları, münferit bantların ve daha sonra farklı ikincil yapı elemanlarının ( $\alpha$ -sarmal,  $\beta$ -tabaka, dönüş ve rasgele bobinler) yüzdesini hesaplamak için kullanılmıştır. Elde edilen deneysel bulgular ve üretilen CLEA'ların FTIR-HATR spektrumlarının 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığındaki amid I bandının bilgisayar ortamında gerçekleştirilen ikincil yapı analizleri Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'de gösterilmiştir. Amid I içinde yer alan ikincil yapıları oluşturan bileşenlerin yüzde değişimleri ise Çizelge 3.5'de sunulmuştur. BSA'nın ikincil yapısal içeriği tahmin etmek için basitlik açısından, düzenli ve düzensiz  $\alpha$ -sarmalın yüzdelik değerleri toplam  $\alpha$ -heliks içeriğini elde etmek için toplanıp ortalaması alınmıştır. Ayrıca düzenli ve düzensiz  $\beta$ -tabakası da toplam  $\beta$ -tabakalı içerik elde etmek için yüzdelik değerleri toplanıp ortalama değerleri ise Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

Daha kesin olarak, katalitik aktivitenin artmasıyla sarmal içeriğinin marjinal olarak azalmasına neden olurken,  $\beta$ -tabakaları ve sırasız yapıları aynı anda artmaktadır. BSA,  $\alpha$ -helikal bakımından zengin globüler bir protein olduğundan enzimatik sentez sırasında esas olarak bu bileşeni kaybeder. Sonuç olarak 500 mg/mL  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  derişiminde BSA derişiminin artmasıyla katalitik aktivite artar. Eğri uydurma sonuçlarına dayanarak  $\alpha$ -heliks içeriği sırasız yapılarda paralel bir artış ile  $\beta$ -tabakaları ve sırasız yapıların ise aynı anda azalmasına neden olmaktadır. Amonyum sülfatın  $\text{C}_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=700$  mg/mL derişiminde BSA derişiminin artmasıyla katalitik aktivite azalır. Bu da  $\alpha$ -heliks içeriğinin azalmasına,  $\beta$ -tabakaları ve sırasız yapıların ise aynı anda artmasına neden olmaktadır.



**Şekil 3.7** Farklı BSA derişimlerinde  $C_E=200$  mg/mL,  $C_{Glu}=60$   $\mu$ L/mL ve  $C_{(NH_4)SO_3}=500$  mg/mL koşullarında hazırlanan CLEA'ların amid I bantları ve ikincil yapı analizleri:

- BSA yok
- $C_{BSA}=1$  mg/mL
- $C_{BSA}=2$  mg/mL
- $C_{BSA}=4$  mg/mL
- $C_{BSA}=8$  mg/mL
- $C_{BSA}=16$  mg/mL.



**Şekil 3.8** Farklı BSA derişimlerinde  $C_E=200$  mg/mL,  $C_{Glu}=60$   $\mu$ L/mL ve  $C_{(NH_4)_2SO_3}=700$  mg/mL koşullarında hazırlanan CLEA'ların amid I bantları ve ikincil yapı analizleri:

- BSA yok
- $C_{BSA}=1$  mg/mL
- $C_{BSA}=2$  mg/mL
- $C_{BSA}=4$  mg/mL
- $C_{BSA}=8$  mg/mL
- $C_{BSA}=16$  mg/mL.

**Çizelge 3.5** CLEA'ların aktivitesine BSA derişimlerinin etkisi: Konformasyonel yapılarındaki değişimler

		Enzim konformasyonel yapı analizi (%)													
$C_E$ (mg/mL)	$C_{Gm}$ ( $\mu$ L/mL)	$C_{NH42SO4}$ (mg/mL)	$C_{BSA}$ (mg/mL)	Aktivite (U)	Tyrosine residues (1610-1613 $cm^{-1}$ )	Aggregated strands /side chains (1619-1921 $cm^{-1}$ )	$\beta$ -Sheet (1627-1632 $cm^{-1}$ )	$\beta$ -Sheet (1635-1641 $cm^{-1}$ )	$\beta$ -Sheet (1643-1646 $cm^{-1}$ )	$\alpha$ -Helix (unordered) (1647-1653 $cm^{-1}$ )	$\alpha$ -Helix (1655-1660 $cm^{-1}$ )	Left-handed $\alpha$ -Helix (1663-1669 $cm^{-1}$ )	$\beta$ -Turns (1671-1979 $cm^{-1}$ )	$\beta$ -Turns (1680-1684 $cm^{-1}$ )	$\beta$ -Sheet (antiparallel $\beta$ -sheet) (1686-1992 $cm^{-1}$ )
200	60	500	0	9.57	1.58	6.85	15.46	15.21	17.17	17.13	11.96	11.96	8.19	8.19	6.45
			1	3.77	3.80	7.64	14.53	16.79	22.45	15.5			9.02	6.01	4.21
			2	4.25	3.83	7.65	14.16	15.71	18.45	15.27	11.31	11.31	7.75		4.32
			4	5.32	4.23	7.87	13.95	15.74	17.01	15.85	11.48	11.48	7.76		4.33
			8	5.73	4.31	7.95	13.64	15.91	18.1	13.73	11.1	11.1	8.62		4.37
			16	6.97	4.41	8.03	13.60	15.92	15.05	9.00	10	10	10.6	6.70	4.38
200	60	700	0	9.57	3.34	8.45	18.15	23.24		21.85			16.81		8.16
			1	7.88	4.01	8.36	15.00		23.18	13.00	11.05	11.05	12.76	6.80	5.84
			2	5.56	3.99	8.26	16.44	21.76		20.55	13.5	13.5	9.75		5.75
			4	5.30	3.10	6.79	15.61	20.74		19.00	20.05		9.33		5.38
			8	4.54	3.09	6.77	16.13		19.28		23.12	16.94		9.30	5.37
			16	3.46	1.10	5.41	16.00	18.09	23.62		18.34	10.00		4.19	3.25

**Çizelge 3.6** CLEA 'ların aktivitesine BSA derişimlerinin etkisi: Konformasyonel yapılarındaki değişimler

Enzim konformasyonel yapı analizi (Ortalama değişimler)										
$C_E$ (mg/mL)	$C_{Gln}$ ( $\mu$ L/mL)	$C_{(NH_4)_2SO_4}$ (mg/mL)	$C_{BSA}$ (mg/mL)	Aktivite ( $\mu$ )	Tyrosine (1610-1613 $cm^{-1}$ )	Aggregated (1619-1921 $cm^{-1}$ )	$\alpha$ -Helix (1647-1669 $cm^{-1}$ )	$\beta$ -Sheet (1627-1646 $cm^{-1}$ )	Turns (1671-1984 $cm^{-1}$ )	Antiparallel (1686-1992 $cm^{-1}$ )
200	60	500	0	9.57	1.58	6.85	15.42	15.34	8.19	6.45
			1	3.77	3.80	7.64	18.98	15.69	7.52	3.21
			2	4.25	3.83	7.65	15.01	15.71	7.75	4.31
			4	5.32	4.23	7.87	14.78	15.74	7.76	4.33
			8	5.73	4.31	7.95	14.31	15.91	8.62	4.37
			16	6.97	4.41	8.03	11.35	15.92	8.65	4.38
200	60	700	0	9.57	3.34	8.45	21.15	20.70	16.81	8.16
			1	7.88	4.01	8.47	12.03	19.09	9.78	5.84
			2	5.56	3.99	8.26	17.03	19.10	9.75	5.75
			4	5.30	3.10	6.79	19.53	18.18	9.33	5.38
			8	4.54	3.09	6.77	20.03	18.14	9.30	5.37
			16	3.46	1.10	5.42	20.98	17.01	7.10	5.25



### 3.1.3.2 Lizin derişimi etkisi

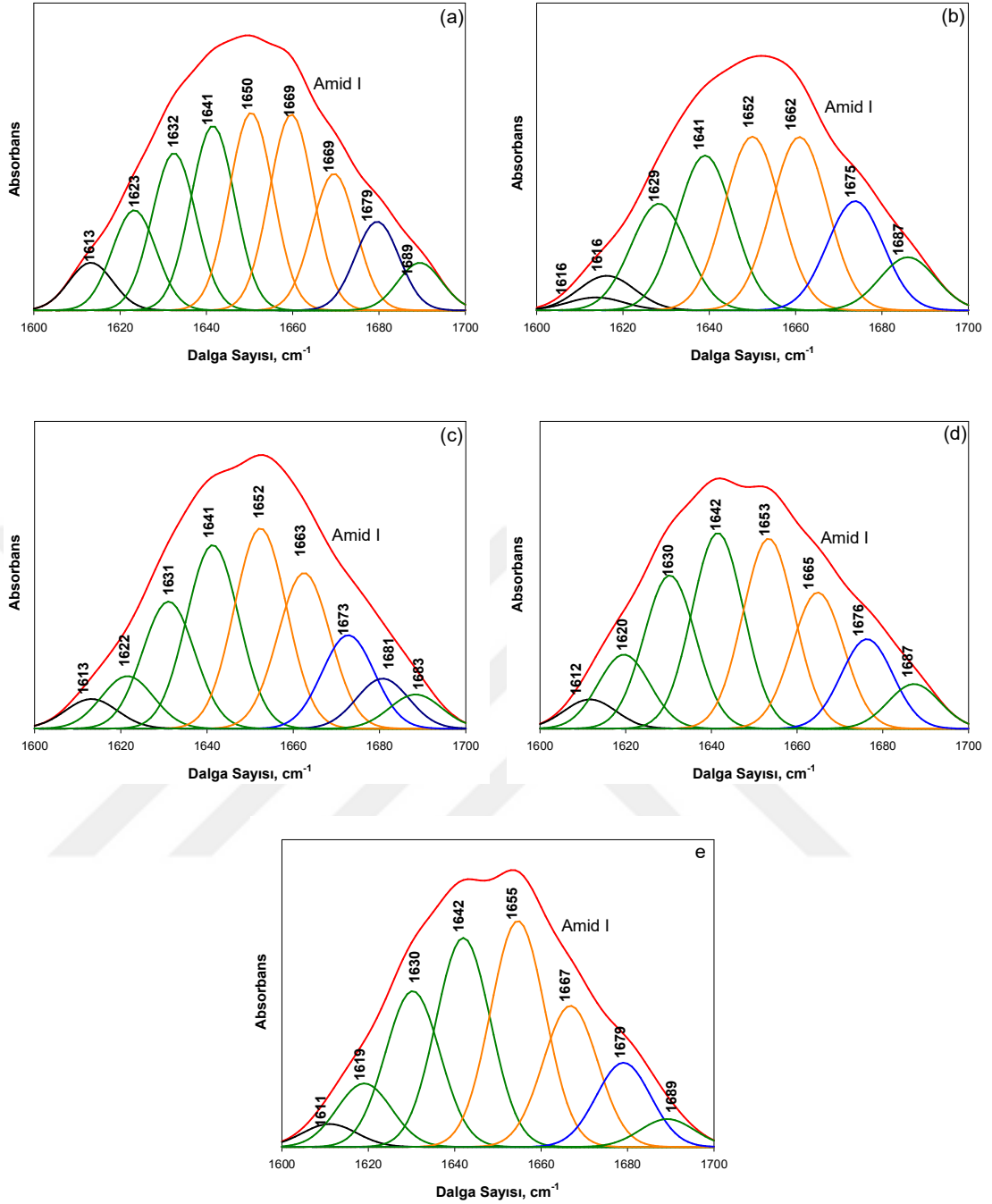
CLEA formundaki enzim sisteminin katalitik aktivitesine lizin derişiminin etkisi;  $C_E=200$  mg/mL başlangıç enzim derişimi,  $C_{Glu}=60$   $\mu$ L/mL gluteraldehit derişimi ve hem  $C_{(NH_4)_2SO_3}=500$  mg/mL hem de  $C_{(NH_4)_2SO_3}=700$  mg/mL gibi iki farklı amonyum sülfat derişimi koşullarında incelenmiştir. Lizin katkısının gerçekteştirilmediği CLEA formundaki enzim immobilizasyon sürecinde ulaşılan katalitik aktivite değeri ile kıyaslandığında lizin katkısının katalitik aktivite üzerine olumsuz bir etkisi saptanmıştır. Ancak bu etkiler presipitasyon koşullarına bağlı olarak farklı etkilere sahip olduğu görölmektedir. Presipitasyon sürecinin  $C_{(NH_4)_2SO_3}=500$  mg/mL olduğu koşullarda elde edilen aktivite değerleri ile kıyaslandığında, amonyum sülfat derişiminin  $C_{(NH_4)_2SO_3}=700$  mg/mL olduğu koşullarda artan salting out etkisinden dolayı taşıtıcısız immobilize enzim sistemlerinin katalitik performanslarının azaldığı görölmektedir.  $C_{Lys}=8$  mg/mL'den daha yüksek derişimlerinde lizin katkısının oluşturulan biyokatalizörün sisteminin katalitik performansında bir gelişme sağlayabileceği öngörülebilir. Ancak BSA'da da olduğu gibi oluşturulan immobilize sistem bir taşıyıcılı immobilize enzim sistemine doğru eğilim göstereceğinden daha yüksek derişimlerde lizin kullanımını bu çalışmanın amaç ve kapsamı başka yönelere kaydıracaktır. Elde edilen deneysel bulgular CLEA'ların FTIR-HATR spektrumlarının  $1600-1700$   $cm^{-1}$  dalga sayısı aralığındaki amid I bandının bilgisayar ortamında gerçekteştirilen ikincil yapı analizleri Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'de gösterilmiştir. Amid I içinde yer alan ikincil yapıları oluşturan bileşenlerin yüzde değişimleri ise Çizelge 3.7'de sunulmuştur. Lizin'nın ikincil yapısal içeriği tahmin etmek için basitlik açasından düzenli ve çarpıtılmış  $\alpha$ -sarmalın yüzdeler değerleri toplamı  $\alpha$ -helis içeriğini elde etmek için toplanp ortalaması alınmıştır. Ayrıca düzenli ve çarpık  $\beta$ -tabakası da toplam  $\beta$ -tabakalı içerik elde etmek için yüzdeler değerleri toplanp ortalama değerleri ise Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

Daha kesin olarak, katalitik aktivitenin artmasıyla sarmal içeriğinin marjinal olarak azalmasına neden olurken,  $\beta$ -tabakaları ve sırasız yapıları aynı anda artmaktadır. Lizin katkısının gerçekteştirilmediği CLEA formundaki enzim immobilizasyon sürecinde ulaşılan en yüksek katalitik aktivite değeri ile kıyaslandığında  $C_{(NH_4)_2SO_3}=500$  mg/mL derişiminde lizin derişiminin artmasıyla katalitik aktivite artar. Eğri uydurma sonuçlarına dayanarak,  $\alpha$ -heliks içeriği sırasız yapılarda paralel bir azalışı ile  $\beta$ -tabakaları ve sırasız yapıların ise aynı anda artmasına neden olmaktadır.



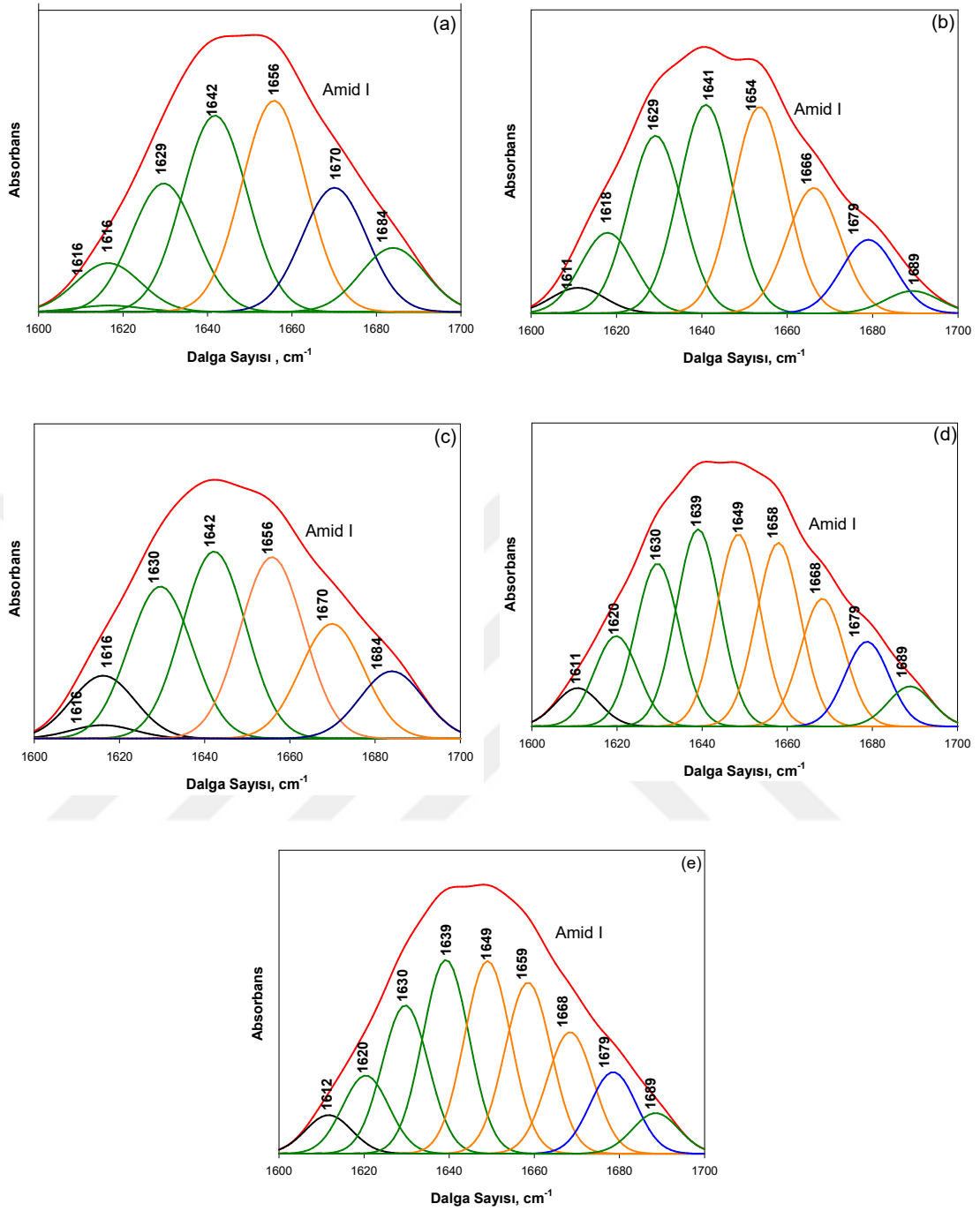
$C_{(NH_4)_2SO_3}=700$  mg/mL koşullarında ise lizin derişiminde artan salting out etkisinden dolayı taşıtıcısız immobilize enzim sistemlerinin katalitik performanslarının azaldığı görülmektedir. Bu da  $\alpha$ -heliks içeriğinin azalmasına,  $\beta$ -tabakaları ve sırasız yapıların ise aynı anda artmasına neden olmaktadır.





**Şekil 3.9** Farklı lizin derişimlerinde  $C_E=200$  mg/mL,  $C_{Glu}=60$  µL/mL ve  $C_{(NH_4)_2SO_3}=500$  mg/mL koşullarında hazırlanan CLEA'ların amid I bantları ve ikincil yapı analizleri:

- Lysin yok
- $C_{Lys}=1$  mg/mL
- $C_{Lys}=2$  mg/mL
- $C_{Lys}=4$  mg/mL
- $C_{Lys}=8$  mg/mL.



**Şekil 3.10** Farklı lizin derişimlerinde  $C_E=200$  mg/mL,  $C_{Glu}=60$   $\mu$ L/mL ve  $C_{(NH_4)_2SO_3}=700$  mg/mL koşullarında hazırlanan CLEA'ların amid I bantları ve ikincil yapı analizleri:  
a) Lizin yok  
b)  $C_{Lys}=1$  mg/mL  
c)  $C_{Lys}=2$  mg/mL  
d)  $C_{Lys}=4$  mg/mL  
e)  $C_{Lys}=8$  mg/mL.

**Çizelge 3.7** CLEA'ların aktivitesine lizin derişiminin etkisi: Konformasyonel yapılarındaki değişimler

		Enzim konformasyonel yapı analizi (%)													
$C_E$ (mg/mL)	$C_{Gln}$ ( $\mu$ L/mL)	$C_{(NH_4)_2SO_4}$ (mg/mL)	$C_{Lys}$ (mg/mL)	Aktivite (U)	Tyrosine residues (1610-1613 cm <sup>-1</sup> )	Aggregated strands /side chains (1619-1921 cm <sup>-1</sup> )	$\beta$ -Sheet (1627-1632 cm <sup>-1</sup> )	$\beta$ -Sheet (1635-1641 cm <sup>-1</sup> )	$\beta$ -Sheet (1643-1646 cm <sup>-1</sup> )	$\alpha$ -Helix (unordered) (1647-1653 cm <sup>-1</sup> )	$\alpha$ -Helix (1655-1660 cm <sup>-1</sup> )	Left-handed $\alpha$ -Helix (1663-1669 cm <sup>-1</sup> )	$\beta$ -Turns (1671-1979 cm <sup>-1</sup> )	$\beta$ -Turns (1680-1684 cm <sup>-1</sup> )	$\beta$ -Sheet (antiparalel $\beta$ -sheet) (1686-1992 cm <sup>-1</sup> )
200	60	500	0	9.57	1.58	6.85	15.46	15.21	17.17	17.13	11.96	11.96	8.19	8.19	6.45
			1	6.54	1.49	4.48	13.45	20.17	22.39	26.11	23.66	8.51	2.13		
			2	7.57	2.13	5.77	14.93	20.90	20.75	19.40	10.45	4.03			
			4	8.48	2.22	6.13	16.36	19.56	20.33	15.44	10.08	5.04			
			8	9.12	2.36	7.17	17.02	23.4	20.33	14.85	9.90	4.42			
200	60	700	0	9.57	3.34	8.45	18.15	23.24	24.20	21.85	16.81	8.16			
			1	4.35	2.62	7.10	13.85	18.22	15.03	15.12	8.00	3.37			
			2	6.11	3.02	7.24	14.58	17.56	15.03	23.24	15.86	3.47			
			4	7.81	3.27	8.11	13.01	21.63	15.46	15.56	11.12	3.57			
			8	8.45	3.47	8.33	17.79	17.57	15.46	15.37	10.31	3.80			

**Çizelge 3.8** CLEA'ların aktivitesine lizin derişimini etkisi: Konformasyonel yapılarındaki değişimler

Enzim konformasyonel yapı analizi (Ortalama değişimler)										
$C_E$ (mg/mL)	$C_{Gm}$ ( $\mu$ L/mL)	$C_{NH_4SO_4}$ (mg/mL)	$C_{Cl^-}$ (mg/mL)	Aktivite (U)	Tyrosine (1610-1613 $cm^{-1}$ )	Aggregated (1619-1921 $cm^{-1}$ )	$\alpha$ -Helix (1647-1669 $cm^{-1}$ )	$\beta$ -Sheet (1627-1646 $cm^{-1}$ )	Turns (1671-1984 $cm^{-1}$ )	Anhparallel (1686-1992 $cm^{-1}$ )
200	60	500	0	9.57	1.58	6.85	15.42	15.34	8.19	6.45
			1	6.54	1.49	4.48	23.34	16.81	8.51	2.13
			2	7.57	2.13	5.77	21.90	17.92	8.45	4.03
			4	8.48	2.22	6.13	18.10	17.96	7.56	4.95
			8	9.12	2.36	7.17	17.59	20.21	9.90	4.97
200	60	700	0	9.57	3.34	8.45	21.15	20.70	16.81	8.16
			1	4.35	2.62	7.10	19.66	16.04	7.44	3.37
			2	6.11	3.02	7.24	19.55	16.07	7.77	3.47
			4	7.81	3.27	8.11	14.93	17.32	7.86	3.57
			8	8.45	3.47	8.33	13.71	17.68	7.90	3.80

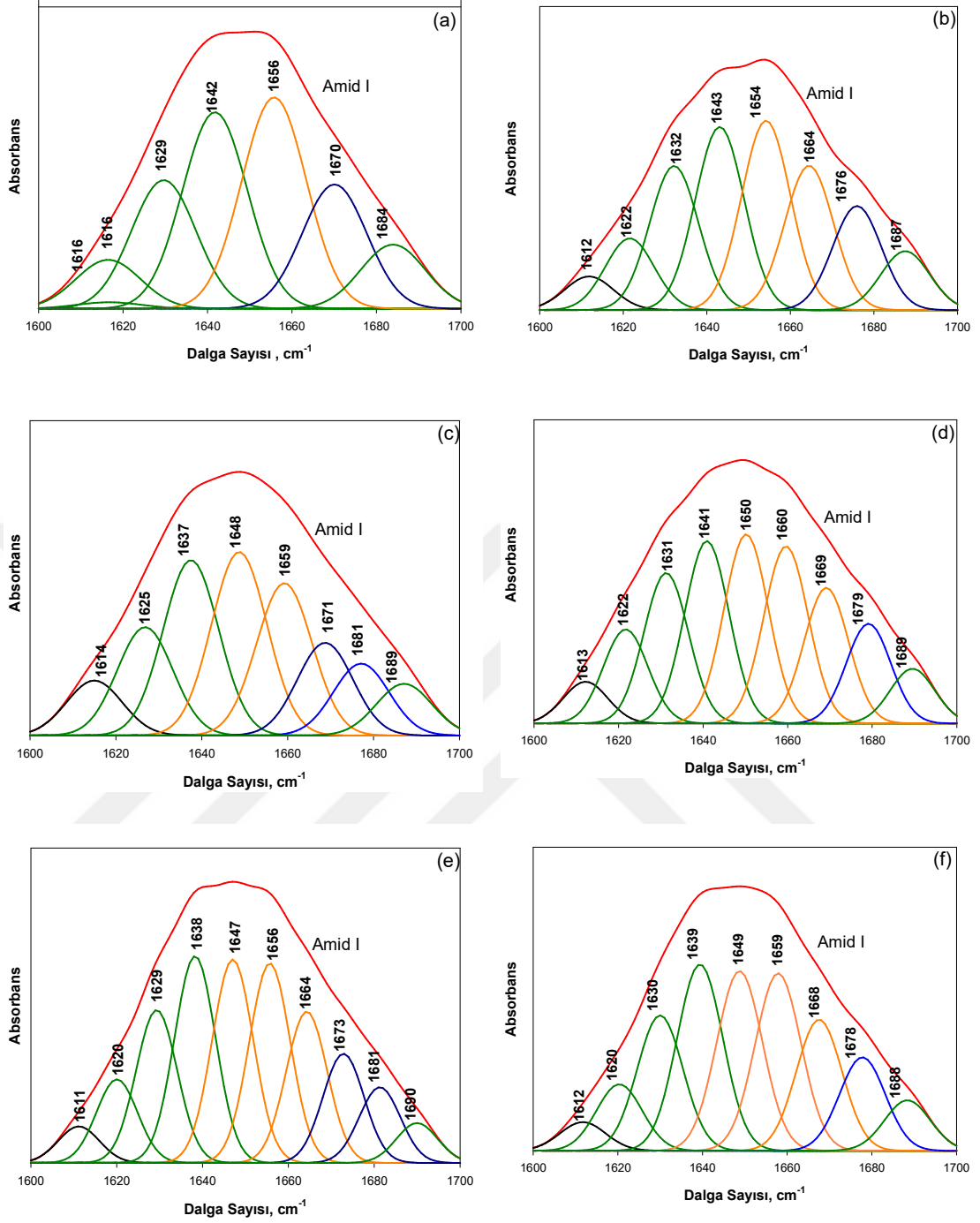
### 3.1.4 Çözücü türü etkisi

Endüstriyel uygulamalarda enzimlerle gerçekleştirilen enzimatik reaksiyonlar sulu ortamlarda tampon sistemlerinde ya da değişik organik çözücü ortamlarında gerçekleştirilmektedir. Bu bağlamda, 50 mM pH=7 koşullarındaki sodyum fosfat tamponunda başlangıç enzim derişiminin  $C_E=200$  mg/mL, amonyum sülfat derişiminin  $C_{(NH_4)_2SO_3}=700$  mg/mL ve glutraldehit derişiminin  $C_{Glu}=60$  µL/mL olduğu koşullarda üretilen CLEA'ların katalitik performansına; deiyonize su, sodyum fosfat tampon sistemi ile dimetilformamit, dimetilsülfoksit, etanol, etilasetat, *n*-hekzan, *i*-oktan, metanol ve siklohekzan gibi değişik organik çözücü sistemlerinin etkisi araştırılmıştır. 25 mL hacimli amber cam şişelerin içerisine herbiri 15 mL hacimde olacak şekilde belirtilen çözücü sistemlerinden ve yaklaşık 150 mg CLEA eklenmiştir. Amber cam şişelerin hava sızdırmaz kapakları kapatıldıktan sonra enzimler oda sıcaklığında 2 gün süreyle belirtilen çözücü sistemlerine maruz bırakılmışlardır. Belirtilen alıkonma süresi sonunda CLEA'lar santrifüjleme ve 50 mM pH=7 koşullarındaki sodyum fosfat tampon sistemi ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra liyofilizatörde kurutulmuş ve katalitik aktiviteleri ölçülmüştür. CLEA formundaki immobilize enzim sistemlerinin katalitik aktivitesine çözücü sistemlerin etkisi Çizelge 3.9'da gösterilmiştir.

En yüksek katalitik aktivite 50 mM pH=7 koşullarındaki sodyum fosfat tampon sisteminde 9.57 U olarak ölçülmesine karşın, en düşük katalitik aktivite ise dimetilsülfoksit ortamında 4.47 U olarak ölçülmüştür. Deiyonize su ortamında CLEA'ların katalitik aktiviteleri yaklaşık olarak %33 kaybederek 6.40 U'ye azalmıştır. Deiyonize su ve dimetilsülfoksit dışındaki diğer çözücü sistemlerinde CLEA'ların belirtilen organik çözücülere karşı yüksek toleransa sahip olduğu görülmektedir. Yine su ve dimetilsülfoksit dışındaki diğer çözücü sistemlerinde CLEA'ların katalitik aktiviteleri en yüksek katalitik aktivite değeri ile kıyaslandığında % 3.7 ile 15.2 arasında azalmalar saptanmıştır. Elde edilen bulgular ışığında dimetilsülfoksit ortamı dışında özellikle sodyum fosfat tampon sistemi-organik çözücü ortamlarını içeren iki fazlı sistemler için uygun olduğu görülmektedir. Çözücü sistemine bağlı olarak büyükten küçüğe doğru katalitik aktivite değerlerinin elde edildiği ortamlar; Fosfat tamponu > proteaz > etilasetat > metanol > siklohekzan > *n*-Hekzan > *i*-oktan > dimetilformamit > etanol > deiyonize su > dimetilsülfoksit

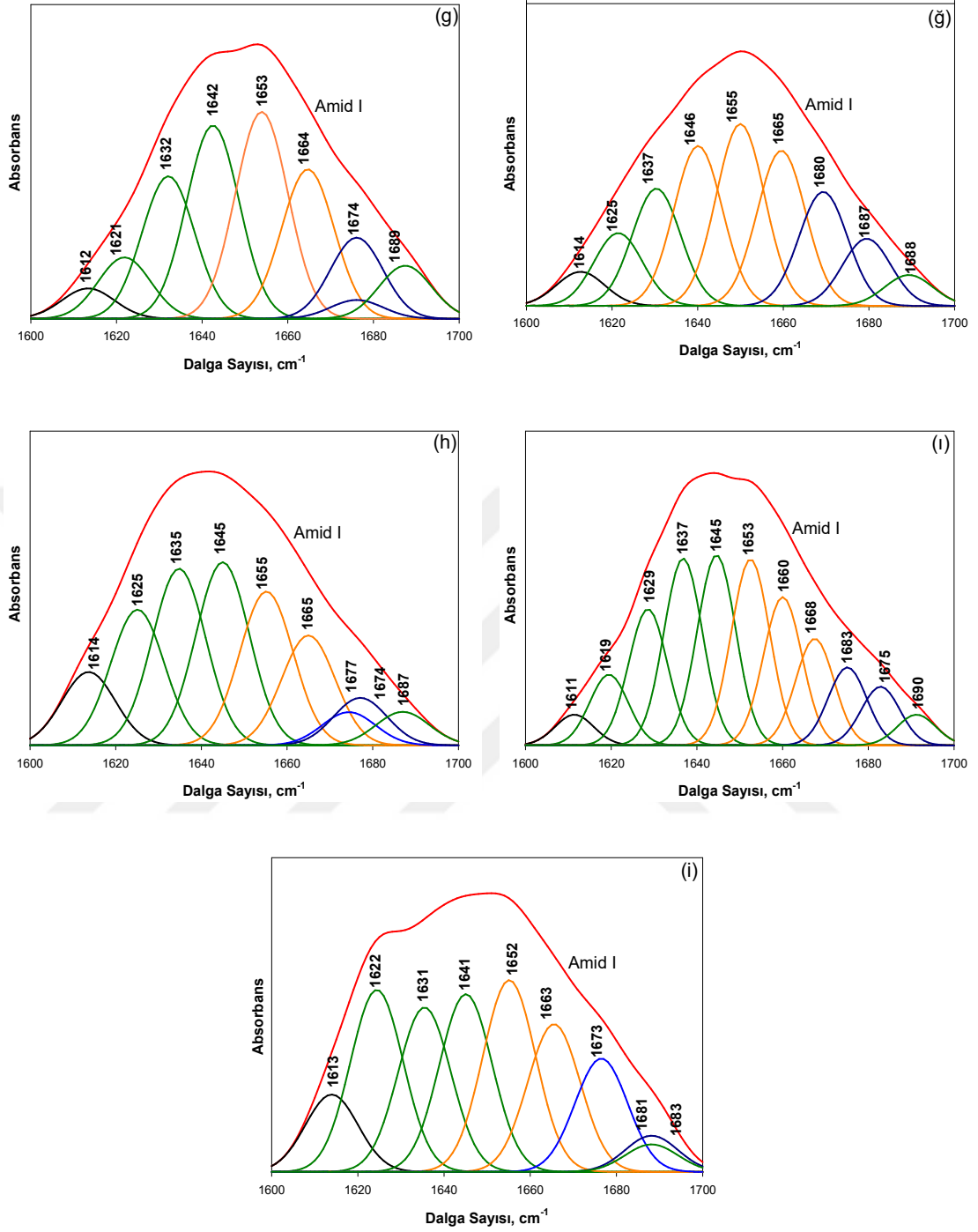
şeklinde sıralanmaktadır.

Elde edilen deneysel bulgular farklı organik bileşiklerin FTIR-HATR spektrumlarının 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığındaki amid I bandının bilgisayar ortamında gerçekleştirilen ikincil yapı analizleri Şekil 3.11’de gösterilmiştir. Amid I içinde yer alan ikincil yapıları oluşturan bileşenlerin yüzde değişimleri ise Çizelge 3.9’da sunulmuştur. Değişik çözücü sistemlerine maruz bırakılan CLEA’ların ikincil yapısal içeriği tahmin etmek için basitlik açısından düzenli ve düzensiz  $\alpha$ -sarmalın yüzdeler değeri toplam  $\alpha$ -heliks içeriğini elde etmek için toplanıp ortalaması alınmıştır. Ayrıca düzenli ve düzensiz  $\beta$ -tabakası da toplam  $\beta$ -tabakalı içerik elde etmek için yüzdeler değeri toplanıp ortalama değeri ise Çizelge 3.10’da gösterilmiştir. Bu da katalitik aktivite değerinin sırasıyla azalması  $\alpha$ -heliks içeriğinin de artmasına,  $\beta$ -tabakaları ve sırasız yapıların ise aynı anda azalmasına neden olmaktadır.



**Şekil 3.11** Değişik organik çözücü sistemlerine maruz bırakılan CLEA'ların amid I bantları ve ikincil yapı analizleri:  
a) Tampon ortamı  
b) Serbes proteaz  
c) Etilasetat  
d) Metanol  
e) Siklohekzan  
f) *n*-Hekzan





**Şekil 3.11** Değişik organik çözücü sistemlerine maruz bırakılan CLEA'ların amid I bantları ve ikincil yapı analizleri: (Devam)  
 g) *i*-Oktan  
 ğ) Dimetilformamit  
 h) Etanol  
 ı) Deiyonize su  
 i) Dimetilsülfoksit

**Çizelge 3.9** Değişik çözücü sistemlerine maruz bırakılan CLEA'ların katalitik aktivitesi ve konformasyonel yapılarındaki değişimler  
( $C_E=200$  mg/mL,  $C_{Glu}=60$  µL/mL ve  $C_{(NH_4)SO_3}=700$  mg/mL)

Çözücü türü	Aktivite (U)	Enzim konformasyonel yapı analizi (%)									
		Tyrosine residues (1610-1613 cm <sup>-1</sup> )	Aggregated strands /side chains (1619-1921 cm <sup>-1</sup> )	β-Sheet (1627-1632 cm <sup>-1</sup> )	β-Sheet (1635-1641 cm <sup>-1</sup> )	β-Sheet (1643-1646 cm <sup>-1</sup> )	α-Helix (unordered) (1647-1653 cm <sup>-1</sup> )	α-Helix (1655-1660 cm <sup>-1</sup> )	Left-handed α-Helix (1663-1669 cm <sup>-1</sup> )	β-Turns (1671-1979 cm <sup>-1</sup> )	β-Turns (1680-1684 cm <sup>-1</sup> )
Tampon	9.58	3.34	8.45	18.15	23.24	16.43	21.85	16.81	16.81	16.81	8.16
Proteaz	9.57	8.77	18.11	19.83	19.83	15.22	12.13	8.72	11.19	11.19	6.35
Etilasetat	9.34	6.40	12.33	18.66	18.66	13.52	12.76	11.93	12.67	6.87	4.86
Metanol	9.22	4.48	9.26	15.01	20.46	12.16	14.50	12.05	8.91	8.91	3.81
Sikloheksan	9.07	3.70	7.90	15.93	15.93	14.88	14.74	11.06	8.72	8.72	3.72
<i>n</i> -Heksan	8.72	3.65	7.80	13.50	18.00	14.13	14.20	12.50	7.67	5.01	3.54
<i>i</i> -Oktan	8.48	3.63	7.71	12.90	17.76	18.49	14.62	11.18	8.37	4.03	3.31
Dimetilformamit	8.43	3.55	7.67	12.57	17.39	21.37	14.29	11.61	6.20	6.20	3.26
Etanol	8.38	2.73	6.64	13.38	16.31	20.38	15.36	11.53	9.48	2.39	2.90
Deiyonize su	6.40	2.64	6.33	12.14	16.42	22.37	17.24	12.10	6.37	4.79	2.60
Dimetilülfoksit	4.47	2.51	5.78	11.14	15.29	23.37	18.84	15.55	5.01	5.01	2.51

**Çizelge 3.10** CLEA'ların aktivitesine çözücü türü etkisi: Konformasyonel yapılarındaki değişimler  
( $C_E=200$  mg/mL,  $C_{Glu}=60$  µL/mL ve  $C_{(NH_4)SO_3}=700$  mg/mL)

Çözücü sistemi	Aktivite ( $\mu$ )	Enzim konformasyonel yapı analizi (Ortalama değişimler)					
		Tyrosine (1610-1613 $cm^{-1}$ )	Aggregated (1619-1921 $cm^{-1}$ )	$\alpha$ -Helix (1647-1669 $cm^{-1}$ )	$\beta$ -Sheet (1627-1646 $cm^{-1}$ )	Turns (1671-1984 $cm^{-1}$ )	Antiparalel (1686-1992 $cm^{-1}$ )
Tampon	9.58	3.34	8.45	21.15	20.70	16.81	8.16
Proteaz	9.57	8.74	18.11	12.02	19.83	11.19	6.35
Etilasetat	9.34	6.40	12.33	12.74	18.66	9.77	4.86
Metanol	9.22	4.48	9.26	12.90	17.74	8.91	3.81
Sikloheksan	9.07	3.70	7.90	13.56	17.64	8.72	3.72
<i>n</i> -Heksan	8.72	3.65	7.80	13.61	15.75	6.34	3.54
<i>i</i> -Oktan	8.48	3.63	7.71	14.76	15.33	6.20	3.31
Dimetilformamit	8.43	3.55	7.67	15.76	14.98	6.20	3.26
Etanol	8.38	2.73	6.64	15.76	14.85	5.94	2.90
Deiyonize su	6.40	2.64	6.33	17.24	14.28	5.58	2.60
Dimetilsülfoksit	4.47	2.51	5.78	19.25	13.22	5.01	2.51

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde çeşitli uygulamalar için daha çevreci ve verimli bir seçenek olarak enzimlerin kullanımı, araştırmacıları ekstrem koşullara dayanıklı enzim ve enzim grupları bulmaya itmiştir. Bunlardan birisi olan proteazlar, dünya enzim pazarının en geniş grubunu oluşturur ve çeşitli endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalardaki rolü ile dikkat çeken oldukça önemli bir enzim grubudur. Gıdadan deterjan endüstrisine, ilaç endüstrisinden atık su arıtımına, peptid sentezine kadar hemen hemen her alanda proteazları görmek mümkündür. Ayrıca canlı organizmalardaki hayati olan fizyolojik süreçlerde önemli roller üstlenmektedirler. Bundan yola çıkılarak ticari öneme sahip, ekonomik değeri olan proteazları; yeni ve doğal kaynaklardan izole etmek, saflaştırmak ve karakterize etmek araştırmacılar için itici bir güç olmuştur.

Mikroorganizmalar, enzim kaynağı olarak kullanılabilen en iyi kaynaklardır. Çünkü enzim teknolojisinde, en düşük maliyetle en yüksek verimi almak temel esastır. Mikroorganizmaların gerek kültüre edilme koşullarının kolay olması gerekse de kısa sürede yüksek verim sağlamaları, onları enzim çalışmaları için önemli bir kaynak haline getirmiştir. Endüstrideki zor ve ağır şartlara dayanıklı enzimlerin eldesinde özellikle ekstrem şartlarda yaşayabilen mikroorganizmalar tercih edilir. Bunun için de bilim insanları biyoteknolojik açıdan değerli olan yeni türleri tanımlamak için sürekli bir araştırma içerisinde bulunmaktadır.

CLEA enzimatik üretim proseslerinde serbest ya da immobilize enzim kullanımındaki darboğazların çözümü için son yıllarda geliştirilen yeni bir immobilizasyon yöntemidir. CLEA'ların 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 halen araştırma konuları arsındadır.

Bu çalışmada, *Bacillus* sp. türü mikroorganizmalardan izole edilmiş ticari proteaz enziminin önce amonyum sülfat ile presipitasyonu ve daha sonra glutaraldehit ile oluşan agregatların çapraz bağlaması yoluyla çapraz bağlı proteaz agregatları oluşturularak immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Süreli yayın veri tabanında konuya ilişkin özellikle proteaz enzimlerine yönelik yeterli bilgi birikimi bulunmaması nedeniyle yüksek lisans tez projesi orijinal bir çalışma niteliğindedir.

Proteazlar tarafından uyarılan konformasyonel ve ikincil yapıların ( $\alpha$ -sarmal,  $\beta$ -tabaka, dönüş ve rasgele bobinler) rastgele değişiklikleri FTIR spektroskopisi ile izlendi. İkincil yapısal içeriğin nihai sonucu ve enzimatik dalgalanmayı açıklığa kavuşturmak için 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$  arasında CLEA formundaki biyokatalizör, farklı amonyum sülfat derişimleri, BSA ve lizin gibi proteik ajan, değişik organik çözücü sistemlerinin katalitik aktiviteleri için eğri uydurma yapılmıştır. İlk eğri uydurma için, alt bantların sayısı ve konumu ile tepe yükseklikleri ve genişlikleri gibi başlangıç girdi parametreleri girildi. Nihai uyanlar için bant aralıkları, genişlikleri ve tüm bantların şekilleri eşzamanlı olarak değiştirildi. Son olarak en uygun eşanlamlı türevler onaylandı. Eğri uydurma sonucunda elde edilen piklerin kesirli alanları, farklı ikincil yapı elemanlarının ( $\alpha$ -sarmal,  $\beta$ -tabaka, dönüş ve rasgele bobinler) yüzdesini hesaplamak için kullanılmıştır. Başlangıç enzim derişimlerinin ikincil yapısal içeriğini tahmin etmek için basitlik açısından, düzenli ve/veya düzensiz  $\alpha$ -sarmalın yüzdelik değerleri toplam  $\alpha$ -heliks içeriğini elde etmek için toplanıp ortalaması alınmıştır. Ayrıca düzenli ve/veya düzensiz  $\beta$ -tabakası da toplam  $\beta$ -tabakalı içerik elde etmek için yüzdelik değerleri toplanıp ortalaması alınmıştır.

CLEA formundaki biyokatalizör sistemlerinin katalitik aktivitelerinin başlangıç enzim derişiminin artmasıyla arttığı görülmektedir. Çalışmada ulaşılan en yüksek iki katalitik aktivite değerlerine;  $C_E=200$  mg/mL ve  $C_{\text{Glu}}=60$   $\mu\text{L}/\text{mL}$  koşullarında ve  $C_E=250$  mg/mL ve  $C_{\text{Glu}}=40$   $\mu\text{L}/\text{mL}$  koşullarında ulaşılmış ve bu koşullarda aktivite değerleri sırasıyla 9.58 U ve 9.69 U olarak saptanmıştır. Ancak  $C_E=250$  mg/mL,  $C_{\text{Glu}}=40$   $\mu\text{L}/\text{mL}$  ve  $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=700$  mg/mL koşulda 1654  $\text{cm}^{-1}$  dan öne çok az  $\alpha$ -heliks düzensiz yapının bulunduğu  $C_E=200$  mg/mL,  $C_{\text{Glu}}=60$   $\mu\text{L}/\text{mL}$  ve  $C_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}=700$  mg/mL olduğu koşulda ise 1654  $\text{cm}^{-1}$  dan öne  $\alpha$ -heliks düzensiz yapının bulunmadığı ve bu düzensiz yapının 1654  $\text{cm}^{-1}$  civarındaki amid I bandının kuvvetli bir şekilde azaldığı bu da  $\alpha$ -helislerden daha düşük bir katkıyı işaret

etmektedir. Başlangıç enzim derişiminde toplam ortalama  $\alpha$ -heliks içeriğinin azalmasına, toplam ortalama  $\beta$ -tabakaları ve sırasız yapıların ise aynı anda artmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak katalitik verim açısından en uygun koşullar  $C_E=200$  mg/mL,  $C_{Glu}=60$   $\mu$ L/mL ve  $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$  mg/mL olarak belirlenmiştir.

Amonyum sülfat derişimi etkisinde de aynı durum söz konusudur. Amonyum sülfat derişiminin artması ile üretilen CLEA'ların katalitik aktivitesi önce azalmakta ve daha sonra artarak hemen hemen sabit bir değere ulaşmaktadır. Amonyum sülfat derişiminin  $C_{(NH_4)_2SO_4}=500$  mg/mL olduğu koşulda aktivite 9.57 U,  $C_{(NH_4)_2SO_4}=600$  mg/mL olduğu koşulda aktivite 8.74 U,  $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$  mg/mL olduğu koşulda aktivite 9.57 U ve  $C_{(NH_4)_2SO_4}=800$  mg/mL olduğu koşulda ise aktivite 9.50 U olarak saptanmıştır. Görüldüğü gibi immobilize enzim sistemi en yüksek katalitik performansını hem  $C_{(NH_4)_2SO_4}=500$  mg/mL hem de  $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$  mg/mL olduğu koşullarda göstermiştir. Ancak  $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$  mg/mL amonyum sülfat derişiminde  $1654\text{cm}^{-1}$  dan öne  $\alpha$ -heliks düzensiz yapının bulunmadığı ve amid I bandının kuvvetli bir şekilde azaldığı bu da  $\alpha$ -helislerden daha düşük bir katkıyı işaret etmektedir. Dolayısıyla başlangıç enzim ve gluteraldehit derişimi etkisindeki  $C_E=200$  mg/mL,  $C_{Glu}=60$   $\mu$ L/mL ve  $C_{(NH_4)_2SO_4}=700$  mg/mL ikincil yapı ( $\alpha$ -sarmal,  $\beta$ -tabaka, dönüş ve rasgele bobinler) bileşenleri ile yaklaşık aynı değerleri verdiğiinden dolayı en uygun koşul olduğu böylelikle ispatlanmıştır.

500 mg/mL  $(NH_4)_2SO_4$  derişiminde BSA derişiminin artmasıyla katalitik aktivite artar. Eğri uydurma sonuçlarına dayanarak Başlangıç koşulu (BSA katkısı yok)  $1650\text{cm}^{-1}$  nun altında ve üstünde ki dalga sayılarında ( $1651,1648,1649\text{cm}^{-1}$ )  $\alpha$ -helikslerin bulunması  $1654\text{cm}^{-1}$  civarındaki amid I bandının protein enzimatik parçalanması sırasında çok az bir değişime neredeyse BSA derişimin artmasıyla bu değişimin sabit kaldığı söylenebilir. Bu da  $\alpha$ -heliks düzensiz yapının fazlalığına  $\alpha$ -heliks düzenli yapıdan daha düşük bir katkıyı işaret etmektedir. Ortalama  $\alpha$ -heliks düzenli içeriğinin kısmen azalması, ortalama  $\beta$ -tabakaları ve sırasız yapıların ise aynı anda kısmen artmasına neden olmaktadır. 700 mg/mL  $(NH_4)_2SO_4$  derişiminde BSA derişiminin artmasıyla katalitik aktivite azalır. Eğri uydurma sonuçlarına dayanarak Başlangıç koşulu (BSA katkısı yok)  $1656\text{cm}^{-1}$  nun altında ki dalga sayılarında ( $1649, 1653, 1654$  ve  $1655\text{cm}^{-1}$ )  $\alpha$ -helikslerin bulunması  $1654\text{cm}^{-1}$  civarındaki amid I bandının BSA derişimin artmasıyla çok kuvvetli bir şekilde

azaldığı söylenebilir. Bu da  $\alpha$ -heliks düzensiz yapıların yokluğunu  $\alpha$ -heliks düzenli yapılardan daha fazla bir katkıyı işaret etmektedir. Ortalama  $\alpha$ -heliks düzenli içeriğinin artması, ortalama  $\beta$ -tabakaları ve sırasız yapıların ise aynı anda azalmasına neden olmaktadır.

500 mg/mL  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  derişiminde Lizin derişiminin artmasıyla katalitik aktivite artar. Eğri uydurma sonuçlarına dayanarak Başlangıç koşulu (Lizin katkısı yok)  $1650 \text{ cm}^{-1}$  nun üstünde ki dalga sayılarında ( $1652, 1653$  ve  $1655 \text{ cm}^{-1}$ )  $\alpha$ -helikslerin bulunması  $1654 \text{ cm}^{-1}$  civarındaki amid I bandının Lizin derişimin artmasıyla çok kuvvetli bir şekilde arttığı söylenebilir. Bu da  $\alpha$ -heliks düzensiz yapının fazlalığına  $\alpha$ -heliks düzenli yapıdan daha düşük bir katkıyı işaret etmektedir. Ortalama  $\alpha$ -heliks düzenli içeriğinin azalması, ortalama  $\beta$ -tabakaları ve sırasız yapıların ise aynı anda artmasına neden olmaktadır. 700 mg/mL  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  derişiminde Lizin derişiminin artmasıyla katalitik aktivite artar. Eğri uydurma sonuçlarına dayanarak Başlangıç koşulu (Lizin katkısı yok)  $1656 \text{ cm}^{-1}$  nun altında ki dalga boylarında ( $1649, 1654$  ve  $1656 \text{ cm}^{-1}$ )  $\alpha$ -helikslerin bulunması  $1654 \text{ cm}^{-1}$  civarındaki amid I bandının protein enzimatik parçalanması sırasında kısmen azalışına yani Lizin derişiminin artmasıyla bu değişimin neredeyse sabit olduğu söylenebilir. Bu da  $\alpha$ -heliks düzensiz yapının fazlalığına  $\alpha$ -heliks düzenli yapıdan daha düşük bir katkıyı işaret etmektedir. Ortalama  $\alpha$ -heliks düzenli içeriğinin kısmen azalması, ortalama  $\beta$ -tabakaları ve sırasız yapıların ise aynı anda kısmen artmasına neden olmaktadır. Amid I bandında Lizin ve BSA katkısının ikincil yapılar üzerine olumsuz bir etkisi saptanmıştır. Ancak bu etkiler presipitasyon koşullarına bağlı olarak farklı etkilere sahip olduğu görülmektedir. Lizin ve BSA katkısının oluşturulan biyokatalizör sisteminin katalitik performansında bir gelişme sağlayabileceği öngörülebilir. Ancak bu durumda da oluşturulan immobilize sistem bir taşıyıcılı immobilize enzim sistemine doğru eğilim gösterebileceğinden daha yüksek derişimlerde çalışılması bu çalışmanın amaç ve kapsamına uygun olmayacaktır.

Değişik çözücü sistemlerinde maruz bırakılan enzimlerin katalitik aktivileri deiyonize su ve dimetilsülfoksit dışında başta pH=7, 50 mM sodyum fosfat tamponu olmak üzere, etilasetat, metanol, sikloheksan, hekzan, izooktan, dimetilformamit ve etanol ortamlarında en fazla %15 ve kuru proteaz da %1 kayıpla koruyabildikleri saptanmıştır. Elde edilen bulgular ışığında geliştirilen immobile enzim sistemlerinin substrat ya da ürün inhibisyonlarının görüldüğü ve sulu sistemlerde çözünmeyen

substrat ya da ürünler yer aldığı biyodönüşüm ortamlarında kullanabilme potansiyeli bulunmaktadır.

Çözücü sistemine bağlı olarak büyükten küçüğe doğru katalitik aktivite değerlerinin elde dildiği ortamlar; tampon sistemi > proteaz > etilasetat > metanol > sikloheksan > *n*-hekzan > *i*-oktan > dimetilformamit > etanol > deiyonize su > dimetilsülfoksit şeklinde sıralanmaktadır. Buda katalitik aktivite değerinin sırasıyla azalması,  $\alpha$ -heliks içeriğinin de artmasına,  $\beta$ -tabakaları ve sırasız yapıların ise aynı anda azalmasına neden olmaktadır. Geliştirilen immobile enzim sistemi ile kuru proteaz sisteminin ikincil yapılar üzerindeki değişiminin yaklaşık olarak aynı olduğu saptanmıştır. Elde edilen bulgular ışığında dimetilsülfoksit ortamı dışında özellikle sodyum fosfat tampon sistemi-organik çözücü ortamlarını içeren iki fazlı sistemler için uygun olduğu görülmektedir. Proteaz enziminin organik çözücüler varlığında daha iyi kararlılık sergilemesinden dolayı endüstride sentetik uygulamalarda kullanılabilir olduğu öngörülebilir.



## KAYNAKLAR

- Aehle, W.**, (2004). *Enzymes in Industry Production and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH&Co, KGaA, USA.
- Alsan, Ö.**, (2014). Süperkritik CO<sub>2</sub> ortam koşullarının *Candida rugosa* lipaz enziminin katalitik performansına etkisi ve enzim konformasyonel yapısının Fourier transform infrared spektroskopisi ile karakterizasyonu. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi*. 82s. Sivas.
- Akçay, Z.**, (2014). Tampon sistemlerinde lipazların katalitik performansına ve ikincil yapısına süperkritik akışkanların etkisi. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi*. 91s, Sivas.
- Aparna, L., Euan, J. R., Aniruddha, C., Chhabinath, M.** (2012). Modeling and structural analysis of PA clan serine proteases, *BMC Research Notes*, 5 (256), 1-11..
- Aytar, B.S., Bakir, U.**, (2008). Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates. *Process Biochemistry*, 43 (2), 125-131.
- Bailey, J.E., Ollis, D.F.**, (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill Co., NewYork, 984p.
- Çelik, N.**, (2006). *Bacillus clausii* GMBAE 42'den saflaştırılan alkalin proteazın termal inaktivasyon kinetiğinin belirlenmesi ve Cu<sup>+2</sup> iyonları ile termo stabilizasyonu, *Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, 103s. Kocaeli.
- Dzwolak, W., Kato, M., Taniguchi, Y.**, (2001). Fourier transform infrared spectroscopy in high-pressure studies on protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure and Molecular Enzymoogy*, 1595 (1-2), 131-144.
- Freedonia Group Inc.**, (2011). *Enzymes Demand and Sales Forecasts, Market Share, Market Size, Market Leaders, USA*, (<https://www.freedoniagroup.com/World-Enzymes.html>.)
- Gerze, A.**, (2003). Proteaz Enziminin *Bacillus Subtilis Megatherium* ve *Bacillus Polymxa* Bakteri Türlerinden Kısmi Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi. İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. *Yüksek Lisans Tezi*. 75s., İstanbul.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P.**, (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Apply Microbiology Biotechnology*, 59, 15–32.
- Güler, G. Dzafic, E., Vorob'ev, M.M., Vogel, V., Mantele. W.**, (2016). Proteolytically-induced changes of secondary structural protein conformation of bovine serum albumin monitored by Fourier transform infrared (FT-IR) and UV-circular dichroism spectroscop. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 161. 8–18.
- Güler, G. Dzafic, E., Vorob'ev, M.M., Vogel, V., Mantele. W.**, (2011) Real time observation of proteolysis with Fourier transform infrared (FT-IR) and UV-circular dichroism spectroscopy: Watching a protease eat a protein. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecula Spectroscopy*, 79, 104–111.

- Haris, P.I., Severcan, F.,** (1999). FTIR Spectroscopic Characterization of Protein Structure in Aqueous and Non-Aqueous Media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 7(1-4), 207-221.
- Hartley, B.S.,** (1960). Proteolytic enzymes. *Annual Review Biochemistry*, 29,45-72.
- Kalisz, M.M.,** (1988). Microbial Proteinase. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Fiecher. A.(Eds). *Springer-Verlag. Berlin*.
- Keay, L., Moseley, M.H., Anderson, R.G., O'Connor, R.J., Wildi, B.S.,** (1972). Production and Isolation of Microbial Proteases. in Enzyme Engineering. Lemuel. B.. Wingard. Jr. (Eds). *John Wiley & Sons. New York*.
- Kaya, N.,** (1993). Biyokimya, Atatürk Üniversitesi Yayınları, Erzurum.
- Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö.,** (2004). Biyokimya, Aktif Yayınevi. *McMillan Publishers Ltd.. England*. 119p. Erzurum.
- Krajewska, B.** (2004). Application of chitin- and chitosan- based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*. 35. 126-139.
- Lewis, S.P., Lewis, A.T., Lewis, P.D.** (2013). Prediction of Glycoprotein Secondary Structure Using ATR-FTIR, *Vibrational Spectroscopy*, 69, 21-29.
- Liu, Y., Dawei, C., Yan, Y.,** (2013). Effect of ionic liquids, organic solvents and supercritical CO<sub>2</sub> pretreatment on the conformation and catalytic properties of *Candida rugosa* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 123-127.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Van Langen, L.M., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A.,** (2004). A new mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates. *Biotechnology and Bioengineering*. 86, 273-276.
- Natalello, A., Ami, D., Brocca, S., Lotti, M. ve Doglia, S.M.** (2005). Secondary structure, conformational stability and glycosylation of a recombinant *Candida rugosa* lipase studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochemical Journal*, 385, 511-517.
- Enzyme Nomenclature** (1992). Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes. New York: Academic Press
- Polgar, L.,** (2005). The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and Molecular Life Science*, 62(19–20), 2161–2172.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V.,** (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology*, 62, 597-635
- Salgın, U., Gökalp, A.** (2015). Çapraz bağlı enzim agregatları formundaki proteaz enziminin taşıyıcısız immobilizasyonu. *Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu*. 61 s, Sivas.
- Stryer, L.,** (1988). Biochemistry, 3rd Edition, W.H. Freeman and Company, NY.
- Sheldon, R.A., Schoevaart, R., Van Langen, L.M.,** (2005). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization. *Biocatalysis and Biotransformation*. 23, 141–147.
- Taşdelen, Ç.,** (2006). Proteaz Enziminin Fiziksel Adsorpsiyon, Kovalent ve İyonik Bağlanma Metodları ile immobilizasyonu. *İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi*, 90s. İstanbul.
- Telefoncu, A.,** (1997). İmmobilize Enzimler. Enzimoloji. Telefoncu. A. (Ed.), *Lisans Üstü Yaz Okulu. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Kuşadası, Aydın*. 446s.

- Topçular, C.**, (2006). Taşıyıcılı ve Taşıyıcısız Sistemlerde İmmobilize Peroksidaz Enziminin Karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü*, 83s. Ankara.
- Trevañ M.D., Poltorak O.M., Chukhrai E.S.**, (1993). Stability in enzymes and cells, in “Molecular Biology and Biotechnology” (Walker JM and Gingold EB eds.) pp 267-304, *The Royal Society of Chemistry*.
- Wiseman, A.**, (1993). Designer enzyme and cell applications in industry ad in environmental monitoring. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 56(1), 3-13.
- Yu, H.W., Chen, H., Wang, X., Yang, Y.Y., 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.

[http://shop.perkinelmer.com/content/TechnicalInfo/TCH\\_FTIRATR.pdf](http://shop.perkinelmer.com/content/TechnicalInfo/TCH_FTIRATR.pdf)

<http://www.temple.edu/strongin/atr.html>

<http://www.nkfu.com/enzimlerin-ozellikleri-maddeler-halinde>

<http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh27-4/317-324.htm>



## ÖZGEÇMİŞ

### **Kişisel bilgiler**

Adı Soyadı	Nagihan Sezi
Doğum Yeri ve Tarihi	Afyonkarahisar, 10.04.1987
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü 58140 Sivas
E-posta Adresi	nagihansezi@gmail.com

### **Eğitim ve Akademik Durumu**

Lise	Açık Öğretim Lisesi, 2011
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2015
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2019

### **İş Tecrübesi**

Mersin Üniversitesi	Pedagojik Formasyon Eğitimi, 2017
Kimya Öğretmeni	Mersin Rekor Eğitim Merkezi, Devam ediyor