

**ANTİPİRİN BAZLI MONOLİTİK KOLON  
GELİŞTİRİLMESİ VE  
PENİSİLİN AMİDOHİDROLAZ ENZİMİ  
AYRILMASINDA KULLANIMI**

Rüstem KEÇİLİ

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı  
Ağustos-2006

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

**Rüstem Keçili'nin "Antipirin Bazlı Monolitik Kolon Geliştirilmesi ve Penisilin Amidohidrolaz Enzimi Ayrılmasında Kullanımı"** başlıklı Kimya Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi.....tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	<b>Adı-Soyadı</b>	<b>İmza</b>
Üye (Tez Danışmanı)	<b>: Doç. Dr. RIDVAN SAY</b>	.....
Üye	<b>: Doç. Dr. ARZU ERSÖZ</b>	.....
Üye	<b>: Yard. Doç. Dr. HANDAN YAVUZ</b>	.....

**Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun**  
..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

**Yüksek Lisans Tezi**

### **ANTİPİRİN BAZLI MONOLİTİK KOLON GELİŞTİRİLMESİ VE PENİSİLİN AMİDOHİDROLAZ ENZİMİ AYRILMASINDA KULLANIMI**

**Rüstem KEÇİLİ**

**Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Rıdvan SAY  
2006, 66 sayfa**

Bu çalışmada, Poli(Etilenglikoldimetakrilat-co-metakroil amidoantipirin) [Poli (EGDMA-co-MAAP)] monolitik afinite sorbentinin geliştirilmesi ve penisilin amidohidrolaz (penisilin açılaz) (E.C 3.5.1.11) enzimi adsorpsiyonunda kullanılabilirliği araştırılmıştır. Çalışmanın birinci aşamasında, 4-aminoantipirin metakroil klorür ile reaksiyona sokularak metakroil amidoantipirin (MAAP) monomeri elde edilmiştir. Elde edilen yapı FTIR ve NMR ile karakterize edilmiştir. Daha sonra MAAP ve EGDMA komonomerleri polimerleştirilerek monolitik afinite sorbenti elde edilmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde, poli (EGDMA-co-MAAP) monolitik afinite sorbenti kullanarak sulu çözeltilerden penisilin amidohidrolaz adsorpsiyonuna derişim, pH, sıcaklık, iyonik şiddet ve akış hızı etkileri incelenmiştir.

Çalışmanın son aşamasında ise Penicillium Chrysogenum NRRL 807 ve Penicillium Purpurogenum 455 mikroorganizmalarından elde edilen ham ekstraktlardan penisilin amidohidrolaz adsorpsiyonu ve desorpsiyonu sürekli sistemde incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Penisilin Amidohidrolaz, Afinite Kromatografisi , Metakroil amidoantipirin (MAAP), Enzim Saflaştırması, Biyoligand

## **ABSTRACT**

**Master of Science Thesis**

### **INVESTIGATION OF ANTIPYRINE CONTAINING MONOLITHIC COLUMN AND ITS USE FOR PURIFICATION OF PENICILLIN AMIDOHYDROLASE**

**Rüstem KEÇİLİ**

**Anadolu University  
Graduate School of Sciences  
Chemistry Program**

**Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ridvan SAY  
2006, 66 pages**

In this study, development of poly(ethyleneglycoldimethacrylate-co-methacryloyl amidoantipyrine) [poly(EGDMA-co-MAAP)] monolithic affinity sorbent and its usefulness for penicillin amidohydrolase (penicillin acylase) (E.C 3.5.1.11) adsorption were investigated. In the first step, 4-aminoantipyrine was reacted with methacryloylchloride to produce methacryloyl amidoantipyrine (MAAP) monomer. The characterization of synthesized structure was evaluated by FTIR and NMR. Then, monolithic affinity sorbent was obtained by the polymerization of MAAP and EGDMA comonomers.

In the second stage, the effect of initial concentration, pH, temperature, ionic strength and flow rate on the adsorption of penicillin amidohydrolase from aqueous solution were studied.

In the final step, adsorption and desorption studies using crude extracts of penicillin amidohydrolase taken from *Penicillium Chrysogenum* NRRL 807 and *Penicillium Purpurogenum* 455 microorganisms were investigated in continuous system.

**Keywords:** Penicillin Amidohydrolase, Affinity Chromatography, Methacryloyl amidoantipyrine (MAAP), Enzyme Purification, Bioligand

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince ilgisi ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan, bana büyük bir hoşgörü ve anlayışla yaklaşan, ayrıca Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (BİBAM) olanaklarından yararlanmamı sağlayan Danışman Hocam Merkez Müdürü Sayın Doç.Dr. Rıdvan SAY'a,

Çalışmalarım süresince desteği ve yardımlarını eksik etmeyen Sayın Doç. Dr. Arzu ERSÖZ'e,

Fen Fakültesi Kimya Bölümü olanaklarından yararlanmamı sağlayan Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Lale ZOR'a,

Hacettepe Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvar imkânlarından yararlanmamı sağlayan Sayın Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye ve Biyokimya Araştırma Grubu (BİYOREG) Üyeleri'ne,

Deneysel çalışmalarım esnasında her türlü konuda yardımcı olan, bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan Sayın Yard. Doç. Dr. Handan YAVUZ'a,

Çalışmam boyunca yardım ve destekleriyle katkıda bulunan arkadaşlarım Sibel BÜYÜKTİRYAKI ve Güner SAKA'ya,

Deneysel çalışmalarımda kullandığım *Penicillium Chrysogenum* NRRL 807 ve *Penicillium Purpurogenum* 455 mikroorganizmalarını ve ham ekstraktlarını temin eden Sayın Yard. Doç. Dr. Nalân YILMAZ SARIÖZLÜ'ye,

Tez çalışmam süresince destekleriyle hep yanımda olan Sentetik Reseptörler Araştırma Grubu (SYNREG) Üyeleri'nden Araş. Gör. Sibel EMİR DİLTEMİZ, Araş. Gör. Ayça ATILIR ÖZCAN, Dr. Ebru BİRLİK ve Araş. Gör. Muharrem KARABÖRK'e,

Ve maddi-manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan Ailem'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Rüstem KEÇİLİ

Ağustos-2006

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Afinite Kromatografisi .....	3
1.1.1. Destek(Matriks).....	5
1.1.2. Ligand .....	5
1.1.3. Ara Kollar (Spacer Arms) .....	6
1.2. Afinite Kromatografisi Türleri.....	6
1.2.1. Pseudo-Spesifik Afinite Kromatografisi .....	7
1.2.2. Metal-Şelat Afinite Kromatografisi .....	8
1.2.3. Kovalent Afinite Kromatografisi .....	10
1.2.4. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi .....	11
1.2.5. Yük Transfer Adsorpsiyon Kromatografisi .....	13
1.2.6. Boya-Ligand Afinite Kromatografisi.....	13
1.3. Afinite Kromatografisi Uygulama Alanları .....	13
1.3.1. Protein Saflaştırma .....	14
1.3.2. Nükleik Asit Ayırma .....	14
1.3.3. Hücre Saflaştırma.....	15
1.4. Afinite Kromatografisi için Monolitik Destek Malzemeleri.....	15
1.4.1. Alternatif Kolon Dolgu Malzemesi olarak Monolitler.....	16
1.4.2. Monolitlerin Gözenek Yapısı .....	18
1.4.3. Kütle Aktarım Özellikleri .....	19

1.5. Enzimler .....	21
1.5.1. Enzimlerin Kısa Tarihçesi .....	21
1.5.2. Enzimlerin Biyosentezi .....	22
1.5.3. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması .....	23
1.6. Enzim İmmobilizasyonu .....	25
1.6.1. Tutuklama (Entrapment) .....	27
1.6.1.1. Polimer Matrikste Tutuklama .....	27
1.6.1.2. Membran Yapısı İçinde Hapsetme .....	29
1.6.2. Yüzey İmmobilizasyonu .....	29
1.6.2.1. Adsorpsiyon .....	30
1.6.2.2. İyonik Bağlama .....	31
1.6.2.3. Kovalent Bağlama .....	32
1.6.2.4. Şelat Bağlama .....	33
1.6.2.5. Biyospesifik Bağlama .....	34
1.6.3. Enzim Molekülleri Arasında Çapraz Bağlama .....	34
1.7. Penisilin Amidohidrolaz .....	35
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>38</b>
2.1. Materyal .....	38
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar .....	38
2.1.2. Kullanılan Cihazlar .....	38
2.2. Yöntem .....	39
2.2.1. Monolitik Afinite Adsorbentin Hazırlanması .....	39
2.2.1.1. Metakroil amidoantipirin (MAAP) Monomerinin Sentezi .....	39
2.2.1.2. [Poli (Etilenglikol dimetakrilat-Metakroil amidoantipirin)] ..	
[Poli (EGDMA-MAAP)] Monolitinin Sentezi .....	40
2.2.2. Karakterizasyon Çalışmaları .....	41
2.2.2.1. Yüzey Morfolojisi .....	41
2.2.2.2. Yüzey Alanı Ölçümü .....	41
2.2.2.3. Şişme Testi .....	41
2.2.2.4. Elementel Analiz .....	42
2.2.2.5. FTIR Analizi .....	42

2.2.2.6. NMR Analizi .....	42
2.2.3. Hücre Kültürleri ve Ham Ekstraktların Hazırlanması.....	42
2.2.3.1. Mikroorganizmalar.....	42
2.2.3.2. Inokulum (Aşı) Hazırlanması.....	43
2.2.3.3. Enzim Üretimi .....	43
2.2.3.4. Ham Ekstraktın Hazırlanması .....	43
2.2.4. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları .....	43
2.2.4.1. Monolitik Polimere Penisilin Amidohidrolaz Adsorpsiyonu .....	43
2.2.4.2. Monolitik Polimerden Penisilin Amidohidrolaz Desorpsiyonu .....	45
2.2.5. Enzim Aktivitesi Çalışmaları .....	45
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>46</b>
3.1. Poli (EGDMA-MAAP) Monolitinin Karakterizasyonu.....	46
3.1.1. Yüzey Morfolojisi .....	46
3.1.2. Yüzey Alanı Ölçümü .....	47
3.1.3. Şişme Testi .....	47
3.1.4. Elementel Analiz.....	47
3.1.5. FTIR Analizi .....	47
3.1.6. <sup>1</sup> H NMR Analizi.....	50
3.2. Poli (EGDMA-MAAP) Monolitine Sulu Çözeltilerden Penisilin Amido Hidrolaz Adsorpsiyonu .....	51
3.2.1. Penisilin Amidohidrolaz Adsorpsiyonuna Başlangıç Penisilin Amidohidrolaz Derişiminin Etkisi .....	51
3.2.2. Penisilin Amidohidrolaz Adsorpsiyonuna pH Etkisi .....	52
3.2.3. Penisilin Amidohidrolaz Adsorpsiyonuna Sıcaklık Etkisi.....	53
3.2.4. Penisilin Amidohidrolaz Adsorpsiyonuna İyonik Şiddet Etkisi .....	53
3.2.5. Penisilin Amidohidrolaz Adsorpsiyonuna Akış Hızının Etkisi .....	54
3.2.6. Langmuir Adsorpsiyon Modeli.....	55
3.3. Geliştirilen Poli(EGDMA-MAAP) Monolit Desteğinin Penisilin Amido Hidrolaz Adsorpsiyonunda Tekrar Kullanılabilirliği.....	57



3.4. Poli (EGDMA-MAAP) Monolitine Ham Ekstraktan Penisilin Amido.....	
Hidrolaz Adsorpsiyonu .....	58
<b>4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>60</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>62</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi .....	3
1.2. İmmobilize bir metal iyonuna bağlı proteinin şematik gösterimi .....	9
1.3. Farklı şekil ve boyutlarda hazırlanmış monolitik malzemeler .....	16
1.4. Dolgulu kolon ve monolit sistemlerin gözenek ağ modelinin şematik..... gösterimi.....	18
1.5. Enzimlerin polimer matrikste tutuklanması .....	28
1.6. Enzimlerin adsorpsiyon ile immobilizasyonu.....	31
1.7. Enzimlerin iyonik olarak immobilizasyonu .....	31
1.8. Aminoasit yanzincirlerinin reaktif grupları.....	32
1.9. Enzimlerin kovalent olarak immobilizasyonu .....	33
1.10. Enzim molekülleri arasında çapraz bağlanma.....	35
1.11. Penisilin molekülünün hidrolizi .....	35
1.12. Enzimatik ve kimyasal yolla 6-aminopenisillanik asit (6-APA) üretimi .....	36
2.1. Metakroil amidoantipirin (MAAP) monomerinin sentez reaksiyonu .....	39
2.2. Monolitik kolonun hazırlanmasının şematik gösterimi .....	40
2.3. Sürekli sistem düzeneği .....	44
3.1. Poli(EGDMA-MAAP) monolitinin SEM fotoğrafları .....	46
3.2. Poli(EGDMA-MAAP) monolitinin açık yapısı .....	48
3.3. MAAP monomerinin açık yapısı .....	49
3.4. MAAP monomerinin FTIR spektrumu .....	49
3.5. MAAP monomerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu .....	50
3.6. Poli (EGDMA-MAAP) monolitine adsorplanan penisilin amidohidrolaz miktarının penisilin amidohidrolaz başlangıç derişimi ile değişimi .....	51
3.7. Penisilin amidohidrolaz adsorpsiyonuna ortam pH'ının etkisi .....	52
3.8. Penisilin amidohidrolaz adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi .....	53
3.9. Penisilin amidohidrolaz adsorpsiyonuna iyonik şiddet etkisi .....	54
3.10. Penisilin amidohidrolaz adsorpsiyonuna akış hızının etkisi .....	55
3.11. Penisilin amidohidrolaz için langmuir adsorpsiyon izotermi .....	56
3.12. Poli (EGDMA-MAAP) monolitinin tekrar kullanılabilirliği .....	57

## ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Afinite kromatografisinin kullanıldığı biyolojik sistemler .....	4
1.2. Endüstriyel uygulamaları olan bazı enzimler.....	26
3.1. Penicillium Chrysogenum (NRRL 1951) ve Penicillium Purpurogenum.....	
mikroorganizmalarından penisilin amidohidrolaz saflaştırılması.....	58

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AIBN	: 2,2'-azobisisobütironitril
APA	: 6-Aminopenisillanik asit
BET	: Gözenek boyutu analizörü
CIM	: Konvektif etkileşim ortamı
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EGDMA	: Etilen glikoldimetakrilat
FT-IR	: Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi
GAK	: Granül halinde aktif karbon
IU	: Uluslararası enzim aktivite birimi
MAAP	: Metakroil amidoantipirin
NIPAB	: 6-Nitro-3-Fenilasetamidobenzoik asit
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
Q	: Adsorpsiyon kapasitesi
PA	: Penisilin amidohidrolaz
PVAL	: Polivinilalkol
RNA	: Ribonükleik asit
RPM	: Döndürme hızı
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
UOK	: Uçucu organik kimyasallar

## 1.GİRİŞ

Biyoteknolojideki gelişmeler, enzim, protein, hormon, nükleik asit gibi birçok biyomolekülün büyük kapasitelerle endüstriyel üretimini gündeme getirmiştir. Modern biyoteknolojik yöntemler ile üretilen veya biyolojik sıvılardan uzaklaştırılarak saflaştırılan biyomoleküllerin çok saf olarak elde edilme ihtiyaçları araştırmacıların biyomoleküllerin ayrılma ve saflaştırma işlemleri üzerinde daha fazla çalışmalarını sağlamıştır. Biyomoleküllerin saflaştırılmasında, ürün sağlığının yanı sıra saflaştırılan ürünün kararlılığını ve aktivitesini uygulanan işlemler ile kaybetmemesi önemlidir. Son yıllarda kromatografik teknikler biyomoleküllerin saflaştırılmasında etkili bir biçimde kullanılmaktadır. Bu teknikler arasında yer alan afinite kromatografisi yöntemi ile biyomoleküller buldukları ortamdan yüksek saflıkta tek basamakta elde edilebilmektedir.

Son yıllarda biyomoleküllerin saflaştırılmasında biyoligandların yerine pseudospesifik ligandlar kullanılmaya başlanmıştır. Pseudospesifik ligandların biyoligandlara göre bazı avantajları mevcuttur. Pseudospesifik ligandların afinite sabitleri ( $10^{-4}$ – $10^{-6}$   $M^{-1}$ ) düşüktür ve zayıf afinite ligand ailesine aittirler. Buna rağmen elektrostatik, hidrofobik, hidrojen bağları ve Van der Waals kuvvetleri gibi etkileşimlerin toplam etkileri seçici ve kuvvetli bir etkileşime neden olmaktadır. Pseudospesifik ligandların (örneğin aminoasit bazlılar) uygulama esnasında matriksten sızma durumunda herhangi bir immün cevaba neden olmamaları biyoligandlara göre önemli avantajları arasındadır. Ayrıca bu ligandlar biyoligandlara göre daha kararlı olup yüksek miktarlarda ve düşük maliyette üretilebilmektedirler.

Penisilin amidohidrolaz (PA) (EC 3.5.1.11), penisilin molekülündeki lineer amid/açıl bağının hidrolizi ile  $\beta$ -laktam çekirdek, yarı sentetik penisilinlerin sentezindeki anahtar hammadde olan 6-aminopenisillanik asit (6-APA) ve ilgili organik asit oluşumu ile sonuçlanan reaksiyonu katalizler. 6-APA'nın ticari üretiminde PA katalizör olarak kullanılmaktadır. Bu endüstriyel uygulama kısmen saflaştırılmış enzimatik çözeltilerden farklı enzim immobilizasyon teknikleri uygulanarak gerçekleştirilmektedir (Keçili ve ark., 2006; Ferreira ve ark., 2004; Jianguo ve ark., 2001; Guan ve ark., 2001; Kheirloomoom ve ark., 2002).

6-APA'nın üretiminin yüksek maliyeti genellikle, son yıllardaki gelişmelere karşın, düşük geri kazanım sağlayan enzim saflaştırma basamağından kaynaklanmaktadır (Coulon ve ark., 2004; Fargues ve ark., 1996). Çok basamaklı işlemlerde PA saflaştırılması için farklı teknikler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin çoğu hidrofobik etkileşim temeline dayalıdır. Ancak bu yöntemler yüksek aktivite kaybı ile geri kazanım sağlamaktadır. Bunun yanı sıra ampicillin, cephalexin ve penicillin gibi genel olarak kullanılan ligandlar pahalıdır ve hidroliz olabilmektedirler. Literatürde PA saflaştırılması için son zamanlarda rapor edilen ligandlar arasında en uygun olanlar heterohalka içerenler olarak belirlenmiştir (Sudharan ve Shewale 1987; Kasche ve ark., 1990; Fonseca ve Cabral 1996; Santarelli ve ark., 2000).

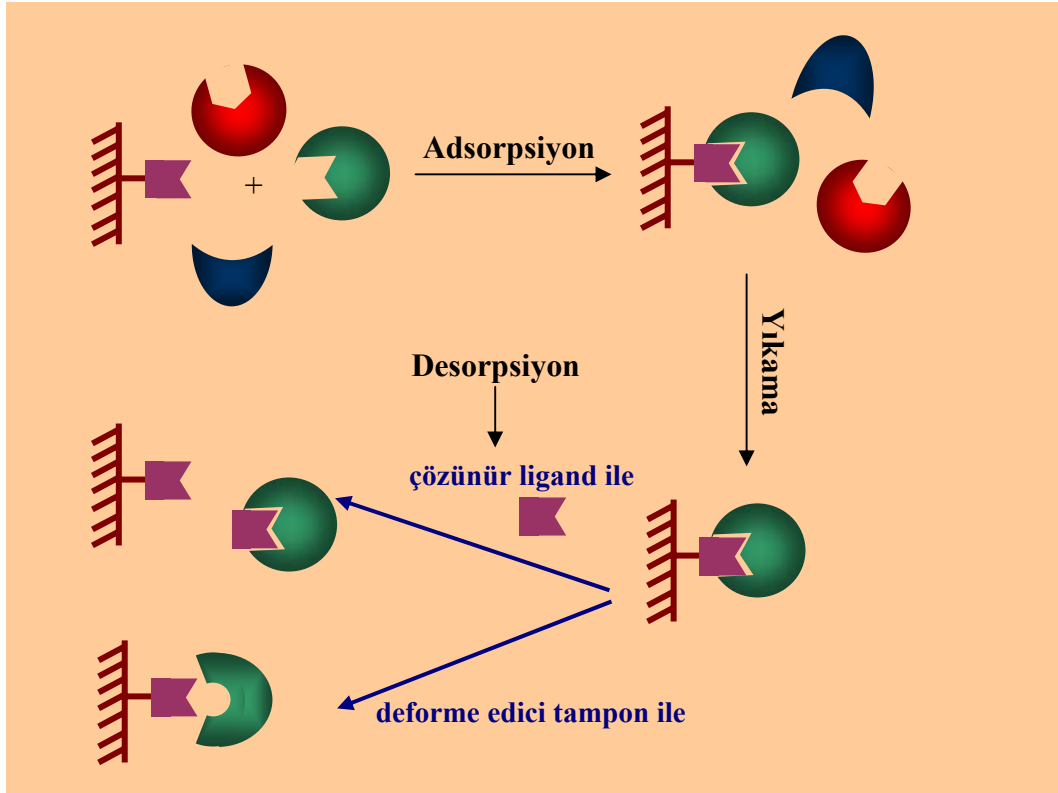
Bu çalışmada *Penicillium Chrysogenum* ve *Penicillium Purpurogenum*'dan PA saflaştırılması için nonopioid analjezik özellik gösteren ve çok bilinen bir ilaç olan 4-aminoantipirin (Cunha ve ark. 2005) fonksiyonel ligand olarak kullanılmıştır. Mevcut çalışmalardan farklı olarak, 4-aminoantipirin metakroil klorür ile reaksiyona sokularak metakroil amidoantipirin (MAAP) monomeri elde edilmiştir. Elde edilen metakroil amidoantipirin (MAAP) monomeri FTIR ve NMR ile karakterize edilmiş ve EGDMA komonomeri eşliğinde yığın polimerizasyonu ile polimerleştirilerek monolitik afinite sorbenti hazırlanmasında kullanılmıştır. Hazırlanan sorbente farklı koşullarda sulu çözeltilerden ve ham ekstraktan PA adsorpsiyonu ve desorpsiyonu sürekli sistemde incelenmiştir.

Bu yaklaşımın en önemli avantajı pseudospesifik MAAP'ın komonomer olarak yapıya ilave edilmesinden sonra matriks aktivasyonu ve ligand immobilizasyonu gibi basamaklara ihtiyaç duyulmamasıdır. Biyoafinite adsorbentlerin hazırlanmasında hem zaman hem de teknik güçlükler (aktivasyon ajanının toksisitesi ve istenmeyen reaksiyonlar) açısından gerekli basamaklar olan aktivasyon ve ligand bağlanmasının bu yeni yaklaşımda olmaması yeni hazırlanan adsorbentin klasik taşıyıcılara önemli bir üstünlüğüdür. Hazırlanan pseudospesifik afinite adsorbentinin bir diğer önemli avantajı ise konvansiyonel biyoafinite ligandı içeren adsorbanlara göre daha ucuz ve kararlı bir yapıya sahip olması ve ilaç olarak da kendini kanıtlayan bir komonomer içermesidir.

## 1.1. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir katı destek materyaline kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir (Keha ve Küfrevioğlu 2000). Kullanılacak ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesi olmalıdır. Ligand olarak enzimler, koenzimler, kofaktörler, antibadiler, aminoasitler, oligopeptidler, oligonükleik asitler ve nükleik asitlerin de (DNA, RNA) bulunduğu çok sayıda biyofonksiyonel molekül kullanılabilir (Denizli ve Pişkin 1995).

Afinite kromatografisinin şematik gösterimi Şekil 1.1’de verilmiştir.



Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi

Katı fazdaki bağlama özelliğinin özgüllüğü seçici bağlama maddesinin (ligand) destek matriksine kovalent bağla bağlanmasıyla sağlanır. Katı fazda

örnekten istenen madde seçimli olarak tutulur. Bağlanmayan maddelerin yıkanarak kolondan uzaklaştırılmasından sonra ayrılan, tutunan (veya saflaştırılan) madde sıvı (mobil) fazın iyonik kuvveti veya pH'ı değiştirilerek kolondan elüe edilir. Destek matriksine kovalent bağla bağlanmış ligantın kolona bağlı kalabilme ve hedef molekül serbest bırakıldıktan sonra da biyolojik olarak aktif olabilme kabiliyeti istenen anahtar özelliktir.

Afinite kromatografisi enzim, antibadi gibi büyük moleküllerin saflaştırılmasında veya küçük bileşiklerin araştırmadan önce seçilip çıkartılmasında kullanılır. Ayrıca hücre ayırma işlemleri de afinite kromatografisi teknikleri kullanılarak gerçekleştirilebilir.

Çizelge 1.1'de afinite kromatografisinin en çok kullanıldığı biyolojik sistemler gösterilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

**Çizelge 1.1.** Afinite kromatografisinin kullanıldığı biyolojik sistemler

<b>Saflaştırılacak Madde</b>	<b>Ligand</b>
Enzim	Substrat, inhibitör, kofaktör
Antikor	Antijen, virüs, hücre
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre yüzey reseptörü, hücre
Nükleik asit	Komplementer baz dizisi, nükleik asit polimeraz, bağlayıcı protein
Hormon	Reseptör protein
Vitamin	Taşıyıcı protein
Hücre	Hücre yüzeyi spesifik proteini, lektin

Küçük ligandları (enzim inhibitörleri) doğrudan matrikse bağlamak suretiyle hazırlanan adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Bu durumlarda uzantı kolları (spacer arms), etkili bağlanmayı kolaylaştırmak için matriksle ligand arasına sokulurlar.



### 1.1.1. Destek (Matriks)

Matriks, biospesifik ligandın üzerine kovalent olarak bağlandığı materyaldir. Matrik seçiminde dikkat edilmesi gereken ilk husus matriksin fiziksel ve kimyasal olarak kararlı olmasıdır. Bunun yanı sıra yüksek akış hızlarında rijit olması gerekir. Matriks tek başına ayrılması istenen biyomolekülle hiçbir etkileşime girmeyecek şekilde inert ve saf olmalıdır. Matriksin gözenek yapısının biyomolekülün gözeneklere girmesine ve liganda bağlanmasına olanak sağlayacak şekilde büyük olması gerekir. Ayrıca matriks ucuz olmalı ve tekrar kullanılabilir. Destek materyali olarak agaroz, selüloz, silika ve değişik organik polimerler kullanılabilir.

### 1.1.2. Ligand

Matrikse kovalent olarak bağlanan ve ayrılması veya saflaştırılması istenen biyomoleküle özel, seçimli afinite gösteren ve onu spesifik olarak tanıyıp bağlayan maddelerdir.

Ligandı matrikse bağlamak için genelde kimyasal immobilizasyon yöntemleri kullanılır. Birçok durumda ligandın matrikse bağlanması için bağlayıcı materyaller kullanılır. En çok kullanılan grup metilen grubudur. Matriksleri kimyasal olarak kararsız duruma getirmek ve ligand ile bağlanmasını sağlamak için birçok aktivasyon yöntemi kullanılır. En çok kullanılan aktivasyon yöntemi siyanojen bromür aktivasyonudur. Ligandın amino grubu içermediği, matriks ve ligand arasına değişen uzunlukta hidrokarbon zinciri konması gerektiği durumlarda siyanojen bromür ile aktive edilmiş taşıyıcı alifatik diamin bileşikleri ile reaksiyona girerek  $\omega$ -alkil türevleri elde edilir. İyi bir ligand ilk olarak saflaştırılacak madde için özgün ve dönüştürülebilir bağlanma özelliklerine sahip olmalıdır. Ayrıca matrikse, bağlama aktivitesini bozmayacak şekilde tutunmasını sağlayacak kimyasal olarak modifiye edilebilir gruplara sahip olmalıdır.

Biyomoleküllerin saflaştırılmasında birçok ligand kullanılmaktadır. Immobilize edilmiş lektin birçok glikoprotein saflaştırılmasında kullanılır.

Hormon reseptörler hormonların, hormonlar da reseptörlerin

saflaştırılmasında kullanılır. İmmünoafinite ile antiadiler antijenlerin saflaştırılmasında kullanılır. Afinite kromatografisinde kullanılacak ligandın sentezi üç adımda incelenebilir.

1. Kullanılacak ligandın seçimi
2. Kullanılacak destek matriksinin seçimi
3. Uygulanacak kimyasal yöntemin seçimi

Kullanılacak ligandın seçiminde dikkat edilmesi gereken en önemli nokta ligandın proteine karşı spesifikliğinin fazla olması ve bağlanmanın geri dönüşümlü olmasıdır. Kromatografi sırasında uygulanacak kimyasal işlemlere karşı ligandın kararlı olması da gerekir. Birçok biyomolekülün ligand olarak kullanılması düşünülse de çok pahalı olmaları ve kararlılıklarının düşük olması sebebi ile tercih edilmezler. Pseudo-spesifik (biyomimetik) ligandların geliştirilmesi ile bu tip dezavantajlar büyük ölçüde giderilmiştir.

### **1.1.3. Ara Kollar (Spacer Arms)**

Ligandla matriks arasındaki karbon zincirleridir. Biyolojik maddelerin aktif bölgelerinin molekülün derin kısımlarında olması durumlarında destek matriksiyle liganda tutunan maddeler arasındaki istenmeyen etkileşimleri önlemek amacıyla matriksle ligand arasına bir kol yerleştirilir. Bu arakolun uzunluğu kritiktir. Eğer çok kısa olursa beklenen etkiyi gösteremez ve ligand örnek içindeki hedef maddeleri bağlayamaz. Çok uzun olursa ayırma işleminin seçiciliği azalır ve ara kol ile örnekteki maddeler ile hidrofobik etkileşime girerler.

## **1.2. Afinite Kromatografisi Türleri**

### **1.2.1. Pseudo-Spesifik Afinite Kromatografisi**

1987’de Cram, Lehn ve Pederson’un Nobel Ödülü almasından günümüze kadar moleküler tanıma ifadesi büyük ilgi görmeye başlamıştır. Moleküllerin, biyolojik ve kimyasal özelliklerinden yararlanarak ayrılma ve saflaştırılmasında “Afinite Kromatografisi” seçimliliği ve duyarlılığı ile eşsiz bir yer tutmaktadır. Afinite kromatografisinde klasik ayırma yöntemlerinden farklı olarak molekülleri

seçici olarak tanıma yeteneğine sahip ligandlar kullanılmaktadır. Afinite kromatografisi ile proteinler, enzimler, hormonlar, antibadiler ve antijenler gibi biyolojik moleküllerin saflaştırılması başarı ile gerçekleştirilmiştir. Ancak endüstriyel boyutta düşünüldüğünde yöntemin en önemli dezavantajı kullanılan ligandların oldukça pahalı olmasıdır. Ayrıca biyolojik ligandlar (proteinler, enzim substratları ve inhibitörleri, nükleik asitler ve hormon reseptörleri v.s) oldukça büyük moleküllerdir. Bu ve bunun gibi problemler seçiciliği yüksek ve daha ucuz yöntemlerin geliştirilmesine yol açmıştır.

Son yıllarda biyomoleküllerin saflaştırılmasında biyoligandların yerine pseudospesifik (biyomimetik) ligandlar kullanılmaya başlanmıştır. Biyomimetik ligandların temelini moleküler tanıma oluşturur. Özellikle biyolojik tanıma özelliğine sahip yapıların keşfi ve bu etkileşimlerin mekanistik olarak aydınlatılması ile moleküler tanıma yeteneği olan yapay moleküllerin geliştirilmesi büyük önem kazanmıştır. Biyomimetik ligandlar biyolojik molekülleri taklit ederek saflaştırılması istenen hedef molekül ile moleküler tanıma temeline göre etkileşebilen yapay moleküllerdir. Bu tür ligandların kullanıldığı afinite kromatografisi türüne “Pseudo-afinite kromatografisi” denir. Pseudo-spesifik moleküller ayırma ve saflaştırmanın yanı sıra biyoteknoloji, tıp ve biyoanalitik alanlarında da kullanılmaktadır.

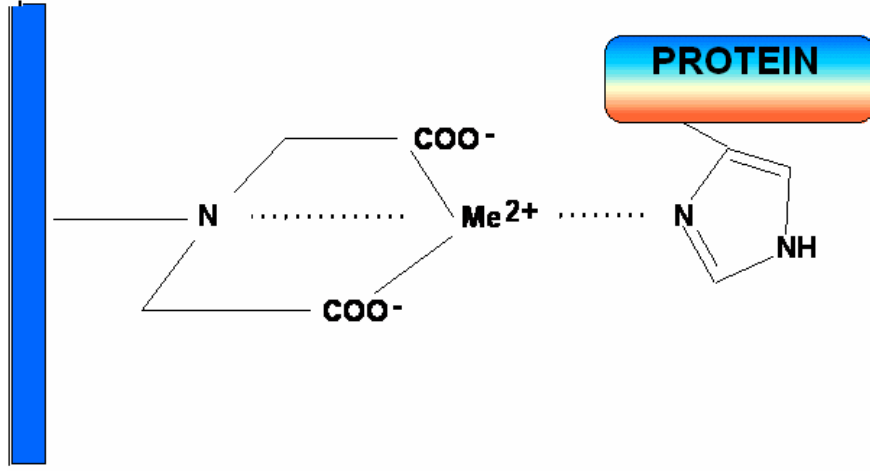
Pseudospesifik ligandlar biyoligandlara göre önemli avantajlara sahiptirler (Bueno ve ark. 1996). Bu avantajlar arasında ucuz, küçük moleküller, sterillenebilme kolaylıkları ve tekrar tekrar kullanılabilir olmalarını sayabiliriz. Aynı zamanda pseudospesifik ligandların afinite sabitleri ( $10^{-4}$ – $10^{-6}$  M<sup>-1</sup>) düşüktür ve zayıf afinite ligand ailesine aittirler. Buna rağmen elektrostatik, hidrofobik, hidrojen bağları ve Van der Waals kuvvetleri gibi etkileşimlerin toplam etkileri seçici ve kuvvetli bir etkileşime neden olmaktadır. Pseudo-spesifik ligandların (örneğin aminoasit bazlılar) uygulama esnasında matriksten sızma durumunda herhangi bir immün cevaba neden olmamaları biyoligandlara göre önemli avantajları arasındadır (Huang ve Carbonell 1999; Baumbach ve Hammond 1992). Ayrıca bu ligandlar biyoligandlara göre daha kararlı olup yüksek miktarlarda ve düşük maliyette üretilebilmektedirler.

Psedo-spesifik ligandlar ilgili ilk çalışmalar ligand olarak tekstil boyalarının kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Tekstil boyalarının en buyk özelliği, protein yapısındaki dipeptit bağlarını taklit edebilmeleridir. Tekstil boyalarının hedef moleküle spesifitesini arttırmak için u gruplar takılabilir ya da moleküller yeniden dizayn edilebilirler. Bu yeni tip boyalara “Biyomimetik boyalar” adı verilir. İlk biyomimetik boya tripsin saflaştırılması için diaminometil benzen grubu aracılığıyla klorotriazin halkasını reaktif etmek için benzamidin kullanılmasıyla hazırlanmıştır.

### **1.2.2. Metal şelat Afinite Kromatografisi**

Birçok protein ve peptidin ağır metal iyonlarına afinitesi olduğu uzun zamandır bilinmektedir. İmmobilize metal iyon afinite kromatografisi (İMAK) nin başlangıcı, Helfferich’in küçük moleküllerin “ligand değişim kromatografisi” ni ne sürdüğü 1961’e kadar uzanabilmektedir. Bu tekniğin temeli ve uygulamaları, Davankov ve Semechkin tarafından detaylıca gözden geçirilmiştir (Davankov ve Semechkin 1977). Makromoleküller için bir afinite ligand olan iminodiasetatın kullanımı Porath ve arkadaşları tarafından 1975’den sonra geliştirildi. Daha sonra Porath, ligand değişimini de içine alan metal şelat etkileşim kromatografisinin bütün şekillerini kapsayan “immobilize metal iyon afinitesi” terimini ortaya koydu (Porath, 1988). Porath, bir protein molekülünün, metal iyon afinite etkileşimleri ile metal iyonlarına bağlanarak saflaştırılabildiğini gözlemledi. Katı bir destek üzerine metal iyonunu immobilize etmek için şelatlayıcı bir ajanın kullanımı, protein metal etkileşimlerinin serbestlik derecesini azaltır. Bu kısıtlama, proteinlerin zengin saflaştırılması ve ayrılmasına olanak sağladığı gibi, denatürasyonu azaltabilir ve aktivitesini devam ettirebilir.

Metal afinitesi ile protein adsorpsiyonunda triptofanın indol, sisteinin tiyol ve histidinin imidazol grubu gibi ortaya çıkan elektron verici aminoasit kalıntıları, immobilize metalin bağlanmasına katkıda bulunurlar. Biyopolimerlere ligandın bağlanması, metal şelasyonunun yanısıra elektrostatik, hidrofobik ve Van Der Waals etkileşimlerini de içermektedir. şekil 1.2 afinite desteğe şelatlanmış bir metale proteinin bağlanmasını göstermektedir.



### Kromatografik matriks

Şekil 1.2. İmmobilize bir metal iyonuna bağlı proteinin şematik gösterimi

İMAK'da proteinlerin adsorpsiyonu, protein yüzeyindeki elektron verici grupları ile immobilize metal iyonu arasındaki koordinasyon oluşumuna dayanır. Çoğunlukla kullanılan metaller, Lewis asitleri olarak düşünülebilen ve elektron çifti kabul eden Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II), Fe(II) gibi geçiş metal iyonlarıdır. Kromatografik desteğe bağlanan şelat oluşturu bileşiklerde bulunan N, S, O gibi elektron verici gruplar, ortamda bulunan koordinasyon bağlarının sayısına bağlı olarak, iki dişli, üç dişli vb. olabilen metal şelatları oluşturarak metal iyonları ile koordinasyon bağı yapabilirler. Geride kalan metal koordinasyon bölgeleri normalde su molekülleri tarafından işgal edilir. Daha sonra proteinden gelen uygun elektron verici gruplar ile yer değiştirebilir. Bazı aminoasitler, özellikle yan zincirlerindeki elektron verici atomlarından dolayı bağlanma için uygundur. Glu, His, Arg, Lys, Asp, Tyr, Cys ve Met gibi çoğu kalıntıların bağlanmaya katılabilmesine rağmen, İMAK'de proteinin gerçekte alıkonması histidin kalıntılarının varlığı temeline dayanır. Trp, Phe ve Tyr gibi aromatik yan zincire sahip aminoasitler de, eğer dışarı uzanabilen histidin kalıntılarına yakın iseler onlarda bağlanmaya katkıda bulunabilir (Arnold 1991 ve Sulkowski 1989).

İMAK desteklerine protein adsorpsiyonu, histidin kalıntılarındaki imidazol azotunun, nötral veya hafif bazik ortamlarda protone olmadığı pH'larda gerçekleşir. Genellikle relativ olarak spesifik olmayan elektrostatik etkileşimleri indirgemek için 0.1–1.0 M NaCl içeren yüksek iyonik şiddetli tamponlar kullanılır. Hedef proteinin elüsyonu için düşürülen pH gradientleri veya düşük pH'lı elüsyon tamponları kullanılır. Düşük pH'ya hassas proteinler için nötral pH civarında imidazol ile ligand değişimi daha uygundur. Bu durumda imidazolün protonlanarak meydana getirdiği pH düşmesinden sakınmak için İMAK kolonları kromatografik ayırmalarda önce imidazol ile doyurulur ve dengeye getirilir. EDTA gibi güçlü şelat oluşturucu ajanların kullanılması da bağlı proteinlerin elüsyonunu sağlar; fakat bu durumda sorbentin bağlama etkisi tahrip edildiği için, bir daha ki ayırmadan önce matriks tekrar şelat oluşturucu iyon ile yüklenmelidir (Diltemiz, 2002).

### **1.2.3. Kovalent Afinite Kromatografisi**

Bu teknik, ligand ile ayırımı yapılacak biyomoleküller arasında kovalent bağ oluşumu esasına dayanır (Ghadge, 2000).

Proteinlerde kimyasal reaksiyonlar için potansiyel bölgeler başlıca çeşitli fonksiyonel gruplara sahip aminoasit yan zincirleridir. Özellikle amino ve karboksil fonksiyonel grupları proteinlerin çözünmez polimerlere immobilizasyonu için kullanılırlar. Bu fonksiyonel gruplarla elde edilen kovalent bağlar, kimyasal olarak çok kararlı bağlardır ve bu bağlarla immobilize olan proteinleri parçalamadan serbest bırakmak pratikte çok zordur.

Kararlı ve yumuşak koşullarda da kırılabilen bir kovalent bağ oluşturan tek fonksiyonel grup tiyol grubudur. Tiyol grupları proteinlerde sıklıkla bulunurlar ve çoğunlukla proteinlerin enzimler, hormonlar, reseptörler v.b olarak fonksiyonlarına doğrudan katılırlar.

Adsorpsiyon aşamasında, ayırımı yapılacak biyomolekül tiyol-disülfür değişim reaksiyonu ile aktive edilmiş destek materyali üzerine kovalent olarak bağlanır. Desteğe bağlanmamış ve spesifik olmayan protein adsorpsiyonunu önlemek için yıkama işlemi yapılmalıdır. Yıkama tamponlarının seçimi kovalent

olarak bağlanmış biyomolekülün kullanılma amacına ve kararlılığına bağlıdır. Uygun bir yıkama işleminden sonra bağlı protein düşük molekül ağırlıklı tiyolün (SH) fazlası ile disülfür bağlarının indirgenmesi yoluyla elüe edilir.

Kovalent kromatografi ilk başlarda kompleks protein karışımlarından tiyol içermeyen moleküllerden tiyol içeren moleküllerin ayrılması için kullanılmıştır. Tiyol reaktif adsorbanların diğer önemli uygulaması ise enzimlerin disülfür bağları ile tersinir immobilizasyonlarıdır. Kovalent kromatografi tekniği uygulanarak literatüre geçmiş çalışmalar arasında, Jack Bean'den üreazın izolasyonu, papainin saflaştırılması, tiyol peptitlerinin saflaştırılması, betagalaktosidazın tersinir immobilizasyonu ve protein altbirimlerinin karakterizasyonu bulunmaktadır.

#### **1.2.4. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi**

Hidrofobik etkileşim kromatografisi, proteinleri yüzeyindeki non-polar bölgelerle immobilize hidroforik ligandlar arasındaki hidrofobik etkileşimlerin temelinde, proteinlerin hidrofobitesine dayanarak ayırımını sağlar. Hareketli fazda yüksek tuz konsantrasyonunda adsorpsiyon artar ve elüentin tuz konsantrasyonunun azaltılmasıyla elüsyon sağlanır. Bu nedenle tuz-destekli adsorpsiyon terimi kromatografinin bu türü için kullanılabilir.

Elüsyon şartlarının farklı tipleri, diğer kromatografik tekniklerin kullanılmasıyla ayırmanın zor olduğu proteinlerin kompleks karışımlarının saflaştırılması için kullanılabilir. Aslında diğer protein kromatografik tekniklerini tamamlayan bağlanma karakterleri rol oynadığı zaman hidrofobik etkileşim kromatografisi, ayırma amaçları için başarılı şekilde kullanılmaktadır. Araştırmacılar kompleks mekanizma içermesine rağmen, hidrofobik etkileşimlere en büyük katkıda bulunan faktörün Van der Waals kuvvetleri olduğunu belirtmişlerdir. Böylelikle, biyolojik moleküllerde yapısal hasarlar minimum düzeyde olur ve onun biyolojik aktivitesi, hidrofobik etkileşim kromatografisinin kullanılmasıyla ayarlanabilir. Hidrofobik etkileşim kromatografisi, adsorbana kuvvetli bağlanmalardan dolayı protein elüsyonu için non-polar çözücülerini

gerektiren, daha az denatürasyon yapan ortamlarda çalışılan ve proteinlerin hidrofobik özelliklerinin kullanıldığı alternatif bir tekniktir.

Son yıllarda, hidrofobik etkileşim kromatografisi birçok araştırmacı tarafından geliştirilmiş ve bugün endüstriyel ölçekli protein saflaştırmanın yanısıra laboratuvar ölçekli güçlü bir ayırma tekniği oluşturulmuştur. Hidrofobik etkileşim kromatografisi için sabit fazın çeşitliliğinin gelişimi ile serum proteinler, nükleer proteinler, hormonlar, rekombinant proteinler ve enzimler gibi biyomoleküllerin saflaştırılmasında hidrofobik etkileşim kromatografisi uygulamalarının kapsamı artmıştır.

Her protein için hidrofobik aminoasitlerin sayısı, onların farklı dağılımları ve hidrofobisite karakteristiktir. Bundan dolayı, hidrofobik desteklerle veya matrikslerle spesifik ayırma yapılabilir. Bu yüzden, proteinlerin hidrofobisitesindeki farklar, biyomoleküllerin hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılmasıyla fraksiyonlanabilmesini sağlar. Bu kromatografik metodun termodinamik analizleri hidrofobik etkileşimlere dayanan diğer yöntemlerle elde edilenlerle temelde aynı sonuçları vermiştir.

Spesifik uygulamalar için kromatografik yöntemin başarısını sağlamak için iki temel unsur dikkate alınır. Bunlar sabit faz ve akışkan mobil fazdır.

Sabit fazın çeşitli türleri ligandın tipi, ligand zincirinin uzunluğu, ligand yoğunluğu ve matriksin veya desteğin türüne göre ayrılabilir.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi için en çok kullanılan ligandlar uç amino gruplu veya grupsuz lineer zincir alkanlardır. Fenil (ve diğer aromatik gruplar) hidrofobik ve aromatik (II-II) etkileşimleri karışımından dolayı iyi sonuçlarla ligand olarak kullanılırlar. Matriks üzerinde süstitüsyon derecesinde, n-alkan ligandlar hidrofobisite ölçeğinde bir seri oluşturur.

Metil<etil<propil<butil<pentil<hekzil<heptil<oktil

Hidrofobisite ve etkileşim kuvveti n-alkil zincir uzunluğunun artmasıyla artar fakat adsorpsiyon seçiciliği azalabilir.

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde en çok kullanılan destekler hidrofilik karbonhidratlar (çapraz bağlı agaroz), silika veya sentetik kopolimer malzemelerdir. Aynı tür ligand kullanarak sabit fazın seçiciliği farklı tip desteklerle değiştirilebilir.



Hidrofobik etkileşim kromatografisinde alıkonma zamanı sadece sabit faza değil tuz derişimi ve türü, pH, sıcaklık ve katkı maddeleri gibi hareketli fazın özelliklerine de bağlıdır.

### **1.2.5. Yük Transfer Adsorpsiyon Kromatografisi**

Yük transfer adsorpsiyon kromatografisi, ligand ve biyomolekül üzerinde bulunan elektron alıcı ve elektron verici grupların etkileşimi esasına dayanır. Aminoasitler, peptitler ve nükleotitler bu yöntemle saflaştırılabilirler. Dekstran ve agaroz bu yöntemde kullanılan en yaygın desteklerdir. Sıklıkla kullanılan ligandlar ise akriflavin akridin sarısı, tritil grubu ve pentaklorofenoldür. Bu ligandlardan immobilize akriflavin araştırmacılar tarafından nükleotit, oligonükleotit ve çeşitli aromatik bileşiklerin ayırımında kullanılmıştır (Ghadge, 2000 ).

### **1.2.6. Boya-Ligand Afinite Kromatografisi**

Boya-ligand afinite kromatografisi protein ve enzimlerin saflaştırılmasında oldukça önemli avantajlara sahiptir. İmmobilize triazin boyalar, boya-ligand afinite kromatografisinde biyolojik makromoleküllerin saflaştırılmasında afinite ligandları olarak kullanılmaktadır. Triazin boyalar proteinlerle etkileşime girecek aromatik halkalara, negatif ve pozitif yük içeren gruplara sahip kompleks moleküllerdir. Boyalar çoğu polimerle nükleofilik süstitüsyon reaksiyonlarına izin verecek derecede yüksek reaktivitede olduğu için biyolojik ligandlarla karşılaştırıldığında polimerik destek materyal üzerine immobilize edilmeleri daha kolaydır. Kompleks bir karışımdan hedef molekülün yüksek saflıkta elde edilmesi hazırlanan destek materyalin spesifikliğı ile yakından ilişkilidir.

### **1.3. Biyoafinite Kromatografisi'nin Uygulama Alanları**

Biyoafinite kromatografisinin başlıca amacı biyomoleküllerin saflaştırılması ve ayrılmasıdır. Son yıllarda biyoafinite kromatografisi sadece

proteinlerin değil, aynı zamanda nükleik asit ve hücrelerinde ayrılmasında başarıyla uygulanmıştır.

### **1.3.1. Protein Saflaştırma**

Proteinlerin saflaştırılması afinite kromatografisinin ana amacıdır. Bu tekniğin geliştirilmesi (matriks seçimi, metod geliştirilmesi) gerçekte protein saflaştırmanın bir fonksiyonu olarak yapılmıştır.

Bu alanda, proteinlerin saflaştırılması ya gerçek biyospesifik afinite ya da pseudo-biyospesifik afinite kromatografisi ile yapılır. İlk durumda ligand, bir substrat, kofaktör, reseptör veya antibadi olabilir. İkinci durumda ligand, basit (aromatik, hidrofobik...) ya da kompleks etkileşimde bulunan sentetik ya da doğal bir moleküldür. Örnek olarak albümin, dehidrojenazlar, kinaz gibi pek çok proteine afinite gösteren immobilize edilmiş Cibacron Blue verilebilir.

### **1.3.2. Nükleik Asit Ayırma**

Nükleik asitler, diğer biyomoleküllerle çok sayıda afinite etkileşimlerine sahiptirler. Çift sarmallı DNA oluşumu, pürin ve pirimidin bazları arasındaki (H-bağları, hidrofobik, yük-transfer etkileşimleri gibi) baz çiftlenme etkileşimleri sonucudur. Kromozomların oluşumunda, histonlarla DNA'nın birleşmesi, DNA zincirinde çok sayıda enzimin davranışı bu etkileşimlere birkaç örnektir. Nükleik asitler üç farklı tür etkileşimi içerir;

- Baz etkileşimlerini tamamlayıcı
- Proteinlerle etkileşim
- Belirli aromatik moleküllerle etkileşim

Protein ve enzimlerle biyoafinite genellikle nükleik asitlerin immobilizasyonunu içerir. Bu afinite tamamlayıcı sistem, immobilize DNA üzerine proteinlerin etkileşimiyle DNA'nın saflaştırılmasını açıklar. Yine de bazı durumlarda histonlar DNA'nın ayrılması için ligand olarak kullanılırlar.

Nükleik asitler ve bazı aromatik moleküller arasındaki afinite mekanizmaları, pürin ve pirimidin bazları ve DNA sarmalı ve dışındaki

elektrostatik etkileşim prosesleri arasındaki etkileşim nedeniyledir. Bu oluşum, yük-transfer etkileşimlerini, hidrofobik ve tamamlayıcı iyonik yükleri içerir.

### **1.3.3. Hücre Saflaştırma**

Hücre ayrımları için afinite kromatografisi, glutaraldehit, aktiflenmiş AcA ve Mersalil-Trisakril C üzerine immobilize edilmiş antibadilerin kullanımıyla başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Avidin-Ultrigel A4R de hücre ayrımı için ilginç ve çok yönlü bir araçtır.

Elüsyon, hücre uygulamasına etki edebilecek iyonik kuvvet veya pH değişimlerinin olmadığı fizyolojik koşullarda gerçekleştirilir. 3 tür elüsyon sözkonusudur.

- Rekabete dayalı elüsyon
- Mekanik elüsyon
- Çift adsorpsiyon-desorpsiyon mekanizması

Rekabete dayalı elüsyon genellikle ligand lektin olduğunda şekerlerle gerçekleştirilir.

Mekanik elüsyon cam çubuk kullanılarak yumuşak bir hızlandırmayla süspansiyonda gerçekleştirilir.

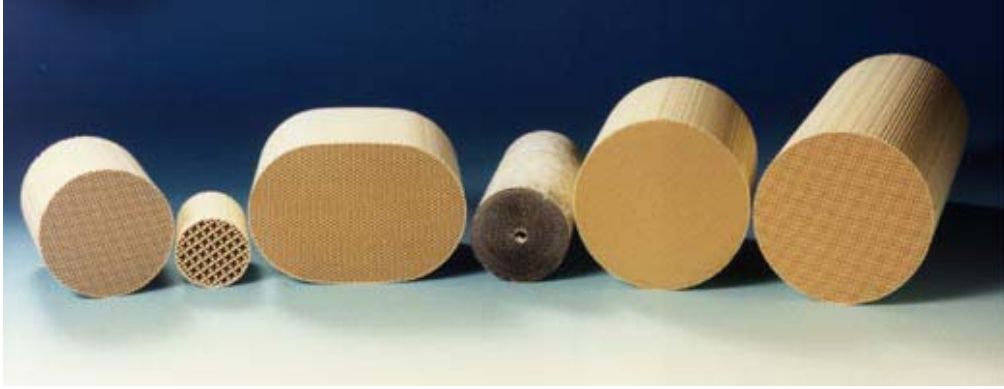
Çift adsorpsiyon mekanizması ligand ve jel arasında ayrılabilir bağlar içerir.

### **1.4. Afinite Kromatografisi için Monolitik Destek Malzemeleri**

Monolit kelimesi eski Yunan dilinden gelmektedir. Mono bir, lit taş-kaya anlamlarını içermektedir. Bu karşılıklara dayanarak monolit, bir taş parçası anlamına gelmektedir. Monolitler, birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır.

Monolitler son dönemde araştırmacılar tarafından yeni nesil taşıyıcı destek malzemesi olarak değerlendirilmektedirler. Monolitik kolonda kütle aktarım direnci ve basınç düşmesi çok düşük düzeydedir. Dolayısıyla monolitik kolonda konveksiyon taşınım nedeniyle kütle aktarımının çok hızlı gerçekleşmesi bu sistemin en önemli avantajıdır.

Monolitler sürekli yataklar olarak da tanımlanmaktadır ve homojen kolonlar veya diskler şeklinde hazırlanmaktadır. Monolit hazırlanmasında sentetik organik malzemeler, doğal polimerler veya organik malzemeler kullanılmaktadır. Daha önce belirtildiği gibi monolitler, daha düşük bir kütle aktarım direnci ve basınç düşmesi gibi hidrodinamik özellikleriyle ticari kolonlara göre birçok avantaj sunmaktadır. Her iki özellik de kromatografik performans, hız ve ölçek büyütmede önemli bir rol üstlenmektedir. Bundan dolayı monolitler biyomoleküllerin ayrılmasında preparatif ve analitik ölçekte geniş kullanım alanları bulmaktadır. Malzemeler disk, çubuk veya tüp formlarında üretilmektedir (Josic, 2001). Şekil 1.3'de farklı şekil ve boyutlarda hazırlanmış monolitik malzemeler verilmiştir.



**Şekil 1.3.** Farklı şekil ve boyutlarda hazırlanmış monolitik malzemeler

#### **1.4.1. Alternatif Dolgu Malzemesi Olarak Monolitler**

Birçok endüstriyel işlemlerde, geleneksel dolgulu kolonlar kullanılmaktadır. Dalgulu kolonların bu popülerliğine rağmen, yavaş kütle transferi, partiküller arası boşlukların fazla olması ve yüksek basınç düşmesi bu sistemlerin hızını ve etkinliğini olumsuz yönde etkiler. Eş boyutlu mikrokürelerle mükemmel doldurulmuş dolgulu kolonlarda en düşük teorik partiküller arası hacim, toplam kullanılabilir hacmin % 26'sını oluşturur. Pratikte ise bu değer mikrokürelerin iç porlarında dahil % 30-40 civarındadır (Xie ve ark., 1999). Çevre kontrol uygulamalarında ve diğer birçok ayırma işlemlerinde basınç düşmesinin

az olması istenir ve düzgün akış kanallarıyla monolitler bu amaç için alternatif olarak ele alınmaktadır. Monolitler bal peteği gibi düzenlenmiş kanallardan oluşmaktadırlar. Kanallar altıgen, daire, kare, üçgen yapılarda olabilir ve hacmine oranla oldukça yüksek bir yüzey alanı ve düşük bir basınç düşmesine sahiptir. Kanal oluşumu ve şekli, hücre yoğunluğu, açıkta olan kesit alanı; en az uzunluğu ve toplam çapı kadar önemli parametrelerdir ve monolit üretimi sırasında değiştirilebilmektedir. Ticari adsorpsiyon işlemlerinde genellikle granül veya pelet yapısındaki malzemeler kullanılmakta olup monolit formundaki bir malzemenin kullanılma çalışmaları daha yenidir.

Adsorpsiyon, hava buharından uçucu organik kimyasalların (UOK) geri kazanımı için kullanılan yöntemlerden biridir. Granül halindeki aktif karbon (GAK), geçmişte en iyi adsorbent olarak ele alınmaktaydı. Fakat aşınma ve yüksek basınç düşmesinden etkilenmekteydi; çünkü karbon granül veya pelletler şeklinde dolgulu kolonlarda kullanılmaktaydı. Buna ek olarak karbon suya daha yüksek afiniteye sahiptir ve nemli hava buharında çok düşük bir performans göstermektedir. Bu amaç için silikalit monolitler, eşsiz organofilik/hidrofilik karakterleri ve yüksek sıcaklıklardaki kararlılıklarıyla uygun destek malzemeleri olarak kullanılmaktadırlar. Silikalit monolitler GAK' in tüm dezavantajlarını yenmektedir.

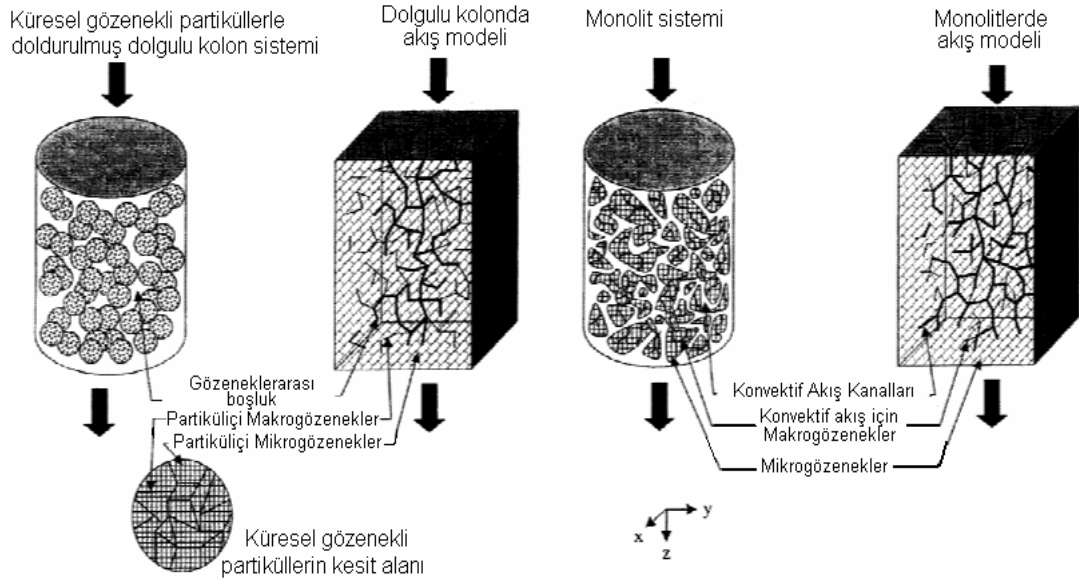
Son zamanlarda monolitik malzemeler, kolay hazırlanabilirlikleri, mükemmel akış özellikleri ve biyomoleküllerin saflaştırılmalarında geleneksel kolonlara kıyasla yüksek performansları nedeniyle saflaştırma sistemlerinde yeni durağan faz olarak kullanılmaktadır (Xie ve ark., 1999; Uzun ve ark., 2004). Monolitlerin hedef moleküllere karşı seçiciliği moleküler baskılama tekniği ile artırılabilir. Literatürde baskılanmış polimerlerin yapay antikor, kimyasal sensör, seçici katalizör gibi potansiyel uygulamalarına ait örnekler bulunmaktadır (Wulff, 1995; Takeuchi ve Haginaka, 1999). Matsui ve çalışma grubu akrilik asit ve etilen dimetakrilat kullanarak ilk baskılanmış monoliti hazırlamıştır ve bu malzemelerin diaminofthalin izomerlerinin ve fenilalanine enantiomerlerinin ayrılmasında moleküler tanıma yetenekleri gösterilmiştir (Matsui ve ark., 1993).

## 1.4.2. Monolitlerin Gözenek Yapısı

Monolitlerin gözenek yapısı, yüksek akış hızlarında mükemmel bir ayırıcılığa olanak sağlamaktadır. Benzer etkiler, büyük gözeneklere sahip örgülerde de gözlenmektedir.

Gözeneklerden tam bir akışın gerçekleşmesi, istenilen bir durumdur; monolitik yataklarda bu büyük oranlarda gerçekleşmektedir. Bu kromatografik yataklarda partikül içi aktarımın performans üzerindeki pozitif etkisi, partikülüçi aktarıma izin veren partiküllerle doldurulmuş yataklara göre daha büyüktür. Bu deneysel olarak da gösterilmiştir.

Araştırmacılar, monolitlerin gözenek yapısı ve analitin hem konvektif hem de difüzyon ile kütle aktarımını gösteren bir model sunmuşlardır (Şekil 1.4). Bu teori, kübik örgü olarak adlandırılan bir modele dayanmaktadır. Araştırmacılar tarafından sunulan bu model ile konvektif hızın ve monolit içerisine çözünenin gözenek difüzyon yeteneğini tahmin etmek de mümkündür. Şekil 1.4'de bu ağın nasıl modellendiği gösterilmektedir.



Şekil 1.4. Dolgulu kolon ve monolit sistemlerin gözenek ağ modelinin şematik gösterimi.

Monolitlere ait elektron mikroskobu fotoğrafları, sadece birleşen küçük partiküller ve oluşan kanallar hakkında bilgi verebilmektedir. Bundan dolayı, henüz bağlanmayı nicel olarak gösteren yöntem yoktur. Partiküllerin sahip olduğu çapları yerine, difüzyon uzunlukları incelenmektedir. Gözeneklerin, monolitin kırımın değerinden farklı bir değere sahip bir malzeme ile doldurulması, elektron mikroskobu ile bağlanmanın ölçülmesinin temelini oluşturmaktadır.

### **1.4.3. Kütle Aktarım Özellikleri**

Geleneksel yöntemlere göre monolitlerin daha iyi bir performans göstermesi, genellikle artırılmış kütle transfer özelliği ile açıklanmaktadır. Ayırımı yapılacak molekül gözenek içerisine difüzyonla değil konveksiyonla ulaşmaktadır. Bu akış sisteminde saflaştırma işlemi oldukça hızlıdır. Partikül içi aktarımın kütle transferini artırması konusunda teorik çalışmalar yapılmaktadır. Polimetakrilat bazlı monolitlerin artırılmış kütle aktarımı birçok araştırma grubu tarafından gösterilmiştir. Gözenekler birbirine difüzyon yolu oldukça kısa olacak şekilde bağlanmışlardır. Monolitik kolonlarda film direnç özellikleri de farklıdır. Film kalınlığının daha küçük ve alanın daha büyük olduğu kabul edilmektedir. Her iki etki artırılmış kütle aktarımına sebep olmaktadır. Bu hipotezin varlığını göstermek için yapılan çalışmalar devam etmektedir.

Monolitler çok daha düşük geri basınç yapmasına rağmen; kolon performansı, HPLC-tipi dolgulu kolonlarla benzerlik göstermektedir. Polimetakrilat bazlı monolitlerin spesifik geçirgenlikleri yaklaşık 45 mm aralık değerine sahip CIM (convective interaction media) diskleri gibidir. Monolitlerin çok daha küçük partiküllerden oluştuğu SEM fotoğraflarından açıkça görülmektedir. Dolgulu kolonda enerji kaybına sebep olan Eddy girdaplarına, monolitik kolonlarda daha az rastlanmaktadır.

Monolitlerdeki adsorpsiyon kinetikleri, geleneksel yöntemlerle aynıdır. Polimetakrilat bazlı CIM-diskler, hareketli fazdaki yüksek tuz derişimlerinde proteinler için yüksek bağlanma kapasitesi göstermektedir. Bu diskler, yüksek yoğunlukta (mmol mertebesinde) yumuşak agaroz ve dextran bazlı iyon

değiştiriciler gibi ligandlar da içermektedir. Bu özellikleri CIM disklerin, ham çözeltilerden proteinlerin ayrılmasında kullanımına olanak sağlamaktadır.

Adsorpsiyon kinetiği, geleneksel kromatografiden farklı değildir ve çok hızlı ayırma işlemleri için sınırlayıcı bir etken olabilir. Bundan dolayı, afinite kromatografisi genellikle monolitlerle birlikte kullanılmaz. Son çalışmalarda, pıhtılaşma faktörlerinden biri olan Faktör VIII'in saflaştırılması için monolitlere peptit immobilize edilmiştir. Bu çalışmada da yüksek hızlarda, düşük adsorpsiyon kinetiğinin sınırlayıcı bir etken olduğu gösterilmiştir. Bir diğer çalışmada, polimetakrilat monolitler üzerine monoklonal antitadiler immobilize edilmiştir. Maya içerisinde üretilen çeşitli model proteinlerin geri kazanımının ve ayırıcılığının, geniş bir hız aralığından bağımsız olduğu belirlenmiştir. 2 mm yüksekliğindeki küçük diskler kullanıldığında, çok yüksek akış hızında (35 cm/dakika) çalışılsa bile, bağlanma için gerekli olan etkileşim süresi bulunmaktadır.

Monolitlere protein adsorpsiyonunda katı difüzyonunun ne derece bir rol oynadığı henüz tam olarak belirlenememiştir. Yüksek tuz derişimlerinde, oldukça yüksek bir bağlanma kapasitesi elde edilmektedir. Bu durum, proteinler tarafından ulaşılamayan fakat tuz iyonları tarafından ulaşılabilen gözenek kesimlerinin varlığı veya katı difüzyonuna yatkınlıkla açıklanabilmektedir. Monolitik sabit fazlar, dolgulu kolonlara bir alternatif olarak gelecek vaat etmektedir. Hem hazırlanmaları kolay hem de sınırsız kimyasal imkanlar sunmaktadırlar. Ayrıca dolgulu kolonların birçok dezavantajını elimine etmektedirler. Dolgulu kolonlardan farklı olarak, kapilerin iç duvarına kimyasal bağlanmaları sonucu mükemmel bir yapısal kararlılığa sahiptirler.

Monolitik malzemeler, tek basamakta çok dar kanal boyut dağılımında kolaylıkla hazırlanabilmektedirler. Fotokimyasal başlatıcılı polimerizasyonla monolitler hazırlanabilmekte; bu monolitlerin spesifik yüzey alanı ayarlanabilmektedir. Bu yöntem monolit teknolojisinin minyatür analitik sistemlerin geliştirilmesi için uygun olduğunu göstermektedir (Svec ve ark. 2000).

Monolitler, proteinlerin ve polinükleotidlerin hızlı ayrılmasında ve işlem kontrollerinde başarıyla kullanılmaktadırlar. Monolitler üzerine yapılan tüm çalışmaların ortak özelliği, hızlı ayırma kapasitesinin belirlenmesi ve enzimatik



dönüşümlerde kullanılabilirliklerinin tayinidir. FVIII-vWF gibi oldukça büyük moleküller bile (1.000.000 Da'dan daha büyük kütleli yapılar) hızlı bir işleme saflaştırılabilmektedir. Uygun monolitik tüplerin hazırlanmasıyla üretim ölçeğinin büyütülmesi de mümkündür. Çapla birlikte akış profilinin değişmesi, monolitik kolonun ayrıcılığını etkilememektedir. Çünkü kütle transferinin konvektif olduğu ve hızdan etkilenmediği belirlenmiştir.

Monolitler, biyoteknolojide analitik ve preparatif uygulamalar için alternatif bir ayırma ortamı olarak üzerinde çalışılması ve yeni yapıların geliştirilmesi gereken oldukça önemli bir araştırma konusudur.

## **1.5. Enzimler**

### **1.5.1. Enzimlerin Kısa Tarihçesi**

Enzimler biyolojik hızlandırıcılardır (katalizör). Kendileri herhangi bir değişime uğramadan canlı sistemlerde oluşan kimyasal tepkimelerin hızını artırırlar.

Biyokimyanın tarihsel gelişiminde enzimlerle ilgili araştırmalar önemli yer tutar. Biyolojik kataliz ilk kez 1700'lü yılların sonunda mide salgılarıyla etin sindirilmesi çalışmalarıyla tanımlandı.1800'lü yılların başlangıcında çeşitli bitki özleri ve tükürkle nişastanın şekerleştiği gözlemlendi. 1850'li yıllarda Louis Pasteur, maya hücreleri ile şekerin alkole mayalanmasının (fermentasyon) , “fermentler” olarak tanımladığı maddelerce katalizlendiğini ileri sürdü. Pasteur, fermentleri canlı maya hücrelerinin ayrılmaz bir parçası olarak düşündü ve bu görüş ‘vitalizm’ olarak uzun yıllar devam etti.

1897'de Eduard Buchner, maya hücreleri özütlerinin de şekeri alkole mayalayabildiğini gösterdi. Böylece mayalanmayı sağlayan moleküllerin hücre dışına çıkarıldıktan sonra da işlevsel oldukları anlaşıldı. Frederick W.Küche, bu molekülleri Yunanca “ enzyμος” kökünden olan ve “maya içinde” anlamına gelen enzim olarak tanımladı.

Enzimolojinin hızlı gelişimi 20.yy'da gerçekleşti. 1903'te Victor Henri ve 1913'te Michealis ve Menten'in enzimatik hidrolizin kinetik modellerini

geliştirmelerinden sonra enzimlerin özelliklerinin belirlenmesine ilişkin çalışmalarda müthiş bir artış gözlemlendi. Bugüne kadar çeşitli canlı sistemlerden yüzlerce farklı enzim saflaştırıldı, bunların birçoğunun aminoasit dizilimleri belirlendi ve kristalleri elde edilerek üç boyutlu yapıları aydınlatıldı. Bazı enzimlerin endüstriyel süreçlerde kullanımları gerçekleşti ve enzim teknolojisi denen bir alan doğdu.

### **1.5.2. Enzimlerin Biyosentezi**

Canlı sistemlerdeki enzim biyosentezi yaşamın devamı için büyük önem taşımaktadır. Canlılığın bütün evrelerinde sabit ya da değişen düzeylerde ayarlanan enzimatik aktiviteler sayesinde metabolizmanın düzenli bir şekilde yürümesi sağlanır. Enzimlerin doğal ortamlarındaki kararlılıkları enzimden enzime değişiklik gösterse de genel olarak yarı ömürleri sınırlı bir süreye karşılık gelir. Özellikle bazı metabolik proseslerin regülasyonlarının sağlanması açısından bu sınırlı yarı ömür büyük önem taşır. Sonuç olarak her ne sebeple olursa olsun canlı sistemler içindeki enzimlerin de diğer proteinlerde olduğu gibi sürekli bir yıkım içinde olduğu açıktır. Canlılığın devamı için bu sürekli yıkıma karşılık enzim aktivitelerini yeterli düzeylerde tutabilmek amacıyla kontrollü bir şekilde yürüten bir enzim biyosentezi gerçekleşmektedir.

Enzimler kimyasal yapı bakımından protein sınıfı maddeler olmaları sebebiyle sentezlerinin protein sentezinden bir farkı yoktur. Herhangi bir enzimin yapısı da ilişkili olduğu yapısal gendeki DNA baz dizisi tarafından belirlenir. Bu genetik bilgi transkripsiyon ile m-RNA ya aktarılır. Ribozomlarda, transfer RNA ve ilişkili faktörlerin de yardımıyla “her üç baz bir aminoaside karşılık gelir” temel prensibi doğrultusunda nükleik asit baz dizisi proteinin (enzimin) aminoasit dizisine çevrilir. Sentez devam ederken enzim molekülü, üç boyutlu yapısını oluşturmaya başlar ve sentez bitip ribozomdan ayrılmasını takiben aktif formu oluşturmak üzere katlanmaya uğrar. Enzimlerin çoğu protein yapısında oldukları için sentez sonrası çeşitli modifikasyonlar gerçekleşir. Bunların yanı sıra özellikle proteolitik enzimlerin biyosentezi kendine özgü nitelikler taşır. Söz konusu enzimler, sentezlenmiş oldukları pankreas ve mide gibi organları yıkıma

uğratmamak amacıyla proenzim veya zimojen adı verilen inaktif formda oluşturulurlar. Bu enzimler ancak faaliyet gösterecekleri bölgeye ulaştıklarında bazı peptit bağlarının kopması ve birkaç aminoasitten oluşan parçaların ayrılmasından sonra aktif forma dönüşürler (Telefoncu, 1997).

### **1.5.3. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması**

Enzimlerin belirlenmesine yönelik çalışmaların ilk yıllarında, bulunan enzimlere herhangi bir ayrıntılı sistematik kural olmaksızın verilen isimler, sayılarının azlığı nedeniyle 20.yy'ın ortalarına kadar önemli bir problem oluşturmamıştır. Ancak 1950'lerin sonlarına doğru enzimolojik araştırmaların hızla gelişmesi sonucunda, bulunan enzimlerin sayısındaki artış aynı enzime farklı araştırmacılar tarafından değişik isimlerin verilmesi sonucunu doğurmuştur. Enzimlere verilen isimlerin çoğu zaman o enzimin katalizlediği reaksiyonla hiçbir ilgisinin olmaması önemli karışıklıklara yol açmıştır. Bu karmaşayı engellemek amacıyla Uluslararası Enzim Komisyonu tarafından 1956 yılında enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır.

Uluslararası Enzim Komisyonunun çalışmaları doğrultusunda enzimlerin adlandırılmasında üç temel ilke gözönüne alınmıştır. Bunlar;

**a)** Enzimlerin isimleri **-az** son eki alırlar. Bu ilke sadece tek bir reaksiyon katalizleyen enzimler için geçerli kabul edilmiş olup birden çok enzimi içeren sistemlere uygulanamaz.

**b)** Enzimler katalizledikleri reaksiyona göre adlandırılır ve sınıflandırılırlar. Burada dikkate alınan sadece enzimin katalizlediği reaksiyondur. Enzimin aksiyon mekanizması, araürünler, kofaktör ya da prostetik gruplar normalde isme dahil edilmezler. Bu nedenle herhangi bir enzim, katalizlediği reaksiyon tam anlamıyla tanımlanana kadar sistematik olarak isimlendirilemez.

**c)** Enzim komisyonunun (E.C.) belirlediği temel ilkeler dikkate alınarak yapılan bir adlandırma, reaksiyonun geri dönüşlü olduğu deneysel olarak gösterilmiş olsa da bütün enzim sınıflarında, reaksiyonun sadece dikkate alınan yönünü ifade eder.

Genelde herhangi bir enzimin biri sistematik diğeri önerilen olmak üzere iki ismi bulunur. Önerilen ismi geleneksel ismi olarak da adlandırılabilir. Önerilen isim yaygın olarak kullanılan ve daha basit olan isimdir. Bir enzimin sistematik adı ve E.C. kod numarası belirlendikten sonra önerilen ismin kullanılmasında hiçbir sakınca yoktur ve bu yöndeki uygulamaya literatürde yaygın olarak rastlanmaktadır.

1961 yılındaki ilk enzim komisyon raporuna göre enzimler katalizledikleri reaksiyon türüne göre altı ana sınıfa ayrılmışlar ve bu sınıflarda yer alan her enzim EC olarak kısaltılmış ve 4 rakamdan oluşan kod numarasıyla karakterize edilmiştir. EC numarasının kapsadığı dört rakamdan ilki enzimin altı ana sınıftan hangisi içinde yer aldığını, ikinci rakam alt sınıfı, üçüncü rakam alt-alt sınıfı ve dördüncü rakam ise alt-alt sınıfındaki seri numarasını ifade eder.

Enzimlerin altı ana sınıfı ise aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

**1. Oksidoredüktazlar:** Redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimler bu sınıfta yer alırlar. Katalizledikleri reaksiyonların özelliğine göre önerilen isimler açısından dehidrogenaz veya redüktaz olarak da adlandırılabilirler. Katalizledikleri indirgenme reaksiyonlarında akseptör olarak oksijeni kullanan bu sınıftaki enzimler oksidaz olarak adlandırılırlar

**2.Transferazlar:** Metil, açıl, amino, glikozil ya da fosfat gibi spesifik bir grubun bir maddeden diğesine transferini katalizleyen enzimler transferazlar olarak adlandırılırlar.

**3.Hidrolazlar:** Hidrolazlar, C-O, C-N, C-C ve bazı diğ bağların hidrolitik yıkımını katalizler. Önerilen isim basitçe substrat ismine –az sonunun getirilmesiyle oluşur.

**4.Liyazlar:** Liyazlar, C-C, C-O, C-N ve diğ bağların eliminasyon yoluyla yıkımını katalizleyen enzimlerdir. Bazı liyazların önerilen isimlerine örnek olarak dekarboksilaz, aldolaz, dehidrataz (sırasıyla CO<sub>2</sub>, aldehit ve suyun eliminasyonu) verilebilir.

**5.İzomerazlar:** İzomerazlar, bir molekül içindeki geometrik ya da yapısal yeniden düzenlemeyi katalizleyen enzimlerdir. Katalizledikleri diğ izomerasyon tiplerine göre bazıları rasemaz, epimeraz, izomeraz, tautomeraz, mutaz ya da sikloizomeraz gibi önerilen isimler alabilirler.

**6.Ligazlar:** Ligazlar, ATP ya da diğer bir nükleozittrifosfatdaki bir pirofosfat bağının hidrolizi yardımıyla iki molekülü birbirine bağlayarak sentez gerçekleştiren enzimlerdir (Telefoncu, 1997).

## 1.6. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler doğal durumda suda çözünürler. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak serbest enzimlerin kullanılması sakıncalara neden olur. Serbest enzim ile gerçekleştirilen bir reaksiyonun durdurulması, enzimin istenilen anda ortamdan uzaklaştırılması ancak spesifik inhibitör kullanılarak sağlanabilir. Bu durumda serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürün veya ürünlerine yeni bir kirlilik katılmış olur. Ürünlerin bu kirlilikten arıtılması güç olduğu kadar masraflıdır.

Ayrıca enzimatik reaksiyonun inhibitör kullanılarak durdurulması katalizörün potansiyelinden tam olarak yararlanılmasını engeller. İnhibitör katılmasa bile serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden geri kazanmak ve yeniden kullanabilmek olanaksızdır.

Enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden, istenilen anda ve kolay bir işlemlle uzaklaştırmaya olanak sağlayan çözüm yolu enzimlerin immobilizasyonudur.

Suda özünen ve çözeltilde serbest hareket edebilen enzim moleküllerinin suda çözünmeyen reaktif bir polimer taşıyıcıya bağlanarak, yine çözünmeyen yüzey aktif taşıyıcılarda adsorplanarak, bifonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlanarak ve polimer matrikste, yarı-geçirgen membran veya mikrokapsüllerde tutuklanarak hareketinin sınırlandırılması olayına “immobilizasyon” denir (Telefoncu, 1993).

İmmobilize enzimin doğal (serbest) enzime göre üstünlükleri şunlardır;

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, satrifüjleme v.b) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- evre koşullarına karşı (pH, sıcaklık v.s) daha dayanıklıdır.

- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha karardır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalama olasılığı azalır.
- Mekanistik çalışmalar için uygundur (Telefoncu, 1993).

Son yıllardaki gelişmeler sayesinde enzimlerin endüstriyel proseslerdeki kullanımını daha da hız kazanmıştır (Ikehata ve Buchanan 2004). Özellikle susuz-enzimatik proseslerdeki ilerlemeler, ürün ve enzim geri kazanımı yönünden birçok araştırma grubunun ilgisini çekmiştir (Gupta, 1992; Braco, 1995; Krishna, 2002). Çizelge 1.2’de endüstriyel uygulamaları olan bazı enzimler verilmiştir.

**Çizelge 1.2.** Endüstriyel uygulamaları olan bazı enzimler

Enzim	Substrat	Ürün
Glukoz izomeraz	Glukoz	Fruktoz
Penisilin açılaz	Penisilin	6-Aminopenisilanik asit
Lipaz	Trigliserit	Kakao yağı
Aspartik asit amonyaliyaz	Fumarik asit	L-Aspartik asit

Uygun immobilizasyon matriksi üretim prosesini etkileyen farklı özelliklere bağlı olarak seçilir (Tischer ve Wedekind 1999). Bu özellikleri şu şekilde sıralayabiliriz;

#### **a- Yüzey alanı ve porozite**

Yüksek yüzey alanı ( $> 100 \text{ m}^2 / \text{g}$ ), enzim yüklemesi açısından oldukça önemli ve istenen bir durumdur. Yüksek porozite ise substratın enzime ulaşım

onunla etkileşmesi açısından önemlidir. 30 nm'den büyük por büyüklüğü immobilizasyon prosesi süresince enzim difüzyonu için idealdir.

#### **b-Yüzey fonksiyonel grupları**

Matriks üzerine enzim yükleme miktarı, yüzeydeki fonksiyonel grup yoğunluğuna da bağlıdır. Fonksiyonel grup seçimi aktivite verimini de etkiler.

#### **c-Mekanik ve kimyasal kararlılık**

Matriksin enzim aktivite kaybının önlenmesi ve prosesin sürekliliği açısından kimyasal ve mekanik yönden kararlı olması gerekir.

#### **d-Hidrofobik/hidrofilik yapı**

Matriks ile sıvı faz arasındaki uyum substrat ve ürün değişimi açısından oldukça önemlidir (David, 2004)

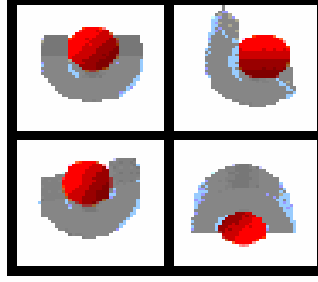
### **1.6.1. Tutuklama**

Prensip olarak tutuklama, enzim molekülünü belirli bir ortamda durmaya zorlamaktır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi çapraz bağlama ya da yüzey immobilizasyonundan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır.

#### **1.6.1.1. Polimer Matrikste Tutuklama**

Polimerizasyon ve çapraz bağlamanın olduğu ortamda enzim de bulunduğu takdirde enzim çapraz bağlama sonucu oluşan odacıklara (kafes) tutuklanmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir.

Yöntem, yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiliye geçmeleri engellenmektedir. Bu durum Şekil 1.5'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Enzimlerin polimer matrikste tutuklanması

Çapraz bağ yüzdesi öyle ayarlanmalıdır ki, enzim molekülleri tutuklanabilsin ama substrat moleküllerinin enzim moleküllerine ulaşmasına engel olunmasın. Çapraz bağ yüzdesinin aşırı olması substratın enzim aktif merkezlerine ulaşmasını engellemekle kalmayıp enzimin zincir yapısını da zorlayıp aktivite kaybına veya tamamen inaktif olmasına neden olabilir. Bu nedenle optimal bir çapraz bağ yüzdesi saptanması önemlidir. Bu oran enzime ve taşıyıcıya bağımlı olarak değişir. Uygun çaplı substrat molekülleri polimer kafes içinde tutuklanmış enzim moleküllerine ulaşır ve reaksiyon ürünleri de dışarı çıkar. Tutuklama yöntemi ile immobilize edilecek enzimin substratının küçük moleküllü olması gerekir. Bu tip immobilizasyon ilk kez 1963 yılında tripsin, kimotripsin ve diğer bazı enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmıştır (Telefoncu, 1997).

Molekül ağırlığı 15.000 den fazla olan enzimlerin immobilizasyonları oldukça kolaydır. Bu tür immobilizasyon işleminde en çok kullanılan taşıyıcılar hidrofilik temele dayalı poliakrilamid jeli ve jel oluşturan polisakkaridlerdir (Kawashima, 1987). Ayrıca silikon lastiği ve silikajel de kullanılmaktadır. Tutuklama yanında özellikle yüklü polimerlerde fiziksel adsorpsiyonun da etkin olduğu saptanmıştır.

Bu yöntemle immobilize edilen bir enzimin asıl özelliklerinde bir değişme beklenmez. Ancak taşıyıcının tipi enzimatik reaksiyonlar bölgesel mikroçerçeve etkilerinin oluşmasına neden olmaktadır. Örneğin taşıyıcının yüklü olması önemli bir etkidir. Kserojel tipi silikajel pH 3 ve daha yüksek pH değerlerinde negatif yüklüdür. Buna karşılık poliakrilamid jeli, nişasta ve silastik reçineler ise elektrikçe nötraldirler. Taşıyıcının yüklü olması immobilize enzimin



özelliklerinde doğal enziminkine kıyasla çok önemli değişmelere neden olmaktadır.

Bu yöntemin yararları; çok kolay uygulanması, gerçek bir fiziksel yöntem oluşu ve çok az miktar enzimle gerçekleştirilmesidir. Nötral, suda çözünmeyen taşıyıcılarla da immobilizasyon gerçekleştirilmekte ve kimyasal bir bağlanma olmadığından yüklü taşıyıcıya gerek duyulmamaktadır.

Yöntemin sakıncaları ise; immobilizasyon işleminde inaktivasyonunun deney koşullarına çok sıkı bağımlı oluşu ve immobilize enzimin ancak küçük moleküllü substratlara karşı iyi bir aktivite göstermesidir.

### **1.6.1.2. Membran Yapısı İçinde Hapsetme**

Bu yöntemde enzimler yarı geçirgen membranlar arasında alıkonulur. Yarı geçirgen zar büyük molekül ağırlıklı enzimi alıkoyarken düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin (substrat ve ürün) dışarı difüze olmalarına izin verir.

Membran yapısı içinde hapsetme mikrokapsüllerde tutuklanarak da gerçekleştirilir. Enzim yarı geçirgen membran tarafından kuşatılmış küçük bir küre içinde tutulur. Yarı geçirgen membran olarak naylon, selüloz, poliakrilat kullanılır.

Tutuklama yönteminin bazı dezavantajları vardır. Bunlar; enzimin çözelti içine sızması, enzim aktivitesinde ve kararlılığında azalma ve mikroçevresel koşullar üzerinde kontrolün azalmasıdır.

### **1.6.2. Yüzey İmmobilizasyonu**

Bu yöntemle enzimi destek materyaline bağlamada bir protein olan enzim molekülünün yapısından yararlanır. Molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlanmada rol alırlar

### 1.6.2.1. Adsorpsiyon

Enzimin zayıf fiziksel kuvvetlerle (Van Der Waals) destek materyalinin yüzeyine bağlanmasıdır. Enzimin aktif bölgesi etkilenmez. Enzim desorpsiyonu özellikle güçlü hidrodinamik kuvvetler varlığında önemli bir problemdir.

Destek materyalleri çok değişik türde olmakla birlikte iyi bir adsorpsiyon sağlayabilmek için genellikle destek materyalinin bir ön işlemden geçirilmesi gerekmektedir. Bir enzimin suda çözünmeyen destek materyaline adsorpsiyonu pH, çözücü, iyonik şiddet ve sıcaklık gibi faktörlere bağlıdır. Bu faktörlerin araştırılması, adsorpsiyon ve aktivitenin önemli ölçüde geri kazanılması için optimal koşulların saptanması çok önemlidir. Adsorpsiyon işleminin mekanizması genellikle çok karışık olup bir olasılıktan hangisinin gerçekleşeceğini önceden saptanması çok güçtür.

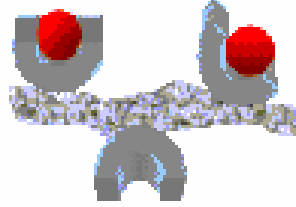
Prensip olarak bir proteinin aktif yüzeylerde adsorpsiyonu tersinir bir işlem olmalıdır. Ancak bazı durumlarda (kaolenitte adsorplanmış üreaz) tersinir olmayan bir adsorpsiyon sözkonusu olabilmektedir. Eğer aktivite sabit kalıyor ve immobilize enzim sürekli işlemlerde kullanılabilirse bu tür adsorpsiyon enzim immobilizasyonu için ideal durumdur. Desorpsiyon, reaksiyon ürünlerinin kirlenmesine ve aktivitede sürekli bir değişmeye neden olur.

Adsorpsiyon yönteminin yararlarını şu şekilde sıralayabiliriz;

- . Enzim immobilizasyon işlemi oldukça basittir.
- . İmmobilizasyon işlemi kolay olduğu gibi çok yumuşak koşullarda gerçekleşmektedir
- . Değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı verir.

Yöntemin sakıncalarını ise şu şekilde sıralayabiliriz; Her ne kadar immobilizasyon işlemi kolaysa da optimal koşulların saptanması çok güçtür. Eğer enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa bu durumda desorpsiyon sonucu enzim serbest halde reaksiyon ortamına geçmekte ve ürünlerin kirlenmesine neden olmaktadır. Enzim desorpsiyonu özellikle substrat konsantrasyonunun yüksek olduğu durumlarda hiç istenmeyen bir durumdur.

Adsorpsiyon ile enzim immobilizasyonu Şekil 1.6’da şematik olarak verilmiştir.

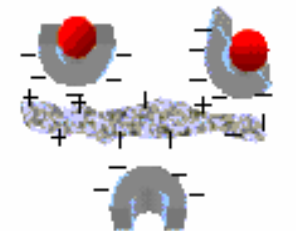


Şekil 1.6. Enzimlerin adsorpsiyon ile immobilizasyonu

### 1.6.2.2. İyonik Bağlama

Bu yöntem, iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik olarak bağlanması temeline dayanır. Bazı durumlarda iyonik bağlama yanında fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır.

İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından bazı durumlarda yüzeyden enzim kaçıışı söz konusu olabilmektedir. Şekil 1.7’de enzimlerin iyonik olarak immobilizasyonu verilmiştir.

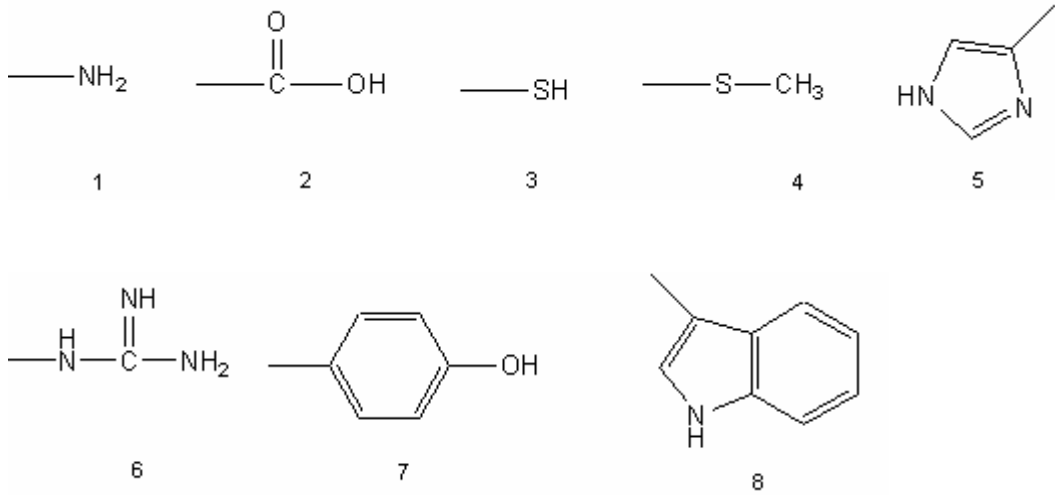


Şekil 1.7. Enzimlerin iyonik olarak immobilizasyonu

### 1.6.2.3. Kovalent Bağlama

Enzim ve destek maddesinin fonksiyonel grupları arasında kovalent bağlanma oluşması sonucu enzimin destek yüzeyinde alıkonulmasıdır. Bu fonksiyonel gruplar enzimin aktif bölgesine ait değildir.

Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir. Taşıyıcıya kovalent bağlanma enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir (Şekil 1.8).



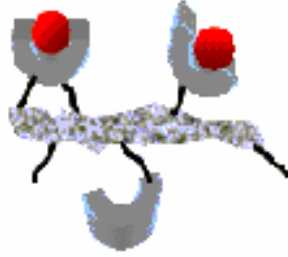
Şekil 1.8. Aminoasit yan zincirlerinin reaktif grupları

- 1: N-Terminal aminoasitlerin amino grubu
- 2: C-Terminal aminoasitlerin, aspartik ve glutamik asidin serbest karboksil grupları
- 3: Sisteinin sülfhidril grubu
- 4: Metiyoninin tiyoeter grubu
- 5: Histidinin imidazol grubu
- 6: Argininin guanidil grubu

7: Tirozinin fenolik grubu

8: Triptofanın indolil grubu

Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar reaktif değillerse yardımcı bir reaktif ile aktive edilmeleri gerekir. İmmobilizasyon çok yumuşak koşullarda (Oda sıcaklığı, nötral pH v.b) gerçekleştirilmelidir. Taşıyıcı suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofobik karakterli de olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik kararlı olmalıdır. Bu tür taşıyıcıların seçiminde enzim-taşıyıcı bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözücülere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımaya dikkat edilmelidir. Şekil 1.9'da enzimlerin kovalent olarak immobilizasyonu gösterilmiştir.



Şekil 1.9. Enzimlerin kovalent olarak immobilizasyonu

#### 1.6.2.4. Şelat Bağlama

Bazı geçiş metallerinin şelat yapma özellikleri sayesinde enzimlerin organik ve inorganik taşıyıcılara bağlanması mümkündür. Yöntem ilk kez 1971 yılında uygulanmış (Novais, 1971) olup daha sonra da kullanılmaya devam edilmiştir (Kennedy ve Cabral 1985).

### 1.6.2.5. Biyospesifik Bağlama

Enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanarak enzimler immobilize edilebilir. Lektinler spesifik karbohidrat artıklarını içeren enzimlere kuvvetlice bağlanırlar. Örneğin bu yöntemle immobilize edilen invertaz, sakarozun kesiksiz dönüşümünde kullanılmıştır (Iqbal ve Saleemuddin 1985). Spesifik monoklonal antikorları suda çözünmeyen materyale bağlayarak hazırlanan taşıyıcılar enzim immobilizasyonunda başarılı bir biçimde kullanılmaktadır (Solomon ve ark. 1987).

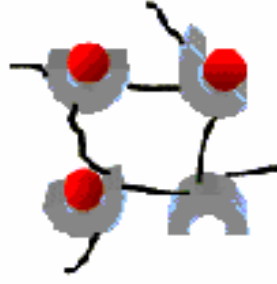
### 1.5.3. Enzim Molekülleri Arasında Çapraz Bağlama

Küçük molekülü bi- veya multi- fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH ya ve immobilize edilecek enzime bağlıdır.

Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu dört farklı şekilde gerçekleştirilir.

- a) Enzimin yalnız bifonksiyonel grup ile reaksiyonu
- b) Enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- c) Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıda adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- d) Enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonu

En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri glutaraldehit, karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, p-benzokinon ve epiklorhidrinlerdir. Şekil 1.10'da enzim molekülleri arasındaki çapraz bağlanma şematik olarak gösterilmiştir.

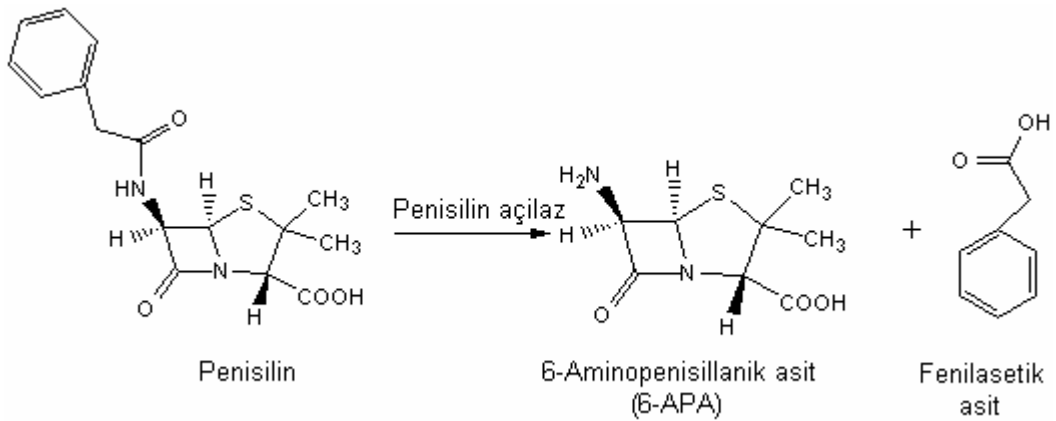


**Şekil 1.10.** Enzim molekülleri arasında çapraz bağlanma

Çapraz bağlama reaksiyonu çok yumuşak koşullarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur. Çapraz bağlı enzimler mekanik bakımdan çok kararsızdır ve şimdiye kadar yalnızca immunolojik testlerde kullanılmışlardır.

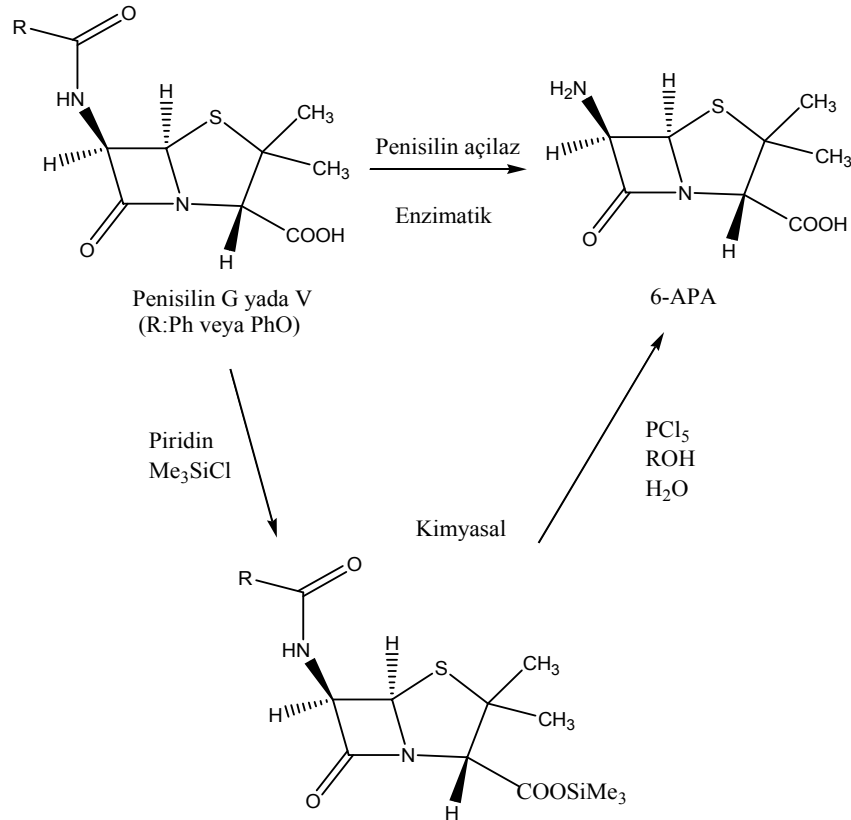
### 1.7. Penisilin Amidohidrolaz (Penisilin Açılaz)

Penisilin açılaz (PA) (EC 3.5.1.11), penisilin molekülündeki lineer amid/açıl bağının hidrolizi ile  $\beta$ -laktam çekirdek, yarı sentetik penisilinlerin sentezindeki anahtar hammadde olan 6-aminopenisillanik asit (6-APA) ve ilgili organik asit oluşumu ile sonuçlanan reaksiyonu katalizler. Şekil 1.11’de penisilin molekülünün hidrolizine ilişkin reaksiyon verilmiştir.



**Şekil 1.11.** Penisilin molekülünün hidrolizi

Yarı sentetik penisilinler enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yoğun olarak kullanılan antibiyotiklerdir. Dolayısıyla bunların üretimi ve tüketimi için dünyada büyük bir pazar oluşmuştur. Yarı sentetik penisilinler, antibakteriyel aktiviteden sorumlu  $\beta$ -laktam halkası içeren ve ana penisilin çekirdeği olarak adlandırılan 6-APA'ya amino grubundan farklı yan zincirler bağlanmasıyla elde edilirler. Bu nedenle yarı sentetik penisilinlerin üretiminde öncelikle 6-APA'nın elde edilmesi zorunludur. 6-APA penisilin G yada penisilin V'den kimyasal ya da enzimatik süreçle elde edilir. Şekil 1.12'de görüldüğü gibi 6-APA'nın kimyasal yolla üretiminde 2 ardışık reaksiyonun gerçekleştirilmesi gerekir. Bu reaksiyonlar birçok kompleks ya da basit organik ya da inorganik katalizöre ihtiyaç vardır. Ayrıca  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  gibi düşük sıcaklıklarda çalışma zorunluluğu vardır ve bu sıcaklıkların sağlandığı özel reaksiyon tasarımları gerekir. Bunların yanı sıra her reaksiyon ürünü için bir saflaştırma sürecinin geliştirilmesi ve kullanılması zorunluluğu vardır.



Şekil 1.12. Enzimatik ve kimyasal yolla 6-aminopenisillanik asit (6-APA) üretimi



Enzimatik süreçte ise penisilin molekülü 37 °C gibi ılımlı koşullarda ve sulu ortamda enzimatik kataliz ile tek kademeli bir reaksiyon ile elde edilmektedir. Diğer taraftan kimyasal süreç her biri ciddi çevre kirliliğine neden olan toksisitesi yüksek kimyasalların kullanımını zorunlu kılarken, enzimatik süreç için gerekli kimyasallar çok daha az çevre kirliliği yaratmaktadır ve kimyasal süreçten daha az sayıda kimyasala ihtiyaç vardır. Bütün bu hususlar göz önüne alındığında enzimatik süreçle 6-APA üretiminin kimyasal süreçle olan üretimden daha kolay, daha ekonomik ve daha çevre dostu olduğu görülmektedir. Bu nedenle bugün bütün dünyada 6-APA yalnız enzimatik süreçle üretilmektedir.

6-APA'nın ticari üretiminde penisilin amidohidrolaz (PA) katalizör olarak kullanılmaktadır. Bu endüstriyel uygulama kısmen saflaştırılmış enzimatik çözeltilerden farklı enzim immobilizasyon teknikleri uygulanarak gerçekleştirilmektedir. 6-APA'nın üretiminin yüksek maliyeti genellikle, son yıllardaki gelişmelere karşın, düşük geri kazanım sağlayan enzim saflaştırma basamağından kaynaklanmaktadır. Çok basamaklı işlemlerde PA saflaştırılması için farklı teknikler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin çoğu hidrofobik etkileşim temeline dayalıdır. Ancak bu yöntemler yüksek aktivite kaybı ile geri kazanım sağlamaktadır. Bunun yanı sıra ampicillin, cephalexin ve penicillin gibi genel olarak kullanılan ligandlar pahalıdır ve hidroliz olabilmektedirler. Literatürde PA saflaştırılması için son zamanlarda rapor edilen ligandlar arasında en uygun olanlar heterohalka içerenler olarak belirlenmiştir (Sudharan ve Shewale 1987; Kasche ve ark., 1990; Fonseca ve Cabral 1996; Santarelli ve ark., 2000).

## **2. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **2.1. Materyal**

#### **2.1.1. Kullanılan Kimyasallar**

Bu çalışmada kullanılan saf penisilin amidohidrolaz, 6-nitro-3-fenilasetamidobenzoik asit (NIPAB), aminoantipirin ve metakroilklorür Sigma (St Louis, USA) firmasından temin edilmiş ve bu monomer düşük basınç altında damıtılarak polimerizasyon inhibitörlerinden arındırılmıştır. Monomerler kullanılıncaya kadar 4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Azobisisobutironitril (AIBN) Fluka AG (İsviçre), poli(vinil alkol) (PVAL; molekül ağırlığı: 100.000, % 98 hidrolize olabilen) Aldrich (ABD) firmalarından temin edilmiştir. Etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) Fluka A. G. (Buchs, İsviçre) firmasından sağlanarak kullanılmadan önce hidrokinon varlığında düşük basınçta damıtılmış ve kullanıncaya kadar 4 °C'da muhafaza edilmiştir. Diğer bütün kimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır. Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz membranlı Barnstead (Dubuque, IA) Ropure LP® ters ozmoz ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgulu iyon değişim sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun iletkenliği 18 megaohm/cm'dir.

#### **2.2.2. Kullanılan Cihazlar**

Monomer ve polimerlerin karakterizasyon çalışmalarında Shimadzu 8000 model FT-IR, JEOL- JEM 1220EX model taramalı elektron mikroskobu (SEM), Bruker-Spectrospin Avance-DPX model 400 MHz'lik NMR, Leco-CHNS-932 model elementel analiz cihazı ve ASAP 2000 model spesifik yüzey alanı ölçüm (BET) cihazları kullanılmıştır. Adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları ve enzim aktivitesi çalışmalarında ise Shimadzu 1601 model spektrofotometre kullanılmıştır.

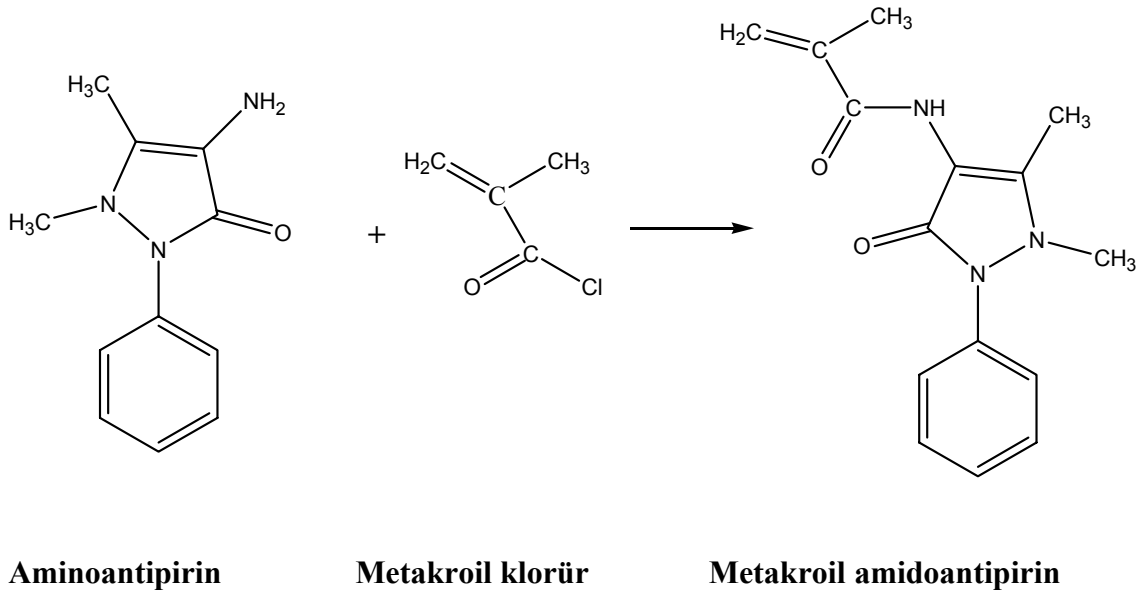
## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Monolitik Afinite Adsorbentin Hazırlanması

#### 2.2.1.1. Metakroil amidoantipirin (MAAP) Monomerinin Sentezi

Metakroil amidoantipirin monomerinin sentezi için uygulanan yöntemde; 0.5 g (2.463 mmol) antipirin ve 0.2 mL (2.46 mmol) piridin, kuru kloroform (100 mL) çözücüsü içerisinde çözülmüştür. Çözelti 0 °C'a soğutulmuş ve 0.26 mL (2.46 mmol) metakroil klorür yavaşça çözeltiye ilave edilmiştir. Bu çözelti azot atmosferi altında manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyon sonunda, çözelti 50 mL seyreltik HCl ve sonra 50 mL seyreltik NaOH ile yıkanmıştır. Daha sonra organik faz döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmış ve kalan kısım (MAAP), petrolbenzini ve etil asetat ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır. İlgili sentez Şekil 2.1'de verilmiştir.

**Erime Noktası: 132–133 °C, Verim: 70%**



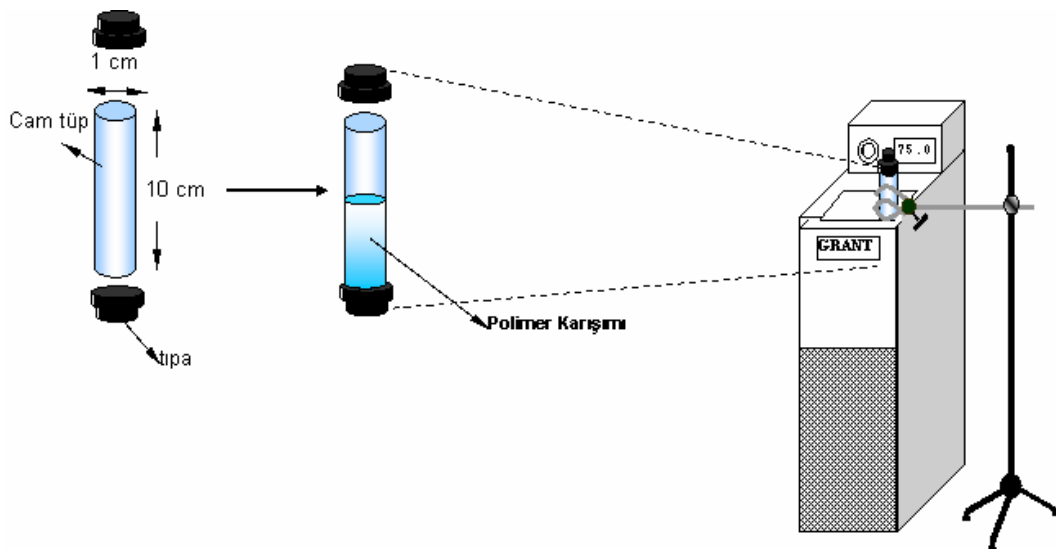
Şekil 2.1. Metakroil amidoantipirin (MAAP) monomerinin sentez reaksiyonu

### 2.2.1.2. [Poli (Etilenglikol dimetakrilat-Metakroil amidoantipirin) [Poli (EGDMA-MAAP)] Monolitinin Sentezi

Bu çalışmada monolitik destek malzemesi, metakroil amidoantipirin (MAAP) ve etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) monomerlerinin cam bir tüp içinde (10 cm yükseklik;1 cm iç çaplı) 60 °C'da 4 saat, 75 °C'da 2 saat süreyle yığın polimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Polimerizasyonda başlatıcı olarak azobisisobütironitril (AIBN) kullanılmıştır. Gözenek oluşturucu maddeler ise sikloheksanol ve n-oktanol'dür.

Uygulanan prosedürde, 70 mg AIBN ve 1.0 mmol MAAP, 3 ml çapraz bağlayıcı (EGDMA) ve gözenek oluşturucu çözücüler (sikloheksanol (6.0 ml) : n-oktanol (1ml))'den oluşan karışım içerisinde çözülmüştür. Monomer karışımı 15 dakika azot atmosferinde bekletildikten sonra 10 cm yükseklik;1 cm iç çaplı cam tüp içerisine aktarılmıştır. Polimerizasyon cam tüp içerisinde 60 °C'da 4 saat, 75 °C'da 2 saat olmak üzere toplam 6 saat içerisinde tamamlanmıştır. Polimerizasyon reaksiyonu tamamlandıktan sonra çözücüler ve reaksiyona girmemiş monomerler polimerin su ve etanol ile yıkanmasıyla yapıdan uzaklaştırılmıştır.

Şekil 2.2.'de monolitik kolonun hazırlanmasında kullanılan sistem gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Monolitik kolonun hazırlanmasının şematik gösterimi

## 2.2.2. Karakterizasyon Çalışmaları

### 2.2.2.1. Yüzey Morfolojisi

Poli(EGDMA-MAAP) monolitinin kesit yapısı ve yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ( JEOL, JEM 1220EX, Tokyo, Japan) kullanılarak belirlenmiştir. Monolitten alınan örnek analiz edilmeden önce oda sıcaklığında kurutulmuş ve örnek haznesine yerleştirildikten sonra vakum altında yaklaşık 100 Å kalınlığında altın tabakasıyla kaplanmıştır. Daha sonra taramalı mikroskop ile görüntüleri alınmıştır.

### 2.2.2.2. Yüzey Alanı Ölçümü

Poli(EGDMA-MAAP) monolitinin spesifik yüzey alanı BET cihazı (ASAP2000, ABD) kullanılarak belirlenmiştir.

### 2.2.2.3. Şişme Testi

Poli(EGDMA-MAAP) monolitinin denge şişme oranının belirlenmesinde aşağıda verilen yöntem izlenmiştir. Kuru monolit  $\pm 0.0001$  duyarlılıkla tartılmış ve 50 ml saf su içeren kaba konulmuştur. Kap 24 saat süre ile sabit sıcaklıktaki su banyosunda tutulmuştur ( $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ). Daha sonra monolitik polimer sudan alınmış, süzgeç kâğıdı yardımı ile yüzeydeki su uzaklaştırılarak tartılmıştır. Kuru ve ıslak ağırlıklar kaydedilmiş ve aşağıdaki eşitlik yardımı ile poli(EGDMA-MAAP) monolitinin su içeriği belirlenmiştir.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = [(W_s - W_0)/W_0] \times 100 \quad (2.1)$$

$W_0$  ve  $W_s$  sırası ile monolitinin şişmeden önceki ve sonraki ağırlıklarını ifade etmektedir.

#### 2.2.2.4. Elementel Analiz

Sentezlenen Poli(EGDMA-MAAP) monolitinin, MAAP içeriğinin belirlenmesi için elementel analiz cihazı kullanılmıştır. Elementel analiz sonuçlarının belirlenmesinde aşağıda verilen yöntem izlenmiştir. 1 mg monolitik polimer elementel analiz cihazının (Leco, CHNS-932, ABD) alüminyum hücreesine yerleştirilerek  $\pm 0,0001$  g duyarlılıkla tartılmıştır. Polimerik örnek cihaza koyularak yakma işlemi sonucunda örneğin karbon, hidrojen, oksijen ve azot analizi yapılmıştır.

#### 2.2.2.5. FTIR Analizi

MAAP monomerinin FTIR spektrumu, FTIR spektrometresi (Shimadzu FTIR 8000 Series) kullanılarak elde edilmiştir. Yaklaşık 0.1 g kuru monolitik polimer 0.1 g KBr ile karıştırılarak tablet hazırlanmış ve FTIR spektrumu çekilmiştir.

#### 2.2.2.6. NMR Analizi

MAAP monomerinin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu,  $\text{CDCl}_3$  içerisinde, Bruker-Spectrospin Avance -DPX 400 MHz NMR cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Kimyasal kaymalar ( $\delta$ ) ppm cinsinden  $\text{CDCl}_3$  referans alınarak rapor edilmiştir.

### 2.2.3. Hücre Kültürleri ve Ham Ekstraktların Hazırlanması

#### 2.2.3.1. Mikroorganizmalar

*Penicillium Chrysogenum* NRRL 1951, Amerika Birleşik Devletleri Tarımsal Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. *Penicillium Purpurogenum* 455 ise topraktan izole edilmiştir.

### **2.2.3.2. Inokulum(Aşı) Hazırlanması**

Fungal suşlar, sporların patates dekstroz agar besi ortamına aktarılıp, 7–10 gün süresince oda sıcaklığında inkübe edilmesiyle hazırlanmıştır. Daha sonra sporlar alınarak % 0.5 Tween–80 solüsyonuna toplanmış ve Thoma lam'ında sayılmıştır.

### **2.2.3.3. Enzim Üretimi**

Enzim üretimi,  $4 \times 10^6$  spor/ml spor süspansiyonu ile inoküle edilmiş 100 ml sıvı besi ortamı içeren 250 ml erlenmayerde gerçekleştirilmiştir. Besi ortamının bileşimi ise; 24 g patates dekstroz, 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ve 2 g fenilasetik asit/lt şeklindedir. Mikroorganizma büyümesi ve enzim üretimi 2 gün içerisinde  $25^\circ\text{C}$  ve 120 rpm'de başlamıştır.

### **2.2.3.4. Ham Ekstraktın Hazırlanması**

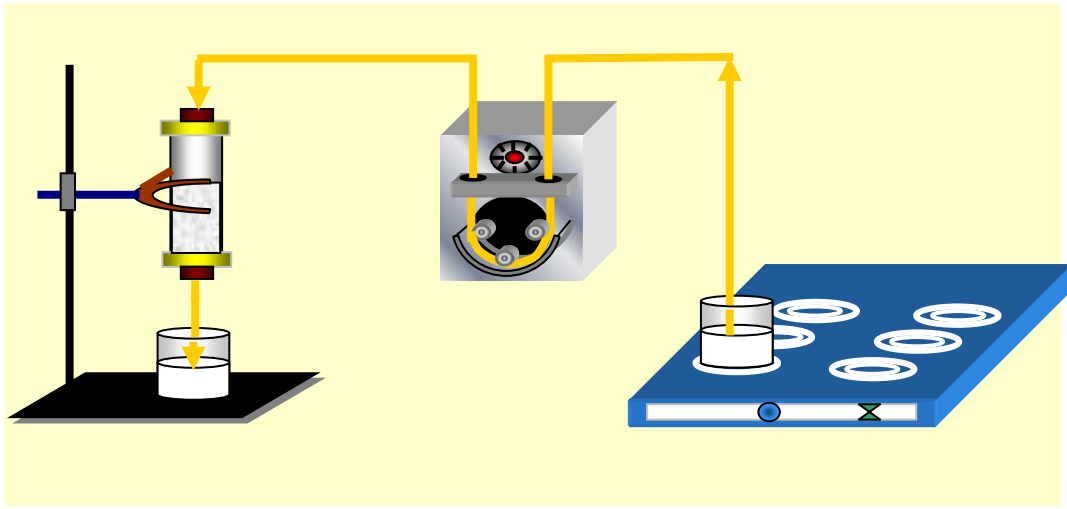
Misel kütlesi 8000 g'de 20 dakika santrifüj işlemiyle hasat edilmiş, 50 mM sodyumfosfat, 2 M sodyumsülfat içeren pH 7 fosfat tamponunda yeniden süspanse edilerek 10 dakika buz banyosu içinde homojenize edilmiştir. Numuneler  $4^\circ\text{C}$ 'de 23500 g karıştırma hızında 30 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra supernatant toplanmış ve enzim çalışmalarında kullanılmıştır.

## **2.2.4. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları**

### **2.2.4.1. Monolitik Polimere Penisilin Amidohidrolaz Adsorpsiyonu**

Poli(EGDMA-MAAP) monolitine sulu çözeltilerden PA adsorpsiyonu sürekli sistemde çalışılmıştır. Adsorpsiyon hızına ve kapasitesine; başlangıç penisilin açılaz derişimi, pH, sıcaklık, iyonik şiddet ve akış hızı etkisi incelenmiştir.

Adsorpsiyon-desorpsiyon çalışlarında sıcaklık kontrollü monolitik kolon sistemi kullanılmıştır. Adsorpsiyon işlemlerinden önce monolit 30 ml deiyonize su ile yıkanmış ve daha sonra 0.1 M NaCl içeren adsorpsiyon tamponu ile dengeye getirilmiştir. Penisilin amidohidrolaz çözeltisinin kolonda dolaşımı peristaltik bir pompa ile sağlanmış, kolondan çıkan çözelti ise ayrı bir beher içinde toplanmıştır (Şekil 2.3). Toplanan çözeltideki PA miktarı Bradford metoduyla spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (595 nm) (Bradford, 1976).



Şekil 2.3. Sürekli sistem düzeneği

Monolitik polimere adsorplanan penisilin amidohidrolaz miktarının hesaplanmasında aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

$$Q = [(C_0 - C) \times V] / m \quad (2.1)$$

Bu eşitlikte Q, birim monolitik polimer başına adsorplanan penisilin açılaz miktarını (mg/g),

$C_0$  ve C sulu çözeltideki penisilin amidohidrolazın başlangıç ve son derişim değerlerini (mg/L),

V sulu çözelti hacmi (ml) ve m ise kullanılan monolitik polimerin kütlesini (g) vermektedir.



#### 2.2.4.2. Monolitik Polimerden Penisilin Amidohidrolaz Desorpsiyonu

Penisilin amidohidrolaz desorpsiyonu için 1 M NaOH desorpsiyon ajanı olarak kullanılmıştır. Desorpsiyon çalışmalarında, 50 ml desorpsiyon ajanı 1.0 ml/dk akış hızında 1 saat süresince kolona gönderilmiştir. Desorpsiyon ortamındaki son penisilin amidohidrolaz konsantrasyonu Bradford yöntemiyle (Bradford, 1976) spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Desorpsiyon oranı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Desorpsiyon(\%)} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamına salınan penisilin amidohidrolaz}}{\text{Adsorplanan penisilin amidohidrolaz}} \times 100 \quad (2.2)$$

#### 2.2.5. Enzim Aktivitesi Çalışmaları

Penisilin amidohidrolaz aktivite çalışmaları, Kutzbach ve arkadaşları'nın literatürde rapor ettikleri prosedür ile gerçekleştirilmiştir. Bu prosedüre göre; pH 7.2'de 10 mM fosfat tamponu içinde 250 µM 6-nitro-3-fenilasetamidobenzoik asit (NIPAB) substrat olarak kullanılmış ve monolitik polimere adsorplanan penisilin amidohidrolaz ile 37 °C'de etkileştirilmiştir. Sonuçta ürün olarak oluşan 6-nitro-3-aminobenzoik asit miktarındaki zamana bağlı değişimin 405 nm'de spektrofotometrik olarak tayiniyle penisilin amidohidrolaz aktivitesi hesaplanmıştır.

Bir enzim aktivitesi (IU) dakikada 1 µmol 6-nitro-3-aminobenzoik asit oluşumunu katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Enzim aktivitesi ise aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\text{Enzim Aktivitesi (IU/ml)} = \Delta\text{Abs}/\Delta\text{T.V.4.49} \quad (2.3)$$

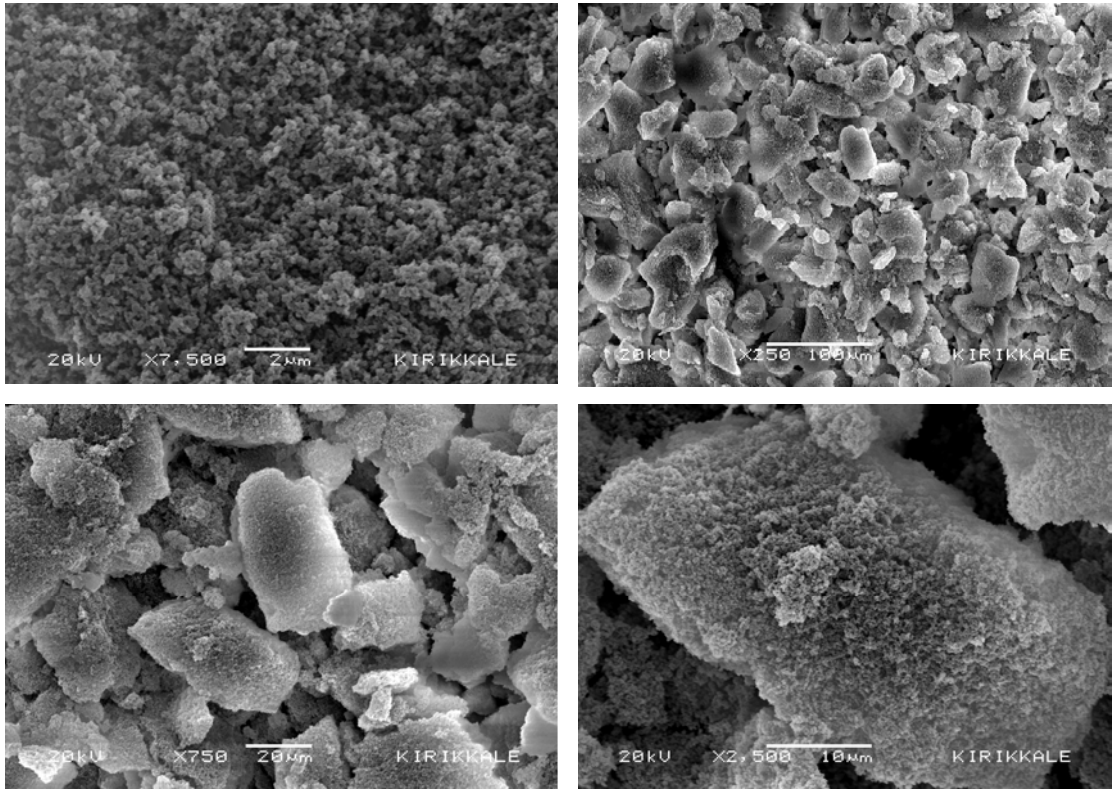
Bu eşitlikte  $\Delta\text{Abs}$ , absorbanstaki değişimi,  $\Delta\text{T}$  zaman değişimini ve  $V$ , numune hacmini ifade etmektedir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Poli(EGDMA-MAAP) Monolitinin Karakterizasyonu

##### 3.1.1. Yüzey Morfolojisi

Poli(MAAP-EGDMA) monolitinin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Şekil 3.1’de görüldüğü gibi yığın polimerizasyonu ile elde edilen polimerik yapı oldukça pürüzlü olup geniş gözeneklere (taşıyım kanalları), gözeneklilik nedeniyle de oldukça büyük yüzey alanına sahiptir. Ayrıca, bu mezoporlar difüzyon direncini azaltmakta ve yüksek iç yüzey alanı sayesinde enzim moleküllerinin kütle transferini de kolaylaştırarak adsorpsiyon kapasitesinin artmasına neden olmaktadır



Şekil 3.1. Poli (EGDMA-MAAP) monolitinin SEM fotoğrafları

### **3.1.2. Yüzey Alanı Ölçümü**

Poli(EGDMA-MAAP) monoliti yığın polimerizasyonu ile çubuk formda üretilmiştir. Monolitin spesifik yüzey alanı BET yöntemi ile 112.4 m<sup>2</sup>/g bulunmuştur.

### **3.1.3. Şişme Testi**

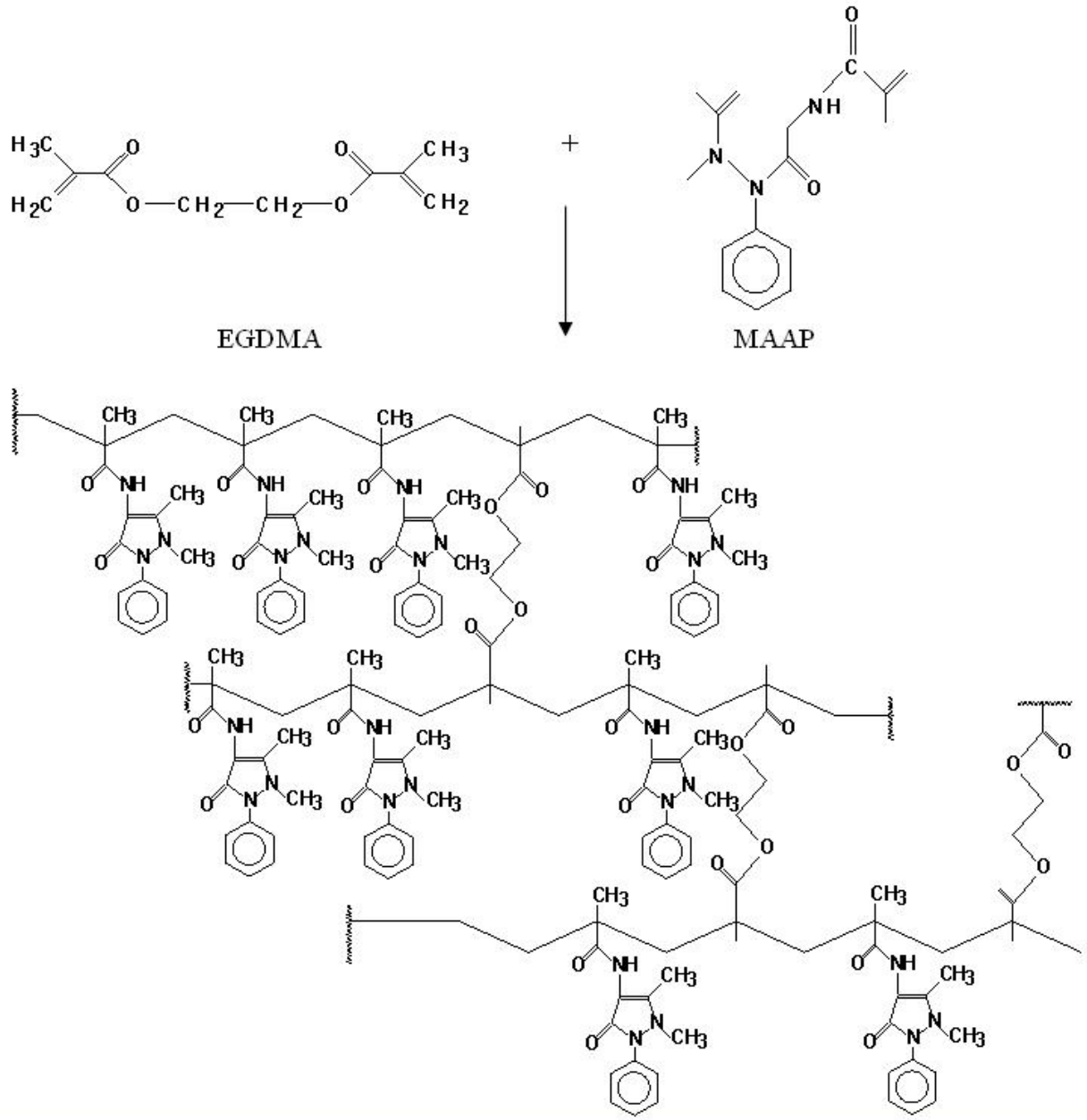
Poli(EGDMA-MAAP) monolitik polimer partikülleri çapraz bağlı, hidrofilik bir matrikstir. Sulu ortamda çözünmez, fakat çapraz bağ derecesine ve matriksin hidrofilitesine bağlı olarak yapılarına su alarak şişerler. Bu çalışmada poli (EGDMA-MAAP) monolitin denge şişme oranı % 56 olarak bulunmuştur.

### **3.1.4. Elementel Analiz**

Poli(MAAP-EGDMA) monolitinin MAAP içeriğinin belirlenmesi için elementel analiz yöntemi kullanılmıştır. Azot stokiyometrisi kullanılarak polimerik yapıya giren MAAP oranı 58.9 µmol/g polimer olarak bulunmuştur.

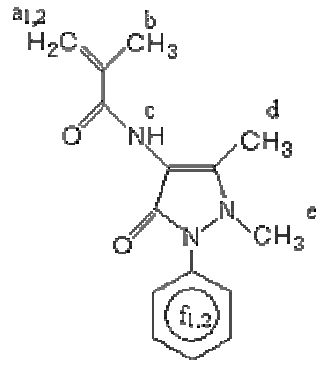
### **3.1.5. FTIR Analizi**

Penisilin açılaz adsorpsiyonu için metakroil amidoantipirin (MAAP) komonomer ve fonksiyonel ligand olarak seçilmiştir. İlk olarak 4-aminoantipirin metakroil klorür ile reaksiyona sokularak metakroil amidoantipirin (MAAP) monomeri elde edilmiştir. Daha sonra MAAP ve EGDMA komonomerleri yığın polimerizasyonu ile polimerleştirilerek poli(EGDMA-MAAP) monoliti elde edilmiştir. Sentezlenen poli(EGDMA-MAAP) monolitinin açık yapısı Şekil 3.2'de verilmiştir.

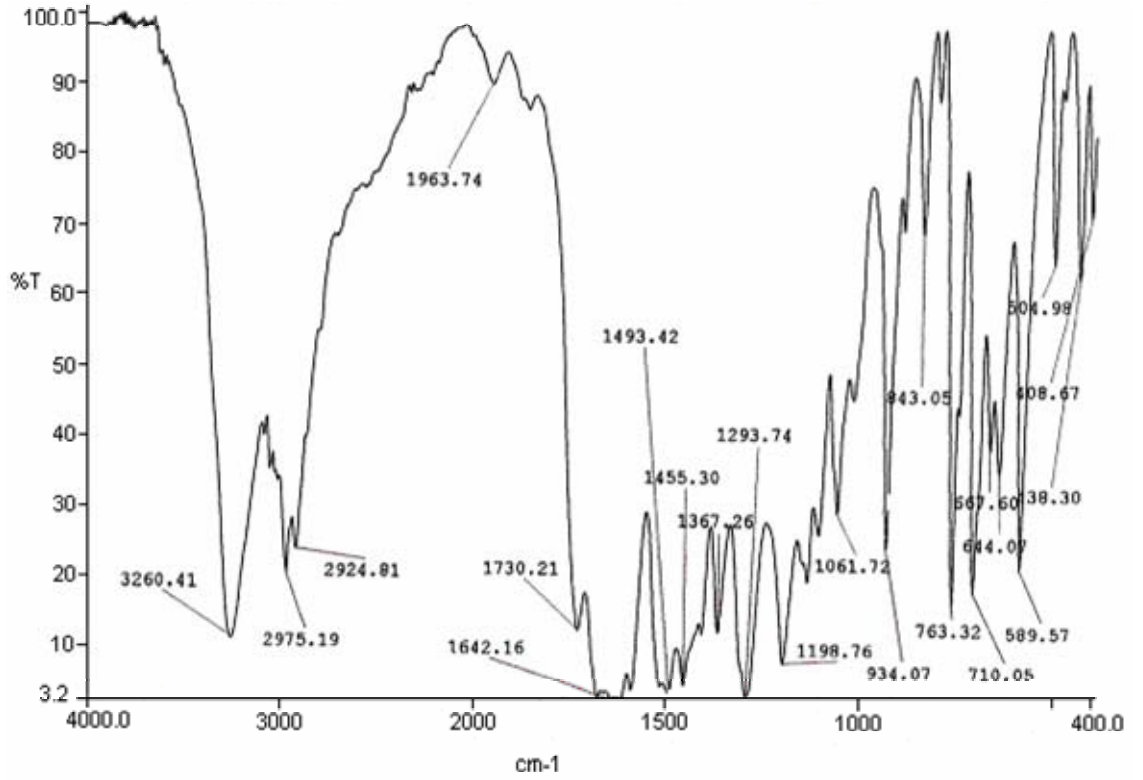


Şekil 3.2. Poli(EGDMA-MAAP) monolitinin açık yapısı

Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te ise MAAP monomeri ve MAAP monomerinin FTIR spektrumu verilmiştir.



Şekil 3.3. MAAP monomerinin açık yapısı

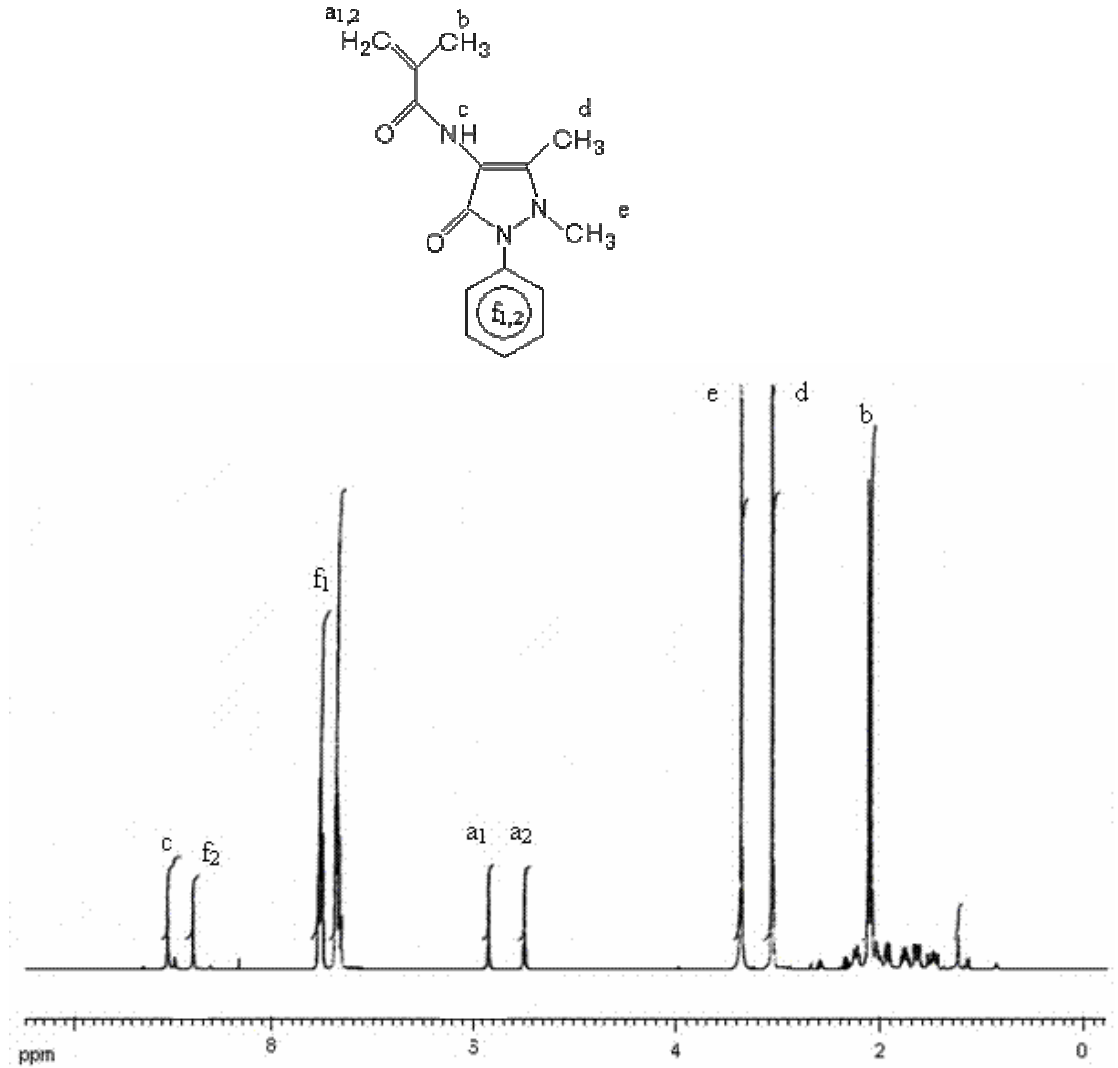


Şekil 3.4. MAAP monomerinin FTIR spektrumu

MAAP monomerinin karakterizasyonu için kullanılan FTIR analizlerinin karakteristik pikleri şöyledir: FT-IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 770–710 cm<sup>-1</sup> (monosubstitüye benzen halkası), 1580 ve 1500 cm<sup>-1</sup> (aromatik halkadaki konjugasyon, kuvvetli iki veya üç band), (1600 cm<sup>-1</sup> (metakril çift bağı), 1642 cm<sup>-1</sup> (amid karbonil bandı), 1730 cm<sup>-1</sup> (siklik keton pozisyonunda karbonil bandı), 2975 ve 2925 cm<sup>-1</sup> (C-H bandı), 3260 cm<sup>-1</sup> ( N-H bandı).

### 3.1.6. <sup>1</sup>H-NMR Analizi

MAAP monomerinin kimyasal yapısının belirlenmesinde <sup>1</sup>H-NMR'ı kullanılmıştır. <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda MAAP monomerinde bulunan gruplara ait karakteristik pikler Şekil 3.5'de görülmektedir. Bu karakteristik pikler şunlardır: 2.05 ppm 3H singlet (-C=C-CH<sub>3</sub>, vinil metil), 3.0 ppm 3H singlet (-C-CH<sub>3</sub>), 3.35 ppm 3H singlet (-N-CH<sub>3</sub>), 5.5 ppm 1H singlet (-CH<sub>a</sub>=C-), 5.8 ppm 1H singlet (-CH<sub>b</sub>=C-), 7.25–8.80 ppm 4H multiplet (aromatik, 7.3 ppm'de CDCl<sub>3</sub> pikide aromatik pikler içine karışmış durumdadır), 8.80 ppm 1H singlet (aromatik), 9.1 ppm 1H singlet (N-H) şeklindedir.

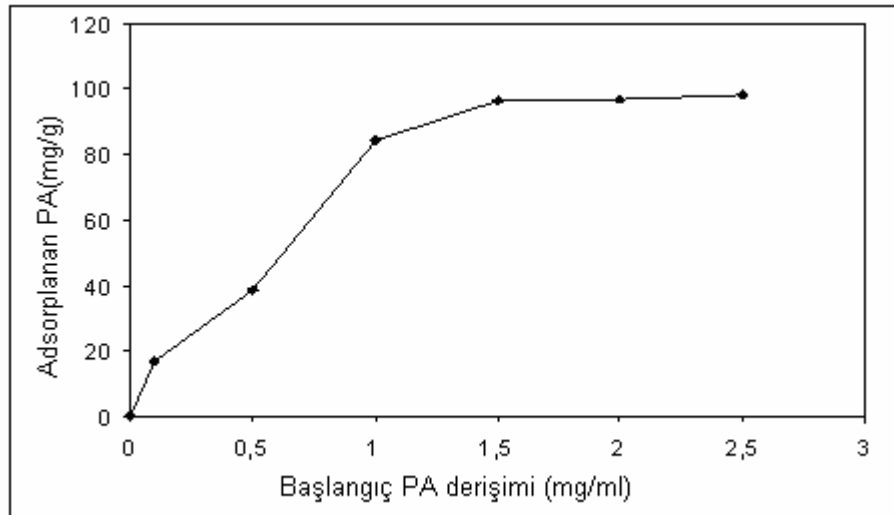


Şekil 3.5. MAAP monomerinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu

### 3.2. Poli(EGDMA-MAAP) Monolitine Sulu Çözeltilerden Penisilin Amido Hidrolaz Adsorpsiyonu

#### 3.2.1. Penisilin Amidohidrolaz Adsorpsiyonuna Başlangıç Penisilin Amido Hidrolaz Derişiminin Etkisi

Şekil 3.6’da başlangıç PA derişiminin adsorpsiyona etkisi verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, çözeltideki PA derişiminin artmasıyla, monolit tarafından birim kütle başına adsorplanan PA miktarı, 1.5 mg/ml’den düşük derişimlerde artmış, daha sonra dengeye ulaşmıştır. Bu, adsorpsiyon davranışında beklenen bir durumdur. Derişimin artması ile adsorpsiyon için sürücü kuvvet olan derişim farkı ( $\Delta C$ ) artmaktadır. Sürücü kuvvetin artması ile adsorpsiyon kapasitesinde de artış gözlenmektedir. Şekil 3.4’de görüleceği gibi adsorpsiyon kapasitesinde protein derişiminin 1.5 mg/ml’den daha büyük olduğu derişimlerde önemli bir artış gözlenmemiş, bir denge durumu oluşmuştur. Bu durum monolit yüzeyinde spesifik ligand-protein etkileşimlerinin dengeye geldiğini göstermektedir.

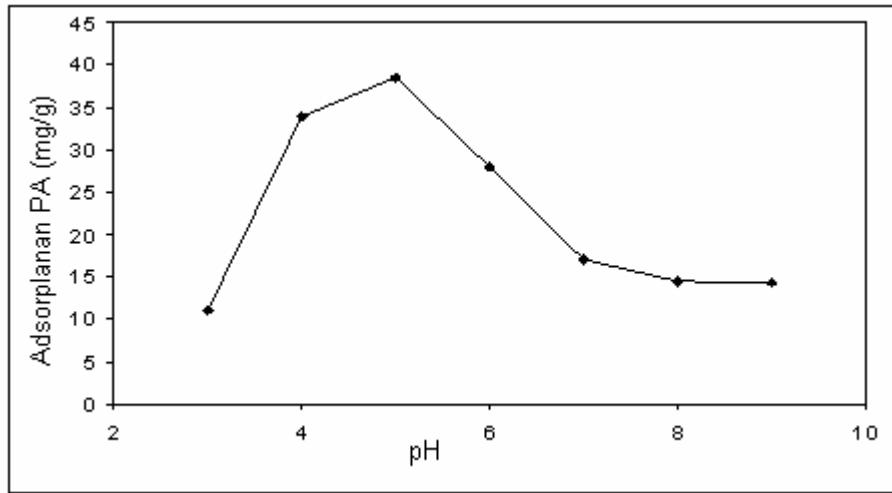


**Şekil 3.6.** Poli(EGDMA-MAAP) monolitine adsorplanan penisilin amidohidrolaz miktarının penisilin amidohidrolaz başlangıç derişimi ile değişimi  
pH:5.0; T:25 °C; Akış Hızı: 1ml/dk; Adsorpsiyon süresi: 2 sa

### 3.2.2. Penisilin Amidohidrolaz Adsorpsiyonuna pH Etkisi

Poli(EGDMA-MAAP) monolitine PA adsorpsiyonunun pH'a bağıllığını incelemek için çözelti pH'sı 3.0–9.0 aralığında değiştirilmiştir. Şekil 3.7'de PA adsorpsiyonuna pH'ın etkisi verilmiştir. Maksimum adsorpsiyon kapasitesi pH 5'te elde edilmiştir. pH 5'in üstünde ve altındaki değerlerde adsorpsiyon kapasitesi belirgin olarak azalmıştır. Penisilin amidohidrolaz'ın izoelektrik pH değeri 6.7–6.8 civarındadır. Fakat maksimum adsorpsiyona pH 5'te ulaşılmıştır. Bu durum poli(EGDMA-MAAP) monolitine penisilin amidohidrolaz bağlanmasında diğer etkileşimlerin yanı sıra büyük oranda hidrofobik etkileşimlerinde varlığını ortaya koymaktadır. Gerçekte bir proteinin izoelektrik noktasında net yükünün sıfır olması, proteinin yüklü gruplardan yoksun olduğu anlamına gelmemektedir. Aminoasit bileşimine bağlı olarak, bir protein izoelektrik pH (pI) noktasında çeşitli yüklü gruplara sahip olabilir. Bu yüzden proteinin bir afinite sistemiyle etkileşimi pI değerinde olmayabilir.

Penisilin amidohidrolaz'ın aminoasit bileşimi incelendiğinde triptofan, fenilalanin ve tirozin gibi enzimin hidrofobik gruplarla etkileşimini kolaylaştıracak elektron verici grupların olduğu görülmüştür.



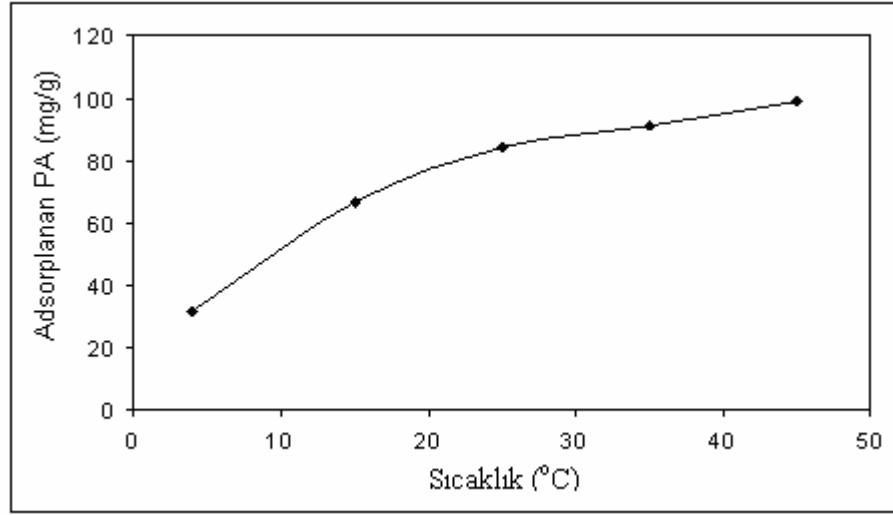
Şekil 3.7. Penisilin amidohidrolaz adsorpsiyonuna ortam pH'ının etkisi

PA derişimi: 1.0 mg/ml; T: 25°C; Akış Hızı: 1 ml/dk; Adsorpsiyon süresi: 2 sa



### 3.2.3. Penisilin Amidohidrolaz Adsorpsiyonuna Sıcaklık Etkisi

Şekil 3.8’de sıcaklığın penisilin amidohidrolaz adsorpsiyonuna etkisi verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi sıcaklığın artması ile adsorpsiyon kapasitesinde artış gözlenmiştir. Bu durum adsorpsiyon sırasında hidrofobik etkileşimlerin önemli ölçüde ön plana çıktığını göstermektedir. Bilindiği gibi hidrofobik etkileşim kromatografisinde sıcaklığın artması proteinin kolonda alıkonma zamanını arttırır ve düşük sıcaklıkta genellikle protein elüsyonu gerçekleşir.



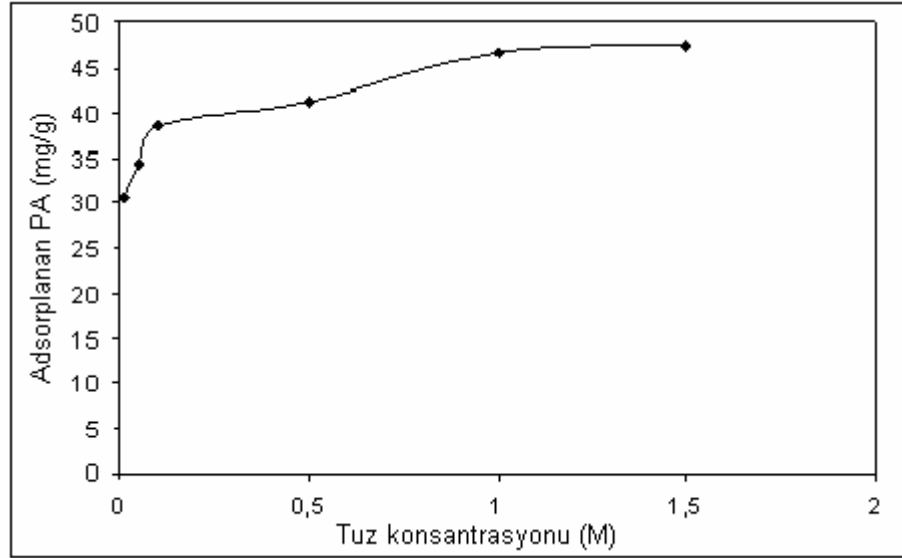
Şekil 3.8. Penisilin amidohidrolaz adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi

PA derişimi:1.0 mg/ml; pH:5.0; Akış Hızı: 1ml/dk; Adsorpsiyon süresi: 2 sa

### 3.2.4. Penisilin Amidohidrolaz Adsorpsiyonuna İyonik Şiddet Etkisi

Tuzların varlığında proteinlerin serbest enerjisi artar ve bu serbest enerji artışı protein moleküllerinin hidrofobik yüzey alanı ile orantılıdır. Hidrofobik grupların moleküller arası birleşmesi, polar çözücü ortamıyla proteinin hidrofobik temas alanının azalmasıyla serbest enerji artışını mümkün olduğunca azaltır. Bu nedenle, hidrofobik sabit faz sisteme girdiği zaman, proteinler sabit faza bağlanırlar. Çünkü tuz çözücü ortamıyla proteinin yüzey temas alanını mümkün olduğunca azaltır ve serbest enerjide minimum artış oluşturur. Bu nedenle, yüksek

tuz konsantrasyonlu ortamda proteine bağlanan formlar, bağlanmamış proteinlerden termodinamik olarak daha karardır. Bu, yüksek tuz konsantrasyonunda hidrofobik sabit faza proteinin bağlanmasını açıklamaktadır. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde denge tamponu ve örnek çözeltisinde yüksek tuz konsantrasyonunun kullanımı, ligand-protein etkileşimlerini ve sonuç olarak da protein alıkonmasını artırır. Şekil 3.9'da tuz derişiminin penisilin açılaz adsorpsiyon kapasitesine etkisi verilmiştir. Görüldüğü gibi tuz derişimi arttıkça penisilin açılaz adsorpsiyon kapasitesinde önemli derecede artma gözlenmiş, 1.0 M derişimden sonra denge durumu oluşmuştur.



**Şekil 3.9.** Penisilin amidohidrolaz adsorpsiyonuna iyonik şiddet etkisi

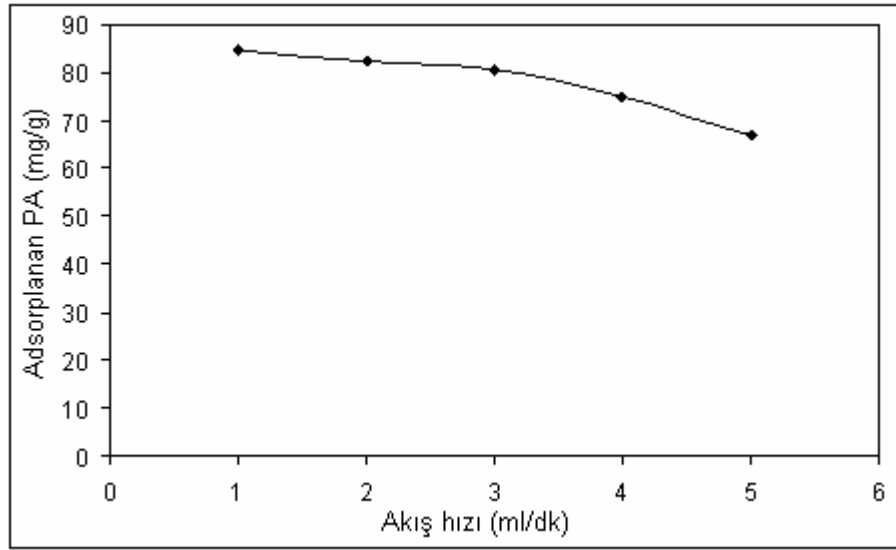
PA derişimi:1.0 mg/ml; pH:5.0; Akış Hızı: 1ml/dk; Adsorpsiyon süresi: 2 sa; T:25°C

### 3.2.5. Penisilin Açılaz Adsorpsiyonuna Akış Hızının Etkisi

Bu grup deneylerde, penisilin amidohidrolaz çözeltisinin hacimsel akış hızı 1.0–5.0 ml/dk arasında değiştirilmiş, diğer deneysel parametreler sabit tutulmuştur. Penisilin açılaz adsorpsiyon kapasitesinin akış hızı ile derişimi Şekil 3.10'da verilmiştir.

Şekilden de görüldüğü gibi akış hızının artması ile adsorplanan penisilin açılaz miktarı önemli ölçüde azalmaktadır. Çalışılan en düşük akış hızı değeri olan

1.0 ml/dk'da 84.48 mg/g adsorpsiyon kapasitesi gözlenirken akış hızının 5.0 ml/dk akış hızına yükselmesi ile adsorpsiyon kapasitesinin 66.68 mg/g değerine düştüğü gözlenmiştir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir; akış hızının artması ile enzim moleküllerinin kolondaki alıkonma zamanı azalır. Sonuçta penisilin açılaz moleküllerinin p(EGDMA-MAAP) monoliti ile etkileşim süreleri ve olasılıkları azalacağından adsorpsiyon kapasitesinde bir düşme gözlenir.



**Şekil 3.10.** Penisilin amidohidrolaz adsorpsiyonuna akış hızının etkisi  
PA derişimi: 1.0 mg/ml; pH: 5.0; T: 25°C

### 3.2.6. Langmuir Adsorpsiyon Modeli

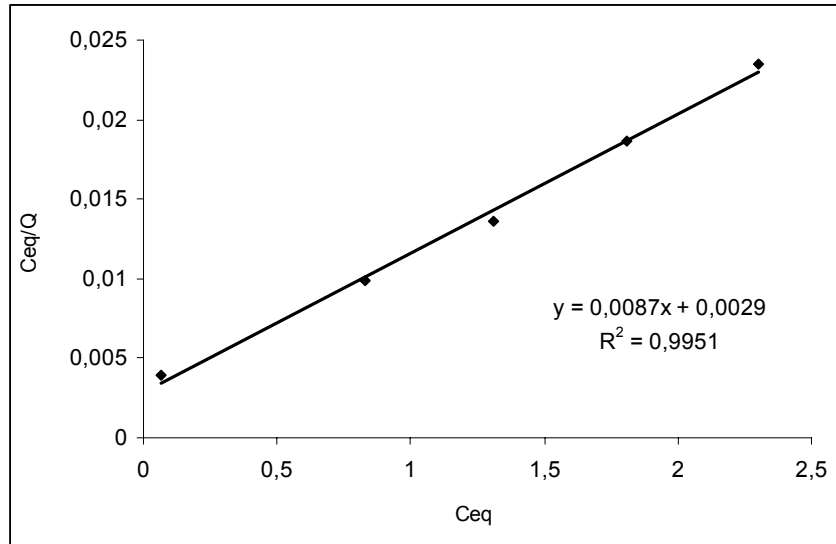
Adsorpsiyon izotermi her bir protein molekülünün matriksle etkileşimini karakterize etmek için kullanılır. Adsorpsiyon izotermi çözeltideki protein derişimi ile katı fazdaki adsoplanmış protein miktarı arasında, iki faz dengede olduğu zaman bir ilişki sağlar. Langmuir adsorpsiyon modeli, her biri yalnızca bir molekül tutabilecek yetenekte olan belli sayıda tanımlanmış bölgeye adsorpsiyon olduğunu varsayar. Bu bölgelerin enerji düzeyi bakımından da eşdeğer olduğu ve komşu bölgelerle adsorplanan moleküller arasında etkileşim olmadığı kabul edilir. Langmuir adsorpsiyon izotermi Eşitlik 3.1 ile tanımlanır. Denge verilerinin

eşitliğe uygulanmasıyla doğrusal bir grafik elde edilmesi, aşağıdaki eşitlikle tanımlanan Langmuir modelinin bu sistemlere uygulanabileceğini göstermektedir

$$C_{eq}/Q = 1/(Q_{max} \cdot b) + C_{eq}/Q_{max} \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte Q adsorbente bağlanan penisilin açılaz miktarı (mg/g),  $C_{eq}$  çözeltildeki denge penisilin amidohidrolaz derişimi (mg/ml), b Langmuir sabiti (ml/mg) ve  $Q_{max}$ , maksimum adsorpsiyon kapasitesini (mg/g) göstermektedir.

Şekil 3.11'de penisilin amidohidrolaz adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon modelinin grafiğı verilmiştir.

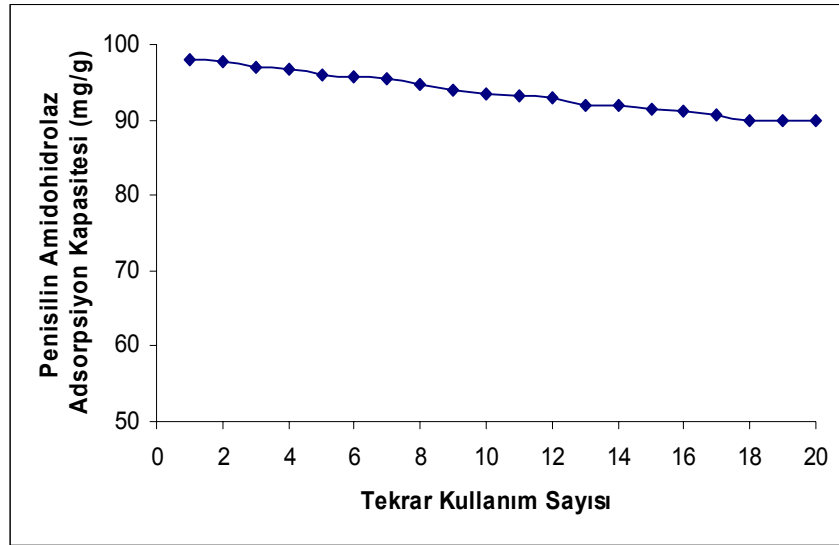


Şekil 3.11. Penisilin amidohidrolaz için langmuir adsorpsiyon izotermi

Adsorpsiyon izotermi, adsorpsiyon özelliklerini değerlendirmek amacıyla yapılan sürekli deneylerle belirlenmiştir. Bu sistemler göz önüne alındığında, poli(EGDMA-MAAP) monolitine penisilin amidohidrolaz adsorpsiyonu için Langmuir modelinin uygulanabilir olduğu gözlenmiştir. Deneysel veriler sonucunda, penisilin amidohidrolaz adsorpsiyonu için maksimum adsorpsiyon kapasitesi ( $Q_{max}$ ) 114.94 mg/g, korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) ise 0.999 gibi yüksek bir değer olarak bulunmuştur.

### 3.3. Geliştirilen Poli (EGDMA-MAAP) Monolit Desteğinin Penisilin Amido Hidrolaz Adsorpsiyonunda Tekrar Kullanılabilirliği

Bir afinite adsorbanında aranan önemli özelliklerden biri de, bu malzemenin ayırma işleminde defalarca kullanılabilmesidir. Rejenerasyon veya tekrar kullanılabilirlik olarak tanımlanan bu özellik sonucunda aynı adsorbent defalarca kullanılarak ayırma işleminin maliyeti önemli ölçüde azaltılır. Poli(EGDMA-MAAP) monolit desteğinin tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla aynı adsorbente 20 kez ardarda adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi uygulanmıştır (Şekil 3.12). Sterilizasyon amacıyla her adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi sonrası monolit distile su ve daha sonra dengeleme için sodyum fosfat tamponu (pH 5.0) ile yıkanmıştır. 20 kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon işlemleri sonrasında adsorpsiyon kapasitesinde kayda değer bir azalma gözlenmemiştir.



Şekil 3.12. Poli (EGDMA-MAAP) monolitinin tekrar kullanılabilirliği

PA derişimi: 1.0 mg/ml; pH:5.0; T:25°C

### 3.4. Poli (EGDMA-MAAP) Monolitine Ham Ekstraktan Penisilin Amido Hidrolaz Adsorpsiyonu

Ham ekstrakt ile gerçekleştirilen adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmalarında Amerika Birleşik Devletleri Tarımsal Araştırma Merkezi'nden temin edilen *Penicillium Chrysogenum* (NRRL 1951) ve topraktan izole edilen *Penicillium Purpurogenum* mikroorganizmaları kullanılmıştır.

Hazırlanan ham ekstraktlar peristaltik bir pompa yardımı ile kolon sistemine verilmiş, kolondan çıkan çözeltinin derişimi Bradford metoduyla (Bradford, 1976) spektrofotometrik olarak tayin edilerek poli(EGDMA-MAAP) monolitine adsorplanan enzim miktarı bulunmuştur.

Klasik penisilin amidohidrolaz saflaştırma teknikleri çöktürme, santrifüj ve adsorpsiyon gibi birbirini izleyen çok basamaklı işlemleri gerektirmektedir. Tez kapsamında sunulan bu çalışmada ise tek basamakta penisilin açılaz saflaştırması gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.1'de *Penicillium Chrysogenum* (NRRL 1951) ve *Penicillium Purpurogenum* mikroorganizmalarından penisilin amidohidrolaz saflaştırması çalışmalarında elde edilen sonuçlar verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** *Penicillium Chrysogenum* (NRRL 1951) ve *Penicillium Purpurogenum* mikroorganizmalarından penisilin amidohidrolaz saflaştırılması

Numune	Aktivite(IU/ml)	Protein(mg/ml)	Spesifik Aktv.(IU/mg)	Saflaştırma Faktörü	Desorpsiyon (%)
<i>Penicillium Chrysogenum</i> (NRRL 1951)					
Ham Ekstrakt	$7.02 \times 10^{-3}$	0.60	0.012	--	--
1 M NaOH ile Elüsyon	$1.09 \times 10^{-3}$	0.009	0.121	10.3	90
<i>Penicillium Purpurogenum</i>					
Ham Ekstrakt	$4.84 \times 10^{-3}$	0.78	0.0062	--	--
1 M NaOH ile Elüsyon	$1.5 \times 10^{-3}$	0.0068	0.220	35.5	89

Çizelge 3.1’de görüldüğü gibi *Penicillium Chrysogenum* (NRRL 1951) ile yapılan çalışmalarda 1.0 M NaOH ile % 90 desorpsiyon ve 10.3 oranında saflaştırma faktörü, *Penicillium Purpurogenum* ile yapılan çalışmalarda ise 1.0 M NaOH ile % 89 desorpsiyon ve 35.5 oranında saflaştırma faktörü değerlerine ulaşılmıştır.

Literatürde rapor edilen çalışmalarda Santarelli ve arkadaşları epoksi ile aktiflenmiş sepharose jel üzerine immobilize edilmiş pseudo-spesifik ligand 4-aminoantipirin, 2-amino-3-benzilokspiridin, 3-amino-5-fenil pirazol, 4-Hidroksibenzaldehit gibi ligandlar ile çalışmışlar ve % 85 desorpsiyon ile 1.5–2.2 arasında değişen oranlarda saflaştırma faktörü; % 100 desorpsiyon ile 1.9–5.7 arasında saflaştırma faktörü değerlerine ulaşmışlardır. Fitton ve Santarelli penisilin amidohidrolaz saflaştırılması için immobilize metal afinite kromatografisini kullanmışlar, %73 desorpsiyon ile 3.18 saflaştırma faktörü; %97 desorpsiyon ile 12.34 saflaştırma faktörü elde etmişlerdir. Marcos ve arkadaşları *Eschericia Coli*’den penisilin amidohidrolaz saflaştırmak amacıyla 2 fazlı poli (etilen glikol)-sodyum sitrat sistemi kullanmışlar ve 5.7 saflaştırma faktörü ile %85 desorpsiyon değerlerine ulaşmışlardır. Chetan ve Gaikar penisilin amidohidrolaz adsorpsiyonunda kitosan’ın N-benzamid ve N-fenilasetamid türevlerini kullanmışlar fakat çalışmalarında düşük elüsyon değerleri gözlemişlerdir. Tez kapsamında sunulan bu çalışmada elde edilen değerler literatür ile kıyaslanabilir düzeyde olup tek basamakta oldukça yüksek saflaştırma faktörlerine ulaşılmıştır.

#### 4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *Penicillium Chrysogenum* ve *Penicillium Purpurogenum*'dan penisilin amidohidrolaz saflaştırılması için yeni bir adsorbent ve yaklaşım geliştirilmiştir. Bu amaçla poli(EGDMA-MAAP) monolitik afinite adsorbenti hazırlanmış ve penisilin amidohidrolaz adsorpsiyon özellikleri incelenmiştir. Burada nonopioid analjezik özellik gösteren ve çok bilinen bir ilaç olan 4-aminoantipirin (Cunha ve ark. 2005) fonksiyonel ligand olarak kullanılmıştır. Mevcut çalışmalardan farklı olarak, 4-aminoantipirin metakroil klorür ile reaksiyona sokularak metakroil amidoantipirin (MAAP) monomeri elde edilmiştir. Elde edilen metakroil amidoantipirin (MAAP) monomeri EGDMA komonomeri eşliğinde yığın polimerizasyonu ile polimerleştirilerek monolitik afinite sorbenti hazırlanmasında kullanılmıştır.

Bu yaklaşımın en önemli avantajı penisilin amidohidrolazda da bulunan tirozin gibi aminoasitlerle  $\pi$ - $\pi$  yük transferi yoluyla etkileşebilen pseudospesifik MAAP'ın komonomer olarak yapıya ilave edilmesinden sonra matriks aktivasyonu ve ligand immobilizasyonu gibi basamaklara ihtiyaç duyulmamasıdır.

Biyoafinite adsorbentlerin hazırlanmasında hem zaman hem de teknik güçlükler (aktivasyon ajanının toksisitesi ve istenmeyen reaksiyonlar) açısından gerekli basamaklar olan aktivasyon ve ligand bağlanmasının bu yeni yaklaşımda olmaması yeni hazırlanan adsorbentin klasik taşıyıcılara önemli bir üstünlüğüdür. Hazırlanan pseudospesifik afinite adsorbentinin bir diğer önemli avantajı ise konvansiyonel biyoafinite ligandı içeren adsorbanlara göre daha ucuz ve kararlı bir yapıya sahip olması ve ilaç olarak da kendini kanıtlayan bir komonomer içermesidir.

Sentezlenen poli(EGDMA-MAAP) monoliti çapraz bağlı ve nispeten hidrofilik yapıda bir matrikstir. Bu çalışmada poli(EGDMA-MAAP) monolitinin tutma oranı % 56 olarak bulunmuştur. Poli(EGDMA-MAAP) monolitinin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Polimerik yapının iç kısmının incelenebilmesi için monolit kırılarak SEM fotoğrafı alınmıştır. Bu fotoğraftan görüleceği gibi (Şekil 3.1) yığın polimerizasyonu ile elde edilen polimerik yapı oldukça pürüzlü olup geniş



gözeneklere (taşınım kanalları), gözeneklilik nedeniyle de oldukça büyük yüzey alanına sahiptir. Ayrıca, bu mezoporlar difüzyon direncini azaltmakta ve yüksek iç yüzey alanı sayesinde enzim moleküllerinin kütle transferini de kolaylaştırarak adsorpsiyon kapasitesinin artmasına neden olmaktadır.

Üretilen monolitinin spesifik yüzey alanı Brunauer Emmett Teller (BET) yöntemi ile 112.4 m<sup>2</sup>/g olarak bulunmuştur.

Poli(EGDMA- MAAP) monolitinin MAAP içeriğinin belirlenmesi için elementel analiz yöntemi kullanılmıştır. Azot stokiyometrisi kullanılarak polimerik yapıya giren MAAP oranı 58.9 µmol/g polimer olarak bulunmuştur.

Poli(EGDMA-MAAP) monolitik afinite sorbentine sulu çözeltilerden penisilin amidohidrolaz adsorpsiyonu sürekli sistemde derişim, pH, sıcaklık, iyonik şiddet ve akış hızına bağı olarak çalışılmıştır. Monolitinin maksimum penisilin amidohidrolaz adsorpsiyon kapasitesi pH 5'te 98.0 mg/g polimer olarak bulunmuştur.

Poli(EGDMA-MAAP) monolitine *Penicillium Chrysogenum* (NRRL 1951) ve *Penicillium Purpurogenum* mikroorganizmalarından elde edilen ham ekstraktlardan penisilin amidohidrolaz adsorpsiyon çalışmaları sürekli sistemde gerçekleştirilmiş, desorpsiyon ajanı olarak 1 M NaOH kullanılmıştır. Klasik penisilin amidohidrolaz saflaştırma teknikleri çöktürme, santrifüj ve adsorpsiyon gibi birbirini izleyen çok basamaklı işlemleri gerektirmektedir. Tez kapsamında sunulan bu çalışmada ise tek basamakta penisilin amidohidrolaz saflaştırması gerçekleştirilmiştir. *Penicillium Chrysogenum* (NRRL 1951) ile yapılan çalışmalarda 1.0 M NaOH ile % 90 desorpsiyon ve 10.3 oranında saflaştırma faktörü, *Penicillium Purpurogenum* ile yapılan çalışmalarda ise 1.0 M NaOH ile % 89 desorpsiyon ve 35.5 oranında saflaştırma faktörü değerlerine ulaşılmıştır.

Gerek geliştirilen monolitik kolon açısından gerekse hiçbir şekilde sızma göstermeyen ligandlarla donatılan ve tekrar tekrar kullanılabilen bir afinite desteğı geliştirilmesi açılarından yapılan çalışma literatürde bir ilktir. Bu destek kullanılarak yapılan penisilin amidohidrolaz saflaştırma çalışmalarında mikroorganizmaların ürettiğı ekstraktlardan tek basamakta ve literatürdeki sonuçlarla yarışabilecek düzeyde saflaştırma değerlerine ulaşılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Arnold, F.H. (1991), "Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing", *Bio/Technology*, **9**, 150-155.
- Baumbach, G.A., Hammond, D.J. (1992), "Protein purification using affinity ligands deduced from peptide libraries", *Biopharm.*, **5**, 24-35.
- Bradford, M.M. (1976), "A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Braco, L. (1995), "Biocatalysis and biorecognition in nonaqueous media-some perspectives in analytical biochemistry", *Microchim. Acta*, **120**, 231-242.
- Bueno, S.M., Legallais, C., Haupt, K. ve Vijayalakshmi, M.A. (1996), "Experimental kinetic aspects of hollow fiber membrane-based pseudobioaffinity filtration : process for IgG separation from human plasma", *J.Membr.Sci.*, **117**, 45-56.
- Calleri, E., Temporini, C., Massolini, G. ve Caccialanza, G. (2004), "Penicillin G acylase based stationary phases: analytical applications", *J.Pha.Biomed.Anal.*, **35**, 243-258.
- Coulon, D., Cabanne, C., Fitton, V., Naubboni, A., Saint-Christophe, E. ve Santarelli, X. (2004), "Penicillin acylase purification with the aid of hydrophobic charge induction chromatography", *J.Chromatogr. B.*, **808**, 111-115.
- Cunha, S., Oliveira, S., Rodrigues, M., Bastos, R., Ferrari, J., Oliveira, C., Kato, L., Napolitano, H., Vencato, I. Ve Lariucci, C. (2005), "Structural studies of 4-aminoantipyrine derivatives", *J.Molec.Struc.*, **752**, 32-39.
- Denizli, A. ve Pişkin, E. (1995), "Heparin Immobilized Polyhydroxyethylmethacrylate microbeads for cholesterol removal: A Preliminary Report", *J. Chromatogr. B.*, **670**, 157-161.
- Davankov, V.A ve Semechkın, A.V. (1977), "Ligand-exchange chromatography", *J. Chromatogr. A*, **141**, 313-353.
- David, A.E. (2004), "Immobilization of enzymes on nanoporous silica composites", PhD Thesis, University of Maryland, A.B.D.

- Emir Diltemiz, S. (2002), *Poli-(2-Hidroksietilmetakrilat-co-metakroilamidohistidin) mikrokürelere Cu(II) şelasyonu ve sitokrom-c adsorpsiyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Fargues, C., Chanel, S. ve Grevillot, G. (1996), “An efficient three steps preparative purification of penicillin acylase from *Escherichia coli* cells”, *Bioseparation*, **6**, 343-351.
- Ferreira, J., Straathof, A., Franco, T. ve Wielen, L. (2004), “Activity and stability of immobilized penicillin amidase at low pH values”, *J.Mol.Catal.B:Enzym.*, **27**, 29-35.
- Fitton, V., Santarelli, X. (2001), “Evaluation of immobilized metal affinity chromatography for purification of penicillin acylase”, *J.Chromatogr. B.*, **754**, 135-140.
- Fonseca, L.P. ve Cabral, J.M.S. (1996), “Evaluation of affinity and pseudo-affinity adsorption processes for penicillin acylase purification”, *Bioseparation*, **6**, 293-302.
- Ghadge, V.B. (2000), “Synthetic polymer based affinity matrices: separation of Penicillin G acylase and penicillinase”, PhD Thesis, University of Pune, India.
- Guan, Y.H., Lilley, T.H. ve Brook, A.H. (2001), “Production of immobilised penicillin acylase using aqueous polymer systems for enzyme purification and in situ immobilization”, *Enzyme Microb.Technol.*, **28**, 218-224.
- Gupta, M.N. (1992), “Enzyme function in organic solvents”, *European J. Biochem*, **203**, 25-32.
- Huang, P.Y., Carbonell, R.G. (1999), “Affinity chromatographic screening of soluble combinatorial peptide libraries”, *Biotechnol.Bioeng.*, **63**, 633-641.
- Ikehata, K., Buchanan, I.D. (2004), “Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment”, *J.Envr.Engineering and Sci.*, **3**, 1-19.
- Iqbal, J. ve Saleemuddin, M. (1985), “Sucrose hydrolysis using invertase immobilized on concanavalin A-sepharose”, *Enzyme Microb.Technol.*, **7**, 175-178.

- Jianguo, L., Wei, C., Shuai, W. ve Fan, O. (2001), "Studies of poly(vinyl acetate-co-diviyl benzene) beads as a carrier for the immobilization of penicillin acylase and kinetics of immobilized penicillin acylase", *React.Funct.Polym.*, **48**, 75-84.
- Jing, H., Xiaofen, L., Evans, D.G., Duan, X. ve Chengyue, L. (2000), "A new support for the immobilization of penicillin acylase", *J.Mol.Catal.B:Enzym.*, **11**, 45-43.
- Josic, D., Buchacher, A. ve Jungbauer, A. (2001), "Monoliths as stationary phases for separation of proteins and polynucleotides and enzymatic conversion", *J. Chromatogr.B.*, **752**, 191-205.
- Kasche, V., Löffler, F., Scholzen, T., Kramer, D.M. ve Boller, T.J. (1990), "Rapid protein purification using phenylbutylamine-Eupergit: a novel method for large-scale procedures", *J. Chromatogr.*, **510**, 149-154.
- Kawashima, K. (1987), "*Methods in Enzymology*", (Ed: Mosbach, K.), Academic Press, Orlando, A.B.D., 146-153.
- Kazan, D., Erarslan, A. (1996), "Influence of polyhydric compounds on the pH stability of penicillin acylase obtained from a mutant of *Eschericia coli* ATTC 11105", *Process Biochem.*, **31**, 691-697.
- Keçili, R., Say, R. ve Yavuz, H. (2006), "Synthesis and characterization of pseudo-affinity ligand for penicillin acylase purification", *Int. J.Biol.Macromol.*, (In press)
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö. (2000), "Biyokimya", Aktif Yayınevi, Erzurum, 85-95.
- Kennedy, J.F., Cabral J.M. (1985), "*Immobilized Cells and Enzymes*", IRL Press, Oxford, U.K., 19-37.
- Kheirrolomoom, A., Khorasheh, F. ve Fazelinia, H. (2002), "Influence of external mass transfer limitation on apparent kinetic parameters of penicillin G acylase immobilized on nonporous ultrafine silica particles", *J.Biosci.Bioeng.*, **93**, 125-129.
- Krishna, S.H. (2002), "Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media", *Biotech. Adv.*, **20**, 239-267.

- Kutzbach, C. ve Rauenbusch, E. (1974), "Preparation and general properties of crystalline penicillin acylase from E.Coli", *Hoppe-Seyler's Z Physiol.Chem.*, **354**, 45-53.
- Largerloff E., Nathorst-Westfelt L., Ekstrom B. ve Sjoberg, B. (1976), "Production of 6-aminopenicillanic acid with immobilized *Eschericia coli* acylase", *Methods.Enzymol.*, **44**, 759-768.
- Mahajan, P.B., Borkar, P.B. (1984), "Novel approaches to purification of penicillin acylase", *Appl.Biochem.Biotechnol.*, **9**, 421-437.
- Matsui, J., Kato, T., Takeuchi, T., Suzuki, M., Yokohama, K., Tamiya, E. ve Karube, I.(1993), "Molecular recognition in continuous polymer rods prepared by a molecular imprinting technique", *Anal.Chem.*, **65** , 2223-2224.
- Novais, J.M. (1971), "Immobilization of amyloglucosidase on alkylamine derivatives of metal-link-activated inorganic supports", PhD Thesis, University of Birmingham, UK.
- Parmar, A., Kumar, H., Marwaha, S. ve Kennedy, J.F.( 2000), "Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA)", *Biotechnol.Adv.*, **18**, 289-301.
- Porath, J. (1988), "IMAC-immobilized metal ions affinity based chromatography, *Trends in Analytical Chemistry*, **7**, 254-259.
- Santarelli, X., Fitton, V., Verdoni, N. ve Cassagne, C.J. (2000), "Preparation, evaluation and application of new pseudo-affinity chromatographic supports for penicillin acylase purification", *J.Chromamatography B.*, **739**, 63-72.
- Sizentirmal, A. (1965), "Properties of penicillin acylase isolated from *Eschericia Coli*", *Acta.Microbiol.Acad.Sci.*, **12**, 395-406.
- Solomon, B., Hollander, Z., Koppel, R. ve Katchalski, K. (1987), "*Methods in enzymology*",(Ed:Mosbach, K.), Academic Press, Orlando, A.B.D., 160-170.
- Sudharan, V.K., Shewale, J.G. (1987), "Hydrophobic interaction chromatography of penicillin amidase", *Biotechnol.Lett.*,**9**, 519-526.
- Sulkowski, E. (1989), "The saga of proteins by IMAC" *Bioassays*, **10**, 170-175.
- Svec, F., Peters, E.C., Sykora, D., Yu, C. ve Echet J.M. (2000), " Monolithic stationary phases for capillary electrochromatography based on synthetic polymers: Design and Applications", *J.High Resol.Chromatogr.*, **23**, 3-18.

- Svedas, V., Guranda, D., Langen, L.V., Rantwijk, F. ve Sheldon, R. (1997), "Kinetic study of penicillin acylase from *Alcaligenes Faecalis*", *FEBS Letters*, **417**, 414-418.
- Takeuchi, T., Haginaka, J. (1999), "Seperation and sensing based on molecular recognition using molecularly imprinted polymers" , *J.Chromamatography B.*, **728**, 1-20.
- Telefoncu, A. (1993), "Biyoteknoloji", Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, 252-255.
- Telefoncu, A. (1997), "Enzimoloji", Lisansüstü Yaz Okulu, Kuşadası, 193-249.
- Tischer, W., Wedekind, F. (1999), "Immobilized enzymes-methods and applications", *Biocatalysis.*, **200**, 95-126.
- Tischer, W., Kasche, V. (1999), " Immobilized enzymes:crystal or carriers?", *Trends in biotech.*, **17**, 326-335.
- Uzun, L., Yavuz, H., Say, R., Ersöz, A. ve Denizli, A. (2004), " Poly(ethylene dimethacrylate-glycidylmethacrylate)monolith as a stationary phase in dye-affinity chromatography", *Ind. Eng. Chem. Res.*, **43** , 6507-6513.
- Uzun, L., Say, R. ve Denizli, A. (2005), "Porous poly(hydroxyethyl methacrylate) based monolith as a new adsorbent for affinity chromatography", *React.Funct.Polym.*, **64**, 93-102.
- Valerie, F., Verdoni, N., Sanchez, J. ve Santarelli, X. (2001), "Penicillin acylase purification with the aid of pseudo affinity chromatography", *J.Biochem. Biophys. Methods*, **49**, 553-560.
- Vandamme, E.J., Voets, J.P. (1974),"Microbial penicillin acylases", *Adv.Apply.Microbiol*, **17**, 311-369.
- Wulff, G. (1995), " Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates- A way towards artificial antibodies" , *Angew Chem.* , **34**, 1812-1832.
- Xie, S., Svec, F. ve Frechet, J.M. (1999), "Design of reactive porous polymer supports for high throughput bioreactors: Poly(2-vinyl-4,4-dimethylazlactone-co-acrylamide-co-ethylene dimethacrylate) monoliths", *Biotechnol.Bioeng.*, **62** , 30-35.