PENİSİLİN G AÇİLAZ SAFLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ DESTEK MATERYALİ

Bayram AKKUŞ

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Temmuz-2012

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Bayram Akkuş'un "**Penisilin G Açilaz Saflaştırılması İçin Yeni Destek Materyali"** başlıklı **Kimya** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi, 16.07.2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	**: Yard. Doç. Dr. SERPİL ÖZKARA YAVUZ**	**……**
Üye	**: Prof. Dr. ARZU ERSÖZ**	**……**
Üye	**: Yard. Doç. Dr. BORA GARİPCAN**	**……**

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

Enstitü Müdürü

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PENİSİLİN G AÇİLAZ SAFLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ DESTEK MATERYALİ

Bayram AKKUŞ

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Serpil ÖZKARA YAVUZ
2012, 88 sayfa

Penisilin G açilaz (EC 3.5.1.11), endüstriyel süreçlerde yarı sentetik penisilinlerin üretiminde kullanılmaktadır. Penisilin açilaz enziminin saflaştırılması, yarı sentetik penisilinlerin ve sefalosporinlerin üretimine imkân sağlar. Sunulan çalışmada, penisilin açilaz saflaştırılması için tekrar kullanılabilir makrogözenekli kriyojel biyoafinite kromatografi adsorbenti hazırlanmıştır. Kriyojeller makrogözeneklere sahiptir. Bu özellikler, kriyojellerin nano-mikro ölçek aralığında herhangi bir difüzyon sorunu olmaksızın kullanımına olanak sağlamaktadır. Çalışmada; ilk olarak, 4-aminoantipirin, metakroil klorür ile reaksiyona sokularak metakroil amidoantipirin (MAAP) monomeri sentezlenmiş ve elde edilen yapı FTIR ile karakterize edilmiştir. Daha sonra; MAAP ve 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) komonomerleri polimerleştirilerek poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel kolon sentezlenmiştir. Hazırlanan kriyojellerin spesifik yüzey alanı 25.8 m^2g^{-1}, şişme değeri % 1463.97 olarak bulunmuştur. Çalışmanın ikinci aşamasında ise MAAP içeren kriyojel kolonlara sulu çözeltilerden ve doğal kaynaklardan penisilin açilaz adsorpsiyonu incelenmiştir. Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojellerin maksimum adsorpsiyon kapasitesi 190.2 mgg^{-1} (pH 5.0 ve 2 saat) olarak bulunmuştur. Doğal kaynaklardan penisilin açilaz saflaştırılması hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) ile gerçekleştirilmiştir. *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951, *Penicillium crysogenum* 807 ve *Penicillium purpurogenum* 455 ham ekstraktlarından penisilin açilaz saflaştırma faktörü sırası ile 17.89, 54.9 ve 10.0 olarak bulunmuştur. Kriyojellerden penisilin açilaz desorpsiyonu, 1 M NaOH kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tekrarlanan 6 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonucunda kriyojellerin adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak; poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel, penisilin açilazın hızlı, ucuz ve spesifik saflaştırılması için uygun kullanım potansiyeline sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Penisilin Açilaz, Afinite Kromatografisi, Enzim Saflaştırması, Metakroil amidoantipirin (MAAP), Kriyojel.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

ABSTRACT

Master of Science Thesis

NEW SUPPORT MATERIAL FOR PENICILLIN G ACYLASE PURIFICATION

Bayram AKKUŞ

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Chemistry Program

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Serpil ÖZKARA YAVUZ
2012, 88 pages

Penicillin G acylase (EC 3.5.1.11) has been used in the production of semi-synthetic penicillins in industrial processes. Purification of penicillin acylase enzyme enables the production of semi-synthetic penicillins and cephalosporins. In the present study, bioaffinity chromatography adsorbent has prepared for the purification of penicillin acylase in the form of reusable cryogel which has macro pores. These characteristics have enabled cryogels to be used in nano-micro scale range without any diffusion problem. In this study, firstly, methacryloyl amidoantipyrine (MAAP) monomer has synthesized reacting 4-aminoantipyrine with methacryloyl chloride and the obtained structure has characterized by FTIR. Then, poly(HEMA-co-MAAP) cryogel column has synthesized by the polymerization of MAAP and 2-hydoxyethylmethacrylate (HEMA) comonomers. The specific surface area and swelling value of prepared cryogels have found to be 25.8 m^2g^{-1} and 1463.97 %, respectively. In the second stage of the study, the adsorption of penicillin acylase has investigated from aqueous solutions and natural sources on cryogel columns containing MAAP. The maximum adsorption capacity of poly(HEMA-co-MAAP) cryogels has calculated as 190.2 mgg^{-1} (pH 5.0 and 2h). The purification of Penicillin acylase from natural sources has achieved by fast protein liquid chromatography (FPLC). Penicillin acylase purification factor from the extract of *Penicillium chrysogenum NRRL 1951*, *Penicillium crysogenum 807* and *Penicillium purpurogenum 455* has found to be 17.89, 54.9 and 10.0, respectively. Desorption of penicillin acylase from cryogels has achieved by using 1 M NaOH. It has been determined that there was no significant decrease in adsorption capacity of cryogels after 6 adsorption-desorption cycles. As a result, poly(HEMA-co-MAAP) cryogels have a suitable utilization potential for fast, cheap and specific purification of penicillin acylase.

Keywords: Penicillin Acylase, Affinity Chromatography, Enzyme Purification, Methacrloyl amidoantipyrine (MAAP), Cryogel.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi, sevgi ve hoşgörüsüyle her zaman bana destek olan, bana yol gösteren Danışman Hocam sayın Yard. Doç. Dr. Serpil ÖZKARA YAVUZ'a ve fikirleriyle bana her zaman yol gösteren Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü sayın Prof. Dr. Rıdvan SAY'a,

Çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübeleriyle desteğini eksik etmeyen sayın Prof. Dr. Arzu ERSÖZ'e,

Deneysel çalışmalarım sırasında bana her türlü konuda yardımcı olan bilgi ve tecrübeleriyle daima destek olan Araş. Gör. Özlem BİÇEN ÜNLÜER'e,

Çalışmalarım boyunca yardım ve desteğiyle her zaman yanımda olan arkadaşım Ceylan HACIOĞLU'na,

Deneysel çalışmalarımda kullandığım *Penicillium chrysogenum 1951*, *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 her zaman destekleriyle bana katkı sunan Okan USLU, Gülnur DÖNMEZ, Ender KÖSE ve tüm Sentetik Reseptörler Araştırma Grubu (SYNREG) Üyelerine,

Ve maddi-manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, daima destek olan sevgili Aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Bayram AKKUŞ

Temmuz-2012

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xi**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **4**
2.1. Proteinler 4
2.1.1. Proteinlerin yapısındaki kovalent olmayan bağlar 7
2.1.1.1. Hidrojen bağları 7
2.1.1.2. Hidrofobik etkileşimler 7
2.1.1.3. Elektrostatik kuvvetler 8
2.1.1.4. Van der waals kuvvetleri 8
2.1.2. Proteinlerin denatürasyonu ve renatürasyonu 9
2.1.3. Proteinlerin sınıflandırılması 9
2.2. Enzimler 10
2.2.1. Enzimlerin genel özellikleri ve moleküler yapıları 11
2.2.2. Enzim aktiflik birimleri 14
2.2.3. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler 15
2.2.4. Enzimlerin sınıflandırılması 17
2.3. Penisilin G Açilaz Enzimi (PA) 18
2.3.1. PA'nın moleküler özellikleri 20
2.3.2. PA'nın sınıflandırılması ve mikrobiyal kaynakları 22
2.3.3. PA'nın biyoteknolojideki uygulama alanları 25
2.3.3.1. 6-APA ve yarı sentetik penisilinlerin üretimi 25

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

2.3.3.2. Peptiplerin sentezi 31
2.3.3.3. Rasemik karışımların ayrılması 32
2.4. Proteinlerin Saflaştırılması 33
2.4.1. Afinite kromatografisi 34
2.4.1.1. Destek (matriks) 35
2.4.1.2. Ligand 36
2.4.1.3. Uzatıcı kollar (spacer arms) 37
2.4.2. Afinite kromatografisi türleri 37
2.4.2.1. Pseudo-spesifik afinite kromatografisi 37
2.4.2.2. Metal şelat afinite kromatografisi 39
2.4.2.3. Kovalent afinite kromatografisi 41
2.4.2.4. Hidrofobik etkileşim kromatografisi 42
2.4.2.5. Yük transfer adsorpsiyon kromatografisi 43
2.4.2.6. Boya-ligand afinite kromatografisi 44
2.5. Biyoafinite Kromatografisinin Uygulama Alanları 44
2.5.1. Protein saflaştırma 44
2.5.2. Nükleik asit ayrıma 45
2.5.3. Hücre saflaştırma 45
2.6. PA Saflaştırmak için Yeni Bir Materyal; Kriyojel Kolonlar 46
2.6.1. Kriyojel 46
2.6.2. Karyotropik jelasyon işleminin temel karakteristik özellikleri 47
2.6.3. Jel ve kriyojel arasındaki farklılıklar 48
2.6.4. Kriyojel hazırlanması 50
2.6.5. Kriyojellerin uygulama alanları 53
2.6.6. Kriyojellerin karakterizasyonu 56
2.6.7. FPLC cihaz bileşenlerinin özellikleri 57

3. MATERYAL VE YÖNTEM **59**
3.1. Materyal 59
3.1.1. Kullanılan kimyasallar 59
3.1.2. Kullanılan cihazlar 59
3.2. Yöntem 59

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

3.2.1. Kriyojel kolonun hazırlanması 59
3.2.1.1. Metakroil amidoantiprin (MAAP) monomerinin sentezi.... 59
3.2.1.2. Poli(HEMA-co-MAAP) kolon materyalinin sentezi 60
3.2.2. Karakterizasyon çalışmaları 61
3.2.2.1. Yüzey morfolojisi 61
3.2.2.2. Yüzey alanı ölçümü 61
3.2.2.3. Şişme testi 61
3.2.2.4. FTIR analizi..... 62
3.2.3. Hücre kültürleri ve ham ekstraktların hazırlanması..... 62
3.2.3.1. Mikroorganizmalar 62
3.2.3.2. Inokulum (kültür) hazırlanması 62
3.2.3.3. Enzim üretimi 62
3.2.3.4. Ham ekstraktların hazırlanması 63
3.2.4. Adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları..... 63
3.2.4.1. Kriyojel kolona PA adsropsiyonu..... 63
3.2.4.2. Kriyojel kolondan PA desorpsiyonu 64
3.2.5. Enzim aktivitesi çalışmaları 64

4. BULGULAR **65**
4.1. Poli(HEMA-co-MAAP) Kriyojel Kolon Materyalinin Karakterizasyonu . 65
4.1.1. Yüzey morfolojisi 65
4.1.2. Yüzey alanı ölçümü 65
4.1.3. Şişme testi 66
4.1.4. FTIR analizi..... 66
4.2. Sulu Çözeltilerden PA Adsorpsiyonu..... 68
4.2.1. PA başlangıç derişimi etkisi 68
4.2.2. pH etkisi 69
4.2.3. İyonik şiddet etkisi..... 70
4.2.4. Akış hızı etkisi..... 71
4.3. Adsorpsiyon İzotermleri..... 71
4.4. Poli(HEMA-co-MAAP) Kriyojel Kolonunun PA Adsorpsiyonunda Tekrar Kullanılabilirliği..... 74

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

4.5. Poli(HEMA-co-MAAP) Kriyojel Kolonuna Ham Ekstrattan PA Adsorpsiyonu 75

5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER **79**

EK: Kalibrasyon Grafiği **82**

KAYNAKLAR **83**

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Amid (peptid) bağı genel gösterimi 5
2.2. Amid (peptid) bağının kısmen kazandığı çift bağ karakteri 5
2.3. Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılarının toplu gösterimi 6
2.4. Hidrojen bağı oluşumu 7
2.5. Hidrofobik etkileşimler 7
2.6. Elektrostatik kuvvetler sonucu oluşan etkileşimler 8
2.7. Van der waals kuvvetleri sonucu oluşan etkileşimler 8
2.8. Anahtar-Kilit modeli 13
2.9. Enzimatik reaksiyonun hızı üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi 16
2.10. Penisilin açilaz enziminin kodlandırılması 17
2.11. Penisilin G açilaz molekülü üzerinde penisilin açilaz ve beta-laktamaz kesim bölgeleri 20
2.12. Penisilin G substratının, penisilin G açilaz enzimi aracılığıyla, 6-APA ve PAA'ya hidrolizi 21
2.13. Karakteristik Ntn-katlanması ve aktif bölgedeki serin rezidüsünün yapısı .. 22
2.14. a) PA öncülünün ikincil yapısı, b) Olgun/aktif PA'nın ikincil yapısı 24
2.15. Penisilinin, 6-APA ve yarı sentetik penisilinlere enzimatik modifikasyonu 27
2.16. Bazı önemli β-laktam antibiyotiklerin penisilin açilazla katalize edilen sentezi 28
2.17. Penisilinin, 6-APA'ya kimyasal ve enzimatik deaçilasyonu 29
2.18. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi 34
2.19. İmmobilize bir metal iyonuna bağlı proteinin şematik gösterimi 40
2.20. Kriyojel oluşum süreci 48
2.21. Çeşitli şekillerde üretilen kriyojellerin optik fotoğrafı 49
2.22. Kriyojelin süngerimsi gözenek yapısının SEM görüntüsü 50
2.23. Farklı monomerlerden hazırlanan kriyojellerin SEM görüntüleri 52
2.24. Farklı kopolimerlerden hazırlanan kriyojellerin SEM görüntüleri 52
2.25. Kan hücrelerinin kromatografik olarak kriyojel kolondan geçirilmesi 53
2.26. Kitosan-jelatin kriyojeli 54

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

2.27. Kriyojel kolon ile Sepharose kolonun geri basınç özelliklerinin karşılaştırılması 55
3.1. Metakroil amidoantipirin (MAAP) monomerinin sentez reaksiyonu 60
4.1. Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojelin SEM görüntüsü 65
4.2. MAAP monomerinin FTIR spektrumu 67
4.3. Poli(HEMA) kriyojeline ait FTIR spektrumu 67
4.4. Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojeline ait FTIR spektrumu 68
4.5. Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel kolona ve poli (HEMA) kriyojel kolona adsorplanan penisilin açilaz miktarının penisilin açilaz başlangıç derişimi ile değişimi 69
4.6. Penisilin açilaz adsorpsiyonuna ortam pH'ının etkisi 70
4.7. Penisilin açilaz adsorpsiyonuna iyonik şiddet etkisi 71
4.8. Penisilin açilaz için Langmuir adsorpsiyon izotermi 72
4.9. Penisilin açilaz için Freundlich izotermi 73
4.10. Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel kolonunun tekrar kullanılabilirliği 75
4.11. Ticari penisilin açilazın sulu çözeltisine ait FPLC kromatogramı 76
4.12. Biyolojik numuneden elde edilen PA'a ait FPLC kromatogramı 76

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

ÇİZELGELER DİZİNİ

2.1. Yapılarına göre proteinlerin sınıflandırılması 10
2.2. Penisilin G açilazın mikrobiyal kaynakları 25
2.3. Afinite kromatografisinin kullanıldığı biyolojik sistemler 35
4.1. Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel kolonuna PA adsorpsiyonuna ilişkin Langmuir ve Freundlich izotermlerinin karşılaştırılması 74
4.2. FPLC'den elde edilen kromatografik ayırma verileri 77
4.3. *Penicillium chryosogenum* (NRRL 1951), *Penicillium chryosogenum* 807 ve *Penicillium purpurogenum* 455 mikroorganizmalarından penisilin açilaz saflaştırılması 78

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

PA	: Penisilin Açilaz
MAAP	: Metakroil amidoantipirin
HEMA	: 2-hidroksietil metakrilat
FT-IR	: Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
BET	: Gözenek boyutu analizörü
FPLC	: Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi
IMAK	: İmmobilize Metal İyon Afinite Kromatografisi
6-APA	: 6-Aminopenisillanik asit
7-ADCA	: 7-amino-3-deasetoksi sefalosporonik asit
PAA	: Fenil asetik asit
AEH	: α-amino asit ester hidrolazlar
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
NIPAB	: 6-Nitro–3-Fenilasetamidobenzoik asit
MBAAm	: N, N'- Metilen bisakrilamit
TEMED	: N,N,N',N' Tetrametiletilendiamin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
ES	: Enzim Sübstrat Kompleksi
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
IU	: Uluslararası enzim aktivite birimi
Q	: Adsorpsiyon kapasitesi
RPM	: Döndürme hızı

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

1. GİRİŞ

Modern biyoteknolojide karşılaşılan en önemli sorunlardan biri biyomoleküllerin (proteinler, enzimler, hormonlar, antibadiler, antijenler vb), bulundukları çok bileşenli ortamlardan (kan, vücut sıvıları, biyolojik ortamlar vb) seçici olarak kazanılması ve saflaştırılmasıdır. Bu moleküllerin elde edilmesinde tüm maliyetin % 50-80'ini ayırma ve saflaştırma işlemleri oluşturmaktadır (Denizli 2002).

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 bulundukları ortamdan yüksek saflıkta tek basamakta elde edilebilmektedir.

Ticari ve klinik önemi olan penisilin açilazlar (EC.3.5.1.11) endüstriyel proseslerde yarı sentetik penisilinlerin üretiminde kullanılan 6-aminopenisilanik asit üretiminde kullanılmaktadır. Bakteriyel hücre duvarı üzerindeki inhibitör etkileri, geniş antibakteriyel spektrumları ve düşük toksisiteye sahip olmaları nedeniyle penisilinler, dünyada en yaygın şekilde kullanılan β-laktam antibiyotikleridir (Parmar ve ark 2000). Bu antibiyotiklerin gereğinden fazla kullanımı dirençli patojenlerin gelişmesine yol açmaktadır. Günümüzde penisilin gibi antibiyotiklere karşı kazanılan bu direnç probleminin üzerinden gelen tek yöntem yarı sentetik penisilinlerin kullanımıdır. Yarı sentetik penisilinlerin üretimindeki kilit nokta, üretim proseslerinde genellikle penisilin açilaz enzimi kullanılması nedeniyle enzim saflaştırma basamağıdır. Penisilin açilaz'ın ticari ve klinik büyük öneme sahip olması enzim saflaştırma proseslerinin ticarileşmesine ve adsorbent geliştirme çalışmalarının artmasına yol açmıştır. Penisilin açilaz saflaştırmak amacıyla geleneksel olarak hidrofobik indüksiyon kromatografisi (Coulon 2004), immobilize metal afinite kromatografisi (İMAK) (Fitton 2001), ikili-faz sistemler (Marcos 1999) gibi yöntemler çalışılmıştır.

Bu çalışmada, penisilin açilaz saflaştırılması için tekrar tekrar kullanılabilir kriyojel formunda biyoafinite kromatografi adsorbentleri hazırlanmıştır. Son zamanlarda kriyojeller makro gözeneklere sahip olmaları,

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

FPLC sistemlerinde geri basınç problemini elimine etmeleri, ucuz ve dayanıklı olmaları nedeniyle saflaştırma çalışmalarında çok önemli kullanım alanı bulmaktadırlar.

Kriyojeller biyoteknolojideki kullanım potansiyeli nedeniyle polimerik hidrojellerin yeni bir türü olarak kabul edilmektedir. Yüksek fiziksel ve kimyasal kararlılık, kolay protein adsorpsiyonu ve desorpsiyonu, düşük üretim maliyeti ve tekrar kullanılabilirlik gibi genel avantajları yanında geniş gözenek boyutu, kısa difüzyon yolu ve küçük basınç düşmesi gibi ilave avantajlarıyla kriyojeller, protein saflaştırılması için oldukça iyi alternatiflerdir. Kriyojellerin osmatik, kimyasal ve mekanik kararlılığı yanında eşsiz yapısal özellikleri sayesinde, biyolojik nanopartiküllerin (plasmidler, virüsler, hücre organelleri) ve hatta tam hücrelerin (*E. coli*) kromatografik ayrılmasında kullanılması mümkündür (Doğan 2012).

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 düşünüldüğünde seçici ve kuvvetli bir etkileşim gerçekleşmektedir. Ayrıca bu ligandlar biyoligandlara göre daha kararlı olup yüksek miktarda ve düşük maliyette üretilebilmektedir (Özkara 2004).

Son zamanlarda penisilin açilaz saflaştırmak amacıyla sefaleksin ve sefahidroksin gibi spesifik ligandlar yerine daha ucuz olmaları ve çözünmemeleri nedeniyle pseudospesifik ligandlar kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında, 4-amino antipirin, metakriloil klorür ile reaksiyona sokularak pseudospesifik MAAP ligandı sentezlenmiştir. Sentezlenen bu ligand dayanıklı olması, kolay çözünmemesi, ucuz olması ve etkili bir elüsyona imkân vermesi gibi avantajlara sahiptir. Pseudospesifik ligand MAAP, polimerizasyon sırasında komonomer olarak kriyojel yapısına sokulduğundan ligand immobilizasyonuna ihtiyaç duyulmamıştır. Dolayısı ile immobilize ligandlarda görülen ligand sızması problemi ile karşılaşılmamıştır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Bu çalışmanın amacı; pseudospesifik poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel kolonları sentezleyerek sulu çözeltilerden ve ham ekstraktlardan penisilin açilaz saflaştırma etkinliklerinin incelenmesi ve ham ekstrakttan saflaştırılan penisilin açilazın aktivitesinin belirlenmesidir. Kullanılan ligandın penisilin açilazda bulunan tirozin gibi aminoasitlerle π-π yük transferi yoluyla etkileşerek (Keçili 2006) etkili bir saflaştırmaya neden olduğu gösterilmiştir. Sentezlenen saflaştırma adsorbentinin yüksek adsorpsiyon desorpsiyon sonuçlarıyla tek basamakta etkili saflaştırmaya imkân verdiği gösterilmiştir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Proteinler

Proteinler, bütün canlı varlıkların en önemli ve hücrelerinde en bol bulunan organik bileşiklerdir. Bütün biyolojik olaylarda önemli görevler üstlenmişlerdir. Bu fonksiyonlardan en önemlileri şöyle sıralanabilir:

Enzimatik katalizleme: Biyolojik sistemlerdeki kimyasal reaksiyonların hemen hemen tamamı enzimlerin olağanüstü katalizleme güçleri sayesinde yürür. Bugün 2000 civarında enzim tanımlanmış olup bazı katalitik RNA molekülleri hariç hepsinin protein yapısında olduğu ortaya konmuştur.

Taşıma ve depolama: Birçok küçük molekül ve iyon spesifik proteinler tarafından taşınmakta ve depolanmaktadır. Örneğin, oksijen kanda hemoglobinle taşınır, kaslarda ise miyoglobin sayesinde depolanır. Demir kan dolaşımında, transferrin proteini ile taşınırken, karaciğerde ferritin adlı başka bir proteinle kompleks oluşturarak depolanır.

Mekanik hareket: Proteinler, kasların en başta gelen bileşenidir. Kas kasılması iki çeşit lif yapısındaki proteinin kayma hareketleriyle ortaya çıkmaktadır.

Mekanik destek: Deri ve kemik dokularının gerilmeye dayanıklılığı fibröz bir bağ dokusu proteini olan kollagen tarafından sağlanmaktadır. Yine saç, kıl, tırnak ve pençe gibi destek ve koruyucu yapılar α-keratin grubu proteinlerden oluşur.

Koruma: Antikorlar, vücuttaki virüs, bakteri ve diğer organizma hücreleri gibi yabancı maddeleri tanıyan ve onlara bağlanarak dolaşımdan uzaklaştırılmalarını sağlayan çok spesifik proteinlerdir. Ayrıca, kanama anında pıhtılaşmayı sağlayan koagülasyon faktörlerinin tamamı protein yapısındadır.

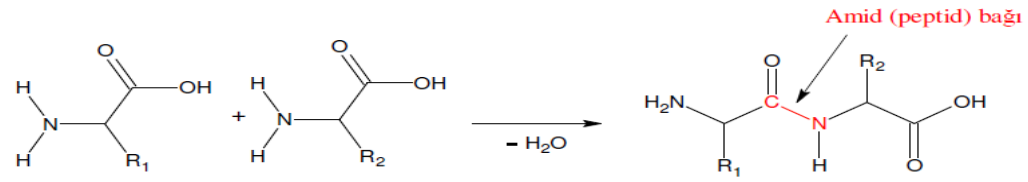
Sinir iletimi: Spesifik uyarılara karşı sinir hücrelerinin cevabı reseptör proteinler aracılığı ile olmaktadır. Mesela, rodopsin, retinal çubuk hücrelerinin fotoreseptör (ışık algılayıcı) proteinidir.

Hormonlar: Metabolizma olaylarının koordineli biçimde yürümesini sağlayan hormonların büyük bölümü protein yapısındadır. Bunun yanı sıra bütün hormonlar, hedef hücrelerinde protein yapısında olan reseptör moleküllere bağlanarak etkilerini gösterirler.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Proteinlerin % 50'si karbon, % 7'si hidrojen, % 23'ü oksijen, % 16'sı azot ve % 4'ü de kükürtten ibarettir ve bu maddeler proteinlerin yapı taşı olan amino asitleri oluştururlar. Bunların yanısıra fosfor, demir, iyod, bakır ve mangan gibi bazı elementlerde bir takım spesifik proteinlerde bulunabilirler (Keha ve ark. 2000).

Proteinler, amino asitlerin birbirine bağlanması sonucu oluşur. Bu bağlanma ise bir amino asidin α-karboksil grubu ile bir diğer amino asidin α-amino grubu arasında bir H_2O molekülünün açığa çıkmasıyla oluşan bir kovalent bağla gerçekleşir. Bu bağa peptid bağı adı verilir. Peptid bağı bir çeşit amid bağıdır. Yan grupları R_1 ve R_2 olan iki amino asit arasındaki peptid bağı oluşumu reaksiyonu şöyle gösterilebilir (Özcan 2007).

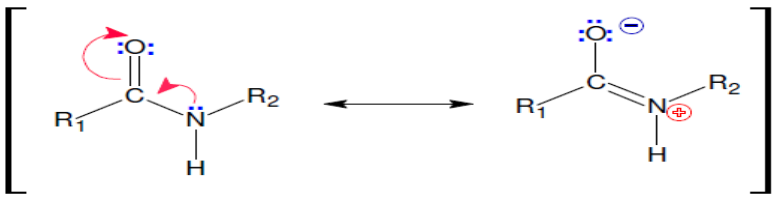


Amino asid$_1$ Amino asid$_2$

Şekil 2.1. Amid (peptid) bağı genel gösterimi

Peptid bağı rezonans hibridleri arasında oluşan denge nedeni ile kısmi çift bağ karakteri taşımaktadır ve herhangi bir kovalent tekli bağdan daha kuvvetlidir.

Her protein molekülünün doğal durumda iken sahip oldugu karakteristik üç boyutlu formuna konformasyonu denir. Proteinlerin konformasyonu, aminoasidlerin karşılıklı ilişkilerine göre dört farklı şekilde ifade edilir.

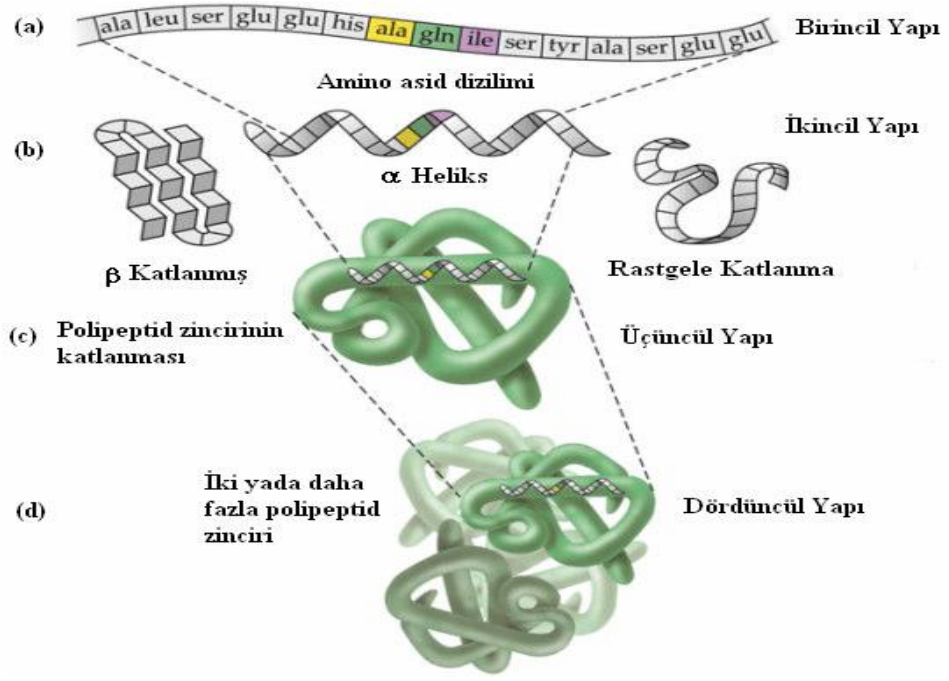


Şekil 2.2. Amid (peptid) bağının kısmen kazandığı çift bağ karakteri

Bunlar; Birincil (primer), ikincil (sekonder), üçüncül (tersiyer), dördüncül (quarterner) yapılarıdır (Bahçeci 2002). Peptid ve proteinlerin birincil yapıları,

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

birbirlerine peptid bağları ile bağlı aminoasidlerin oluşturduğu düz zincirden meydana gelmektedir. Sekonder yapı lineer dizilişte birbirine yakın amino asit yan zincirleri arasındaki etkileşmeler sonucu meydana gelir. Bu etkileşimlerin bazıları periyodik ve düzenli bir özelliktedir. Bir protein zincirinin bazı bölgelerinin maruz kaldığı bu yapılanmayı hidrojen bağları oluştururken, amino asitlerinin R gruplarından kaynaklanan etkileşmeler de bu yapının proteinin hangi bölgelerinde olacağını belirler (Keha ve ark. 2000). Hidrojen bağları; aynı polipeptid zinciri üzerinde gerçekleşir ise α **heliks**, farklı polipeptid zincirleri arasında meydana gelir ise β **katlanmış yapı** oluşur (Acar 2006). Tersiyer yapı, lineer dizilişte birbirinden uzak noktalardaki amino asitler arasındaki sterik etkileşmelerle ortaya çıkar. Bir protein zinciri içindeki kararlı katlanmalar sonucu, lineer dizilişte birbirlerinden uzakta olan amino asit yan zincirleri bir araya gelir ve proteinin aktif bölgesini de oluşturur. Tersiyer yapıda belli bir düzenlilik ve periyodik şekil göze çarpmaz. Disülfid bağı bu yapıyı daha kararlı hale getirir (Keha ve ark. 2000). Kuaterner yapıya ise, birden fazla polipeptid zincirine sahip oligomerik proteinlerde rastlanır. Polipeptid alt birimleri, sekonder ve tersiyer yapıları meydana getiren sterik etkileşmelerle oluşan bağlar vasıtasıyla bir arada tutulur (Keha ve ark. 2000).



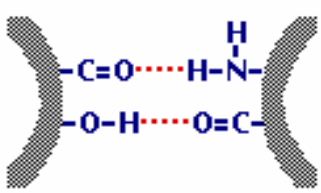
Şekil 2.3. Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılarının toplu gösterimi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

2.1.1. Proteinlerin yapısındaki kovalent olmayan bağlar

2.1.1.1. Hidrojen bağları

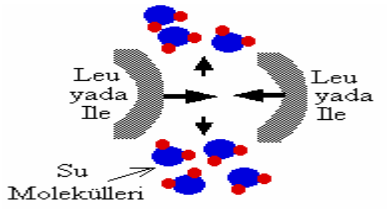
Polipeptidler ana zincirlerini oluşturan aminoasidlerin R gruplarında birçok proton alıcısı (acceptor) ve vericilerine (donor) sahiptir. Ayrıca proteinin bulunduğu sulu çözelti ortamında da oldukça fazla miktarda hidrojen bağı alıcı ve vericisi bulunmaktadır. Buna bağlı olarak hidrojen bağları hem polipeptid zincirlerinin kendi arasında hem de sulu çözelti ortamında bulunan elektron alıcı ve vericileri ile polipeptid zinciri arasında hidrojen bağları oluşmaktadır.



Şekil 2.4. Hidrojen bağı oluşumu

2.1.1.2. Hidrofobik etkileşimler

Proteinlerin yapısındaki amino asit yan zincirleri hidrofilik ya da hidrofobik özellikte olabilmektedir. Farklı R gruplarının sulu ortamdaki etkileşimleri, proteinin yapısında ve bağlanmasında oldukça önemli role sahiptirler. Globular proteinlerdeki kendiliğinden katlanma durumu; hidrofilik R grupları ile sulu ortam arasındaki Hidrojen bağı oluşturma gücü ile Hidrofobik R gruplarının sulu ortamdan itilmesi arasında oluşan dengenin yansımasıdır.

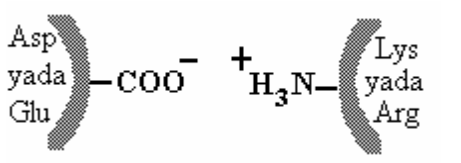


Şekil 2.5. Hidrofobik etkileşimler

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

2.1.1.3. Elektrostatik kuvvetler

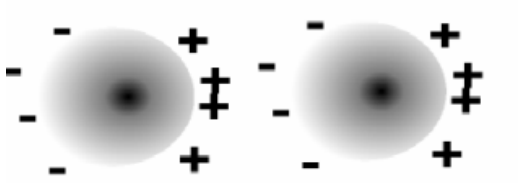
Elektrostatik kuvvetlerden oluşan etkileşimler; yüklü gruplar arasında ya da dipol momente sahip gruplar arasında meydana gelmektedir. Yüklü gruplar arasındaki etkileşim tipik olarak pozitif yüklü Aspartik asid ya da Glutamik asid ile Histidin, Lizin ya da Arginin arasında görülmektedir.



Şekil 2.6. Elektrostatik kuvvetler sonucu olusan etkilesimler

2.1.1.4. Van der waals kuvvetleri

Van der Waals kuvvetlerinin itme ve çekme kuvvetleri protein katlanmaları ve proteinlerin diğer moleküller ile etkileşimlerinde etkilidir. Van der Waals çekme kuvveti, yüksüz ve bağlanmamıs durumdaki yakın atomlar arasında oluşan yük yoğunluğundaki dalgalanma sonucu meydana gelen kısa süreli kısmi kutuplaşma ile oluşmaktadır. Van der Waals kuvveti çok zayıf olmasına karşın etkileşimin çok büyük protein moleküllerinde olmasından dolayı katlanmalarda ve diğer moleküller ile etkileşimlerde Van der Waals kuvvetlerinin önemi artmaktadır (Acar 2006).



Şekil 2.7. Van der Waals kuvvetleri sonucu oluşan etkileşimler

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

2.1.2. Proteinlerin denatürasyonu ve renatürasyonu

Proteinin üçüncül yapısı, çevrenin etkisi (sıcaklık, çeşitli ajanlar, yabancı yüzeyle temas vb.) ile tersinir veya tersinmez olarak değişebilir. Bu değişiklik "denatürasyon" olarak adlandırılır. Üçüncül yapıyı oluşturan bazı ikincil bağların kırılması sonucu tersinir değişimler gözlenir. Bu tür değişimde protein fonksiyonunu kaybeder fakat çevrenin etkisi ortadan kalkınca yeniden orijinal üç boyutlu yapıya döner (renatürasyon) ve fonksiyon göstermeye başlar. Çevrenin etkisi şiddetli ise polipeptit zinciri ikincil düzenini kaybederek katlanmamış duruma ulaşır. Örneğin yumurtanın pişirilmesinde albüminin denatürasyonu ile katı hale geçmesi tersinmezdir. Ancak, bazı proteinlerin (enzimlerin) bu durumdan renatürasyon ile orijinal hallerine dönebildikleri belirlenmiştir. İki veya daha fazla polipeptit zincirinin yine çok spesifik bir düzen içinde bir araya geldikleri durumlarda bu hal söz konusudur. Eğer protein dördüncül yapıya sahipse, denatürasyon sonucu protein alt birimleri birbirlerinden ayrılır ve kuaterner yapı bozulur. Denatürasyon eğer ılımlı koşullarda gerçekleşmiş ise renatürasyon ile fonksiyonlarını geri kazanabilir. Örneğin, hemoglobin tuz çözeltisi ile etkileştirilirse molekül iki ayrı alt birime ayrılır (denatürasyon). Diyaliz ile tuz ortamdan çekildiğinde ise iki alt birim bir araya gelir ve protein tekrar fonksiyonel hale gelir (renatürasyon) (Gözükara 2000).

2.1.3. Proteinlerin sınıflandırılması

Proteinler farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmalardan biri yapılarına göre sınıflandırmadır (Çizelge 2.1). Yapılarına göre proteinler iki grup altında incelenir:

1. Basit Proteinler: Yapıları yalnızca proteinlerden oluşmuştur.
2. Konjuge Proteinler: Başka moleküllerle kompleks yapmış proteinlerdir (Keha ve ark. 2000).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Çizelge 2.1. Yapılarına göre proteinlerin sınıflandırılması

Protein	Yapısal Bileşenleri ve Özellikleri	Örnek
Basit Proteinler		
Albuminler	Suda çözünür	Serum albumin
Globulinler	Suda çözünmez, HCl`de çözünür	Serum globulini
Konjuge Proteinler		
Nükleoproteinler	Nükleik asitlerle kompleks yapmış kromozomlar	Proteinler
Glikoproteinler	Karbohidratlarla kompleks yapmış proteinler	Mukopolisakkaritler
Lipoproteinler	Lipidlerle ester yapmış proteinler	Serum Lipoprotein
Fosfoproteinler	Fosfatlarla ester yapmış proteinler	Kazein
Kromoproteinler	Fe-porfirin ile kompleks yapmış proteinler	Sitokrom-c
Metalloproteinler	Fe, Cu ve Zn ile kompleks yapmış proteinler	Transferin Seruloplazmin

2.2. Enzimler

Enzimler doğanın katalizörleri olarak düşünülmektedir. Günümüzde birçok enzim biyolojik malzemelerin fermantasyonu ile üretilip farklı substrat özgüllüğü olan binlerce enzim bilinmektedir; fakat bunlardan çok azı saf halde elde edilip kristalize edilmiştir.

Enzimlerin sağladığı yararlar, substrat özgüllüğü, ılımlı reaksiyon koşulları ve düşük proses atığıdır. Bu, doğru enzimin seçilmesiyle hangi ürünlerin üretileceğini kontrol ederek ve istenmeyen yan reaksiyonları en aza indirerek mümkün olabilir. Mikroorganizma kaynaklı enzimler, uygulama alanları, yüksek verimlilikleri, genetik değişime gösterdikleri uyum ve mikroorganizmaların ucuz besi ortamlarında hızlı büyümesi gibi özelliklerinden dolayı bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlerden daha kullanışlıdır.

Dünyadaki mikroorganizmaların sadece yaklasık % 2'si enzim kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Bakteri türleri, yüksek aktivite sergilemeleri, nötür

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

veya alkali pH'larda üremeleri ve sıcaklığa dayanıklı olmaları nedeniyle daha çok tercih edilmektedir (Hasan ve ark. 2006).

Enzimler günlük yaşantımızda önemli rolü olan maddeler haline gelmiştir. Bugün enzimlerden; gıda, ilaç ve kimya endüstrisinde, dericilik, boya ve temizlik maddeleri üretimi gibi özel konularda, biyoloji ve biyoteknoloji bilim dallarında, tıp, tarım ve veterinerlik alanlarında yaygın olarak yararlanılmaktadır.

2.2.1. Enzimlerin genel özellikleri ve moleküler yapıları

Enzimler çok etkili ve spesifik katalizörlerdir. Enzimlerin, diğer kimyasal katalizörlere göre birçok üstünlükleri bulunmaktadır. Enzimlerin kimyasal katalizörlerden en önemli farkı spesifik olmalarıdır. Genel olarak enzimler belirli maddeler arasındaki belirli reaksiyonları katalize ederler. Biyokimyasal katalizörler, reaksiyon hızını 10^{20}'ye kadar artırırken, diğer katalizörler 10^{2}–10^{3}'e kadar arttırabilmektedir.

Enzimler yalnızca canlı hücreler tarafından sentezlenir. Bu enzimlerin bir kısmı hücre içinde kalır ve burada fonksiyon gösterir. Bu tip enzimlere ''intraselüler'' (hücre içi) enzimler denir. Bazı enzimler ise hücre içinde sentezlendikten sonra hücre dışına salınır ve burada fonksiyon gösterir. Bunlara da ''ekstraselüler'' (hücre dışı) enzimler denir.

Bazı enzimler benzer yapıda bir grup substrata etki ederken bazıları tek molekül türü üzerine etki eder.

Birbirine çok benzeyen maddeleri, hatta aynı maddenin stereoizomerlerini bile dönüşüme uğratmazlar. Bu yüksek seçicilik sayesinde en basit bir hücrede bile aynı anda binlerce biyokimyasal reaksiyon meydana gelmektedir.

Enzim tarafından değişikliğe uğratılan maddelere ''substrat'' denir. Substratlar enzimde ''aktif merkez'' denilen özel bir bölgeye bağlanırlar. Polipeptit zincirinin belirli kısımlarının özel katmanları ile oluşan bu aktif merkez, katalitik aktiviteden sorumludur.

Enzimlerin tümü protein yapısındadır. Enzimler yapısında protein dışında yabancı madde içerip içermemesine göre gruplandırılabilmektedir:

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

- Bazı enzimler yalnızca proteinden yani aminoasitlerden oluşmuşlardır. Bu tip enzimlerde protein yapı hem spesifiklikten hem de katalitik aktiviteden sorumludur. Örnek olarak; amilazlar, pepsin, tripsin, üreaz verilebilir.

- Bazı enzimlerin yapısında proteinin yanısıra organik veya inorganik maddeler yer almaktadır. Protein yapısında olmayan bu maddelere ‘‘kofaktör’’ adı verilmektedir.

- Kofaktörü ile birleşmiş ve aktif halde bulunan enzimlere ‘‘haloenzim’’ adı verilmektedir. Haloenzimin protein kısmına ise ‘‘apoenzim’’ denilir. Apoenzimlerin protein yapısındaki aminoasit türleri ve dizilişleri her enzimde farklılık göstermektedir. Bu nedenle enzimin özelliğini ve özgüllünü belirleyen kısım apoenzimdir. Apoenzimler tek başlarına aktivite gösteremezler, ancak koenzimle birlikteyken katalitik aktivite kazanırlar.

Kofaktörler; inorganik iyonlar ve koenzimler olarak gruplandırılabilirler.

Koenzimler; Bazı enzimler tek başlarına da aktivite gösterebilirken büyük bir çoğunluğunun aktivite gösterebilmesi için başka moleküllerle kompleks oluşturması gerekmektedir. Bu maddelere ‘‘koenzim’’denir. Koenzimler metal iyonları veya vitamin yapısında veya bu yapıya benzeyen organik moleküller olabilir. Koenzimler; reaksiyon sırasında enzimin aktif merkezine gevşek olarak bağlanırlar ve aktivite sonunda enzim molekülünden ayrılırlar. Örneğin; Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+), birçok yükseltgenme-indirgenme tepkimesinde yer alan bir koenzimdir.

Aşağıdaki tepkimeye göre koenzim kinetik olarak ikinci bir substrat gibi davranmakta ve indirgenerek reaksiyondan NADH şeklinde farklı bir ürün olarak ortaya çıkmaktadır.

Alkol dehidrogenaz

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \Longleftrightarrow CH_3CHO + NADH + H^+$$

Alkol Aldehit

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

İnorganik iyonlar ise; kofaktör olarak görev üstlenen katyonlar (Ca^{+2}, Mg^{+2}, Zn^{+2}, Fe^{+2}, Cu^{+2}, Co^{+2}, Ni^{+2}, Na^{+}, K^{+} vb.) ve anyonlar (Cl^{-}, Br^{-}, F^{-}, I^{-} vb.) dır.

Alman Kimyacı Emil Fischer 1894 yılında Anahtar-Kilit ve Enzim-Substrat ilişkisini ortaya koymuştur.

Enzimler genellikle sustratlardan daha büyük moleküllerdir. Enzim molekülü üzerindeki kofaktör ve koenzimlerin yer aldığı, enzim-substrat kompleksinin şekillendiği dar bir bölge aktif merkezi teşkil eder.

Enzim molekülü özel bir cep içerir; bu aktif bölge olarak tanımlanır. Aktif taraf substratı bağlayarak enzim-substrat kompleksi oluşturur. Enzim ürün yapısına çevrilir ve sonra üründen enzim ayrılır.

Bir enzimatik reaksiyon şu şekilde gerçekleşmektedir:

$$E + S \leftrightarrow S\,E \rightarrow E + P$$

Bu tepkimeye göre enzim substratı ile birleşerek bir ES kompleksi oluşturmakta, daha sonra da bu ES kompleksinden ürün oluşmakta, enzim ise reaksiyon ortamında tekrar serbest hale geçmektedir.

Şekil 2.8. Anahtar-Kilit modeli

Aktif merkezin bazı özelikleri

- Aktif merkez enzimin protein kısmında yer alır.
- Aktif merkez belirli çeşit, sayı ve dizilişte aminoasitlerden oluşmuştur.
- Substrat aktif merkeze H-bağları, Van-der Waals ve elektrostatik güçlerle çok zayıf olarak bağlamaktadır.
- Bazı enzimlerin birden fazla aktif merkezi olabilmektedir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

- Aktif merkez enzimin toplam hacminin çok küçük bir bölümünü oluşturmaktadır.

2.2.2. Enzim aktiflik birimleri

Enzimler, biyolojik ortamda çok az miktarda bulundukları için miktarlarının ölçümü çok zordur. Ancak aktiviteleri ölçülebilir.

Bir enzimin aktivitesini çeşitli yollardan ifade etmek olasıdır. Örneğin,1 mg enzim proteini tarafından birim zamanda meydana getirilen absorbans değişikliği bir birim olarak ifade edilebilir. Fakat dünya genelinde, elde edilen sonuçları karşılaştırabilmek için daha standart bir birim tanımlaması geliştirilmiştir. Bu uluslarası ünite (International Unit; IU) veya enzim ünitesi olarak ifade edilmektedir.

Enzim ünitesi: Optimum şartlarda, bir ünite enzim, bir dakikada 1μmol ürünün oluşumunu (veya 1μmol substratın dönüşümünü) katalizleyen enzim miktarıdır.

Spesifik aktivite: Bir enzimin aktivitesini tanımlamak için kullanılan diğer bir birim de spesifik aktivitedir. Bir enziminin spesifik aktivitesi, 1 miligram protein başına düşen enzim ünitesinin sayısıdır. Spesifik aktivite, enzim ünitesi/mg protein olarak hesaplanmaktadır.

Saf bir enzimin spesifik aktivitesi sabittir ve o enzime özgü bir değerdir. Spesifik aktiviteden yola çıkarak enzim ünitesini miligram olarak tanımlamak da mümkündür (Eşitlik 2.1).

$$\text{ünite/spesifik aktivite(ünite/mg)} = \text{miligram enzim} \qquad (2.1)$$

Spesifik aktivite kavramı özellikle bir enzimin saflığını kabaca tanımlamak için kullanılan bir ölçüttür. Örneğin, ham özütlerdeki yüksek protein derişiminin ancak küçük bir kısmını ilgilendiğimiz enzime ait protein oluşturmaktadır.

Bu nedenle ölçüm yapıldığında oldukça yüksek bir enzim ünitesi elde etmek olasıdır, fakat bu durumda enzimin spesifik aktivitesi düşük olacaktır. Enzimi saflaştırdıkça solüsyondaki enzim ünitesi sabit kalırken, protein derişimi düşeceği için spesifik aktivite yükselecektir. Enzim en yüksek saflığa eriştiğinde spesifik aktivite sabit bir değere ulaşacaktır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Katal: Enzim aktivitesi birimi olarak ünite terimi günümüzde yaygın olarak kullanılmakla beraber, Uluslararası Biyokimya Birliği, Enzim Alt Komisyonu tarafından önerilmiş bir birim de katal (Kat)'dır. Optimum şartlarda 1 katal, 1 saniyede 1 mol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır. Katal, tanımından da anlaşılacağı gibi, büyük ölçekli bir birimdir ve bu nedenle aktiviteleri tanımlamak için nanokatal ve pikokatal birimleri çok daha kullanışlıdır.

2.2.3. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler

Enzim aktivitesini ortamın pH'ı, sıcaklık, enzim derişimi, substrat derişimi, zaman, inhibitör, çeşitli iyonların derişimi ve özellikleri, ışık ve diğer fiziksel faktörlerin etkisi gibi etkenler etkiler.

Ortam pH'ı: Enzimler katalitik etki gösterirken ortamın hidrojen iyonu derişimine bağlı olarak aktiviteleri değişmektedir. Bazı enzimler düşük pH seviyelerinde (asit ortamda) daha aktif olmakla beraber, bazıları ise yüksek pH'lı ortamlarda (bazik ortamda) aktiftirler. Fakat çoğunlukla enzim aktivitesi nötral ortamlarda en fazla olmaktadır.

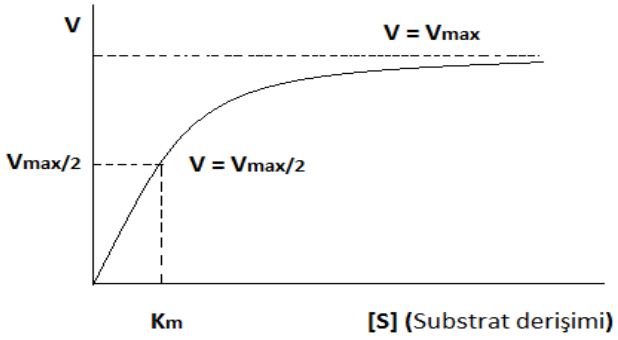
Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'a o enzimin optimum pH'ı adı verilir. Enzimatik çalışmalarda pH'ı optimumda sabit tutmak veya en azından hidrojen iyonu derişimini elverişli durumda tutmak için tamponlar kullanılır. Optimum pH, kullanılan tamponun cinsine, özel substratın yapısına ve enzimin elde edildiği kaynağa bağlıdır.

Sıcaklık: Sıcaklık enzimatik reaksiyonları da diğer reaksiyonlarda olduğu gibi hızlandırır. Her 10℃ sıcaklık artmasına karşılık enzimatik reaksiyonun hızı 2 kat kadar artmaktadır. Ancak enzimler protein yapılı olduklarından belli bir sıcaklığın üzerinde dayanıklılığını yitirerek denatüre olurlar. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık adı verilir.

Enzim derişimi: Enzimatik reaksiyonun hızı, enzimin substratına doygun olduğu koşullarda enzim derişimine bağlı olarak artmaktadır. Ortamdaki enzim molekülü ne kadar çoksa reaksiyon o kadar hızlı yürür. Enzimin hücrede lokalize olduğu yerde yeterince substrat bulunmadığı için reaksiyon o derece yüksek düzeyde meydana gelmez. Substratın bol olduğu koşullarda enzim derişimi reaksiyon hızı ile doğru orantılıdır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Substrat derişimi: Substrat derişimi reaksiyon hızını belli bir süre lineer olarak artırmaktadır. Enzim substratına karşı doygunluğa ulaştığında reaksiyon hızı değişmeden devam eder (Şekil 2.9). Bu durumda enzim maksimum hız ile çalışıyor demektir. Maksimum hız Vmax ile gösterilir. Enzim maksimum hız ile çalışırken enzim moleküllerinin yarısına bağlı substrat derişimine Michaelis-Menten sabiti (Km) denilmektedir. Enzimin substratına ilgisi ne kadar fazla ise Km değeri o kadar küçüktür.



Şekil 2.9. Enzimatik reaksiyonun hızı üzerine substrat derişiminin etkisi

Zamanın etkisi: Bir enzim reaksiyonun hızı belirli bir zamanda üretilen ürünün miktarı ile belirlenmektedir. Bir enzim tarafından katalize edilen bir reaksiyon sürerken reaksiyonun hızı giderek düşer. Bunun nedeni reaksiyon devam ederken oluşan ürünlerin aralarında birleşerek aksi yönde bir reaksiyon oluşturmaları, enzimin zamanla inaktive olması, reaksiyonu önleyen maddelerin teşekkül etmesi ve substratın tükenmesi gibi faktörlerdir. Bu faktörlerin etkilerinin ortadan kaldırılması için enzim çalışmaları çoğunlukla substratın yaklaşık % 10'unun sarfedildiği reaksiyonun başlangıç aşamasında gerçekleştirilir.

İnhibitör: İnhibitörler, enzimatik tepkimelerin hızını azaltan maddelerdir. İnhibitörler, substratın enzimin aktif merkezine bağlanıp, enzim-substrat kompleksinin oluşumunu önlerler (Öztan 2007).

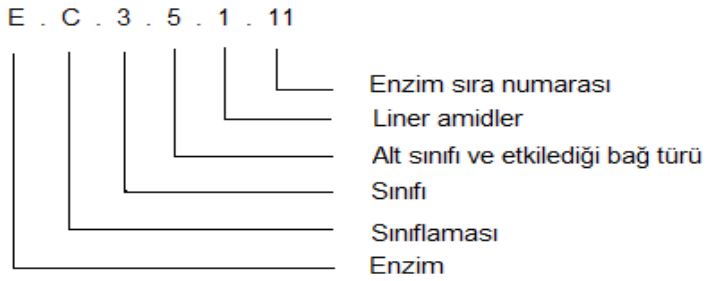
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

2.2.4. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler kullanıldıkları substratın veya katalizledikleri reaksiyon tipine göre adlandırılmaktadır. Enzimin etkilediği substrat ve reaksiyon tipi –az eki getirilerek adlandırılmıştır. Ancak son zamanlarda bu şekilde adlandırılmaları önemini kaybetmiştir. Yeni keşfedilen ve sayıları günden güne artan enzimler Uluslar arası Biyokimya Birliği tarafından yeni bir adlandırılmaya ve sınıflandırılmaya tabi tutulmuştur. Buna göre enzim sınıfları aşağıdaki gibidir.

1- Oksidoredüktazlar
2- Transferazlar
3- Hidrolazlar
4- Liyazlar
5- İzomerazlar
6- Ligazlar (Sentetazlar)

Yeni sınıflamada enzimlere 4 numara verilmektedir. İlk numara enzimin altı sınıftan hangisine ait olduğunu, ikinci numara etki ettiği kimyasal yapıyı veya fonksiyonel grubu, üçüncü numara akseptörü, dördüncü numara ise belli bir sınıfta enzimin aldığı sıra numarasını göstermektedir. Şekil 2.10'da penisilin açilaz (PA) enziminin kodlandırılması gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Penisilin açilaz enziminin kodlandırılması

Oksidoredüktazlar: Redoks reaksiyonlarını katalizler. Bu sınıf enzimlerin substratları genellikle elektron ve hidrojen vericidir. Dehidrojenazlar ve

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

redüktazlar bu gruptandır. Oksijen, elektron veya hidrojen alıcısı ise bu durumda oksidazlar olarak isimlendirilirler. Alkol– dehidrojenaz, redüktaz, tirosinaz bu grubun örnekleridir.

Transferazlar: Verici üzerindeki bir fonksiyonel grubun alıcı substrat molekülüne taşınmasını katalizleyen enzimlerdir. Amino-transferazlar, CoA-transferazlar bu grubun örnekleridir.

Hidrolazlar: Ester, glikozid, peptid, C-N, C-C, C-X, P-N, asit anhidrit bağların hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Lipazlar, fosfatazlar, penisilin açilazlar bu grubun örnekleridir.

Liyazlar: Çift bağ oluşumunu ve çift bağa katılma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Dekarboksilazlar, aldolazlar, dehidratazlar bu grubun örnekleridir.

İzomerazlar: Molekülün geometrik veya yapısal çevrilmesini katalizleyen enzimlerdir. Aminoasit rasemazlar, glukozfosfat-izomerazlar, yağ asidi cis-trans izomerazlar, fosfogluktomutazlar bu grubun örnekleridir.

Ligazlar: ATP'nin AMP ve PPi'ye parçalanmasından açığa çıkan enerjiden yaralanarak iki molekülü birbirine bağlayan enzimlerdir. Aminoasitleri aktive eden enzimler, açilCoA – sentetazlar bu grubun örnekleridir. (Whitaker 1994, Wong-Dominic 1995)

2.3. Penisilin G Açilaz Enzimi (PA)

β-laktam antibiyotiklerde bulunan β-laktam çekirdeği ile bir karboksil grubu arasındaki amit bağını kesebilen ilk enzim 1950'lerde tanımlanmıştır. Penisilin G açilaz olarak adlandırılan bu enzimin, on yıl sonra, ters reaksiyon (kondensasyon) yoluyla β-laktam antibiyotiklerini sentezleyebileceği belirlenmiştir. Geçen süreçte, çeşitli prokaryotlarda benzer aktivite gösteren ve farklı substrat özgüllüğüne sahip birçok enzim bulunmuştur (Polderman-Tijmes, 2004)

Penisilin açilaz ilaç endüstrisi için oldukça önemlidir (Jaiprakash ve ark.1997**)**. Penisilin G açilaz (EC 3.5.1.11) endüstriyel süreçlerde yarı sentetik penisilinlerden olan, 6-aminopenisilanik asit (6-APA) ve 7-amino-3-deasetoksi sefalosporanik asit (7-ADCA) üretiminde kullanılmaktadır. 6-APA ve 7-ADCA

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

alkalin pH (7.5-8.5) değerlerinde üretilirken yarı sentetik penisilinler asidik veya nötral pH (4.0-7.0) değerlerinde üretilir. Penisilin G açilaz değişik metotlarla; bira mayası, bakteri ve küf mikroorganizmaları kullanılarak üretilmekle birlikte çoğunlukla *Escherichia coli* bakterisinden üretilmektedir. Rekombinant *E.coli* kullanmak penisilin üretiminde karşılaşılan glukoz, fruktoz, laktoz ve diğer karbon kaynaklarının katabolik baskılaması gibi değişik problemleri elimine eder (Kheirolomoom 2001). İlk olarak *Penicillum chrysogenum Q176*'dan izole edilen penisilin açilazlar, çesitli Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler, aktinomiset, filamentöz fungi ve mayaların da dahil olduğu birçok mikroorganizma tarafından üretilmektedir. 1950'lerde keşfedilişlerinden bu yana, çok büyük miktarlarda üretilen penisilin açilazlar, ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Vandamme ve Voets 1974).

Ticari ve klinik büyük önemi olan Penisilin açilazların saflaştırılabilir olması yarı sentetik penisilinlerin ve sefelosporin üretimi için kullanılan proseslerin ticarileşmesine imkan vermiştir. Bu teknolojlerdeki anahtar nokta, β-laktam amid bağını kırmadan muhafaza ederek yan zincirdeki amid bağını seçici olarak hidroliz eden penisilin açilazın bulunabilmesidir. Yarı sentetik penisilinler cephalosporinler 2000 yılında 45000 tonu aşan ve dünya çapında giderek artan antibiyotik üretiminin % 65'ine karşılık gelmektedir (Kasche ve ark.1990). Penisilin açilazın adlandırma terminolojisi substrat spesifitesine dayanır. Penisilin açilazın keşfinden 40 yıl geçmesine rağmen 6-APA üretim teknolojisi rekabet gücünden dolayı değerini büyük oranda korumaktadır. 6-APA üretiminde başarılı olmak için penisilin açilaz ve penisilin üretimindeki gelişmeler birlikte düşünülmek zorundadır. PenG/PGA kombinasyonunun üretimi ve uzun tarihi bugün onu PenV/PVA ikilisinden üstün yapar (Jaiprakash ve ark. 1997).

Escherichia coli, Kluyvera citrophila, *Providencia rettgeri* ve *Alcaligenes faecalis* gibi gram-negatif bakterilerin PA'ı periplazma çevresinde birikir. Bakteride PA'ın rolü henüz net olmamasına rağmen, bakteri serbest yaşama modunda iken karbon kaynağı olarak kullanılabilen fenil asetik asit (PAA)'nın jenerasyonu için PA'ın zorunlu olduğu önerilmiştir. *E.coli* içinde PA'ı kodlayan genin 4-hidroksifenil asetik asit'in bozunma yolunu kodlayan bir gen dizisinin

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

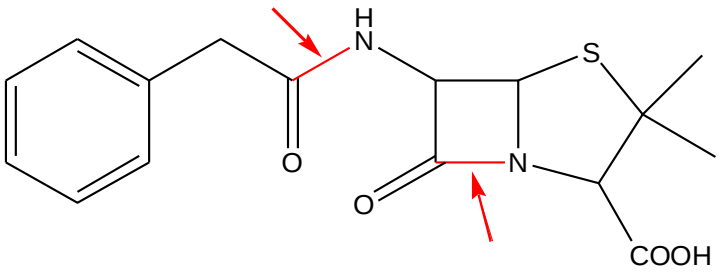
yanına yerleşmiş olduğu bilinmektedir. Bundan dolayı PA'ın bozunma yolunda reaktant olan fenil asetilat bileşiğinin sağlanmasında zorunlu olduğu düşünülmektedir (Rajendhran ve Gunasekaran 2004).

2.3.1. PA'nın moleküler özellikleri

Heterodimerik bir protein olan E. coli penisilin açilazı 209 amino asitlik α-alt birimi ve 557 amino asitlik β- alt biriminden oluşur. Aktif bölge bu iki alt birimin rezidülerinin birbirine geçerek oluşturdukları konik bir çukurun dibine yerleşmiştir. E. coli olgun PA'sı 86 kDa büyüklüğünde olup, periplazmik alana yerlesmiştir (Mclanahan 2003).

Bu enzim, penisilin G'nin β-laktam çekirdeğinin birincil amino grubu ile fenilasetik asidin (PAA) yan zincirinin karboksil grubu arasındaki amit bağını hidrolize eder. Aynı şekilde, sefalosporin açilazlar da sefalosporinlerin β-laktam çekirdeği ile alifatik yan zincirleri arasındaki amit bağını hidrolize ederler (Sio ve Quax 2004).

Penisilin G açilaz kesim bölgesi

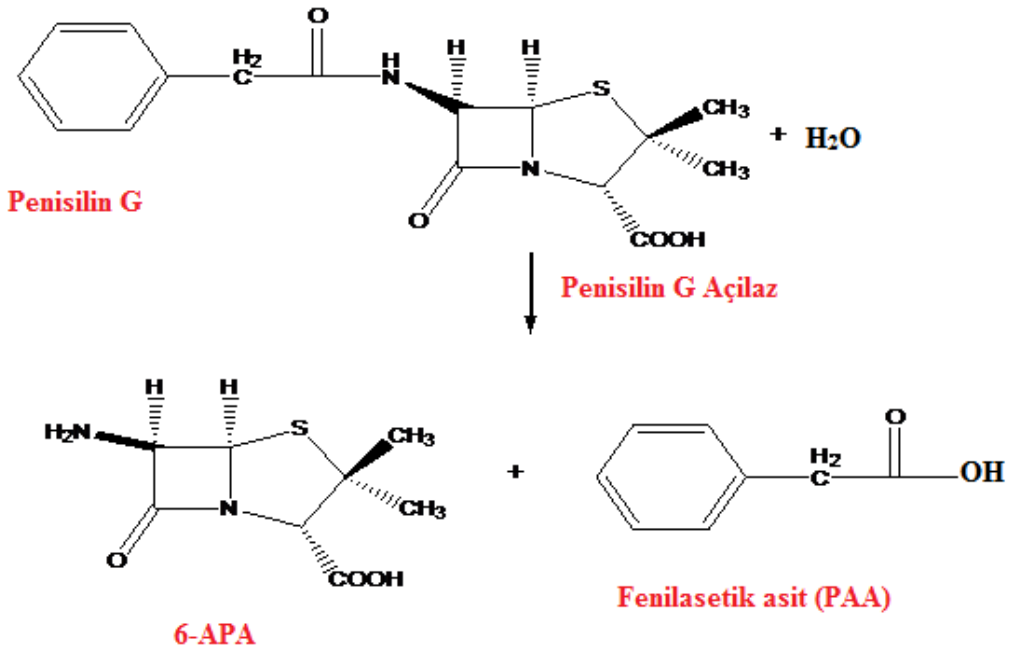


beta - laktamaz kesim bölgesi

Şekil 2.11. Penisilin G açilaz molekülü üzerinde penisilin açilaz ve beta-laktamaz kesim bölgeleri

Penisilin açilazın katalize ettiği hidroliz reaksiyonunun ürünü 6-APA ve PAA dır (Şekil 2.12). 6-APA bütün doğal penisilinlerin yapısında bulunan çekirdeği oluşturur. Hidroliz reaksiyonu sonucu oluşan bu çekirdek endüstriyel süreçte, yarı sentetik penisilinlerin başlangıç bileşiğidir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



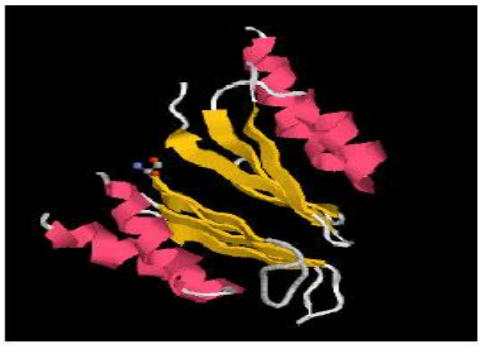
Şekil 2.12. Penisilin G substratının, penisilin G açilaz enzimi aracılığıyla, 6-APA ve PAA'ya hidrolizi (McLanahan 2003)

Penisilin açilaz amit ya da ester bağlarının karbonil karbonlarına nükleofilik atak gerçekleştirmesi yönünden serin proteazlara benzemekle birlikte, katalitik merkezinde, serin proteazlarda bulunan katalitik üçlü yerine, tek bir amino asitin yer almasıyla farklılık gösterir. Bu amino asit, β alt biriminin N-ucunda bulunan Serin β1 rezidüsüdür. Bu özelliği nedeniyle penisilin açilaz, "N-ucu nükleofil hidrolazlar" (Ntn-hidrolazlar) üst ailesine dâhil edilir (Giordano ve ark. 2006; Arroyo ve ark. 2000)

Hidrolitik enzimlerin yeni bir yapısal üst sınıfını oluşturan Ntn hidrolazlar, otokatalitik olarak aktive edilmiş enzimi oluşturmak üzere, translasyon sonrası işlemlere uğrarlar. Ntn-hidrolazlar, aktif bölge etrafında ortak bir katlanma şeklini paylaşan ve N-ucunda katalitik bir serin, sistein ya da treonin rezidüsünü içeren enzimleri kapsar. Bu N-ucundaki rezidü bir nükleofil ve katalitik baz olarak işlev görür. Bu nükleofilin reaktifliği, hemen yakınında bulunan amino asit rezidülerinden etkilenir. Enzimlerin bu üst ailesinin üyeleri yalnızca benzer bir oluşum sürecini değil aynı zamanda benzer bir üçüncül yapıyı da paylaşırlar. Ntn-hidrolazların karakteristik katlanması, dört tabakalı katalitik olarak aktif αββα

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

çekirdeğinden oluşur. Bu çekirdek yapısı birbirinin karsısına paketlenmis iki antiparalel β tabakası ve bunların her birinin antiparalel α heliks tabakalarıyla örtülmesinden oluşur. Bu ailenin bilinen üyeleri; penisilin G açilaz, penisilin V açilaz, II. Sınıf glutamin amidotransferazlar, proteozom β alt birimi ve glikozilasparajinazdır. Sefalosporin açilazların da bu Ntn-hidrolaz süper ailesinin bir üyesi olduğu düşünülmektedir (Oinonen ve Rouvinen 2000; Oh ve ark. 2004).



Şekil 2.13. Karakteristik Ntn-katlanması ve aktif bölgedeki serin rezidüsünün yapısı (McLanahan 2003)

PA, Ntn-hidrolazlarda tanımlandığı şekilde, *E. coli* sitoplazmasında tek zincirli bir öncül molekül olarak sentezlenir. Bu öncül 26 amino asitlik bir sinyal dizi ile 54 amino asitlik bağlayıcı bir peptit içerir. Sinyal dizi, preproenzimi periplazmaya yönlendirir. α ve β zincirleri arasındaki ara peptit ise aktif bölgeyi bloke eder. Ara peptitin, aynı zamanda, proteinin son katlanmasını etkilediği de düşünülmektedir. Sinyal peptit ve ara peptitin otokatalitik olarak uzaklaştırılması sonucunda *E. coli* periplazmasında enzimin olgun/aktif şekli oluşur (Mclanahan 2003; Mcvey ve Walsh 2001).

2.3.2. PA'nın sınıflandırılması ve mikrobiyal kaynakları

PA'lar; penisilin amidaz, penisilin açilaz, penisilin amidohidrolaz, penisilin açiltransferaz, penisilin deaçilaz ve penamidaz gibi farklı isimlerle adlandırılırlar. Penisilin açilaz (E.C.3.5.1.11) penisilin açilazlara Enzim Komisyonu tarafından verilen resmi ad olmakla birlikte, resmi olmayan isimleri,

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

“penisilin açilaz ve penisilin amidaz”, yaygın olarak kullanılmaktadır (Parmar ve ark. 2000).

Penisilin açilazlar substrat tercihlerine göre sınıflandırılırlar.

I. sınıf penisilin açilazlar (Penisilin V açilazlar); fenoksimetil penisilin (penisilin V)’i hidrolize ederler.

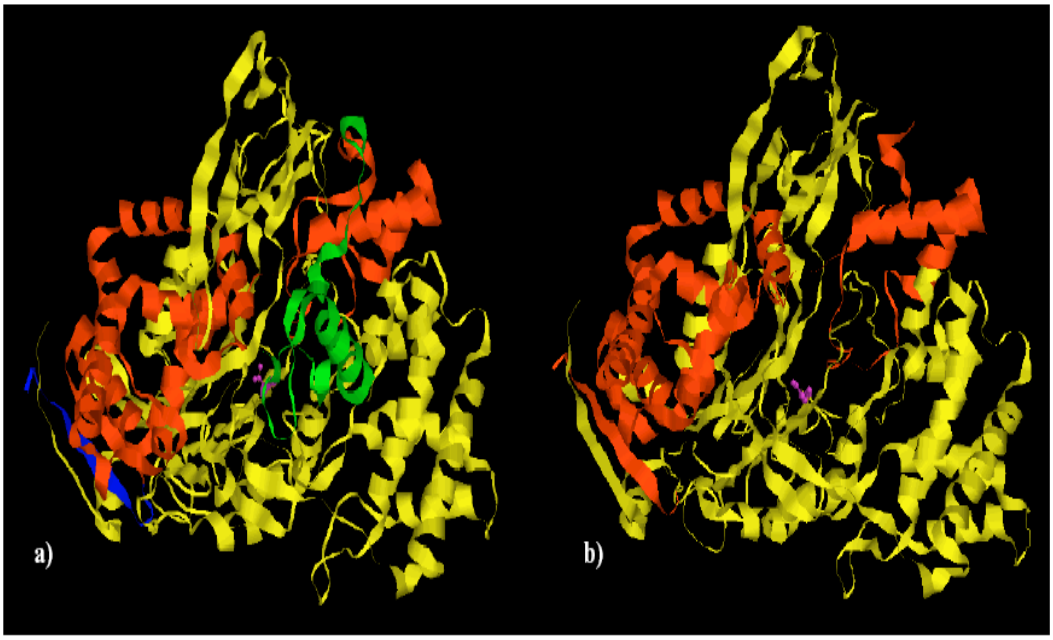
II. sınıf penisilin açilazlar (Penisilin G açilazlar); benzil penisilin (penisilin G)’i hidrolize ederler.

III. sınıf penisilin açilazlar (Ampisilin açilazlar); ampisiline karsı etkilidirler. Günümüzde, ampisilin açilazlar, α-amino asit ester hidrolazlar (AEH’ler, EC 3.1.1.43) olarak sınıflandırılmaktadır (Skrob ve ark. 2003).

Penisilin G açilazlar; seçici olarak fenilasetil yan zincirine sahip penisilinleri (penisilin G) hidrolize ederler ve geniş bir substrat özgüllüğüne sahiptirler. Penisilin G açilazlar; *Alcaligenes faecalis, Arthrobacter viscosus, Bacillus megaterium, Escherichia coli, Kluyvera citrophila ve Providencia rettgeri* gibi birçok bakteride bulunur. β-laktam açilazların en çok bilinen ve endüstride yaygın olarak kullanılan üyesi *E. coli ATCC 11105* penisilin açilazıdır.

24 ve 64 kDa ağırlığında iki farklı alt birimden (heteromer) oluşan E. coli penisilin açilazı periplazmik bir proteindir (Skrob ve ark. 2003).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 2.14. a) PA öncülünün ikincil yapısı. Sinyal dizi mavi, ara/baglayıcı peptit yesil (aktif bölgeyi bloke etmis), α ve β alt birimlerini olusturacak amino asit dizileri sırasıyla kırmızı ve sarı renkler ile gösterilmistir. b) Olgun/aktif PA'nın ikincil yapısı. α zinciri: kırmızı. β zinciri: sarı. Aktif bölge rezidüsü Ser β1 ise her iki sekilde de mor renk ile gösterilmistir (McLanahan 2003)

Penisilin V açilazlar; seçici olarak penisilin V'yi hidrolize eder ve *Achromobacter sp. NCIB 9424, Actinoplanes sp., B. megaterium, B. sphaericus, Cryptococcus sp., Erwinia aroideae, Fusarium sp., Micrococcus ureae, Penicillium chrysogenum, Pleurotus ostreatus, Pseudomonas acidovorans, Rhodotorula glutinis ve Streptomyces lavendulae* gibi bakteri, maya ve mantarlar da dahil birçok mikroorganizmada bulunur.Bu tip açilazların moleküler ağırlığı 83.2 kDa'dan (*Fusarium sp. SKF 235*), 140 kDa'a (*Bacillus sphaericus*) kadar değişmekte olup *Fusarium sp. SKF 235* penisilin açilazı monomer iken, *Bacillus sphaericus* açilazı tetramerdir. Optimum pH değerleri 5.6 ile 8.5 arasında değişir. Penisilin V açilazlar birçok mikroorganizmada hücre içi enzim olarak üretilir (Polderman ve Tijmes 2004).

Ampisilin açilazlar; α-amino asit ester hidrolazlar (AEH); yalnızca ampisilin ve sefaleksin gibi açil grubunun α-karbon atomunda serbest bir amino grubu içeren β-laktam antibiyotikleri hidrolize edebilir. AEH'ler; *Pseudomonas*

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

*elanogenum IFO 12020, Acetobacter turbidans ATCC 9325 ve Xanthomonas citri IFO 3835'*de bulunur (Skrob ve ark. 2003).

Penisilin açilaz; *Escherichia coli, Kluyvera citrophila, Alcaligenes faecalis, Providencia rettger*i gibi Gram negatif bakterilerde periplazmik alanda birikirken, *Arthrobacter viscous, Bacillus megaterium* gibi Gram pozitif bakterilerde hücre dışına salgılanmaktadır. Bununla birlikte, bir *Bacillus sp*. soyunda hücre içi penisilin açilazın varlığı da rapor edilmiştir (Rajendhran ve Gunasekaran 2004).

Çizelge 2.2. Penisilin G açilazın mikrobiyal kaynakları (Rajendhran ve Gunasekaran 2004)

Organizma	**Enzim yerlesimi**	**Protein alt birimleri**	
		α (kDa)	**β (kDa)**
Escherichia coli	periplazmik alan	23.8	63.4
Kluyvera citrophila	periplazmik alan	23.6	61.7
Providencia rettgeri	periplazmik alan	23.7	62.2
Alcaligenes faecalis	periplazmik alan	23	62.7
Arthrobacter viscous	hücre dısı	24.3	61.4
Bacillus megaterium	hücre dısı	24.2	61.4
Bacillus sp.	hücre içi	belirlenmedi	

2.3.3. PA'nın biyoteknolojideki uygulama alanları

Çeşitli farmasötik ürünlerin sentezinde enzimatik dönüşümlerden uzunca bir zamandır yararlanılmakta, mikrobiyal dönüşümler özellikle steroid ve antibiyotiklerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.3.3.1. 6-APA ve yarı sentetik penisilinlerin üretimi

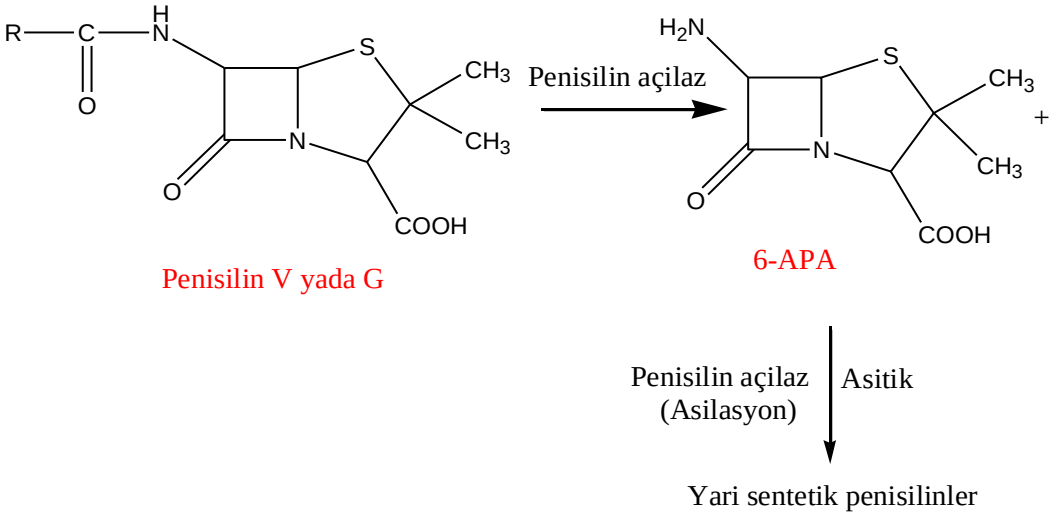
Bakteriyel hücre duvarı sentezi üzerindeki üstün inhibitör etkileri, geniş antibakteriyel spektrumları ve düşük toksisiteye sahip olmaları nedeniyle penisilinler, dünyada en yaygın şekilde kullanılan β-laktam antibiyotikleridir Parmar ve ark 2000). Bu antibiyotiklerin gereğinden fazla kullanımı dirençli patojenlerin gelişimine yol açmaktadır. Birçok mikroorganizmanın sahip olduğu

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

doğal direnç mekanizmaları ya da mutasyon yoluyla kazanılan dayanıklılık nedeniyle penisilinler etkisiz kalabilmektedir. Öte yandan penisilin G midede kararlı değildir ve bu nedenle iğne yoluyla verilmesi gerekmektedir. Günümüzde, penisilin gibi antibiyotiklere karsı kazanılan bu direnç probleminin üstesinden gelen tek yöntem; yeni yarı sentetik penisilinlerin kullanımıdır. Yarı sentetik penisilinler, penisilin V ve penisilin G'ye göre; kararlılık, daha kolay emilim, daha az yan etki, azaltılmış toksisite, patojenler karsısında mükemmel seçicilik, geniş antimikrobiyal etki ve iyileştirilmiş farmakolojik özelliklere sahip olacak şekilde geliştirilebilir (Arroyo ve ark. 2000; Parmar ve ark. 2000). Günümüzde antibiyotik pazarında % 65'lik satışları ile dünyanın en önemli biyoteknoloji ürünlerini oluşturan penisilinler; Penisilin G ve V, *Penicillium* soylarından fermentatif olarak her yıl 33.000 ton civarında üretilmekte ve bunun 10.000 tonu yarı sentetik β-laktam antibiyotiklerinin üretilmesinde başlangıç maddesi olarak kullanılmaktadır (Elander 2003). Yarı sentetik β-laktam antibiyotiklerinin üretimi iki aşamada gerçekleşmektedir; fermentatif olarak üretilmiş β-laktam antibiyotiklerinin (Penisilin G ve V) hidrolizi ve hidroliz ürünlerinden biri olan β-laktam çekirdeğinin (6-APA ya da 7-ADCA) yeni bir yan zincirle birleştirilmesi.

Yarı sentetik penisilinlerin üretiminde katalizör olarak kullanılan penisilin G açilazın verimli bir şekilde üretilebilmesi için sıklıkla rekombinant *E. coli* soyları kullanılırken, penisilin V açilazın yüksek verimde üretilmesi için rekombinant *Fusarium oxysporum* kullanılmaktadır (Elander 2003).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

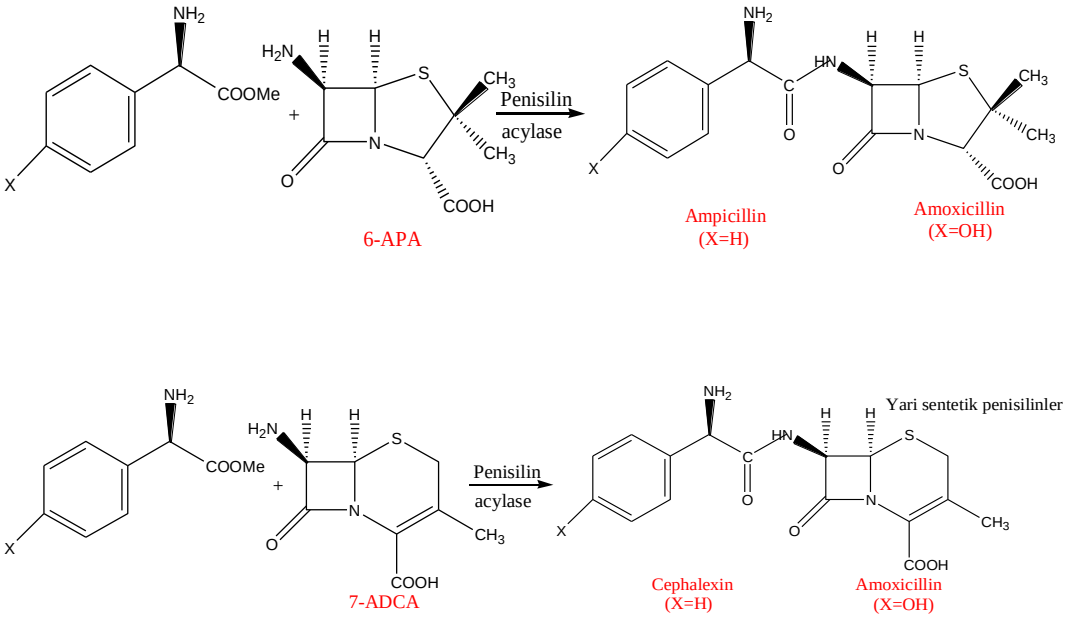


Şekil 2.15. Penisilinin, 6-APA ve yarı sentetik penisilinlere enzimatik modifikasyonu (Parmar ve ark. 2000)

Penisilin açilazın da dahil olduğu β-laktam açilaz enzimleri; geleneksel olarak, β-laktam bileşikleri penisilin G ve glutaril-7-aminosefalosporanik asitin (glutaril-7-ACA), sırasıyla, 6-APA ve 7- ACA'ya deaçilasyonunu gerçekleştirirler. Reaksiyon sonucunda oluşan bu β-laktam halkası ise yarı sentetik β-laktam antibiyotiklerinin üretiminde öncül molekül olarak kullanılırlar. Bu öncül moleküle uygun yan zincirlerin eklenmesiyle yarı sentetik penisilinler oluşturulur.

Yarı sentetik penisilinlerin üretimi asidik veya nötral pH değerlerinde gerçekleşirken, 6-APA ve 7-ADCA, alkalin pH (7.5-8.5) değerlerinde üretilir. Penisilin açilazlar maya, bakteri ya da aktinomisette üretilmekle birlikte, endüstriyel süreçlerde kullanılan penisilin açilazların çoğu *Escherichia coli*'den üretilir. Rekombinant *E. coli* soylarının (örneğin; ATCC 31052, 11105, 21285 ve 14595 kökenli) kullanımı penisilin açilaz üretiminde karşılaşılan bazı problemleri (şeker ya da diğer karbon kaynaklarıyla katabolit represyon gibi) ortadan kaldırır. Çoğu endüstriyel süreçte; kısmen saflaştırılmış enzim, farklı desteklere bağlanan tüm hücre ya da enzimin immobilize edilmiş şekilleri kullanılır. Hücrenin bütününün immobilize edilmiş halde biyokatalizör olarak kullanılması, üretimin daha düşük maliyette olması nedeniyle daha çok ilgi uyandırır (Kheirolomoom ve ark. 2001).

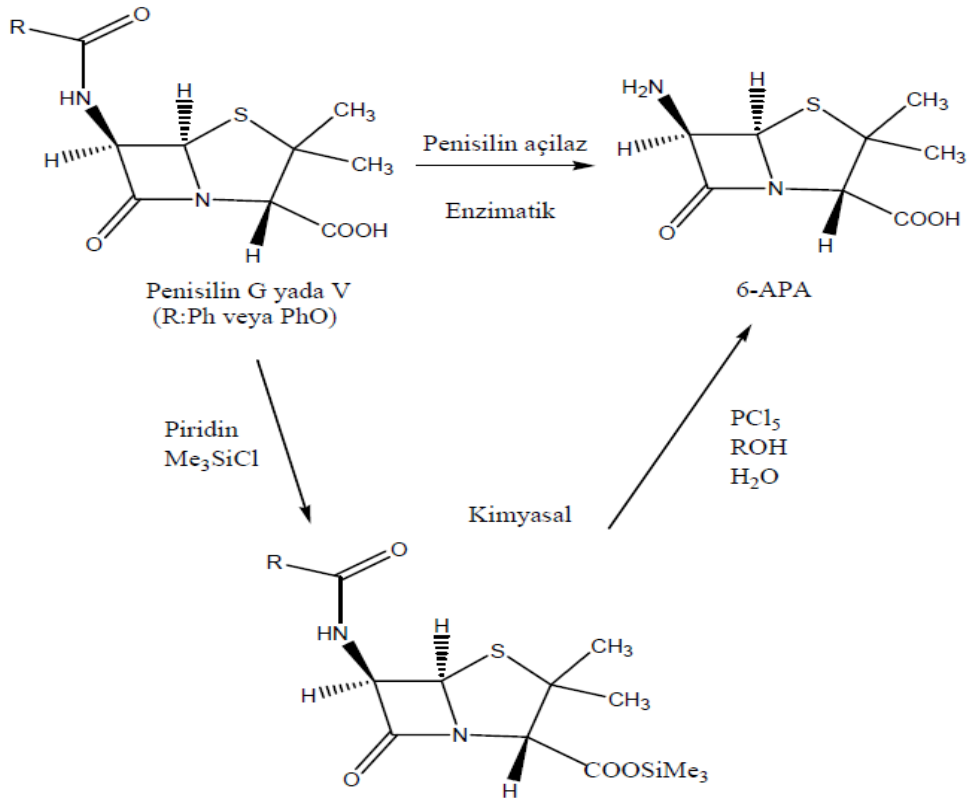
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 2.16. Bazı önemli β-laktam antibiyotiklerin penisilin açilazla katalize edilen sentezi (Arroyo ve ark. 2003)

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 β-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 günümüzde üç yolla üretilir; penisilin G ya da penisilin V'den kimyasal (organik sentez), fermantasyon ve enzimatik teknoloji. Özellikle 1960'lı yıllardan beri enzim immobilizasyon ve biyoreaktör teknolojilerindeki gelişmelerle birlikte 6-APA üretimi ağırlıklı olarak enzimatik teknolojilere bağlıdır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 2.17. Penisilinin, 6-APA'ya kimyasal ve enzimatik deaçilasyonu (Parmar ve ark. 2000)

Şekil 2.17'de görüldüğü gibi 6-APA'nın kimyasal yolla üretiminde 2 ardışık reaksiyonun gerçekleştirilmesi gerekir. Bu reaksiyonlarda birçok karmaşık ya da basit organik ya da inorganik katalizöre ihtiyaç vardır. Ayrıca -40 °C , 0 °C gibi düşük sıcaklıklarda çalışma zorunluluğu vardır ve bu sıcaklıkların sağlandığı özel reaksiyon tasarımları gerekir. Bunların yanı sıra her reaksiyon için bir saflaştırma sürecinin geliştirilmesi ve kullanılması zorunluluğu vardır.

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

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

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 açilaz (PA) katalizör olarak kullanılmaktadır. Bu endüstriyel uygulama kısmen saflaştırılmış enzimatik çözeltiden farklı enzim immobilizasyon tenikleri uygulanarak gerçekleştirilmektedir (Keçili 2006).

6-APA'nın kimyasal ve enzimatik dönüşüm yoluyla üretilmesi durumundaki maliyetleri karşılaştırıldığında, enzimatik işlemlerin diğerine göre en az % 9 daha düşük olduğu görülmüştür. Enzimatik yolla 6-APA üretimi, fermentasyon yoluyla penisilin G üretimi ile birleştirildiğinde bu oran % 20'ye çıkar (Arroyo ve ark. 2000; Parmar ve ark. 2000).

β-laktam antibiyotiklerin enzimatik sentez basamağı (öncül moleküle uygun yan zincirin eklenmesi), kinetik ya da termodinamik olarak kontrol edilen koşullar altında gerçekleştirilebilir. İlk yaklaşımda; aktive edilmiş bir açil verici öncülüne (örneğin; ilgili antibiyotigin D-açil yan zincirinin ester ya da amidi) gereksinim duyulur. Bu açil verici, β-laktam çekirdeği (6-APA) ile birleştirilir. Bu reaksiyonun ürünü istenilen antibiyotiğe ek olarak, alkol ya da amonyumdur. Açil vericinin değiştirilmesi farklı bir antibiyotiğin oluşmasını sağlar. Ancak, bu sentez reaksiyonu, aktive edilmiş açil verici ve oluşan antibiyotik ürününün her ikisinin hidroliz reaksiyonlarıyla yarış halindedir (Giordano ve Ribeiro 2006). Reaksiyon ortamındaki suyun azaltılması hidrolitik reaksiyonları bastıracağından, reaksiyonun sentez basamağına doğru kaymasını sağlar. Su aktivitesinin azaltılması, uygun kosolventlerin kullanılması ya da substrat derişiminin arttırılmasıyla baskılanabilir. İmmobolize edilmiş penisilin açilazlarla β-laktam antibiyotiklerin sentezi için, suda çözünen organik çözücüler (özellikle polioller) uygun bir ortam sağlar. Böyle bir ortam tamamen sulu bir reaksiyon ortamına göre daha yüksek verim elde edilmesine olanak verir. Bununla birlikte, kosolvente bağlı olarak enzim böyle bir reaksiyon ortamında daha kararsız olabilir. Bu tür problemler, immobilizasyon yöntemleri, mutagenez teknikleri ya da protein mühendisliği gibi çalışmalarla aşılabilir. CLEA'lar yani çapraz bağlanmış enzim agregatları da organiklerin sentezindeki yeni biyokatalizörlerdendir (Illanes ve ark. 2007).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Kinetik olarak kontrol edilen antibiyotik sentezinde ürün verimi yüksektir. Ancak aktive edilmiş açil verici antibiyotik çekirdeği ile birleşemeden hidroliz olabilir. Açil vericinin tekrar kazanılıp aktive edilmesi gereklidir. Bu durum ekstra işlemlerin olması ve maliyetin artması demektir. β-laktam antibiyotiklerin sentezinde daha basit bir yaklaşım olan termodinamik olarak kontrol edilen sentezde, aktive edilmemiş açil vericiler, antibiyotik çekirdeği ile doğrudan birleştirilirler. Yani açil vericinin aktivasyonuna gereksinim yoktur ve üretim daha az sıkıntıyla gerçekleşir. Eğer sentez reaksiyonu, etkili bir ürün kaldırma basamağı ile birleştirilebilirse yararlıdır. Termodinamik olarak kontrol edilen sentezdeki problem, reaksiyon dengesini, ürünlere doğru kaydırma gerekliliğidir. Bu işlem kesinlikle mükemmel bir çözeltide gerçekleştirilmelidir. Bu işlemde, E. coli PA'sı kullanıldığı zaman, yan zincirin karboksil grubu, enzimin nükleofilik atağına uygun ve mutlaka nötral olmalıdır. Aynı zamanda, β-laktam çekirdeğinin amino grubu da, nükleofilik etkileşimlerin gerçekleşebilmesi için nötraldir. Termodinamik olarak kontrol edilen süreçlerde enzim aktivitesinin organik kosolventler varlığındaki kaybı bir engel oluşturur. Bu yaklaşımda özellikle, organik çözücülere karşı kararlı enzimlere gereksinim duyulur. Enzimin immobilizasyon desteklerine kovalent olarak bağlanması, kararlılığını arttırabilir. Bu yaklaşım, uygun denge pozisyonunun sağlanabildiği koşullarda başarılı bir şekilde uygulanır (Diender ve ark. 1998; Schoren ve ark. 1999; Yang ve ark. 2002)

2.3.3.2. Peptitlerin sentezi

Biyolojik olarak aktif bileşiklerin ilginç bir grubunu oluşturan peptitler ve türevleri, endüstride besin katkı maddeleri ve antibiyotik olarak kullanılırlar. Besin katkı maddelerinden birisi olan aspartam (tatlandırıcı), endüstriyel bir ürün haline gelmiştir (Khimiuk ev ark. 2003). Dipeptitlerin kimyasal sentezi genellikle koruma ve etkinleştirme basamaklarına gereksinim duyar; bu da uzun ve masraflı bir süreç demektir. Örneğin; aspartamın endüstriyel sentezi sürecinde, enzimatik peptit sentezi kimyasal senteze göre daha etkili ve verimlidir. Penisilin açilazlar peptitler ve türevlerinin sentezinde, amino asitlerin amino gruplarının korunması (protection) ve korumanın kaldırılmasında (deprotection) doğrudan enzimatik

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

sentez ve açil grup transfer reaksiyonları aracılığıyla kullanılabilirler (Arroyo ve ark. 2000; Khimiuk ve ark. 2003)

Proteazlar da peptit sentezinde sıklıkla kullanılan enzimlerdir, ancak L-amino asit türevleri ile sınırlıdırlar ve fenilglisin gibi doğal olmayan amino asitleri dönüştüremezler. E. coli penisilin açilazı, D-(-)-fenilglisil rezidülerini de içeren doğal olmayan fenilglisin dipeptitlerinin sentezinde kullanılırlar. Penisilin açilazın açil bağlama bölgesi fenilasetik asit ve türevleri için yüksek seçiciliğe sahiptir ve açil verici olarak D-(-)-fenilglisin türevlerini de kabul edebilir. Aksine, penisilin açilazın nükleofil bağlama bölgesi amino asitlerin büyük bir kısmının L-enantiyomerleri için son derece seçicidir. Bu nedenle, penisilin açilaz peptit sentezinde katalizör olarak proteazlarla birlikte kullanılır. Ek olarak, penisilin açilaz farklı amino asit içeren D-(-)-fenilglisin dipeptitlerinin büyük bir kısmının sentezinde tek seçenektir (Langen ve ark. 2000; Khimiuk ve ark. 2003; Arroyo ve ark. 2000)

2.3.3.3. Rasemik karışımların ayrılması

Rasemik karışım; optik olarak aktif bilesiklerin D- ve L- formlarını eşit miktarda içeren karışım demektir. Bir rasemik karışım optik olarak aktif değildir. Biyokatalizörler, rasemik karışımların tek enantiyomerlerinin üretim ve biyotransformasyonunu sağlarlar. Genellikle biyolojik olarak aktif kiral moleküllerin farklı enantiyomerleri farklı biyolojik aktiviteye sahiptir. Sıklıkla, enantiyomerlerden yalnızca birisi istenilen aktiviteye sahiptir ve diğeri muhtemelen zararlıdır. Bu nedenle, farmasötik endüstrisi bir ilacın rasemik karışımını değil de sadece farmakolojik olarak aktif enantiyomerini içerdiğini garanti etmek zorundadır. Penisilin açilazlar bu rasemik karışımlardan istenilen enantiyomerin ayrılmasında katalizör olarak kullanılırlar. Penisilin açilazların, sulu çözeltilerde olduğu kadar su-çözücü karışımlarında ve susuz organik ortamlarda, çözünmüş amino asitlerin, α-amino esterlerin, aminlerin ve ikincil alkollerin rasemik karışımlarının birbirinden ayrılmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Elde edilen saf enantiyomerler, biyolojik olarak aktif bileşiklerin üretilmesinde ara ürün olarak kullanılabilirler. Örneğin; etil-3-amino-4-pentinoat'ın rasemat karışımı E. coli penisilin G açilazı ile katalizlenmiş bir

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

enantiyoselektif açilasyon aracılığıyla ayrıştırılabilir. Bu reaksiyon sonucunda oluşan *S*-izomer; anti-platelet ajan Xemilofiban sentezi için kiral sinton olarak kullanılabilir (Gavrilescu ve Chisti 2004; Sio ve Quax 2004; Arroyo ve ark. 2000).

2.4. Proteinlerin Saflaştırılması

Her türlü organizma kendisine has proteinlere sahiptir ve proteinler biyolojik aktivitelerini ancak belirli pH ve sıcaklık sınırlarında gösterebilirler. Bu sebeplerden dolayı bir proteinin saf bir şekilde bir hücre veya dokudan izolasyonu güç bir iştir. Bu güçlüklere rağmen bir çok protein saf olarak elde edilmiştir. Binin üzerinde enzim kısmen saflaştırılmış ve iki yüzden fazlası saf kristal halde elde edilmiştir. İzolasyon işlemleri oldukça yüksek dikkat ve gayret gerektirir. Globular proteinlerin çözelti içindeki davranışlarından faydalanılarak, onların saflaştırılması yapılmaktadır. Bu özellikler şunlardır: molekül büyüklüğü, çözünürlük, elektriksel yük, adsorbsiyon davranışlarındaki farklılıklar ve diğer moleküllere karşı biyolojik afinite.

Molekül büyüklüğü esasına dayanarak protein ayırma metotları; diyaliz ve ultrafiltrasyon, yoğunluk gradienti santrifügasyonu ve jel geçirgenlik kromatografisidir. Çözünürlük farklılıkları esasına dayanarak proteinlerin ayrılmasında ise çözünürlüğün pH, iyonik şiddet ve sıcaklığa bağlı olmasından yararlanılır. İzoelektrik çökelme, nötral tuzlarla çöktürme ve çözücülerle fraksiyonlama bu grupta yer alan saflaştırma teknikleridir. Elektriksel yük esasına dayanarak proteinleri ayırmada kullanılan metotlar, elektroforez ve iyon değişim kromatografisidir. Seçimli adsorbsiyon esasına dayanarak proteinlerin ayrılmasında kizelgur, alüminyum oksit ve hidroksilapatit gibi adsorban maddeler kullanılır. Afinite kromatografisiyle saflaştırma da yine bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon dolgu maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir olarak bağlandığı bir tekniktir. Matriks olarak sephadex, sepharose ve biogel kullanılabilir. Bu teknikte önemli olan saflaştırılacak maddeye spesifik ve tersinir affinite gösteren ligandın seçilmesidir. Bazı durumlarda matrikse bağlanan küçük bir ligand büyük enzim yapılarını

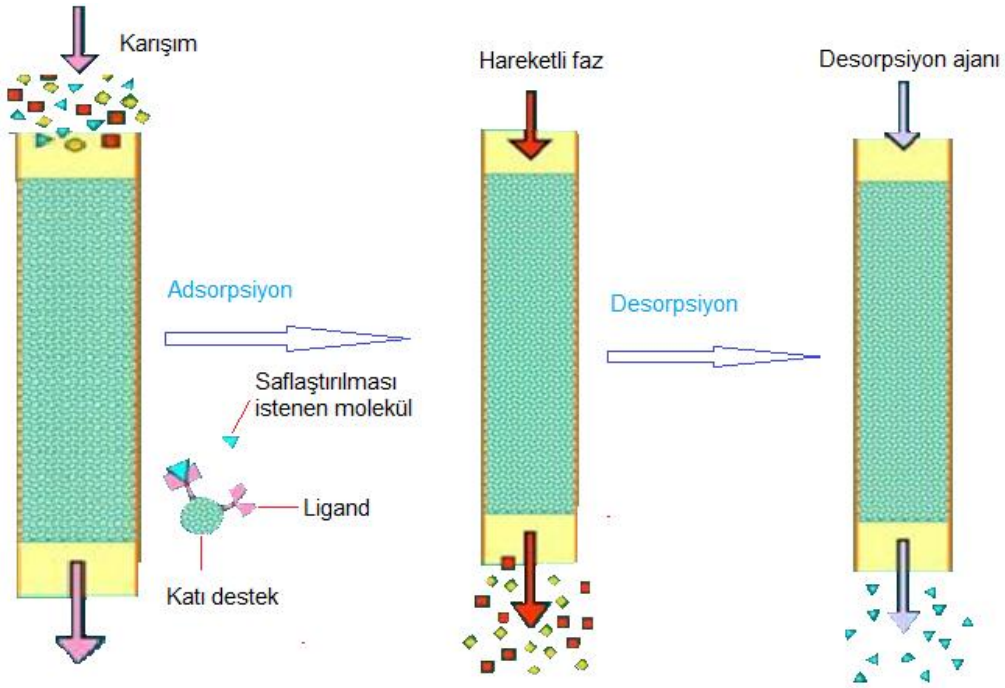
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

saflaştırmada, sterik engeller dolayısıyla, yeterince etkin olmayabilir. Bu durumlarda uzantı kolları, etkili bağlanmayı sağlamak için matriksle ligand arasına sokulurlar (Keha ve ark. 2000).

2.4.1. 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, oligonükleikasitler ve nükleik asitlerin de (DNA, RNA) bulunduğu çok sayıda biyofonksiyonel molekül kullanılabilir (Denizli ve Pişkin 1995). Afinite kromatografisinin şematik gösterimi Şekil 2.18'de verilmiştir.

Katı fazdaki bağlama özelliğinin özgüllüğü seçici bağlama maddesinin (ligand) destek matriksine kovalent bağla bağlanmasıyla sağlanır. Katı fazda örnekten istenen madde seçimli olarak tutulur.



Şekil 2.18. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

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.

Küçük ligandları (enzim inhibitörleri) doğrudan matrikse bağlamak suretiyle hazırlanan adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Çizelge 2.3'de afinite kromatografisinin en çok kullanıldığı biyolojik sistemler gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Afinite kromatografisinin kullanıldığı biyolojik sistemler

Saflaştırılacak Madde	Ligand
Enzim	Substrat, inhibitör, kofaktör
Antikor	Antijen,virüs, hücre
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein
Nükleik asit	Komplimenter baz dizisi, nükleik asit polimeraz, bağlayıcı protein
Hormon	Reseptör protein
Vitamin	Taşıyıcı protein
Hücre	Hücre yüzeyi proteini, lektin

2.4.1.1. 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 rjit olması gerekir. Matriks tek başına ayrılması istenen biyomoleküle hiçbir

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

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 kullanılabilmelidir. Destek materyali olarak agaroz, selüloz, silika ve değişik organik polimerler kullanılabilir.

2.4.1.2. 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 kulanılan 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 ώ-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. İmmobilize edilmiş lektin birçok glikoproteinin saflaştırılmasında kullanılır.

Hormon reseptörler hormonların, hormonlar da reseptörlerin saflaştırılmasında kullanılır. İmmünoafinite ile antibadiler 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

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

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.

2.4.1.3. Uzatıcı 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 hidrofobik etkileşime girerler.

2.4.2. Afinite kromatografisi türleri

2.4.2.1. 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

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

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.

Psedo-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 psedospesifik 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. 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 ligandlarla ilgili ilk çalışmalar ligand olarak tekstil boyalarının kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Tekstil boyalarının en büyük özelliği, protein yapısındaki dipeptit bağlarını taklit edebilmeleridir. Tekstil boyalarının hedef moleküle spesifitesini arttırmak için uç gruplar takılabilir ya da moleküller yeniden dizayn edilebilirler. Bu yeni tip boyalara "Biyomimetik boyalar" adı verilir. İlk biyomimetik boya tripsin saflaştırılması için diaminometil

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

benzen grubu aracılığıyla klorotriazin halkasını reaktive etmek için benzamidin kullanılmasıyla hazırlanmıştır.

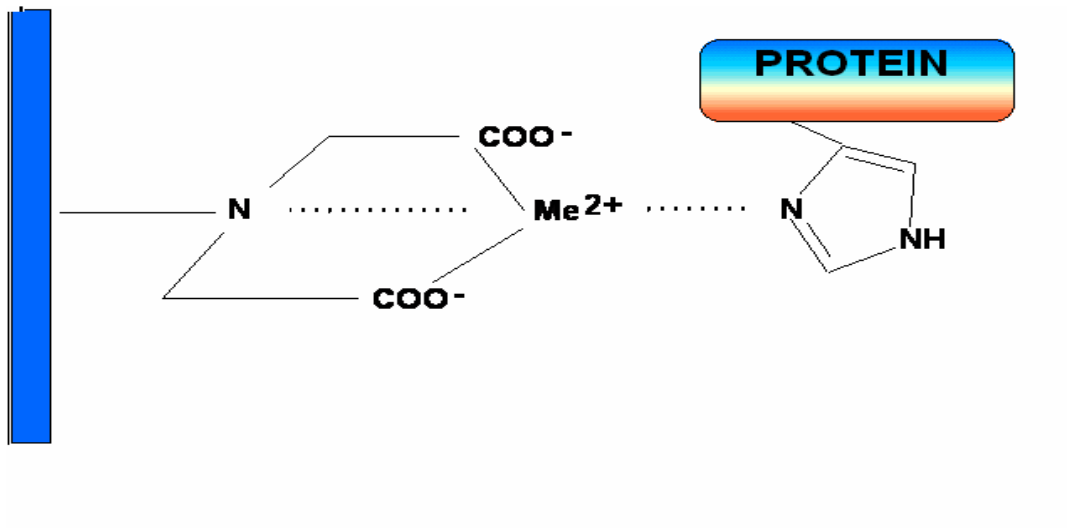
2.4.2.2. Metal şelat afinite kromatografisi

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 öne sürdüğü 1961'e kadar uzanabilmektedir. Bu tekniğin temeli ve uygulamaları, Davankov ve Semechkin tarafından detaylıca gözden geçirilmiştir (Davankov ve Semechkın 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 Walls etkileşimlerini de içermektedir. Şekil 2.19 afinite desteğe şelatlanmış bir metale proteinin bağlanmasını göstermektedir. 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 oluşturucu 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

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

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 uygundurlar. 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).



Şekil 2.19. İmmobilize bir metal iyonuna bağlı proteinin şematik gösterimi

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

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

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).

2.4.2.3. 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.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

2.4.2.4. Hidrofobik etkileşim kromatografisi

Hidrofobik etkileşim kromatografisi, proteinleri yüzeyindeki non-polar bölgelerle immobilize hidrofobik ligandlar arasındaki hidrofobik etkileşimlerin temelinde, proteinlerin hidrofobisitesine dayanarak ayırımını sağlar. Hareketli fazda yüksek tuz derişiminde adsorpsiyon artar ve elüentin tuz derişiminin 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 çözücüleri 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 laboratuar 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 hidrofobisiteleri 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

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

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 (Π-Π) etkileşimleri karışımından dolayı iyi sonuçlarla ligand olarak kullanılırlar. Matriks üzerinde sübstitüsyon 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 (Özkara 2010).

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

2.4.2.5. 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 ayırımda kullanılmıştır (Ghadge 2000).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

2.4.2.6. 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 sübstitüsyon 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 spesifikliği ile yakından ilişkilidir.

2.5. 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.

2.5.1. 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 psedo-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.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

2.5.2. 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 araomatik 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.

2.5.3. Hücre saflaştırma

Hücre ayrımları için afinite kromatografisi, glutaraldehit, aktiflenmiş AcA ve Mersalil-Trisakril C üzerine immobilize edilmiş antibadilerin kullanımıyla başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Avidin-Ultragel 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

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

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 (Keçili 2006).

2.6. PA Saflaştırmak İçin Yeni Bir Materyal; Kriyojel Kolonlar

2.6.1. Kriyojel

Kriyojel, monomerik ve polimerik öncülerin uygun çözücülerdeki çözeltilerinin dondurulması sırasında şekillenen jel matrisidir. Kriyojel sözcüğü Yunanca kökenli olup, -kryos- (buz, soğuk) ve –gel- (jel) sözcüklerinin bir araya getirilmesinden meydana gelmiştir. Dolayısıyla soğukta yapılan jel anlamına gelmektedir.

Kriyojeller birbirine bağlantılı büyük gözeneklere sahiptir. Bu gözenekler pratik olarak, herhangi bir büyüklükteki çözünenlerin difüzyonuna, aynı zamanda nano partüküllerin, mikropartiküllerin kütle geçislerine izin verirler. Kriyojellerin yapı iskeletine bakıldığında sünger morfolojisine sahip olduğu görülmektedir. Yani birbirine bağlantılı gözenekli sürekli bir yapı kriyojellerin temel yapısını oluşturur. Bu sünger şeklindeki gözenek sistemi çözünenlerin kriyojellerin içinden madde kaybı olmadan geçişlerini sağlar. Kriyojellerin temel yapısı, osmotik basınçları, kimyasal ve mekanik dayanıklılığıyla birleştirildiğinde, biyolojik nanopartiküllerin, mikropartiküllerin (plazmidler, virüsler, hücre organelleri) ve hatta bütün hücrelerin kromatogrofisi için bu yapıları ilgi çekici parçacıklar haline getirir (Lozinsky ve ark. 2003).

Kriyojeller, karyotropik jelasyon işlemiyle üretilirler. Karyotropik jelasyon işlemi daha çok dondurma-eritme şeklinde gerçekleştirilen bir işlemdir. Kriyojel hazırlama surecinin temel basamaklarından bahsetmek gerekirse, kriyojel oluşturmak için ilk önce monomer, monomer karışımları veya polimer uygun bir çözücüde çözülerek homojen çözeltisi şeklinde hazırlanır. Bu çözelti içerisine uygun çapraz bağlayıcı ve gerekli tepkime başlatıcı da eklenerek, hazırlanan homojen karışım belirli bir süre dondurucuda bekletilir, karışımın donması

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

sağlanır. Daha sonra buz halindeki karışım oda sıcaklığına alınarak polimer içinde oluşan buz kristallerinin erimesi ve bir yandan da kriyojel oluşumu başlar. Polimer icerisindeki buz kristalleri iyice eridiğinde, madde oda sıcaklığına geldiğinde, elde edilen birbirine bağlantılı gözeneklerden oluşan ürün, kriyojeldir (Yao ve ark. 2006). Kriyojel hazırlama sırasında öncü olacak maddeler seçilirken önemli bir nokta; termotropik jellerin kriyojel hazırlanmasında öncü olarak kullanılamayacağıdır.

2.6.2. Karyotropik jelasyon işleminin temel karakteristik özellikleri

_ Jel formasyon ajanları (monomer veya polimer) içeren çözelti çözücü kristalizasyon noktasının birkaç santigrat derece alt sıcaklığında dondurulur. Burada donmuş sistem tek bir katı halinde görünmesine rağmen aslında heterojendir ve donmuş çözücü kristalleri içerisinde donmamış sıvı mikro faz içerir.

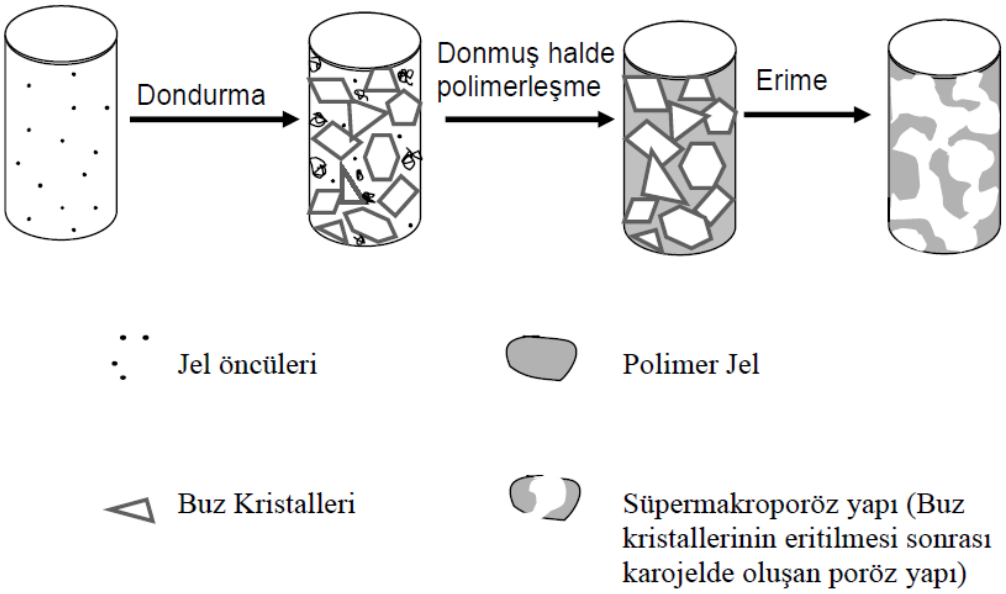
_ Jel oluşturma ajanları donmuş çözücü kristalleri içerisindeki donmamış sıvı mikrofaz içerisinde yoğunlaşır. Burada donmamış sıvı mikrofaz başlangıç toplam hacmin sadece küçük bir kısmını içermesine rağmen, jel öncülerinin derişimi jel oluşumunu ilerleterek yavaş yavaş artmaktadır.

_ Donmuş çözücü kristalleri gözenek oluşturucu ajan görevini üstlenir. Eritildiğinde boşlukları terk ederler ve büyük gözenekler çözücü ile dolar. Çözücü ve jel fazı arasındaki yüzey tansiyonu gözeneklerin şeklini belirler, gözenek yüzeyini pürüzsüzleştirir.

_ Dondurulduğunda, çözücü kristalleri diğer kristallerle karşılaşıncaya kadar büyürler ve bu yüzden erime sonrasında birbirine bağlanmış gözenekler sistemi jel içerisinde artar.

_ Kriyojelin polimer fazı, polimer zincirleri arasında oluşmuş mikro gözenekler içerir. Böylelikle, kriyojeller hem heterofaz hem de hetero gözenekler içerirler (Şekil 2.20).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 2.20. Kriyojel oluşum süreci

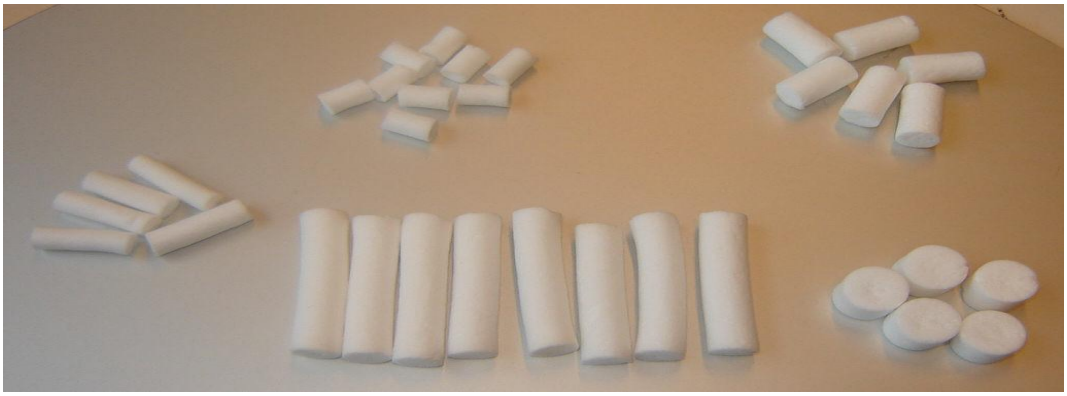
2.6.3. Jel ve kriyojel arasındaki farklılıklar

Jel adı altına birleşen polimerik materyaller, makromolekülleri geniş mesafeli bağ yolu ile bağlanmış ve zaman içinde değişime uğramayan polimer hareketsiz çözücü sistemleridir. Polimer ağlarının bağlantı yerlerindeki intermoleküler bağların yapısına göre jeller iki gruba ayrılabilir: Kimyasal ve fiziksel jeller.

Kriyojeller herhangi bir kimyasal şekilde olabilirler: Kovalent, iyonik ya da non kovalent kriyojeller. Dondurma – kurutma polimerik materyalleri şeklinde düşünülerek hazırlanan jeller de kriyojellere benzer olarak makro ve mikro yapıda gözenekler içerirler. Çözücü kristallerinin (genellikle sulu sistemler için buz) süblimleşmesi sonucu elde edilen dondurulmuş çözücü, polimerik materyalde yani oluşan jelde birbirine bağlı gözenekler sistemi oluşturur.

Fakat bunlar sadece ince objeler (filmler, ince tabakalar) şeklinde üretilebilirler. Bu jellerin silindirler halinde üretilmesi teknik açıdan pek pratik değildir. Diğer taraftan kriyojeller, bloklar, silindirler, tüpler, granüller ve diskler olmak üzere istenilen her şekilde üretilebilirler (Şekil 2.21).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

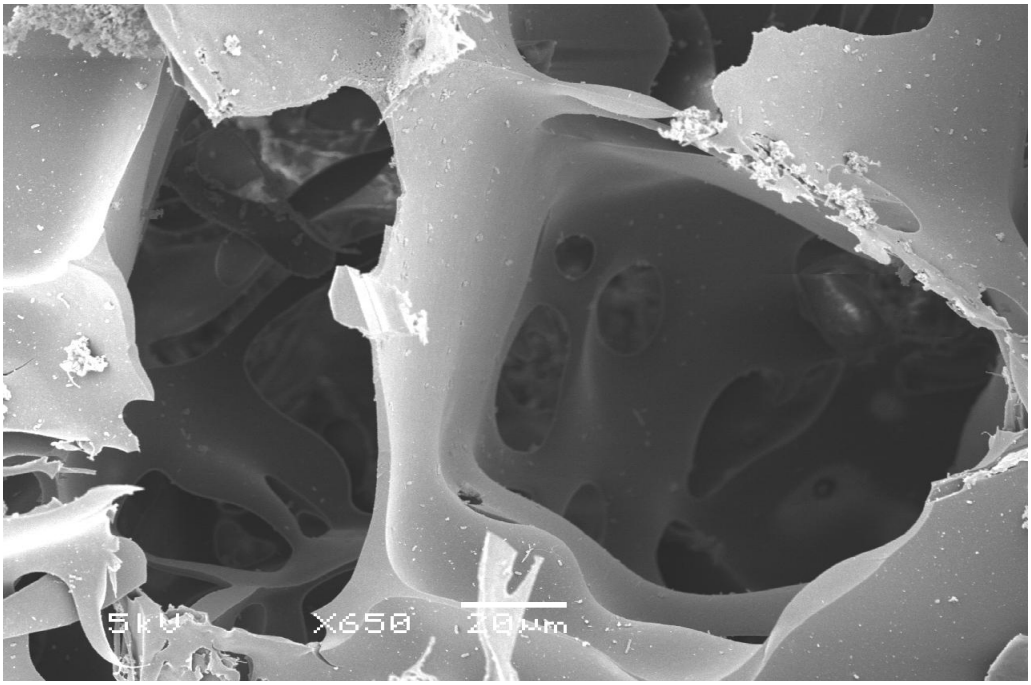


Şekil 2.21. Çeşitli şekillerde üretilen kriyojellerlerin optik fotoğrafı

Ayrıca bunlara ek olarak, kriyojellerin üretimi diğer dondurma- kurutma ile üretilen jellerin üretiminden daha basittir. Çünkü çözücü hareketi için kriyojel üretiminde indirgenmiş basınç gerekli değil iken, diğer jel üretiminde çözücü hareketi için indirgenmiş basınç gereklidir.

Birbirine bağlı geniş gözeneklerden oluşan bir sistem kriyojellerin temel karakteristik özelliğidir. Çözünenlerin bilinen homofaz jellerin içindeki difüzyonunun aksine, sünger şeklindeki gözenek yapısına sahip kriyojeller (Şekil 2.22), çözünenlerin kriyojel içinden madde kaybı olmadan geçişlerine olanak verir. Diğer tür jellerde, çözünen, jel içerisinden geçerken madde kaybına uğrar (Lozinsky ve ark. 2003).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 2.22. Kriyojelin süngerimsi gözenek yapısının SEM görüntüsü

2.6.4. Kriyojel hazırlanması

Bir kriyojel elde etmenin genel prosedürü şu şekildedir:

1. Makromoleküller, düşük moleküler çözünenler (monomer, monomer karışımı veya polimer) ile çözücü içeren homojen karışım dondurulur.

2. Dondurulmuş sistemde donmuş çözeltinin polikristalleri oluşur. Ancak, ortamda aynı zamanda donmamış bir mikrofaz da bulunur.

3. Bu sistem kontrollü olarak erimeye bırakılır. Bu sırada kriyojellerin polimerik iskeleti oluşur, fakat aynı zamanda çok çok az miktarda çözücü de sistemde bulunmaktadır. Yani kriyojellerin polimer fazı, polimer zincirleri arasında oluşmuş mikrogözenekler içerir. Böylece kriyojeller hem heterofaz hem de hetero gözenekli bir yapıya sahip olurlar.

_ Kriyojel sentezleme işleminde öncü molekül bir polimer ise;

İlk basamakta polimer iyi çözündüğü bir çözücüde çözülür. İçerisine katalizor görevi yapacak reaktif ya da dondurma işleminden önce polimer oluşumunu engelleyen reaktif hızlı bir şekilde iyice karıştırılarak eklenir. Bu

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

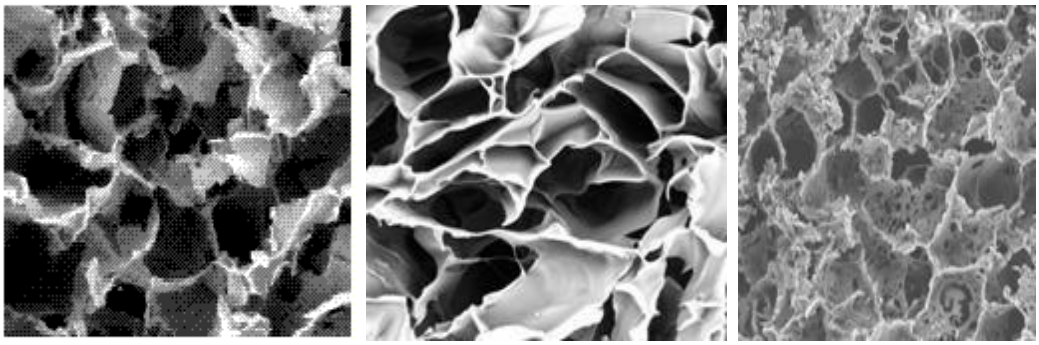
reaktifin de çözücü içerisinde iyi bir şekilde çözünür olmasına dikkat edilmelidir. Elde edilen çözelti dondurulur. Buradaki donma sıcaklığının da çözücü kristalizasyon noktasının birkaç santigrat derece alt sıcaklığında olmasına özen gösterilmelidir.

_ Kriyojel sentez işleminde öncü molekül bir monomer ise;

Öncü molekülün monomer olduğu kriyojel sentezlerinde karyokopolimerizasyon yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde monomer önceden polimer haline getirilmez. Direkt olarak kriyojel sentezlenmesi prosesinde çözeltinin içerisinde, hem monomerden polimer oluşumu hem de çözücü kristallenmesi oluşur. Karyokopolimerizasyon yönteminin donma aşamasında, monomerler sulu çözeltilerinde donmuş halde bulunurken, aynı sıcaklıkta çözücü kristalizasyonu da görülür. Bunun sonucunda buz kristalleri ya da buz blokları gözlenir. Dolayısıyla bu aşamada seçilecek olan sıcaklık değeri, monomerlerin donma noktasının altında ve aynı zamanda çözücü kristalizasyonu için de yeterli bir değer olmalıdır. Eritme aşamasında ise, kristal haldeki çözelti birbirine bağlanmış süper makro gözenekleri oluştururken, erimiş monomer çözeltisi ise bu kristallerin etrafında kopolimerizasyonu ve jel matriksini oluştururlar. Bu yöntemde ilk önce monomerler ve çapraz bağlayıcı bunları iyi çözen bir çözücüde çözülür ve hazırlanan çözelti içerisine katalizör görevi yapacak olan reaktif eklenir. Hazırlanan homojen karışım dondurulur ve donma işleminin ardından kontrollü bir şekilde oda sıcaklığında eritilir. Elde edilen ürün, öncü molekülün monomer olduğu kriyojeldir (Galaev 2002).

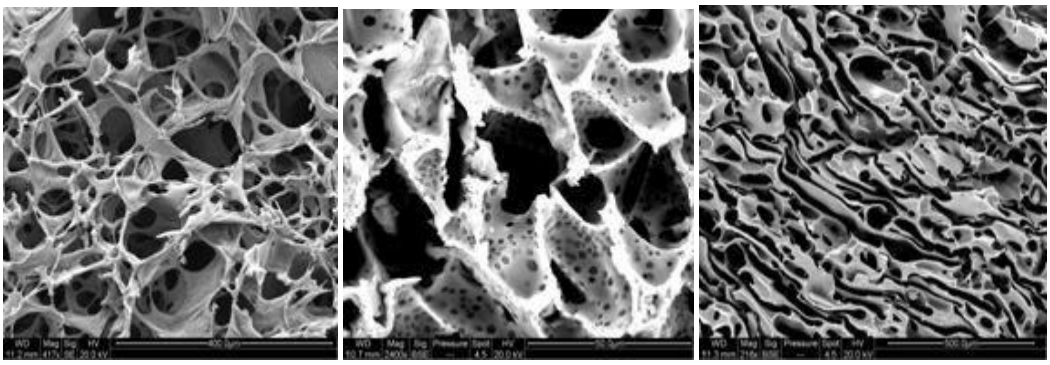
Kriyojeller sentezlenirken başlangıç öncü madde akrilamit, polivinil alkol, karbon, metilmetakrilat gibi sentetik kimyasallar olabildiği gibi, kitosan, jelatin gibi doğal polimerler de olabilir (Şekil 2.23). Ayrıca; sentetik maddelerle doğal polimerlerin kopolimerizasyonu oluşturularak öncü madde olarak; poli (vinil klorür- ko- jelatin, poli(akrilamit kitosan) gibi polimerler de olabilmektedir (Şekil 2.24)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



(1) **(2)** **(3)**

Şekil. 2.23. Farklı monomerlerden hazırlanan kriyojellerin SEM görüntüleri
1) Poli(N-izopropilakrilamit) kriyojeli, 2) Kitosan-jelatin kriyojeli,
3) Poli(Akrilonitril) kriyojeli



(a) **(b)** **(c)**

Şekil 2.24. Farklı kopolimerlerden hazırlanan kriyojellerin SEM görüntüleri
a) Poli(dimetilakrilamit- ko- polivinilalkol), b) Poli(vinil klorur- ko- jelatin),
c) Poli(akrilamit kitosan)

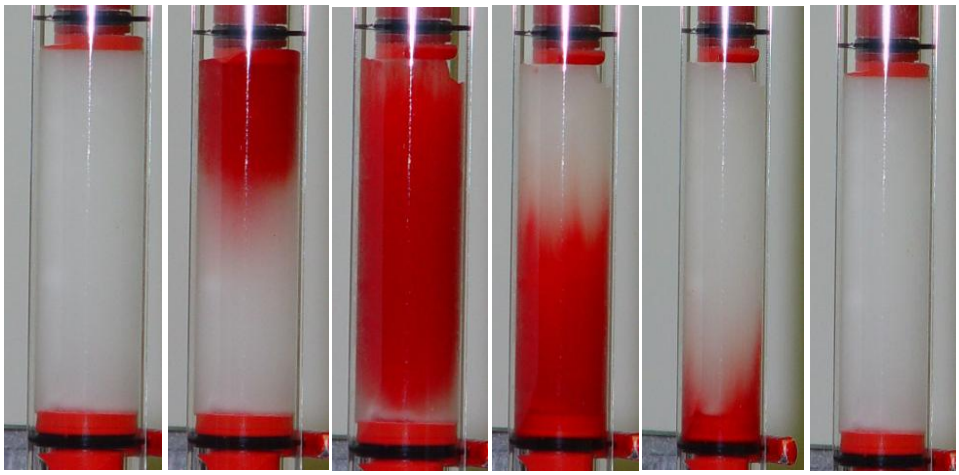
Kriyojellerin yapısındaki gözeneklerin büyüklüğü, gözenek dağılımı, yapının elastikliği sentez aşamasında kullanılan çapraz bağlayıcı ve başlatıcı miktarlarıyla ve donma işleminin süresiyle değişmektedir. Kullanılan çapraz bağlayıcı ve reaksiyon başlatıcı oranı arttırıldığında daha sert ve sıkı yapıda gözenekler oluşmaktadır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

2.6.5. Kriyojellerin uygulama alanları

Kriyojeller sahip oldukları eşsiz yapısıyla kan hücrelerinin ayırımında afinite matriksi olarak, memeli hücrelerinin kültür ortamı olarak, doku mühendisliğinde ve günlük hayatta filtre ve membran olarak kullanımlarıyla karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca kromatografik alanda kolon dolgu maddesi olarak kullanıldıklarında kolonda geri basınç oluşturmadıklarından verimli ayırımlar elde etmede kromatografi malzemesi olarak kullanılmaktadırlar.

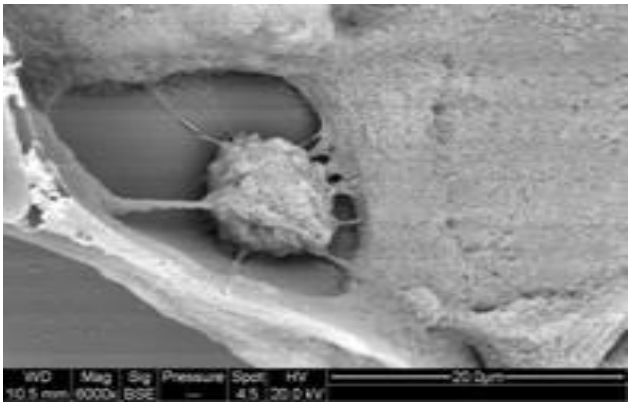
Kan hücrelerinin ayırımında afinite matriksi olarak kullanımlarına bakıldığında; dimetil akrilamit, N-izopropil akrilamitten sentezlenen kriyojellere protein-A, antibody yada metal ligandlar gibi spesifik ligandlar immobilize edildiğinde seçici bağlanmayla ayrılması istenen hedef hücrelerin (kök hücre, kanser hücreleri, makrofajlar) kromatografisi için kullanım alanının olduğu görülmektedir (Şekil 2.25)



Şekil 2.25. Kan hücrelerinin kromatografik olarak kriyojel kolondan geçirilmesi

Doku mühendisliğinde kriyojellerin kullanımında; polivinil kaprolaktam, dextran, jelatin ve aljinat içeren akrilamit, dimetil akrilamit, poli vinil alkol tabanlı kriyojeller jelatin veya kollojenlerle modifiye edilerek, doku hasarının giderilmesinde ya da rejenerasyonunda kullanılabilecek yüzey oluşturmaktadırlar.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



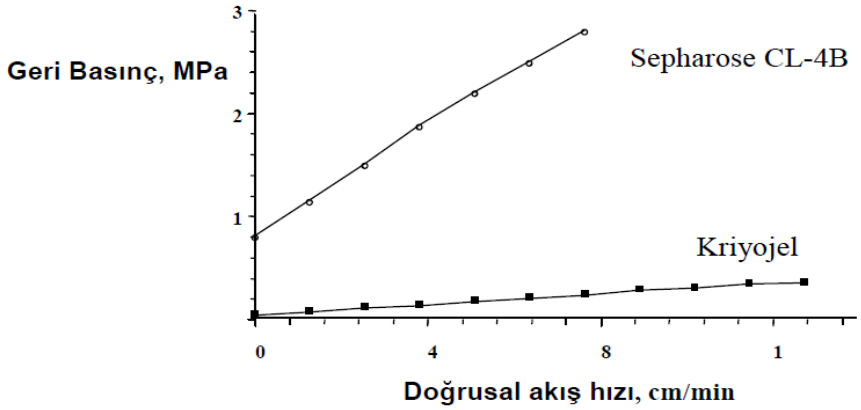
Sekil 2.26. Kitosan-jelatin kriyojeli

Kriyojellerin kromatografik alanda kolon dolgu maddesi olarak kullanımları, diğer bir kolon dolgu maddesi olan Sepharose CL-4B kolon ile karşılaştırıldığında kriyojel kolonların akışa karşı direncinin diğer Sepharose kolonlara göre çok daha az, hatta ihmal edilebilir düzeyde olduğu ve bu özelliğinin de onları kromatografide kolon dolgu maddesi olarak ilgi çekici materyaller yaptığı bilinmektedir (Şekil 2.27).

Kriyojellerle Vladimir I. Lozinsky ve ark. (Lozinsky ve ark. 2003) tarafından yapılan çalışmada; kriyojellerin biyo ayırmada kullanılmasından faydalanarak, kriyojelde *Escherichia coli* hücrelerinin tutunmasını incelemişlerdir. Bunun için akrilamit kriyojeli hazırlamışlardır. Hazırlanan kriyojelde kapiler gözenek boyutu 10-100 μm aralığındadır. *E.coli* hücrelerinin büyüklüğü ise 1x3 μm dir ve kriyojelin gözeneklerinden kolayca geçebileceği düşünülmüştür. *E.coli* hücrelerinin kriyojele tutunmasını sağlamak için kriyojel sentez aşamasında gözeneklerine bir ko-monomer tutturularak kriyojelin pozitif yüklenmesi sağlanmıştır.

E.coli hücrelerinin yüzeyi de negatif yüklenerek, hücrelerin kriyojelde sürüklenmesi sırasında tutunmaları sağlanmıştır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 2.27. Kriyojel kolon ile Sepharose kolonun geri basınç özelliklerinin karşılaştırılması

Gerçekte *E.coli* hücreleri herhangi bir ligand içermeyen saf kriyojel yüzeyine tutunmaz. Bu nedenle hücrelerin tutunmasını sağlamak için böyle bir işlem yapılmıştır. Kriyojele tutulan hücreler sodyum klorur solüsyonu ile elüe edilmiştir. Ard arda yapılan işlemlerle *E.coli* hücrelerinin en fazla miktarda ayrılabileceği kriyojel kolonu özellikleri tespit edilmiştir.

Diğer bir çalışmada ise kriyojellerin adsorpsiyon çalışmalarında kullanımı incelenmiştir (Kim ve ark. 2006). Karbon kriyojellerinin fenol ve reaktif boyaları adsorpsiyonunu incelemişlerdir. Bunun için; aktive edilmiş karbon kullanarak hazırlanan kriyojelin temsil ettiği aktive edilmiş karbon mikrosferi ve karbon kriyojelinin temsil ettiği karbon mikrosferi olmak üzere iki ayrı adsorban yüzey kullanılmıştır. Reaktif boya olarak da Black 5 ve Red E kullanılmıştır. Aktive edilmiş karbonların çoğu gelişmiş mikroporoziteye ve yüksek yüzey alanına sahiptir. Bu nedenle düşük moleküler ağırlıklı bileşikler için yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahiptir. Bununla birlikte, yüksek moleküler ağırlıklı büyük moleküllerin uzaklaştırılması için uygun değildir. Karbon kriyojelleri formaldehit (HCOH) ile resorsinolün [$C_6H_4(OH)_2$] inert atmosferde piroliz ve dondurma-kurutma işlemleri takip edilerek çok zayıf bazik sulu çözeltideki sol jel polikondenzasyonundan sentezlenebilir. Karbon karyojelleri yüksek BET yüzey alanına ve geniş mezopor hacimlere sahiptir. Ayrıca mezoporoziteleri reaktantların miktarları değiştirilerek, katalizörle ve sol jel polikondenzasyonu ile kontrol edilebilir. Yapılan çalışmada, karbon kriyojellerinin sıvı faz adsorpsiyonu

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

için adsorban olarak kullanımları üzerine odaklanılmıştır. Fenolün adsorplanmasında, aktive edilmiş karbondan oluşan aktive edilmiş karbon karyojellerinin, karbon kriyojellerine göre daha fazla miktarda fenol adsorpladığı görülmüştür. Ayrıca fenolün adsorplanmasına bakıldığında, test edilen örneklerin adsorpsiyon kapasitelerinin öncelikli olarak BET yüzey alanlarına ve mikro gözenek hacmine bağlı olduğu görülmüştür. Karbon kriyojellerinde Black 5 ve Red E adsorplanmasında ise, adsorplanan Black 5 ve Red E miktarlarının aktive edilmiş karbon kriyojellerinde adsorplanan miktarlarından daha fazla olduğu görülmüştür.

Ceyhun Babac ve ark. Poli(akrilamit allil glisidil eter) [poli(Aam – AGE)] monolitik kriyojeline tutturulmuş immobilize konkanavalin A'ya (con A) sulu çözeltiden ve insan plazmasından insan immunoglobulin – G (IgG) bağlanması üzerine çalışmışlardır (Babac ve ark. 2006). Poli(akrilamit allil glisidil eter) kriyojeli, monomerlerin donmuş çözeltilerinden karyokopolimerizasyon işlemiyle hazırlanmıştır. Elde edilen monolitik kriyojel 10 – 100 μm boyutunda birbiriyle bağlantılı sürekli bir polimerik matriks içermektedir. Con A epoksi gruplarıyla poli (Aam – AGE) karyojeline kovalent bağlarla tutturularak immobilize edilmiştir. Con A - poli(Aam – AGE) kriyojelinin maksimum IgG bağlama kapasitesi pH 7.4'te görülmüştür. Daha sonra % 90 dan fazla adsorplanmış IgG sodyum klorür çözeltisi kullanılarak elüe edilmiştir. Diğer kan proteinleri için saptanan adsorpsiyon kapasiteleri ise fibrinojen için 1.0 mgg^{-1} ve albümin için 1.7 mgg^{-1} olarak bulunmuştur. Con A - poli(Aam – AGE) kriyojelleriyle 10 tekrar yapıldığında, IgG moleküllerinin adsorpsiyon kapasitesinde kayıp görülmeden adsorpsiyon/desorpsiyon için kullanılabilir olduğu saptanmıştır.

2.6.6. Kriyojellerin karakterizasyonu

Farklı monomerler, monomer karışımları veya polimer ya da polimer karışımları kullanılarak sentezlenen kriyojellerin, taramalı elektron mikroskobuyla (SEM), Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisiyle (FTIR), azot adsorpsiyon porozimetri (BET) yöntemiyle ve şişme testlerinin uygulanmasıyla karakterizasyonu yapılmaktadır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

SEM ile görüntülemeyle kriyojel yapısındaki gözenek dağılımı, gözenek boyutları, yapıyı meydana getiren gözenek örgüsü gibi bilgiler elde edilmektedir. SEM ile görüntüleme yapmak için ilk önce örnekler kurutulur ve ardından altın ile kaplama yapılır.

FTIR analizi ile sentezlenen kriyojeldeki fonksiyonel gruplar aydınlatılır ve buna göre, kriyojel gözeneklerinin amaca yönelik bir madde için modifikasyonunun gerçekleştirilip gerçekleştirilemeyeceği belirlenmektedir. Kriyojellerin FTIR spektrumları katı halde, IR spektroskopi cihazının ATR modunda çalışılarak alınmaktadır. Bu yöntemde kuru haldeki kriyojeller kristal üzerine konulur ve üzerine infrared ışığı gönderilerek maddenin spektrumu alınmaktadır.

Azot adsorpsiyon porozimetri yöntemiyle, kriyojelin yüzey alanı, gözenek boyutu, gözenek hacmi, parcacık boyutu ve gözenek dağılımı gibi özellikleri belirlenmektedir. BET metoduna göre yapılan analizlerle –198 ℃ deki sıvı azot ortamında azot (N_2) gazı adsorpsiyonu tekniğine dayalı olarak katıların m^2g^{-1} olarak yuzey alanları ölçülebilmektedir.

Sişme testiyle de kriyojellerin hidrofilik karakterde olmaları ve hacimlerinin % 150 sine kadar su tutma kapasiteleri bulunduğundan, sentezlenen kriyojele özgü bünyesindeki su tutma kapasitesi ve su tuttuğunda hacmindeki esneme miktarı belirlenebilmektedir. Kriyojellerin sişme oranı asağıdaki eşitlik 2.1 ile bulunabilir.

Sişme oranı (%): [(Wşişmiş – Wkuru) / Wkuru] x 100 (2.1)

Wşişmiş: şişen kriyojellerin ağırlığı, Wkuru: kuru kriyojellerin ağırlığı

2.6.7. FPLC cihaz bileşenlerinin özellikleri

FPLC cihazında aşağıda belirtilen türden dedektörler kullanılabilir;

UV-Vis dedektör; Ksenon flas lambası hem UV hem görünür bölge aralığında çalışır (190-700nm). Çift yollu akış hücresi dinamik absorbans aralığını 10-5'den 40 AU'nin üzerine kadar genişletir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Floresans dedektörüyle lüminesans, fosforesans, kemilüminesans ve biolüminesans ölçümleri mümkündür.

Kırılma indisi Dedektörü; polimerler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, alkoller ve yağ asitleri gibi absorbans yapamayan bileşiklerin analizleri için idealdir.

FPLC cihazında kullanılan pompa, güçlü mekanik motoru sayesinde 4000 psi (275 bar) geri-basınçlarına kadar dakikada 50 ml sıvı pompalayabilir.

FPLC cihazındaki fraksiyon toplayıcısında 18 mm çapındaki tüpler için 144 parca kapasitesi vardır.

FPLC cihazında farklı analiz metotları için farklı kolonlar kullanılabilir:

İyon-değiştirme metodu icin; Hiprep 16/10 Q sefaroz XL ve Hiprep 16/10 SP sefaroz XL kolonları bulunur. Sefarozla önceden paketlenmiş Q XL or SP XL ortamı, 20 ml preparatif anyon ve katyon-değişim kolonları yüksek yükleme kapasitesi ve hızlı elüsyon sağlar.

Jel filtrasyon metodu için; Hiload 16/60 süperdex 200pg ve Hiload 26/60 superdex 75 pg kolonları bulunur. Süperdex 75 kolonu prep peptidler, daha büyük proteinler, oligosakkaritler yani Mr 3000-70000, için uygundur; Superdex 200 kolonu ise prep antikorlar ve Mr 10000-600000 proteinler icin uygundur.

FPLC'de hazırlanan örneklerin özelliklerine bakıldığında, 100µL-5mL arasında berrak ve safsızlıklardan arındırılmış sıvı örneğin FPLC sistemine enjeksiyonu yapılabilir. Biliniyorsa örnek içerisindeki protein miktarı veya derişimi de verilmelidir. Analizi yapılacak örnek, FPLC cihazına enjeksiyonla verilir ve hareketli faz sayesinde ayırımın yapılacağı kolona taşınır (Biçen 2009).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan saf penisilin açilaz, 6-nitro-3-fenilasetamidobenzoik asit (NIPAB), 2-Hidroksietilmetakrilat (HEMA), Amonyum per sülfat (APS), 4-aminoantipirin ve metakroilklorür Sigma (St Louis, USA) firmasından temin edilmiş ve metakroilklorür düşük basınç altında damıtılarak polimerizasyon inhibitörlerinden arındırılmıştır. N, N'- Metilen bisakrilamit (MBAAm) Fluka, Chemica ve N, N, N', N'- Tetrametiletilendiamin (TEMED) Fluka, BioChemica firmalarından temin edilmiştir. Diğer çözelti hazırlamada kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Kimyasallar kullanılıncaya kadar +4 ℃'de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Monomer ve polimerlerin karakterizasyon çalışmalarında Shimadzu 8000 model FTIR, JEOL- JEM 1220EX model (Tokyo, Japan) taramalı elektron mikroskobu (SEM), Quontachrome, Nova 2200e model spesifik yüzey alanı ölçüm (BET) cihazı ve ÄKTA, UPC-900, P 920 model FPLC cihazı kullanılmıştır. Adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları ve enzim aktivitesi çalışmalarında ise Shimadzu 1601 model spektrofotometre kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kriyojel kolonun hazırlanması

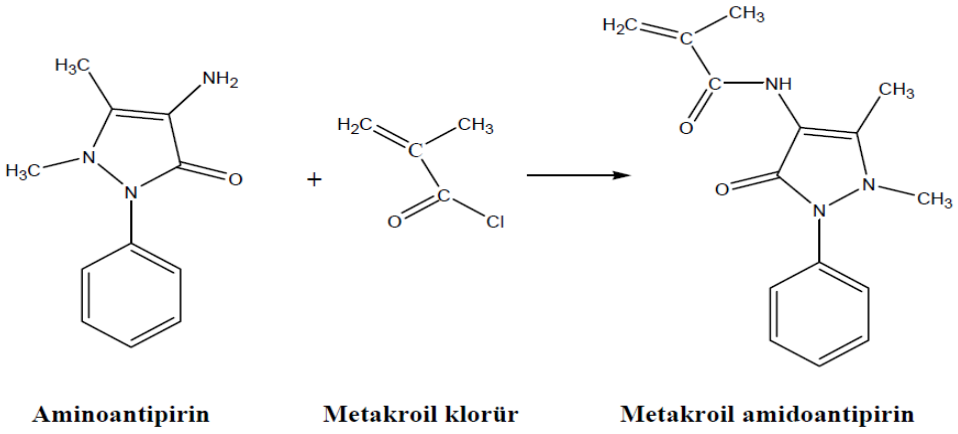
3.2.1.1. Metakroil amidoantipirin (MAAP) monomerinin sentezi

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 ºC'a soğutulmuş ve 0.26 mL (2.46 mmol) metakroilklorür yavaşça çözeltiye ilave edilmiştir. Bu çözelti azot

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

atmosferi altında manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyon sonunda çözelti önce 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 3.1'de verilmiştir.

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



Şekil 3.1. Metakroil amidoantipirin (MAAP) monomerinin sentez reaksiyonu

3.2.1.2. Poli(HEMA-co-MAAP) kolon materyalinin sentezi

Bu çalışmada; metakroil amidoantipirin tutturulmuş 2-hidroksi etil metakrilat (HEMA) tabanlı süper makro gözenekli kriyojeller serbest radikal karyokopolimerizasyonu yöntemiyle sentezlenmiştir. Bu amaçla 56 mg N,N'-Metilen bis akrilamit 1 mL deiyonize suda çözülmüştür. Bu çözeltiye 260 µL HEMA monomeri ve 740 µL deiyonize su eklenerek monomer-çapraz bağlayıcı karışımı oluşturulmuştur. Hazırlanan karışıma 6 mg metakroil amidoantipirin (MAAP) ve 3 mL deiyonize su eklenerek 10 dak. süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırılıp 5 dak. ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Hazırlanan karışım 20 dak. -4 ^{0}C 'de tutulmuştur. Polimerizasyonun başlaması için gerekli olan 4 mg amonyum per sülfat ve 5 µL TEMED eklenerek, alt ucu parafinle kapatılmış olan 5 mL'lik 0.8 cm çaplı enjektöre doldurularak önce 2 saat süreyle -12 ^{0}C'de daha sonra da

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

16 saat süreyle -20 ^{0}C'de dondurulmuştur. Bu sürenin sonunda kriyojel matriksi oda sıcaklığına alınmış ve 4 saat bekletilmiştir. Oluşan polimer ağı arasındaki buz kristallerinin çözülmesi sonucunda birbirine bağlantılı makro gözenekli ve bu gözeneklere MAAP tutturulmuş HEMA tabanlı kriyojel oluşturulmuştur. Sentezlenen kriyojel, önce % 75'lik, % 50'lik ve % 25'lik etanol çözeltisinin 5 mL'siyle daha sonra da 10 mL deiyonize suyla yıkanarak, reaksiyona girmemiş safsızlıklardan arındırılmıştır. Daha sonra kullanılıncaya kadar % 0.02'lik sodyum azid çözeltisi içerisinde bekletilmiştir.

3.2.2. Karakterizasyon çalışması

3.2.2.1. Yüzey morfolojisi

Poli(HEMA-co-MAAP) kolon materyalinin yapısı ve yüzey morfolojisi SEM kullanılarak belirlenmiştir. Kriyojelden 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 elektron mikroskobu ile görüntüleri alınmıştır.

3.2.2.2. Yüzey alanı ölçümü

Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel kolonu tartılarak BET yöntemiyle yüzey analizi yapılmıştır. Analizde kriyojellerin gözeneklerine azot adsorpsiyonu yapılarak, polimerin yüzey alanı belirlenmiştir. Cihazda 10 noktaya göre analiz yapılarak kriyojelin gram başına düşen yüzey alanı bulunmuştur.

3.2.2.3. Şişme Testi

Poli(HEMA-co-MAAP) kolon materyalinin ve poli(HEMA) kriyojelinin denge şişme oranının belirlenmesinde aşağıda verilen yöntem izlenmiştir. Kuru kriyojel ± 0.0001 duyarlıkla tartılmış ve 50 mL saf su içeren kaba konulmuştur. Daha sonra kriyojenik polimer sudan alınmış, süzgeç kâğıdı yardımı ile yüzeydeki su uzaklaştırılarak tartılmıştır. Kuru ve ıslak ağırlıklar kaydedilmiş ve eşitlik 3.1 ile poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel kolon materyalinin ve poli(HEMA) kriyojelinin su tutma miktarı belirlenmiştir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Şişme oranı (%) = $[(Ws-W_0)/W_0] \times 100$ (3.1)

W_0 ve Ws sırası ile kriyojelin şişmeden önceki ve sonraki ağırlıklarını ifade etmektedir.

3.2.2.4. FTIR analizi

MAAP monomerinin FTIR spektrumu, yaklaşık 0.1 g MAAP'ın KBr ile karıştırarak tablet hazırlanmış ve FTIR spektrumu alınmıştır. Poli(HEMA) ve poli(HEMA-co-MAAP) kriyojellerinin FTIR spektrumları ise ATR modunda alınmıştır.

3.2.3. Hücre kültürleri ve ham ekstraktların hazırlanması

3.2.3.1. Mikroorganizmalar

Penicillium chrysogenum NRRL 1951, Penicillium chrysogenum 807 Amerika Birleşik Devletleri Tarımsal Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. *Penicillium purpurogenum 455* ise topraktan izole edilmiştir.

3.2.3.2. Inokulum (kültür) 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.

3.2.3.3. Enzim üretimi

Enzim üretimi, $4x10^6$ spor mL^{-1} spor süspansiyonu ile inoküle edilmiş 100 mL sıvı besi ortamı içeren 250 mL erlenmayerde gerçekleştirilmiştir. Besi ortamının bileşimi ise; 24 g patates dextroz, 3 g KH_2PO_4, 7 g K_2HPO_4, 1 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.2 g, $MgSO_4.7H_2O$ ve 2 g fenilasetik asitL^{-1} şeklindedir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Mikroorganizma büyümesi ve enzim üretimi 2 gün içerisinde 25 ^{0}C ve 120 rpm'de başlamıştır.

3.2.3.4. 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 dak. buz banyosu içinde homojenize edilmiştir. Numuneler 4 ^{0}C'de 23500 g hızında 30 dak. santrifüj edilmiştir. Daha sonra supernatant toplanmış ve enzim çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.4. Adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları

3.2.4.1. Kriyojel kolona PA adsorpsiyonu

Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel kolonuna sulu çözeltilerden PA adsorpsiyonu sürekli sistemde çalışılmıştır. Adsorpsiyon kapasitesine; başlangıç penisilin açilaz derişimi, pH, iyonik şiddet ve akış hızı etkisi incelenmiştir.

Adsorpsiyon işlemlerinden önce kriyojel, 30 mL deiyonize su ile yıkanmış ve daha sonra 0.1 M NaCl içeren adsorpsiyon tamponu ile dengeye getirilmiştir. Penisilin açilaz çözeltisi kriyojel kolondan geçirilmiş, kolondan çıkan çözelti ise ayrı bir beher içinde toplanmıştır. Toplanan çözeltideki PA miktarı Bradford metoduyla spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (595 nm) (Bradford 1976).

Kriyojel kolona adsoplanan penisilin açilaz miktarının hesaplanmasında aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

$$Q = [(Co-C) \times V] / m \qquad (3.2)$$

Bu eşitlikte; Q, birim kriyojel polimer başına adsorplanan penisilin açilaz miktarını (mgg^{-1}), Co ve C sulu çözeltideki penisilin açilaz'ın başlangıç ve son derişim değerlerini (mgmL^{-1}), V sulu çözelti hacmi (mL) ve m ise kullanılan kriyojel kolonun kütlesini (g) vermektedir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

3.2.4.2. Kriyojel kolondan PA desorpsiyonu

Penisilin açilaz desorpsiyonu için 1 M NaOH desorpsiyon ajanı olarak kullanılmıştır. Desorpsiyon çalışmalarında, 30 mL desorpsiyon ajanı 1.0 $mldk^{-1}$ akış hızında 1 saat süresince kolondan geçirilmiştir. Desorpsiyon ortamındaki son penisilin açilaz derişimi Bradford yöntemiyle (Bradford 1976) spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Desorpsiyon oranı aşağıdaki eşitlik (Eşitlik 3.3) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Desorpsiyon \%} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamına salınan penisilin açilaz}}{\text{Adsorplanan penisilin açilaz}} \times 100 \qquad (3.3)$$

3.2.5. Enzim aktivitesi çalışmaları

Penisilin açilaz 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 kriyojel kolona adsoplanan penisilin açilaz ile 37 ^0C'de etkileştirilmiştir. Sonuçta ürün olarak oluşan 6-nitro-3- aminobenzoik asit miktarındaki zamana bağlı değişimin 405 nm'de spektrofotometrik olarak tayiniyle penisilin açilaz 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 (Eşitlik 3.4) hesaplanmıştır.

$$\text{Enzim Aktivitesi } (IUmL^{-1}) = \Delta Abs/\Delta T.V.4.49 \qquad (3.4)$$

Bu eşitlikte; ΔAbs, absorbanstaki değişimi, ΔT, zaman değişimini ve V, numune hacmini ifade etmektedir.

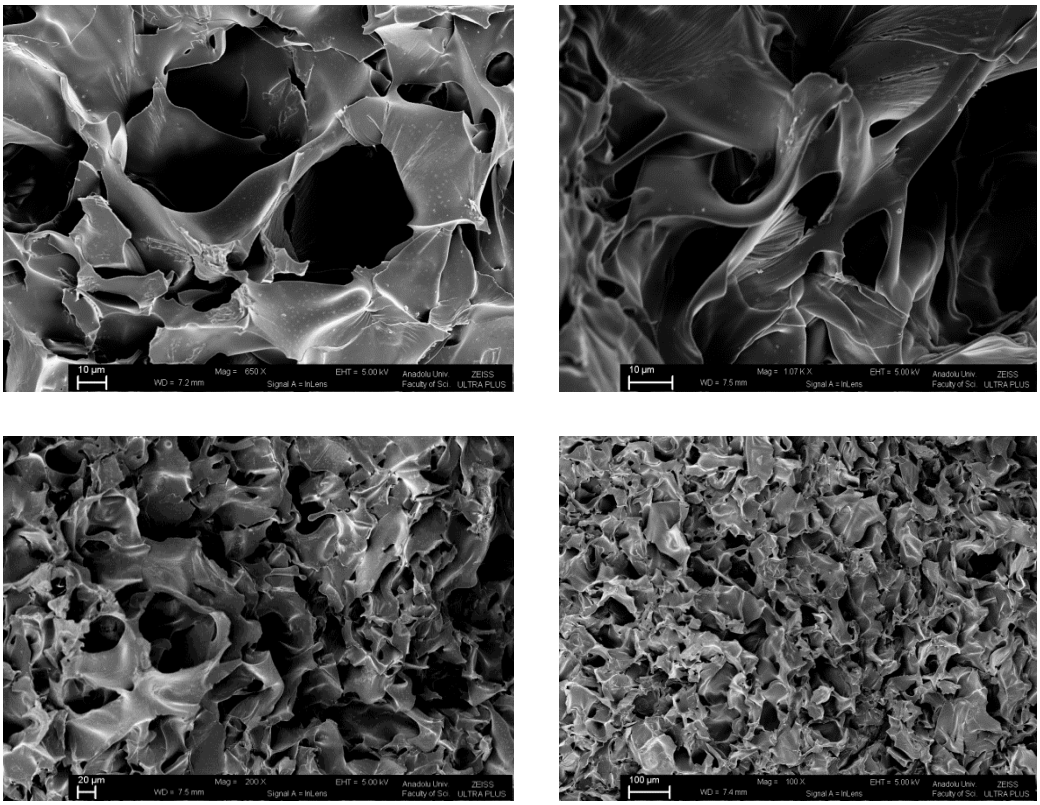
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

4. BULGULAR

4.1. Poli(HEMA-co-MAAP) Kriyojel Kolon Materyalinin Karakterizasyonu

4.1.1. Yüzey morfolojisi

Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel kolon materyalinin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi sentezlenen kriyojelin gözenek boyutu enzim saflaştırmasına imkan verecek kadar büyüktür ve heterojen bir gözenek dağılımına sahiptir.



Şekil 4.1. Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojelin SEM görüntüsü

4.1.2. Yüzey alanı ölçümü

MAAP ligandı içeren kriyojel kolonun spesifik yüzey alanı BET yöntemiyle 25.8 m^2g^{-1} olarak bulunmuştur.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

4.1.3. Şişme testi

Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojenik kolon polimerik yapıda, büyük gözenek boyutuna sahip, çapraz bağlı, hidrofilik bir matrikstir. Sulu ortamda çözünmez, fakat bağ derecesine ve hidrofilitesine bağlı olarak yüksek oranda şişme özelliği gösterirler. Bu çalışmada sentezlenen poli(HEMA-co-MAAP) kriyojelin denge şişme oranı % 1463,97 olarak bulunmuş ve poli(HEMA) kriyojelin denge şişme oranı ise % 1500 olarak bulunmuştur.

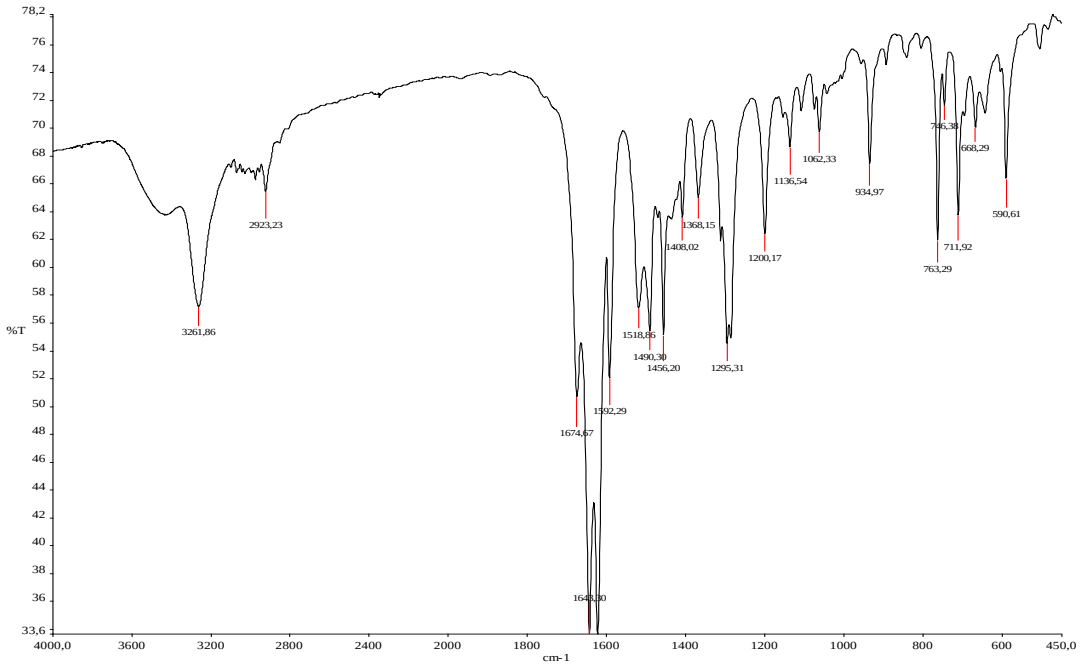
4.1.4. FTIR analizi

MAAP monomerinin karakterizasyonu için kullanılan FTIR analizlerinin (Şekil 4.2) karakteristik pikleri şöyledir: FTIR (KBr, cm^{-1}): 770–710 cm^{-1} (monosubstitüye benzen halkası), 1580 ve 1500 cm^{-1} (aromatik halkadaki konjugasyon, kuvvetli iki veya üç band), 1600 cm^{-1} (metakril çift bağı), 1642 cm^{-1} (amid karbonil bandı), 1730 cm^{-1} (siklik keton pozisyonunda karbonil bandı), 2975 ve 2925 cm^{-1} (C-H bandı), 3260 cm^{-1} (N-H bandı).

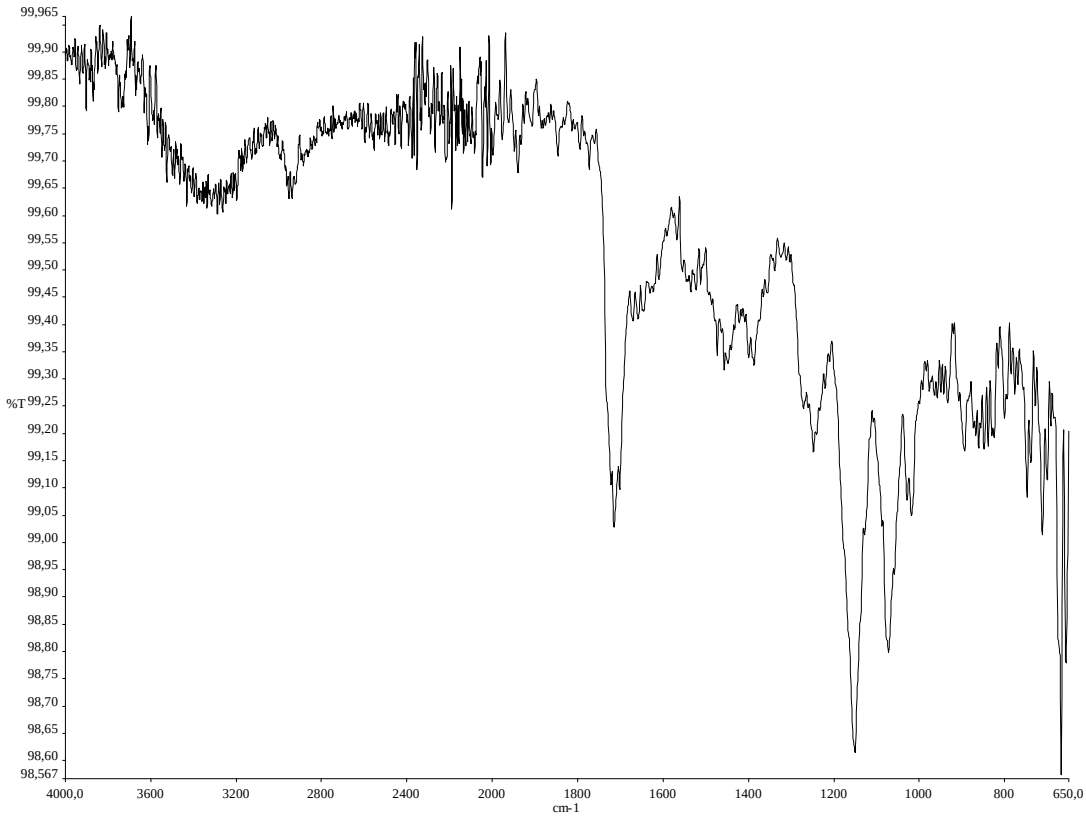
Poli(HEMA) kriyojeline ait FTIR spektrumları ATR modunda alınmıştır. Elde edilen pikler şekil 4.3'te görülmektedir. 3400 cm^{-1}'de OH bandı, 3000 cm^{-1}'de N-H bandı, 2400 cm^{-1}'de C-H gerilmesine ait pik, 1700 cm^{-1}'de C=O piki, 1190-1280 cm^{-1}'de C-O pikleri görülmektedir.

Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojelinin FTIR piklerinde (Şekil 4.4) 3275 cm^{-1}'de OH bandı, 1630 cm^{-1}'de C-N bandı, 1161 cm^{-1}'de siklik halkaya ait pik, 1088 cm^{-1}'de ise aromatik halkaya ait pik görülmektedir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

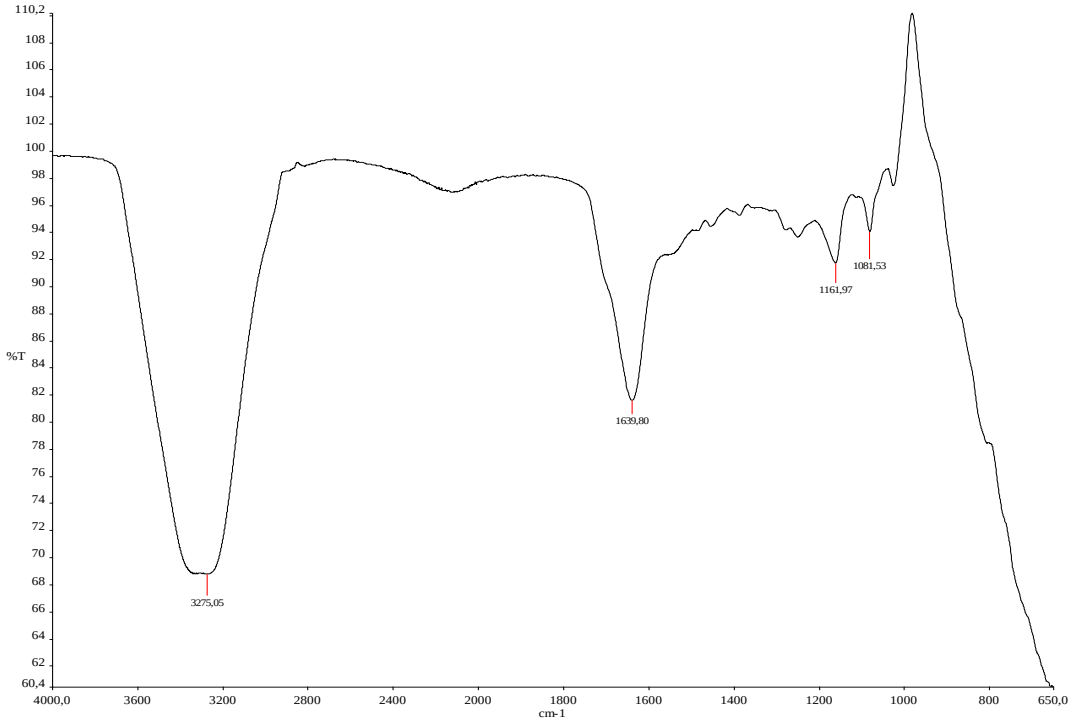


Şekil 4.2. MAAP monomerinin FTIR spektrumu



Şekil 4.3. Poli(HEMA) kriyojeline ait FTIR spektrumu

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



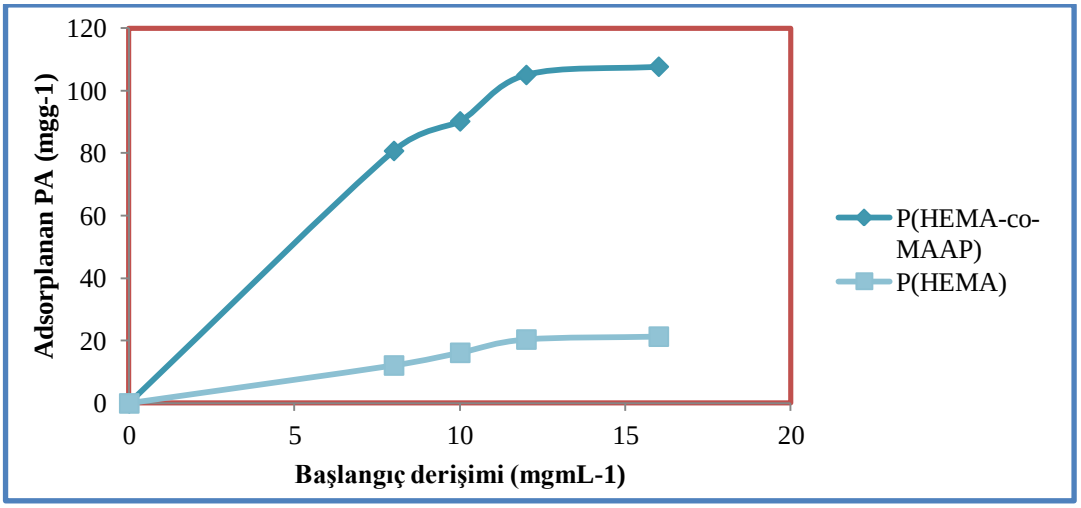
Şekil 4.4. Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojeline ait FTIR spektrumu

4.2. Sulu Çözeltilerden PA Adsorpsiyonu

4.2.1. PA başlangıç derişimi etkisi

Şekil 4.5'te PA'nın başlangıç derişiminin adsorpsiyona etkisi verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi PA derişiminin artmasıyla, kriyojelin birim kütlesi üzerine adsorplanan PA miktarı, 12 mgmL^{-1}'den düşük derişimlerde artmış, daha sonra dengeye ulaşmıştır. Bu durum adsorpsiyon için sürücü kuvvet olan derişim farkının (ΔC) artmasıyla artmaktadır. Sürücü kuvvetin artmasıyla adsorpsiyon kapasitesinde artış gözlenmektedir. Bu artış kriyojel yüzeyinde spesifik protein-ligand etkileşimi dengeye gelinceye kadar devam etmektedir. Denge durumundan sonra adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir değişim gözlenmemiştir. Boş kriyojel kolonun penisilin açilaz adsorplama miktarı ise enzime afinite gösteren bir ligand olmadığı için oldukça düşüktür.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



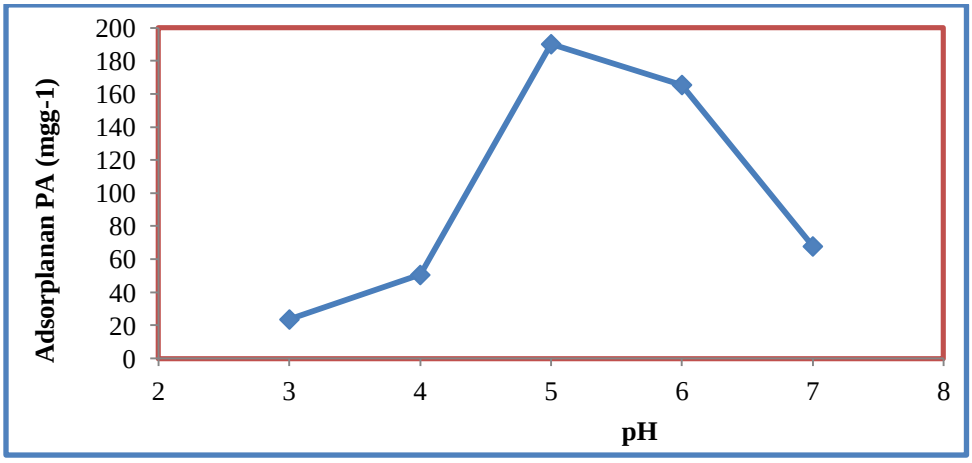
Şekil 4.5. Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel kolona ve poli (HEMA) kriyojel kolona adsorplanan penisilin açilaz miktarının penisilin açilaz başlangıç derişimi ile değişimi
T: 25℃; Akış hızı: 1mLdk^{-1}; Adsorpsiyon süresi: 2 saat

4.2.2. pH Etkisi

Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojele PA adsorpsiyonunun pH etkisini(Şekil 4.6) incelemek için çözelti pH'sı 3.0-7.0 aralığında değiştirilmiştir. PA'nın maksimum adsorplandığı pH değeri pH = 5 olarak belirlenmiştir. Bu pH'da adsorplanan PA miktarı 190.2 mgg^{-1} olarak bulunmuştur. Penisilin açilaz'ın izoelektrik pH değeri 6.7-6.8 civarındadır. Fakat; maksimum adsorpsiyona pH 5'te ulaşılmıştır. Bu durum poli(HEMA-co-MAAP) kriyojeline PA bağlanmasında diğer zayıf etkileşimlerin yanı sıra büyük oranda hidrofobik etkileşimlerin de etkin olduğunu ortaya koymaktadır. Gerçekte bir proteinin izoelektrik noktasında net yükün sıfır olması, proteinin yüklü gruplardan yoksun olduğu anlamına gelmemektedir. Aminoasit bileşimine bağlı olarak, bir proteinin izoelektrik pH (pI) noktasında çeşitli yüklü gruplara sahip olabilir. Bu yüzden proteinin bir afinite sistemiyle etkileşimi pI değerinde olmayabilir.

Penisilin açilaz'ın aminoasit bileşimi incelendiğinde triptofan, fenilalanin ve tirozin gibi enzimin hidrofobik gruplarla etkileşimini kolaylaştıracak elektron verici grupların olduğu görülmüştür. İzoelektronik nokta dışında PA'nın elektron verici grupları MAAP ligandıyla spesifik etkileşime girdiği düşünülmektedir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

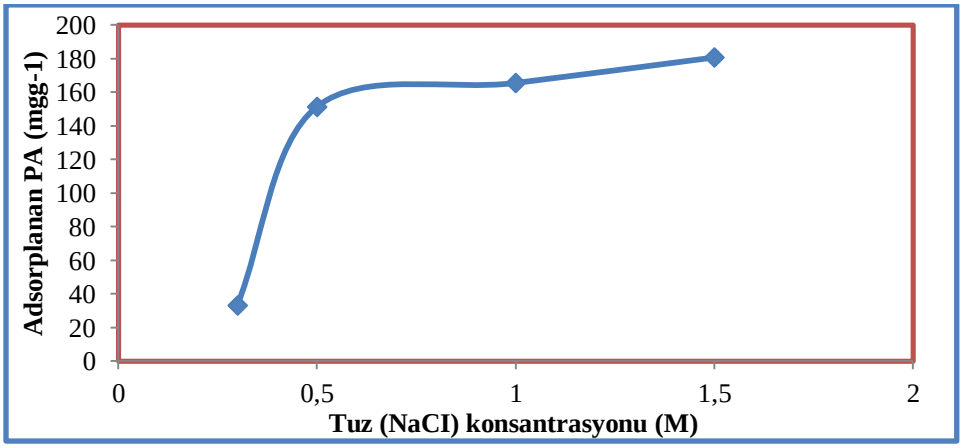


Şekil 4.6. Penisilin açilaz adsorpsiyonuna ortam pH'ının etkisi
T: 25°C; Akış hızı: 1mldk^{-1}; Adsorpsiyon süresi: 2 saat

4.2.3. İyonik şiddet etkisi

Dengeleme tamponuna ve örnek çözeltisine yüksek derişimlerde çeşitli tuzların ilavesi (salting-out) adsorpsiyonda hidrofobik etkileşimlerin olduğu sistemlerde ligand-protein etkileşmesini başlatır. Tuzun derişimi arttıkça bağlanan proteinlerin oranı da neredeyse doğrusal olarak belli bir tuz derişimine kadar artar ve daha yüksek derişimlerde eksponansiyel bir şekilde hala artmaya devam eder. Bunun nedeni tuzların varlığında proteinlerin serbest enerjisi artar ve bu serbest enerji artışı protein moleküllerinin hidrofobik yüzey alanı ile orantılıdır. Çünkü tuz çözücü ortamıyla proteinin yüzey temas alanını mümkün olduğunca azaltır ve serbest enerjide minimum artış oluşturur. Bu nedenle, yüksek tuz derişimli ortamda proteine bağlanan formlar, bağlanmamış proteinlerden termodinamik olarak daha kararlıdır. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde dengeleme çözeltisinde yüksek tuz derişiminin kullanılması ligand-protein etkileşimlerini ve sonuç olarak da protein alıkonmasını artırır. Şekil 4.7'de tuz derişiminin PA adsorpsiyonuna etkisi verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi tuz derişimi artıkça PA adsorpsiyon kapasitesinde önemli derecede artma gözlenmiş, 1 M'dan sonra denge durumu oluşmuştur.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 4.7. Penisilin açilaz adsorpsiyonuna iyonik şiddet etkisi
T: 25°C; Akış hızı: 1mldk^{-1}; Adsorpsiyon süresi: 2 saat

4.2.4. Akış hızı etkisi

PA adsorpsiyonuna ilişkin akış hızı çalışmaları poli(HEMA-co-MAAP) kriyojelinin FPLC cihazında kolon olarak kullanılması ve 10 mgmL^{-1} PA'nın farklı akış hızlarında geçirilmesiyle elde edilen pik alanlarının karşılaştırılmasıyla yapılmıştır. FPLC cihazında 0.5; 0.8; 1; 1.5 mldk^{-1} akış hızlarında çalışılmış ve maksimum adsorpsiyonun 1 mldk^{-1}'da olduğu saptanmıştır.

4.3. Adsorpsiyon İzotermleri

Adsorpsiyon izotermi, her bir molekülün adsorbanlarla etkileşimlerinin karakterizasyonu için kullanılır. Adsorpsiyon izotermi, iki faz dengede iken katı faza adsorbe olan iyon miktarı ve çözeltideki moleküllerin derişimi arasında ilişki kurulmasını sağlar. Langmuir adsorpsiyon modeli, her biri yalnız bir molekülü tutmaya elverişli belirli sayıdaki tanımlanmış bölümlere moleküllerin adsorbe olduğunu var sayar. Bu bölümlerin enerji olarak eş değer olduğu ve yakın bölümlerdeki adsorbe olmuş moleküllerle arasında hiçbir etkileşim olmayacak kadar birbirinden uzak olduğu varsayılır. Langmuir denklemi eşitlik 4.1 ile aşağıdaki gibi gösterilebilir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

$$Q = Q_{max}.b.C_{eq}/(1+bC_{eq}) \quad (4.1)$$

Q = Adsorbana adsorplanmış PA derişimi (mgg^{-1})

C_{eq} = Çözeltideki PA denge derişimi ($mgmL^{-1}$)

b = Langmuir sabiti (Lmg^{-1})

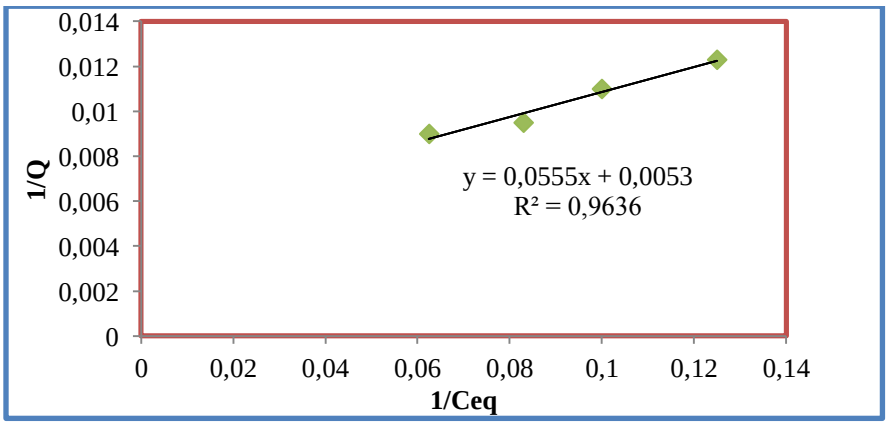
Q_{max} = Maksimum adsorpsiyon kapasitesi (mgg^{-1})

Bu denklem eşitlik 4.2 ile aşağıdaki gibi lineerleştirilebilir.

$$1/Q = [1/(Q_{max}b)].[1/C_{eq}] + [1/Q_{max}] \quad (4.2)$$

1/Q'ya karşı $1/C_{eq}$ grafiğe geçirildiğinde; kesim $1/Q_{max}$, eğim ise; $1/Q_{max}b$'yi verir. Şekil 4.8'de PA adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon modelinin grafiği verilmiştir.

Adsorpsiyon izotermleri, adsorpsiyon özelliklerini değerlendirmek amacıyla yapılan kesikli deneylerle belirlenmiştir. Deneysel veriler sonucunda, PA'nın adsorpsiyonu için maksimum adsorpsiyon kapasitesi (Q_{max}) elde edilmiştir. Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojeli için, korelasyon katsayısı (R^2) 0.9636 gibi yüksek bir değer, maksimum adsorpsiyon kapasitesi (Q_{max}) 188.68 mgg^{-1} ve Langmuir sabiti (b) 0.0964 Lmg^{-1} olarak bulunmuştur.



Şekil 4.8. Penisilin açilaz için Langmuir adsorpsiyon izotermi

Sisteme uygulanan diğer bir adsorpsiyon modeli ise Freundlich izotermidir. Freundlich denklemi ideal olarak temiz ve homojen olmayan katı

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

yüzeylerdeki adsorpsiyonlar için Alman fizikokimyacı Herbert Max Finlay Freundlich tarafından deneysel çalışmalara bağlı olarak türetilmiştir. (Sarıkaya 1993) Freundlich denklemi aşağıda verilen eşitlikle gösterilmektedir.

$$\ln Q = \ln K_f + n \ln C_{eq} \qquad (4.3)$$

Bu eşitlikte;

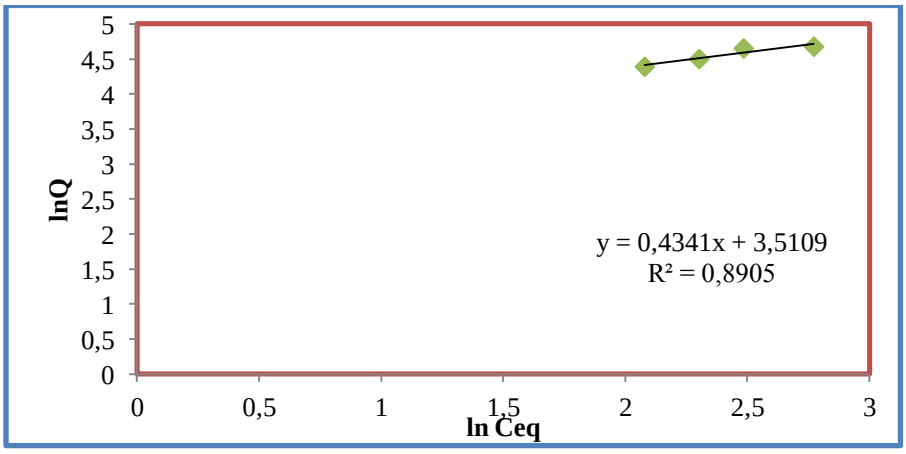
Q = Adsorplanan PA miktarı (mgg^{-1})

C_{eq} = Çözeltideki PA denge derişimi ($mgmL^{-1}$)

n = Freundlich sabiti

K_f = Freundlich sabiti

lnQ'ya karşı $\ln C_{eq}$ grafiğe geçirildiğinde doğrunun y eksenini kestiği noktadan K_f ve eğimden de n sabitleri bulunabilir. Şekil 4.9'da poli(HEMA-co-MAAP) kriyojeline PA adsorpsiyonu için Freundlich adsorpsiyon modelinin grafiği verilmiştir. PA adsorpsiyonu için elde edilen veriler, sırasıyla Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermine uygulanmıştır. Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da görüldüğü gibi PA adsorpsiyonunun Langmuir izotermine uyduğu bulunmuştur. Çünkü elde edilen grafiklerin korelasyon sabitlerine (R^2) bakıldığında Langmuir için hesaplanan değer (0.9636), Freundlich için hesaplanan değerden (0.8905) daha yüksek çıkmıştır.



Şekil 4.9. Penisilin açilaz için Freundlich izotermi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Dolayısıyla sınırlı sayıda bağlanma bölgesi içeren bir yüzey üzerine tek basamaklı bir adsorpsiyon gerçekleştiği söylenebilir.

Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojeli üzerine PA adsorpsiyonuna ilişkin deneysel veriler çizelge 4.1'de verilmiştir.

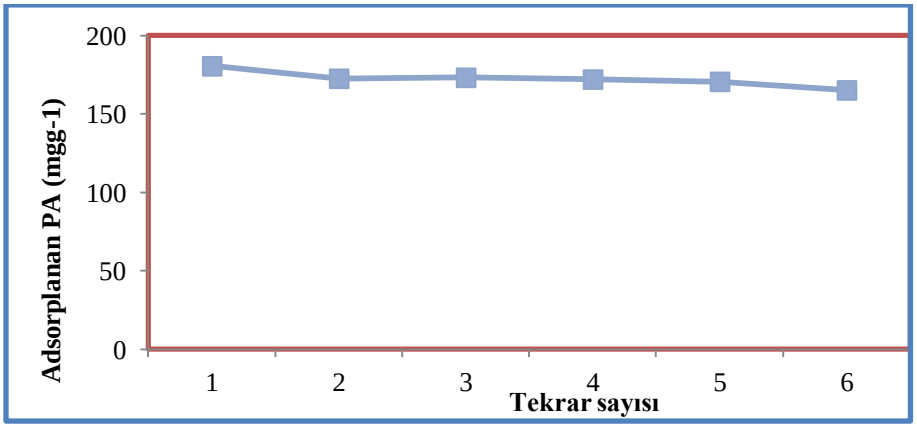
Çizelge 4.1. Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel kolonuna PA adsorpsiyonuna ilişkin Langmuir ve Freundlich izotermlerinin karşılaştırılması

	Deneysel	**Langmuir**			**Freundlich**		
	Q ($mg.g^{-1}$)	**Q_{max} ($mg.g^{-1}$)**	**b (Lmg^{-1})**	**R^2**	**K_f**	**n**	**R^2**
MAAP' lı Kriyojel	107.69	188.68	0.0964	0.9636	33.49	0.43	0.8905

4.4. Poli(HEMA-co-MAAP) Kriyojel Kolonunun PA Adsorpsiyonunda Tekrar Kullanılabilirliği

Bir afinite adsorbanında aranılan 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(HEMA-co-MAAP) kriyojel kolonunun tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla aynı adsorbent 6 kez adsorpsiyon-desorpsiyon işleminde kullanılmıştır (Şekil 4.10). Sterlizasyon amacıyla her adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi sonrası kriyojel distile su ve daha sonra dengeleme için sodyum fosfat tamponu (pH 5.0) ile yıkanmıştır. 6 kez tekrarlanan adsorpsiyon desorpsiyon işlemleri sonrasında adsorpsiyon kapasitesinde kayda değer bir azalma gözlenmemiştir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



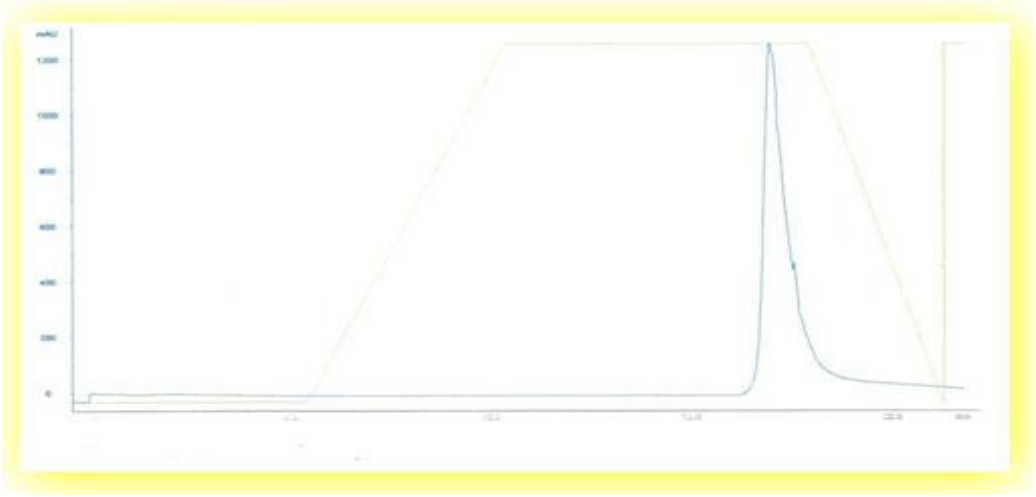
Şekil 4.10. Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel kolonunun tekrar kullanılabilirliği

4.5. Poli(HEMA-co-MAAP) Kriyojel Kolonuna Ham Ekstrattan PA Adsorpsiyonu

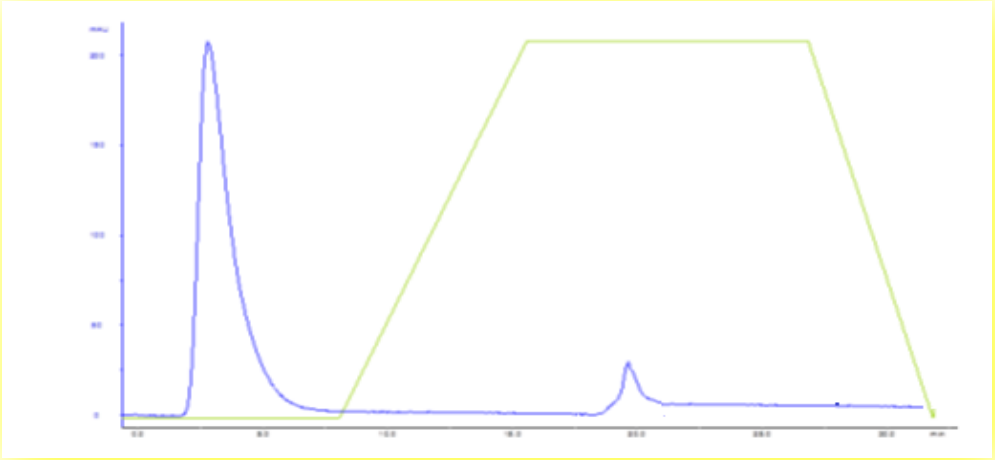
Ham ekstrakt ile gerçekleştirilen adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları Amerika Birleşik Devletleri Tarımsal Araştırma Merkezi'inden temin edilen ve fakültemiz Biyoloji Bölümü'nde üretilen *Penicillium chryosogenum (NRRL 1951), Penicillium chryosogenum 807* ve *Penicillium purpurogenum* mikroorganizmaları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel FPLC'de kolon materyali olarak kullanılmıştır. Hazırlanan ham ekstraktlar FPLC kolonuna verilmiştir. Desorpsiyon ajanı olarak 1 M NaOH kullanılmıştır. Desorpsiyon ajanı ile birlikte gelen pik toplanmış ve saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan çözeltide bulunan protein derişimi Bradford metoduyla (Bradford 1976) spektrometrik olarak tayin edilerek poli(HEMA-co-MAAP) kriyojeline adsorplanan enzim miktarı bulunmuştur. FPLC'de gözlenen pikler şekil 4.11 ve şekil 4.12'de görülmektedir. Şekilden görüldüğü gibi ham ekstraktta bulunan ve pseudospesifik poli(HEMA-co-MAAP) kriyojeline afinite gösteren penisilin açilaz desorpsiyon ajanı ile birlikte gelmiştir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 4.11. Ticari penisilin açılazın sulu çözeltisine ait FPLC kromatogramı
A: 0.1M NaCl; B: 1M NaOH T: 25 ℃; Akış hızı: 1mldk^{-1}; Adsorpsiyon süresi: 1 saat



Şekil 4.12. Biyolojik numuneden elde edilen PA'a ait FPLC kromatogramı
A: 0.1M NaCl; B: 1M NaOH T: 25 ℃; Akış hızı: 1mldk^{-1}; Adsorpsiyon süresi: 1 saat

Şekil 4.12'deki kromatogramda alıkonma zamanları (t_R) PA için 21, bağlanmayan türler için 4 dak. olarak görülmektedir. Bu değerlerden yararlanılarak kriyojel kolonun ayırma kapasitesi belirlenmiştir. Buna göre; ayırıcılık sabitleri (Rs), kapasite faktörleri (k′), seçicilik faktörleri (α) ve teorik plaka sayıları (N) aşağıda verilen denklemler kullanılarak hesaplanmıştır (Eşitlik 4.4, 4.5, 4.6, 4.7).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

$$Rs = 2(t_2 - t_1)/(\omega_2 - \omega_1) \quad (4.4)$$

$$k' = (t_R - t_0)/t_0 \quad (4.5)$$

$$\alpha = k'_2/k'_1 \quad (4.6)$$

$$N = 5.54(t_{R/W0.5})^2 \quad (4.7)$$

Bu eşitliklerde t_2, PA için alıkonma zamanı, t_1, bağlanmayan proteinler için alıkonma zamanı, t_0 kolonda enjeksiyona kadar geçen ölü zaman, ω_2, ikinci pikin taban genişliği, ω_1 ise ilk pikin taban genişliğidir. Teorik tabaka sayısını hesaplarken kullanılan $w_{0.5}$ değeri ise pik maksimum yüksekliğinin yarı yüksekliğindeki pik genişliğine karşılık gelmektedir (Özcan 2007).

Bu eşitliklerden yola çıkılarak protein ayırımı için bulunan Rs, k', α ve N değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Bu çizelgede görüldüğü gibi protein ayırımı için bulunanan Rs ve α değerlerinin (6.8 ve 9.5) birden büyük olması, hazırlanan kriyojel kolonun iyi bir seçicilik faktörüne ve iyi bir ayırıcılığa sahip olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.2. FPLC'den elde edilen kromatografik ayırma verileri

	t_R	**N**	**k'**	**α**	**R_s**
Ham Ekstrakttan Saflaştırılan PA	21	4343	9.5	9.5	6.8
Ticari PA	21	4343	9.5		

Geleneksel penisilin açilaz saflaştırma teknikleri çöktürme, santrifüj ve adsorpsiyon gibi birbirini izleyen çok basamaklı işlemler gerektirmektedir. Tez kapsamında sunulan bu çalışmada ise tek basamakta penisilin açilaz saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. *Penicillium chryosogenum (NRRL 1951)*, *Penicillium chryosogenum 807* ve *Penicillium purpurogenum* mikroorganizmalarından penisilin açilaz saflaştırması çalışmalarından elde edilen sonuçlar çizelge 4.3'de verilmiştir. Bu tez kapsamında, *Penicillium chryosogenum (NRRL 1951)*, *Penicillium chryosogenum 807* ve *Penicillium purpurogenum*

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

bakteri türlerinden penisilin açilaz saflaştırılmasına yönelik olarak yeni bir destek materyali geliştirilmiştir. Pseudospesifik MAAP ligandı komonomer olarak kullanılarak yığın polimerizasyonu yöntemiyle poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel afinite kolonu sentezlenmiştir.

Çizelge 4.3. *Penicillium chryosogenum (NRRL 1951), Penicillium chryosogenum 807* ve *Penicillium purpurogenum 455* mikroorganizmalarından penisilin açilaz saflaştırılması

Numune	**Aktivite ($IUmL^{-1}$)**	**Protein ($mgmL^{-1}$)**	**Spesifik Aktv. (IUmg-1)**	**Saflaştırma Faktörü**	**Desorpsiyon %**
Penicillium chrysogenum (NRRL 1951)					
Ham Ekstrakt	0.205	4.8802	0.0419	---	---
1 M NaOH ile Elüsyon	0.018	0.024	0.75	17.89	95.6
Penicillium crysogenum 807					
Ham Ekstrakt	0.195	8.9166	0.019	---	---
1 M NaOH ile Elüsyon	0.096	0.092	1.043	54.9	92.3
Penicillium purpurogenum 455					
Ham Ekstrakt	0.005	2.8489	0.0018	---	---
1 M NaOH ile Elüsyon	0.001	0.056	0.018	10.0	86

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Sentezlenen kriyojel kolon konvansiyonel saflaştırma materyallerine karşı bazı üstünlüklere sahiptir. Makro gözenekli yapısından dolayı bir ön saflaştırma işlemi gerektirmeden ham eksrakttan doğrudan saflaştırma gerçekleştirilebilmektedir. Kriyojelin süngerimsi yapısı sayesinde FPLC sistemlerde karşılaşılan geri basınç probleminin önüne geçilmektedir. Ligand, kriyojel yapısına monomer olarak dahil edildiğinden geleneksel yöntemlerdeki ligand immobilizasyonu ve matriks aktivasyonu gibi toksik kimyasalların kullanıldığı işlemlere gerek kalmamaktadır. Geleneksel olarak penisilin açilaz saflaştırmak için kullanılan matrikslerde karşılaşılan ligand sızması probleminin de bu sayede önüne geçilmiştir.

Literatürde rapor edilen çalışmalarda Keçili ve ark. (2006) pseudospesifik MAAP ligandını etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) ile polimerleştirerek poli (EGDMA-MAAP) monolitik kolonu sentezlemiş ve penisilin açilaz adsorpsiyonunda kullanmıştır. Yapılan çalışmada, % 89 desorpsiyon oranı ile 35.5 saflaştırma faktörü elde etmiştir. Santarelli ve ark. (2000) epoksi ile aktifleştirilmiş sepharose jel üzerine immobilize edilmiş pseudospesifik ligand 4-aminoantipirin, 2-amino-3-benziloksipiridin, 3-amino-5-fenil pirazol, 4-hidroksibenzaldehit gibi ligandlar ile çalışmışlar ve % 85 desorpsiyon ile 1.5-2.2 arasında saflaştırma faktörü değerlerine ulaşmışlardır. Fitton ve Santarelli (2001) penisilin açilaz saflaştırılması için immobilize metal afinite kromatografisi kullanmışlar ve % 73 desorpsiyon ile 3.18 saflaştırma faktörü, % 97 desorpsiyon ile 12.34 saflaştırma faktörü elde etmişlerdir. Marcos ve ark. (1999) *Escherica coli*'den penisilin açilaz saflaştırmak amacıyla 2 fazlı poli(etilen glikol)-sodyum sitrat sistemi kullanmışlar ve 5.7 saflaştırma faktörü ile % 85 desorpsiyon değerine ulaşmışlardır.

Bu tez kapsamında poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel afinite kolonuna sulu çözeltilerden penisilin açilaz adsorpsiyonu derişim, pH, iyonik şiddet ve akış hızına bağlı olarak çalışılmıştır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sentezlenen kriyojellerin yüzey morfolojisi elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiş ve şekil 4.1'de görüldüğü gibi gözenek boyutu büyük, heterojen dağılıma sahip kriyojeller elde edilmiştir.

Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojelin spesifik yüzey alanı BET yöntemiyle 25.8 m^2g^{-1} olarak bulunmuştur.

Kriyojellerin gözenekleri içerisindeki su elle kolaylıkla sıkılabilmektedir. Sıkılan kriyojel parçası suya daldırıldığında 1-2 saniye içerisinde orijinal boyut ve şekline tekrar dönebilmektedir. Sentezlenen poli(HEMA-co-MAAP) kriyojellerin denge şişme oranı % 1463.97 olarak, poli(HEMA) kriyojellerin denge şişme oranı ise % 1300 olarak bulunmuştur.

Sentezlenen poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel kolonun adsorpsiyon kapasitesi pH 5'te (akış hızı: 1mldk^{-1}, T: 25 ℃, adsorpsiyon süresi: 2 saat) 190.2 mg^{-1}'lara kadar çıkmaktadır.

Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermlerinden hesaplanan korelasyon katsayıları (R^2) sırasıyla 0.9636 ve 0.8905 olarak bulunmuştur. Langmuir için hesaplanan korelasyon katsayısının (0.9636) daha yüksek çıkmasına bakılarak adsorpsiyon modelinin Langmuir adsorpsiyon modeline uyduğu gösterilmiştir. Langmuir izoterminden maksimum adsorpsiyon kapasitesi 188.68 mg^{-1} olarak hesaplanmıştır.

Poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel kolonuna *Penicillium chryosogenum (NRRL 1951), Penicillium chryosogenum 807* ve *Penicillium purpurogenum* mikroorganizmalarından elde edilen ham ekstraktlardan penisilin açilaz adsorpsiyon çalışmaları FPLC'de gerçekleştirilmiştir. FPLC kromatogramından yararlanarak hesaplanan Rs ve α değerlerinin (6.8 ve 9.5) 1'den büyük olması, hazırlanan kriyojel kolonun yüksek seçiciliğe ve iyi bir ayırıcılığa sahip olduğunu göstermektedir.

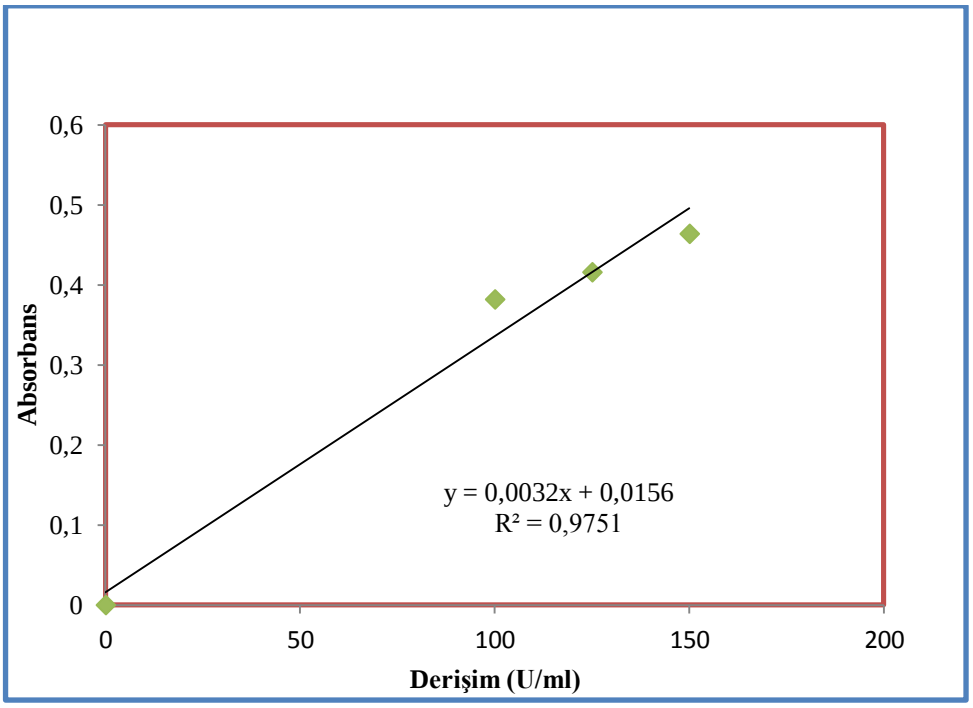
Desorpsiyon ajanı olarak 1 M NaOH kullanılmıştır. *Penicillium chryosogenum (NRRL 1951)* ile yapılan çalışmalarda 1 M NaOH ile % 95.6 desorpsiyon ve 17.89 saflaştırma faktörü, *Penicillium chryosogenum 807* ile gerçekleştirilen çalışmalarda % 92.3 desorpsiyon ve 54.9 saflaştırma faktörü, *Penicillium purpurogenum 455* ile yapılan çalışmalarda ise 1 M NaOH ile % 86 desorpsiyon ve 10.0 saflaştırma faktörü değerlerine ulaşılmıştır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Elde edilen sonuçlardan görüldüğü gibi pseudospesifik poli(HEMA-co-MAAP) kriyojel kolonu kullanılarak literatürde rapor edilen sonuçlarla kıyaslanabilecek saflaştırma faktörleri ile mikroorganizma ekstraktlarından penisilin açilaz saflaştırılma işlemi gerçekleştirilmiştir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

EK: Kalibrasyon Grafiği



ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

KAYNAKLAR

Acar, S., *Peptid protein kovalent konjugasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2006.

Arnold, F.H., "Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing" *Bio/Technology*, **9**, 150-155, 1991

Arroyo, M., Mata, I., Acebal, C., Castillon, M.P., "Biotecnological applications of penicilin acylases: state of the art" *Appl Microiol Biotechnol*, **60**, 507-514, 2003.

Babac, C. Yavuz, H., Galaev, Y. I ., Piskin, E., Denizli, A., "Binding of antibodies to concanavalin A-modified monolithic cryogel" *Reactive and Functional Polymers*, **66**, 1263 – 1271, 2006.

Bahçeci, Z., *Moleküler Biyoloji*, Ögrenci Kitabevi Yayınları, Kırsehir, 2002

Baumbach, G.A. ve Hammond, D.J., "Protein purification using affinity ligands deduced from peptide libraries" *Biopharm*, **5**, 24-35, 1992.

Biçen, Ö., *Moleküler baskılanmış polimer tabanlı kriyojel ayırma sistemleri ve biyo-ayırma uygulamaları*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2009

Bradford, M.M., "A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding" *Anal. Biochem*., **72**, 248-254, 1976.

Bueno, S.M., Legallais, C., Haupt, K. ve Vijayalakshmi, M.A., "Experimental kinetic aspects of hollow fiber membrane-based pseudobioafinity filtration : process for IgG separation from human plasma" *J.Membr.Sci*., **117**, 45-56, 1996.

Cunha, S., Oliveira, S., Rodrigues, M., Bastos, R., Ferrari, J., Oliveira, C., Kato, L., Napolitano, H., Vencato, I. Ve Lariucci, C., "Structural studies of 4-aminoantipyrine derivatives" *J.Molec.Struc*., **752**, 32-39, 2005.

Davankov, V.A ve Semechkın, A.V., "Ligand-exchange chromatography" *J. Chromatogr. A.*, **141**, 313-353, 1977.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Denizli, A. ve Pişkin, E., "Heparin Immobilized Polyhydroxyethylmethacrylate microbeads for cholesterol removal: A Preliminary Report" *J. Chromatogr. B.*, **670**, 157-161, 1995.

Diender, M.B., Straathof, A.J.J., Wielen, L.A.M., Ras, C., Heijnen, J.J., "Feasibility of the thermodynamically controlled synthesis of amoxicillin" *Journal of Molecular Catalysis B*, **5**, 249-253, 1998.

Doğan, A., Özkara, S., Sarı, M.M., Uzun, L., Denizli, A., "Evaluation of human interferon adsorption performance of Cibacron Blue F3GA attached cryogels and interferon purification by using FPLC system, *Journal of Chromatography B*, 69– 76, 893– 894, 2012.

Elander, R.P., "Industrial production of β-lactam antibiotics" *Appl Microbiol Biotechnol*, **61**, 385-392, 2003.

Emir Diltemiz, S., *Poli-(2-Hidroksietilmetakrilat-co-metakroilamidohistidin) mikroküre*lere *Cu(II) şelasyonu ve sitokrom-c adsorpsiyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2002.

Fitton, V., Santarelli, X., "Evaluation of immobilized metal affinity chromatography for purification of penicillin acylase" *J.Chromatogr. B.*, **754**, 135-140, 2001.

Galaev, Y. I., "Macroporous hydrogels, cryogel new materials for biotechnology" *Trends in Biotechnology*, **21**, 445-451, 2003.

Gavrilescu, M. ve Chisti, Y., "Biotechnology – a sustainable alternative for chemical industry" *Biotechnology Advances*, **23**, 471-499, 2005.

Ghadge, V.B., *Synthetic polymer based affinity matrices: seperation of Penicillin G acylase and penicillinase*, PhD Thesis, University of Pune, India, 2000.

Giordano, R.C., Ribeiro, M.A.P., Giordano, R.L.C., "Kinetics of β-lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization" *Biotechnology Advances*, **24**, 27-41, 2006.

Gözükara, E.M., *Biyokimya*, Dördüncü Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2000

Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A., "Industrial applications of microbial lipases" *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 235-251, 2006.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Huang, P.Y. ve Carbonell, R.G., "Affinity chromatographic screening of soluble combinatorial peptide libraries" *Biotechnol.Bioeng*, **63**, 633-641, 1999.

Illanes, A., Wilson, L., Altamirano, C., Cabrera, Z., Alvarez, L., Aguirre, C., " Production of cephalexin in organic medium at high substrate concentrations with CLEA of penicillin acylase and PGA-450" *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 195-203, 2007.

Jaiprakash G.Shewale ve Vayalombron, K. Sudhakaran., "Penicillin V Acylase: Its Potential in The Produvtion of 6-aminopenicillanic acid" *Enzyme and Microbial Technology*, **20**, 402-410, 1997.

Kasche, V., Loffer, F., Scholzen, T., Kramer, D.M., Boller, T.J., "Rapid protein purification using phenylbutylamine-Eupergit; a novel method for large-scale procedures" *Journal of Choramatography*, **510**, 149-154, 1990.

Keçili, R., *Antipirin bazlı monolitik kolon geliştirilmesi ve penisilin amidohidrolaz enzimi ayrılmasında kullanımı*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2006.

Keçili, R., Say, R. ve Yavuz, H., "Synthesis and characterization of pseudo-affinity ligand for penicillin acylase purification" *Int. J.Biol.Macromol.*, **39**, 250-255, 2006.

Keçili, R., Say, R., Ersöz, A., Yavuz, H., Denizli, A., "Purification of penicillin acylase through a monolith column containing methacryloyl antipyrine" *Separation and Purification Technology*, **55**, 1-7, 2007

Keha, E. ve Küfrevioğlu, İ., *Biyokimya*, Aktif Yayınevi,Erzurum, 2000.

Kheirolomoom, A., Ardjmand, M., Fazelinia, H., Zakeri, A., "Isolation of penicillin G acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105 by physical and chemical treatments" *Biochemical Engineering Journal*, **8**, 223-227, 2001.

Khimiuk, A.Y., Korennykh, A.V., Langen, L.M., Rantwijk, F., Sheldon, R.A., Svedas, V.K., "Penicilin acylase-catalyzed synthesis in aqueous medium: a chemo-enzymatic route to stereoisomerically pure diketopiperazines" *Tetrehedron: Asymmetry*, **14**, 3123-3128, 2003.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Kim, S., Yamamoto, T., Endo, A., Ohmori, T., Nakaiwa, M., "Adsorption of phenol and reactive dyes from aqueous solution on carbon cryogel microspheres with controlled porous structure" *Microporous and Mesoporous Materials*, **96**, 191 – 196, 2006.

Kutzbach, C. ve Rauenbusch, E., "Preparation and general properties of crystalline penicilin acylase from E.Coli" *Hoppe-Seyler's Z Physiol.Chem*., **354**, 45-53, 1974.

Langen, L.M., Rantwijk, F., Svedas, V., Sheldon, R., "Penicilin acylasecatalyzed peptide synthesis: a chemo-enzymatic route to stereoisomers of 3,6-diphenylpiperazine-2,5-dione" *Tetrahedron Asymetry*, **11**, 1077-1083, 2000.

Lineweaver, H. ve Burk, D., "The determination of enzyme dissociation constant" *J.Am.Chem. Soc.*, **56**, 658-662, 1934.

Lozinsky, I. V., Galaev, Y. I., Plieva, M. F., Savina, I. N., Jungvid, H., Mattiasson, B., "Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest" *Trends in Biotechnology*, **21**, 445-451, 2003.

Marcos, J.C., Fonseca, L.P., Ramalho, M.T., Cabral, J.M.S., "Partil purification of penicilin acylase from Escherichia coli in poly(ethylene glycol)-sodium citrate aqueous two-phase systems" *Journal of Chromatography B*, **734**, 15-22, 1999.

Mclanahan, E.D., " An enzyme of great pharmaceutical importance*" 2003.*

McVey, C.E., Walsh, M.A., Dodson, G.G., Wilson, K.S., Brannigan, J.A., "Crystal Structures of Penicillin Acylase Enzyme-substrate Complexes: Structural Insights into the Catalytic Mechanism" *JMB.*, **313**, 139-150, 2001.

Oh, B., Kim, K., Park, J., Yoon, J., Han, D., Kim, Y., "Modifying the substrate specificity of penicillin G acylase to cephalosporin acylase by mutating active-site residues" *BBRC.*, **319**, 486-492, 2004.

Oinonen, C. ve Rouvinen, J., "Structural comparison of Ntn-hydrolases" *Protein Science*, **9**, 2329-2337, 2000.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Özcan, A., *Biyomoleküller için molekül baskılanmış polimerik yapay reseptör geliştirilmesi ve biyokromatografi uygulamaları*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2007.

Özkara, S., Akgöl, S., Çanak, Y., Denizli, A., "A Novel Magnetic Adsorbent for Immunoglobulin-G Purification in Magnetically Stabilized Fluidized Bed", *Biotechnology Progress*, **20**, 1169-1175, 2004.

Özkara, S., Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi, *Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler* (Denizli, A. Ve Küfrevioğlu, İ.), Pozitif Matbaacılık LTD. ŞTİ., Ankara, 163-180, 2010.

Öztan, D., *Tirosinaz enziminin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve fenollerin gideriminde kullanılması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007.

Parmar, A., Kumar, H., Marhawa, S.S., Kennedy, F.J., "Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-Aminopenicillanic acid (6-APA): a review" *Biotechonology Advances*, **18**, 289-301, 2000.

Polderman-Tijmes, J.J., *Biochemical Characterization of α-Amino Acid Ester Hydrolases*, Doktora Tezi, Rijksuniversiteit Groningen, Hollanda, 2004.

Porath, J., "IMAC-immobilized metal ions affinity based chromatography" *Trends in Analytical Chemistry*, **7**, 254-259, 1988.

Rajendhran, J., Gunasekaran, P., "Recent Biotechnological Interventions for Developing Improved Penicillin G Acylases" *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **97 (1)**, 1-13, 2004.

Santarelli, X., Fitton, V., Verdoni, N. ve Cassagne, C.J., "Preparation, evaluation and application of new pseudo-affinity chromatographic supports for penicillin acylase purification" *J.Chromamatography B.*, **739**, 63-72, 2000.

Sarıkaya, Y., Fizikokimya, Gazi Büro Kitabevi, Ankara, 1993.

Schoren, C.G.P.H., Nierstrasz, V.A., Kroon, P.J., Bosma, R., Janssen, A.E.M., Beeftink, H.H., Tramper, J., "Thermodynamically controlled synthesis of β-

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

lactam antibiotics. Equilibrium concentrations and side-chain properties" *Enzyme and Microbial Technology*, **24**, 498-506, 1999.

Sio, C.F. ve Quax, W.J., "Improved β-lactam acylases and their use as industrial biocatalysts" *Current Opinion in Biotechnology*, **15**, 349-355, 2004.

Skrob, F., Becka, S., Plhackova, K., Fotopulosova, V., Kyslık, P., "Novel penicillin G acylase from *Achromobacter* sp. CCM 4824" *Enzyme and Microbial Technology*, **32**, 738–744, 2003.

Vandamme, E.J., Voets, J.P., "Microbial Penicillin acylases" *Advan. Appl. Microbiol.*, **17**, 311-369, 1974.

Whitaker, J.R., "Principles of enzymology for the food sciences 2nd ed." *Marcel Dekker*, New york, **543**, 2-4, 1994.

Wong-Dominic, W. S., "Food enzymes structure and mechanism 1st ed." *Chapman & Hall*, New york, 271-272, 1995.

Yang, S., Zhou, L., Tang, H., Pan, J., Wu, X., Huang, H., Yuan, Z., "Rational design of a more stable penicillin G acylase against organic cosolvent" *Journal of Molecular Catalysis B*, **18**, 285-290, 2002.

Yao, K., Shen, S., Yun, J., Wang, L., He, X., Yu, X., "Preparation of polyacrylamide-based supermacroporous monolithic cryogel beds under freezing-temperature variation conditions" *Chemical Engineering Science*, **61**, 6701 – 6708, 2006.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ