T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PEPSİN İMMOBİLİZE EDİLMİŞ KRİYOJEL BİYOREAKTÖRLERİN HAZIRLANMASI

Mustafa YEŞİL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
Temmuz - 2019

T.C

DİCLE UNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Mustafa YEŞİL tarafından yapılan "Pepsin İmmobilize Edilmiş Kriyojel Biyoreaktörlerin Hazırlanması " konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan: Prof. Dr. Lokman UZUN

Üye : Prof. Dr. Mehmet DOĞRU

Üye : Doç. Dr. Mehmet Hüseyin ALKAN

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 05/07/2019

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../20

Prof. Dr. Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜR V.

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam esnasında desteği ve bilgi birikimiyle her zaman yanımda olarak karşılaştığım zorlukların aşılmasında yardımlarını ve anlayışını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet DOĞRU' ya,

Tezimin deneysel aşamasındaki zorlukları aşabilmem için çalışmalarım boyunca sonsuz desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Lokman UZUN' a, Doç. Dr. Mehmet Hüseyin ALKAN' a, ve Dr. Öğretim Üyesi İhsan ALACABEY' e,

Finansal desteğinden dolayı Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (DÜBAP) Koordinatörlüğüne (ZGEF.18.018 nolu proje),

Yaşamımın her anında yanımda bulunarak sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen, aileme sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR ..... **I**
İÇİNDEKİLER ..... **II**
ÖZET ..... **IV**
ABSTRACT ..... **V**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **VI**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **VII**
KISALTMA VE SİMGELER ..... **VIII**
1. GİRİŞ **1**
2. KAYNAK ÖZETLERİ **5**
2.1. İmmünoglobülinler 5
2.1.1. İmmünoglobülinlerin Yapısı 5
2.1.2. İmmünoglobülin G (IgG) 7
2.2. Enzimler ve Genel Özellikleri 9
2.2.1. Enzim Aktivitesini Belirleme Yöntemleri 10
2.2.2. Enzimlerin Uygulama Alanları 11
2.2.3. Enzim İmmobilizasyonu 12
2.2.4. İmmobilize Enzimlerin Kullanım Alanları 13
2.2.5. İmmobilizasyon İçin Kullanılan Farklı Teknikler 14
2.2.5.1. Adsorpsiyon 14
2.2.5.2. Kovalent Bağlanma 15
2.2.5.3. Afinite İmmobilizasyonu 15
2.2.5.4. Tutuklama 15
2.2.5.5. İyonik Bağlanma 16
2.3. Kriyojeller 16
2.3.1. Kriyojellerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu 17
2.3.2. Gözenek Özelliklerinin Kontrolü 19
2.3.4. Kriyojelin Geometrisi 20
2.3.5. Kriyojellerin Yüzey Kimyası 21
2.3.6. Kriyojellerin Uygulamaları 22
3. MATERYAL ve METOT **23**
3.1. Kullanılan Kimyasallar 23
3.2. Kriyojel Biyoreaktörlerin Hazırlanması 23
3.3. Pepsin Enzim İmmobilizasyonu 24

3.4. Kriyojel Biyoreaktörlerin Karakterizasyonu 24
3.4.1. Yüzey Morfolojisi (SEM) 24
3.4.2. Şişme Deneyi 24
3.5. Pepsin Enzim Aktivite Tayini 25
3.6. Substrat Derişiminin Aktiviteye Etkisi 25
3.7. Enzim immobilize edilmiş kriyojel biyoreaktör ile pepsin enzim aktivitesinin gerçekleştirilmesi ve optimizasyon koşullarının belirlenmesi 26
3.7.1. pH Değişiminin Aktiviteye Etkisi 26
3.7.2. Sıcaklığın Aktiviteye Etkisi 26
3.8. Depo Kararlılığı 26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 27
4.1. Pepsin Enzim İmmobilizasyonu 27
4.2. Kriyojel Biyoreaktörlerin Karakterizasyonu 27
4.2.1. Yüzey Morfolojisi 27
4.2.2. Şişme Deneyi 29
4.3. Pepsin Aktivitesine Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi 30
4.3.1. pH Değişiminin Aktiviteye Etkisi 30
4.3.2. Sıcaklığın Aktiviteye Etkisi 31
4.3.3. Substrat Derişiminin Aktiviteye Etkisi 32
4.4. Depo Kararlılığı 35
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 37
6. KAYNAKLAR 41
ÖZÇEÇMİŞ 47

ÖZET

PEPSİN İMMOBİLİZE EDİLMİŞ KRİYOJEL BİYOREAKTÖRLERİN HAZIRLANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mustafa YEŞİL

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2019

Kriyojeller üç boyutlu polimerik iskelet yapıya sahip, birbirine gözenekli ağlar ile bağlı, iletim yolu ile taşınıma izin veren destek malzemeleridir ve çeşitli biyoayırma işlemlerinde uygulanacak yeni ayırma matriksleri olarak geliştirilmiştir.

Kriyojeller son yıllarda terapötik proteinlerin üretimi ve degredasyonu için biyoreaktör olarak da kullanılmaktadır. Biyoreaktörlerin sağlık sektöründe teşhis, tedavi amaçlı ve biyofarmasötik üretiminde tek kullanımlık olarak kullanılması mevcuttur. Ancak biyoreaktörlerin tek kullanımlık olması maliyeti önemli ölçüde arttırırken, tekrarlanabilirliliği azaltmaktadır.

Biyofarmasötik uygulamalarda proteinlerin tamamı yerine proteinlerin istenilen parçalanma ürünlerini kullanmak hedefe yönelik bir yaklaşımdır. Böylece spesifik olmayan etkileşimlerden kaynaklanan kontaminasyonların önüne geçilmiş olunacaktır. $F(ab)_2$ fragmanları immünoglobulin G (IgG) molekülünün antijen-antikor etkileşimlerinde kullanılan bölgesidir. Ticari olarak satılan terapötik monoklonal $F(ab)_2$ fragmanları sağlık sektöründe oldukça önemlidir.

Sunulan çalışmada, sürekli sistemde çalışılmış ve aynı zamanda pepsin enziminin immobilizasyonu kolay ve etkili bir kriyojel biyoreaktörün yapıldığı ileri sürülmüştür. Kriyojel biyoreaktör kullanılarak Pepsin immobilizasyonunun etkili ve güvenilir dizaynı için, matriksin epoksi grupları ve Pepsin enziminin amino grupları arasında kovalent immobilizasyon yapılmıştır. Enzim immobilize edilmiş kriyojel bioreaktör SEM ve şişme testiyle karakterize edilmiştir. İmmobilize edilmiş pepsin geniş pH aralıklarındaki spesifik aktivitesi, substrat konsantrasyonu, sıcaklık ve depo kararlılığı, IgG substrat olarak kullanıldığı bir çözeltideki serbest pepsin ile kıyaslanmıştır.

Anahtar Kelimeler : Kriyojel, Biyoreaktör, Pepsin, Enzim İmmobilizasyonu, IgG, $F(ab)_2$ Fragmanı

ABSTRACT

PREPARATION OF PEPSIN IMMOBILIZED CRYOGEL BIOREACTORS

MsD THESIS

Mustafa YEŞİL

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2019

Cryogels are three-dimensional polymeric skeletal structures, bonded to each other by porous networks, permitting transport by convection, and have been developed as new separation matrices to be applied in various bioseparation processes.

In recent years, cryogels have also been used as bioreactors for the production and degradation of therapeutic proteins. Bioreactors are available in the health sector for diagnostic, therapeutic purposes and for single use in biopharmaceutical production. However, the single use of bioreactors significantly increases the cost and reduces reproducibility.

In biopharmaceutical applications, it is a targeted approach to use the desired degradation products of proteins instead of all proteins. Thus, contamination from nonspecific interactions will be avoided. $F(ab)_2$ fragments are the region of the immunoglobulin G (IgG) molecule used in antigen-antibody interactions. Commercially sold therapeutic monoclonal $F(ab)_2$ fragments are very important in the health sector.

In the present study, it has been studied in a continuous system and at the same time it has been suggested that an easy and effective cryogel bioreactor is made to immobilize the pepsin enzyme. For efficient and reliable design of Pepsin immobilization using cryogel bioreactor, covalent immobilization was performed between the epoxy groups of the matrix and the amino groups of Pepsin enzyme. The enzyme was characterized by immobilized cryogel bioreactor SEM and swelling test. The specific activity, substrate concentration, temperature and storage stability of the immobilized peps over a wide pH range were compared with the free pepsin in a solution using IgG susbstrate.

Key Words: Cryogel, Bioreactor, Pepsin, Enzyme Immobilization, IgG, $F(ab)_2$ Fragment

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No **Sayfa**

Çizelge 4.1. Serbest ve immobilize pepsin kinetik parametre değerlerinin gösterimi 34

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 2.1.	İmmünoglobülin sınıflarının moleküler yapısı	5
Şekil 2.2.	IgG molekülünün şematik gösterimi	7
Şekil 2.3.	IgG molekülünün papain ve pepsin enzimleri ile parçalanması	8
Şekil 2.4.	Kriyojelleşme olayı	17
Şekil 2.5.	Farklı formlarda hazırlanmış kriyojellerin dijital görüntüleri	21
Şekil 4.1.	Kriyojel biyoreaktörlerin farklı oranlarda büyütülmüş SEM görüntüleri	28
Şekil 4.2.	Kriyojel biyoreaktörlerin farklı oranlarda büyütülmüş SEM görüntüleri	29
Şekil 4.3.	pH değerinin pepsin aktivitesine etkisi	31
Şekil 4.4.	Sıcaklık değerinin pepsin aktivitesine etkisi	32
Şekil 4.5.	Serbest pepsin için Lineweaver-Burk grafiği	33
Şekil 4.6.	İmmobilize pepsin için Lineweaver-Burk grafiği	34
Şekil 4.7.	Serbest ve immobilize pepsin polimerin depo kararlığı	35

KISALTMA VE SİMGELER

IgG	; İmmünoglobulin G
Fab	: Antijen bağlayabilen fragman
Fc	: Kristalize olabilen fragman
IU	: International Unit (Uluslararası birim)
HEMA	: 2-Hidroksietil Metakrilat
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin
Td	: Donma sıcaklığı
APS	: Amonyum Persülfat
TCA	: Trikloroasetik asit
GMA	: Glisidil metakrilat
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
EGDMA	: Etilenglikol dimetakrilat
HCI	: Hidroklorik asit
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
UV	: Görünür bölge spektrofotometresi

1.GİRİŞ

Kromatografik malzemeler ve polimerik jeller, enzimlerin, hücrelerin ve moleküllerin immobilizasyonu için taşıyıcılar ve immünodifüzyon için matriksler de dahil olmak üzere biyoteknolojinin bir çok farklı alanında kullanılmaktadır. Kullanılan biyolojik örneklerin oldukça geniş bir yelpazede olmasının yanı sıra polimerik jellerin kullanılmasıyla çeşitli problemler ortaya çıkmıştır. Yaşanılan bu sıkıntılar biyolojik uygulamalarda kullanılabilecek yeni jel materyallerinin geliştirilmesini gerektirmektedir. Kriyojeller biyoteknolojik faaliyetlerde önemli potansiyele sahip yeni nesil polimerik jellerin birisidir.

Kriyojeller, çözücünün donma noktasının altındaki sıcaklıklarda sentezlenen üç-boyutlu (3D) polimerik yapı iskelesidir. Kriyojeller nano-mikro ölçek aralığında kütle aktarımıyla taşınımın yanı sıra hemen hemen her boyuttaki çözünen maddelerin engellenmeden difüzyonuna izin veren birbiriyle bağlı makrogözeneklere ve makrogözeneklerin duvarlarını oluşturan polimer makromolekülleri arasındaki mikrogözeneklere sahiptir. Kriyojel oluşumu Şekil 1.'de verilmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi kriyojel oluşumu sırasında öncelikle çözeltideki monomerler, makromoleküller ve polimer öncüleri su benzeri bir çözücüde çözünür. Sonrasında; -12°C' de polimerleşme aşamasında ise, çözücü kısım donarak birbirine bağlı buz kristalleri oluşturma aşamasında, donmamış bölümde bulunan mikrofaz polimerleşerek buz kristallerinin etrafında bir ağ yapı oluştururlar. Klasik polimerik jellerin aksine kriyojeller, çözücünün (su) hem polimer yapısında hem de gözeneklerde bulunduğu heterofaz sistemde polimerleşirler. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra oda sıcaklığına getirilen buz kristalleri erir ve "kriyojel" dediğimiz gözenekli birbiriyle bağlanmış polimerik ağ yapı elde edilir.

Kriyojellerin uygulama alanları onların gözenekli yapısı, dayanıklılığı, kimyasal ve mekanik kararlılığı ile belirlenir. Ayrıca kriyojeller süper makrogözenekli yapıları sayesinde daha düşük geri basınç ile difüzyon direnci olmadan daha yüksek akış hızlarında çalışma imkanı sağlamaktadır. Kriyojeller enzimler ve immobilize hücreler ile biyokataliz, biyoayırma, plazmidlerin, virüslerin, hücre organellerinin hatta tüm hücrelerin kromatografisi ve ayrıca doku mühendisliğinde destek malzemesi olarak kullanılmaktadır. İmmobilize biyopolimer matriksi olarak kullanılan kriyojellerin

geleneksel jellere göre daha iyi sonuçlar verdiği kanıtlanmıştır. Örneğin, kriyojellerin birbirine bağlı gözenek ağı, ince kılcal bir gözenek yapısı oluşturur. Kriyojellerin ince ağ yapısı, fiber biyoreaktörlerin içindeki fiber kılcal düzene çok yakındır. Kriyojel biyoreaktörlerin ince ağ yapısının sınırlarını oluşturan gözenek duvarı hücre yapışması, proliferasyon için oldukça geniş bir yüzey alanı sunar. Kriyojel biyoreaktörler monoklonal antikorlar da dahil olmak üzere terapötik protein üretimi için de kullanılmaktadır. Ayrıca, kriyojel makrogözeneklerine enzim immobilizasyonu ile üretilen biyokatalizör, makromoleküler substratın işlenmesine izin verir. Çünkü substrat makrogözeneklere karışmadan hızlıca difüzlenir. Biyopartiküllerin ayrılması için geliştirilen kriyojeller biyoreaktörler için son derece uygundur.

Enzimler canlı hücrede meydana gelen kimyasal ve biyokimyasal tepkimeleri katalizleyen protein yapılı biyolojik katalizörlerdir. Enzimler kimyasal katalizörlere göre tepkimeleri daha hızlı gerçekleştirmekte ve daha değişik kimyasal reaksiyonları katalizleyebilmektedir. Enzimlerin çalışması için pH, sıcaklık ve çözücü gibi ortam koşullarının uygun şartlarda olması gerekmektedir. Reaksiyon tipine ve substratına göre son derece spesifik özellik gösterirler, bu nedenle de yüksek verim elde etmek mümkündür.

Enzimleri saflaştırmanın yüksek maliyetini düşürmek, enzimlerin tekrar kullanılabilirliğini geliştirmek, istenildiği anda ortamdan uzaklaştırılabilmesini sağlamak ve enzim aktivitesinin kararlılığını arttırmak için enzimler reaksiyonlarda serbest enzim yerine immobilize enzim olarak bulunması tercih sebebidir. Enzim biyoteknolojisinde suda çözünmeyen matrikslerle enzimlerin immobilizasyonu araştırma konusu olup, endüstriyel işlemlerde uygulanmaları için gereklidir. Çok sayıda enzim, uygun destek üzerinde yüksek etkinlik verimi ile başarıyla immobilize edilebilmektedir. Bu immobilize enzimler ilaç ve gıda endüstrisinde biyokatalizör olarak, yapay organ yapımında, biyosensör ve biyoreaktör uygulamalarında kullanılmaktadır. Enzimin kararlılığının korunmuş olması, tekrar tekrar kullanılabilmeleri, maliyetinin düşük olması, ürünlerin hem saf bir halde hemde kolay bir şekilde elde edilebilmeleri gibi nedenlerden dolayı enzim immobilizasyonu oldukça önemlidir. Enzim immobilizasyonu için adsorpsiyon, polimerik matrikse tutuklama ya da enkapsülasyon, iki fonksiyonlu moleküllerle çapraz bağlama ve kovalent bağlanma gibi farklı yöntemler geliştirilmiştir. Enzimlerin kovalent bağlanma yoluyla immobilizasyonu, sıcaklık, organik çözücüler ve denatüre edici

faktörler varlığında enzim sızmasını minimize edip ürünün enzimler tarafından kirlenme olasılığı yok ettiğinden daha çok tercih edilmektedir. Enzim immobilizasyonun etkin bir şekilde gerçekleşebilmesi için immobilizasyon yöntemi önemli olduğu kadar enzimin doğal yapısı ve kullanılan destek malzemesi de oldukça önemlidir. Enzimin doğal yapısı dikkate alındığında; yüzeyindeki bağlanma bölgelerinin çok sayıda olmasından kaynaklanan denatürasyon, enzimin konformasyonel değişim eğilimi ve olması mümkün olan spesifik olmayan etkileşimlerin immobilizasyon sırasında gerçekleşmemesi gerekmektedir.

Pepsin enziminin, diğer proteazlar gibi otomatik parçalamaya yatkın olduğu iyi bilinir. Elde edilen peptidler, proteinlerin parçalanma ürünlerinin kirlenmesine neden olur. Bu nedenle, pepsin gibi proteazların bir destek malzemesi üzerine immobilizasyonu, otomatik parçalama ile üretilen bu kontaminasyonları ortadan kaldırmak için iyi bir çözümdür. Son yıllarda, bütün antikorun menteşe bölgesinin (iki ağır zinciri birbirine bağlayan disülfid bağlarının bölgesi) pepsin enzimi ile spesifik parçalanmasıyla $F(ab')_2$ fragmanlarının oluşturulması dikkat çekmiştir. $F(ab')_2$ fragmanları, F_c alt fragmanı olmadan tamamlayıcılık-belirleme bölgesi (CDR)'ni barındıran monokovalent bir antikor yapısındadır. Antijenleri özel olarak tanıyarak bunlara bağlanabilir. Araştırmalarında ve kalite kontrolünde, $F(ab')_2$ fragmanları, IgG'nin bütün yapısı yerine kullanılmaktadır. Ayrıca, pepsin yüksek sıcaklık ve denatüre edici ajanlar varlığında dahi kararlılığını ve aktivitesini koruyabilen bir enzimdir.

Bu çalışmada kriyojellerin gözenekli yapısı, dayanıklılığı, kimyasal ve mekanik kararlılığı gibi eşsiz özelliklerinden yararlanarak, sürekli sistemde kullanılacak biyoreaktörlerin hazırlanmıştır. Kriyojel biyoreaktörlere, kovalent bağlanma yöntemiyle pepsin enzimi immobilize edilmiş ve bu kriyojeller ile pH, sıcaklık, substrat derişimi, enzim miktarı, tepkime süresi ve depolama süresinin pepsin aktivitesine etkisi incelenmiştir. Uygun çalışma koşulları belirlendikten sonra enzim immobilize edilen biyoreaktörlerin temel hedeflerinden biri olan tekrar kullanılabilirliliği değerlendirilmiştir. Sentezlenen biyoreaktör ile IgG protein degredasyon verimi incelenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1.İmmünoglobülinler

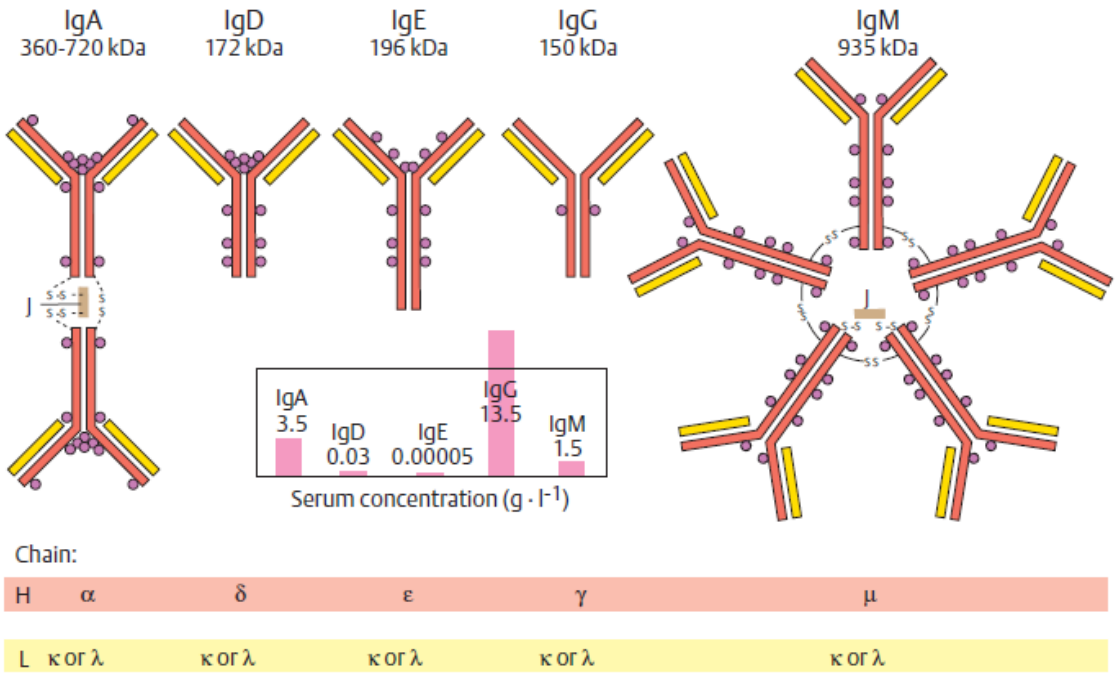
2.1.1. İmmünoglobülinlerin Yapısı

İmmünoglobülinler de denilen antikorlar yabancı bir madde yani bir antijen varlığına karşılık olarak bağışıklık sisteminin ürettiği proteinlerdir. Antikorların antijenlere spesifik bağlanması yabancı işgalinin varlığını gösterir ve bu işgalci patojenin aktivitesini yok etmeden sorumlu olan bağışıklık sistemini harekete geçirir. (Çulha, S. 2014) Antikorlar, antijenlerle uyarılan B lenfositlerin başkalaşımı ile ortaya çıkan plazma hücreleri (plazmosit) tarafından oluşturulurlar. Antikorlar bir erişkin serumundaki protein miktarının % 25'ini oluştururlar (Özkara 2002)

Glikoprotein yapısındaki immünoglobülinlerin biyolojik özelliklerinin hemen hepsi yapılarındaki polipeptit birimlerine bağlıdır. İmmünoglobülinlerin iki temel işlevi vardır. Bunlardan birincisi spesifik antijenlerine bağlanmaktır. İkinci grup işlevi arasında komplemanı aktive etmek, opsonizasyon, sinyal iletimi gibi işlevler vardır. Bu işlevlerin her biri immünoglobülinin değişik bölgeleri ile ilişkilidir (Neyzi ve Ertuğrul 2002)

İnsan serumunda değişik biyolojik özelliklere sahip beş değişik antikor sınıfı vardır. En yüksek derişimde bulunan antikor IgG' dir. Diğer antikor sınıfları IgA, IgM, IgD ve IgE' dir. Bütün antikorlar, molekül ağırlığı 25 kDa olan hafif (L) bir zincir ve molekül ağırlığı 50-77 kDa olan bir ağır (H) zincir olmak üzere iki değişik türdeki polipeptit zincirlerinden oluşur. Hafif zincir κ ve λ olmak üzere iki değişik türde bulunabilir ve antikorların bütün sınıflarında vardır. Diğer yandan ağır zincir türü bir immünoglobülinin sınıfını belirleyen zincirdir. IgG' nin ağır zinciri γ olarak adlandırılırken IgA, IgM, IgD ve IgE immünoglobülinlerin ağır zinciri sırasıyla α, μ, δ ve ε olarak adlandırılır (Berg ve ark. 2002), (Özkara 2002), (Neyzi 2002), (Alberts ve ark. 2002).

IgG, IgA ve IgD sınıfı globülinlerde Y molekülünün gövde kısmında C_H2 ve C_H3 olmak üzere iki adet (C_H1 ile birlikte 3 adet), IgM ve IgE globülinlerin gövde kısmında ise C_H2, C_H3 ve C_H4 olmak üzere üç adet, (C_H1 ile birlikte 4 adet) sabit kıvrım bulunur (Özkara 2002).



Şekil 2. 1. İmmünglobülin sınıflarının moleküler yapısı (Color Atlas of Biochemistry/Second edition)

L polipeptit zincirleri üzerinde bir değişken V_L bir de değişmez C_L bölgesi bulunur. L zincirleri, üzerindeki C_L bölgelerinde görülen kimyasal yapı değişikliklerine bağlı olarak iki tipe ayrılır. Bunlardan birisi λ (lamda) diğeri κ (kappa) tipleridir. Bu yapı değişiklikleri antijenik ayrım sağlar.

Bir immünoglobülin molekülündeki L polipeptit zincirleri ya λ ya da κ tipi zincirlerden oluşmuştur. Aynı immünoglobülin molekülü üzerinde hem λ hem de κ tipi zincirler bir arada bulunamazlar. Bir hayvandaki κ tipi zincir taşıyan immünoglobülinlerin sayısının, λ tipi zincir taşıyan immünoglobülinlerin sayısına oranı her tür canlı için değişmezdir. Bu oran insanlarda 2:1' dir.

İmmünoglobülinlerdeki H zincirlerinde, H zincirlerinin C bölgeleri arasındaki stereokimyasal ve serolojik ayırımlara göre 5 ayrı yapı saptanmıştır. Bunlar γ (gama), α (alfa), μ (mü), δ (delta) ve ε (epsilon) olarak adlandırılmaktadır. İmmünoglobülinlerdeki H zincirlerinin yapısı o immünoglobülinin sınıfını belirler. IgG'de γ, IgA'da α, IgM'de μ, IgD'de δ ve IgE'de ise ε ağır zinciri bulunur. İmmünoglobülinlerin tüm yapısında bulunan kısımlar şunlardır:

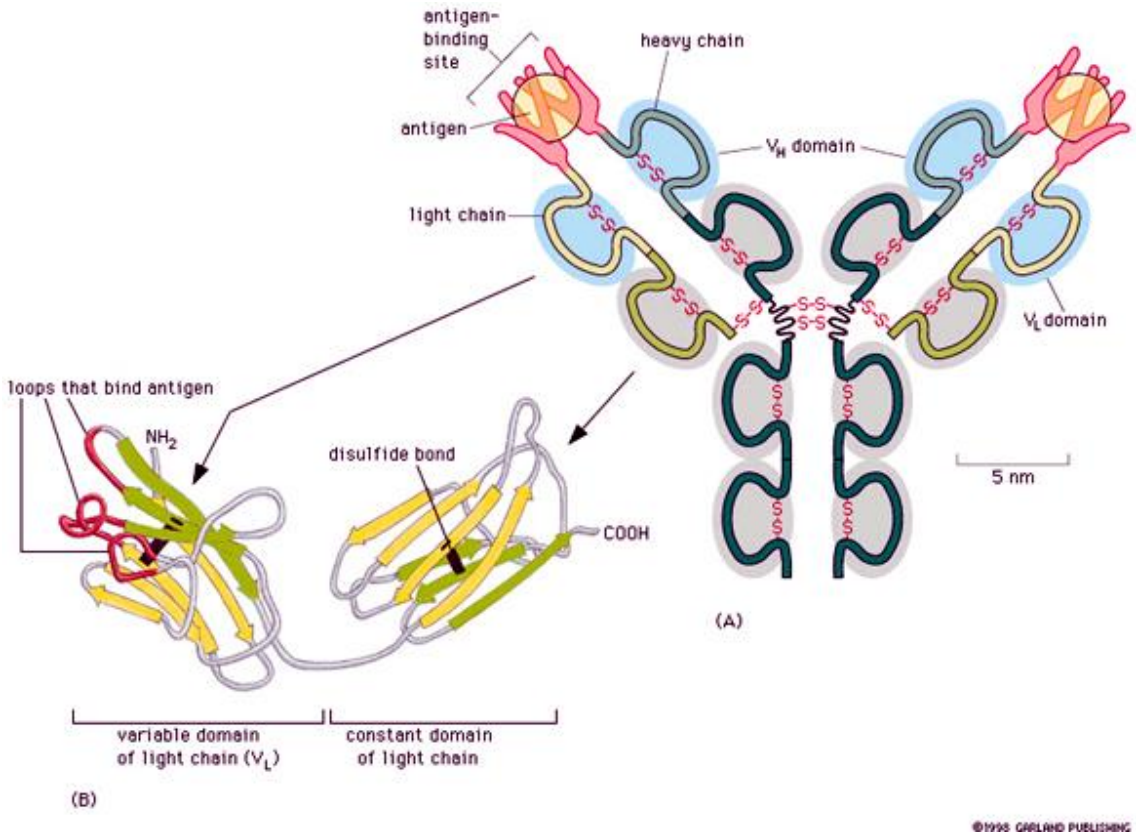
IgG'de H zincirleri olarak 2 adet γ zincirleri ve bir de iki adet L zincirleri bulunur. Bu L zincirleri de bir IgG molekülünde ya λ ya da κ yapısındadır. Buna benzer şekilde monomer yapısındaki IgE'de iki adet ε, IgD'de iki adet δ yapılarında H zincirleri ile her birinde ya λ ya da κ yapısında ikişer adet L zincirleri bulunur. Polimer yapısındaki IgM ve dimer yapısındaki IgA immünoglobülinlerindeki H ve L zincirleri daha çok sayıdadır (Özkara 2002).

H zincirleri arasında ve H zincirleriyle L zincirleri arasındaki bağlantıyı oluşturan disülfit bağlarının sayısı ve bağlantı yerlerinin gösterdiği değişikliklere göre IgG sınıfında 4 alt sınıf vardır: IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4. Bu alt sınıfları oluşturan ağır zincirler de γ_1, γ_2, γ_3, γ_4'dür. IgG sınıfını oluşturan IgG alt sınıfları şu oranda bulunur: IgG_1 % 66, IgG_2 % 23, IgG_3 % 7 ve IgG_4 % 4 (Özkara 2002).

2.1.2. İmmünoglobülin G (IgG)

Elektron mikroskopu ile incelendiğinde IgG molekülü Y harfi biçiminde görülür. İkişer ikişer aynı yapıda olmak üzere IgG molekülü dört adet polipeptit zincirinden oluşur (Şekil 2.6). Bütün ntikorlar, molekül ağırlığı 25 kDa olan hafif (L) bir zincir ve molekül ağırlığı 50 kDa olan bir ağır (H) zincir olmak üzere iki değişik türdeki polipeptit zincirlerinden oluşur (Berg ve ark. 2002) . IgG molekülünde L zincirler Y harfinin kollarında, H zincirler ise hem kollarında hem de gövdesinde bulunurlar. Kollardaki hafif ve ağır zincirler arasında ve gövdedeki iki ağır zincir arasında bulunan disülfit bağları polipeptit zincirlerini birbirlerine bağlarlar. IgG molekülünde 1320 adet aminoasit bulunur. Ağır zincirde 446, hafif zincirde ise 214 aminoasit saptanmıştır (Neyzi 2002). Kollardaki hem L hem de H zincirlerinin bir uçları $-NH_2$ ile sonlandıklarından dolayı bu uçlara amino terminal uçlar, zincirlerin diğer uçları ise -COOH ile sonlandıklarından bu uçlara da karboksil terminal uçları denilir. Her polipeptit zincirinin amino terminal uca yakın kısımları spesifik antijene bağlanma bölgesi olup buna bağlı olarak aminoasit sırasında, diğer bölgelere göre daha çok değişiklikler görülür. Bundan dolayı bu bölgelere değişken bölge (V) denir. Polipeptit zincirlerinin geri kısmı nispeten değişmez durum gösterdiğinden değişmez bölge (C) denir. Her polipeptit zincirininde disülfit bağlarıyla bağlanmasıyla oluşturulan kıvrım alanları bulunur. Değişken bölgede bulunan kıvrım alanlarına V kıvrımları adı verilir. Bunlardan H zinciri üzerindekine V_H, L zincirleri

üzerindekine V_L kıvrımları adı verilir. Değişmez bölgedeki kıvrım alanlarına C kıvrımları adı verilir. Y biçimindeki immünoglobülin molekülünün kollarında, V bölgesinin hemen altında, sabit bölgedeki H zinciri üzerindeki kıvrıma C_H1, aynı bölgede L zinciri üzerindeki kıvrıma C_L kıvrımları denir (Özkara 2002).



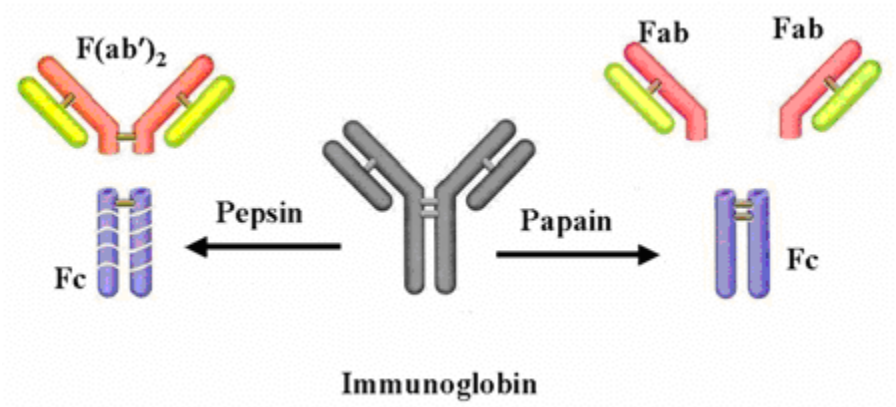
Şekil 2. 2. IgG molekülünün şematik gösterimi (**http://www.bio.miami.edu/~cmallery/255/255prot/immunog.jpg** 5.3.2019)

1960' ların başında Gerald Edelman (ABD), Rodney Porter (İngiltere) tarafından antikorun yapısı aydınlatılmıştır.

Porter IgG'yi indirgeyici bir ajan olan sisteini papain enzimi ile parçalamıştır. Papain enzimi ile IgG molekülündeki peptid bağları hidrolize edilmiştir. Daha sonra IgG 3 parça (I, II, III) olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu parçalar eşit molekül ağırlığına fakat farklı yüklere sahiptirler. Parçalanan IgG molekülünden elde edilen özdeş olan 2 parça antijen bağlama yeteneğine sahiptir. Özdeş olan 2 parça Fab (antijen bağlayabilen fragman) şeklinde isimlendirilmiştir. Porter, iki değerlikli olan IgG molekülünün papain ile parçalanması sonucu her biri antijen bağlayabilen bu Fab parçalarının tek değerlikli

olduğu sonucuna varmıştır. Porter, papainin parçalaması sonucu oluşan diğer parçanın ise antijen bağlamamış ama kristalize olduğunu görmüş ve bu parçayı Fc (kristalize olabilen fragman) olarak adlandırmıştır. Böylece Fab/Fc oranı 2/1 dir.

Benzer çalışmalarda, Alfred Nisonoff ise IgG molekülünü pepsin kullanarak parçalamış ve papainden farklı olarak IgG molekülünün farklı bölgelerden ayrıldığını görmüştür. Pepsin enzimi ile parçalanan IgG molekülünden elde edilen parçanın molekül ağırlığı bir Fab fragmanının 2 katı (100 kD) olan bir büyük parçaya ve Fc diye adlandırılan parçalara ayrılmıştır. Nisonoff bu büyük parçayı $F(ab')_2$ olarak isimlendirmiştir. $F(ab')_2$ olarak adlandırılmış parçanın yine antijen bağlayabildiğini gözlemlemiştir. Pepsin ve papain enzimleri Fab parçalarını bir arada tutan bağı farklı taraflarından parçalar. (Elgert 2009)



Şekil 2.3. IgG molekülünün papain ve pepsin enzimleri ile parçalanması

2.2. Enzimler ve Genel Özellikleri

Enzimler peptit bağlarıyla birbirine bağlanmış aminoasit zincirlerinden oluşan yüksek molekül ağırlıklı, çoklu fonksiyonel gruplara ve oldukça kararlı üç boyutlu yapıya sahip biyolojik bileşiklerdir. Canlı hücreler tarafından oluşturulurlar ve canlı hücrelerde gerçekleşen binlerce kimyasal tepkimeyi yürüten protein yapısında biyokatalizörlerdir (Özer 2009).

Enzimlerin varlığı yüzyıllardır bilinmektedir. 1835 yılında yapılan ilk çalışmalar, enzimleri kimyasal katalizör olarak adlandıran İsveçli kimyager Jon Jakob Berzelius tarafından yürütülmüştür. İlk saf haldeki enzim Cornell Üniversitesi'nde James B.

Sumner tarafından 1926 yılında elde edilmiştir. Sumner, fasulyeden üreaz enzimini izole ederek 1947 yılında Nobel ödülüne layık görülmüştür (Freehold 1972).

Enzimlerin en önemli özellikleri tepkime aktivasyon enerjisini düşürerek tepkimenin hızlı ve verimli olmasını sağlaması ve kararlı yapılarıyla herhangi bir kimyasal değişikliğe uğramadan tepkimeyi katalizlemesidir(Harper 1977), (Lehninger 1982). Enzim katalizli tepkimelerde enzimin aktif kısmına substrat bağlanması hidrojen bağları veya iyonik bağlar ile gerçekleşir.

Standart koşullarda bir dakikada 1 mikromol substrat dönüşümünü katalizleyen enzim miktarı 1 aktiflik birimi (U) olarak adlandırılır. Aktiflik değeri yaklaşık olarak saf enzimler için 10-6-10-11 kg ve endüstriyel enzim preparatları için ise 10-4-10-7 kg olarak belirtilebilir (Nandane ve Prasad 2006). Bir enzim molekülü dakikada binlerce kez tepkime döngüsüne girip döngüyü yürütebilir.

Enzimlerin aktiviteleri, yapısını oluşturan aminoasitlerin dizilişine ve reaktifliklerine (nükleofilitesine) bağlıdır. Sıcaklık, pH, enzim ve substrat derişimi, inhibitör veya aktivatör varlığı gibi çeşitli faktörler de enzim aktivitesini etkiler (Bernhnard 1968).

Biyokatalizör olarak enzimlerin geleneksel kimyasal katalizörlere göre özgünlük ve seçimlilik üstünlükleri vardır. Bu avantajları sadece belirli tepkimelerle sınırlı olmayıp etkinlik gösterdikleri moleküllerin benzer kısımlarını ayırt etmede (bölgesel özgüllük) veya optik izomerlerin ayırt edilmesinde (stereoözgüllük) de geçerlidir (Krajewska 2004). İşlem süresinin kısalığı, geniş bir derişim aralığında ve seyreltik çözeltilerde bile etkin arıtım potansiyelleri diğer üstünlükleridir. Enzim izolasyon ve saflaştırma maliyetinin yüksekliği ve doğal ortamlarından uzaklaştırıldığında kararsız oluşları ise dezavantaj olarak belirtilebilir.

2.2.1. Enzim Aktivitesini Belirleme Yöntemleri

Enzimin aktivitesini belirlemek için çeşitli yöntemler literatürde rapor edilmiştir. Aktivite tayininde genel olarak kaybolan substrat miktarı ve/veya meydana gelen ürün miktarının belirlenerek enzimlerin aktiviteleri ölçülmektedir (Cornish 1995) .

Enzim aktivitesi için IU (Intenational Unit) kullanılır. 1 IU, optimum şartlarda 1 dakikada 1µmol substratı dönüştüren enzim miktarıdır. Enzim aktivitesine, ayrıca

spesifik aktivite de denir. Herhangi bir enzim için spesifik aktivite, 1 mg enzim proteini başına düşen enzim ünitesi sayısıdır. Biyolojik örnekteki enzim için yapılan aktivite ölçümü enzimin saflığı arttıkça spesifik aktivitesinde de artış göstermektedir (Gromada ve ark. 2007).

Enzim aktivitesi tayini için kullanılan farklı metotlar vardır. Bu metotlar arasında en fazla spektrofotometrik analiz yöntemi işlem kolaylığı ve basitliği nedeniyle tercih edilir.

2.2.2. Enzimlerin Uygulama Alanları

Bitkisel, hayvansal veya mikrobiyal kaynaklardan üretilebilen kompleks moleküller olan enzimler canlı organizmalarda substratların kimyasal değişimini katalizlerler. Biyoteknolojik yöntemler kullanılarak enzimler büyük ölçeklerde üretilebilir. Örnek olarak, tripsin enzimi büyük baş hayvanların pankreaslarından, lizozim enzimi yumurta akından, nişastayı parçalayan alfa-amilaz enzimi çimlenmekte olan arpadan endüstriyel ölçekte üretilebilir. Özellikle içeceklerin bozulmasını önlemek için Aspergilus niger'den biyoteknolojik metotlar ile üretilen katalaz kullanılmaktadır (Chaplin ve Bucke 1990).

Enzimlerin medikal ve endüstriyel alanlarda birçok kullanım alanları vardır. Enzimler gıda sektöründe yiyecek ve içecek üretiminde ve hazırlanmasında, tekstil ürünlerinin temizliğinde, klinik tıp ve eczacılık gibi alanlarda hastalıkların teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Medikal alanda kullanılan birçok enzim arasında hazmı kolaylaştırıcı ve nişastayı parçalayan enzim selüloz enzimi, proteini parçalayan enzim proteaz enzimi, laktozu parçalayan enzim laktaz enzimi ve yağları parçalayan enzime ise lipaz enzimleri örnek verilebilir (Brant ve ark. 2004).

Deterjan endüstrisi enzimlerin çok kullanıldığı alanlardan bir diğeridir. Deterjanların bileşimi kullanılacakları alana göre değişen kompleks karışımlardan oluşur. Bazı deterjanlar yapımında da amilaz, selülaz ve lipaz gibi enzimler kullanılırken bazılarında ise alkali koşullarda aktivite gösteren alkali-protez (bazik) enzimler kullanılmaktadır. Bu enzimler özellikle yağ, protein ve nişasta etkisiyle oluşan kirliliği etkili bir şekilde temizler (Fuentes ve Roberts 1988). Dünyada enzimlerin kullanıldığı en büyük pazarlardan bir diğeri de kağıt hamuru ve kağıt endüstrisidir. Son yıllarda

enzimlerin kağıt hamuru ve kağıt üretiminde kullanılabilmesi için yapılan çalışmalar artış göstermiştir. Mürekkep giderme ve ağartma işlemlerinde kullanılmak üzere birçok enzim halen yoğun şekilde çalışılmaktadır. Bu alanda sıklıkla selülaz, ksilaz, lakkaz, lipaz ve katalaz enzimleri kullanılır (Varalakshmi ve Siva).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, rekombinant-DNA teknolojisi ile beraber istenilen özellikteki enzimin endüstriyel ölçekli üretiminin mümkün olduğunu göstermesi, enzimlerin kullanım alanlarının gelecekte daha da yaygınlaşacağını göstermektedir.

2.2.3. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler genelikle gıda ve ilaç endüstrisinde biyokatalizör olarak, kimyasal analiz ve kliniklerde ise özgül biyoafinite ligandları olarak kullanılmaktadırlar. Girdikleri kimyasal reaksiyonlarda sahip oldukları büyük özgünlükleri sayesinde girdikleri reaksiyonlarda herhangi bir değişime uğramazlar, bu özgünlüklerinden dolayı çoğu kez kullanılabilirler. Bu şekilde maliyetten kazanç elde edilir. Ayrıca enzim eğer çözeltide ise, enzimi reaksiyon ortamında bulunan tepkime ve/veya ürünlerden ayırmak zordur. Bundan dolayı uzaklaştırıldıktan sonra enzimin yeniden kullanılabilmesi için bir destek içerisinde veya üzerinde immobilize edilirler. Enzimler çözünmeyen destek görevi gören materyaller (destekler) yardımıyla suda çözünmeyen hale getirilmelerine immobilizasyon denilir. Bu yolla enzim moleküllerinin hareketleri sınırlandırılır. Enzim immobilizasyonu, enzimin bir destek malzemesine fiziksel veya kimyasal olarak bağlanırken katalitik işlemelerde enzim moleküllerinin katalitik aktifliğini koruyarak sürekli ve tekrar kullanımını olarak açıklanabilir.

Enzimleri destek mataryallerine tutuklamanın sağladığı avantajları aşağıdaki gibi sıralayabiliriz:

- ✓ Kararlılık ve tepkimede daha fazla etkili olması
- ✓ Defalarca tekrar kullanılabilirlik
- ✓ Elde edilen ürünlerin enzim içermemesi
- ✓ Çoklu enzim reaksiyon sistemleri için uygulanabilirliği
- ✓ Enzim fonksiyonlarının kolay kontrol edilmesi
- ✓ Endüstride ve ilaç sanayi alanlarında kullanılabilirlik
- ✓ Kirletici atık sorununun en aza indirilmesi

Bu avantajların yanı sıra immobilizasyon işleminin sunduğu bazı dezavantajlar ise şu şekilde sıralanabilir:

- ✓ İmmobilizasyon işlemi sırasında enzimin biyolojik aktivite kaybına uğrama olasılığı
- ✓ Genellikle gelişmiş ekipmanlar gerektirdiğinden immobilizasyon işleminin maliyetli olması (Arica 2000).

Enzimin uygun bir destek malzemesine immobilizasyonu dört farklı yolla gerçekleşir.

1. İmmobilizasyondan önce enzim uygun bir tepkimeyle aktive edilir. Aktivasyon işleminde, molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlanma olasılığı ve reaktif kimyasal bileşiklerin aktiviteyi değiştirme riski dikkate alınmalıdır.

2. Modifiye edilmiş destek malzemesi aktive edildikten sonra enzimin yüzeye kovalent bağ ile bağlanması sağlanır.

3. Biyoseçimli grup içeren protein eldesi için rekombinant DNA tekniği ile modifiye edilip, biyoafinite yöntemiyle uygun destek malzemesine adsorbe edilir.

4. Molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlanmasına neden olabilecek çok fonksiyonlu birleştirme ajanlı destek malzemesi ile enzimin fonksiyonel grupları etkileştirilir.

2.2.4. İmmobilize Enzimlerin Kullanım Alanları

Enzim immobilizasyonu uygulamaları enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanılmasına olanak sağlamaktadır çünkü immobilize enzimlerde depolama ve çalışma kararlılıkları iyileştirilmektedir (Fernández-Fernández ve ark. 2012). Kullanılacağı yere göre, immobilizasyon yöntemi ve kullanılacak destek materyali seçilebilir. İmmobilize enzimler tekrar kullanılmak üzere tepkime ortamından ayrılabilir ve bu yolla serbest enzime kıyasla önemli avantaj sağlar. İmmobilizasyon işlemi ile enzimlerin yüksek sıcaklık, yüzey aktif maddeler ve oksitleyici maddeler gibi sert tepkime koşullarından etkilenmeleri engellenebilir. Aynı zamanda immobilize enzimlerin katı faz protein kimyası ve kontrollü ilaç salınımı konularında uygulama alanları bulunmaktadır. Hali hazırda, yüzlerce enzim immobilize edilmiş ve gıda, ilaç, deterjan ve tekstil endüstrisi gibi farklı endüstri alanlarında kullanılmıştır.(Arica 2000). Enzim immobilizasyonun,

antibiyotik üretimi, tıp, gıda endüstrisi, biyosensör ve biyodizel üretimi ve tekstil endüstrisi gibi alanlardaki uygulamalarının yaygın olduğu rapor edilmiştir (Khan ve Alzohairy 2010).İ

İmmobilizasyon yöntemlerinin çoğu aktive edilmiş destek malzemesinin fonksiyonel gruplarına, amino gruplarının nükleofilik saldırısı ile gerçekleşir.
İmmobilizasyon işlemi, enzimi, üründen ve tepkime karışımından ayırma kolaylığı, enzimin tekrar kullanılabilirliği ve düşük maliyet gibi avantajlar sağlar (Polizzi ve ark. 2007). İmmobilize enzimin konformasyonel ve fonksiyonel özellikleri korunur, ısıl kararsızlık, aktivitede inhibisyon ve denatüre edici ajanlara karşı yüksek duyarlılık gibi olumsuz etkilerin önüne geçilir (Rekuć ve ark. 2009),(Arica ve ark. 2009),(Kunamneni ve ark. 2008),(Arroyo 1998). İmmobilize enzimler susuz sistemlerde, serbest enzimlerden daha yüksek derişimlerde ve sürekli sistemlerde kullanılabilir. İmmobilizasyon ile bazı enzimlerin ısıl kararlılığı arttırılabilir (Twyman 2005).

2.2.5. İmmobilizasyon İçin Kullanılan Farklı Teknikler

2.2.5.1. Adsorpsiyon

İmmobilize enzim hazırlanması için basit ve ucuz bir yöntemdir. Bu teknik kullanılarak hazırlanan immobilize enzimin, yüksek katalitik aktivite sağlamasıdır. Ayrıca immobilize enzimin inaktivasyonundan sonra, destek materyalinin tekrar tekrar kullanılabilmesi diğer metotlara kıyasla daha yüksek bir ticari potansiyele sahip olduğunun göstergesidir. Bu metot ucuz ve kolaydır ancak taşıyıcı ile enzim arasında oluşan kuvvetlerin zayıf olması bu yöntemin dezavantajını oluşturur (Ayhan ve ark. 2013). Destek materyaline bu zayıf bağlarla adsorbe olan enzimlerin bir kısmı yıkama ve işlem sırasında desorbe olur. Bu nedenle, adsorbsiyon yolu ile tersinir enzim immobilizasyonu, enzim ve destek materyali arasında çok güçlü hidrofobik ya da iyonik etkileşim gerektirir (Berna ve Batista 2006). Enzim ve destek yüzeyi arasındaki etkileşim hidrojen bağı, hidrofilik bağ, iyonik bağ ve van der waals kuvvetleri gibi zayıf kuvvetler ile meydana gelmektedir. Agaroz, selüloz ve sefadeks türevleri, metal tuzları ve mineraller veya organik kökenli polimerik destek materyalleri adsorban olarak kullanılmaktadır.

2.2.5.2. Kovalent Bağlanma

Kullanışlı bir immobilizasyon metodu olan kovalent bağlama ile enzim destek materyaline doğrudan bağlanabilir (Ayhan ve ark. 2013). Enzimin destek malzemesi ile kovalent bağlanması iki temel aşamadan oluşur. Bunlardan ilki, enzim molekülleri ve destek malzemesinin bulunduğu ortama eklenen reaktif bir bileşik ile aktive edilmesi ve ikincisi ise, önce desteki aktive etmek için polimer omurgasının aktivasyonu ve/veya modifikasyonu ve ardından yüzeyde oluşturulan gruplar aracılığı ile enzimin doğrudan kovalent olarak bağlanmasıdır. Aktivasyon aşamasında destek malzemeleri üzerinde elektrofilik gruplar meydana getirilir ve böylece destek malzemesi proteinler üzerindeki güçlü nükleofiller ile reaksiyona girer. Bu yolla hazırlanan immobilize enzim sisteminin çeşitli çevresel şartlara, sıcaklık, denaturantlar ve organik çözücülere karşı yüksek direnç kazandırdığı gösterilmiştir. Bu gelişmelerin kapsamı, enzimin doğası, destek materyalinin tipi ve tutuklama yöntemi gibi sistemin diğer koşullarına bağlı olabilmektedir. Enzimler kovalent bağlarla selüloz, agaroz, sefadeks, porlu seramik poliakrilamid, gibi suda çözünmeyen taşıyıcılara kimyasal olarak bağlanırlar.

2.2.5.3. Afinite İmmobilizasyonu

Afinite immobilizasyonu, farklı fizyolojik koşullar altında enzimin matrikse olan ilgisine dayanılarak 2 şekilde gerçekleştirilebilir: ya enzim desteğe afinite oluşturan bir bileşik ile konjuge edilir ya da destek hedef enzim için bir ligand ile ön işleme sokulur. Aynı zamanda enzimlerin saflaştırılmasında afinite adsorbanları kullanılır (Datta ve ark. 2013).

Hidrojen bağı kuvvetleri, van der Walls, coulomb etkileşimi gibi kovalent olmayan etkileşimlerle biyoafinite kaplaması tekrar kullanılabilirliğini ve enzim bağlama kapasitesini önemli oranda arttıran bir tekniktir (Datta ve ark. 2013).

2.2.5.4. Tutuklama

Bu metotta enzimler sentetik veya doğal polimerik ağ içerisine hapsedilir. Bu polimerik ağ, substrat ve ürünün geçmesine izin verirken enzimi ağ içerisinde tutar. Çapraz bağlı poliakrilamid jeller, kappa karragenan, Ca alginat tutuklama yöntemi ile enzim immobilizasyonu işleminde kullanılan bazı polimer olarak örnek verilebilir.

Uygulamada kısa işlem süresi gerektirmesi, ucuz olması ve reaksiyon için ılımlı koşullara sahip olması bu yöntemin sunduğu avantajlar olarak sıralanabilir. Bu metodun en önemli dezavantajı kütle transferinde sınırlamaya sahip olmasıdır (Ayhan ve ark. 2013).

2.2.5.5. İyonik Bağlanma

Kromatografide kullanılan protein-ligand etkileşimi prensibine dayanan bir yaklaşım olan iyonik bağlanma yöntemi, enzimlerin geri dönüşümlü immobilizasyonuna olanak sağlayan, uygulaması basit bir yöntemdir (Berna ve Batista 2006). Kovalent olmayan immobilizasyon metodunun doğası gereği immobilizasyon süreci sıcaklığın, polaritenin ve iyonik şiddet koşullarının değişmesi ile tersine dönebilir. Bu yöntemin uygulamadaki başarısı, genelde enzimin hem tamamen aktif olduğu hem de güçlü bağlandığı koşulların bulunmasına bağlıdır.

2.3.Kriyojeller

Kriyojel tanımı yunanca da krios yani donma ya da buz anlamına gelmektedir ve kriyojeller gel matriksler olarak tanımlanırlar (Denizli ve Küfrevioğlu 2010),(Lozinsky ve ark. 2003).

Kriyojellerin (makrogözenekli jeller olarak tanımlanabilir) üretilmesinde yarı donmuş sulu ortamda buz kristalleri ile gözenekli bir yapı oluşturur. Donmuş buz kristallerin erimesinden sonra birbirine bağlı gözenekler oluşmuş olur. Sistemin büyük çoğunluğunda gözenekler yüksek esnekliğe sahip ve birbiriyle bağlantılı bir şekildedir. Klasik jellerin aksine kriyojeller heterofaz sistemde polimerleşir. Kriyojeller mikro ve makrogözenekli yapılardır. (Plieva ve ark. 2007).

Kriyojeller, yüksek difüzyon, kimyasal ve mekanik dayanıklılık özelliklerinin benzersiz bir bileşimini sunan, sıfırın altındaki sıcaklıklarda sentezlenen ve yüksek derecede birbirine bağlı gözenekli yapıya sahip olan özel bir hidrojel türüdür (Tripathi ve ark. 2009). Kriyojeller, 10-100 mikron aralığında gözenek boyutu ile birbirine bağlı süper makrogözenekli yapılardır. Kriyojel yapılarının birbirine bağlı süper

makrogözeneklerinin bulunması jel matrisin tıkanmasını önleyerek mikro, nano veya biyopartiküllerin kolaylıkla geçişine izin verir (Lozinsky ve ark. 2003),(Lozinsky 2002).

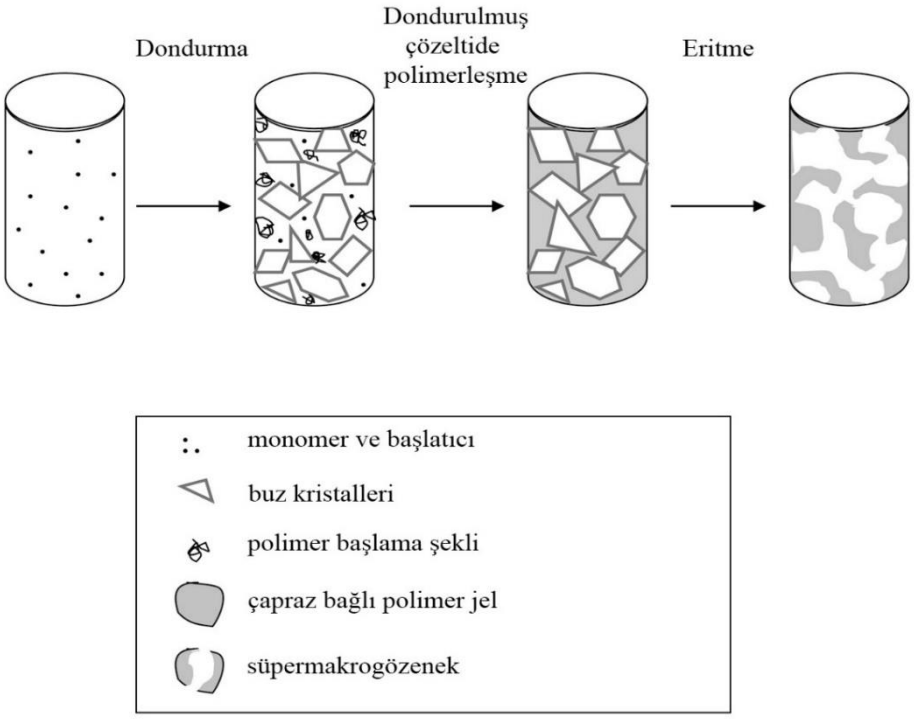
2.3.1. Kriyojellerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Çözücünün kristallenme ve kimyasal reaksiyon hızı uygun bir şekilde kontrol edilerek uygun özelliklere sahip kriyojel hazırlanır. Kriyojelin hazırlanması esnasında donan buz kristalleri porojen olarak görev alır. Kriyojel eridikten sonra birbirine bağlı makrogözenekler negatif sıcaklıklarda sulu ortamda oluşur. Kimyasal reaksiyon donmamış sıvı fazda gerçekleşir. Donma sorasında çözücünün kristalleri büyümeye başlar. Donan kristaller sürekli bir sistemi oluşturana kadar diğer kristallerle birleşir. Kimyasal reaksiyonlar tamamlandıktan sonra buz kristalleri erimeye başlar ve daha sonra birbiriyle bağlantılı makrogözenekli kanallar içeren bir matriks oluşturur. (Şekil 2.1) (Plieva ve ark. 2007).

Kimyasal reaksiyon donmamış sıvı faz içinde gerçekleşir. Çözünmüş reaktifler yarı donmuş reaksiyon ortamında yoğunlaşır. Reaksiyon devamında polimer zincirleri gözeneklerden gözenek duvarlarına geçerek kriyojeller oluşturulur. Gözenek duvarları içindeki artan polimer konsantrasyonu kriyojelin mekanik sertliğinin oluşmasını sağlar (Plieva ve ark. 2005),(Plieva ve ark. 2006),(Arvidsson ve ark. 2003) .

Kriyojeller monolit, çubuk, levha, disk ve küresel parçacıklar gibi farklı şekillerde üretilebilir. Şekil, tepkime kabı, dağılım maddesi ve diğer sentez koşulları tarafından belirlenir (Lozinsky 2002),(Kumar ve ark.). Çoğu uygulama için kriyojellerin geometrik şekli, kendi iç gözenekli yapısından daha az önemlidir.

İyonik şiddet, pH, dondurulma hızı, sıcaklık gradienti, çözünen monomer veya oligomerler, çapraz bağlanma koşulları, su ve organik çözücüler, kriyojellerin gözenek boyutu dağılımı ve gözenek duvarı kalınlığı gibi yapısal özelliklerinde ciddi anlamda değişiklikler meydana gelmesine sebep olurlar. Bu etkiler, buz kristallerinin su damlalarından (nano alan, küme) daha büyük bir özgül hacme sahip olmalarıyla, buz kristalitlerinin orijinal sulu çözeltiden daha fazla saf ve homojen olmalarıyla ilgilidir. Gözeneklerin şeklinin yuvarlak ve gözenek yapısının pürüzsüz olmasının sebebi çözücü ve polimerik yapı arasındaki yüzey gerilimidir (Plieva ve ark. 2009),(Cui 2011).



Şekil 2. 1. Kriyojelleşme olayı (Plieva ve ark. 2007)

Yavaş dondurulma hızı, daha büyük buz kristallerinin oluşmasına sebep olurken gözenek duvarlarının parçalanmasına neden olabilir. Fakat çözeltinin dondurulma sıcaklığı arttırıldığında daha büyük buz kristalleri oluşması sonucunda daha geniş gözenekli kriyojeller elde edilir. Çözeltinin dondurulma sıcaklığı azaltıldığında ise gözenek yapıcı olarak kullanılan çözücü kristallerinin daha küçük yapıda daha fazla sayıda oluşumu ile yoğun gözenek yapısına sahip kriyojellerin elde edilmesine sebep olur (Lozinsky ve ark. 1986). Başlangıç monomer veya oligomer derişimi ne kadar fazlaysa o kadar kırılgan ve yoğun matriksler elde edilir. Başlangıç derişimi azaltıldıkça matriksler daha süngerimsi ve elastik bir yapı göstermeye başlarlar (Arvidsson ve ark.2003). Süngerimsi kriyojeller içerisinde bulunan suyun büyük bir kısmı kapilerler içerisindedir ve mekanik olarak sıkıştırma ile uzaklaştırılabilirler. Mekanik sıkıştırma ile kriyojelin içindeki toplam sıvının yaklaşık % 70'i uzaklaştırılabilir. Sıkıştırılmış kriyojeller bir dakikadan daha kısa bir süre içerisinde sıvı ile temas ettiğinde tekrar şişmeye başlar ve orijinal şekline geri döner. Kriyojeller hazırlanırken ne kadar az miktarda çapraz bağlayıcı kullanılırsa sıvıda şişme oranları o kadar fazladır (Daniak ve ark. 2006).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda HEMA, agaroz, dekstran, poliakrilamid, polivinil alkol ve polidimetilakrilamidden kriyojeller üretilmiştir (Lozinsky ve Plieva 1998a.),(Plieva ve ark. 2005).

Kriyojeller sahip oldukları geniş gözenekler, kısa difüzyon yolu, düşük basınç kaybı ve çok kısa alıkonma süresi gibi pek çok avantajı ile kullanım alanını arttırmaktadır. Günümüzde kriyojeller kromatografi malzemeleri, moleküler elektroforez, immuno difüzyon ve katı kültür ortamları için jel destek malzemesi olarak çok çeşitli biyomedikal ve biyomühendislik uygulamalarda kullanılmaktadır (Lozinsky ve ark. 2003),(Lozinsky ve ark. 2006).

Kriyojellerin temel uygulama alanları ise hedef molekülün saflaştırılması için organellerin, virüslerin, mikrobiyallerin ve memeli hücrelerinin kromatografisinde, immobilize enzim ve hücrelerde üç boyutlu biyoayırma destek malzemesi olarak kullanımı şeklinde özetlenebilir (Lozinsky ve ark. 2003).

2.3.2.Gözenek Özelliklerinin Kontrolü

Kriyojellerin gözenekli yapısı özellikle kriyojellerin çözünmüş monomerlerin derişimi, donma sıcaklığı (Td), kullanılan çözücü ve başlangıç reaksiyon karışım içeriği (TEMED, amonyumpersülfat) ile kontrol edilir. Donma sıcaklığı (Td) ve kullanılan çözücü, gözenekli yapıyı etkiler. Kriyojellerinin üretilmesinde donma sıcaklığını -30^{o}C ile -10 ^{o}C' olması bu kriyojel monolitlerin jelleşme verimini ve akış yolu özelliklerini azaltır. -20 ^{o}C' ye kadar olan düşük sıcaklıklarda kriyojel oluşumu sırasında kriyojellerin monomer dönüşüm oranı % 70-90 civarındadır (Lozinsky ve Russ 2002), (Plieva ve ark. 2004),(Plieva ve ark. 2004), (Plieva ve ark. 2006).

Serbest radikal polimerleşme reaksiyonlarında polimerleşme hızı oluşan polimerin molekül ağırlığı üzerinde; aktifleştirici TEMED' in derişimleri ve başlatıcı amonyumpersülfat (APS) büyük bir etkiye sahiptir. APS ve TEMED arasındaki reaksiyonla polimerleşme reaksiyonu, monomerlerin polimer zincirlerini çapraz bağlamak için serbest radikaller oluşturmak üzere başlar. Serbest radikal polimerleşme reaksiyonu yöntemiyle negatif sıcaklıklarda kriyojeller hazırlanırken 2 olası durumu göz ardı etmemek gerekir:

1) Jelleşme oluşmadan önce çözeltinin donması
2) Önceden jelleşmiş karışımın donması

Reaksiyon karışımındaki başlatıcı sistemin miktarı tarafından polimerleşme hızı kontrol edilir. Bundan dolayı birbirine bağlı makrogözenekli kriyojeller, reaksiyon karışımındaki başlatıcı sistemin miktarı değiştirilerek hazırlanır. İlk safhada kopolimerleşme işlemi gerçekleşir. Reaksiyon ortamının donmasından sonra ise geriye kalan donmamış mikrofazın içinde tamamlanır. Sonrasında makrogözenekli yapının oluşmasını sağlar. (Plieva ark. 2006).

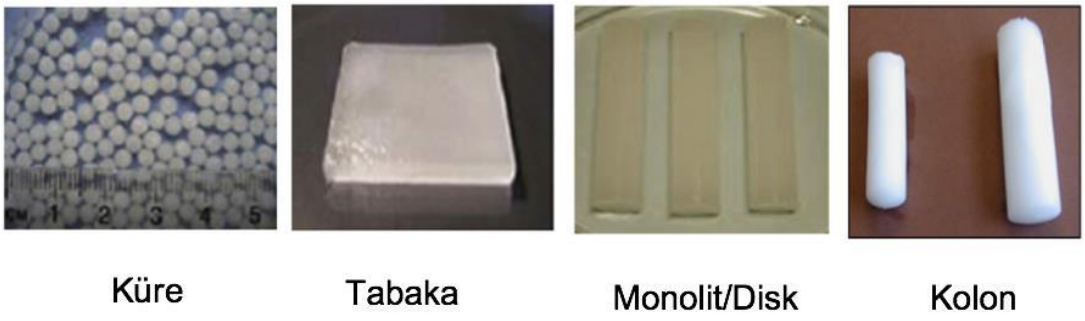
2.3.4. Kriyojelin Geometrisi

Donma koşulları altında jel oluşturucu monomerler içeren sulu çözeltinin kriyopolimerizasyonuylahazırlanan süngerimsi malzemeleri olan kriyojel toz, tabaka, çubuk, küre, membran ve monolitik malzeme formunda hazırlanabilir (Şekil 2.12). Biyoayırma için çoğu kriyojel, laboratuvar ölçeğinde kullanılmaya uygun olan monolit formunda hazırlanmıştır. Monolitik bir kriyojelin, kriyojelin kendisi ile aynı çapa sahip olan uygun bir kolona gereksinimi vardır ve bu nedenle bazen ölçek uygun değildir. Bununla birlikte, formattaki monolitik kriyojellerden farklı olarak kriyojel küreleri, sulu jeloluşturucu karışımı suyla karışmayan çözücülere damlatarak oluşan sulu damlacıkların dondurulması-çözdürülmesiyle üretilmiştir (Lozinsky ve Plieva 1998), (Kumar ve ark. 2005), (Orakdogen ve ark. 2011), (Tripathi ve Kumar 2011). Damlatma yöntemi, kullanım için uygundur, ancak nispeten büyük damlacıklar üretme eğilimindedir.

Mikrokanallar ya da mikroakışkanlar, monodispers damlacıklarının veya partiküllerinin kontrollü olarak hazırlanması için kullanılmıştır (Baroud ve ark. 2010), (Garstecki ve ark. 2006),(Tan ve ark. 2008). Bu damlacıkların ya da partiküllerin boyutları, mikrokanalların geometrisinin yanı sıra sıvı özellikleri ve hızı ile de ilişkilidir (Yun ve ark. 2009), (Xu ve ark. 2012), (Liu ve ark. 2012). Kriyojel kürelerin hazırlama işleminde, kriyojel kürelerin çap dağılımı, sulu fazın ve su ile karışmaz sıvının akış hidrodinamiğinin değiştirilmesi ile ayarlanabilir ve kontrol edilebilir (Zhao ve ark. 2014).

Kriyojelin uygun şekli performansını artıracaktır. Molekül baskılı kriyojelin, bir monolitik sütunu aracılığıyla, hedef maddenin rekombinant tutma mekanizmasını

kriyojel üzerindeki yapısal analogları ile keşfedebiliriz. Bir kriyojel, moleküler olarak basılmış polimerik parçacıklara gömüldüğünde, kriyojelin özgül yüzey alanı ve adsorpsiyon kapasitesi dikkat çekici şekilde artacaktır. Kriyojel, yüksek miktarlarda biyolojik numunelerin yüksek verimle işlenmesine yardımcı olan, moleküler olarak baskılı ayırma membranı olarak da hazırlanabilir (Wang ve ark. 2015).



Şekil 2.5. Farklı formlarda hazırlanmış kriyojellerin dijital görüntüleri (Plieva ve ark. 2008).

2.3.5. Kriyojellerin Yüzey Kimyası

Biyoparçacıkların kromatografisi için dizayn edilen pAAm kriyojellerin toplam hacminin yaklaşık % 90-93' ünü oluşturan büyük gözenek hacmi ve büyük gözenek boyutu, hedef moleküllere bağlanacak yüzey alanının sınırlı olmasına neden olur. Ayrıca pAAm kriyojellere dayalı olan kromatografik matrislerin kapasitesi, genellikle AAm ile kopolimerize olan fonksiyonel monomerin derişimine bağlıdır. Ko-monomerin derişiminin fonksiyonel grupla artması çoğu kez kırılgan ve esnek olmayan kriyojellerin oluşmasına neden olur. Esnek ve süngerimsi yapıda kriyojel hazırlamak için ko-monomerin derişimi % 0.08-0.20 mol arasında tutulur. Ancak fonksiyonel grupların çoğu hedef substrat ile etkileşemez ve 0.02-0.08 mmol/ml' lik iyon değiştirme kapasitesi protein bağlanma kapasitelerinin 0.1-0.4 mg/ml'yi aşmamasına neden olur (Plieva ve ark 2006).

Kriyojellerin yüzeyine fonksiyonel bir ligand takmak için değişik yollar bulunmaktadır. Ligand, pAAm kriyojellerde bulunan reaktif gruba ya oluşum sırasında doğrudan ya da bir uzatıcı kol (spacer) yoluyla fonksiyonel grup üzerinden bağlanır**(**Plieva ve ark. 2007).

2.3.6. Kriyojellerin Uygulamaları

Kriyojeller gözenekli yapıları, hızlı şişme kinetikleri (hidrofilik karakterden dolayı), elastik ve kararlı yapılarıyla, akış hızlarına karşı gösterdikleri düşük dirençten dolayı avantajlı malzemelerdir (Plieva ve ark. 2007), (Kumar ve ark. 2006). Kriyojellerin uygulama alanları incelenecek olursa; Destek Malzemesi: Kriyojeller sahip oldukları avantajlar nedeniyle ayırma işlemlerinde kromatografik destek malzemesi olarak kullanım alanı bulmuşlardır. Ayırma işlemlerinde kullanılan kriyojellere örnek olarak; insan periferal kan lenfositlerini ayırma (Kumar ve ark. 2003) ile L- glutamik asitin ayrılması (Aydoğan ve ark. 2012) verilebilir. Hücre ve Enzim Tutuklanması: Mekanik kararlılığı ve fizikokimyasal karakterleri de barındıran kriyojeller, hücre taşınmasında da kullanım alanı bulmuştur (Plieva ve ark. 2007). Örneğin Efremenko, ve ark., (Efremenko ve ark. 2006) tarafından yapılmış olan çalışmada polivinil alkol kriyojellere hücre tutuklanmış (*Rhizopus oryzae*) ve laktik asit biyokatalizini hedeflemişlerdir. Diğer bir çalışmada; polivinil alkol kriyojellere enzim (glukoz oksidaz) immobilize edilmiştir (Doretti ve ark. 1998). Destek malzemesi olarak kullanılan kriyojel membranların aynı zamanda sensör uygulamasında kullanılabilirliği araştırılmıştır (Doretti ve ark. 1998). Doku Mühendisliği: Doku iskeletleri (scaffold) doku mühendisliğinde kullanılan sentetik ya da doğal polimerlerden sentezlenen, 3 boyutlu ve gözenekli yapıya sahip malzemelerdir (Sharma ve ark. 2013). Sharma, ve ark., tarafından doğal polimerler (jelatin ve karrageenan) kullanarak uygun koşullar altında kriyojel doku iskeleti hazırlamış ve doku mühendisliğinde kullanılabilirliğini araştırmışlardır (Sharma ve ark. 2013). Diğer doku mühendisliği çalışmasında doğal (dekstran) ve sentetik kaynaklı (hidroksietil metakrilat) sentezlenen, biyobozunur özellikteki kriyojelin doku mühendisliği için uyguluğu araştırılmıştır (Bölgen ve ark. 2009).

3.MATERYAL ve METOT

3.1. Kullanılan Kimyasallar

2-Hidroksietil metakrilat (HEMA), glisidil metakrilat (GMA), sodyum dodesil sülfat (SDS), etilenglikol dimetakrilat (EGDMA), amonyum persülfat (APS), Glisin, hidroklorik asit (HCI), İmmünoglobülin-G (IgG), pepsin, trikloroasetik asit (TCA), Sigma (Sigma Chemical Co., ABD) firmasından tedarik edilmiştir. N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) Fluka AG (İsviçre) firmasından tedarik edilmiştir. ullanılan diğer kimyasalların hepsi Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından tedarik edilmiştir.

3.2. Kriyojel Biyoreaktörlerin Hazırlanması

İlk olarak biyoreaktör olarak kullanılacak olan kriyojeller yığın polimerizasyonu ile kısmen dondurulmuş koşullar altında sentezlenmiştir. Kriyojellerin hazırlanması için iki ayrı sıvı faz oluşturulmuştur. Birinci sıvı faz için, 555.0 µL GMA (glisidil metakrilat) ve 2.20 mL HEMA (2-hidroksietil metakrilat) monomerleri, 3.25 mL suda çözülmüştür. Diğer sıvı faz için, yüzey aktif madde olarak olarak kullanılan 0.50 g SDS (sodyum dodesil sülfat) 13.80 mL suda çözülmüş ve 1.20 mL EGDMA (etilenglikol dimetakrilat) çapraz bağlayıcısı eklenmiştir. Daha sonra her iki sıvı faz manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve buz banyosunda 20 dakika soğutulmuştur. Polimerleşme tepkimesinin gerçekleşmesi için 0.01 g APS (amonyum persülfat) ve 50.0 µL TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin) başlatıcı ve aktivatör çiftleri kullanılmıştır. Önce APS, buz banyosunda bekletilen monomer çözeltisi içerisinde çözülmüş ve hemen sonrasında TEMED eklenerek polimer çözeltisi şırıngaların içerisine 4 mL eklenerek dökülmüs -12.0°C'da 24 saat bekletilerek polimerleştirilmiştir. Polimerleşmesi gerçekleşen biyoreaktör kriyojeller, oda sıcaklığına alınarak gözeneklerin açılması gerçekleştirilmiş ve tepkimeye girmemiş monomerlerin uzaklaştırılması için saf su ile birkaç defa yıkanmıştır.

3.3.Pepsin Enzim İmmobilizasyonu

Kriyojel biyoreaktörlere pepsin enzim immobilizasyonu öncesi, 2 saat 50 mM pH 4.0 Gly-HCI tamponu ile sürekli sistemde dengeye getirilmiştir. Dengeye getirilen kriyojel, 50 mM pH 4.0 Gly-HCI tamponunda hazırlanmış 2 mg/mL derişimine sahip 20 mL pepsin çözeltisi ile 24 saat +4°C'de farklı sürelerde (3, 6, 12, 24 saat) immobilize edilmeye çalışılmıştır. Gerçekleştirilen immobilizasyon işlemi öncesi ve sonrası pepsin çözeltileri ayrılarak UV-görünür bölge spektrofotometresi kullanılarak 280 nm'de absorbans değerleri (A) ölçülerek immobilizasyon miktarı belirlenmiştir.

3.4. Kriyojel Biyoreaktörlerin Karakterizasyonu

3.4.1. Yüzey Morfolojisi (SEM)

Kriyojel biyoreaktörlerin morfolojisini belirlemek için yığın ve yüzey yapısında yüksek oranda büyütme sağlayan taramalı elektron mikroskobu (SEM) (JEOL, JEM 5600, Tokyo, Japonya) kullanılmıştır. Gözeneklerinde su olan kriyojel biyoreaktörler -60.0°C'da dondurulma işlemiyle liyofilizatörde (Chris Alpha 1-2 LD plus, M Christ GmbH, Almanya) kurutulmuştur. Kurumuş biyoreaktör parçaları iletken bir yapıştırıcıyla SEM örnek plakası üzerine sabitlenmiş ve örnek yüzeyi 200 Å kalınlığında metalik altın ile vakum altında kaplanarak iletken hale getirilmiştir. Yerleştirilen kriyojel örneklerinin farklı büyütme oranlarında mikrofotoğrafları çekilmiştir.

3.4.2. Şişme Deneyi

Kriyojel biyoreaktörlerin denge şişme oranlarının belirlenmesi amacıyla, biyoreaktörler ±0.0001 g duyarlıkla tartılarak 50 mL saf su içeren bir behere konulmuştur. 25.0°C sıcaklıkta 1 dakika ile 2 saat aralığında belirlenen sürelerde su ortamından alınan kriyojellerin süzgeç kağıdı vasıtasıyla yüzeyindeki su uzaklaştırılarak hassas terazi ile tartımı gerçekleştirilmiştir. Kuru ve ıslak ağırlıklar kaydedilmiş ve aşağıdaki eşitlik kullanılarak biyoreaktörlerin denge şişme oranları belirlenmiştir.

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

W_0 kriyojelin şişmeden önceki kütlesini (g), W_s ise kriyojelin şiştikten sonraki kütlesini (g) ifade etmektedir.

3.5. Pepsin Enzim Aktivite Tayini

Pepsin aktivitesi tayini, Bergkvist ve Hasem. (Bergkvist,R. 1963, Acta Chem. Scand, 17,2239-2249, Hashem 2000, Bioresour. Technol., 75,219-222) tarafından önerilen metodun modifikasyonu ile gerçekleştirildi.

Bu metot ile 50 µL serbest pepsin enzimi, 250 µL pH 2.0, 0.05 M Gly-HCl tamponu ve 250 µL IgG 30 dakika 37 ºC'de bekletilmiştir. 30 dakika sonunda ortama 250 µL % 5'luk trikloroasetik asit (TCA) ilave edilmiştir. Daha sonra 1.0 mL alınarak 12000 g'de 10 dakika santrifüjlenmiştir ve süpernatanın 280 nm'de absorbansı okunmuştur.

İmmobilize pepsinin aktivite tayini için; kriyojel biyoreaktörler 30 dk pH 2.0 Gly-HCI tamponu muamele edilmiş ardından 30 dk pH 2.0 tamponu ile dengeye getirilmiştir. Dengeye getirilen biyoreaktörler IgG çözeltisi ile 60 dk etkileşime sokulmuştur. Biyoreaktör ile muamele edilen IgG çözeltisinden 250 µL alınarak serbest pepsin aktivitesinde de kullanılan 250 µL pH 2.0 tamponu içerisine eklenmiş ve 30 dakika 37.0°C'de bekletilmiştir. Serbest epsin enzim aktivitesinde yapıldığı gibi on dakika sonunda ortama 250 µL % 5'luk trikloroasetik asit (TCA) ilave edilmiştir. Daha sonra bu karışım 12000 g'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatanın 280 nm'de absorbansı okunmuştur.

3.6. Substrat Derişiminin Aktiviteye Etkisi

Pepsin aktivitesine substrat derişiminin etkisini belirlemek için sabit hacimde ve optimum pH değerinde farklı derişimlerde (2.0- 6.0 mM) IgG çözeltileri hazırlanmıştır. İmmobilize pepsin ve serbest pepsin için Bölüm 3.5.'de anlatılan yöntemlere göre aktivite tayini yapılmıştır.

3.7. Enzim immobilize edilmiş kriyojel biyoreaktör ile pepsin enzim aktivitesinin gerçekleştirilmesi ve optimizasyon koşullarının belirlenmesi

3.7.1. pH Değişiminin Aktiviteye Etkisi

Pepsin aktivitesine pH değerinin etkisini belirleyebilmek amacıyla farklı pH değerlerinde (pH 1.0-5.0 Gly-HCl tamponu) substrat derişimi 2.0 mg/mL olan çözeltiler hazırlanmıştır. Her bir pH değerinde immobilize pepsin ve serbest pepsin için aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Diğer parametreler sabit tutularak pH değerinin değiştirilmesiyle epsin aktivitesine pH değerinin etkisi incelenmiştir. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek % aktivite değerleri bulunmuştur. pH değerlerine karşılık % aktivite değerleri grafiğe geçirilerek serbest ve immobilize pepsin için en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri "optimum pH" olarak belirlenmiştir. Yürütülen diğer deneyler optimum pH değerinde gerçekleştirilmiştir.

3.7.2. Sıcaklığın Aktiviteye Etkisi

Pepsin aktivitesine sıcaklığın etkisini belirleyebilmek amacıyla farklı sıcaklık değerlerinde (4.0-50.0°C) optimum pH değerindeki tamponla hazırlanmış substratın kullanımıyla immobilize pepsin ve serbest epsin için aktivite tayini yapılmıştır.

3.8. Depo Kararlılığı

Serbest ve immobilize pepsin 4°C'de 30 gün boyunca aktivite ölçümleri yapılarak depo kararlılıkları incelenmiştir. Bu zaman periyodunda enzimde herhangi bir sızma gözlenmemiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Pepsin Enzim İmmobilizasyonu

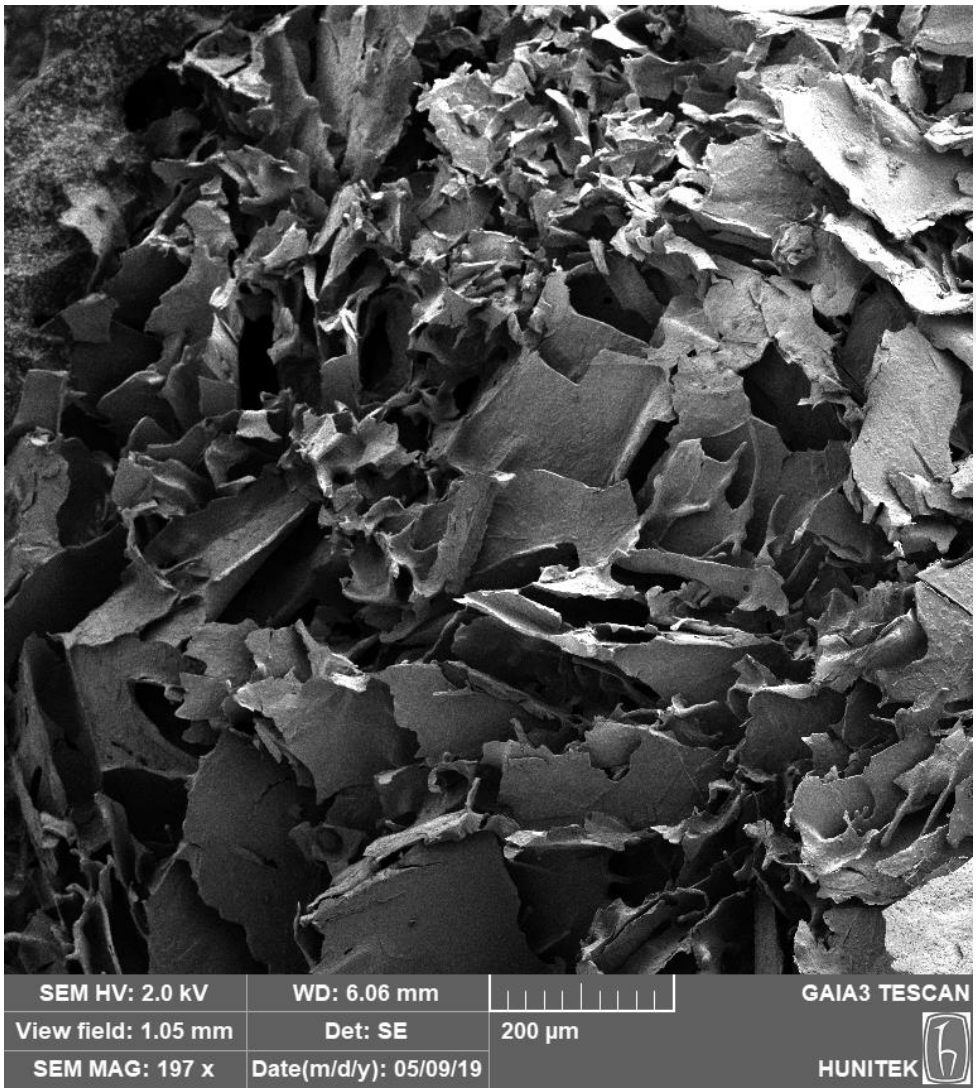
Sentezlenen destek malzemesine pepsin enzim immobilizasyonu sentezde kullanılan GMA monomerinin epoksi gruplarına pepsinin amino gruplarının nükleofilik saldırısı sonucu kovalent bağlanma yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Pepsin immobilizasyonu öncesi kriyojeller ilk olarak 2 saat 50 mM pH 4.0 Gly-HCI tamponunda sürekli sistem kullanılarak dengeye getirilmiştir. Dengeye getirilen kriyojel, 50 mM pH 4.0 Gly-HCI tamponunda hazırlanmış 2 mg/mL derişimine sahip 20 mL pepsin çözeltisi ile sürekli sistemde +4°C'de farklı sürelerde (3, 6, 12, 24 saat) immobilize edilmeye çalışılmıştır. Kriyojellerden sürekli sistem kullanılarak geçirilen pepsin çözeltileri immobilizasyon öncesi ve sonrası olarak muhafaza edilmiştir. İmmobilizasyon işleminden sonra da fiziksel adsorpsiyonu ortadan kaldırmak için kriyojeller 10 mL su ile çözelti absorbans ölçümleri sıfıra yaklaşana kadar yıkama işlemine devam ettirilmiştir. Ayrılan immobilizasyon öncesi, sonrası ve yıkama çözeltileri UV-görünür bölge spektrofotometresi kullanılarak 280 nm'de absorbans değerleri (A) ölçülerek immobilizasyon miktarı incelenmiş ve etkili immobilizasyonun sadece 24 saatte gerçekleştiği görülmüştür. Yapılan hesaplar doğrultusunda 24 saatte gerçekleştirilen immobilizasyon sonucunda kriyojellere 13.35 mg pepsin immobilize edildiği görülmüştür.

4.2. Kriyojel Biyoreaktörlerin Karakterizasyonu

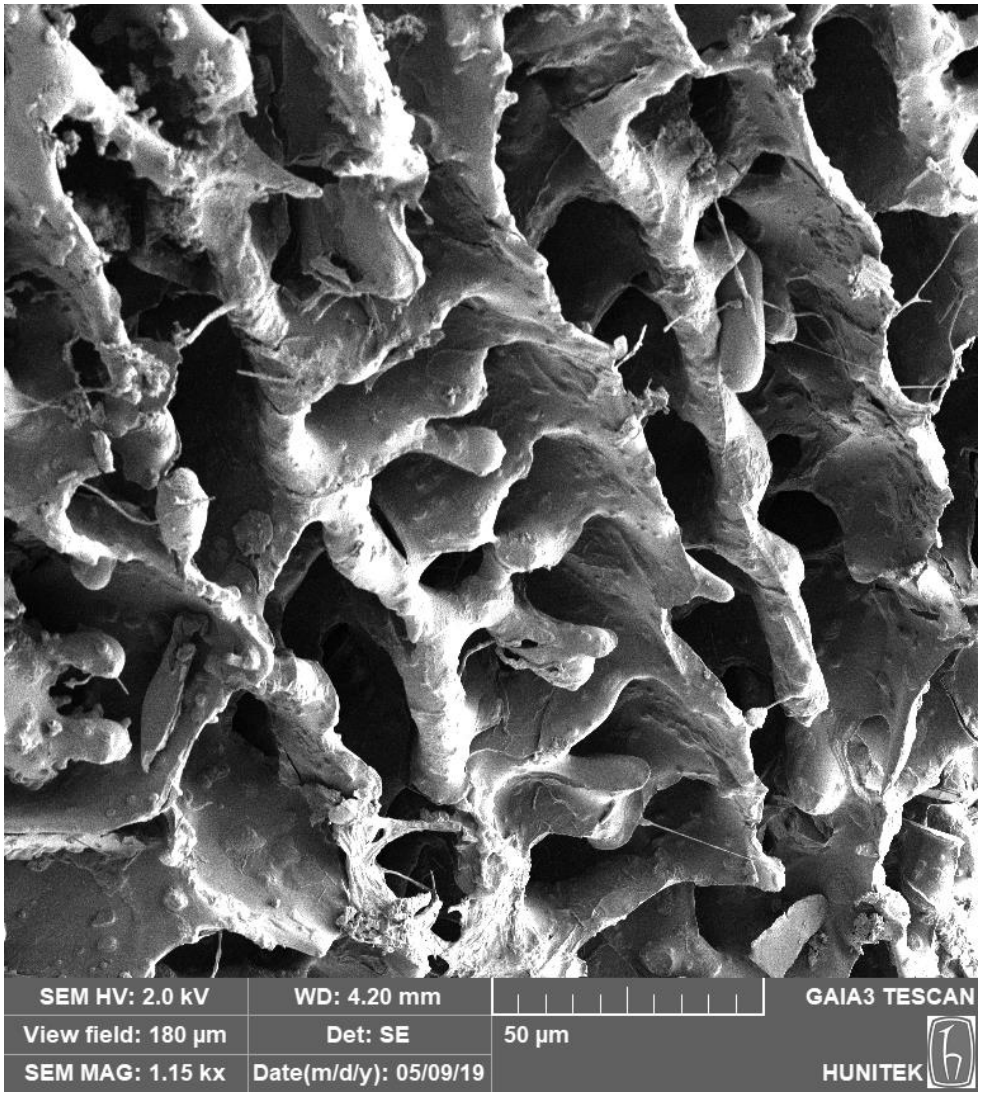
4.2.1. Yüzey Morfolojisi

Pesin immobilizasyonunda destek malzemesi olarak kullanılan biyoreaktörlerin yüzey morfolojisini ve iç yapısını incelemek amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülemesi yapılmıştır. Gözenek yapısını kaybetmemesi için 24 saat buzdolabında bekletildikten sonra liyofilizatörde dondurularak kurutulan biyoreaktörlerin farklı oranlarda büyütülmüş SEM görüntüleri Şekil 2.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi kriyojeller birbirleriyle bağlantılı makrogözeneklere sahiptir.

Tez kapsamında sentezlenen kriyojel biyoreaktörlerde suyun yüzey gerilimini azaltmak ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılan etilenglikol dimetakrilatın çözünürlüğünü artırmak için sodyum dodesil sülfatın yüzey aktif madde olarak dahil edilmesiyle klasik kriyojel görüntüsünden farklıdır. Bu nedenle, kriyojel gözenek yapısı yuvarlak olmasına rağmen biraz pürüzlüdür. Gözeneklerin boyutlarının yaklaşık olarak 5-50 µm aralığında olduğu bulunmuştur. Bu gözenekli yapı substratın kolayca difüzyonuna olanak sağladığı için sentezlenen kriyojelin pepsin immobilizasyonuna uygun destek malzemesi olduğunu gösterir.



Şekil 4.1. Kriyojel biyoreaktörlerin farklı oranlarda büyütülmüş SEM görüntüleri



Şekil 4.2. Kriyojel biyoreaktörlerin farklı oranlarda büyütülmüş SEM görüntüleri

4.2.2. Şişme Deneyi

Kriyojel biyoreaktörlerin denge şişme oranlarının belirlenmesi amacıyla ±0.0001 g duyarlıkla tartılarak 50 mL saf su içeren bir behere konulmuştur. 25.0°C sabit sıcaklıkta 1 dakika ile 2 saat aralığında belirlenen sürelerde su ortamından alınan kriyojellerin süzgeç kağıdı yardımı ile yüzeyindeki su uzaklaştırılarak hassas terazi ile tartımı gerçekleştirilmiştir. Kuru ve ıslak ağırlıklar kaydedilmiş ve aşağıdaki eşitlik kullanılarak biyoreaktörlerin denge şişme oranları belirlenmiştir.

Şişme oranı (%) = $[(W_s-W_0) / W_0] \times 100$ (4.1)

W_0 kriyojelin şişmeden önceki kütlesini (g), W_s ise kriyojelin şiştikten sonraki kütlesini (g) ifade etmektedir.

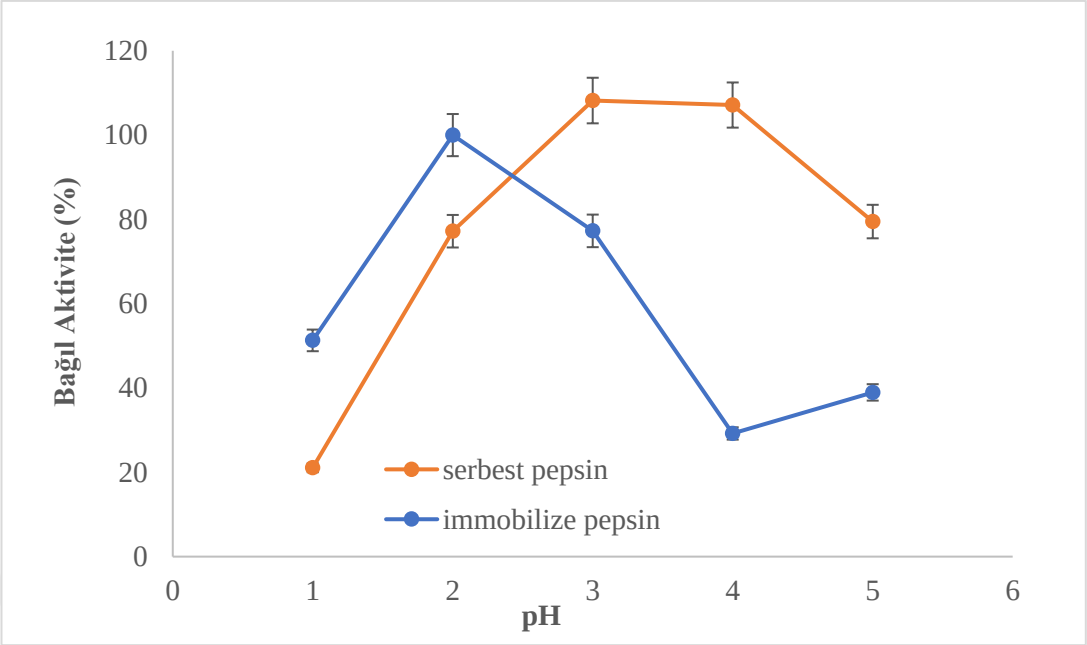
Sentezlenen biyoreaktörleri, monomerik alt birimleri çapraz bağlar ile bağlı olduğundan suda çözünmeyip şişebilen üç boyutlu polimerik yapılardır. Su içerisine koyulan kriyojel biyoreaktörlere su molekülleri kapiler etki yaratarak yapının içine ilerleyip gözeneklerini açarak çok hızlı şişmesine ve hatta 1. Dakikada en son şişmiş hallerine ulaşmalarına sebep olmuştur. Bu çalışmada sentezlenen pepsin immobilize reaktör ve pepsin immobilize edilmemiş reaktörlerin denge şişme oranları sırasıyla % 480 ve % 536 olarak bulunmuştur.

Denge şişme oranlarından da görüldüğü gibi kriyojel biyoreaktörlerin denge şişme oranları oldukça yüksektir. Bu sonuçlar yapısındaki HEMA ve GMA monomerlerin hidrofilik fonksiyonel grup sayısının fazla olduğunu gösterir. Ayrıca pepsin immobilize edilen reaktörün denge şişme oranının diğer reaktöre göre yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuç immobilizasyon ile birlikte artan yüzey alanı, pepsinin hidrofilik karakteri ve protein üzerindeki polar grupların olması ile açıklanabilir.

4.3. Pepsin Aktivitesine Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi

4.3.1. pH Değişiminin Aktiviteye Etkisi

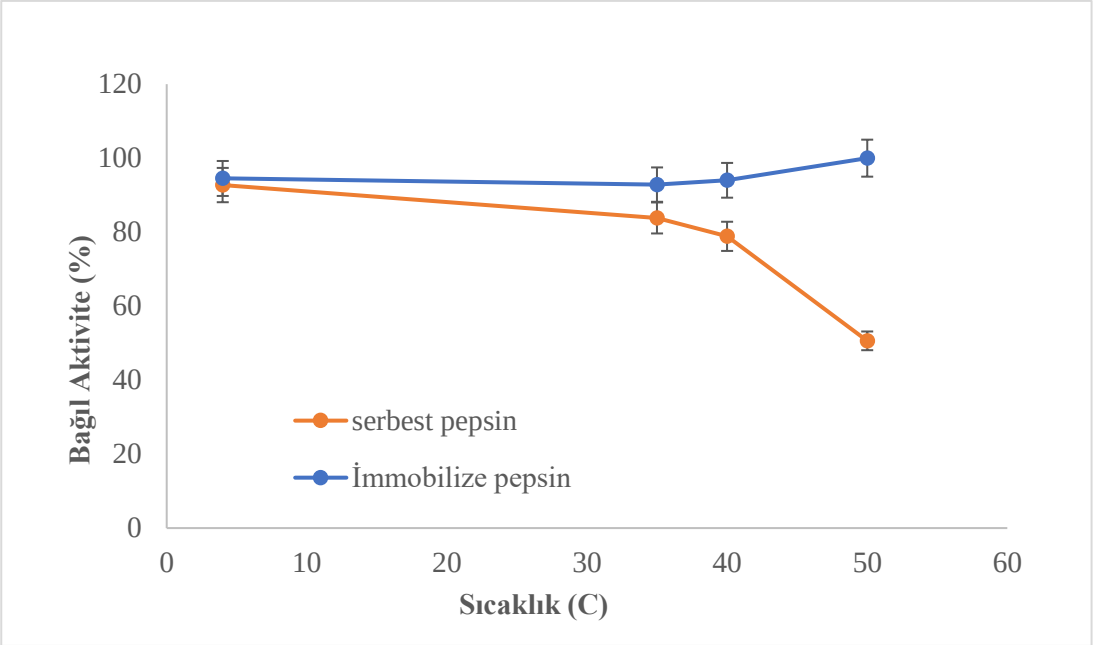
Serbest ve immobilize pepsin aktivitesine pH'ın etkisi Gly-HCl (pH 1.0-5.0) tamponları ile çalışılmıştır. Bu çalışmada IgG substratı kullanılmış, ve 25.0°C'de pepsin aktivitesi ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pH grafikleri Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Grafik incelendiğinde serbest pepsin için optimum pH' a pH 3.0 Gly-HCl tamponu ile ulaşılırken, immobilize pepsin için optimum pH' a pH 2.0 Gly-HCl tamponu ile ulaşılmaktadır. Grafik incelendiğinde immobilize pepsin aktivitesinde pH 2.0'dan düşük ve yüksek değerlerde keskin bir şekilde azalma vardır. Fakat serbest pepsin aktivite gösterdiği pH aralığı daha geniştir. Bu sonuç kovalent bağlı pepsin enziminin immobilizasyon işlemi ile ekstrem pH değerine karşı kararlılığındaki artışı göstermektedir.



Şekil 4.3. pH değerinin pepsin aktivitesine etkisi; IgG derişimi: 2.0 mg/mL; zaman: 60 dak; t: 25.0°C.

4.3.2. Sıcaklığın Aktiviteye Etkisi

Serbest ve immobilize pepsin enzimlerinin aktivitesi 4.0-50.0°C arasında 5 farklı sıcaklıkta incelenmiştir. Şekil 4.4., serbest ve immobilize pepsin aktivitesine sıcaklığın etkisini göstermektedir. Grafik incelendiğinde serbest ve immobilize pepsin için optimum sıcaklıklar sırasıyla 30.0 °C ve 60.0 °C olarak bulunmuştur. Optimum sıcaklık değerindeki bu kayma pepsinin immobilizasyon işlemi ile daha yüksek sıcaklıkta çalışabileceğini ve daha kararlı hale geldiğini göstermiştir. İmmobilize pepsin aktivitesinde sıcaklık arttıkça orantılı bir artış, göstermiş, ve 60.0 °C'da en yüksek aktivite değeri elde edilmiştir. Serbest enzimde 40.0°C'den itibaren pepsin aktivitesi % 50.6'a kadar düşmüştür. Enzim aktivitesinin azalması ortamdaki enzimin denatüre olma olasılığı, çözünmüş oksijen derişiminin azalmasına ve aktif merkezin konformasyon değişimine bağlanabilir.



Şekil 4.4. Sıcaklık değerinin pepsin aktivitesine etkisi; IgG derişimi: 2.0 mg/mL; zaman: 60 dak; t: 25.0°C; Serbest enzim için pH: 3.0; immobilize enzim için pH: 2.0.

4.3.3. Substrat Derişiminin Aktiviteye Etkisi

Enzim katalizli tepkimelerin hızı, sabit miktardaki enzim varlığında substrat derişimine bağlı olarak artmaktadır. Bu yüzden pepsin aktivitesine yani tepkime hızına substrat derişiminin etkisini incelemek için optimum pH değerinde hazırlanmış farklı derişimlerdeki (2.0-6.0 mM) IgG çözeltileri ile Bölüm 3.3.'te anlatılan deneyler yapılmıştır. Deneysel veriler kullanılarak pepsin % bağıl aktivitesi, substrat derişimine karşı grafiğe geçirilmiş ve belirli bir substrat derişimine kadar artan sonrasında aktivite değerlerinde pek bir değişiklik olmayan hiperbolik bir eğri elde edilmiştir. Bu hiperbolik eğri enzim kinetiğinin Michealis-Menten denklemiyle açıklanan non-allosterik aktiviteyle uyumludur. Bir başka tanımla, enzimde substratın bağlanabileceği belirli sayıda aktif bölge bulunması ve aktif bölgelerin yüksek substrat derişiminde doygunluğa ulaşmasıdır.

1913 yılında Michealis ve Menten bu doygunluk eğrisinin matematiksel olarak ifade edilmesinde kullanılan Eşitlik 4.2'yi önermişlerdir.

$$V = (Vm \times [S]) / (Km+[S]) \qquad (4.2)$$

V_m enzimatik tepkimenin doygun substrat derişiminde ulaşabileceği en yüksek hız değerini (mM.dak-1), K_m Michealis-Menten sabiti (mM) veya doygunluk sabiti olarak adlandırılan değeri, V tepkime hızını (mM.dak-1) ve [S] ise substrat derişimini (mM) ifade etmektedir.

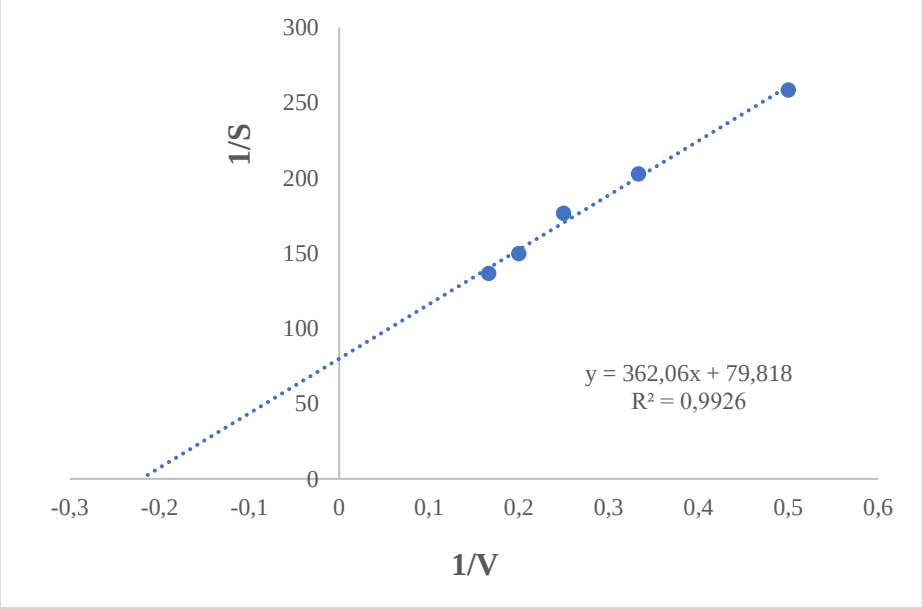
Ayrıca K_m değeri, maksimum tepkime hızının yarısına karşılık gelen substrat derişimini de gösterir. Michealis-Menten grafiği kullanılarak K_m ve V_m değerlerini belirlemek mümkündür. Fakat tam olarak tespit edilmesi zordur.

Bu yüzden K_m ve V_m değerlerinin belirlenmesinde Michaelis-Menten eşitliğinin düzenlenmesi ile elde edilen Lineweaver-Burk eşitliğinden yararlanılır.

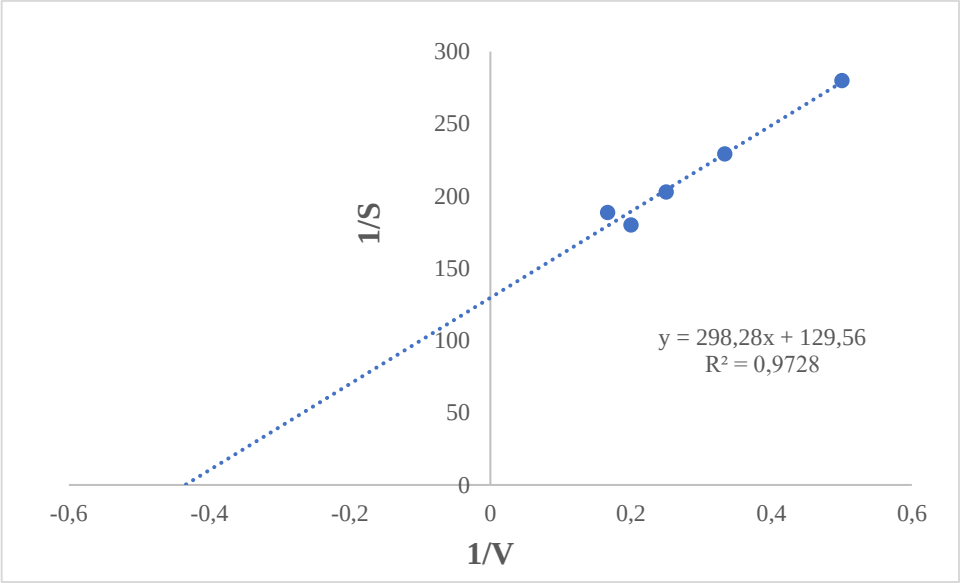
$$1/V = (Km/Vm) \times (1/[S]) + (1/Vm) \qquad (4.3)$$

1/V, 1/[S]'a karşı grafiğe geçirildiğinde; y eksenini kestiği nokta $1/V_m$, x eksenini kestiği nokta $-1/K_m$ ve eğimi K_m/V_m değerlerini veren bir doğru elde edilir.

Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak 1/[S]'a karşı 1/V grafiği çizilmiş ve lakkazın Michaelis-Menten sabiti (K_m) ile doygun substrat derişimindeki en yüksek hız (Vm) değerleri grafikte x ve y eksenini kestiği noktalardan hesaplanmıştır (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Serbest pepsin için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.6. İmmobilize pepsin için Lineweaver-Burk grafiği

Yapılan hesaplamalar sonucunda serbest pepsin için K_m ve V_m değerleri sırasıyla 4.53 mM ve 12.5 µM.dak^{-1} olarak belirlenmiştir. İmmobilizasyon sonrası pepsin K_m ve V_m değerleri serbest pepsin kıyasla azalmıştır. İmmobilize lakkaz için K_m ve V_m değerleri sırasıyla 2.30 mM, ve 7.72 µM.dak-1 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Serbest ve immobilize pepsin kinetik parametre değerlerinin gösterimi

	K_m (mM)	V_m (µM.dak^{-1})
Serbest pepsin	4.53	12.5
İmmobilize pepsin	2.30	7.72

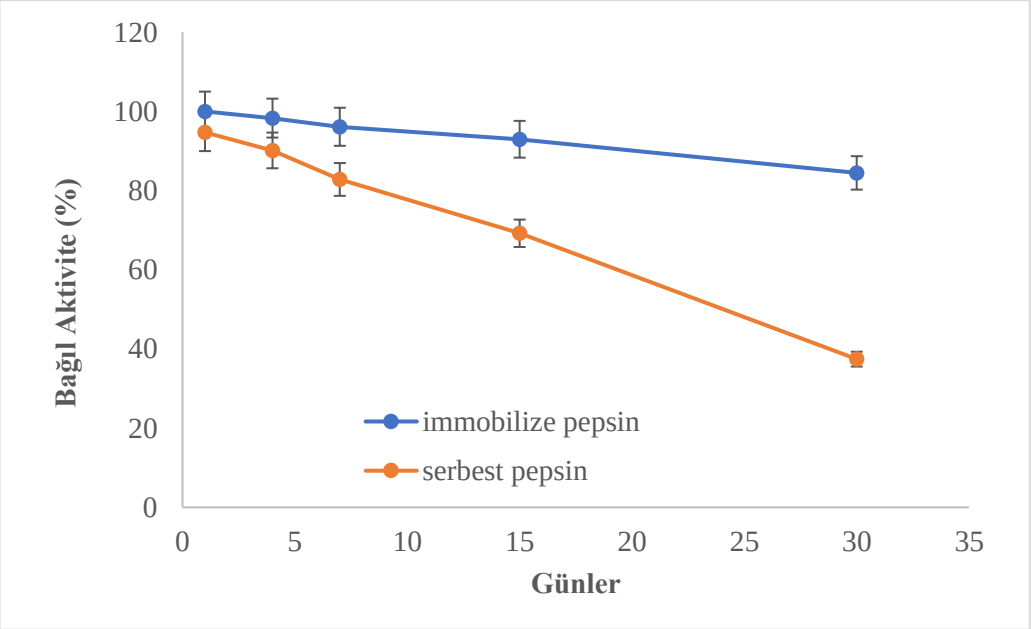
Beklenildiği gibi, pepsin P(GMA) kriyojeline immobilizasyonu sonrası K_m ve Vm değerleri değişiklik göstermiştir. Km değeri enzimin substrata olan ilgisinin bir ölçüsüdür. Deney sonuçlarından immobilize pepsinin Km değerinin azaldığı yani pepsinin IgG 'ye olan ilgisinin immobilizasyon işlemi ile arttığı görülmektedir. Pepsinin substratına olan ilgisinin artması immobilizasyonu için uygun destek malzemesinin seçildiğini belirtmektedir. Çünkü immobilizasyon için seçilen kriyojelin yüksek difüzyon kapasitesi ve makrogözenekli yapısı sayesinde substratın enzimin aktif bölgelerine ulaşması engellenmemiştir. Pepsin, geniş bir substrat etkinliğine sahip olduğundan dolayı

Km değerleri oldukça geniştir. Ayrıca bu sonuç immobilizasyon esnasında enzimin aktif bölgelerinin kapatılmadığının önemli bir göstergesidir.

İmmobilizasyon işlemi sonrasında pepsinin Vm değerinde 2 kat azalma görülmüştür. Fakat bu azalma farklı pH değerine sahip tamponlarda, sıcaklık değerlerinde, substrat ve enzim derişimlerinde yürütülmüş tüm deneyler ile uyum içerisindedir. Serbest enzimin diğer yürütülen deneylerde de immobilize enzimden 2 kat arasında daha aktif olduğu belirlenmiştir.

4.4. Depo Kararlılığı

Serbest ve immobilize pepsin enzimleri için 4°C'de 30 gün boyunca aktivite ölçümleri yapılmış olup depo kararlılıkları incelenmiştir. Serbest pepsin enzimi 30 günün sonunda aktivitesinin % 37'sini korurken, immobilize pepsin ise başlangıç aktivitesinin % 84'ünü korumuştur (Şekil 4.7). Bir destek maddesine enzim immobilizasyonu genellikle bazı konformasyonel değişikliklerin oluşması ile enzimin serbestliğini sınırlar ve bu denatürasyona karşı artan stabiliteyle sonuçlanabilir.



Şekil 4.7. Serbest ve immobilize pepsin polimerin depo kararlığı t: 25.0°C.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

- ✓ Sentezlenen destek malzemesine pepsin enzim immobilizasyonu sentezde kullanılan GMA monomerinin epoksi gruplarına pepsinin amino gruplarının nükleofilik saldırısı sonucu kovalent bağlanma yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Yapılan hesaplar doğrultusunda 12 saatte gerçekleştirilen immobilizasyon sonucunda kriyojellere 13.35 mg pepsin immobilize edildiği görülmüştür.

- ✓ Sentezlenen kriyojel biyoreaktörlerde suyun yüzey gerilimini azaltmak ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılan etilenglikol dimetakrilatın çözünürlüğünü artırmak için sodyum dodesil sülfatın yüzey aktif madde olarak dahil edilmesiyle klasik kriyojel görüntüsünden farklıdır. Bu nedenle, kriyojel gözenek yapısı yuvarlak olmasına rağmen biraz pürüzlüdür. Gözeneklerin boyutlarının yaklaşık olarak 5-50 μm aralığında olduğu bulunmuştur. Bu gözenekli yapı substratın kolayca difüzyonuna olanak sağladığı için sentezlenen kriyojelin pepsin immobilizasyonuna uygun destek malzemesi olduğunu gösterir.

- ✓ Pepsin immobilize reaktör ve pepsin immobilize edilmemiş reaktörlerin denge şişme oranları sırasıyla % 480 ve % 536 olarak bulunmuştur. Denge şişme oranlarından da görüldüğü gibi kriyojel biyoreaktörlerin denge şişme oranları oldukça yüksektir. Bu sonuçlar yapısındaki HEMA ve GMA monomerlerin hidrofilik fonksiyonel grup sayısının fazla olduğunu gösterir. Ayrıca pepsin immobilize edilen reaktörün denge şişme oranının diğer reaktöre göre yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuç immobilizasyon ile birlikte artan yüzey alanı, pepsinin hidrofilik karakteri ve protein üzerindeki polar grupların olması ile açıklanabilir.

- ✓ Kriyojel opak, süngerimsi ve esnek bir yapıya sahiptir. Gözeneklerin içinde biriken suyu uzaklaştırmak için kriyojel el ile kolaylıkla sıkıştırılabilir. Kriyojelin sıkıştırılmış parçası suya daldırıldığında suda ıslanır ve 1-2 saniye içinde orijinal büyüklük ve şeklini alır.

- ✓ SEM görüntülerinden görüldüğü gibi Pepsin immobilize reaktör, gözenekli olmayan ve ince polimer duvarlara ve hareketli fazın akması için kanal oluşturan büyük, sürekli ve birbirine bağlı (10-200 μm çapındaki) gözeneklere sahiptir. Bu gözenekler nedeniyle kriyojel oldukça büyük yüzey alanına sahiptir. Ayrıca, bu gözenekler difüzyon direncini azaltmakta ve yüksek iç yüzey alanı nedeni ile kütle transferini kolaylaştırmaktadır.

- ✓ Serbest ve immobilize pepsin için optimum sıcaklıklar sırasıyla 30.0 °C ve 60.0 °C olarak bulunmuştur. Optimum sıcaklık değerindeki bu kayma pepsinin immobilizasyon işlemi ile daha yüksek sıcaklıkta çalışabileceğini ve daha kararlı hale geldiğini göstermiştir. İmmobilize pepsin aktivitesinde sıcaklık arttıkça orantılı bir artış, göstermiş, ve 60.0 °C'da en yüksek aktivite değeri elde edilmiştir. Serbest enzimde 40.0°C'den itibaren pepsin aktivitesi % 50.6'a kadar düşmüştür. Enzim aktivitesinin azalması ortamdaki enzimin denatüre olma olasılığı, çözünmüş oksijen derişiminin azalmasına ve aktif merkezin konformasyon değişimine bağlanabilir.

- ✓ Yapılan hesaplamalar sonucunda serbest pepsin için K_m ve V_m değerleri sırasıyla 4.53 mM ve 12.5 $\mu M.dak^{-1}$ olarak belirlenmiştir. İmmobilizasyon sonrası pepsin K_m ve V_m değerleri serbest pepsin kıyasla azalmıştır. İmmobilize lakkaz için K_m ve V_m değerleri sırasıyla 2.30 mM, ve 7.72 μM.dak-1 olarak bulunmuştur.

- ✓ Km değeri enzimin substrata olan ilgisinin bir ölçüsüdür. Deney sonuçlarından immobilize pepsinin Km değerinin azaldığı yani pepsinin IgG 'ye olan ilgisinin immobilizasyon işlemi ile arttığı görülmektedir. Pepsinin substratına olan ilgisinin artması immobilizasyonu için uygun destek malzemesinin seçildiğini belirtmektedir.

- ✓ İmmobilizasyon işlemi sonrasında pepsinin Vm değerinde 2 kat azalma görülmüştür. Fakat bu azalma farklı pH değerine sahip tamponlarda, sıcaklık değerlerinde, substrat ve enzim derişimlerinde yürütülmüş tüm deneyler ile uyum içerisindedir. Serbest enzimin diğer yürütülen deneylerde de immobilize enzimden 2 kat arasında daha aktif olduğu belirlenmiştir.

- ✓ Serbest ve immobilize pepsin 4°C'de 30 gün boyunca aktivite ölçümleri yapılarak depo kararlılıkları incelenmiştir. Bu zaman periyodunda enzimde herhangi bir sızma gözlenmemiştir. Serbest pepsin 30 günün sonunda aktivitesinin % 37'sini korurken, immobilize pepsinin başlangıç aktivitesinin % 84'nü korumuştur. Bir destek maddesine enzim immobilizasyonu genellikle bazı konformasyonel değişikliklerin oluşması ile enzimin serbestliğini sınırlar ve bu denatürasyona karşı artan stabiliteyle sonuçlanabilir.

6. KAYNAKLAR

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002. ***Molecular Biology of the Cell.*** 4th ed. New York and London: Garland Science.

Arica, M.Y., 2000. Epoxy-derived pHEMA membrane for use bioactive macromolecules immobilization: covalently bound urease in a continuous model system, ***Journal of Applied Polymer Science,*** 77 (9), 2000-2008.

Arica, M.Y., Altintas, B., Bayramoglu, G., 2009. Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly(GMA/EGDMA) beads: application for textile dye degradation, ***Bioresource Technology,*** 100,(1): 665-669.

Arroyo, M. 1998. Inmobilized enzymes: Theory, methods of study and applications, ***Ars Pharmaceutica***, 39(2), 23–39,81.

Arvidsson, P., Plieva, F. M., Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. 2003. ***J. Chromatogr. A.*** , 986, 275- 290.

Arvidsson, P., Plieva, F.M., Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2003. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent, ***Journal of Chromatography A,*** 986, 275–290.

Aslıyüce çoban, S. 2015. protein a baskılanmış süpermakrogözenekli poli (hidroksietil-metakrilat) kriyojeller. Doktora, Hacettepe Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı,Ankara.

Aydoğan, C., Andaç, M., Bayram, E., Say, R., Denizli, A. 2012. Molecularly imprinting cryogel for L-glutamic acid separation. ***Biotechnol. Prog***. 18, 459-466.

Ayhan, H., Ayhan, F. and Akpolat, O. 2013. Modelling of the β-D-glucose destruction kinetics by using glucose oxidaseenzyme aggregates,***Turkish Journal of Biochemistry***,38, 4, 483-493.

Baroud, C. N., Gallaire, F., Dangla, R. 2010. Dynamics of microfluidic droplets, ***Lab on a Chip***, 10, 2032-2045.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L.2002.***Biochemistry***. 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company.

Berna B.M. and Batista F. 2006. Enzyme immobilization literature survey methods in Biotechnology: ***Immobilization of enzymes and cells***, 2nd Ed., 15-30.

Bernhnard, S. 1968. 78 The Structure and Function of Enzyme, *W.A.* ***Benjamin Inc***., New York.

Bölgen, N., Vargel, I., Korkusuz, P., Güzel, E., Plieva, F., Galaev, I.Y., Mattiason, B., Pişkin, E. 2009. Tissue responses to novel tissue engineering biodegradable cryogel scaffolds: An animal model. ***Biomed Mater. Res***. 91A. 60-68.

Brant, A., Hole, A., Cannon, J., Helm, J., Swales, C., Welch, J., Taylor, A. and Cullinan, P. 2004. Occupational asthma caused by cellulase and lipase in the detergent industry. ***Occup. Environ. Med.,*** 61, 793-795.

Chaplin, M. and Bucke, C. 1990 .***Enzyme Technology***. Cambridge University Press.

Color Atlas of Biochemistry/Second edition Elgert, K. D. 2009. Understanding The Immune System, ***Immunology***,2.Baskı, Wiley- Blackwell Publishers.

Cornish, B. 1995. Fundamentals of Enzyme Kinetics. *Portland Pres*. Gromada, A., Hab, D. and Fiedurek, J. 2007. Optimization of catalase biosynthesis in submerged cultures of Aspergillus niger mutant. ***Jour. Of Basic Microbiol.***, 37, 2, 85-91.

Cui, Z. 2011. Medical Biothechnology and Healthcare. ***Comprehensive Biotechnology***, (ed: Moo-Young, M.), Elsevier, Ontario, Canada, 5(2).

Daniak, M.B., Kumar, A., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2006. Detachment of affinity-captured bioparticles by elastic deformation of a macroporous hydrogel, ***Proceedings of the National Academy of Sciences,*** 103(4), 849-854.

Datta, S., Christena, L.R., Rajaram, Y.R.S. 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. ***Biotechnology***, 3: 1-9.

Denizli, A., Küfrevioğlu, Ö.İ. 2010. Protein kromatografisi ve yeni nesil polimerik sistemler. 1-297, Pozitif Matbaacılık.

Doretti, L., Ferrara, D., Gattolin, P., Lora, S., Schiavon, F., Veronese, F.M. 1998. PEG modified glucose oxidase immobilized on a PVA cryogel membrane for amperometric biosensor applications. ***Talanta.*** 45, 891-898.

Efremenko, E.N., Spiricheva, O.V., Veremenko, D.V., Baibak, A.V. and Lozinsky, V.I. 2006. L(+)-lactic acid production using poly(vinyl alcohol)-cryogelentapped *Rhizopus oryzae* fungal cells. ***Chem. Technol. Biotechnol***, 81, 519 522.

F. M. Plieva, M. Karlsson, M.-R. Aguilar, D. Gomez, S. Mikhalovsky, and I. Y. Galaev. 2005. Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels, ***Soft Matter***, 1, 303-309.

Fernández-Fernández, M., Sanromán, M.A., Moldes, D. 2012. Recent developments and applications of immobilized laccase, ***Biotechnology Advances***, 18.

Fuentes, J.L. and Roberts, M. 1988. ***Europian Patent***, 262040.

G. B. Sergeev and V. Batyuk. 1976. Reactions in Frozen Multicomponent Systems, ***Russian Chemical Reviews***, 45, 391.

Garstecki, P., Fuerstman, M. J., Stone, H. A., Whitesides, G. M. 2006. Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction - Scaling and mechanism ofbreak-up, ***Lab on a Chip***, 6, 437-446.

Gok, C., Gerstmann, U., Aytas, S. 2013. Biosorption of radiostrontium by alginate beads: application of isotherm models and thermodynamic studies, ***Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry,*** 295, 777–788.

Harper, H.A. 1977. Enzyme Review of Physiological Chemistry, ***Los Atlos***, California, 16, 1-681.

Khan, A.A., Alzohairy, M.A., 2010. Recent Advances and Applications of Immobilized Enzyme Technologies: A Review, ***Research Journol of Biological Sciences***, 5(8):565-575.

Krajewska, B. 2004. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, ***Enzyme and Microbial Technology***, 35, 126–139.

Kumar, A., Bansal, V., Andersson, J., Roychoudhury, P.K., Mattiason, B. 2006. Supermacroporous cryogel matrix for integrated isolation immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell culture broth of human kidney cell line. ***Journal of Chromatography A***. 1103, 35-42.

Kumar, A., Bansal, V., Nandakumar, K.S., Galaev, I.Y., Roychoudhury, P.K., Holmdahl, R., Mattiasson, B., Integrated Bioprocess for the Production and Isolation of Urokinase from Animal Cell Culture using Supermacroporous Cryogel Matrices, ***Biotechnology Bioengineering***, 93(4).

Kumar, A., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiason, B. 2003. Affinity fractionation of lymphocytes using a monolithic cryogel. ***Journal of Immunological Methods***. 283, 185-194.

Kumar, A., Rodríguez-Caballero, A., Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Nandakumar, K. S., Kamihira, M., Holmdahl, R., Orfao, A., Mattiasson, B. 2005. Affinity binding of cells to cryogel adsorbents with immobilized specific ligands: Effect of ligand coupling and matrix architecture, ***Journal of Molecular Recognition***, 18, 84-93.

Kunamneni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, F.J., Alcalde, M., 2008. Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers, ***Process Biochemistry,*** 43,(1): 169-178.

Lehninger, A.L. 1982. Enzymes Priciples of Biochemistry, ***Worth Publishers Inc***., New York.

Liu, C., Zhu, L., Lin, D., Yao, S. 2012. Preparation of chitosan-NaCS/TPP microcapsule with uniform size by microfluidic chip, ***Huagong Xuebao/CIESC Journal***, 63, 216-222.

Lozinsky, V,I. 2002.Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and applications, ***Russian Chemical Reviews***, 71(6), 489-511.

Lozinsky, V. I. 2002. ***Russ. Chem. Rev***., 71, 489- 511.

Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Plieva, F. M., Savina, I. N., Jungvid, H., Mattiasson, B. 2003. ***Trends Biotechnol***., 21, 445-451.

Lozinsky, V. I., Plieva, F. M. 1998. Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments, ***Enzyme and Microbial Technology,*** 23, 227-242.

Lozinsky, V., Plieva, F.M. 1998a. Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments, ***Enzyme and Microbial Technology***, 23, 227–242.

Lozinsky, V.I., Domotenko, L.V., Vainerman, E.S., Mamtsis, A.M., Titova, E.F., Belavtseva, E.M., Rogozhin, S.V. 1986. Study of cryostructurization of polymer systems. VII. Structure formation under freezing of poly(vinyl alcohol) aqueous solutions, ***Colloid and Polymer Science***, 264, 19–24.

Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Plieva, F.M., Savina ,I.N., Jungvid, H., Mattiasson, B. 2003. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, ***Trends in Biotechnology***, 21(10), 445–451.

Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Plieva, F.M., Savina, I.M., Jungvid, H. and Mattioasson, B., 2003. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, ***Trends in Biotechnology***, 21,(10): 445-451.

Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Galaev, Y.I., Mattiasson, B. 2006. The potential of polymeric cryogels in bioseparation, ***Bioseparation,*** 10, 163–188.

Manual of Clinical Enzyme Measurements, Freehold, NJ. 1972. ***Worthington Biochemical Corporation,*** 8, 1-56.

Nandane, A.S., Prasad, R.V., 2006. Enzymes: Some Basic Concepts and Applications in Food Industry, ***Journal of Engineering***, 3(1): 66-71.

Neyzi, O., Ertuğrul, T. 2002. ***Pediatri***, Nobel, İstanbul.

Orakdogen, N., Karacan, P., Okay, O. 2011. Macroporous, responsive DNA cryogel beads, ***Reactive and Functional Polymers***, 71, 782-790.

Özer, N. 2000.Biyokimya 1, ***Palme Yayıncılık***, Ankara.

Özkara, S., 2002. *Yüksek Lisans Tezi*. Hacettepe Ünv. Fen Fakültesi Kimya Bölümü, ANKARA.

Plieva, F. , Andersson, J., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. 2004. ***J. Sep. Sci***., 27, 828-836.

Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Noppe, W., Mattiasson, B. 2008. Cryogel applications in microbiology, ***Trends in Microbiology***, 16, 543-551.

Plieva, F. M., Karlsson, M., Aguilar, M.-R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., Galaev, I. Y. 2005 ***Soft Matter*** ,1, 303-309.

Plieva, F. M., Karlsson, M., Aguilar, M.-R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. 2006. ***J. Appl. Polym. Sci.,*** 100,1057-1066.

Plieva, F. M., Savina, I. N., Deraz, S., Andersson, J., Galaev, I. Y. Mattiasson, B. 2004. ***J. Chromatogr. B***., 807, 129- 137.

Plieva, F., Bober, B., Dainiak, M., Galaev, I. Y., Mattiasson,. B. 2006 ***J.Mol. Recogn***., 19, 305-312.

Plieva, F., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. , 2007**.** ***Langmuir,*** 23(1), 35–40.

Plieva, F., Huiting, X., Galaev, I. Y., Bergensthl, B., Mattiasson, B. 2006. ***J. Mater. Chem.,*** 16, 4065-4073.

Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2007. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulatecontaining fluids and cell culture applications. ***J. Sep. Sci.*** 30, 1657-1671.

Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2009. Production and Properties of Cryogels by Radical Polymerization. ***Macroporous Polymers Production Properties and Biotechnological/ Biomedical Applications,*** (eds: Mattiasson, B., Kumar, A., Galaev, I.Y.), CRC Press, 23-48.

Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. ***J. Sep. Sci***. 2007, 30, 1657-1671.

Plieva, F.M., Karlsson, M., Aguilar, M.R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., Galaev, Y.I. 2005. Porestructure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels, ***Soft Matterials***, 1, 303-309.

Polizzi, K.M., Bommarius, A.S., Broering, J.M., Chaparro-Riggers, J.F. 2007. Stability of biocatalysts, ***Current Opinion in Chemical Biology,*** 11, 220–225.

Rekuć, A., Jastrzembska, B., Liesiene, J., Bryjak, J., 2009. Comparative studies on immobilized laccase behaviour in packed-bed and batch reactors. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, 57,(1): 216-223.

Sharma, A., Bhat, S., Vishoi, T., Nayok, V. and Kumar, A. 2013. Three dimentional carregeenan-gelatin cryogel matrix for tissue engineering applications. ***BioMed Research International***. 1-15.

Tan, J., Xu, J. H., Li, S. W., Luo, G. S. 2008. Drop dispenser in a cross-junction microfluidic device: Scaling and mechanism of break-up, ***Chemical Engineering Journal***, 136, 306-311.

Tripathi, A., Kathuria, N., Kumar, A. 2009. Elastic and macroporous agarose–gelatin cryogels with isotropic and anisotropic porosity for tissue engineering, ***Journal of Biomedical Materials Research Part A***, 90, 680–694.

Tripathi, A., Kumar, A. 2011. Multi-Featured Macroporous Agarose-Alginate Cryogel: Synthesis and Characterization for Bioengineering Applications, ***Macromolecular Bioscience,*** 11, 22-35.

Twyman, R.M., 2005. Enzymes: Immobilized Enzymes. ***Encyclopedia of Analytical Science,*** (eds: Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C.), Elsevier Science, 2,(1): 523-529.

Varalakshmi, V. and Siva, D. Enzyme Immobilization: The Fascinating Challenge in Biotechnology. ***Journal of Environmental Science, Computer Science and Engineering & Technology***, 2,3, 840-853.

Wang, J., Wang, Q.-M., Tian, L.-L., Yang, C., Yu, S.-H., Yang, C. 2015. Research Progress of the Molecularly Imprinted Cryogel, ***Chinese Journal of Analytical Chemistry***, 43, 1777-1784.

Xu, L., Tan, X., Yun, J., Shen, S., Zhang, S., Tu, C., Zhao, W., Tian, B., Yang, G., Yao, K. 2012. Formulation of poorly water-soluble compound loaded solid lipid nanoparticles in a microchannel system fabricated by mechanical microcutting 85 method: Puerarin as a model drug, ***Industrial and Engineering Chemistry Research***, 51, 11373-11380.

Yun, J., Zhang, S., Shen, S., Chen, Z., Yao, K., Chen, J. 2009. Continuous production of solid lipid nanoparticles by liquid flow-focusing and gas displacing method in microchannels, ***Chemical Engineering Science***, 64, 4115-4122.

Zhao, W., Zhang, S., Lu, M., Shen, S., Yun, J., Yao, K., Xu, L., Lin, D.-Q., Guan, Y.-X., Yao, S.-J. 2014. Immiscible liquid–liquid slug flow characteristics in the generation of aqueous drops within a rectangular microchannel for preparation of poly(2-hydroxyethylmethacrylate) cryogel beads, ***Chemical Engineering Research and Design***, 92, 2182-2190.

ÖZÇEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mustafa YEŞİL

Doğum Yeri : Bismil/Diyarbakır

Doğum Tarihi: 10.07.1977

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Bismil Lisesi, 1992-1994

Lisans : Dicle Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 1998-2002

Tezsiz Yüksek Lisans: İnönü Üniversitesi, 2005-2006

İş Güvenliği Uzmanlığı: (B sınıfı)

Çalıştığı Kurumlar:

Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu (2009 – 2009, Şanlıurfa)

Sosyal Güvenlik Kurumu (2009 – Devam ediyor, Bursa-Diyarbakır)

İNTİHAL FORMU

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ İNTİHAL FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Mustafa YEŞİL
ÖĞRENCİ NO	15803017
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2018-2019
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	Kimya
PROGRAM	Yüksek Lisans
TEZ KONUSU	Pepsin İmmobilize Edilmiş Kriyojel Biyoreaktörlerin Hazırlanması
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	57
BENZERLİK ORANI	% 11
RAPORLAMA TARİHİ	18/07/2019

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 57 sayfalık kısmına ilişkin, 18/07/2019 tarihinde tez danışmanım tarafından *turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 11 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

☐ Kabul/Onay sayfaları hariç,
☒ Kaynakça hariç
☐ Alıntılar hariç/dâhil
☐ Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Mustafa YEŞİL
18/07/2019

Prof. Dr. Mehmet DOĞRU
Tez Danışmanı
18/07/2019

Prof. Dr. Haluk AYDIN
Anabilim Dalı Başkanı
18/07/2019

Formdaki bilgiler bilgisayar ortamında doldurulmalıdır. El yazısı ile doldurulan formlar geçersiz sayılmaktadır.

KGK-FRM-340/00