ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Dilek ALAGÖZ

HİDROKSİNİTRİL LİYAZ'IN ÇEŞİTLİ MEYVE ÇEKİRDEKLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE İMMOBİLİZASYONU

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA, 2012

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİDROKSİNİTRİL LİYAZ'IN ÇEŞİTLİ MEYVE ÇEKİRDEKLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE İMMOBİLİZASYONU

DİLEK ALAGÖZ

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez …/…/2012 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

…….....	…….	……
Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL	Prof.Dr.Güzide YÜCEBİLGİÇ	Prof. Dr.Levent KAYRIN
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

……….....**…**	……
Doç.Dr.Gülfeza KARDAŞ	Doç.Dr. Gül ÖZYILMAZ
ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. M. Rifat ULUSOY
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2009D13

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

HİDROKSİNİTRİL LİYAZ'IN ÇEŞİTLİ MEYVE ÇEKİRDEKLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE İMMOBİLİZASYONU

Dilek ALAGÖZ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman :Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
Yıl: 2012, Sayfa: 147
Jüri :Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
:Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
:Prof. Dr. Levent KAYRIN
:Doç. Dr. Gülfeza KARDAŞ
:Doç. Dr. Gül ÖZYILMAZ

Bu çalışmada, şimdiye kadar hidroksinitril liyaz (HNL) kaynağı olarak kullanılmamış üçü yabani ve üçü kültür formu altı çeşit *Prunus* türü meyvenin çekirdeklerinden HNL'ın saflaştırılması, karakterizasyonu ve Eupergit CM desteğe kovalent olarak veya çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) oluşturma yöntemiyle immobilizasyonları (HNL-CLEA) ile (*R/S*)-mandelonitrilin kinetik rezolüsyonu ve (*R*)-mandelonitril, (*R*)-2-kloromandelonitril, (*R*)-3,4-dihidroksimandelonitril ve (*R*)-2-hidroksi-4-fenilbütironitril sentezlerinde kullanımları araştırılmıştır. Ayrıca serbest ve immobilize HNL'ların termal ve depolama kararlılıkları ve immobilize HNL'ların kesikli reaktördeki tekrar kullanım kararlılıkları araştırılmıştır. Farklı türlerden saflaştırılan HNL'ın herbiri yaklaşık 25 kDa olan 4 alt üniteden oluştuğu belirlenmiştir. Serbest HNL'lar arasında en yüksek V_{max} değeri 197,2 U/mg prot. olup acıbadem HNL için ve immobilize HNL'lar arasında en yüksek V_{max} değeri 126,2 U/g Eup CM ve 48 U/g CLEA olup sırasıyla kayısı HNL-Eupergit CM ve kayısı HNL-CLEA için hesaplanmıştır. Tüm immobilize HNL'ların 50°C'deki termal kararlılıkları ve 5°C'deki depolama kararlılıkları serbest karşıtlarına göre daha yüksek bulunmuştur. İmmobilize HNL'lar arasında, tekrar kullanım kararlılığı en yüksek olan kültür formu erik HNL-Eupergit CM'nin 20 mg'ının kesikli reaktörde başlangıç aktivitesinin %50'si kalıncaya kadarki tekrar kullanımı sonucundaki aktivite toplamı (prodüktivite) yaklaşık $4x10^3$ U/g Eup CM olarak belirlenmiştir. Farklı türlerin serbest HNL'ları kullanılarak sentezlenen (*R*)-mandelonitril, (*R*)-2-kloromandelonitril, (*R*)-3,4-dihidroksimandelonitril, (*R*)-2-hidroksi-4-fenilbütironitril için en yüksek %verim değerleri sırasıyla %91, %66, %95, %88 ve en yüksek enantiyomerik aşırılık (%ee) değerleri sırasıyla %94, %47, %99, %94 olarak belirlenmiştir. İmmobilize HNL'lar için, özellikle de HNL-CLEA'lar kullanılarak yapılan sentezler olmak üzere daha yüksek % verim ve ee değerine sahip enantiyosaf siyanohidrinler elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hidroksinitril liyaz, saflaştırma, immobilizasyon, enantiyosaf siyanohidrin, kinetik rezolüsyon

ABSTRACT

PhD THESIS

PURIFICATION AND IMMOBILIZATION OF HYDROXYNITRILE LYASE FROM DIFFERENT FRUITS SEEDS

Dilek ALAGÖZ

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Supervisor :Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
Year: 2012, Pages: 147
Jury :Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
:Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ
:Prof. Dr. Levent KAYRIN
:Assoc. Prof. Dr. Gülfeza KARDAŞ
:Assoc Prof. Dr. Gül ÖZYILMAZ

In this study, we aimed to purify and characterize hydroxynitrile lyase (HNL) from the seeds of three wild type and three cultivated type of *Prunus* fruits which have not been used as HNL sources up to now, to immobilize onto Eupergit CM by covalently or cross-linked to obtain cross-linked HNL aggregates (HNL-CLEA), and to investigate the application of free and immobilized HNLs for the kinetic resolution of (*R/S*)-mandelonitrile and the synthesis of (*R*)-mandelonitrile, (*R*)-2-chloromandelonitrile, (*R*)-3,4-dihydroxy mandelonitrile and (*R*)-2-hydroxy-4-phenylbutyronitrile. Thermal and storage stabilities of all HNL preparations were also determined and the reusabilities of immobilized HNLs in batch type reactor were investigated. Purified HNLs were consist of four identical subunits and the molecular weight of each one is 25 kDa. Of free HNLs the highest V_{max} value was determined as 197.2 U/mg prot. for wild type almond and the highest V_{max} values were determined as 126.2 U/g Eup CM and 48 U/g CLEA for cultivated apricot HNL-Eupergit CM and cultivated apricot HNL-CLEA, respectively. Immobilized HNL preparations showed better thermal stabilities at 50°C and storage stabilities at 5°C than those of corresponding free HNLs. The highest reusability was obtained with the cultivated plum HNL-Eupergit CM and the productivity of 20 mg sample was determined as $4x10^3$ U/g Eup CM when the remaining activity was 50% of its initial activity. Using free HNLs of different types, the highest (*R*)-mandelonitrile, (*R*)-2-chloromandelonitrile, (*R*)-3,4-dihydroxy mandelonitrile, *R*)-2-hydroxy-4-phenylbutyronitrile yields were determined as 91, 66, 95, 88% , respectively and the highest enantiomeric excess (ee%) values were obtained as 94, 47, 99, 94%, respectively. Better results were obtained with immobilized HNLs, especially in the case of HNL-CLEAs for the synthesis of above mentioned enantiopure cyanohydrins.

Keywords: Hydroxynitrile lyase, purification, immobilization, enantiopure cyanohydrins, kinetic resolution.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca engin bilgi ve deneyimi ile yardım ve önerilerini hiçbir zaman esirgemeyen, her konuda beni aydınlatan ve geliştirici açıklamaları ile çalışmalarım boyunca önümde bir ışık olan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL'e sevgi ve emeklerinden dolayı sonsuz şükranlarımı sunarım.

Ayrıca saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ ve Doç. Dr. Ramazan BİLGİN' e ilgilerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımda bilgi ve deneyimleri ile izlemem gereken yöntem ve metodlar hakkında sürekli beni bilgilendiren, hiçbir zaman yardım ve desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Dr. Deniz YILDIRIM'a ve Dr. Özlem ALPTEKİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarım boyunca beni manevi olarak destekleyen Mustafa Serkan YALÇIN'a ve Kimya Bölümündeki arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bütün eğitimim boyunca maddi ve manevi hiçbir desteği, ilgi ve sevgilerini benden esirgemeyen babam Ahmet ALAGÖZ'e, annem Nebahat ALAGÖZ'e, kardeşlerim Dinçer ALAGÖZ ve Demet ALAGÖZ'e, Fadile YALDIZ'a, Didem YENER'e sonsuz şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ……. I

ABSTRACT…….. II

TEŞEKKÜR…….. III

İÇİNDEKİLER……. IV

ÇİZELGELER DİZİNİ……. VIII

ŞEKİLLER DİZİNİ…… X

1.GİRİŞ …… 1

1.1. Hidroksinitril Liyazlar ……... 1

1.2.Protein Saflaştırmanın Amacı……. 4

1.2.1.Protein Saflaştırma Stratejisi……. 5

1.2.1.1.Çöktürme……. 6

1.2.1.2.Kromatoğrafi……... 7

1.2.1.3.Hidrofobik Etkileşim Kromatoğrafisi……. 7

1.2.1.4.Moleküler Eleme Kromatoğrafisi……... 8

1.3.Enzim İmmobilizasyonu…….. 8

1.3.1.Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri……. 9

1.3.2.Çapraz Bağlama Yöntemleri…….. 13

1.3.3.Tutuklama Yöntemleri…….…….. 16

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR……..…… 21

3.MATERYAL VE METOD……...……. 29

3.1.Materyal……..... 29

3.1.1. Meyve Çekirdeklerinin Toplanması…… 29

3.1.2. Kimyasallar…….……..... 29

3.1.3. Araç ve Gereçler…….. 30

3.2.Metod……...……... 30

3.2.1.HNL'ın Meyve Çekirdeklerinden Saflaştırılması…….……... 30

3.2.1.1.Çekirdeklerin Homojenizasyonu ve Amonyum Sülfat ile Çöktürme……..... 30

3.2.1.2.Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi……...…….. 31

3.2.1.3. Moleküler Eleme Kromatoğrafisi……..……...… 31
3.2.1.4. Protein Tayini……..……...……... 31
3.2.1.5. HNL'ın Liyaz Aktivitesinin Belirlenmesi……..…..…… 32
3.2.1.6. Denatüre edici olmayan (Native) PAGE Elektroforezi…….…… 32
3.2.1.7. Moleküler Ağırlığın Belirlenmesi……...……...…..... 33
3.2.1.8. SDS-PAGE Elektroforezi……..……..... 33
3.2.2.HNL'ların Eupergit CM Üzerine Kovalent İmmobilizasyonu…….……..... 33
3.2.3.HNL'ın CLEA Oluşturularak İmmobilizasyonu…….……..... 34
3.2.4.Serbest HNL'ların, HNL-Eupergit CM'lerin ve HNL-CLEA'ların Optimum Aktivite Gösterdiği Koşulların, Kinetik Parametrelerinin, Termal ve Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi..…..... 35
3.2.5.İmmobilize HNL'ların Kesikli Reaktör Sistemlerinde Kullanılması……..... 36
3.2.6.HNL Örneklerinin Kullanımı İle Rasemik Mandelonitrilin Kinetik Rezolusyonu…….. 37
3.2.7.Standart Olarak Kullanılacak Mandelonitril, 2-kloro-mandelonitril, 3,4-dihidroksimandelonitril ve 2-hidroksi-4-fenilbütironitrilin Kimyasal Sentezi…….. 38
3.2.8.HNL Örneklerinin Kullanımı İle (*R*)-mandelonitril, (*R*)-2-kloromandelonitril, (*R*)-3,4-dihidroksimandelonitril ve (*R*)-2-hidroksi-4-fenilbütironitrilin Enzimatik Sentezleri……..……... 39
4. BULGULAR VE TARTIŞMA……... 41
4.1.Serbest HNL'lar ile İlgili Bulgular……..... 41
4.1.1.Çekirdeklerin Homojenizasyonu ve Amonyum Sülfat ile Çöktürme Bulguları……... 41
4.1.2.Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi Bulguları.……..... 41
4.1.3.Moleküler Eleme Kromatoğrafisi Bulguları….……... 45
4.1.4.Denatüre edici olmayan (Native) PAGE Elektroforezi Bulguları….…….. 51
4.1.5.HNL'ın Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi İle İgili Bulgular…...…..... 52
4.1.6.HNL'ların Karakterizasyonu İle İlgili Bulgular …….. 54
4.1.6.1.Serbest HNL'ların Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular..... 54
4.1.6.2.Serbest HNL'ların Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular 55

4.1.6.3.Serbest HNL'ların Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular …..... 56
4.1.6.4.Serbest HNL'ların Termal Kararlılıkları İle İlgili Bulgular ……. 59
4.1.6.5.Serbest HNL'ların Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular 63
4.2.HNL'ların Eupergit CM Üzerine Kovalent İmmobilizasyonu ile İlgili Bulgular…… 65
4.2.1.HNL-Eupergit CM'lerin Aktivitelerine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular……. 65
4.2.2.HNL-Eupergit CM'lerin Aktivitelerine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular……...…….. 65
4.2.3.HNL-Eupergit CM'lerin Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular.....… 66
4.2.4.HNL-Eupergit CM'lerin Termal Kararlılıkları İle İlgili Bulgular….…… 70
4.2.5.HNL-Eupergit CM'lerin Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular……. 72
4.4.CLEA Yöntemi İle İmmobilize Edilen HNL'lar HNL-CLEA'lar ile İlgili Bulgular……. 76
4.4.1.HNL-CLEA'ların Aktivitelerine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular…….……..…….. 76
4.4.2.HNL-CLEA'ların Aktivitelerine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular……..... 76
4.4.3.HNL-CLEA'ların Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular…….……..... 77
4.4.4.HNL-CLEA'ların Termal Kararlılığı İle İlgili Bulgular….……. 81
4.4.5.HNL-CLEA'ların Depolama Kararlılığı İle İlgili Bulgular…….……..... 83
4.5.Serbest ve İmmobilize HNL'ların Rasemik Mandelonitrilin Kinetik Rezolusyonunda ve Enantiyosaf Siyanohidrin Sentezlerinde Kullanılmaları ile İlgili Bulgular……...…….…….. 87
4.5.1.Rasemik Mandelonitrilin Kinetik Rezolusyonu İle İlgili Bulgular……. 87
4.5.2.Serbest ve İmmobilize HNL'ların Enantiyosaf (*R*)-mandelonitril, (*R*)-2-kloro-mandelonitril, (*R*)-3,4-dihidroksimandelonitril ve (*R*)-2-hidroksi-4-fenilbütironitril Sentezlerinde Kullanılmaları İle İlgili Bulgular…….. 89
4.6.İmmobilize HNL Örneklerinin Kesikli Ve Sürekli Reaktörde Kullanımı İle İlgili Bulgular…….……. 94

4.7.Tartışma……..…...… 103
5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER……... 113
5.1.Sonuçlar……... 113
5.2.Öneriler…….…... 114
KAYNAKLAR……..... 115
ÖZGEÇMİŞ……..... 123
EKLER……..……... 126

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1.	Protein saflaştırma tekniklerinin özellikleri (Erarslan ve ark., 2000)...	6
Çizelge 4.1.	Kültür Bademi (*Prunus dulcis*)-HNL için saflaştırma sonuçları……..……..	48
Çizelge 4.2.	Acıbadem (*Prunus amygdalus turcomenica*)-HNL için saflaştırma sonuçları……...…….	49
Çizelge 4.3.	Kayısı (*Prunus armeniaca*)-HNL için saflaştırma sonuçları…...……..	49
Çizelge 4.4.	Zerdali (*Prunus pseudoarmaniaca*)-HNL için saflaştırma sonuçları..	50
Çizelge 4.5.	Yabani Erik (*Prunus cerasifera*)-HNL için saflaştırma sonuçları……	50
Çizelge 4.6.	Kültür Eriği (*Prunus domestica*)-HNL için saflaştırma sonuçları……..……..	51
Çizelge 4.7.	Serbest ve immobilize HNL örnekleri ile gerçekleştirilen (*R/S*)-mandelonitrilin kinetik rezolüsyonu reaksiyonu için elde edilen verim ve ee değerleri…….	88
Çizelge 4.8.	Serbest ve immobilize HNL'lar ile gerçekleştirilen (*R*)-mandelonitril sentezi için verim ve ee değerleri……..	90
Çizelge 4.9.	Serbest ve immobilize HNL'lar ile gerçekleştirilen (*R*)-2-kloromandelonitril sentezi için verim ve ee değerleri……...……...…	91
Çizelge 4.10.	Serbest ve immobilize HNL'lar ile gerçekleştirilen (*R*)-3,4-dihidroksi mandelonitril sentezi için verim ve ee değerleri…….……..	92
Çizelge 4.11.	Serbest ve immobilize HNL'lar ile gerçekleştirilen (*R*)-2-hidroksi-4-fenilbütiro nitril sentezi için verim ve ee değerleri……....	93
Çizelge 4.12	İmmobilize HNL'ların farklı miktarları kesikli reaktörde %50 aktiviteleri kalıncaya kadar kullanıldığında elde edilen aktivite toplamları…….	102
Çizelge 4.13.	Çeşitli bitkilerin çeşitli toprak üstü organlarından saflaştırılan HNL'ların moleküler ağırlıkları ve sahip olduğu alt birim sayıları…	105
Çizelge 4.14.	Serbest HNL, HNL-Eupergit CM ve HNL-CLEA örnekleri için kinetik parametreler (V_{max}, k_{cat} ve k_{cat}/K_m)……..	108

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1.	Hidroksinitril liyazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar…….....	1
Şekil 1.2.	Bitkilerde gerçekleşen siyanojenez olayı…….	2
Şekil 1.3.	Çıkış maddesi olarak kullanılabilecek bazı önemli optikçe aktif siyanohidrinler (Nu: nükleofil, PG: Prostetik Grup, TMS:Tri Metil Silil) (Purkartofer ve ark., 2007)…….……..	3
Şekil 1.4.	Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Tischer, 1998)……..	9
Şekil 1.5.	Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinin gösterimi……..……	10
Şekil 1.6.	İyonik bağlama ile enzim immobilizasyonunda kullanılabilecek destek materyallerine örnekler……	11
Şekil 1.7.	Biyospesifik bağlama (Affinite) ile enzim immobilizasyonu…….	11
Şekil 1.8.	Enzimin desteğe kovalent immobilizasyonu : (A) Aktif aminoasit artığı; (B) Desteğin fonksiyonel bağ yapacak grubu; (C) Destek; (D) Ara kol (Cao, 2005)……..	12
Şekil 1.9.	Destek yüzeyindeki aktif fonksiyonel gruba bağlı olarak enzim (EN) molekülünde bağlanmada kullanılabilecek artık aminoasit grupları (Cao,2005).	13
Şekil 1.10.	Taşıyıcı olmadan yapılan enzim immobilizasyon yöntemleri: (a) kristallendirme, (b) çöktürme, (c) püskürterek kurutma, (d) doğrudan çapraz bağlama (Twyman, 2005)……	14
Şekil 1.11.	Polimer bir matriks içerisinde enzim molekülünü tutuklanması (Cao,2005)…….....	17
Şekil 1.12.	Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu……	18
Şekil 1.13.	Lipozom yöntemi ile enzim immobilizasyonu……...	19
Şekil 3.1.	HNL'ın Eupergit destekler üzerine kovalent immobilizasyonu…..	34
Şekil 3.2.	HNL'ın CLEA şeklinde immobilizasyonunun şematik gösterimi…	35

Şekil 3.3.	HNL'lar tarafından katalizlenen (*R/S*)-mandelonitrilin kinetik rezolusyonu……...	38
Şekil 3.4.	HNL'lar kullanılarak sentezlenen enantiyosaf siyanohidrinlerin yapıları.....	40
Şeki 4.la.	Kültür Bademi (*Prunus dulcis*)-HNL için hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi sonuçları……...……	42
Şekil 4.lb.	Acıbadem (*Prunus amygdalus turcomenica*)-HNL için hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi sonuçları…….……	42
Şekil 4.lc.	Kayısı (*Prunus armeniaca*)-HNL için hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi sonuçları……..……	43
Şekil 4.ld.	Zerdali (*Prunus pseudoarmaniaca*)-HNL için hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi sonuçları…….……..	43
Şekil 4.le.	Yabani Erik (*Prunus cerasifera*)-HNL için hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi sonuçları……..…….....	44
Şekil 4.lf.	Kültür Eriği (*Prunus domestica*)-HNL için hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi sonuçları…….....	44
Şekil 4.2a.	Kültür Bademi (*Prunus dulcis*)-HNL için moleküler eleme kromatoğrafisi sonuçları……	45
Şekil 4.2b.	Acıbadem (*Prunus amygdalus turcomenica*)-HNL için moleküler eleme kromatoğrafisi sonuçları…….……	46
Şekil 4.2c.	Kayısı (*Prunus armeniaca*)-HNL için moleküler eleme kromatoğrafisi sonuçları……...……	46
Şekil 4.2d.	Zerdali (*Prunus pseudoarmaniaca*)-HNL için moleküler eleme kromatoğrafisi sonuçları……..	47
Şekil 4.2e.	Yabani Erik (*Prunus cerasifera*)-HNL için moleküler eleme kromatoğrafisi sonuçları……..……	47
Şekil 4.2f.	Kültür Eriği (*Prunus domestica*)-HNL için moleküler eleme kromatoğrafisi sonuçları……	48
Şekil 4.3.	HNL için örnek bir denatüre edici olmayan (Native) PAGE sonucu……	52
Şekil 4.4.	Moleküler eleme kromatografisi için standart protein grafiği……..	53

Şekil 4.5.	HNL için örnek bir moleküler eleme kromatoğramı……	53
Şekil 4.6.	HNL için örnek bir SDS-PAGE sonucu……..…….....	54
Şekil 4.7.	Serbest HNL örneklerinin liyaz aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi.	55
Şekil 4.8.	Serbest HNL örneklerinin liyaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi…….	56
Şekil 4.9a.	Kültür bademi HNL için Lineweaver-Burk grafiği……..	57
Şekil 4.9b.	Acıbadem HNL için Lineweaver-Burk grafiği…….	57
Şekil 4.9c.	Kayısı HNL için Lineweaver-Burk grafiği……...……	58
Şekil 4.9d.	Zerdali HNL için Lineweaver-Burk grafiği……...……...	58
Şekil 4.9e.	Kültür eriği HNL için Lineweaver-Burk grafiği……...	59
Şekil 4.9f.	Yabani Erik HNL için Lineweaver-Burk grafiği……...……...	59
Şekil 4.10a.	Kültür bademi (*Prunus dulcis*)-HNL'ın bağıl aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimi…….…….....	60
Şekil 4.10b.	Acıbadem (*Prunus amygdalus turcomenica*)-HNL'ın bağıl aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimi……...	61
Şekil 4.10c.	Kayısı (*Prunus armeniaca*)-HNL'ın bağıl aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimi……..……..	61
Şekil 4.10d.	Zerdali (*Prunus pseuduarmaniaca*)-HNL'ın bağıl aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimi……...……..	62
Şekil 4.10e.	Yabani Erik (*Prunus cerasifera*)-HNL'ın bağıl aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimi……..	62
Şekil 4.10f.	Kültür eriği (*Prunus domestica*)-HNL'ın bağıl aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimi……	63
Şekil 4.11a.	Acıbadem ve kültür bademi HNL'ların aktivitelerinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi……..	64
Şekil 4.11b.	Kayısı ve zerdali HNL'ların aktivitelerinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi……	64
Şekil 4.11c.	Yabani erik ve kültür eriği HNL'ların aktivitelerinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi……..	65
Şekil 4.12.	HNL-Eupergit CM'lerin liyaz aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimi……..……...	66

Şekil 4.13.	HNL-Eupergit CM'lerin liyaz aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimi…….…...	67
Şekil 4.14a.	Kültür formu badem HNL-Eupergit CM için Lineweaver-Burk grafiği…….……...	68
Şekil 4.14b.	Acıbadem HNL-Eupergit CM için Lineweaver-Burk grafiği……...	68
Şekil 4.14c.	Kayısı HNL-Eupergit CM için Lineweaver-Burk grafiği…….	69
Şekil 4.14d.	Zerdali HNL-Eupergit CM için Lineweaver-Burk grafiği……...	69
Şekil 4.14e.	Kültür erik HNL-Eupergit CM için Lineweaver-Burk grafiği…….	70
Şekil 4.14f.	Yabani erik HNL-Eupergit CM için Lineweaver-Burk grafiği……	70
Şekil 4.15a.	Kültür badem HNL-Eupergit CM ve acıbadem HNL-Eupergit CM için aktivitelerin inkübasyon süresine bağlı değişimi……	71
Şekil 4.15b.	Kayısı HNL-Eupergit CM ve zerdali HNL-Eupergit CM için aktivitelerin inkübasyon süresine bağlı değişimi……..……..	72
Şekil 4.15c.	Kültür eriği HNL-Eupergit CM ve yabani erik HNL-Eupergit CM için aktivitelerin inkübasyon süresine bağlı değişimi…..	72
Şekil 4.16a.	Kültür formu badem HNL-Eupergit CM aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi…….	73
Şekil 4.16b.	Acıbadem HNL-Eupergit CM aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi…….	74
Şekil 4.16c.	Kayısı HNL-Eupergit CM aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi…….	74
Şekil 4.16d.	Zerdali HNL-Eupergit CM aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi…….…	75
Şekil 4.16e.	Kültür formu erik HNL-Eupergit CM aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi……	75
Şekil 4.16f.	Yabani erik HNL-Eupergit CM aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi…….…	76
Şekil 4.17.	HNL-CLEA örneklerinin aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi……..	77
Şekil 4.18.	HNL-CLEA örneklerinin aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi…..	78
Şekil 4.19a.	Kültür formu badem HNL-CLEA için Lineweaver-Burk grafiği….	79
Şekil 4.19b.	Acıbadem HNL-CLEA için Lineweaver-Burk grafiği…….....	79

Şekil 4.19c. Kayısı HNL-CLEA için Lineweaver-Burk grafiği……... 80
Şekil 4.19d. Zerdali HNL-CLEA için Lineweaver-Burk grafiği…….. 80
Şekil 4.19e. Kültür erik HNL-CLEA için Lineweaver-Burk grafiği…… 81
Şekil 4.19f. Yabani erik HNL-CLEA için Lineweaver-Burk grafiği……..…… 81
Şekil 4.20a. Kültür formu badem ve acıbadem HNL-CLEA'ların aktivitelerinin inkübasyon süresine bağlı değişimi……... 82
Şekil 4.20b. Kayısı ve zerdali HNL-CLEA'ların aktivitelerinin inkübasyon süresine bağlı değişimi……. 83
Şekil 4.20c. Kültür formu erik ve yabani erik HNL-CLEA'ların aktivitelerinin inkübasyon süresine bağlı değişimi……...……... 83
Şekil 4.21a. Kültür formu badem HNL-CLEA aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi……... 84
Şekil 4.21b. Acıbadem HNL-CLEA aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi……...……. 85
Şekil 4.21c. Kayısı HNL-CLEA aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi……... 85
Şekil 4.21d. Zerdali HNL-CLEA aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi…….. 86
Şekil 4.21e. Kültür formu erik HNL-CLEA aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi…… 86
Şekil 4.21f. Yabani erik HNL-CLEA aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi……. 87
Şekil 4.22a. Kültür formu badem HNL-Eupergit CM örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim…….……. 95
Şekil 4.22b. Acıbadem HNL-Eupergit CM örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim……...… 95
Şekil 4.22c. Kayısı HNL-Eupergit CM örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim……... 96

Şekil 4.22d. Zerdali HNL-Eupergit CM örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim…….. 96

Şekil 4.22e. Kültür formu erik HNL-Eupergit CM örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim…….…. 97

Şekil 4.22f. Yabani erik HNL-Eupergit CM örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim…….…. 97

Şekil 4.23a. Kültür formu badem HNL-CLEA örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim…… 98

Şekil 4.23b. Acıbadem HNL-CLEA örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim…….. 99

Şekil 4.23c. Kayısı HNL-CLEA örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim……...…... 99

Şekil 4.23d. Zerdali HNL-CLEA örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim…… 100

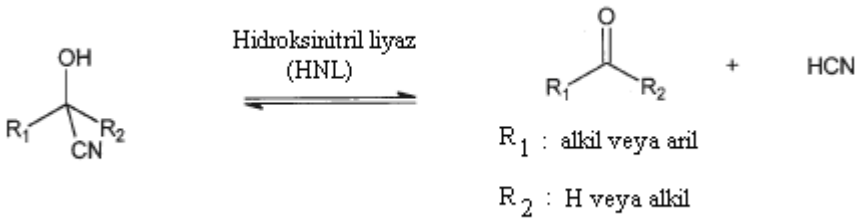
Şekil 4.23e. Kültür formu HNL-CLEA örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim…… 100

Şekil 4.23f. Yabani erik HNL-CLEA örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim……... 101

1.GİRİŞ

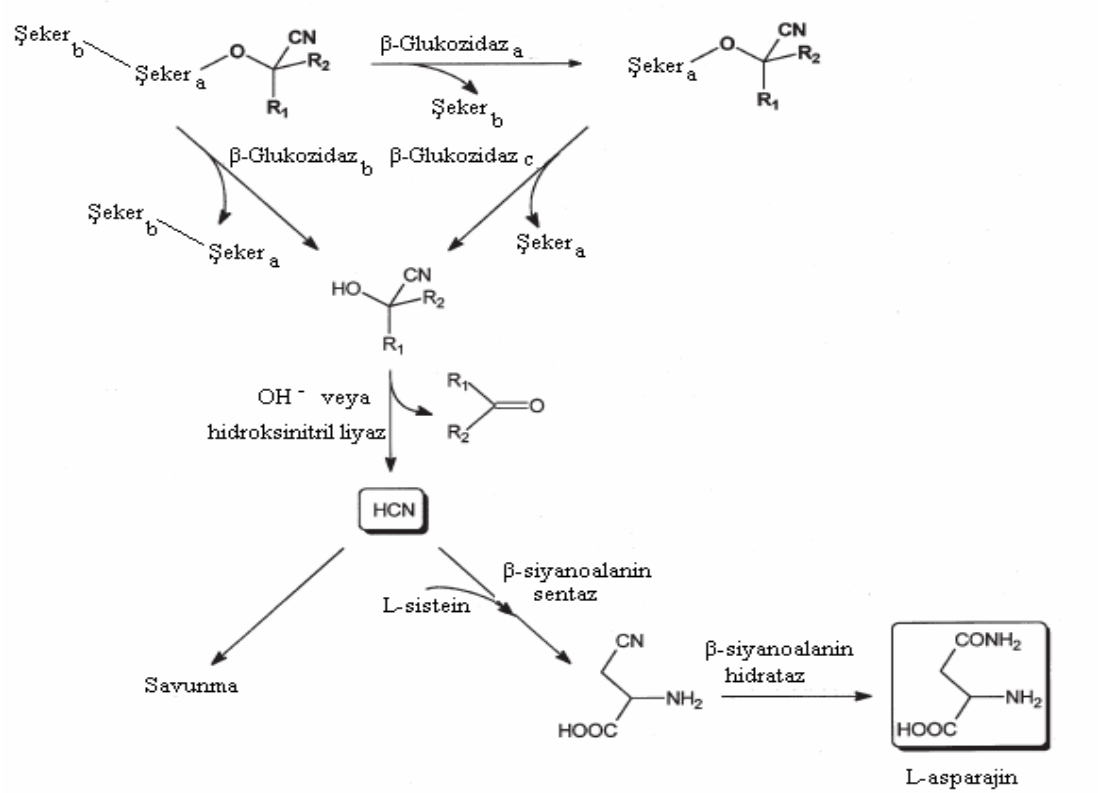
1.1. Hidroksinitril Liyazlar

Hidroksinitril liyazlar (HNL) (EC 4.1.2.x) siyanohidrinlerin enantiyoseçici olarak HCN ve aldehite (veya ketona) ayrıştırılmasını veya tersi reaksiyon ile enantiyosaf siyanohidrinlerin sentezini katalizleyen enzimlerdir (Şekil 1.1) (Koch ve ark., 2008)



Şekil 1.1. Hidroksinitril liyazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar.

HNL'ların en yaygın olarak bitkilerde, ancak böcek, bakteri ve fungi gibi bitkisel olmayan bazı kaynaklarda da bulunduğu bildirilmiştir (Conn, 1981; Nahrstedt, 1985; Zagrobelny ve ark., 2004). *İn vivo* koşullarda siyanojenik glikozidlerin aglikan kısmını oluşturan kiral siyanohidrin artıkları β-glukozidaz ile hidroliz edilmekte ve açığa çıkan siyanohidrinler HNL ile aldehit (keton) ve HCN'e ayrıştırılmaktadır. Bu olay siyanojenez olarak adlandırılmakta, açığa çıkan HCN'in herbivoral ve fungal ataklara karşı bitkilerin savunma mekanizmasında görev aldığı ve L-asparajinin sentezinde azot kaynağı olarak kullanıldığı bilinmektedir (Şekil 1.2) (Vetter, 2000).

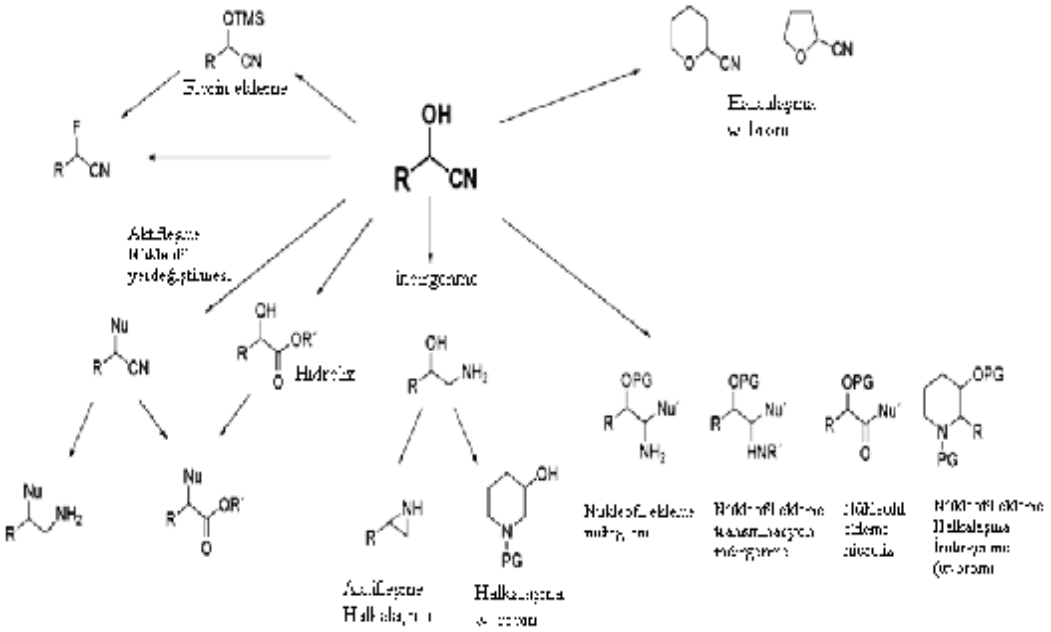


Şekil 1.2. Bitkilerde gerçekleşen siyanojenez olayı.

HNL'lar FAD prostetik grubu içeren ve içermeyen olarak başlıca iki sınıfa ayrılır. FAD prostetik grubu içeren HNL'ların (4.2.1.10) doğal substratı (*R*)-mandelonitril olup, *Rosaceae* bitki ailesinin iki alt ailesinden (*Prunoideae* ve *Maloideae*) izole edilirler. Badem (*Prunus amygdalus*) ve kiraz (*Prunus serotina*) gibi meyveler FAD kofaktörü içeren *Prunoideae* alt ailesinin birer üyesidirler. Buna karşın sorgum, cassava ve sünger ağacı gibi bitkilerden izole edilen HNL'lar prostetik grup olarak FAD içermezler ve (S)-seçicidirler. FAD içeren HNL'lar ile kıyaslandığında molekül ağırlıkları, substrat seçicilikleri ve doğal olmayan substratlarına karşı aktiviteleri farklılık göstermektedir (Wagner ve ark., 1996; Dreveny ve ark., 2001; Purkarthofer ve ark., 2007).

1837 yılında ilk kez badem HNL aktivitesi Wöhler tarafından fark edildi ve 1908 yılında Rosanthaler badem HNL'ını kullanarak (R)-mandelonitrilin enantiyoseçici sentezinde biyokatalizör olarak kullanılabileceğini bildirmiştir. Günümüzde de HNL'ların optikçe aktif siyanohidrinlerin endüstriyel amaçlı

sentezinde klasik sentezlere alternatif olarak kullanımlarının araştırılmasına yönelik çeşitli araştırmalar yapılmaktadır (Wehtje ve ark., 1988; Veum ve ark., 2004; Nanda ve ark., 2005; Bhunya ve ark., 2009; Tükel ve ark., 2010; Dadashipour ve Asano 2011). Zira sentezlenen optikçe aktif siyanohidrinler ilaç ve tarım endüstrisinde, veterinerlik ürünlerinde, gıda katkı maddelerinde, vitaminlerin sentezlenmesinde kullanılan α-hidroksi karboksilik asitler, primer ve sekonder β-hidroksiaminler, aziridinler, α-aminonitriller, α-azidonitriller, α-floronitriller, α-hidroksiketonlar, α-amino β-hidroksikarbosilik asitler v.b. gibi bileşiklere dönüştürülerek ince kimyasalların sentezinde kullanılabilmektedir (Şekil 1.3). Siyanohidrinlerin ılımlı koşullarda enzimatik olarak sentezlenmesiyle eliminasyon, rasemizasyon veya izomerizasyon gibi istenmeyen yan reaksiyonların da önlendiği bildirilmektedir (Zandbergen ve ark., 1992; Stelzer, 1993; Effenberger ve Stelzer, 1995; Monterde ve ark., 1999; Gröger, 2001).



Şekil 1.3. Çıkış maddesi olarak kullanılabilecek bazı önemli optikçe aktif siyanohidrinler (Nu: nükleofil, PG: Prostetik Grup) (Purkartofer ve ark., 2007).

Enantiyomerik olarak saf siyanohidrinlerin eldesi için kinetik rezolüsyon ve doğrudan stereoseçici sentezleri içeren çeşitli kimyasal yöntemler geliştirilmiştir

(Gregory, 1999). Çeşitli metallerin ve çeşitli ligandların oluşturduğu metal komplekslerin katalizör olarak kullanıldığı kimyasal yöntemlerde genellikle ağır metal içerikli olan metal katalizörlerin kullanımı potansiyel olarak toksik endüstriyel atık kaynağı olmaları bakımından özellikle büyük ölçekli endüstriyel üretimler için dezavantaj oluşturmaktadır. HNL katalizli metotlar ise etkinliklerinin, daha ılımlı ve ekonomik koşullarda gerçekleşiyor olmalarının yanı sıra çevre kirliliği yaratmamaları bakımından da önemlidir.

1.2. Protein Saflaştırmanın Amacı

Protein saflaştırmanın amacı saf protein elde etmek değil daha sonraki çalışmalar için kullanılabilecek bir protein preparatı hazırlamaktır. Bu çalışmalar; proteinin aktivitesinin araştırılması ve bu aktiviteden biyoteknolojik üretim, analitik veya tedavi edici amaçla yararlanılmasına yönelik olabileceği gibi, protein yapısının veya yapı fonksiyon ilişkisinin araştırılmasını da hedefleyebilir.

Protein üretiminde zaman ve maliyet çok önemlidir. Gerekli protein miktarı ve saflık düzeyi kullanım amacına bağlıdır. Bilimsel araştırmalar için az miktarda protein yeterlidir fakat preparat kesinlikle zararlı yabancı aktivite içermemelidir. Endüstriyel uygulamalar için büyük ölçekte üretim söz konusudur ve saflık ikinci derecede önem taşır. Tedavi edici uygulamalar için hazırlanan protein preperatının ise yüksek saflıkta olması gerekir.

Yapı araştırma çalışmalarında oldukça fazla miktarda ve yüksek saflıkta proteine gereksinim vardır. Bu durumda maliyet ve zaman ikinci derecede önemlidir. Fakat yapı-fonksiyon ilişkisi araştırılıyorsa saflaştırma işlemi süresince aktivite kaybını minimize etmek için işlem süresinin olabildiğince kısaltılması gerekir.

Belirli bir miktar çıkış maddesinden elde edilecek saf protein miktarı saflaştırma adımlarının toplam verimine bağlıdır. Adım sayısı verim ile ters fakat saflık derecesi ile doğru orantılıdır. En az saflaştırma adımı ile amaca uygun saflıkta protein preparatı hazırlamak çok önemlidir.

Saflaştırma işlemleri süresince protein denatürasyonundan korunması ve biyolojik aktivitesini yitirmemesine özen gösterilmelidir. Bu şekilde hazırlanan protein preparatı her türlü çalışmada kullanılabilirken amaç yalnız polipeptid zincir dizisini (primer yapı) aydınlatmak ise daha sert koşullarda çalışılmasında sakınca yoktur. Protein saflaştırılmasındaki adımlar denatürasyon ve proteolizi minimuma düşürecek şekilde seçilmelidir.

1.2.1. Protein Saflaştırma Stratejisi

Bir proteinin saflaştırılmasında uygun bir işlem dizisinin optimizasyonu çok önemlidir. En etkili, en hızlı ve en ekonomik ayırma ve saflaştırma proseslerinin mevcut bilgiler yardımıyla belirlenmesi hedeflenir. Bu nedenle saflaştırılacak proteinin bulunduğu kaynaklar, özellikleri ve stabilitesinin iyice incelenmesi gerekir. Uygulanacak ayırma ve saflaştırma teknikleri proteinin biyolojik aktivitesini olumsuz etkilememelidir.

Her saflaştırma basamağından sonra ilgilenilen proteinle ilgili analizler, onun saflık derecesi ve saflaştırma işleminin veriminin bilinmesi gerekir. Bunu belirlemenin en önemli yolu her aşamada proteinlerin aktivitelerini ölçmektir. Her hangi bir enzim için ideal bir aktivite belirleme yöntemi yoktur; ama, ideal protein analiz yöntemi mümkün olduğunca hızlı, basit ve özgün olmalıdır. Hızlı analizler saflaştırma basamakları arasındaki bekleme sürelerini ve dolayısıyla enzimin aktivite kaybetme olasılığını en aza indirecektir. Protein miktar tayinleri, her saflaştırma basamağının verimi ve ilgilenilen proteinin spesifik aktivitesi ile ilgili bilgiler ve sonuçlar bir araya getirilerek gerekli bilgi bütünlüğü sağlanmış olur (Erarslan ve ark., 2000). Çizelge 1.1’de çeşitli protein saflaştırma teknikleri ve özellikleri verilmiştir.

Çizelge 1.1. Protein saflaştırma tekniklerinin özellikleri (Erarslan ve ark.,2000).

Teknik	**Dayandığı Özellik**	**Kapasite**	**Etkinlik**	**Verim**	**Maliyet**
PH çöktürmesi	Yük	Yüksek	Çok düşük	Orta	Düşük
$(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi	Hidrofobisite	Yüksek	Çok düşük	Yüksek	Düşük
Ekstraksiyon	Değişik	Yüksek	Çok düşük	Yüksek	Düşük
Biyoafinitekromatoğrafisi	Biyoafinite	Yüksek	Yüksek	Değişebilir	Yüksek
İyon değişim kromatoğrafisi	Yük	Orta	Orta	Orta	Orta
Hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi	Hidrofobisite	Orta	Orta	Orta	Orta
Kromatofokuslama (odaklama)	Yük/ pI	Düşük	Yüksek	Orta	Yüksek
Boya afinite kromatoğrafisi	Değişik	Orta	Yüksek	Orta	Orta
Ligand afinite kromatoğrafisi	Biyoaktivite	Orta-düşük	Çok yüksek	Düşük	Yüksek
Jel Geçirgenlik kromatoğrafisi	Molekül boyutu	Çok düşük	Düşük	Yüksek	Orta

Saflaştırmanın ilk adımlarında daha çok deriştirmeye yönelik (yüksek kapasiteli) teknikler kullanılmaktadır. Böylece ortamdaki suyun büyük kısmı uzaklaştırılmış olmaktadır. Çöktürme, ekstraksiyon ve kromatoğrafi teknikleri bu amaçla kullanılabilmektedir.

1.2.1.1.Çöktürme

Bir protein ya da protein grubunun diğerlerinden ayrılmasında çöktürme yöntemleri protein saflaştırma işlemlerinin çoğunda kullanılmaktadırlar. Çöktürme bir sonraki saflaştırma adımı ya da analiz öncesinde proteinlerin konsantre edilmesi amacıyla da kullanılmaktadır. Bir proteinin sulu bir çözücüdeki çözünürlüğü onun yüzeyindeki hidrofilik ve hidrofobik yüklü gruplarının dağılımı ile belirlenir. Yüzeydeki yüklü gruplar çözeltideki iyonik gruplarla etkileşirler.

Proteinlerin çöktürülmesi, pH değişimi, iyonik gücün düşürülmesi (salting in), iyonik gücün arttırılması (salting out) ve organik çözücülerle gerçekleştirilmektedir.

1.2.1.2.Kromatoğrafi

Kromatoğrafi, bir numune içindeki bileşenlerin hareketli ve durgun fazlar arasında yapılan diferansiyel bir ayırma işlemidir. Uygulamaların çoğunda durgun faz bir kolon içine doldurulan küresel partiküllerden oluşmaktadır. Ayrılacak proteinlerin bir karışımı hareketli faza verilmekte ve bu fazın içinde kolon boyunca göç etmesi sağlanmaktadır. Katı fazla daha fazla etkileşimi olan proteinler hareketli faza daha fazla etkileşimi olan proteinlerden daha yavaş olacak şekilde göç etmekte ve bunun sonucunda ayırma olmaktadır.

Her saflaştırma yöntemi saflaştırılacak numunedeki bazı özelliklere gereksinim duymaktadır. Bu nedenle bir saflaştırma prosesinin tasarımında ardışık olarak kullanılacak tekniklerin uyumluluğu önemlidir. Örneğin amonyum sülfat ile yapılan bir tuz çöktürmesinden sonra proteini içeren çözeltinin tuz konsantrasyonu yüksek olduğundan tuz giderme işlemi yapılmadan iyon değiştirme kromatoğrafisinin kullanılması iyi sonuç vermez. Ancak hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi protein adsorpsiyonunu hızlandırmak için yüksek tuz konsantrasyınuna ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle amonyum sülfat çöktürmesinden sonra hidrofobik etkileşim kromatoğrafisinin kullanılması daha uygundur.

1.2.1.3.Hidrofobik Etkileşim Kromatoğrafisi

Hidrofobik etkileşim kromatoğrafisinde, yüzeyinde non-polar alkil (metil veya oktil gibi) veya aril (fenil gibi) grubu bulunan destek materyali kullanılmaktadır. Proteinin hidrofibik bölgeleri ile destek materyalinde bulunan bu hidrofobik gruplar arasında hidrofobik etkileşimler olmaktadır. Her bir proteinin hidrofisitesi farklıdır. Proteinler hidrofobik bağlanma gücüne göre gradient olarak azalan tuz derişimi içeren çözeltiler kullanılarak, kolondan elüe edilmektedirler. Kuvvetli olarak olarak bağlanan proteinler daha az tuz derişimi içeren çözeltilerle elüe edilmektedirler.

1.2.1.4.Moleküler Eleme Kromotografisi

Moleküler eleme kromotografisinin temel prensibi kürecik şeklinde olan poröz matriksin çözücü ile çevrelenmiş olarak bir kolona doldurulması ve üzerinden örneklerin geçirilmesi esasına dayanır. Matrikse uygulanacak örnek içerisindeki molekül boyutları durgun fazdaki matriksi gözeneklerinden daha küçük ve daha büyüktür. Matriksin gözenek büyüklüğünden daha küçük olan moleküller, matriksin gözenekleri içine girerler ve kolon boyunca daha yavaş hareket ederler. Gözenek büyüklüğünden daha büyük olan moleküller ise matriks tarafından dışarı bırakılırlar, dolayısıyla kolonu öncelikle terk ederler. Ara büyüklükteki moleküller, matriks gözenekleri içine girebilir ancak kolon içinde küçük moleküllerinkinden daha kısa süre kalırlar. Böylelikle moleküllerin hepsi kolondan azalan büyüklük sırasına göre elue edilirler.

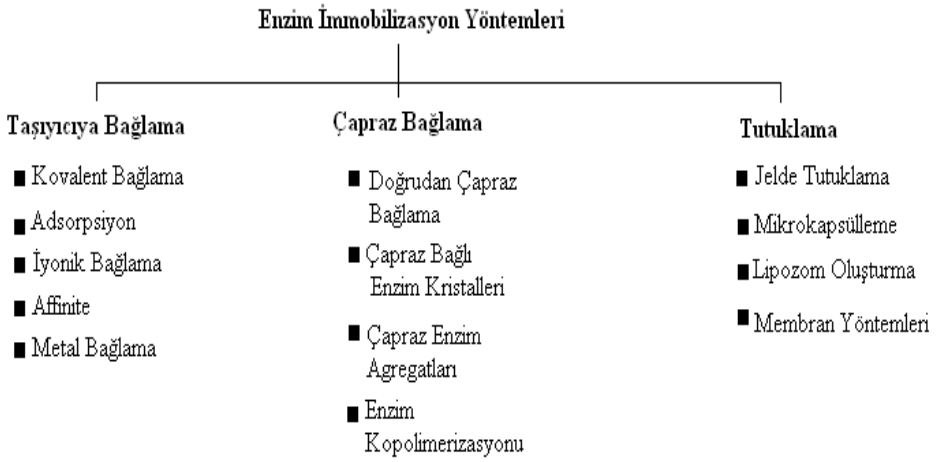
Saflaştırmanın verimi protein tayini ile kaç kat saflaştırma gerçekleştirildiği ise birim protein kütlesi başına fonksiyonel aktivitenin ölçülmesi ile bulunur. Protein saflık testi ve kaç yabancı protein içerdiği jel elektroforezi ile belirlenir. Safsızlıkların molekül kütleleri SDS-PAGE ile tayin edilir ve safsızlıklar jel geçirgenlik kromatoğrafisi ile uzaklaştırılır.

1.3. Enzim İmmobilizasyonu

Enzim izolasyonu ve saflaştırılmasında uygun kaynağın seçimi, bulunabilirliği ve saflaştırma işlemlerinin oldukça pahalı ve zahmetli olması saflaştırılan enzimlerin pahalı olmalarına neden olmaktadır. Diğer taraftan endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması oldukça zordur. Serbest enzimin reaksiyon ortamından istenildiği anda uzaklaştırılamaması reaksiyonun kontrolünü güçleştirir. Serbest enzimi reaksiyon ortamında etkisiz hale getirebilmek için kullanılan inhibitörler ise reaksiyon ürünlerine yeni bir kirlilik unsuru olarak eklenir. Reaksiyon ortamındaki bu kirlilik unsurlarının uzaklaştırılmaya çalışılması maliyeti artıracaktır. Ayrıca serbest enzimler sürekli üretim proseslerinde de tercih edilmezler.

Bu nedenlerle enzimleri daha ekonomik ve kullanışlı hale getirmek için immobilize edilerek kullanımları araştırılmaktadır.

İmmobilizasyon, çözünmüş durumdaki bir enzimin tekrar ve sürekli kullanımını mümkün kılmak, kararlılığını arttırmak için enzimin organik veya inorganik desteğe bağlanması veya bir membran ile etrafının sarılmasıdır. Enzim immobilizasyonu yöntemleri için çok çeşitli sınıflandırmalar olmakla beraber Şekil 1.4'de olduğu gibi bir sınıflandırma yapmak mümkündür.



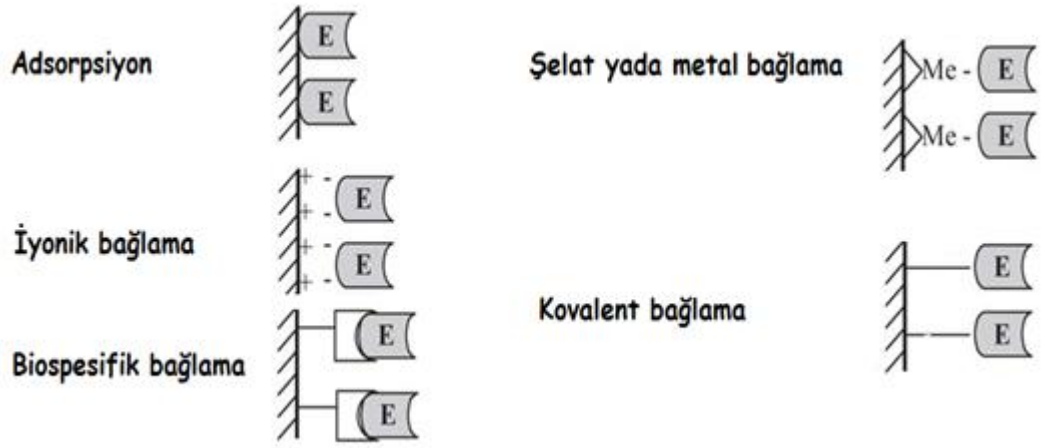
Şekil 1.4. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Tischer, 1998).

Çeşitli yöntemler kullanılarak immobilize edilen enzimlerin serbest enzime göre beklenen üstünlükleri vardır. İmmobilize enzimler reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilmeli, birçok kez ve uzun süre sürekli işlemlere uygulanabilmeli, çevre koşullarına (pH, sıcaklık) karşı dayanaklı olmalıdır. İmmobilize enzimler bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.

1.3.1. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri

Taşıyıcıya bağlamada bir protein olan enzim molekülünün yapısından yararlanılır. Molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bağlamada rol alırlar. Taşıyıcıya bağlama yöntemleri kovalent bağlama,

adsorpsiyon, iyonik bağlama, affinite, metal bağlama ve olmak üzere beş gruba ayrılır (Şekil 1.5).

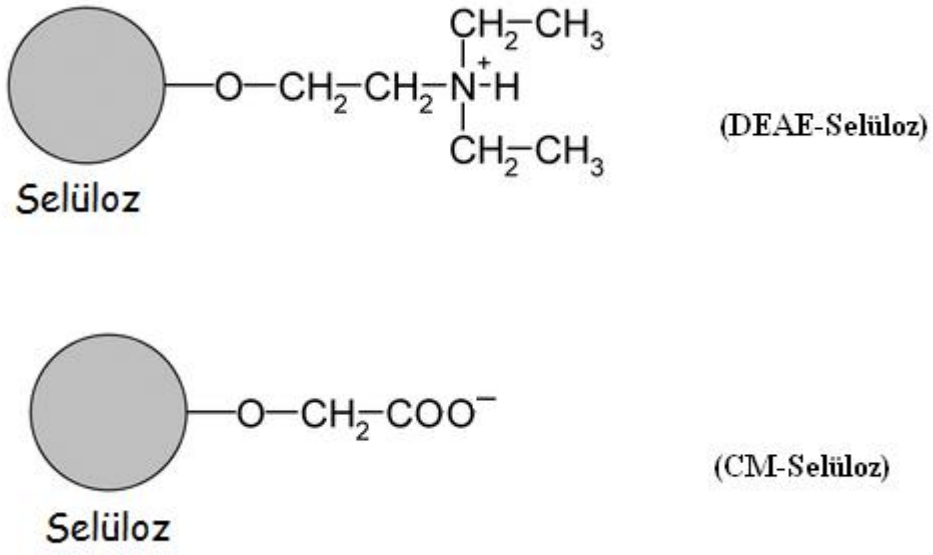


Şekil 1.5. Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinin gösterimi.

Adsorpsiyon: Enzim immobilizasyonunda ilk kullanılan enzim immobilizasyon metodlarından birisidir. Fiziksel adsorbsiyonda enzim desteğe hidrojen bağları, Vander Waals ve hidrofobik etkileşimler gibi zayıf etkileşimlerle bağlanırlar. Adsorbsiyon yöntemi ile enzim immobilizasyonunda immobilizasyon işlemi ılımlı koşullarda gerçekleştirilir, kullanılan desteğin aktifleştirilmesini gerektirmez, ekonomik olarak avantajlıdır ve genellikle immobilizasyon işlemi sonunda enzim aktivitesini önemli ölçüde kaybetmez (Messing, 1976; Rexova-Benkova ve ark., 1982; Woodward, 1985).

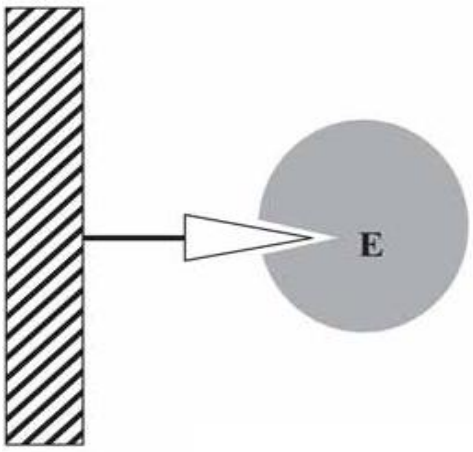
İyonik Bağlama: Bu yöntem, suda çözünmeyen ve net bir yüke sahip taşıyıcılara enzim molekülünün iyonik etkileşimlerle bağlanması temeline dayanır (Solas ve ark., 1994). İyonik bağlama ile enzim immobilizasyon yöntemleri basit olmakla beraber enzimin desteğe hem kuvvetli bağlandığı hem de çok aktif olduğu aynı şartları bulmak zordur (Bahulekar ve ark., 1991). İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçışı söz konusudur.

Destek olarak iyon değiştirici özelliğe sahip dekstran, selüloz, polisitiren türevi sentetik polimerler kullanılmaktadır (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. İyonik bağlama ile enzim immobilizasyonunda kullanılabilecek desek materyallerine örnekler.

Biyospesifik Bağlama (Affinite): Enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanarak enzim immobilize edilebilir (Hermanson ve ark., 1992). Lektinler spesifik karbohidrat artıklarını içeren enzimlere kuvvetlice bağlanırlar (Şekil 1.7).

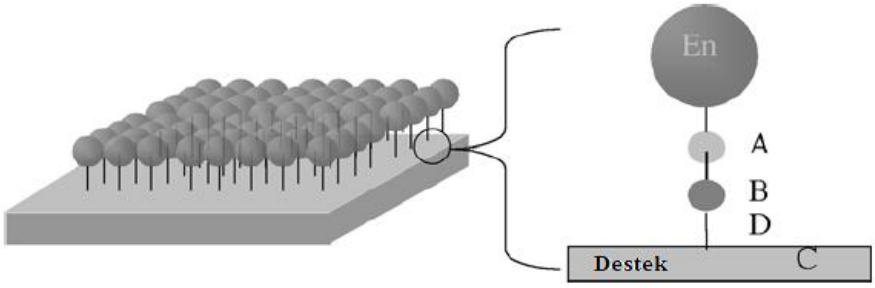


Şekil 1.7. Biyospesifik bağlama (Affinite) ile enzim immobilizasyonu.

Metal (Şelat) Bağlama: Bu immobilizasyon yönteminde geçiş metallerinin özellikle titanyum ve zirkonyumun tuzları veya hidroksitleri kullanılır (Kennedy ve

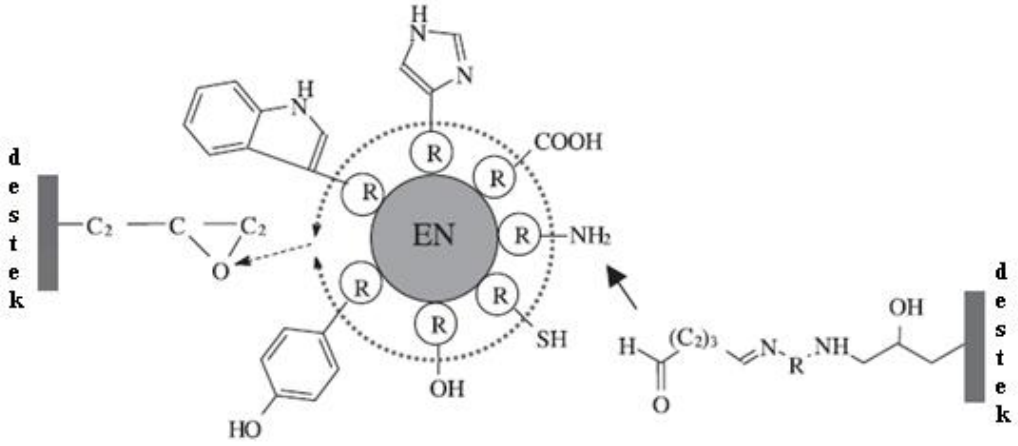
Cabral, 1985; Cabral ve ark., 1986). Metalin tuzu veya hidroksit formu destek yüzeyine (selüloz, kitin, alginik asit, silikat gibi) ısıtma veya nötralizasyon yöntemi ile çöktürülür. İmmobilizasyon işlemi metalin boş d orbitali ile enzim molekülündeki artık aminoasit grupları arasında gerçekleşir.

Kovalent Bağlama: Kovalent enzim immobilizasyonu kovalent bağın doğası gereği enzim molekülü ve destek arasındaki bağın kararlı olması ve bu yüzden enzimin destek yüzeyinden kolaylıkla ayrılmasının mümkün olmaması sebebiyle enzim immobilizasyonunda çok yaygın olarak kullanılan metodlardan birisidir. Ancak, kovalent enzim immobilizasyonunda dikkat edilecek önemli nokta bağlanmanın enzimin aktif bölgesinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir (Guisan, 2006). Enzimin yüzeyinde yer alan aminoasit artığı ile destek yüzeyinde yer alan fonksiyonel grup arasındaki kimyasal bağ Şekil 1.8'de gösterilmiştir (Cao, 2005).



Şekil 1.8. Enzimin desteğe kovalent immobilizasyonu : (A) Aktif aminoasit artığı; (B) Desteğin fonksiyonel bağ yapacak grubu; (C) Destek; (D) Ara kol (Cao, 2005).

İnorganik ve organik yapıda birçok doğal ve yapay materyal kovalent immobilizasyonda destek materyali olarak kullanılabilmektedir. Kovalent enzim immobilizasyonunda kullanılan desteğin yüzeyindeki aktif fonksiyonel gruplara bağlı olarak çok farklı bağlanma türleri meydana gelebilmektedir (Şekil 1.9). Destek yüzeyinde aktif fonksiyonel grupların hazırlanmasında monomerlerin uygun koşullarda polimerleştirilmesi ve çeşitli aktivasyon yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir (Cao, 2005).



Şekil 1.9. Destek yüzeyindeki aktif fonksiyonel gruba bağlı olarak enzim (EN) molekülünde bağlanmada kullanılabilecek artık aminoasit grupları (Cao,2005).

1.3.2. Çapraz Bağlama Yöntemleri

Çapraz bağlama ile yapılan enzim immobilizasyon yöntemlerinde küçük molekül yapılı, bi- veya multi fonksiyonel reaktifler, enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen kompleksler oluşturmaktadır (Govardhan, 1999; Schoevaart ve ark.,2004; Sheldon ve ark., 2005; Shah ve ark., 2006). Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif derişimine, pH'ya ve immobilize edilecek enzime çok bağlıdır. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, kloroformat ve karbonilimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, p-benzokinon, geçiş metal iyonları ve epiklorohidrinlerdir. Genellikle pahalı olmadığı ve ticari olarak kolay bulunduğu için glutaraldehit çapraz bağlama reaktifi olarak kullanılmaktadır.

Çapraz bağlı immobilize enzimler;

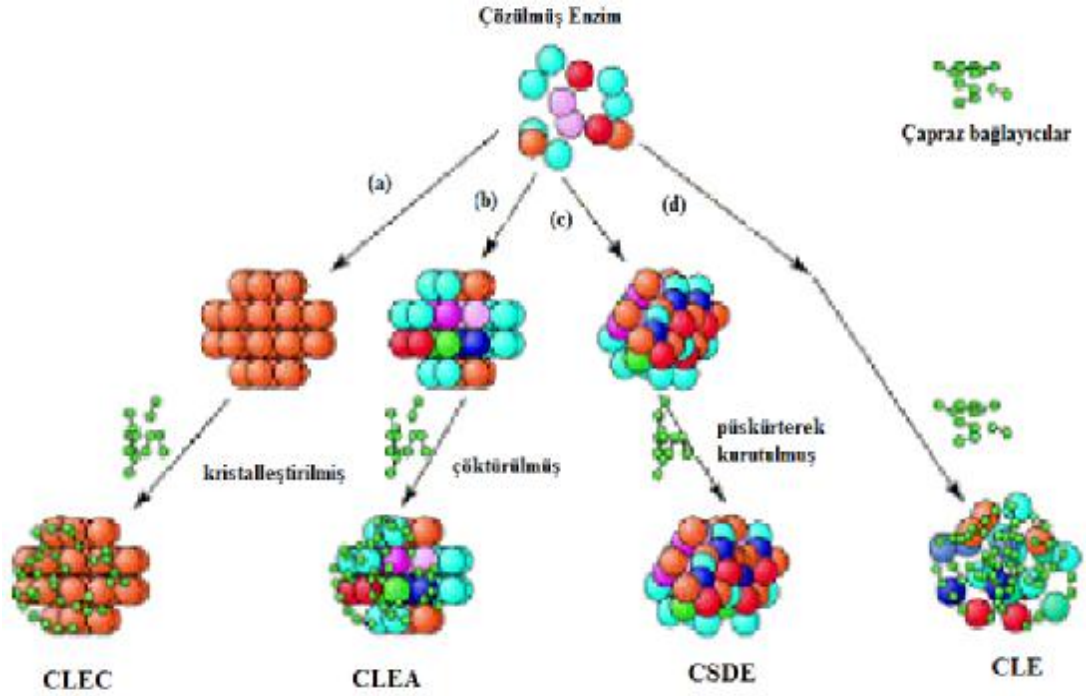
CLE: Çapraz bağlı çözünmüş enzim (Cross-linked dissolved enzyme)

CLEC: Çapraz bağlı enzim kristali (Cross-linked enzyme crystal)

CSDE: Çapraz bağlı püskürtülerek kurutulmuş enzim (Cross-linked spray dried enzyme)

CLEA: Çapraz bağlı enzim agregatları (Cross-linked enzyme agregate) olmak üzere dört farklı şekilde hazırlanabilmektedir (Şekil 1.10).

CLE: Bu tür immobilize enzim için termal kararlılık güçlendirilebilir ancak çapraz bağlayıcının miktarı, sıcaklık, pH ve iyonik güç gibi birkaç faktör arasında hassas bir denge gerektirir. Ayrıca çözünmüş enzim moleküllerinin arasındaki yüksek oranda intermoleküler çapraz bağların oluşması düşük aktivite, zayıf tekrarlanabilirlik, düşük mekanik kararlılık gibi bazı olumsuzluklara neden olabilmektedir. Ayrıca jölemsi yapıda olması da dezavantajlarından biridir (Cao ve ark., 2003).



Şekil 1.10. Taşıyıcı olmadan yapılan enzim immobilizasyon yöntemleri: (a) kristallendirme, (b) çöktürme, (c) püskürterek kurutma, (d) doğrudan çapraz bağlama (Twyman, 2005)

CLEC: Büyüklükleri 1- 100 μm arasında kontrol edilebilen, yüksek oranda aktif ve kararlı immobilize enzimler olarak geliştirilmiştir. Diğer taraftan enzim kristalizasyonu için kullanılacak enzimin son derece saf olması gerekmektedir. Bu da maliyeti çok artırmaktadır. Lipaz, proteaz ve açilaz gibi birçok hidrolazlar asimetrik sentezler için kiral biyokatalizörler olarak ticari amaçla CLEC olarak kullanılmıştır (Cao ve ark., 2003).

CSDE: Püskürtülerek kurutulmuş enzim tozları çapraz bağlı enzim preparatları hazırlamak için kullanılır. Uygun bir aktivite göstermesine rağmen bu yöntemden şimdiye kadar yararlanılmamıştır. Çünkü bu yöntem uygulanırken enzim, kurutulması nedeniyle etkisiz hale gelmektedir. CSDE'nin CLEC, CLEA veya taşıyıcı ile yapılan immobilize enzimlerle kıyaslandığında oldukça düşük aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Cao ve ark., 2003).

CLEA: Çözünür enzim moleküllerinin çözünmez agregatlar oluşturmasına dayanmaktadır. Uygun agregat oluşturucular eklenmesiyle enzim çözeltisinin elektrostatik sabitlerinin değişmesi ile ya da enzim çözeltisinin hidrasyon durumunun değiştirilmesi ile çözünmez enzim agregatları oluşturulabilmektedir. Yüksek oranda çözünmüş serbest enzim molekülleri çöktürücülerle çözünmez çökeltiler halinde çöktürülürler. Bu çözünmez çökeltiler daha sonra bifonksiyonel çapraz bağlayıcıların eklenmesiyle çapraz bağlanırlar. Oluşmuş CLEA'lar CLEC'lerle karşılaştırılabilir aktivite ve kararlılık gösterirler. CLEA'nın kullanımı halen gelişmekte olan bir teknolojidir (Cao ve ark., 2003). CLEC'in aksine enzimin kristal formunu gerektirmez bu nedenle maliyeti daha düşüktür (Sheldon ve ark., 2005).

Enzim molekülleri başka bir destek maddesi olmadan, kendi aralarında molekül içi veya moleküller arası çapraz bağlanarak immobilize olabilirler. Bu yöntem üç boyutlu çapraz bağlı enzim oluşumu esasına dayanmaktadır. Bu immobilizasyon metodu enzimi tamamen saf bir halde kullanmaya gerek duymadığı için basit, sağlam ve etkili bir metottur. CLEA'da çapraz bağlama için kullanılan reaktif aldehit grubu içeren, yüksek molekül ağırlıklı polifonksiyonel polimerlerin (100-200 kDa) enzimlerin veya alt ünitelerin çapraz bağlanmasında etkili olduğu bildirilmektedir (Mateo ve ark., 2003).

Çapraz bağlama ile enzim immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken şartların seçimi ve kurulumu zahmetlidir. Enzim aktifliği; tepkime süresi, sıcaklık, iyonik şiddet, pH, çapraz bağlayıcı madde ve enzim derişimi gibi faktörlere ve bunlar arasındaki dengeye bağlıdır.

CLEA'nın Avantajları:

- Tek bir işlemde enzimlerin immobilize edilebilmesi,
- Enzim immobilizasyonu için yeni, çok yönlü ve etkili olması,
- Metodun hızlı immobilizasyon için basit olması,
- Metod ilk adımda saflaştırma ve immobilizasyonun bir bileşimi olduğundan enzimin yüksek saflığını gerektirmemesi,
- Yöntemin kombine CLEA'ların hazırlanması için de uygun olması,
- Herhangi bir destek kullanılmaması nedeniyle enzim aktivitesinde seyrelme olmaması,
- Yüksek kararlılık ve düşük üretim maliyeti,
- Endüstriyel uygulamalarda zamandan ve maliyetten kazanç,
- Multimerik enzimlerin alt ünitelerinin ayrılmasını engelleyerek enzimin kararlılığının artması ve dördüncül yapısının dengeli tutulması.

CLEA' nın Dezavantajları:

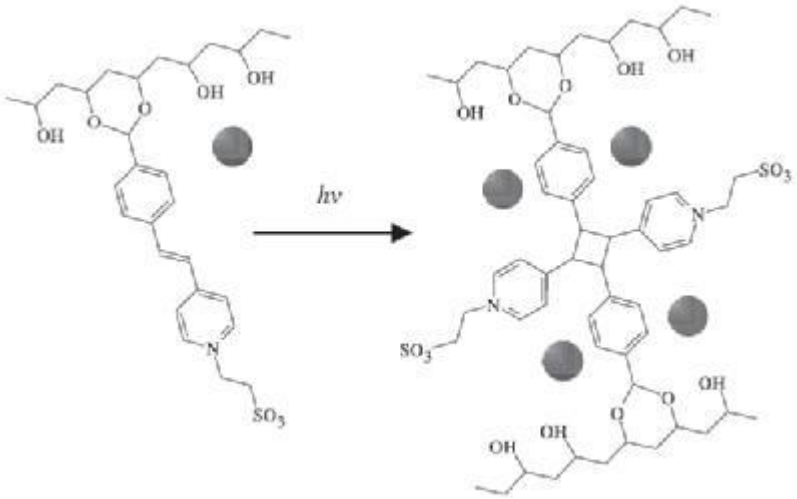
- Yüksek aktiflik gösteren immobilize enzim elde etmek için moleküller arası çapraz bağlanma reaksiyonunun kontrol edilmesindeki zorluklar,
- Çöken enzimlerin partikül boyutlarının kontrolünün zorluğu.

1.3.3. Tutuklama Yöntemleri

Tutuklama yöntemlerinde enzim molekülleri substrat ve reaksiyon ürünlerini geçişine izin veren ancak enzim moleküllerinin dışarıya çıkmasını önleyen bir matriks içerisinde tutuklanması esasına dayanmaktadır (O'Driscoll, 1976). Polimerik matriks oluşumu kimyasal (çapraz bağlama) ve fiziksel yöntemlerle gerçekleştirilmektedir.

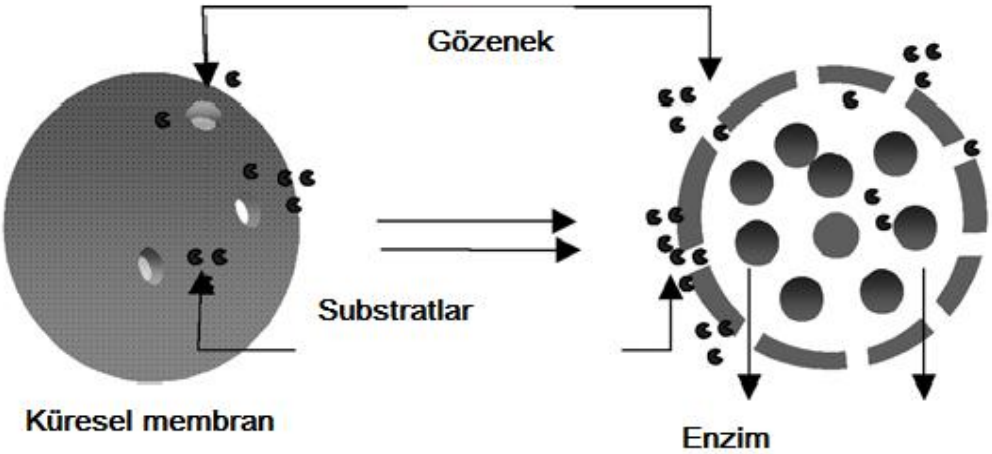
Polimer Matrikse Tutuklama: yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır (Şekil 1.11). Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiye geçmeleri engellenmektedir (Sperinde ve Griffith, 1997). Bu amaçla en çok kullanılan monomerlerin bazıları akrilamid, akrilik asid ve glisidilakrilat, 2

hidroksietilmetilakrilat, N-vinilpirolidon, 2-hidroksi propilamid, polietilen glikol metilakrilat'dır.



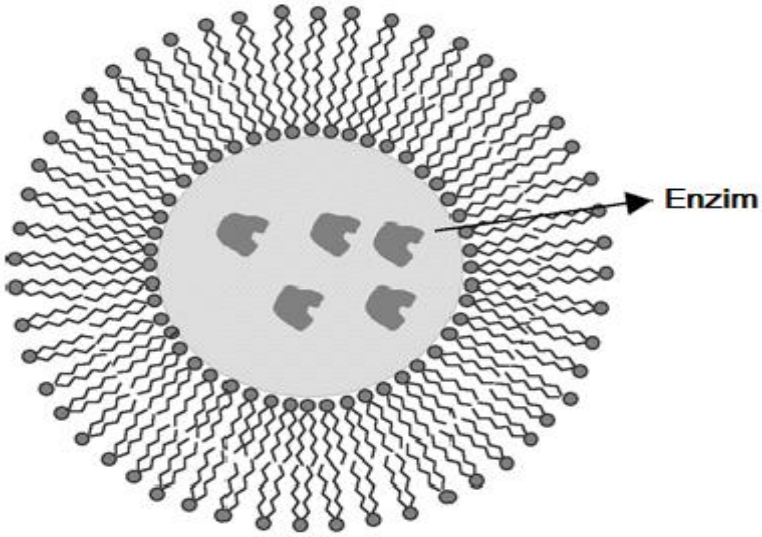
Şekil 1.11. Polimer bir matriks içerisinde enzim molekülünü tutuklanması (Cao,2005).

Mikrokapsülleme; enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanması esasına dayanır (Şekil 1.12). Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100 µm arasında değişmektedir. Yarı geçirgen membranın gözenek çapları; substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek bir büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse bu yöntem ile immobilize edilmiş enzimin verimliliği o ölçüde yüksek olacaktır.



Şekil 1.12. Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu

Lipozom yöntemi; sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanır (Şekil 1.13), (Regen ve ark., 1984). Çapı 1-100 µm arasında değişen enzim çözeltisi damlacıklarını içeren hidrokarbon çözücünün; çeşitli katkı maddeleri ve yüzey yapıcılarla enzim çözeltisi damlacıkları çevresinde oluşturduğu suda çözünmeyen faza sıvı yüzey yapıcı membranlar adı verilmektedir. Yöntemin en önemli üstünlüğü; süreksiz, dönüşümlü ve tamamen fiziksel oluşudur. Aynı anda bir adımda birçok enzimin immobilizasyonuna olanak sağlar ve oldukça büyük bir temas yüzeyine sahiptir. Önemli sakıncaları ise; substrat ve ürünün membranda geçişinin çözünürlüğe bağımlı olması, işlem sırasında enzimin inaktif olması ve sıvı olan membrandan enzimin kaçma olasılığıdır.



Şekil 1.13. Lipozom yöntemi ile enzim immobilizasyonu

Membran yöntemleri; enzimin çok yarı geçirgen bir zarla çevrelendiği ve enzime geniş bir hareket alanının sağlandığı bir immobilizasyon tekniğidir (Weethall, 1976). Yarı geçirgen özellik gösteren oyuk elyaf membranları ve ultrafiltrasyon membranların kullanımı enzimlerin çözünür formda immobilizasyon yöntemlerinden biridir. Bu immobilizasyon yöntemi hiçbir kimyasal bileşiğin veya tekniğin kullanılmasının gerekmediği son derece kolay bir yöntemdir. Oyuk elyaf membranlar ile ultrafiltrasyon membranları enzimi geçirmezken substrat ve ürünün

geçişine izin verir. Ayrıca mikropların enzime ulaşmasını engelleyerek koruyucu etki gösterirler. Enzim desteğe herhangi bir bölgesinden bağlanmadığı için moleküler geometrisi, esnekliği ve dolayısıyla katalitik etkinliği değişmez, ancak substratın membrandan geçip enzime ulaşmasındaki kısıtlamalar bu yöntemin en önemli dezavantajlarından birini oluşturur. Substrat molekülü ne kadar küçükse membrandan geçişi o denli kolay olacağından enzimin etkinliği de o oranda artacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Wajant ve ark., 1995, *Phlebodium aureum* hidroksinitril liyazını (*Pha*HNL) Q sefaroz FF, kromatofocuslama, jel filtrasyonu, mono Q(pH 7,5) ve mono S (pH 3,9) olmak üzere 5 kolon kromatografisi kullanarak A, B ve C olmak üzere 3 enzim saflaştırmışlardır. Saflaştırılan *Pha*HNL'in izoenzimlerinin üçünün de SDS-PAGE sonrasında her bir alt ünitesi yaklaşık 20 kDa olan ve toplam molekül ağırlığı yaklaşık 168±30 kDa olan multimer bir enzim olduğunu FAD içermediğini bildirmişlerdir. *Pha*HNL enzimlerinin pH'ya bağlı aktiviteleri incelendiğinde benzer davranış gösterdikleri ve maksimum aktivitelerinin pH 6,5'de olduğunu bildirmişlerdir. *Pha*HNL'nin izomerlerinin geniş bir sıcalık aralığında aktif oldukları ve 35 ile 50°C arasında maksimum aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir. Belirlenen optimum koşullarda substrat olarak mandelonitril kullanarak *Pha*HNL'nin kinetik özelliklerini incelediklerinde maksimum aktivite değerinin 60,1 µmol benzaldehit mL^{-1} dk^{-1} ve K_m değerinin ise 0,83 mM benzaldehit olduğunu hesaplamışlardır. Ayrıca *Pha*HNL'ı avicel-selüloza immobilize ettikten sonra diizopropileter içerisinde çeşitli siyanohidrinlerin sentezlenmesinde kullanmışlardır. Sentezlenen ürünlerin karakterizasyonu için NMR, enantiyomerik aşırılığın belirlenmesi için ise GC kullanmışlardır.

Wajant H. ve Förstern S., 1996 *Hevea brasiliensis* hidroksinitril liyazını (*Hb*HNL) %29 verim ile 106 kat saflaştırmışlar, 100-105 kDa molekül ağırlığına sahip bir homotrimer veya homotetramer olduğunu ve FAD içermediğini bildirmişlerdir. Saflaştırma işlemi için ham ekstrakta sırasıyla %40 $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi, jel filtrasyonu, Q-sefaroz FF (pH 5,4) ve Mono Q (pH 7,8) işlemlerini uygulamışlardır. *Hb*HNL'ın doğal substratı olan aseton siyanohidrin kullanıldığında optimum pH'nın 5,3 ile 5,7 arasında olduğunu ve daha yüksek pH değerlerinde aseton siyanohidrinin kendiliğinden bozunduğunu bildirmişlerdir. Aseton siyanohidrin kullanarak belirledikleri K_m değeri ise 115 mM'dır.

Van Langen ve ark., 2004, *Prunus amygdalus* HNL'ının (*Pa*HNL) çapraz bağlı enzim agregatlarını (CLEA) oluşturmak için çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit ve çöktürücü ajan olarak da 1,2-dimetoksietan kullanmışlardır. Elde

edilen *Pa*HNL-CLEA partiküllerinin boyutlarını lazer difraksiyonu ile belirlemişler ve boyutların 0,5 ile 200 µm arasında değiştiğini ve çoğunluğunun boyutunun 12 µm olduğunu bildirmişlerdir. *Pa*HNL-CLEA'nın tekrar kullanım kararlılığını mikroaqua (%2) diizopropileter (DIPE) içeren ortamda 2-metil benzaldehitin parçalanması ile belirlemişler ve 10. kez kullanımdan sonra da *Pa*HNL-CLEA'nın aktivitesini kaybetmediğini bildirmişlerdir. Ayrıca serbest *Pa*HNL ve *Pa*HNL-CLEA'yı mikroaqua (%2, v/v) DIPE ve bifazik DIPE:H_2O (1:1, v/v) ortamlarında 2-klorobenzaldehit, 2-nitrobenzaldehit ve *trans*-sinamaldehiti kullanarak çeşitli siyanohidrinlerin sentezlenmesi için kullanılmışlardır ve hesaplanan %verim-ee değerlerini karşılaştırmışladır.

Nanda ve ark., 2005, Japon kayısısından (*Prunus mume*) %30'luk $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi ile elde ettikleri HNL'ın diğer Prunus türleri ve FAD içeren HNL'lar ile benzer özelliklere sahip olduklarını belirlemişlerdir. pH 4,5 sitrat tamponu içerisinde çeşitli siyanohidrinlerin sentezlenmesinde benzaldehitin yanı sıra bütanal, 2-bütanon, 2-kloro-benzaldehit ve 2-furankarboksialdehit gibi alifatik, aromatik, heteroaromatik aldehitleri ve alifatik ketonları kullanmışlardır. Oluşan siyanohidrinlerin % verimlerini ve enantiyomerik aşırılıklarını (ee) hesaplamışlardır. R-mandelonitrilin sentezlenmesine pH'nın etkisini araştırmışlar ve düşük pH'larda (pH:4,0-4,5) enzimin daha aktif olduğunu ve pH'nın artmasıyla birlikte enantiyomerik aşırılığın azaldığını ve pH 6,5'de enzimin aktivitesini tamamen kaybettiğini bildirmişlerdir. Buna ek olarak yüksek sıcaklıklarda (40˚C'nin üstünde) enzimin aktivite kaybettiği ve en iyi aktiviteyi 15-25˚C'de gösterdiğini belirlemişlerdir. *Prunus mume* HNL aktivitesini çeşitli organik çözücüler içerisinde de test etmişler ve en ideal organik çözücü: tampon oranını 10:1 olarak belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda en iyi çözücülerin diizopropileter (DIPE), t-bütilmetileter (TBME) ve di-n-bütileter (DBE) olduğunu ve bu üç çözücü için %95'den daha fazla verim elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

Cabirol ve ark., 2006, *Prunus amygdalus* hidroksinitril liyazını (*Pa*HNL), *Manihot esculanta* hidroksinitril liyazını (*Me*HNL) ve *Hevea brasiliensis* hidroksinitril liyazını (*Hb*HNL) sol-jel metodu ile başarılı bir şekilde immobilize etmişlerdir. Ayrıca *Hb*HNL'ını çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) oluşturma

yöntemi ile de immobilize etmişlerdir. Bu immobilize enzim preparatlarını enantiyosaf siyanohidrinlerin sentezinde kullanmışlardır. Sol-jel metodu ile immobilize edilen HNL'ların az miktarda kullanılması ve organik çözücüde (diizopropil eter) kullanılmasıyla etkili sonuçlar elde etmişlerdir. Farklı HNL'ların CLEA'larının stabilitesinin değişken olduğunu, *Pa*HNL-CLEA ve *Hb*HNL-CLEA'nın diizopropileter içerisinde önemli derecede deaktive olduğunu kanıtlamışlardır. Ancak ticari olarak satılan *Me*HNL-CLEA'nın diizopropileter içerisinde önemli ölçüde güçlü ve etkili bir biyokatalizör olduğunu kanıtlamışlardır.

Cabirol ve ark., 2006, *Manihot esculanta* HNL (*Me*HNL) ve *Prunus amygdalus* HNL'dan (*Pa*HNL) çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) oluşturarak elde ettikleri *Me*CLEA ve *Pa*CLEA ile diizopropileter-tampon (50 mM sitrat/fosfat, pH 5,5) içeren reaksiyon ortamında sırasıyla (S) ve (R)-mandelonitril sentezlemişlerdir. Oda sıcaklığında 4 saat reaksiyon süresi sonrasında elde edilen ürünlerin ortalama %95 verim ve %97 enantiyomerik aşırılık (ee) ile sentezlediklerini, *Me*CLEA ve *Pa*CLEA preparatlarını 3 kez kullandıktan sonra da aktivitelerini kaybetmediğini bildirmişlerdir. Reaksiyon ortamına klorotrimetilsilan (TMSCI) gibi TMS türevleri eklendiğinde siyanohidrinlerin ortalama %80 verim ve %99 ee ile sentezlenendiğini rapor etmişlerdir.

Han ve ark., 2006, *Vicia sativa* L. (bakla) çekirdeklerinden elde edilen hidroksinitril liyazı (*Vs*HNL) kullanarak, tampon çözelti içermeyen, diizopropil eter içeren mikroaqua ortamda aromatik, heteroaromatik, floro-substitue aromatik aldehitlere HCN'nin eklenmesiyle %52-100 verim ve %88-99 enantiyomerik aşırılıkla (ee) enantiyosaf siyanohidrinleri sentezlemişlerdir.

Cabirol ve ark., 2008, *Linumu sitatissimum* hidroksinitril liyaz (*Lu*HNL) enzimini çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) oluşturarak immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyon işlemi sırasında katkı maddesi olarak 2-bütanon kullanmışlar ve HNL'ın karboligasyon aktivitesinin arttığını rapor etmişlerdir. (*R*)-2-hidroksi-2-metilbütirikasiti 30°C'de, 3 saat reaksiyon süresinin sonunda %85 verim ve %87 enantiomerik aşırılık ile sentezlemişlerdir.

Koch ve ark., 2008 su/organik çözelti (sitrat tamponu/ metil-t-bütileter) içeren ikili faz sisteminin optimum karışım oranlarını belirlemişler ve HNL içeren R seçici

*Pa*HNL (*Prunus amygdalus*) ve *S*- seçici *Hb*HNL (*Heveabrasiliensis* HNL) ham hücre lizatını kullanarak optikçe aktif siyanohidrinlerin sentezlenmesi için mikroreaktör sistemlerinde çeşitli aldehitlerden siyanohidrinlerin sentezlenmesi üzerinde çalışmışlardır. Mikroreaktörleri büyük ölçekli reaktörlerle karşılaştırdıklarında HNL'ın aktivitesinin ve enantiyoseçiciliğinin mikroreaktörlerde daha yüksek olduğunu vurgulamışlardır.

Ueatrongchit ve ark., 2009, 74 bitki ailesinin yaklaşık 163 türünde (R) ve (S) seçici HNL'ların varlığını tespit etmişlerdir. Japon kayısısının (Eriobotrya japonica) çekirdeklerinden (R) seçici HNL'ı saflaştırmak için %30-80 arası $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi, ardından sırasıyla DEAE-Toyopearl ve Concanavalin A Sefaroz 4B kolon kromotoğrafilerini kullanarak 49 kat saflaştırılmış HNL enzimi elde etmişlerdir. Saflaştırdıkları HNL'ı karakterize etmişler ve çeşitli siyanohidrinlerin sentezinde kullanmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda HNL'ın aktivitesini artırmak için metal iyonlarının gerekli olmadığını ve $CuSO_4$, $HgCI_2$, $AgNO_3$, $FeCI_3$, β-merkaptoetanol, iyodoasetikasit, fenilmetilsülfonilflorür ve dietilprokarbonat tarafından HNL aktivitesinin inhibe edildiğini bildirmişlerdir.

Bhunya ve ark., 2009, kayısı (*Prunus armeniaca*) çekirdeklerinden elde ettikleri kaba homojenata %30'luk $(NH_4)SO_2$ ile çöktürme yapmışlar ve 18,800 g'de santrifüjledikten sonra elde edilen çökeltiyi fosfat tamponunda (10 mM, pH 6,0) çözmüşler ve HNL kaynağı olarak kullanmışlardır. *Prunus armeniaca* hidroksinitril liyazını (*Pars*HNL) kullanarak büyük sübtitüentli aromatik aldehitlerden ve polisiklik aromatik aldehitlerden enantiyosaf siyanohidrinler sentezlemişlerdir. *Pa*HNL tarafından sentezlenen siyanohidrinlerin veriminin %68-82 ve enantiyomerik aşırılığının (ee) %0-99 değerleri arasında farklılık gösterdiğini rapor etmişlerdir. Enantiyosaf siyanohidrinlerin sentezlenmesi için diizopropileter/Na-sitrat tamponu (400 mM, pH4.0) bifazik reaksiyon ortamını kullanmışlardır. Sentezlenen ürünlerin analizi için kiral HPLC CHIRALCEL-OJ H kolonu kullanmışlardır. Bu çalışmada, hareketli faz olarak hekzan:2 propanol kullanılmış ve akış hızı 0,5-1,0 mL/dk olarak belirlenmiştir.

Tükel ve ark., 2010, *Prunus armeniaca* çekirdeklerinden hidroksinitril liyazı (*Pa*HNL) aseton ekstraksiyonu ve ardından %40'lık $(NH_4)_2SO_4$ ile kısmi

saflaştırmışlardır. Kısmi saflaştırılan *Pa*HNLEupergit C ve Eupergit C 250 L üzerine kovalent olarak immobilize etmişler ve bağlanan HNL miktarını her bir gram destek materyali için sırasıyla %81 ve %98 olarak hesaplamışlardır. *Pa*HNL'ın liyaz aktivitesi için belirlenen optimum koşullarda hesaplanan K_m ve V_{max} değerleri serbest *Pa*HNL için sırasıyla 2,23 mM ve 0,54 U/mg.prot.Eupergit C üzerine immobilize edilen *Pa*HNL için sırasıyla 1,6 mM ve 0,87U/mg prot. Eupergit C 250 L üzerine immobilize edilen *Pa*HNL için ise sırasıyla 1,03 mM ve 0,35 U/mg prot., olarak belirlemişlerdir. Serbest ve immobilize *Pa*HNL'ların 25 ve 50°C'deki termal kararlılıklarını karşılaştırmış ve immobilizasyonun *Pa*HNL'ın termal kararlılığını arttırdığını bildirmişlerdir. Serbest ve immobilize *Pa*HNL'ların karboligasyon aktivitelerini araştırmak için benzaldehit ve HCN kullanarak farklı pH ve sıcaklıklarda (R)-mandelonitril sentezlemişlerdir. Bütün *Pa*HNL örnekleri için en yüksek verim (%100) ve enantiyomerik aşırılığı (ee) (%99) pH 4,0 ve 5°C'de elde etmişlerdir. Ayrıca immobilize *Pa*HNL'ların liyaz ve karboligasyon aktivitelerine göre tekrar kullanımlarını incelemişler ve 10 defa kullanım sonrasında immobilize *Pa*HNL'ların (*R*)-mandelonitrili %99 ee ile sentezleyebildiğini bildirmişlerdir.

Ueatrongchit ve ark., 2010 ***Passiflora edulis*** yapraklarından hidroksinitril liyazı (*Pe*HNL) saflaştırmışlar ve karakterize etmişlerdir. *Pe*HNL'i saflaştırabilmek için sırasıyla %20-30 $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi, DEAE-Toyopearl, Bütil-Toyopearl, DEAE-Toyopearl(2. kez), Con-A Sefaroz ve Fenil Sefaroz kolon kromatoğrafilerini kullanmışlar ve *Pe*HNL'ı % 0,27 verimle 55 kat saflaştırmışlardır. *Pe*HNL'nin 15 kDa molekül ağırlığına sahip bir monomer olduğunu SDS-PAGE ile belirlemişlerdir. *Pe*HNL ile bifazik ortamda çeşitli aromatik ve alifatik aldehitler kullanarak substrat çeşitliliğini araştırmışlardır. *Pe*HNL'nin aktivitesinin sıcaklık, pH ve organik çözücü gibi parametrelerden etkilendiğini ve optimum sıcaklığın 10°C, pH'nın ise 4,0 olduğunu bildirmişlerdir. Belirlenen bu optimum koşullarda *Pe*HNL'nin metil-t-bütil eter, dibütil eter, hekzan ve diizopropil eter içerisinde kararlı olduğunu, 12 saat inkübasyon süresi sonrasında başlangıç aktivitesinin %80'ini koruduğunu, dietil eter ve etil asetatın ise uygun çözücüler olmadığını rapor etmişlerdir. Ayrıca sentezlenen siyanohidrinlerin enantiyomerik aşırılığının(ee) log*P* değeri 3,5'in altında olan organik çözücülerde daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ueatrongchit ve ark., bu

çalışmada optimum substrat konsantrasyonunu benzaldehit için 250 mM, aseton siyanohidrin için ise 900 mM olarak; optimum *Pe*HNL konsantrasyonunu ise 26,7 U/mL olarak belirlemişlerdir. Bu koşullarda (*R*)-mandelonitril %31,6 verim ve %98,6 ee değerleri ile sentezlenmiştir.

Fukuta ve ark., 2011, Japon kayısısından (*Prunus mume*) %30'luk $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi ve çeşitli kromatoğrafi basamaklarını (sırasıyla DEAE-Toyopearl, FenilToyopearl, DEAE-Toyopearl) uygulayarak hidroksinitril liyaz'ı (*Pm*HNL) %14,6 verimle 24,4 kat saflaştırmışlardır. Saflaştırdıkları *Pm*HNL'ının 58 kDa molekül ağırlığına sahip bir monomer olduğunu ve diğer *Rosaceae* ailesine ait HNL'lar gibi FAD içerdiğini belirlemişlerdir. *Pm*HNL'ın aktivitesinin iyodoasetik asit, 2-iyodoasetamid, Ag^+ ve Hg^{2+} tarafından inhibe edildiğini ve bu nedenle *Pm*HNL'ın aktif bölgesinde sistein aminoasitinin olduğunu bildirmişlerdir.

Solis ve ark., 2011, badem, erik, kırmızı erik, kiraz, meksika kirazı, kayısı, şeftali, sarı şeftali ve nektarin olmak üzere 9 *Prunus* türü meyvelerin çekirdeklerinden aseton ile ekstrakte ettikleri hidroksinitril liyazı (HNL) enzim kaynağı olarak kullanmışlardır. Bu HNL'ları çeşitli aldehitlere HCN eklenmesinde kullanmışlar ve aktivitelerini karşılaştırmışlardır. Elde edilen siyanohidrinlerin %verim ve enantiyomerik aşırılığını(ee) HPLC ile Chiracel OD kolonunda hareketli faz olarak hekzan:izopropanol (9:1,akış hızı:1.0 mL/dk) kullanarak belirlemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre kiraz ve meksika kirazının en iyi HNL kaynağı olduğunu, diğer türlerin HNL aktivitelerini ise benzer olduğunu bildirmişlerdir. Siyanohidrinlerin %ee ve %verim değerlerinin yapıdaki sübstitüente bağlı olduğunu ve bu sübstitüent *para*- pozisyonunda ise sentezlenen siyanohidrinin %ee ve %verim değerlerinin daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Bu doktora tez çalışması kapsamında;

1) Şimdiye kadar HNL kaynağı olarak kullanılmamış, yabani erik (*Prunus cerasifera*), zerdali (*Prunus pseudoarmeniaca*), badem (*Prunus amygdalus turcomenica*) olmak üzere üç yabani ve erik (*Prunus domestica*), kayısı (*Prunus armeniaca*) ve badem (*Prunus dulcis*) olmak üzere üç kültür formu meyvenin çekirdeklerinden HNL saflaştırılması,

2) Saflaştırılan HNL'ların Eupergit CM üzerine kovalent olarak immobilize edilmesi,

3) HNL'lar çapraz bağlı enzim agregatları oluşturma yöntemiyle HNL agregatları (HNL-CLEA) şeklinde immobilize edilmesi,

4) Serbest, kovalent olarak immobilize edilmiş ve CLEA yöntemiyle immobilize edilmiş HNL'ların, kinetik özellikleri (K_m, V_{max}, k_{cat}/K_m), termal kararlılıkları, depolama kararlılıkları ve tekrar kullanım kararlılıkları belirlenerek birbirleriyle kıyaslanması,

5) Serbest ve immobilize HNL'ların rasemik siyanohidrinlerin kinetik rezolüsyonu reaksiyonu için kullanımları karşılaştırmalı olarak araştırılması,

6) Serbest ve immobilize HNL'lar kullanılarak birçok enantiyosaf bileşiğin sentezlenmesinde öncü bileşik olan (*R*)-mandelonitril; noradrenalinin sentezinde öncü bileşik olan (*R*)-3,4-dihidroksimandelonitril; oral antikoagülan olarak bilinen (*R*)-2-kloromandelik asit sentezinde öncü bileşik olan (*R*)-2-kloromandelonitril; ve anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri olarak bilinen lizinopril, silazapril, enalapril, benazepril gibi bileşiklerin sentezinde öncü bileşik olan (*R*)-2-hidroksi-4-fenilbütironitril ilgili aldehitler ve HCN kullanılarak serbest ve immobilize HNL'lar tarafından katalizlenen reaksiyonlar ile sentezlenmesidir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Meyve Çekirdeklerinin Toplanması

Gaziantep-Nizip bölgesinde acıbadem (*Prunus amygdalus turcomenica)* tam olgunluk zamanı olan Ağustos ayında; Mersin-Mut bölgesinde doğal olarak yetişen zerdali (*Prunus pseudoarmeniaca*) Haziran ayında; Pozantı-Adana bölgesinde yabani erik (*Prunus cerasifera*), kültür formu erik stanley (*Prunus domestica*), kayısı (*Prunus armeniaca*) ve badem (*Prunus dulcis*) meyveleri Ağustos ayında toplanmıştır. Çekirdekler meyve kısımlarından çıkarılmış ve kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Kimyasallar

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Merck veya Sigma-Aldrich firmalarından sağlanmıştır.

Eupergit CM (partikül büyüklüğü 50-300 μm, oksiran içeriği 600-800 μmol/g), amonyum sülfat, sodyum hidroksit, bakır (II) sülfat, folin-ciocalteu çözeltisi, Coomassie Brillant Blue G 250, moleküler eleme kromatoğrafisi için standart proteinler (Sigma, SDS7B2), elektroforez için standart proteinler (Fermantas, SM 1811), etil alkol, sodyum sitrat, sığır serum albümin, glutaraldehit, aseton, Biosuite 250 HR kolonu, rasemik mandelonitril, benzaldehit, 3,4-dihidroksibenzaldehit, 3-fenil propiyonaldehit, potasyum siyanür (KCN), amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$), sodyum klorür (NaCI), sodyum hidroksit (NaOH), glasiyel asetik asit, fosforik asit (%85,v/v), hidroklorik asit (%37,v/v), hekzan, 2-propanol, tersiyer bütil metil eter (TBME), dimetil sülfoksit (DMSO).

3.1.3. Araç ve Gereçler

UV-Vis spektrofotometre (Shimadzu UV-1800), HPLC (Shimadzu, Classs Vp serisi), Diyod array dedektör (Shimadzu, SPD M20A), FT-IR (PerkinElmer, Spectrum RX I FT-IR System), NMR (Bruker Ultrashield Plus Biospin, Avance III 400 MHz), Termal gravimetrik analiz cihazı (PerkinElmer TGA 7), Nucleocel Delta kiral HPLC kolonu (4,6x250 mm), Biosuite 250 HR moleküler eleme kolonu (7,8x300 mm), HiPrep 16/10 Butil FF kolonu (1x20 cm) hidrofobik etkileşim kolonu, Econo pump gradient pompa ve fraksiyon kollektörü (Biorad), pH metre (HANNA 8417), magnetik karıştırıcı, inkübatör (ES 500), santrifüj, analitik terazi, otomatik pipet, girdap karıştırıcı, termostatlı çalkalayıcılı su banyosu, kriyostat, magnetik karıştırıcı, otomatik pipet.

3.2. Metod

3.2.1. HNL'ın Meyve Çekirdeklerinden Saflaştırılması

3.2.1.1. Çekirdeklerin Homojenizasyonu ve Amonyum Sülfat ile Çöktürme

Sert kabuklarından çıkartılan çekirdek içlerinin her 1 gramına 5 mL -20°C'ye kadar soğutulmuş aseton eklenerek örnekler homojenize edilmiş ve homojenat su trompu yardımıyla vakum altında süzülmüştür. Böylece aseton ile birlikte fenolik bileşikler ve bazı lipitler de süzüntü ile birlikte uzaklaştırılmış olmaktadır. Filtre kağıdının üstünde kalan kısım tekrar blender haznesine alınarak işlem yukarıda anlatıldığı şekilde 2 kez tekrarlanmıştır. Son süzme işlemi sonucunda süzgeç kağıdında kalan katı ekstrakt asetonun uçurulması amacıyla 24 saat 5°C bekletildikten sonra amonyum sülfat çöktürmesi için kullanılmış veya daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

Aseton ekstraksiyonu işlemi sonucunda edilen katı ekstraktın her 1 gramı 10 mL fosfat tamponu (50 mM, pH 6,2) içerisinde çözüldükten sonra elde edilen çözelti, 12000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanta %20-40'lık amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır. $(NH_4)_2SO_4$

çöktürmeleri sonunda elde edilen her bir çökelti ve süpernatantın HNL aktiviteleri ve protein miktarları Bradford (1976) yöntemiyle ölçülmüştür.

3.2.1.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

HNL'ın hidrofobik etkileşim kromatografisi (HEK) ile ayrıştırılmasında dolgu maddesi olarak butil sefaroz içeren HiPrep 16/10 Butil FF kolonu (1x20 cm) kullanılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen çökelti, 50 mM fosfat tamponu (pH 6,2) içerisinde çözülerek hidrofobik etkileşim kromatoğrafisine uygulanmıştır. HNL'ın kolondan alınması için %40-0 (w/v) aralığında farklı derişimlerde amonyum sülfat içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 6,2) kolondan geçirilmiş ve toplanan eluatların 280 nm'deki absorbans değerlerine bakılmıştır. Protein içeren örneklerde HNL aktivitelerine bakılarak, HNL içeren elüatlar biraraya getirilmiştir.

3.2.1.3. Moleküler Eleme Kromatografisi

HNL'ın moleküler eleme kromatografisi ile ayrıştırılmasında 10-4000 kDa aralığındaki globüler proteinleri ayırabilen Sefaroz 6B dolgu materyali içeren kolon (1,5x27 cm) kullanılmıştır. Kolon 100 mL fosfat tamponu (50 mM, pH 7,0) ile yıkanarak dengeye getirilmiş ve daha sonra hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi sonrasında elde edilen ve yüksek HNL aktivitesi içeren fraksiyonlar moleküler eleme kolonuna yüklenmiştir. Proteinin kolondan alınması için 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) kullanılmıştır. Toplanan eluatların 280 nm'de absorbanslarına bakılmış ve protein içeren örnekler HNL aktivitesi için analiz edilmiştir.

3.2.1.4. Protein Tayini

Saflaştırılma işlemleri sırasında HNL örneklerinin protein miktarları Bradford yöntemi (1976) ile belirlenmiştir. İmmobilizasyon işlemlerinde ise immobilize

olmayan protein miktarlarını belirlemek için ise Lowry (1951) protein tayini yöntemi kullanılmıştır.

3.2.1.5. HNL'ın Liyaz Aktivitesinin Belirlenmesi

HNL'ın liyaz aktivitesinin belirlenmesinde literatürde Tükel ve ark., (2010) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Özetle, 2,85 mL 100 mM asetat tamponu içerisine (pH 5,5) %95'lik etil alkol içerisinde hazırlanmış rasemik mandelonitril çözeltisinin (30 mM) 50 µL'si ilave edilmiştir. Reaksiyon, HNL içeren çözeltinin 100 µL'sinin ilavesi ile 25 °C'de başlatılmıştır. 10 dk reaksiyon süresi sonunda reaksiyon tüpünden alınan 500 µL örnek 50 mM asetat tamponu (pH 4,0) ile 3 mL'ye seyreltilmiş ve açığa çıkan benzaldehitin absorbansı 50 mM asetat tamponuna (pH 4,0) karşı 250 nm'de ölçülmüştür (OD_e). Mandelonitrilin 250 nm'de verdiği absorbansın (OD_b) belirlenmesi için 2,95 mL 50 mM asetat tamponu (pH 5,5) üzerine 50 µL mandelonitril çözeltisi ilave edilmiş, proteinden kaynaklanan absorbansın (OD_p) belirlenmesi için ise 2,90 mL 50 mM asetat tamponu (pH 5,5) üzerine 100 µL HNL örneği eklenmitir. Her iki örneğin absorbansı 250 nm'de ölçülmüştür. Buna göre HNL aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Aktivite (U/mL)} = \frac{\Delta OD}{\varepsilon \times t} \times \frac{V_t}{V_e} \qquad \Delta OD = OD_e - (OD_b + OD_p)$$

ε: Benzaldehitin 250 nm'deki ekstinksiyon katsayısı

t: Reaksiyon süresi (dk)

V_t: Reaksiyon karışımının toplam hacmi (mL)

V_e : Kullanılan enzim çözeltisinin hacmi (mL)

3.2.1.6. Denatüre edici olmayan (Native) PAGE Elektroforezi

Saflaştırılan HNL'ların Native-PAGE elektroforezleri için Laemmli tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır (Laemmli, 1970). Native-PAGE elektroforezi

sonrasında protein bantlarının görünür hale getirilebilmesi için ise Blum ve ark. (1987) tarafından bildirilen yönteme göre gümüş boyama tekniği kullanılmıştır.

3.2.1.7. Moleküler Ağırlığın Belirlenmesi

HNL'ın moleküler ağırlığı HPLC ile Biosuite 250 HR moleküler eleme kolonu (5 μm, 7,8x300 mm) kullanılarak Diyot Array Dedektör (DAD) ile 220 nm'de belirlenmiştir. Hareketli faz olarak akış hızı 1 mL/dk olan 300 mM NaCl içeren fosfat tamponu (100 mM, pH 7,0) kullanılmış ve analiz boyunca kolon sıcaklığı 30 °C'de sabit tutulmuştur. Standart protein grafiğinin çizilmesinde moleküler ağırlıkları 26,6 kDa olan triozfosfat izomeraz, 36,5 kDa olan laktat dehidrojenaz, 48,5 kDa olan fumaraz, 58,5 kDa olan piruvat kinaz, 90 kDa olan laktoferrin, 116 kDa olan β-galaktozidaz ve 180 kDa olan α2-makroglobulin standart proteinleri kullanılmıştır.

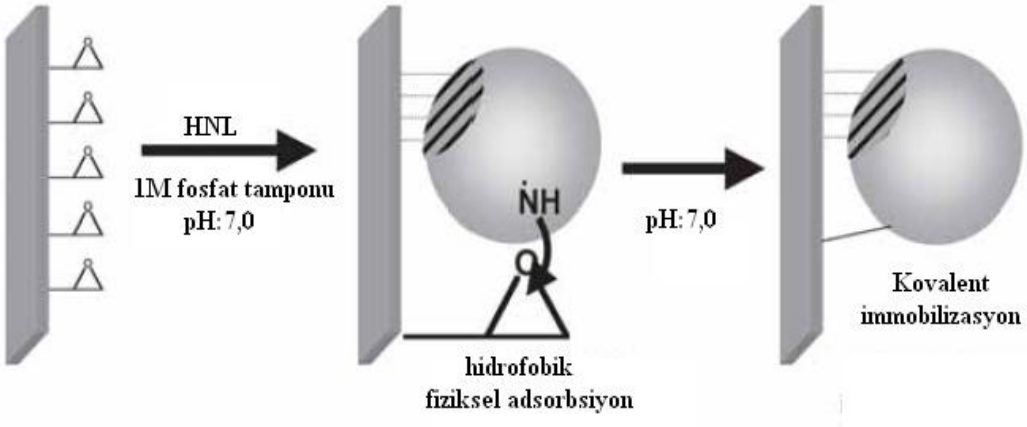
3.2.1.8. SDS-PAGE Elektroforezi

Saflaştırılan HNL'ların SDS-PAGE elektroforezleri için Laemmli tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır (Laemmli, 1970). Üst ve alt jelin konsantrasyonları sırasıyla %5 ve 15 olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.2.2. HNL'ların Eupergit CM Üzerine Kovalent İmmobilizasyonu

Saflaştırılan HNL örnekleri Eupergit CM üzerine Mateo ve ark. önerdiği yönteme göre ayrı ayrı immobilize edilmişlerdir (Mateo ve ark., 2000). Kısaca, 1 g Eupergit CM üzerine derişimi 1 mg/mL olacak şekilde 1 M fosfat tamponu (pH 7,0) içerisinde hazırlanmış HNL çözeltisinin 9 mL'si ilave edilmiştir (Şekil 3.1). İmmobilizasyon işlemi oda sıcaklığında çalkalayıcı su banyosunda hafifçe çalkalayarak 24 saat süresince devam ettirilmiştir. Süre sonunda immobilize HNL örnekleri süzgeç kağıdından süzülmüş ve immobilize enzim preparatları süzüntüde protein olmayıncaya kadar saf su ile yıkanmıştır. İmmobilize HNL örnekleri

kullanılıncaya kadar soğutmalı inkübatörde 5 °C'de saklanmıştır. Bu immobilize enzim örneklerinin su içeriği termal gravimetrik analiz yöntemi ile belirlenmiş ve gram destek başına yaklaşık %15 olarak hesaplanmıştır. Bu şekilde hazırlanmış immobilize HNL örnekleri depolama kararlılığı ölçümlerinde kuru HNL preparatları olarak adlandırılmıştır.

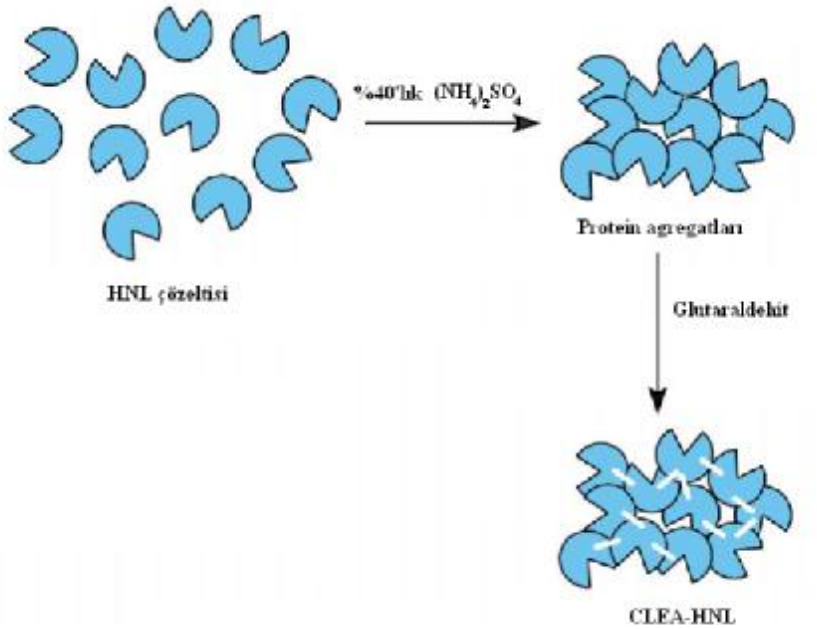


Şekil 3.1. HNL'ın Eupergit CM üzerine kovalent immobilizasyonu.

3.2.3. HNL'ın CLEA Oluşturularak İmmobilizasyonu

HNL'ların CLEA oluşturularak immobilizasyonu için Sheldon ve ark. tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır (Sheldon ve ark., 2006). Meyve çekirdeklerinden aseton ile çöktürme sonucu elde edilen katı ekstraktın her 1 gramına 5 mL 50 mM pH 6,2 fosfat tamponu eklenmiş ve 40-45 dk karıştırıldıktan sonra 12000 rpm'de 20 dk santrüfüj edilmiştir. Santrüfüj sonrası alınan süpernatanta %40'lık amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ve çökelti 5 mL tampon ile (50 mM pH 6,2 fosfat tamponu) çözülmüştür. Bu şekilde elde edilen HNL çözeltisine derişimi %40 olacak şekilde katı amonyum sülfat eklenmiş, sonrasında 1,5 mL glutaraldehit (%25'lik, v/v) eklenerek 5°C'de 17 saat boyunca çalkayıcılı su banyosunda tutulmuştur. Oluşan CLEA örnekleri üzerine 3 mL soğuk aseton eklenerek, iyice çalkalandıktan sonra aseton fazı dökülmüştür. Daha sonrasında CLEA örneklerine 2 mL eter eklenmiş, çalkalandıktan sonra HNL-CLEA'lar süzülmüştür (Şekil 3.2). Elde edilen immobilize HNL-CLEA'lar süzüntüde glutaraldehit kalmayıncaya kadar saf su ile yıkanmıştır. Süzüntüde glutaraldehit varlığı Boratynski ve Zal (1990)

tarafından önerilen yönteme göre belirlenmiştir. Elde edilen HNL-CLEA örnekleri kullanılıncaya kadar 5°C'de saklanmıştır. HNL-CLEA örneklerinin su içeriği termal gravimetrik analiz yöntemi ile belirlenmiş ve gram destek başına yaklaşık %15 olarak hesaplanmıştır. Bu şekilde hazırlanmış immobilize HNL örnekleri depolama kararlılığı ölçümlerinde kuru HNL preparatları olarak adlandırılmıştır.



Şekil 3.2. HNL'ın CLEA şeklinde immobilizasyonunun şematik gösterimi.

3.2.4. Serbest HNL'ların, HNL-Eupergit CM'lerin ve HNL-CLEA'ların Optimum Aktivite Gösterdiği Koşulların, Kinetik Parametrelerinin, Termal ve Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi

Serbest HNL'ların, HNL-Eupergit CM'lerin ve HNL-CLEA'ların aktiviteleri üzerine pH'nın etkisini araştırmak için pH 4,0, 4,5, 5,0 ve 5,5 (50 mM asetat tamponu), pH 6,0 (50 mM sitrat tamponu), pH 6,5 ve 7,0 (50 mM fosfat tamponu)' de aktivite ölçümleri yapılmış ve maksimum aktivite gösterdikleri pH değerleri belirlenmiştir.

Sıcaklığın aktiviteye etkisi, her bir enzim örneğinin maksimum aktivite gösterdiği pH'da ve 10-40 ºC'de aralığındaki farklı sıcaklıklarda HNL örneklerinin aktiviteleri ölçülerek belirlenmiştir.

Tüm örnekler için belirlenen optimum koşullarda 0,1-2,0 mM rasemik mandelonitril derişimlerinde aktiviteleri belirlenmiş ve elde edilen bulgulara göre Sigma Plot Enzim Kinetik Modül Proğramı kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiklerinden yararlanılarak Michealis-Menten sabitleri (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri hesaplanmıştır.

Tüm örneklerin termal kararlılıklarının belirlenmesi için HNL örnekleri 25 ve 50 °C'de 1, 4, 8 ve 16 saat bekledikten sonra örneklerin kalan aktiviteleri ölçülmüş ve kalan aktiviteleri (% olarak) hesaplanmıştır.

Tüm enzim preparatlarının depolama kararlılıklarının belirlenmesi için serbest HNL örnekleri 50 mM pH 6,2 fosfat tamponunda 5 ˚C'de ve oda sıcaklığında bekletilerek belirli günlerde aktiviteleri ölçülmüştür. İmmobilize HNL örnekleri ise 50 mM pH 6,2 fosfat tamponunda veya kuru HNL preparatları halinde 5 ˚C'de ve oda sıcaklığında bekletilerek belirli günlerde aktiviteleri ölçülmüş ve depolama süresine bağlı olarak bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır.

3.2.5. İmmobilize HNL'ların Kesikli ve Sürekli Reaktör Sistemlerinde Kullanılması

İmmobilize HNL örneklerinin kesikli reaktörde kullanımının araştırılmasında çapı 1,5 cm, uzunluğu 6 cm olan kolonlar kullanılmıştır. İmmobilize HNL örneklerinden 5, 10 ve 20 mg kolona yüklenerek üzerine 2,95 mL asetat tamponu (50 mM, pH 5,5) ve etanol içerisinde hazırlanmış 50 μL rasemik mandelonitril çözeltisi (30 mM) eklenmiştir. 10 dk. reaksiyon süresi sonunda çözelti kolondan hızla uzaklaştırılmış ve absorbansları 250 nm'de ölçülmüştür. Bu işlem immobilize HNL örneğinin başlangıç aktivitesinin %50'si kalana kadar tekrarlanmıştır. İmmobilize HNL örneklerinin kesikli reaktör sistemlerinde kullanılabilirliğinin araştırılması için 5, 10 ve 20 mg enzim miktarları kullanılarak bağıl aktiviteleri ve toplam enzim için elde edilen toplam aktivitesi (prodüktivite) hesaplanmıştır.

Michaelis-Menten kinetiği gösteren bir enzim için substrat/enzim inhibisyonun olmadığı, geri dönüşümsüz reaksiyonlarda, izotermal koşullarda prodüktivite aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır (Wiseman, 1986).

$$XS - K_m In(1 - X) = \frac{KEp}{V}$$

KE: Reaktördeki toplam enzimin maksimum aktivitesi (mmol/dk.)

K_m: İmmobilize enzimin Michealis-Menten hız sabiti (mM)

V*:* Reaktörün çalışma hacmi (L)

π: İşlem süresi (dk.)

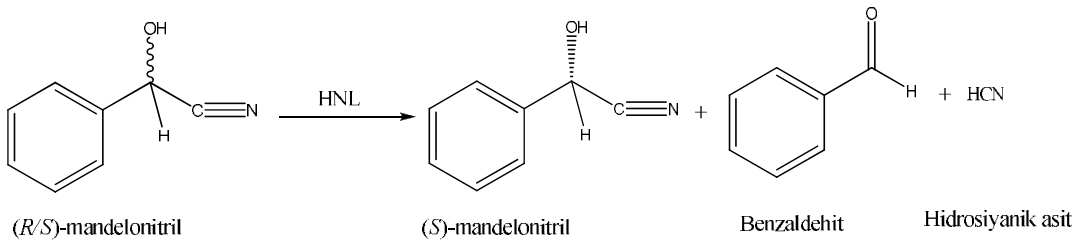
X: Dönüşüm oranı, $(S-S_t)/S$, S substratın başlangıç derişimi, S_t ise t zaman sonundaki kalan substrat derişimi

İmmobilize HNL örneklerinin sürekli reaktörde kullanımı için 2,0 mm çapında ve 15 cm uzunluğunda cam kolon reaktör olarak kullanılmıştır. Bio-Rad Econo Gradient Pompa ile belirli akış hızlarında (0,1, 0,5 ve 1,0 mL/dk) farklı etanol/tampon karışımlarında (25/70, 50/50 ve 75/25, v/v) hazırlanmış substrat çözeltisi 5, 10 ve 20 mg immobilize HNL içeren kolona gönderilmiştir. Kolondan çıkan çözeltideki benzaldehitin absorbansı 10 dk aralıklarla UV-Vis Spektrofotometrede ölçülmüştür.

3.2.6. HNL Örneklerinin Kullanımı İle Rasemik Mandelonitrilin Kinetik Rezolusyonu

Serbest HNL, HNL-Eupergit CM ve HNL-CLEA örnekleri kullanılarak gerçekleştirilen rasemik mandelonitrilin kinetik rezolusyonu reaksiyonu (Şekil 3.3) Effenberger ve Schwammle (1996) tarafından önerilen yöntem esas alınarak gerçekleştirilmiştir 790 µL asetat tamponu (50 mM, pH 5,5) üzerine 200 µL HNL (ortalama 0,15 mg/mL) enzim örneği ilave edilmiş ve reaksiyon 10 µL rasemik mandelonitrilin (7,15 M) eklenmesiyle başlatılmıştır. Reaksiyon süresince sıcaklık 25 ºC'de sabit tutulmuştur. Reaksiyon karışımından belirli zaman aralıklarında (15,

30, 45, 60, 120 ve 240 dk) alınan 100 µL örnek üzerine 100 µL dietileter ve 400 µL hekzan ilave edilmiş ve organik faz kiral Nucleocel Delta kolonu (4,6 x 250 mm) kullanılarak 220 nm'de HPLC ile analiz edilmiştir. Hareketli faz olarak akış hızı 2,0 mL/dk olan, % 0,1 asetik asit içeren hekzan/izopropil alkol karışımı (96/4, v/v) kullanılmıştır. Analiz boyunca kolon sıcaklığı 25 ºC'de tutulmuştur.



Şekil 3.3. HNL'lar tarafından katalizlenen (*R/S*)-mandelonitrilin kinetik rezolusyonu.

(*S*)-mandelonitrilin enantiyomerik aşırılığı (ee) aşağıda verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\%ee=\frac{[(S)\text{-mandelonitril}]-[(R)\text{-mandelonitril}]}{[(S)\text{-mandelonitril}]+[(R)\text{-mandelonitril}]}\times 100$$

Reaksiyon veriminin hesaplanmasında ise başlangıçta ilave edilen (*R*)-mandelonitrilin mol miktarından (R_0) reaksiyon sonrasında kalan (R)-mandelonitrilin mol miktarı (R_t) HPLC'de elde edilen pikin alanından bulunmuş ve verim aşağıda verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\%verim=\frac{(R)_0-(R)_t]}{(R)_0}\times 50$$

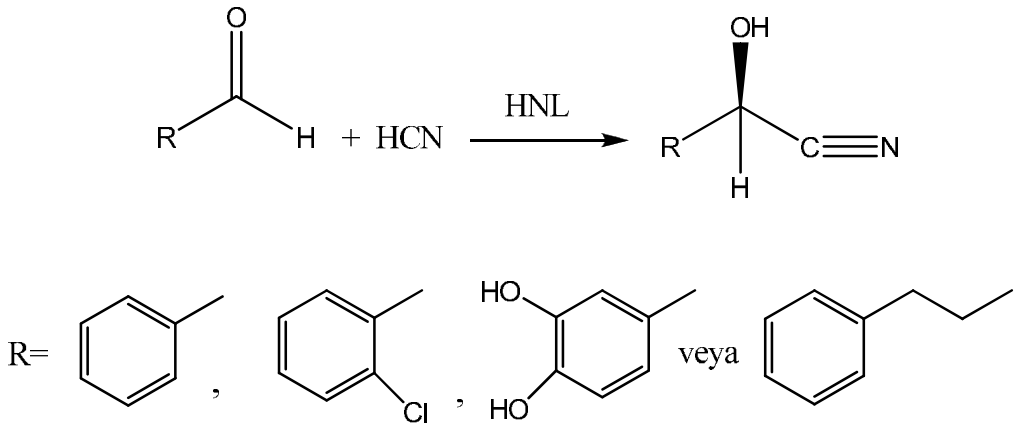
3.2.7. Mandelonitril, 2-kloromandelonitril, 3,4-dihidroksimandelonitril ve 2-hidroksi-4 fenilbütironitrilin Kimyasal Sentezi

Analizlerde referans bileşikler olarak kullanılacak olan 2-kloromandelonitril, 3,4-dihidroksimandelonitril ve 2-hidroksi-4 fenilbütironitrilin sentezi Cabirol ve ark. (2006) tarafından önerilen yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Bir beher içerisine 0.15

mol (9,76 g) KCN tartılarak üzerine 15 mL saf su ile ilave edilmiş ve buz içerisinde soğutulmuştur. 0,1 mol aldehit örneğinin ilave edilmesiyle reaksiyon başlatılmış ve 5 ºC'de 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Süre sonunda reaksiyon karışımına 5 dakika aralıklarla ortam pH'sı 3'ün altına düşünceye kadar HCl (%37, w/w) ilave edilmiştir. Oluşan siyanohidrinler 20 mL etil asetat ilavesi ile organik faza alınmış ve organik faz ayırma hunisi yardımıyla sulu çözeltiden ayrılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanarak elde edilen organik fazlar bir araya getirilmiş ve organik faz vakum altında uzaklaştırılmıştır. Elde edilen siyanohidrinlerin karakterizasyonu HPLC, FT-IR ve NMR teknikleri kullanılarak yapılmıştır.

3.2.8. (*R*)-mandelonitril, (*R*)-2-kloromandelonitril, (*R*)-3,4-dihidroksi mandelonitril ve (*R*)-2-hidroksi-4-fenilbütironitrilin Enzimatik Sentezleri

HNL örnekleri kullanılarak (*R*)-mandelonitril, (*R*)-2-kloromandelonitril, (*R*)-3,4-dihidroksimandelonitril ve (*R*)-2-hidroksi-4-fenilbütironitrilin HNL katalizli sentezleri Tükel ve ark., (2010) önerdiği yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenmeye çalışılan enantiyosaf siyanohidrinlerin yapısı Şekil 3.4'de gösterilmiştir. Sentezlerde 500 µL sitrat tamponu üzerine (400 mM, pH 4,0), 100 µL HNL örneği (ortalama 0,15 mg/mL),100 µL DMSO içerisinde hazırlanmış 1 M aldehit örneği ve 1 mL TBME ilave edilmiştir. Reaksiyon 200 µL TBME içerisinde hazırlanmış 1M HCN ilavesi ile 5 ºC başlatılmıştır. 24 saat aralıklarla eter fazından alınan 100 µL örnek 400 µL hekzan ile seyreltilmiş ve kiral Nucleocel Delta kolonu kullanılarak 220 nm'de HPLC ile analiz edilmiştir. Hareketli faz olarak akış hızı 2,0 mL/dk olan % 0,1 asetik asit içeren hekzan/izopropil alkol karışımı (96/4, v/v) kullanılmıştır. Analiz boyunca kolon sıcaklığı 25 ºC'de tutulmuştur.



Şekil 3.4. HNL'lar kullanılarak sentezlenen enantiyosaf siyanohidrinlerin yapıları.

1 M HCN çözeltisinin hazırlanmasında Bhunya ve ark., (2009) önerdiği yöntem hullanılmıştır. 6,5 g KCN ve 0,1 g sitrik asit 100 mL saf su içerisinde çözülmüş ve üzerine çözeltinin pH'sı 4,0 oluncaya kadar %35'lik HCl ilave edilmiştir. Oluşan HCN TBME ile (2x50 mL) eter fazına alınmış ve 5 °C'de kahverengi şişe içerisinde kullanılıncaya kadar saklanmıştır. Hazırlanan HCN'in derişiminin belirlenmesinde Van Langen ve ark., (2003) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Hazırlanan HCN çözeltisinin 5 mL'sinin üzerine 25 mL NaOH çözeltisi (1 M) ilave edilmiş ve 2 dakika boyunca karıştırılmıştır. Çözeltinin üzerine küçük bir miktar potasyum kromat indikatör olarak ilave edildikten sonra 0,1 M $AgNO_3$ çözeltisi ile titre edilmiş ve HCN'nin derişimi hesaplanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

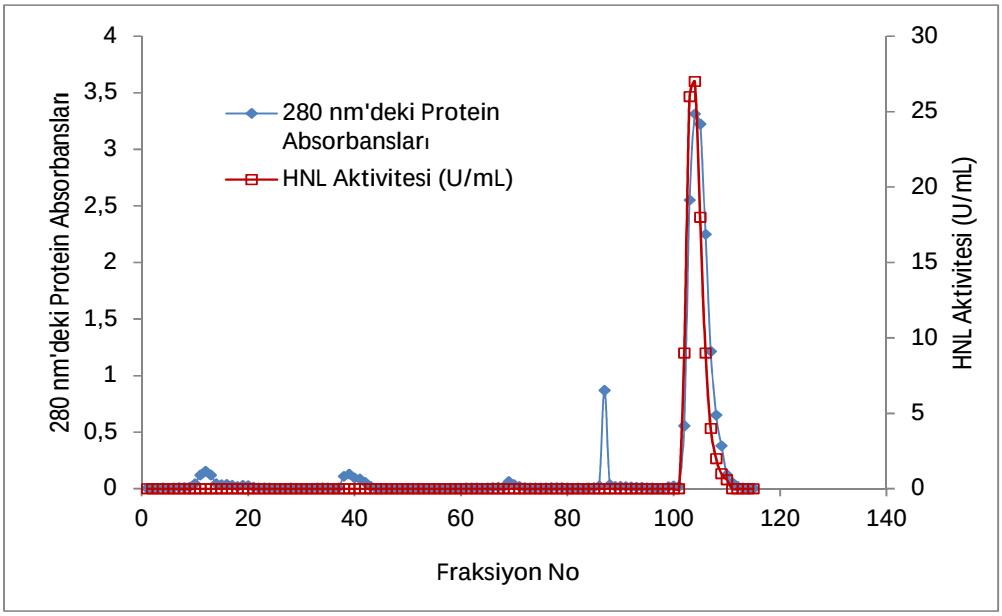
4.1. Serbest HNL'lar ile İlgili Bulgular

4.1.1. Çekirdeklerin Homojenizasyonu ve Amonyum Sülfat ile Çöktürme Bulguları

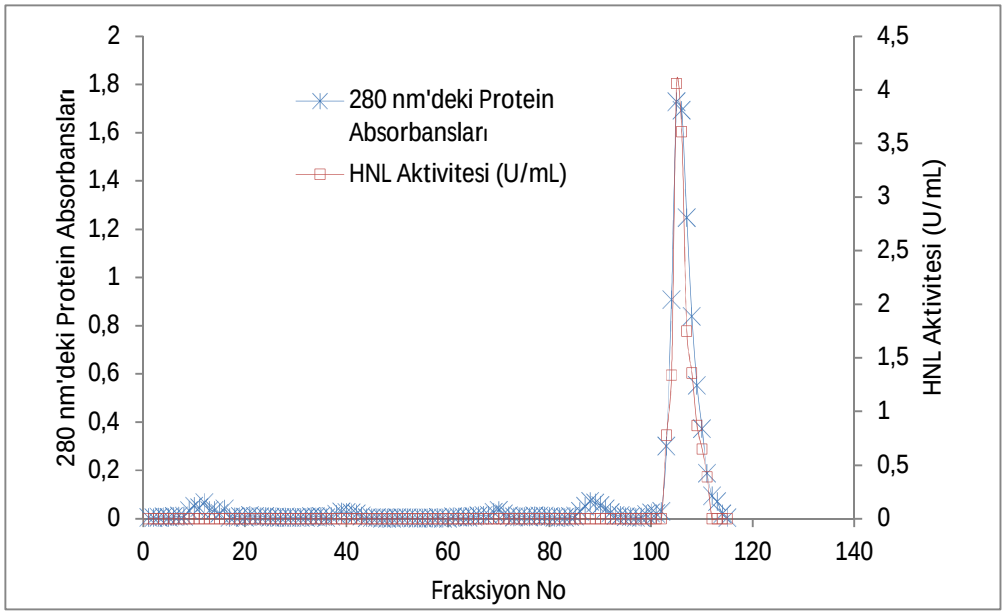
Aseton ekstraksiyonu sonrası elde edilen katı ekstraktın her 1 gramı 10 mL fosfat tamponunda (50 mM, pH 6,2) çözüldükten sonra $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi yapıldığında en yüksek HNL aktivitesinin %40'lık amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen çökeltide olduğu belirlenmiştir.

4.1.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi Bulguları

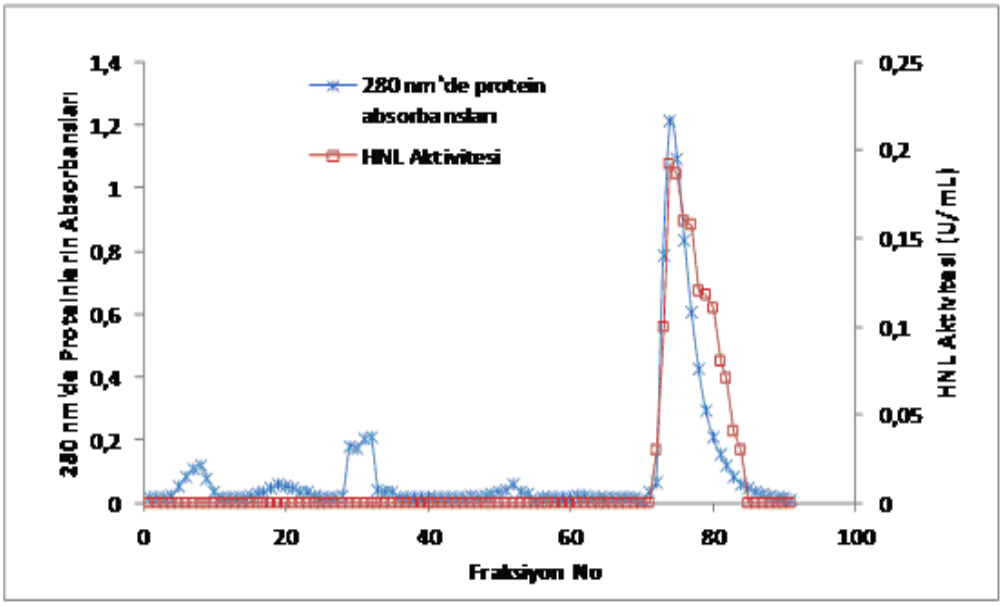
%40'lık amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen çökeltinin 50 mM fosfat tamponu (pH 6,2) içerisindeki çözeltisi hidrofobik etkileşim kromatografisine uygulanmış ve %40-0 amonyum sülfat içeren fosfat tamponu ile elüe edilen fraksiyonların 280 nm'deki protein absorbanslarına bakılmıştır. Absorbans veren eluatlarda HNL aktivitesi ölçülerek, HNL'ın tampon çözelti ile elüe edildiği belirlenmiştir. Kültür formu badem, acıbadem, kayısı, zerdali, doğal olarak yetişen yabani erik ve kültür formu erik HNL'ları için sonuçlar sırasıyla Şekil 4.1a-1f'de verilmiştir.



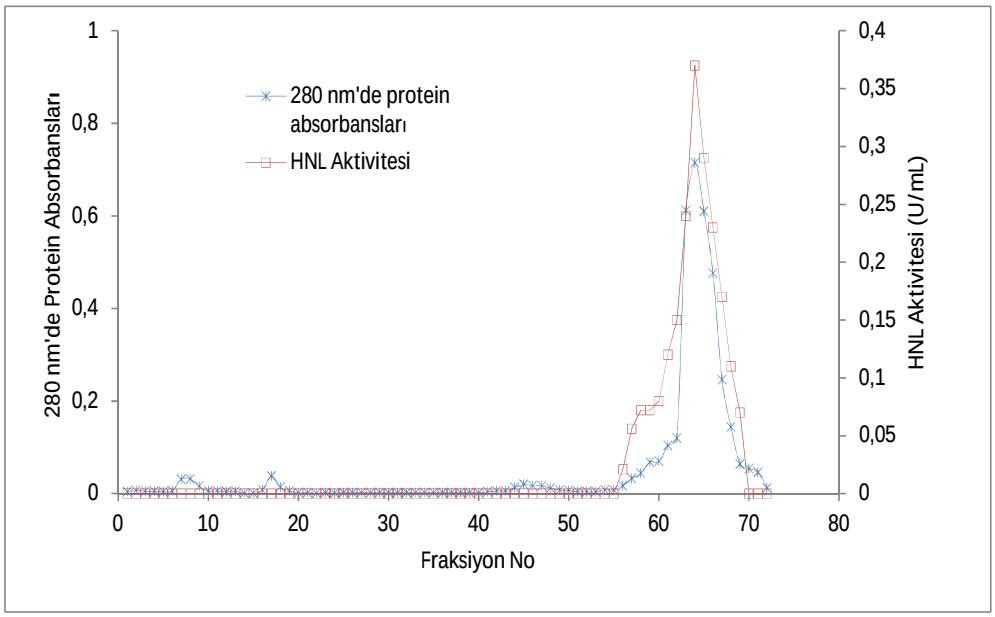
Şekil 4.la. Kültür Bademi (*Prunus dulcis*)-HNL için hidrofobik etkileşim kromatografisi sonuçları.



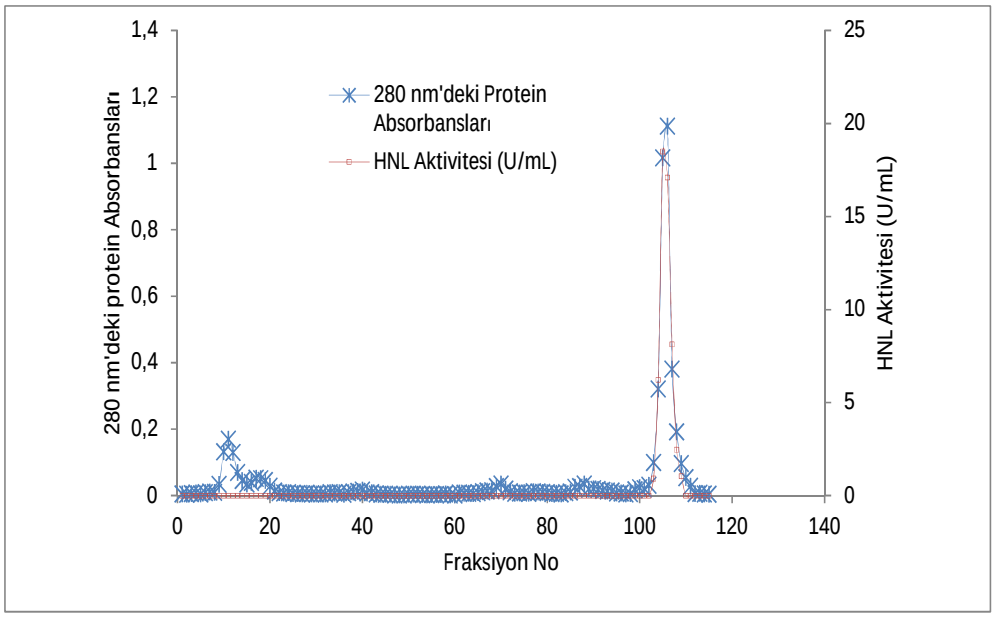
Şekil 4.lb. Acıbadem (*Prunus amygdalus turcomenica*)-HNL için hidrofobik etkileşim kromatografisi sonuçları.



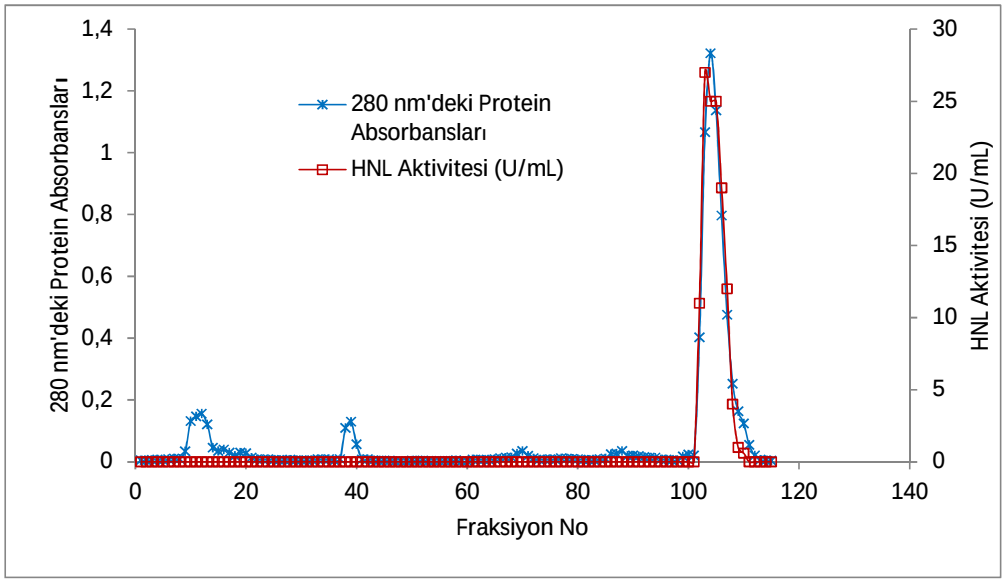
Şekil 4.lc. Kayısı (*Prunus armeniaca*)-HNL için hidrofobik etkileşim kromatografisi sonuçları.



Şekil 4.1d. Zerdali (*Prunus pseudoarmaniaca*)-HNL için hidrofobik etkileşim kromatografisi sonuçları.



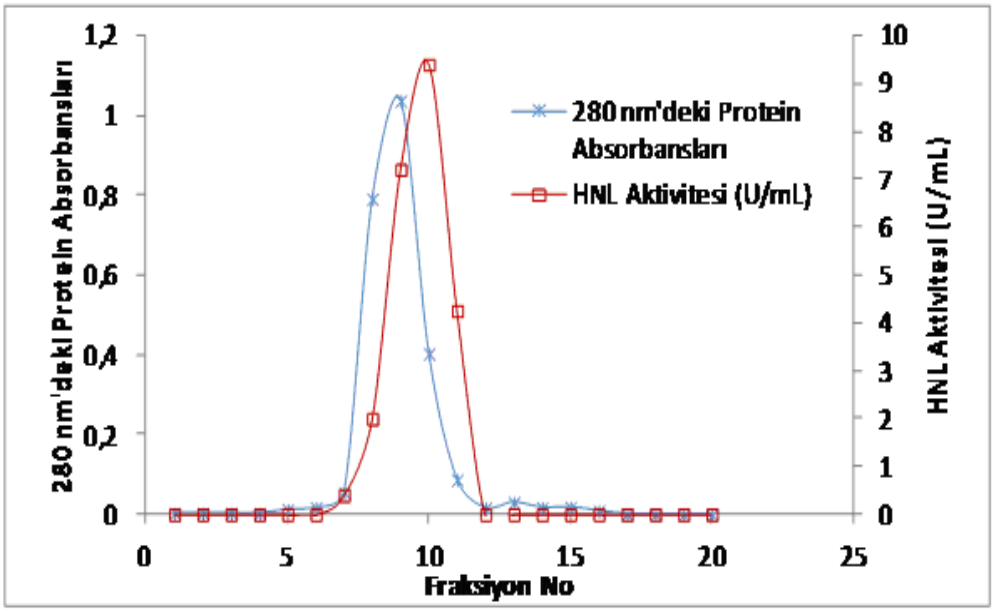
Şekil 4.le. Yabani Erik (*Prunus cerasifera*)-HNL için hidrofobik etkileşim kromatografisi sonuçları.



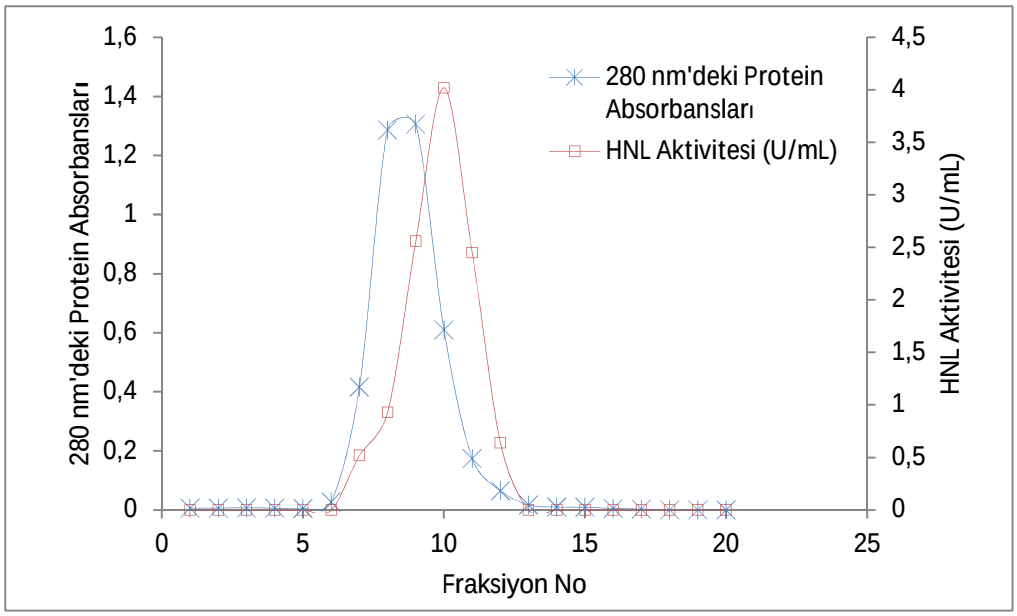
Şekil 4.lf. Kültür Eriği (*Prunus domestica*)-HNL için hidrofobik etkileşim kromatografi sonuçları.

4.1.3. Moleküler Eleme Kromatoğrafisi Bulguları

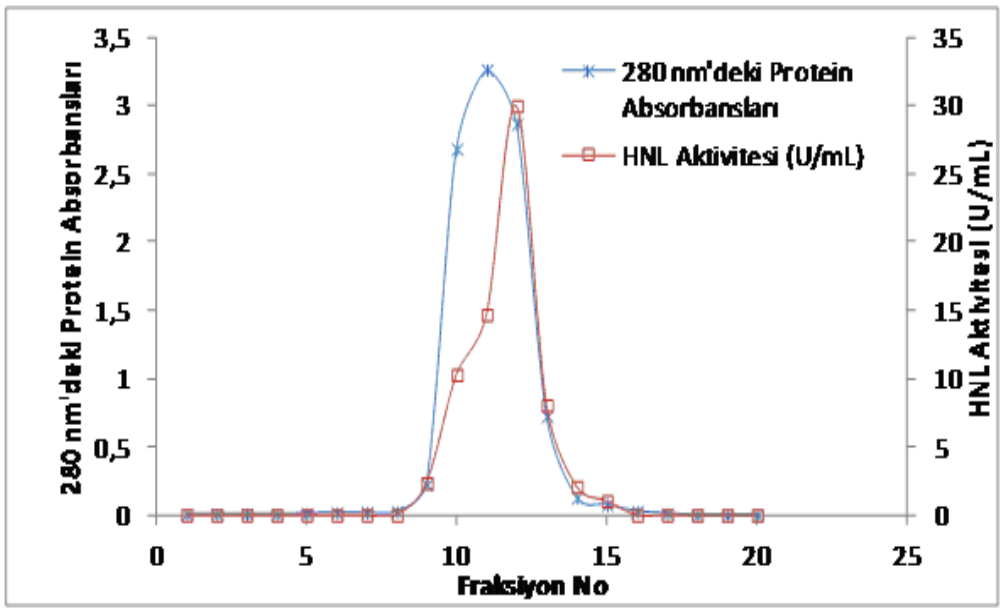
HNL'ın moleküler eleme kromatografisi ile saflaştırılması Bölüm 3.2.1.3.'de belirtildiği gibi yapılmıştır. Kültür formu badem, acıbadem, kayısı, zerdali, yabani erik ve kültür formu erik HNL'ları için moleküler eleme kromatoğrafisi sonrası elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 4.2a-2f'de şematik olarak gösterilmişlerdir.



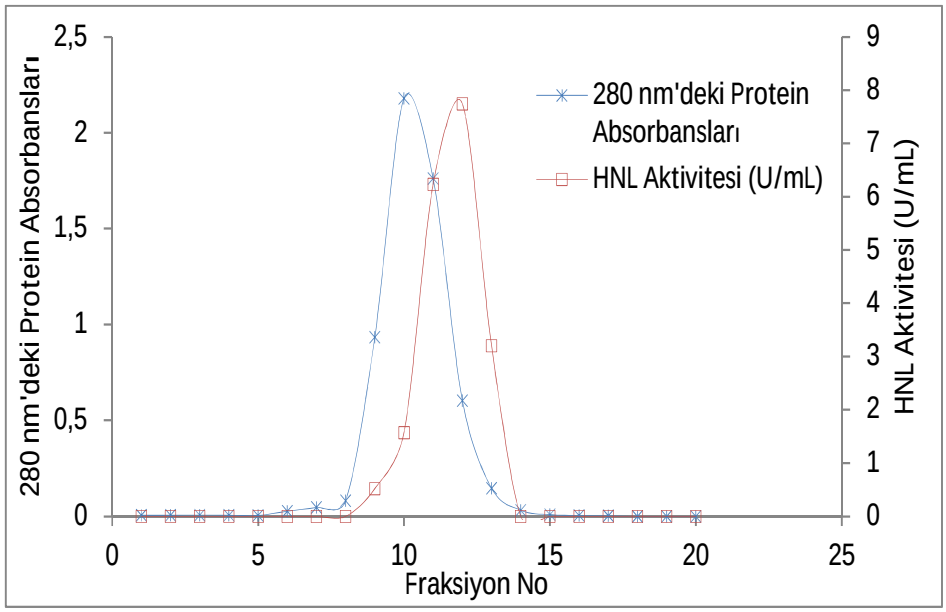
Şekil 4.2a. Kültür Bademi (*Prunus dulcis*)-HNL için moleküler eleme kromatografisi sonuçları.



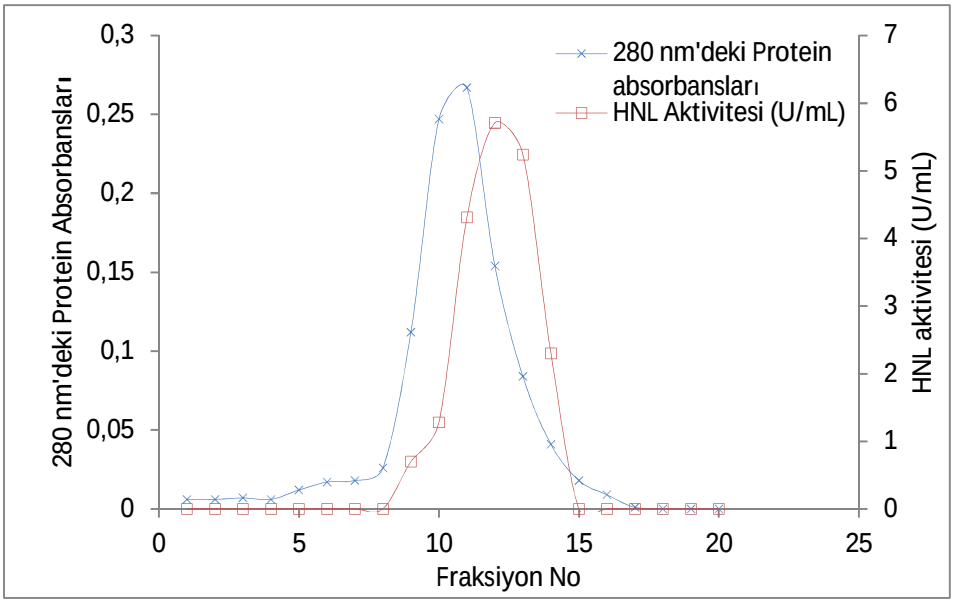
Şekil 4.2b. Acıbadem (*Prunus amygdalus turcomenica*)-HNL için moleküler eleme kromatografisi sonuçları.



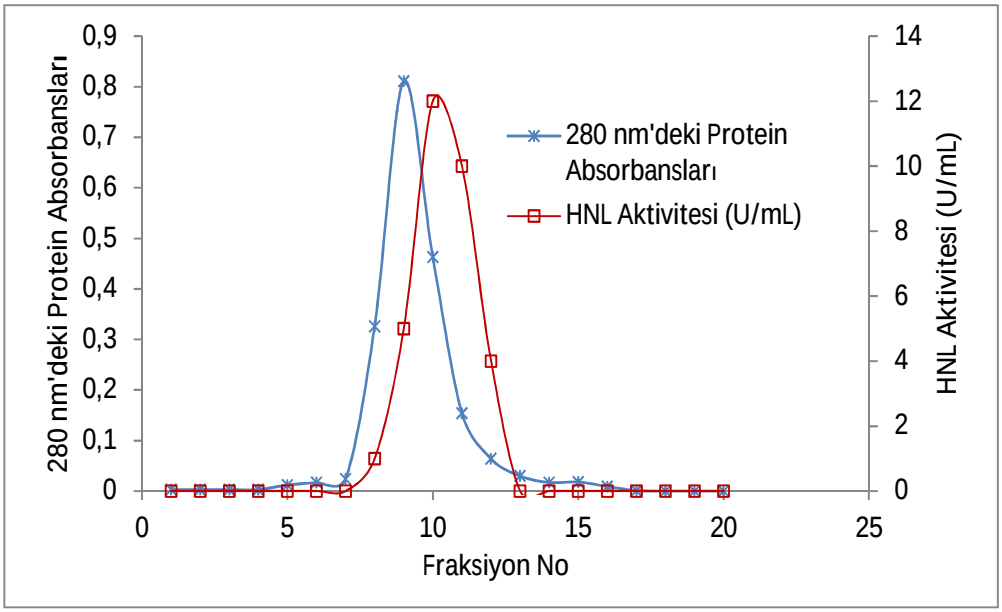
Şekil 4.2c. Kayısı (*Prunus armeniaca*)-HNL için moleküler eleme kromatografisi sonuçları.



Şekil 4.2d. Zerdali (*Prunus pseudoarmaniaca*)-HNL için moleküler eleme kromatografisi sonuçları.



Şekil 4.2e.Yabani Erik (*Prunus cerasifera*)-HNL için moleküler eleme kromatografisi sonuçları.



Şekil 4.2f. Kültür Erigi (*Prunus domestica*)-HNL için moleküler eleme kromatoğrafisi sonuçları.

Kültür formu badem, acıbadem, kayısı, zerdali, yabani erik ve kültür formu erik HNL'larının saflaştırılması ile ilgili sonuçlar sırasıyla Çizelge 4.1-4.6'da özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Kültür Bademi (*Prunus dulcis*)-HNL için saflaştırma sonuçları

Saflaştırma basamağı	Hacim (mL)	Akt. (U/mL)	Protein (mg/mL)	Top.Prot. (mg)	Top.Akt. (U)	Spesifik Akt. (U/mg prot.)	Verim (%)	Saflaştırma Oranı
Ham HNL ekstraktı	42	27	7	294	1134	3,8	100	1
%40 Amonyum sülfat çöktürmesi	24	38	5,6	134	912	6,8	80	1,8
Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonrası	29	17	0,7	20	493	24	43	6
Moleküler eleme kromatografisi sonrası	40	8	0,2	8	320	40	28	11

Çizelge 4.2. Acıbadem (*Prunus amygdalus turcomenica*)-HNL için saflaştırma sonuçları.

Saflaştırma basamağı	Hacim (mL)	Akt. (U/mL)	Protein (mg/mL)	Top.Prot. (mg)	Top.Akt. (U)	Spesifik Akt.(U/mg prot.)	Verim (%)	Saflaştırma Oranı
Ham HNL ekstraktı	37	19	6,7	248	703	2,8	100	1
%40 Amonyum sülfat çöktürmesi	24	22	4,8	115	528	4,6	75	1,6
Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonrası	27	5,4	0,3	8,1	146	18	21	6,4
Moleküler eleme kromatografisi sonrası	36	4	0,1	3,6	137	40	19	14

Çizelge 4.3. Kayısı (*Prunus armeniaca*)-HNL için saflaştırma sonuçları.

Saflaştırma basamağı	Hacim (mL)	Akt. (U/mL)	Protein (mg/mL)	Top.Prot. (mg)	Top.Akt. (U)	Spesifik Akt.(U/mg prot.)	Verim (%)	Saflaştırma Oranı
Ham HNL ekstraktı	42	15	6	276	630	2,5	100	1
%40 Amonyum sülfat çöktürmesi	20	23	7,5	150	460	3,1	73	2
Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonrası	21	17	0,5	12	357	34	57	14
Moleküler eleme kromatografisi sonrası	44	7,4	0,1	4,4	325	74	52	29

Çizelge 4.4. Zerdali (*Prunus pseudoarmaniaca*)-HNL için saflaştırma sonuçları.

Saflaştırma basamağı	Hacim (mL)	Akt. (U/mL)	Protein (mg/mL)	Top.Prot. (mL)	Top.Akt. (U)	Spesifik Akt.(U/mg prot.)	Verim (%)	Saflaştırma Oranı
Ham HNL ekstraktı	42	19	9,6	403	798	1,9	100	1
%40 Amonyum sülfat çöktürmesi	24	31,4	12	288	754	2,6	94	1,4
Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonrası	21	11,3	0,5	11	237	23	30	12
Moleküler eleme kromatografisi sonrası	29	8	0,2	6	232	40	29	21

Çizelge 4.5. Yabani Erik (*Prunus cerasifera*)-HNL için saflaştırma sonuçları.

Saflaştırma basamağı	Hacim (mL)	Akt. (U/mL)	Protein (mg/mL)	Top.Prot. (mg)	Top.Akt. (U)	Spesifik Akt.(U/mg prot.)	Verim (%)	Saflaştırma Oranı
Ham HNL ekstraktı	37	25,5	8	296	943	3	100	1
%40 Amonyum sülfat çöktürmesi	24	24	5,7	138	576	4,2	61	1,4
Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonrası	32	9,6	0,3	9,6	307	32	33	11
Moleküler eleme kromatografisi sonrası	48	5,12	0,12	5,7	246	43	26	14

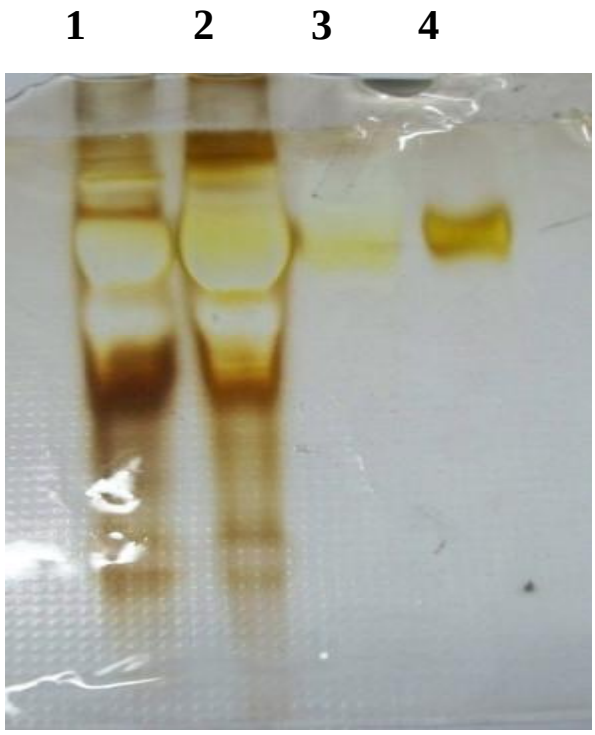
Çizelge 4.6. Kültür Eriği (*Prunus domestica*)-HNL için saflaştırma sonuçları

Saflaştırma basamağı	Hacim (mL)	Akt. (U/mL)	Protein (mg/mL)	Top.Prot. (mg)	Top.Akt. (U)	Spesifik Akt.(U/mL prot.)	Verim (%)	Saflaştırma Oranı
Ham HNL ekstraktı	44	24	12	528	1056	2	100	1
%40 Amonyum sülfat çöktürmesi	24	35	12,5	300	840	2,8	80	1,4
Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonrası	24	15,4	0,75	18	370	20,5	35	10
Moleküler eleme kromatografisi sonrası	36	10	0,25	9	360	40	34	20

Saflaştırma çalışmalarının sonuçlarının verildiği Çizelge1-6'dan da görüleceği gibi saflaştırma oranları kültür formu badem, acıbadem, kayısı, zerdali, yabani erik ve kültür eriği HNL'ları için sırasıyla 11, 14, 29, 21, 14 ve 20 kat olarak bulunmuştur.

4.1.4. Denatüre edici olmayan (Native) PAGE Elektroforezi Sonuçları

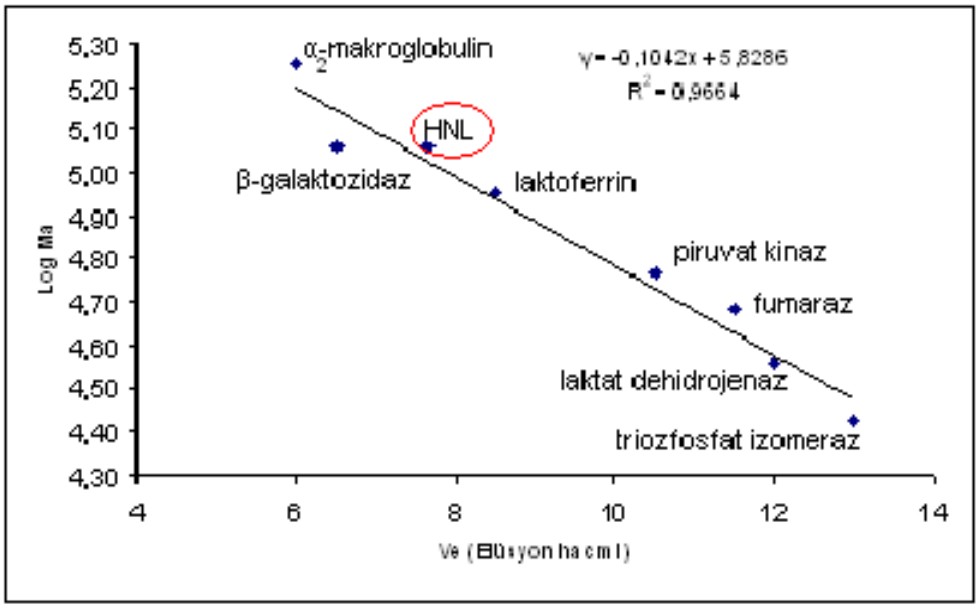
Şekil 4.3'de örnek olarak bir native PAGE sonucu verilmiştir. Soldan sağa doğru 1.sütun ham ekstraktın, 2. sütun %40 amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen çökeltinin çözündürülmesiyle elde edilen örneğin, 3. sütun hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi sonrasındaki örneğin ve 4. sütun ise moleküler eleme kromatoğrafisi sonrasındaki örneğin elektroforez sonuçlarını göstermektedir.



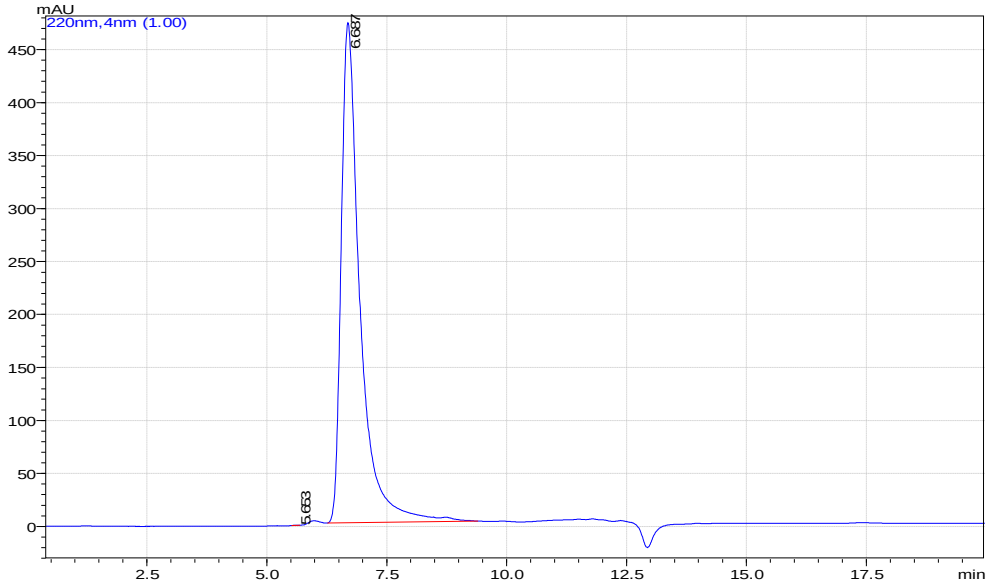
Şekil 4.3. HNL için örnek bir denatüre edici olmayan (Native) PAGE sonucu.

4.1.5. HNL'ın Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi Sonuçları

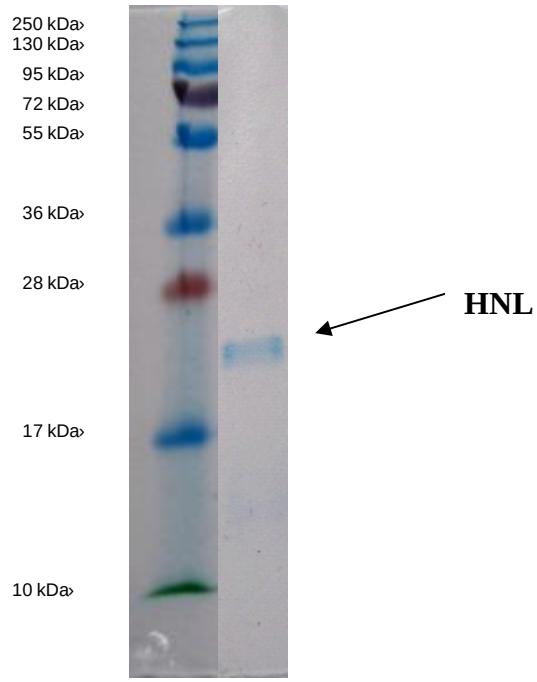
Altı çeşit HNL örneğinin hepsi için alıkonma zamanları aynı olarak bulunmuş ve standart protein grafiği kullanılarak HNL'ın moleküler ağırlığı yaklaşık 100 kDa olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4). Şekil 4.5'de kültür bademi HNL'ı için moleküler eleme kromatoğrafisi sonucu elde edilen kromatoğram örnek olarak verilmiştir. Saflaştırılan tüm HNL'ların her birinin yaklaşık 25 kDa ağırlığında özdeş 4 alt üniteye sahip oldukları SDS-PAGE sonuçlarına göre belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.4. Moleküler eleme kromatografisi için standart protein grafiği.



Şekil 4.5. HNL için örnek bir moleküler eleme kromatogramı.

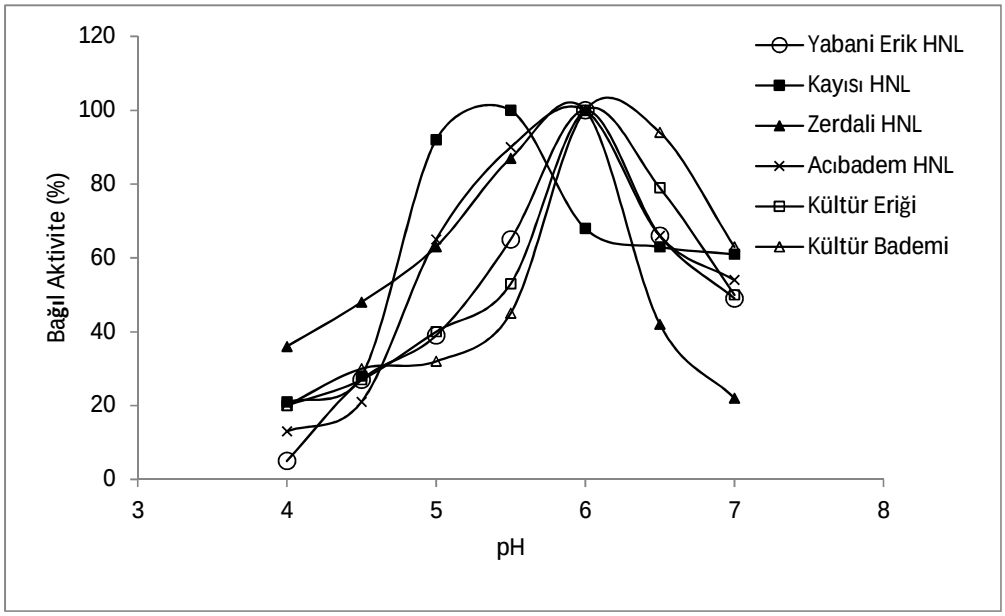


Şekil 4.6. HNL için örnek bir SDS-PAGE sonucu.

4.1.6. HNL'ların Karakterizasyonu İle İlgili Bulgular

4.1.6.1. Serbest HNL'ların Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular

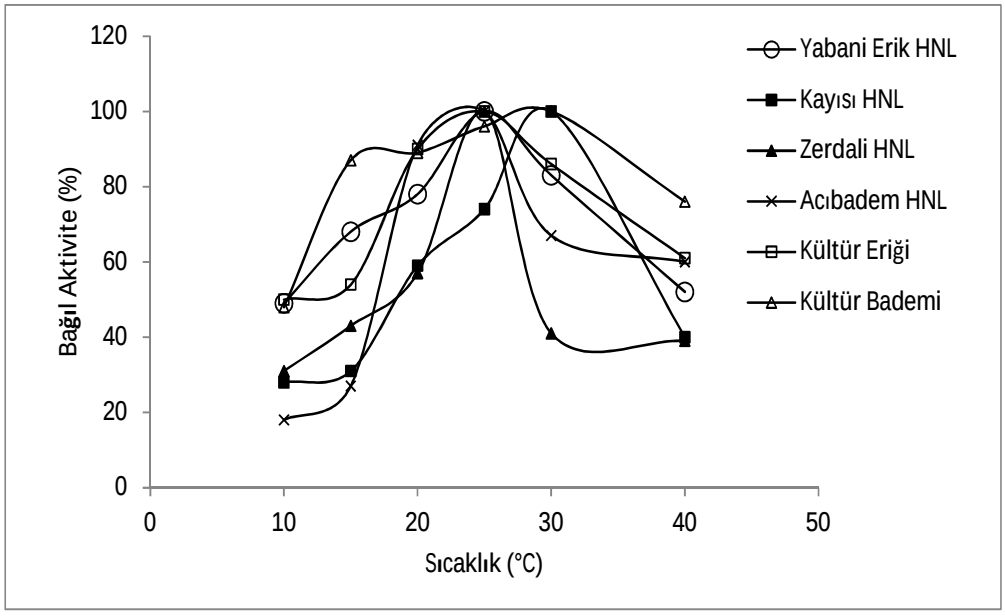
Şekil 4.7'den de görüldüğü gibi kayısı HNL'ı için maksimum liyaz aktivitesi pH 5,5'de, kültür formu badem, acıbadem, zerdali, yabani erik ve kültür formu erik HNL'ları için ise pH 6,0'da gözlenmiştir.



Şekil 4.7. Serbest HNL örneklerinin liyaz aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi.

4.1.6.2. Serbest HNL'ların Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular

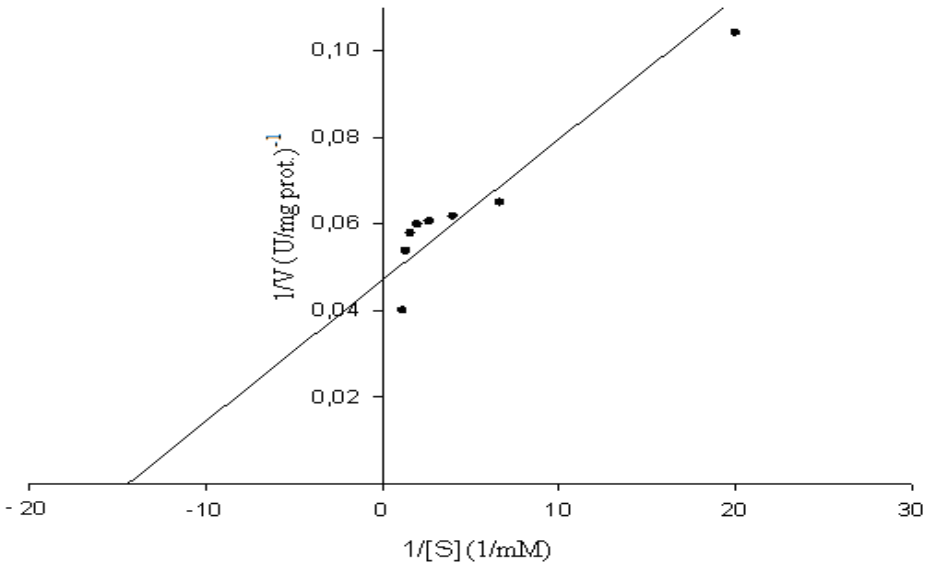
Şekil 4.8'den de görüldüğü gibi kayısı ve kültür bademi HNL'ları için optimum sıcaklık 30 °C, kültür formu badem, acıbadem, zerdali, yabani erik ve kültür formu erik HNL'ları için ise optimum sıcaklıkları 25 °C olarak belirlenmiştir.



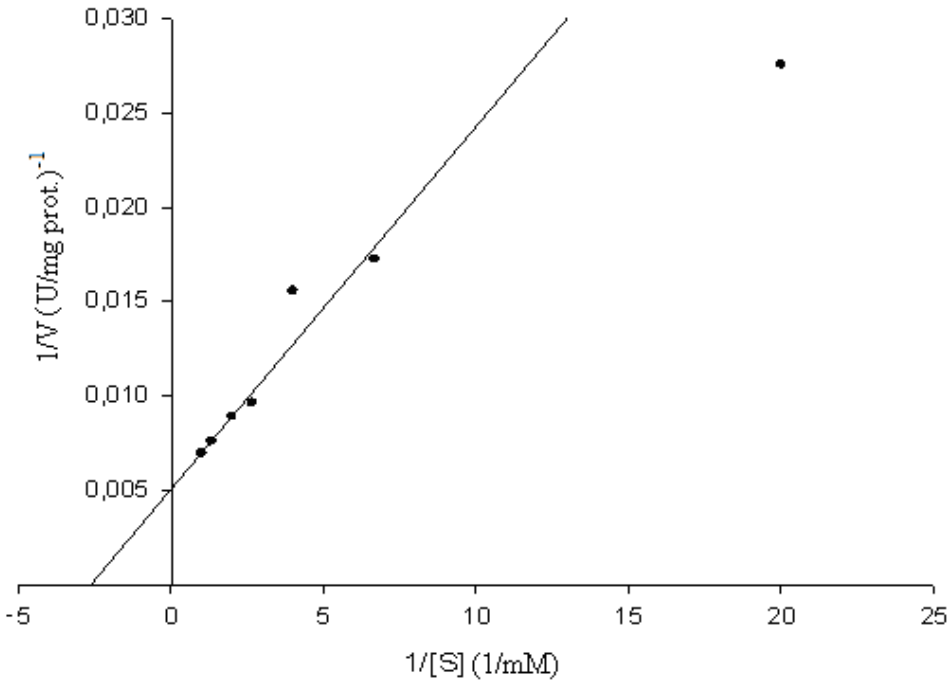
Şekil 4.8. Serbest HNL örneklerinin liyaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.

4.1.6.3. Serbest HNL'ların Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular

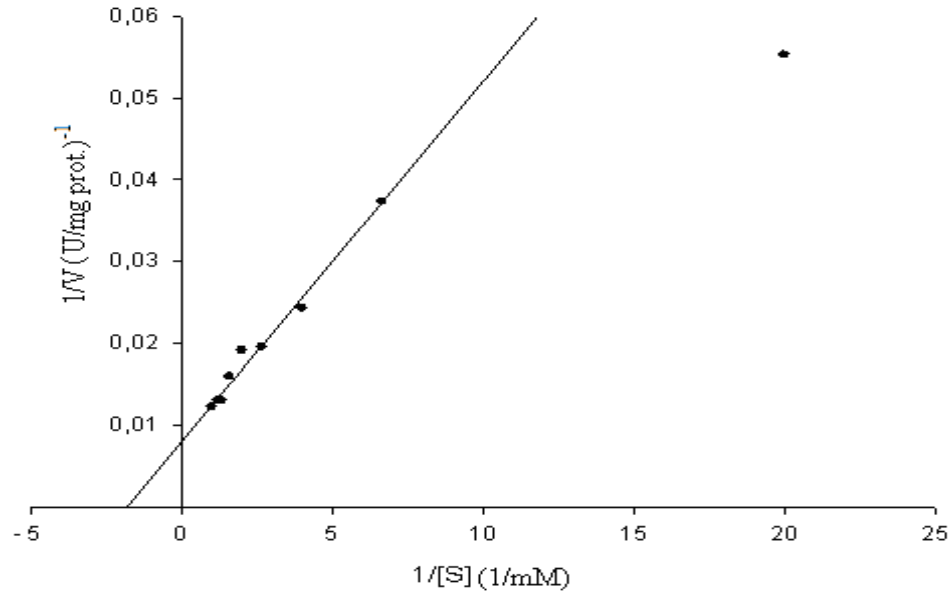
Belirlenen optimum pH ve sıcaklıkta (kayısı HNL için sırasıyla 5,5 ve 30 °C, diğer HNL örnekleri için ise sırasıyla 6,0 ve 25°C) 0,1-2,0 mM rasemik mandelonitril derişimleri kullanılarak serbest HNL örnekleri için Sigma Plot Enzim Kinetik Modül proğramı kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiş (Şekil 4.9a-9f) ve kinetik parametreler hesaplanmıştır. K_m ve V_{max} değerleri kültür formu badem HNL için sırasıyla 0,07 mM–21 U/mg prot.; acıbadem HNL için sırasıyla 0,38 mM–197,2 U/mg prot.; kayısı HNL için sırasıyla 0,55 mM–125,4 U/mg prot.; zerdali HNL için sırasıyla 0,07 mM–28,2 U/mg prot; yabani erik HNL için sırasıyla 0,31 mM–174 U/mg prot.; kültür formu erik HNL için sırasıyla 0,41 mM–51 U/mg prot. olarak hesaplanmıştır.



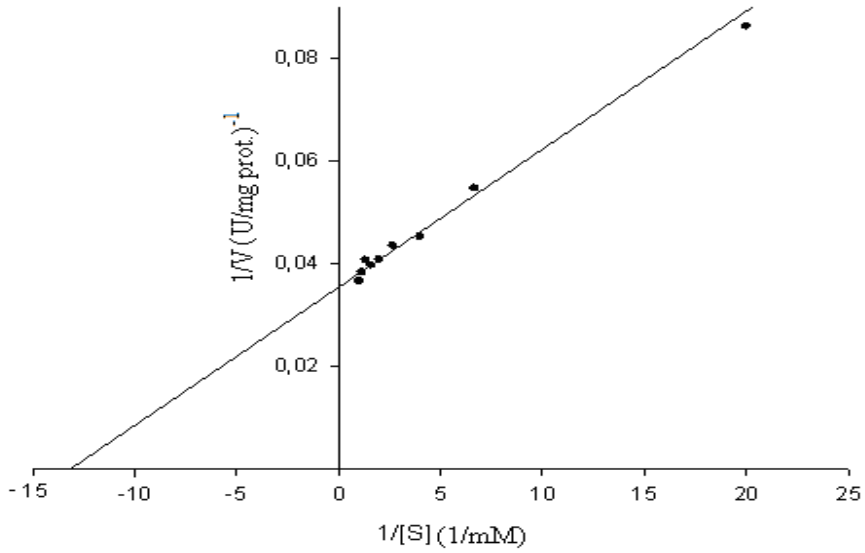
Şekil 4.9a. Kültür bademi HNL için Lineweaver-Burk grafiği.



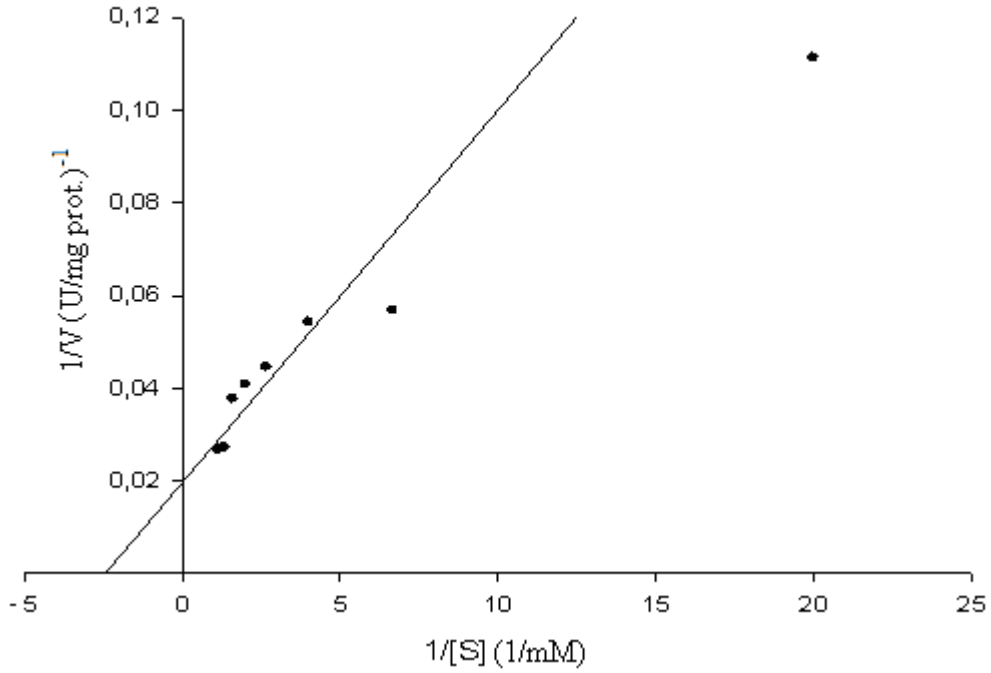
Şekil 4.9b. Acıbadem HNL için Lineweaver-Burk grafiği.



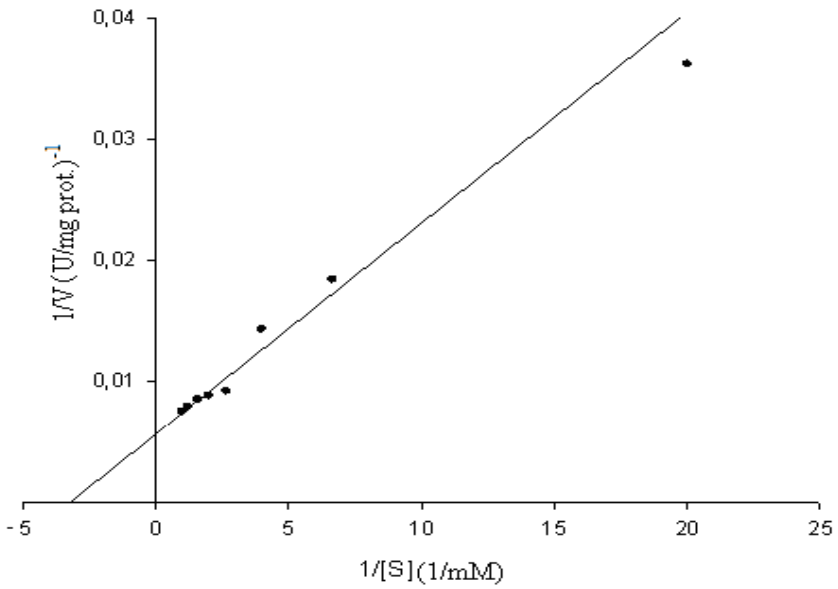
Şekil 4.9c. Kayısı HNL için Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4.9d. Zerdali HNL için Lineweaver-Burk grafiği.



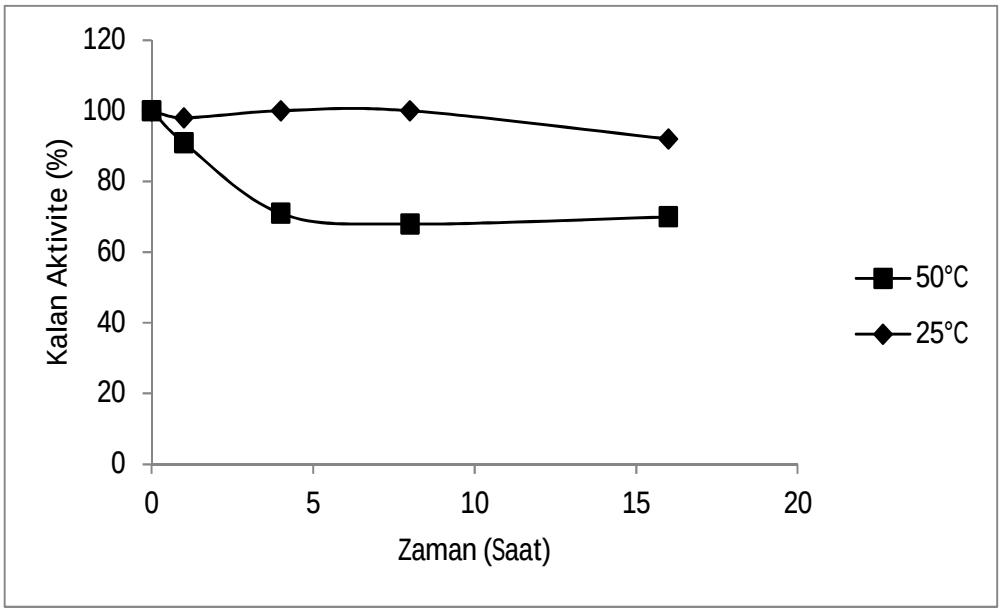
Şekil 4.9e. Kültür eriği HNL için Lineweaver-Burk grafiği.



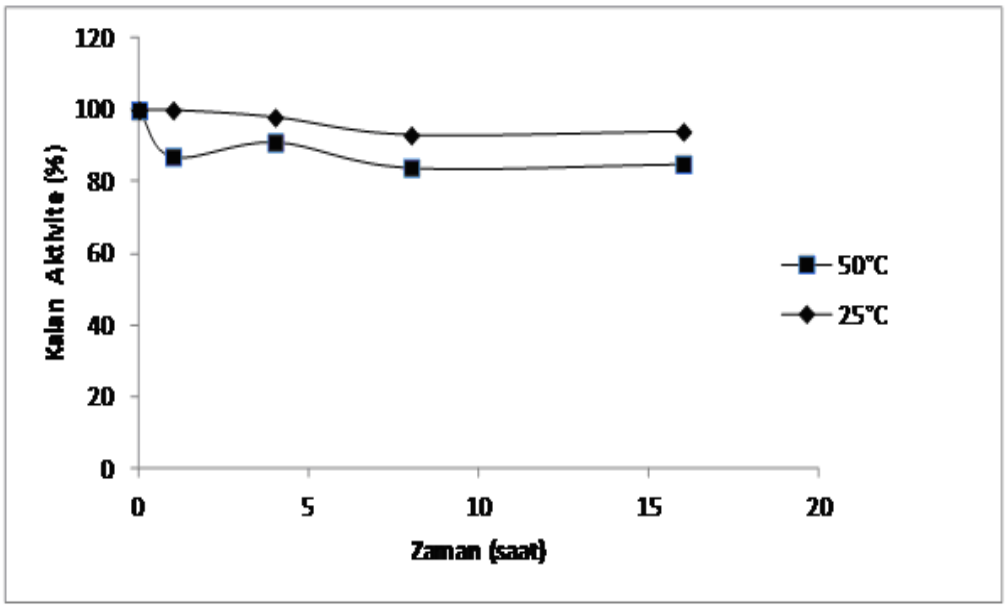
Şekil 4.9f. Yabani Erik HNL için Lineweaver-Burk grafiği.

4.1.6.4. Serbest HNL'ların Termal Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

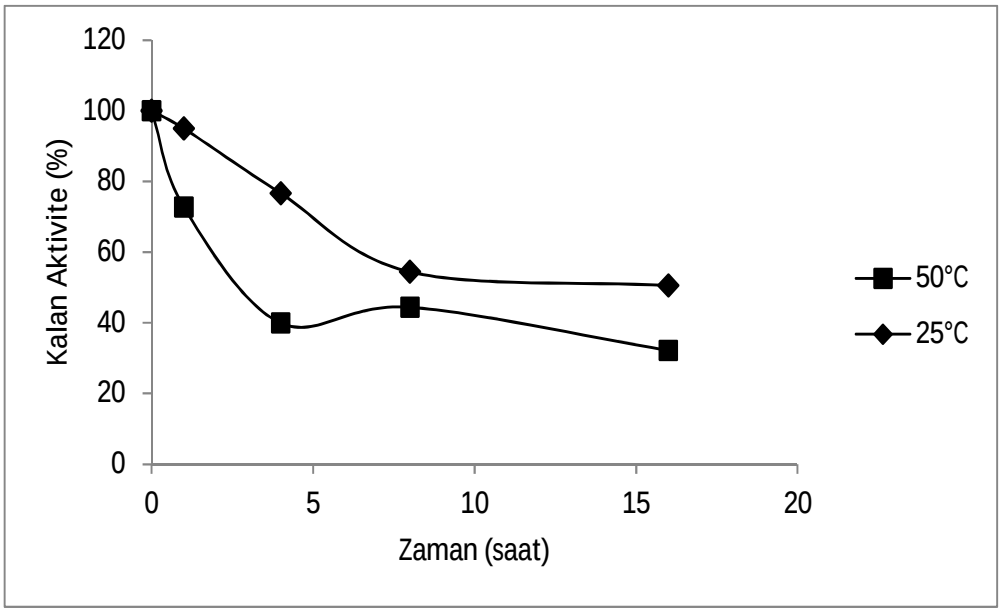
HNL örneklerinin 25 ve 50 ˚C'de 1, 4, 8 ve 16 saat bekletildikten sonra kalan aktiviteleri 25 ˚C'de ölçülmüş ve kalan aktiviteleri (% olarak) hesaplanmıştır (Şekil4.10a-10f).



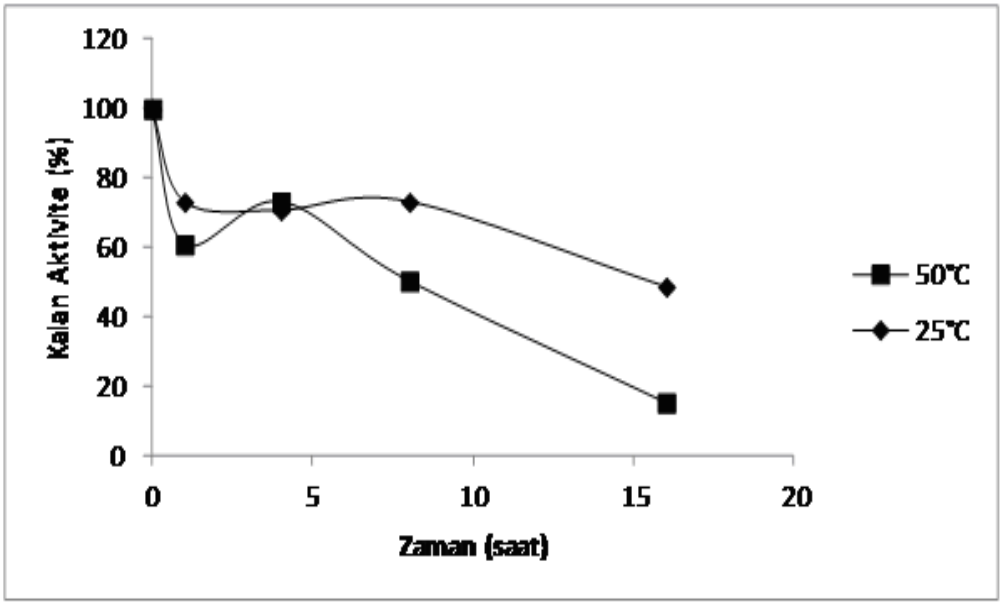
Şekil 4.10a. Kültür bademi (*Prunus dulcis*)-HNL'ın bağıl aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimi.



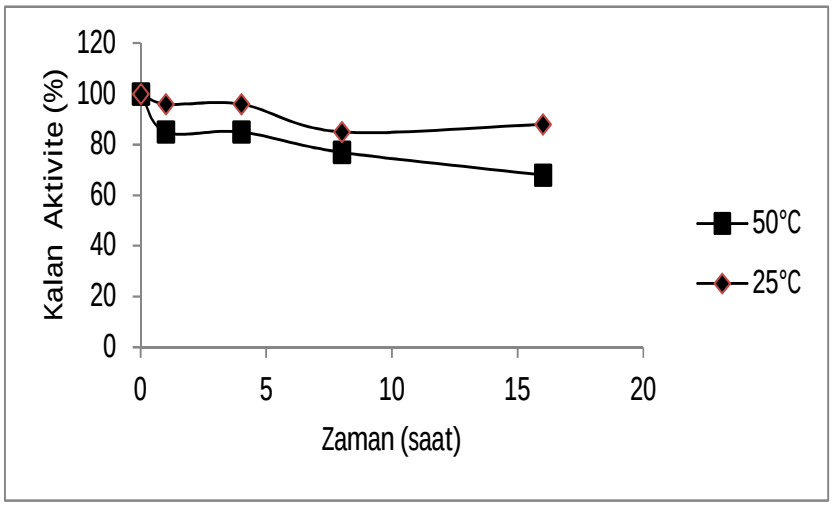
Şekil 4.10b. Acıbadem (*Prunus amygdalus turcomenica*)-HNL'ın bağıl aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimi.



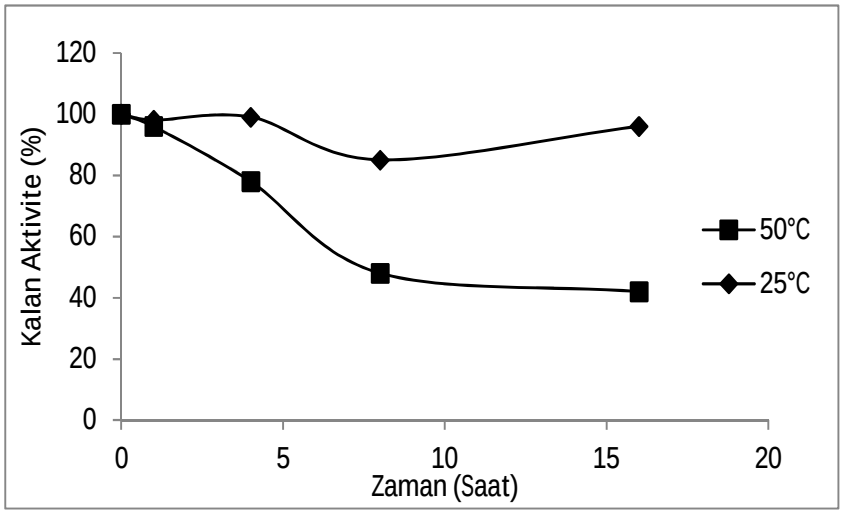
Şekil 4.10c. Kayısı (*Prunus armeniaca*)-HNL'ın bağıl aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimi.



Şekil 4.10d. Zerdali (*Prunus pseuduarmaniaca*)-HNL'ın bağıl aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimi.



Şekil 4.10e.Yabani Erik (*Prunus cerasifera*)-HNL'ın bağıl aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimi.

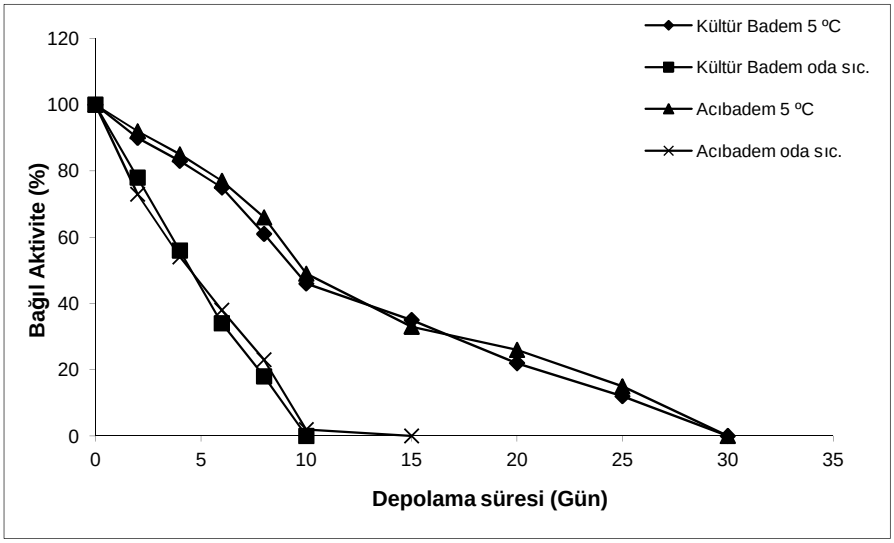


Şekil 4.10f. Kültür eriği (*Prunus domestica*)-HNL'ın bağıl aktivitesinin inkübasyon süresine bağlı değişimi.

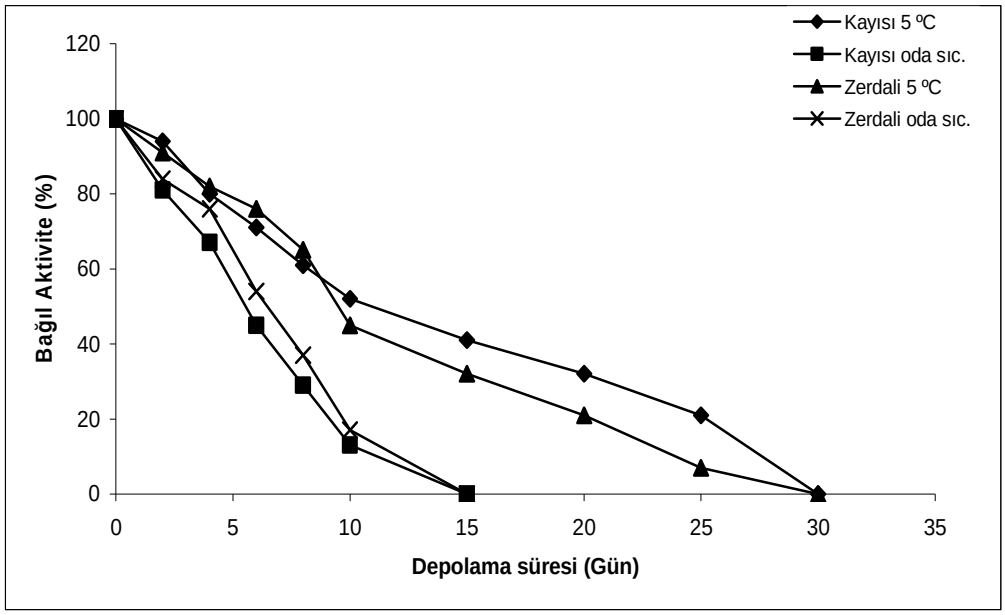
Serbest HNL örneklerinin termal kararlılığının sıcaklık ve zamana bağlı olarak değişimini gösteren grafikler incelendiğinde 25 °C'de 16 saat sonunda kalan HNL aktivitesinin 50 °C'de kalan aktiviteye göre tüm örnekler için daha yüksek olduğu görülmektedir. Bununla birlikte 50 °C'de 16 saat sonunda kültür formu badem, acıbadem, kayısı, zerdali, yabani erik ve kültür formu erik HNL örnekleri sırasıyla başlangıç aktivitelerinin %70, 85, 33, 15, 68 ve 42'sini korumuştur.

4.1.6.5. Serbest HNL'ların Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

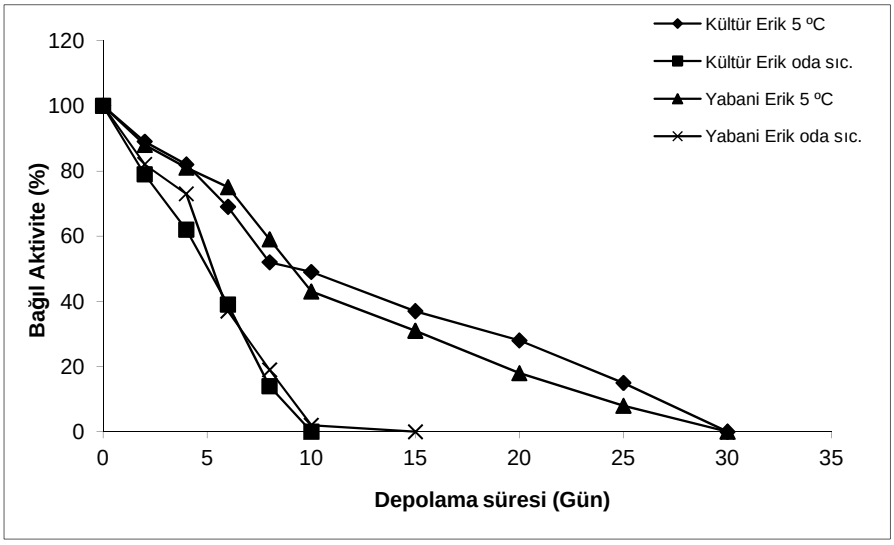
Serbest HNL örnekleri oda sıcaklığında ve 5 ºC'de 50 mM pH 6,2 fosfat tamponunda bekletilerek belirli günlerde kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Serbest HNL örneklerinin depolama süresine bağlı aktivite değişimleri Şekil 4.11a-11c'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11a. Acıbadem ve kültür bademi HNL'ların aktivitelerinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi.



Şekil 4.11b. Kayısı ve zerdali HNL'ların aktivitelerinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi.



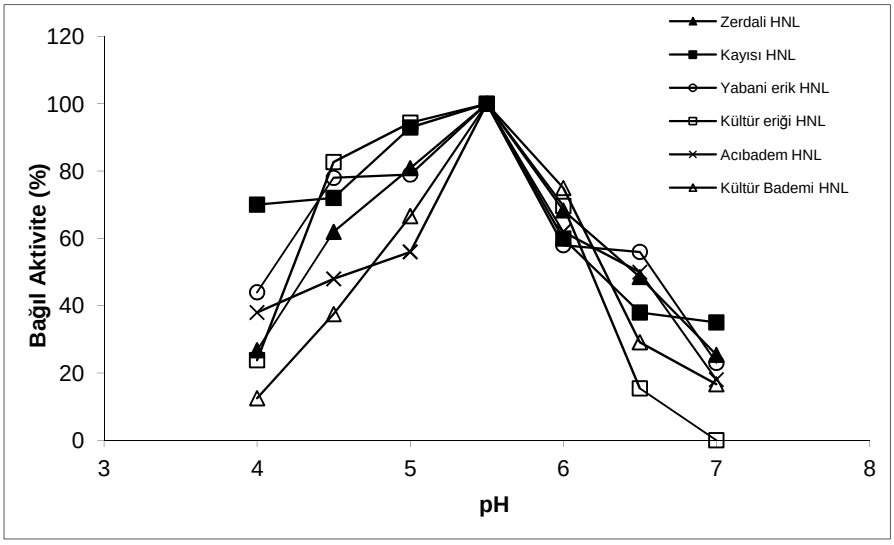
Şekil 4.11c. Yabani erik ve kültür eriği HNL'ların aktivitelerinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi.

Oda sıcaklığında saklanan tüm HNL örnekleri yaklaşık 15 gün sonunda başlangıç aktivitelerinin tamamını kaybederken, 5 ºC'de saklanan tüm HNL örnekleri ise 30 gün sonunda başlangıç aktivitelerinin tamamını kaybetmişlerdir.

4.2. HNL'ların Eupergit CM Üzerine Kovalent İmmobilizasyonu (HNL-Eupergit CM) İle İlgili Bulgular

4.2.1.HNL-Eupergit CM'lerin Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular

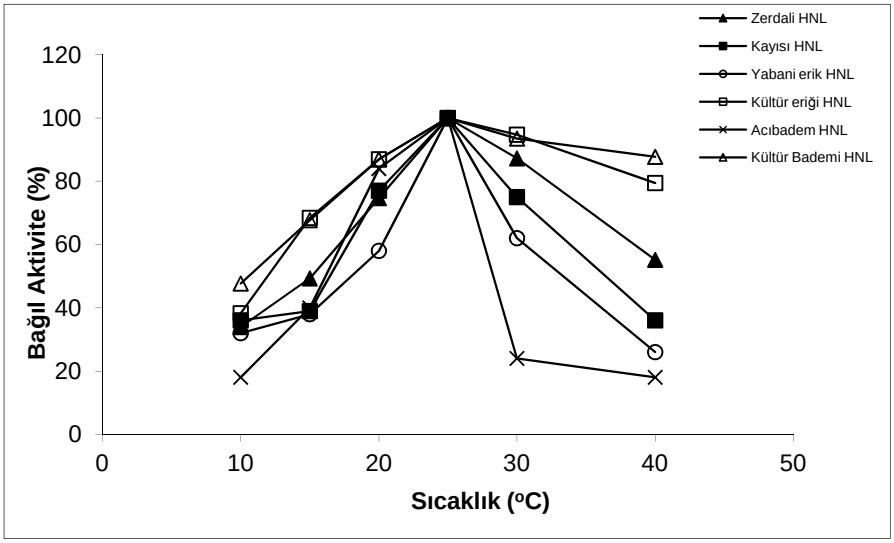
HNL-Eupergit CM'lerın aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimini Şekil 4.12'de verilmiştir. HNL-Eupergit CM'lerin tümü için en yüksek aktivite değeri pH 5,5'ta ölçülmüştür.



Şekil 4.12. HNL-Eupergit CM'lerin liyaz aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimi.

4.2.2. HNL-Eupergit CM'lerin Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular

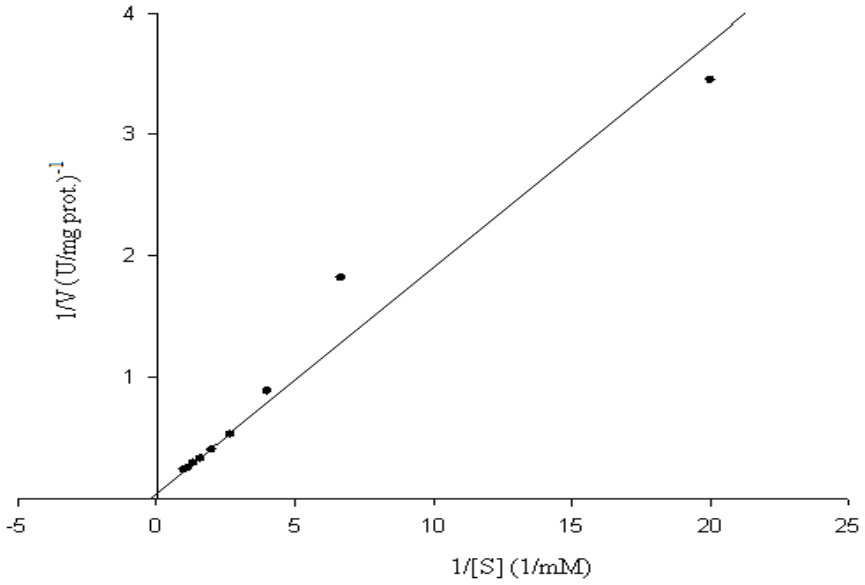
Şekil 4.13 HNL-Eupergit CM örneklerinin aktivitelerinin 10–40 ºC'deki değişimini göstermektedir. HNL-Eupergit CM'lerin tümü en yüksek aktivitelerini 25 ºC'de göstermişlerdir.



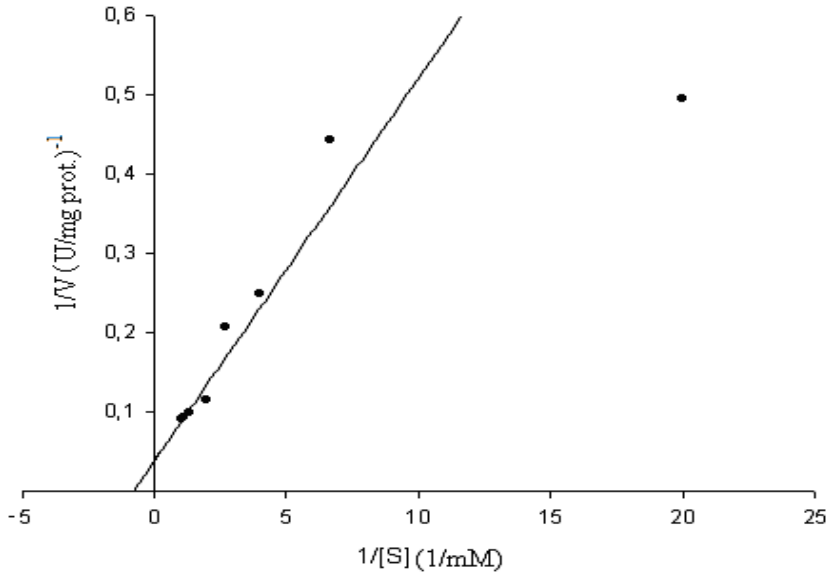
Şekil 4.13. HNL-Eupergit CM'lerin liyaz aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimi.

4.2.3. HNL-Eupergit CM'lerin Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular

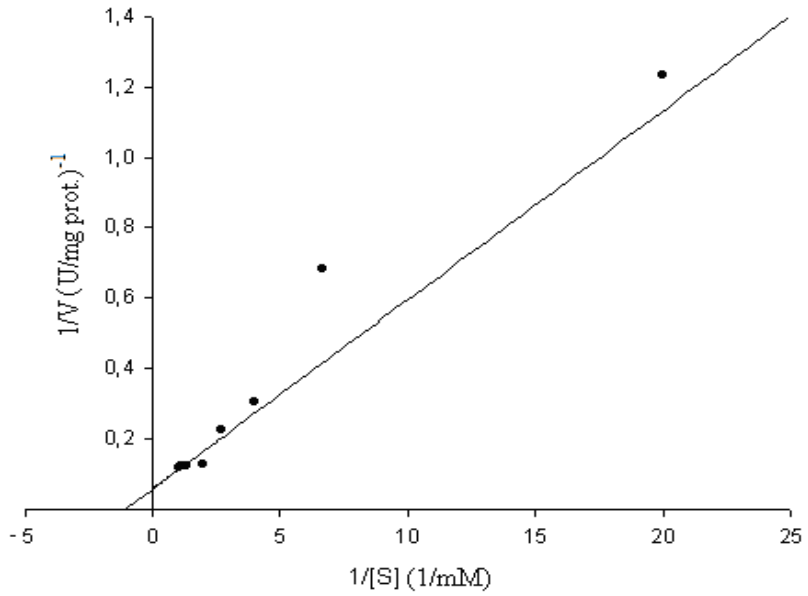
HNL-Eupergit CM'lerin 0,1-2,0 mM rasemik mandelonitril derişimlerinde, pH 5,5 ve 25 °C'de ölçülen aktivitelerine göre çizilen Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.14a-14f'de verilmiştir. K_m–V_{max} değerleri sırasıyla Eupergit CM üzerine immobilize edilen kültür formu badem HNL için 4,15 mM–22,4 U/mg prot.; acıbadem HNL için 1,3 mM–26 U/mg prot.; kayısı HNL için 0,92 mM–17,1 U/mg prot; zerdali HNL için 1,5 mM–10 U/mg prot.; kültür erik HNL için 7,0 mM–27 U/mg prot.; yabani erik HNL için 0,77 mM–11,7 U/mg prot. olarak bulunmuştur.



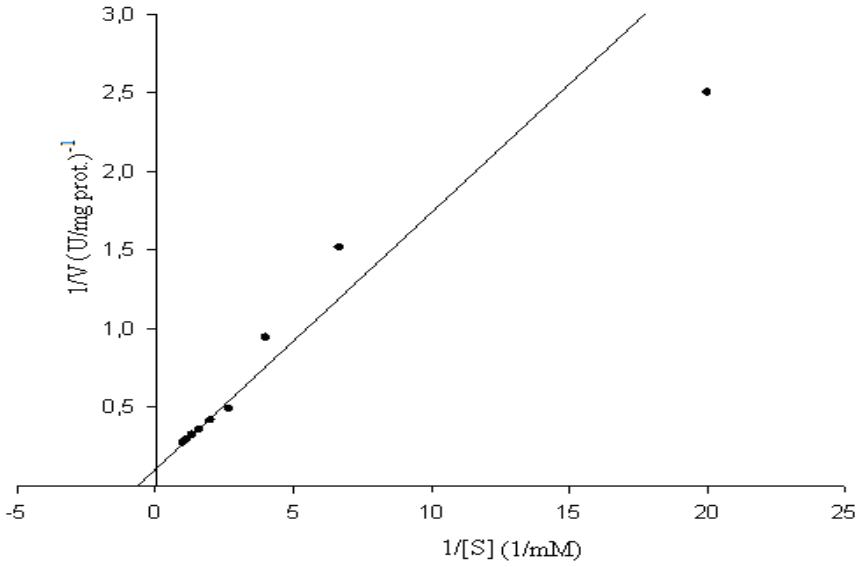
Şekil 4.14a. Kültür formu badem HNL-Eupergit CM için Lineweaver-Burk grafiği.



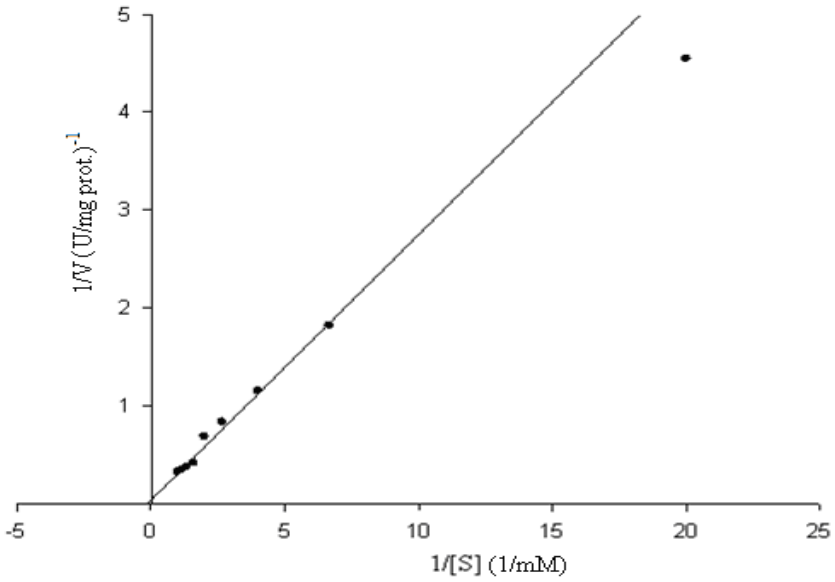
Şekil 4.14b. Acıbadem HNL-Eupergit CM için Lineweaver-Burk grafiği.



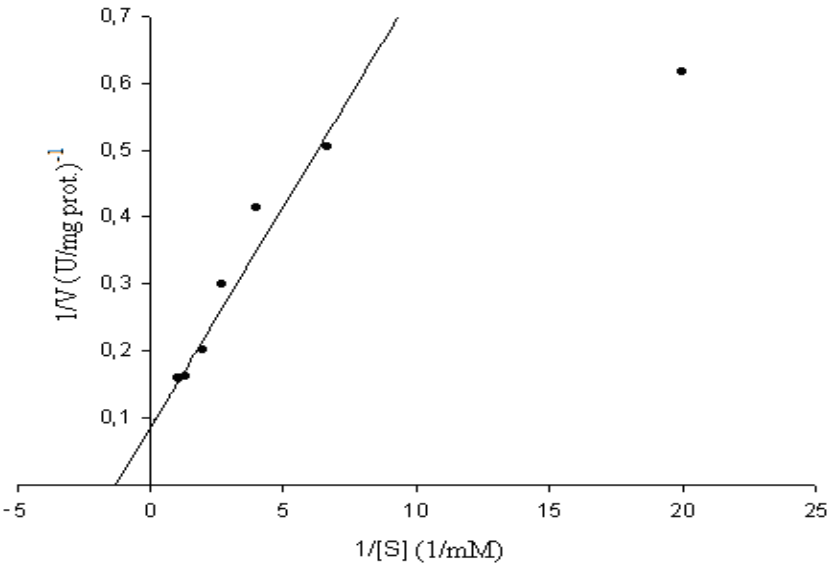
Şekil 4.14c. Kayısı HNL-Eupergit CM için Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4.14d. Zerdali HNL-Eupergit CM için Lineweaver-Burk grafiği.



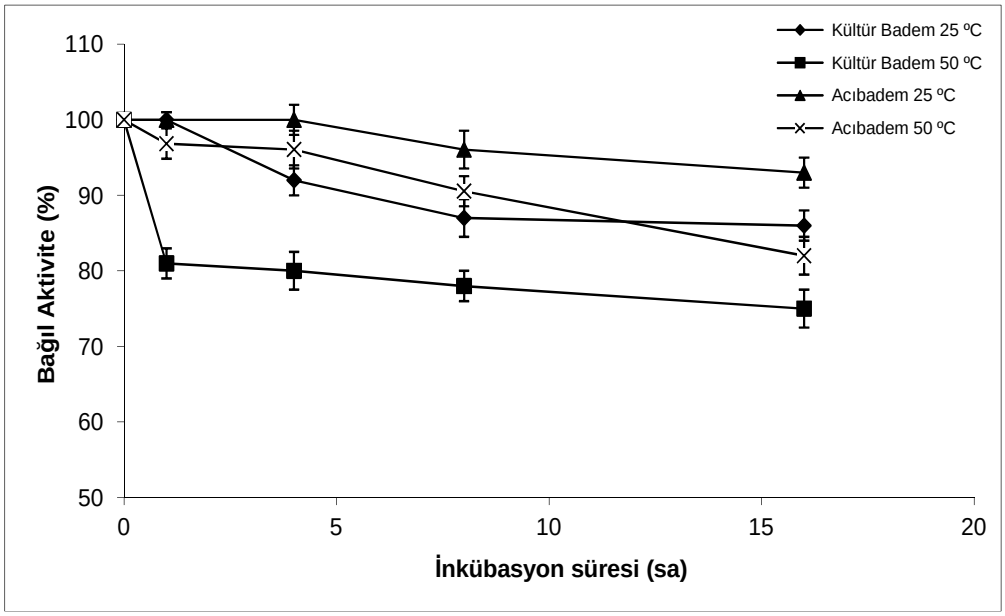
Şekil 4.14e. Kültür erik HNL-Eupergit CM üzerine immobilize edilen için Lineweaver-Burk grafiği.



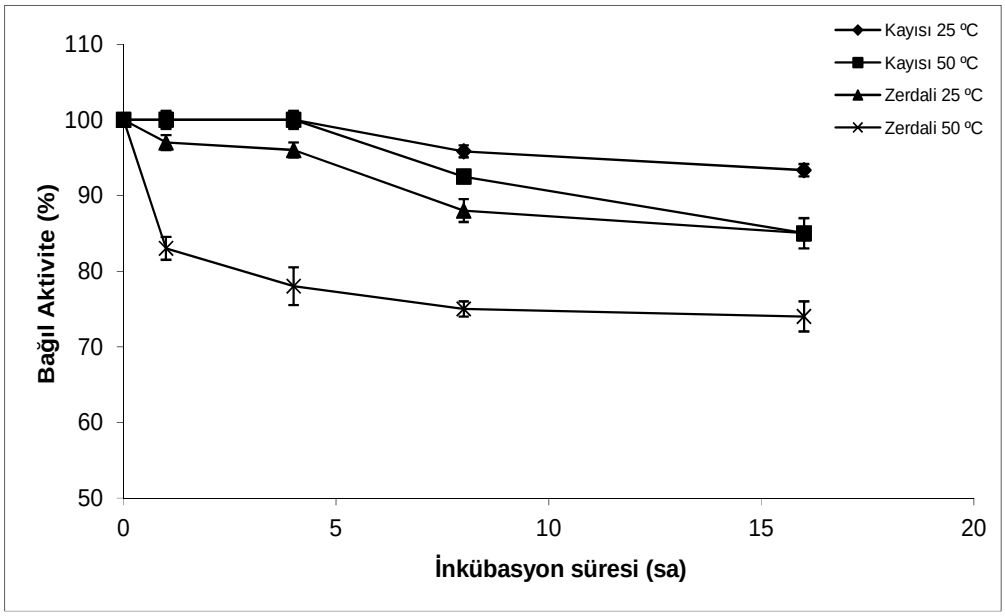
Şekil 4.14f. Yabani erik HNL-Eupergit CM için Lineweaver-Burk grafiği.

4.2.4. HNL-Eupergit CM'lerin Termal Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

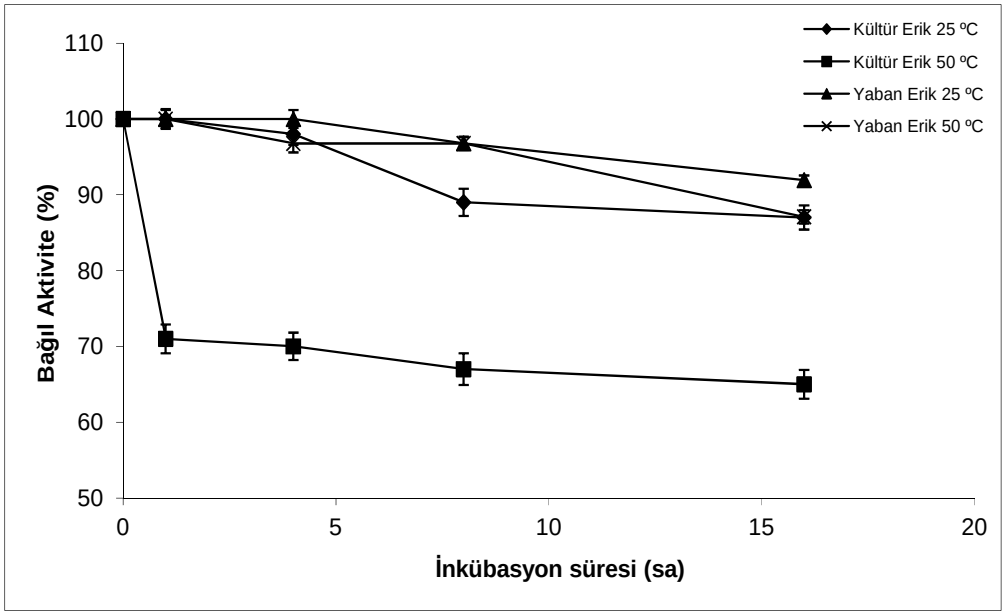
HNL-Eupergit CM'lerin termal kararlılıklarını saptamak için yapılan çalışmaların sonuçları Şekil 4.15a-15c'de verilmiştir. Eupergit CM üzerine kovalent olarak immobilize edilen kültür formu badem, acıbadem, kayısı, zerdali, yabani erik ve kültür eriği HNL'ları 25 ºC'de 16 saat inkübe edildiğinde başlangıç aktivitelerinin sırasıyla %86, 93, 93, 85, 85 ve 87'ini, aynı süre için 50 ºC'de ise sırasıyla başlangıç aktivitelerinin %75, 82, 85, 74, 87 ve 92'ini korumuşlardır.



Şekil 4.15a. Kültür badem HNL-Eupergit CM ve acıbadem HNL-Eupergit CM için aktivitelerin inkübasyon süresine bağlı değişimi.



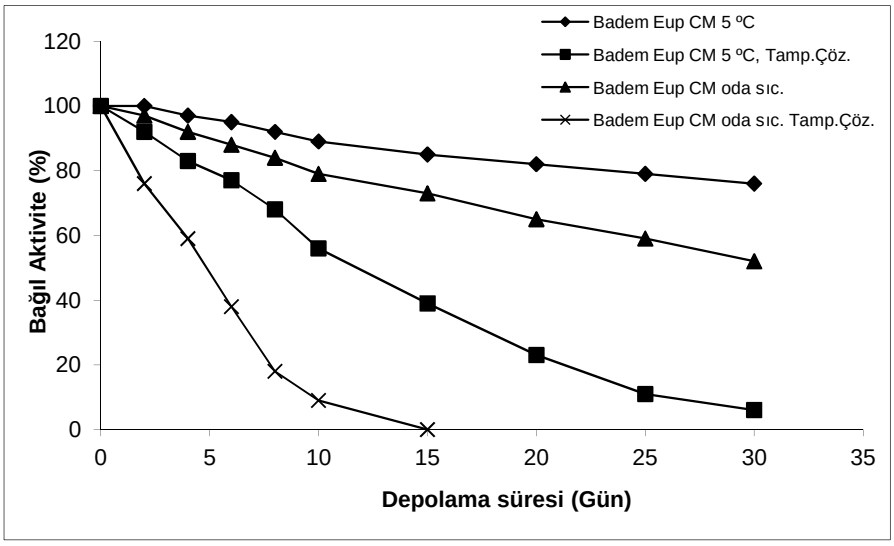
Şekil 4.15b. Kayısı HNL-Eupergit CM ve zerdali HNL-Eupergit CM için aktivitelerin inkübasyon süresine bağlı değişimi.



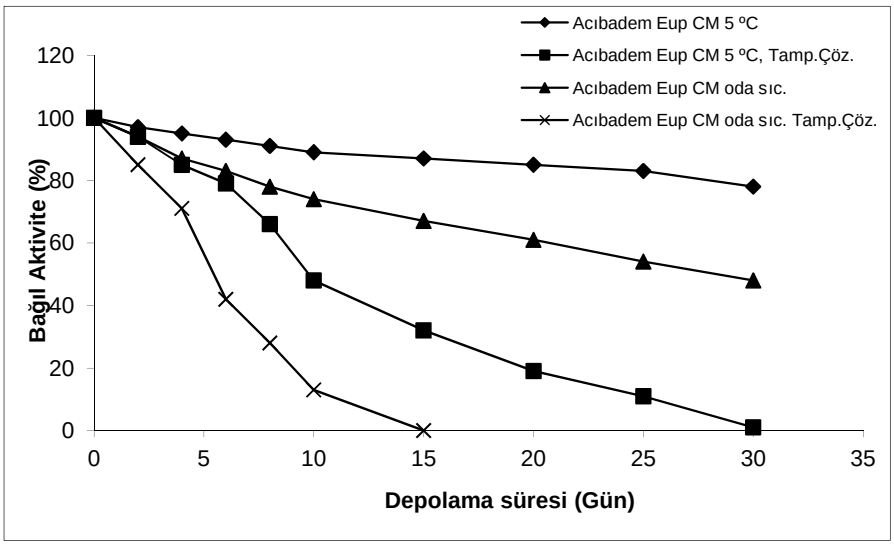
Şekil 4.15c. Kültür eriği HNL-Eupergit CM ve yabani erik HNL-Eupergit CM için aktivitelerin inkübasyon süresine bağlı değişimi.

4.2.5. HNL-Eupergit CM'lerin Depolama Kararlılıkları İle İlgili Bulgular

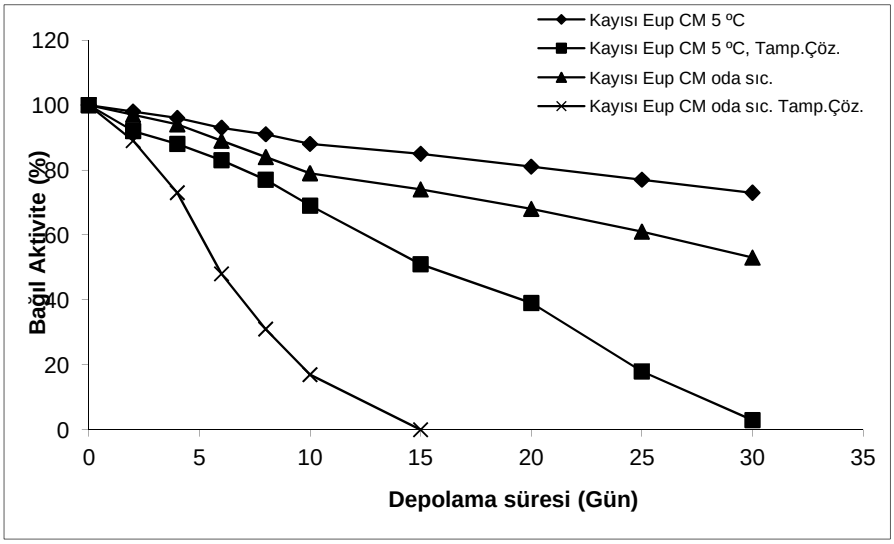
HNL-Eupergit CM örnekleri 5˚C ve oda sıcaklığında 50 mM pH 6,2 fosfat tamponunda veya kuru HNL preparatları halinde bekletilerek belirli günlerde aktiviteleri ölçülmüş ve bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.16a-16f'de verilmiştir.



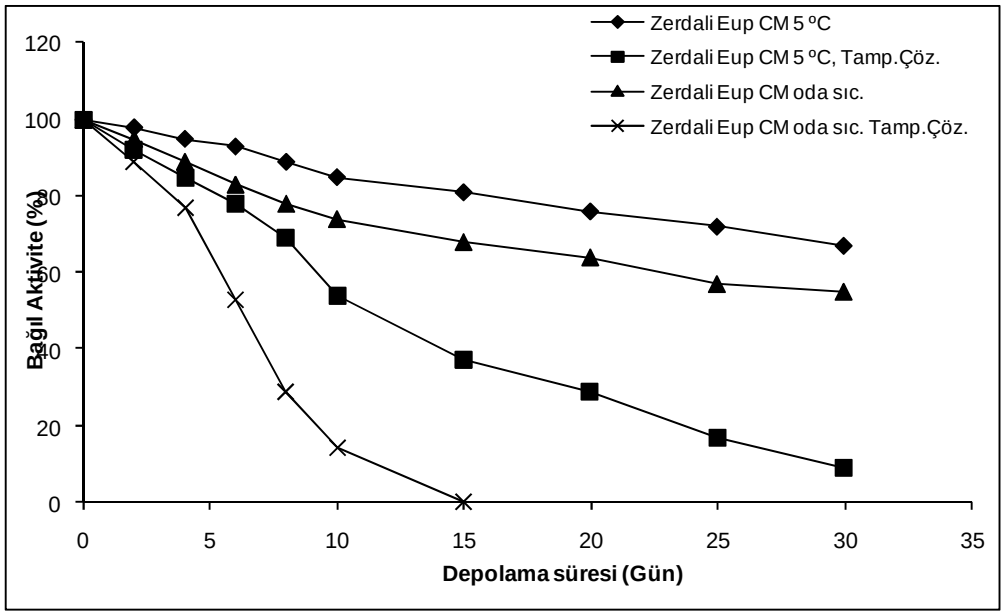
Şekil 4.16a. Kültür formu badem HNL-Eupergit CM aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi.



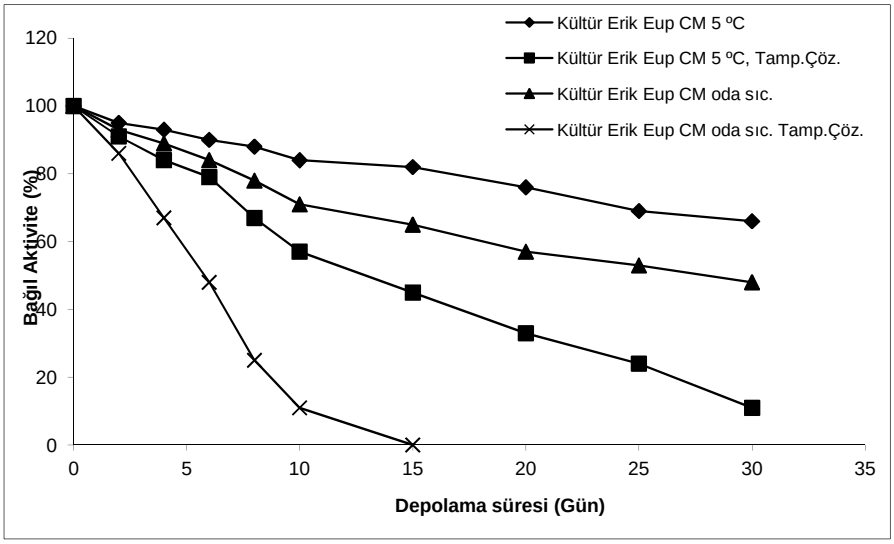
Şekil 4.16b.Acıbadem HNL-Eupergit CM aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi.



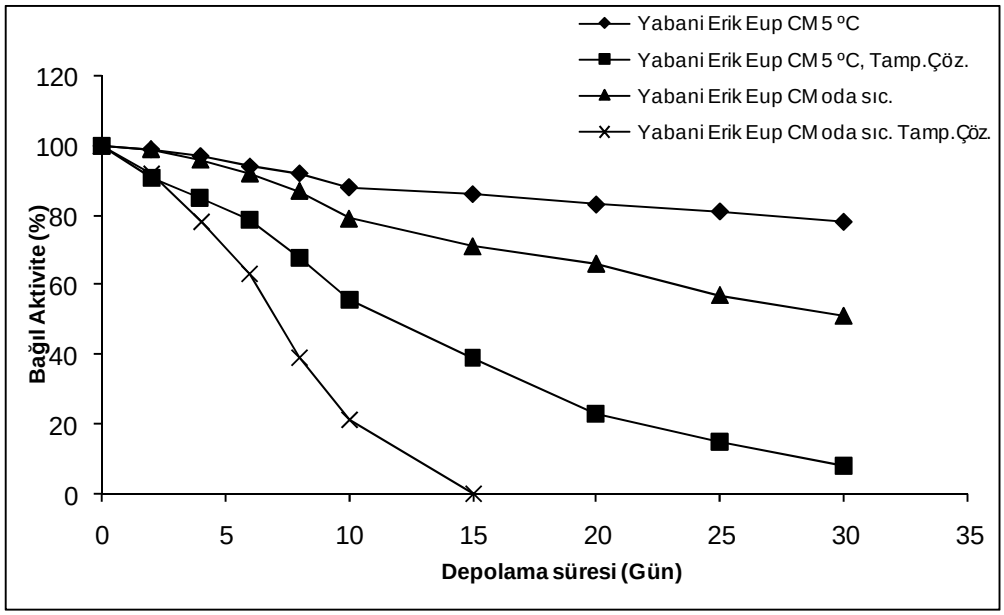
Şekil 4.16c. Kayısı HNL-Eupergit CM aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi.



Şekil 4.16d. Zerdali HNL-Eupergit CM aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi.



Şekil 4.16e. Kültür formu erik HNL-Eupergit CM aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi.



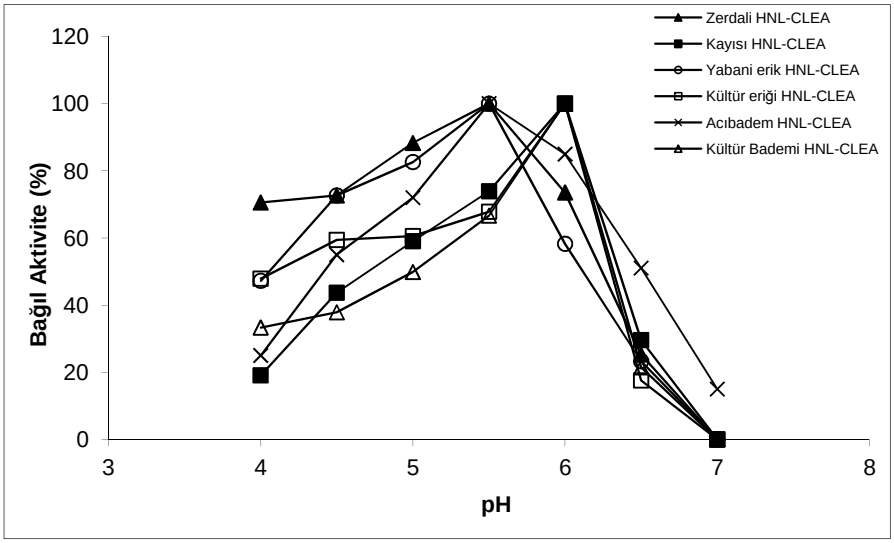
Şekil 4.16f. Yabani erik HNL-Eupergit CM aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi.

Oda sıcaklığında 50 mM pH 6,2 fosfat tamponunda depolanan tüm immobilize HNL örnekleri 15 gün depolama süresi sonunda başlangıç aktivitelerinin tamamını yitirirken, oda sıcaklığında kuru HNL-Eupergit CM preparatları halinde bekletilen immobilize kültür formu badem, acıbadem, kayısı, zerdali, kültür formu erik ve yabani erik HNL-Eupergit CM'ler ise başlangıç aktivitelerinin sırasıyla %52, 48, 53, 55, 48 ve 51'ini korumuşlardır. Buna karşın 5 °C'de 50 mM pH 6,2 fosfat tamponunda depolanan immobilize kültür formu badem, acıbadem, kayısı, zerdali, kültür eriği ve yabani erik HNL örnekleri ise başlangıç aktivitelerinin sırasıyla % 6, 1, 3, 9, 11 ve 8'ini korurken 5 °C'de kuru HNL preparatları halinde bekletildiklerinde sırasıyla başlangıç aktivitelerinin sırasıyla %76, 78, 73, 67, 66 ve 78'ini korumuşlardır.

4.4. CLEA Yöntemi İle İmmobilize Edilen HNL'lar (HNL-CLEA) İle İlgili Bulgular

4.4.1. HNL-CLEA'ların Aktivitesine pH'nın Etkisi İle İlgili Bulgular

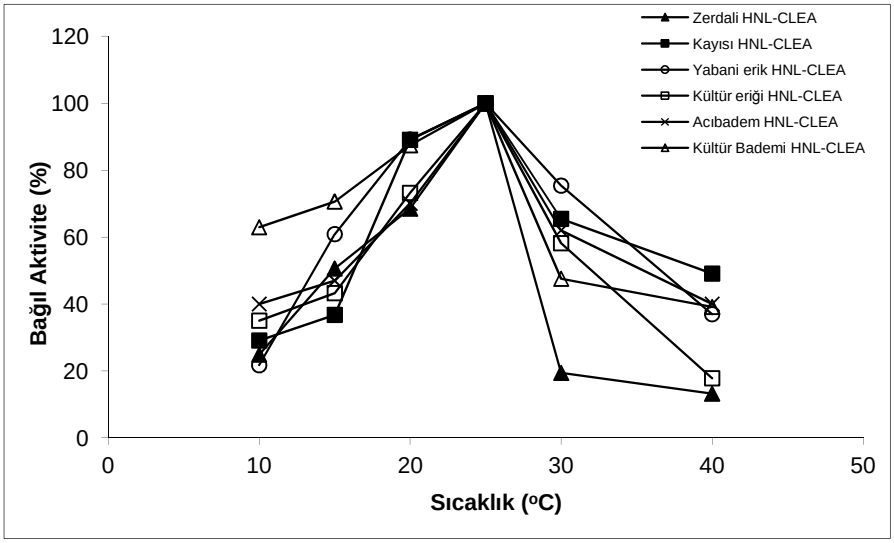
HNL-CLEA örneklerinin aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimi Şekil 4.17'de verilmiştir. HNL-CLEA örneklerinden acıbadem, zerdali ve yabani erik HNL-CLEA'larının maksimum aktivite gösterdikleri pH değeri 5,5, kayısı, kültür erik ve badem HNL-CLEA'larının maksimum aktivite gösterdikleri pH ise 6,0 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.17. HNL-CLEA örneklerinin aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi.

4.4.2.HNL-CLEA'ların Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi İle İlgili Bulgular

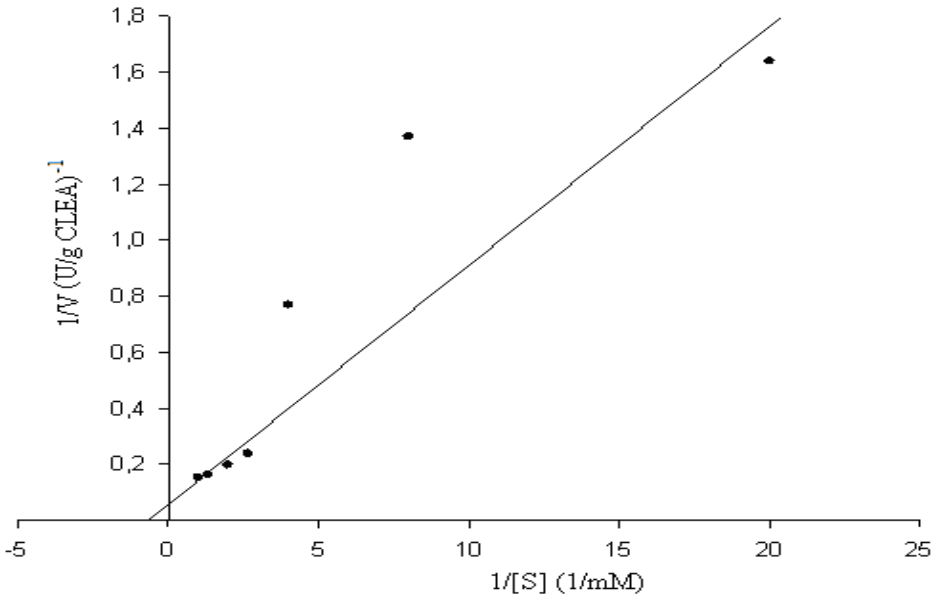
HNL-CLEA örneklerinin aktivitelerinin 10–40 ºC'de sıcaklığa bağlı değişimini Şekil 4.18'te gösterilmiştir. Şekil'den görüleceği gibi bütün HNL-CLEA'lar en yüksek aktivitelerini 25 ºC'de göstermişlerdir.



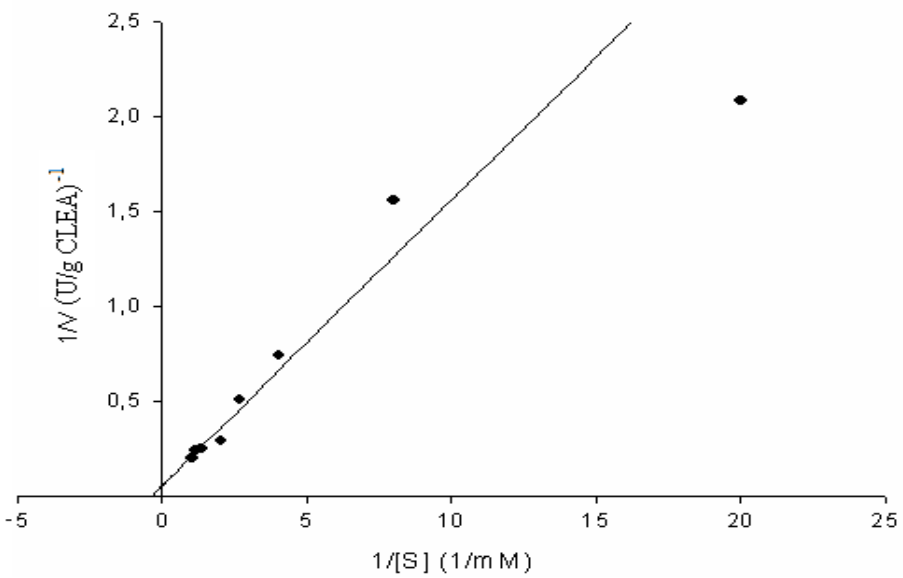
Şekil 4.18. HNL-CLEA örneklerinin aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi.

4.4.3. HNL-CLEA'ların Kinetik Parametreleri İle İlgili Bulgular

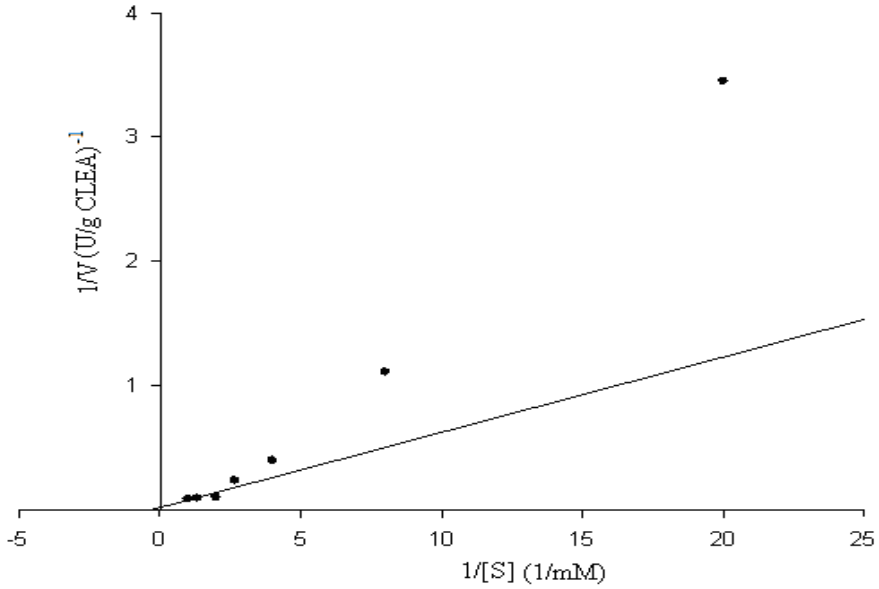
HNL-CLEA'ların 0,1-2,0 mM rasemik mandelonitril derişimlerinde acıbadem, zerdali ve yabani erik HNL'ları için pH 5,5 ve 25 °C, kayısı, kültür erik ve badem HNL'ları için ise pH 6,0 ve 25 °C'de ölçülen aktivite değerlerine göre çizilen Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.19a-19f'de verilmiştir. HNL-CLEA'lar için K_m–V_{max} değerleri sırasıyla kültür formu badem için 1,5 mM–18 U/g CLEA; acıbadem HNL-CLEA için 2,7 mM–18 U/g CLEA; kayısı HNL-CLEA için 2,9 mM–48 U/g CLEA; zerdali HNL-CLEA için 1,1 mM–16 U/g CLEA; kültür erik HNL-CLEA için 1,8 mM–20 U/g CLEA ve yabani erik HNL-CLEA için 4,0 mM–22 U/g CLEA olarak hesaplanmıştır. İmmobilizasyon süresinin sonunda eter ve aseton ile muamele edilen HNL-CLEA'lardan elde edilen süzüntüde eter, aseton ve glutaraldehit bulunmasından dolayı agregat oluşturmayan HNL miktarı protein tayini yöntemleri ile belirlenememiştir. Bu nedenle HNL-CLEA'lar için K_m ve V_{max} değerleri hesaplanabilirken k_{cat} değerleri hesaplanamamıştır.



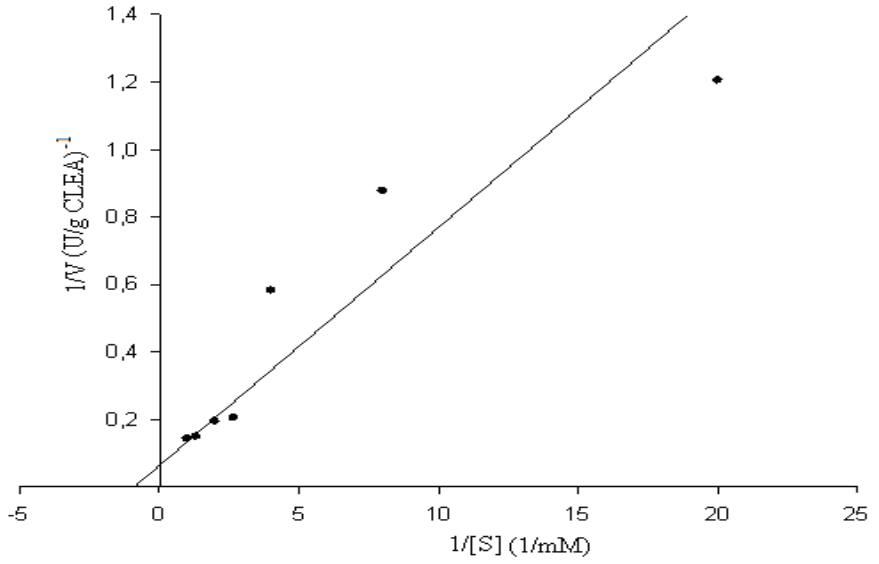
Şekil 4.19a. Kültür formu badem HNL-CLEA için Lineweaver-Burk grafiği.



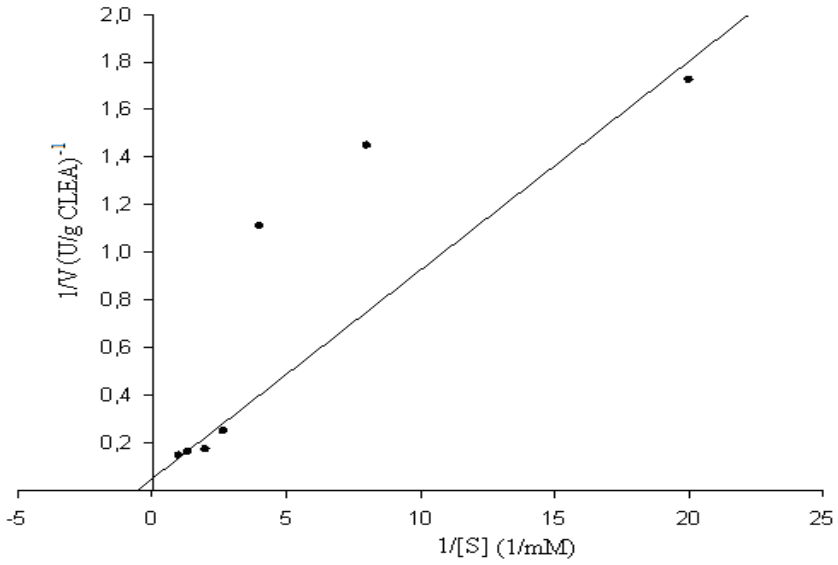
Şekil 4.19b. Acıbadem HNL-CLEA için Lineweaver-Burk grafiği.



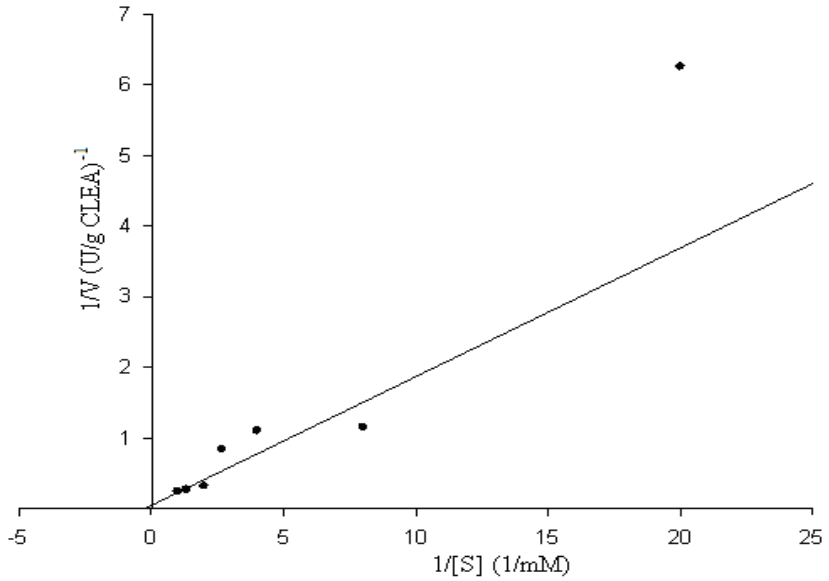
Şekil 4.19c. Kayısı HNL-CLEA için Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4.19d. Zerdali HNL-CLEA için Lineweaver-Burk grafiği.



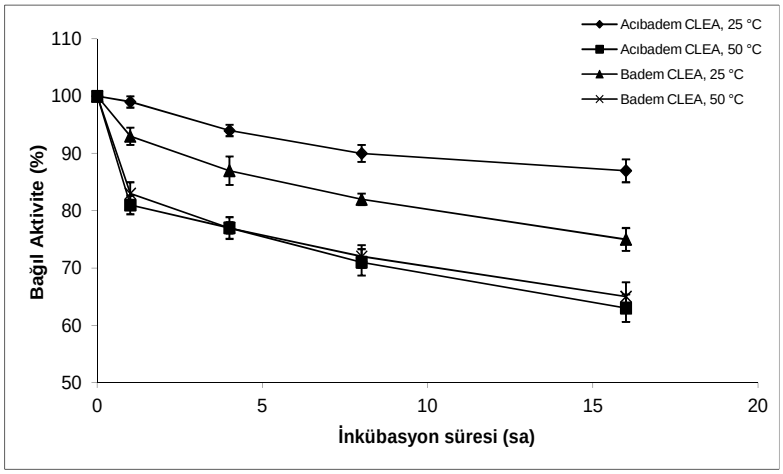
Şekil 4.19e. Kültür erik HNL-CLEA için Lineweaver-Burk grafiği.



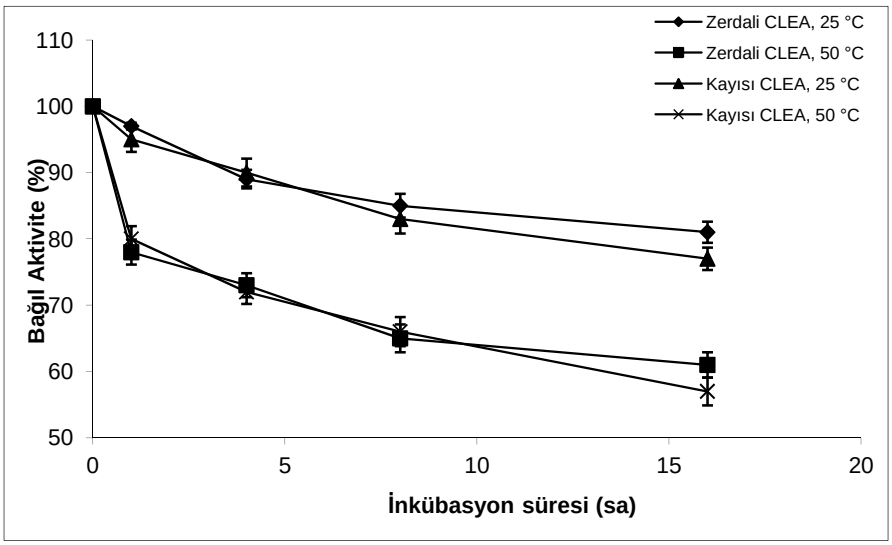
Şekil 4.19f. Yabani erik HNL-CLEA için Lineweaver-Burk grafiği.

4.4.4. HNL-CLEA'ların Termal Kararlılığı İle İlgili Bulgular

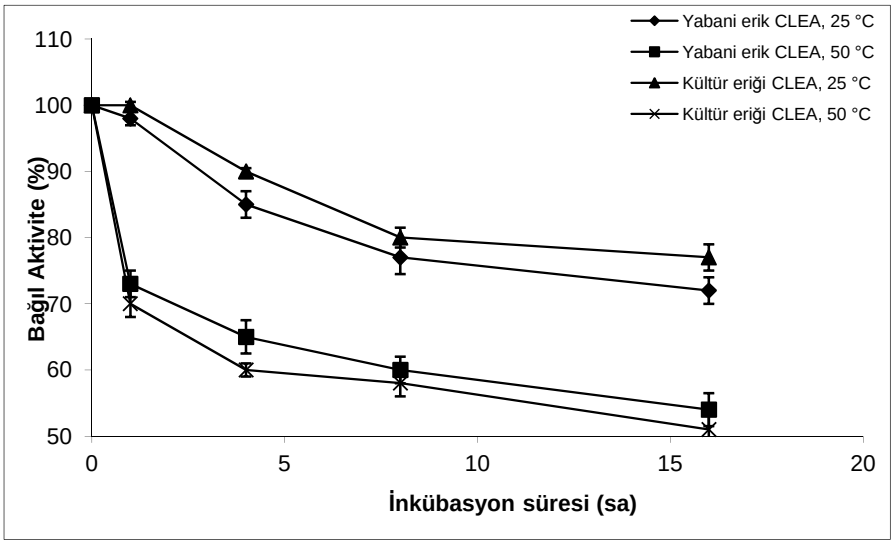
HNL-CLEA örnekleri 25 ve 50 ºC'de 1, 4, 8 ve 16 saat bekletildikten sonra kalan aktiviteleri 25 ºC'de ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.20a-20c'de gösterilmiştir. Kültür formu badem, acıbadem, kayısı, zerdali, kültür formu erik ve yabani erik HNL-CLEA'ları 25 ºC'de 16 saat inkübasyon sonunda sırasıyla başlangıç aktivitelerinin %75, 87, 77, 81, 77 ve 72'sini, aynı süre sonunda 50 ºC'de ise sırasıyla başlangıç aktivitelerinin %65, 63, 57, 61, 51 ve 54'ünü korumuşlardır.



Şekil 4.20a. Kültür formu badem ve acıbadem HNL-CLEA'ların aktivitelerinin inkübasyon süresine bağlı değişimi.



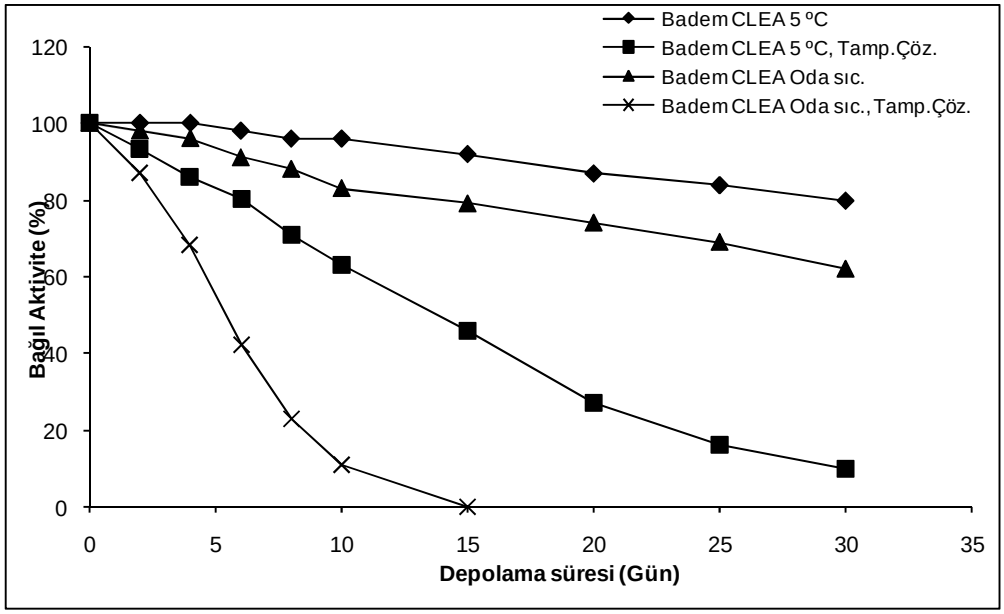
Şekil 4.20b. Kayısı ve zerdali HNL-CLEA'ların aktivitelerinin inkübasyon süresine bağlı değişimi.



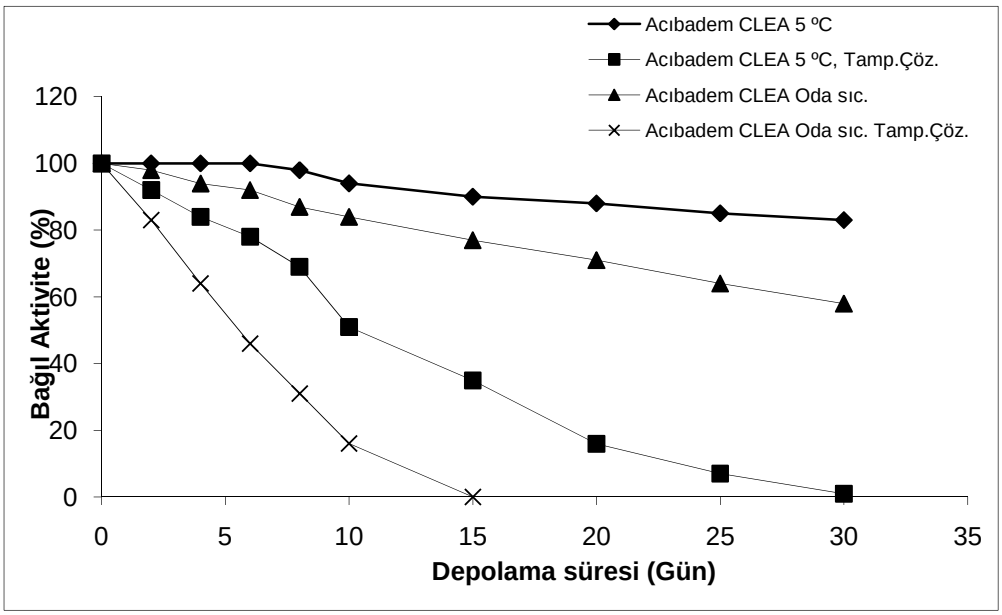
Şekil 4.20c. Kültür formu erik ve yabani erik HNL-CLEA'ların aktivitelerinin inkübasyon süresine bağlı değişimi.

4.4.5. HNL-CLEA'ların Depolama Kararlılığı İle İlgili Bulgular

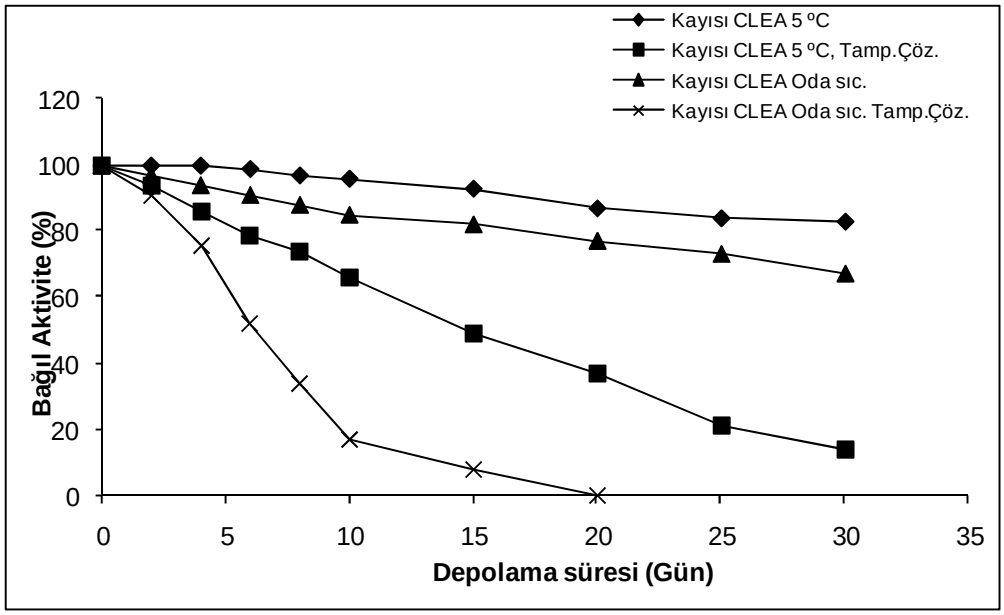
HNL-CLEA örneklerinin 5˚C ve oda sıcaklığında 50 mM pH 6,2 fosfat tamponunda veya kuru HNL preparatları halinde bekletilerek belirli günlerde aktiviteleri ölçülmüş ve bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.21a-21f'de verilmiştir.



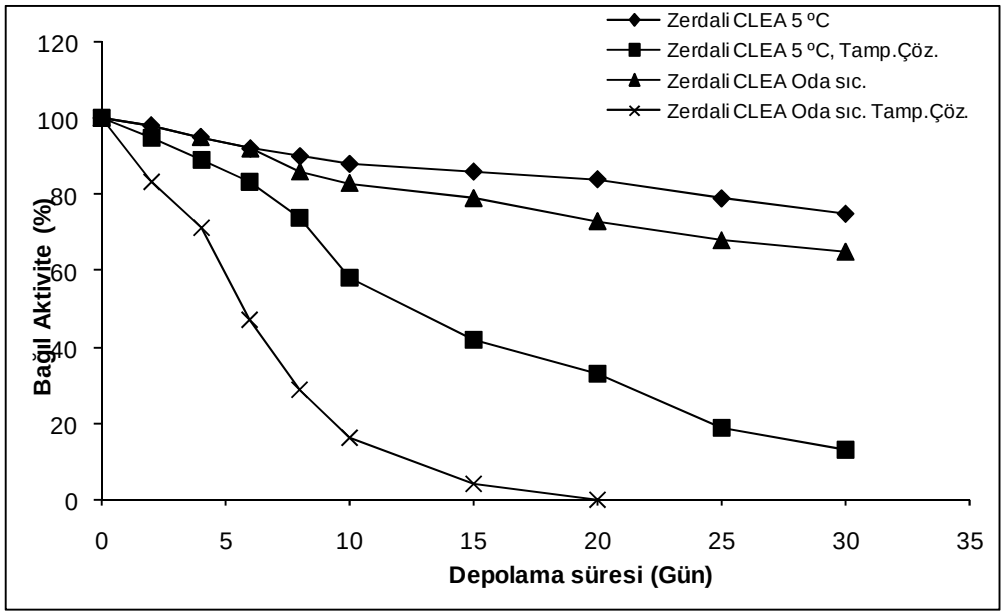
Şekil 4.21a. Kültür formu badem HNL-CLEA aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi.



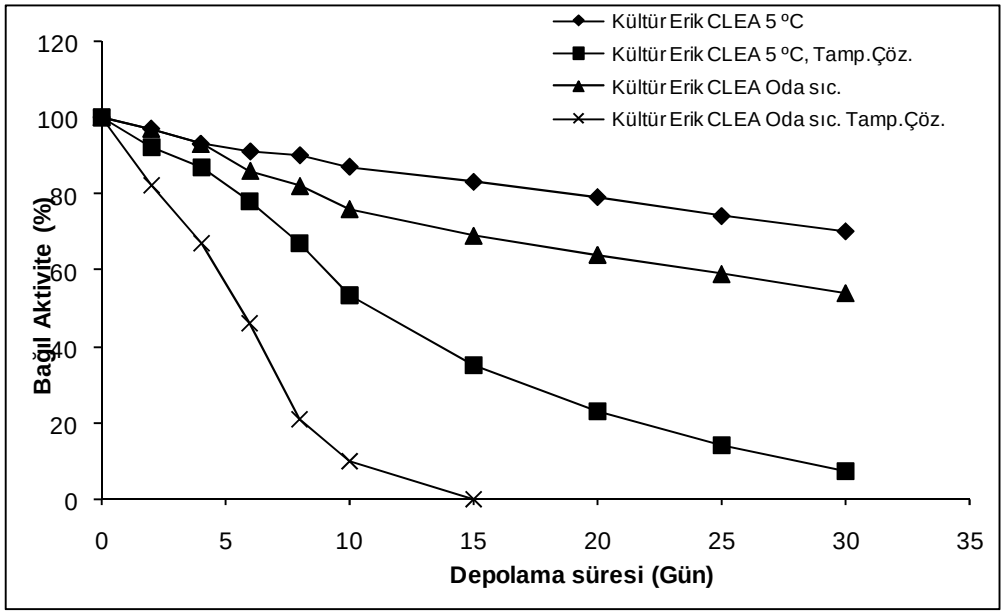
Şekil 4.21b. Acıbadem HNL-CLEA aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi.



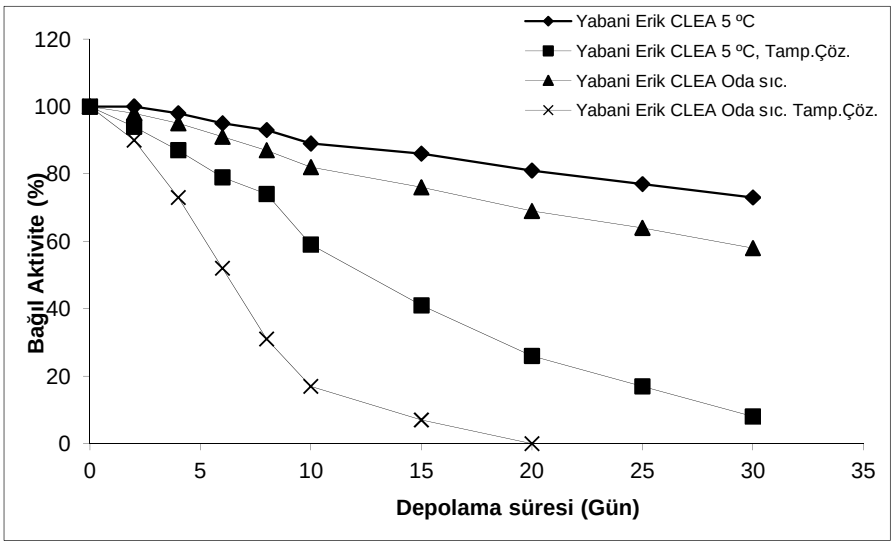
Şekil 4.21c. Kayısı HNL-CLEA aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi.



Şekil 4.21d. Zerdali HNL-CLEA aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi.



Şekil 4.21e. Kültür formu erik HNL-CLEA aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi.



Şekil 4.21f. Yabani erik HNL-CLEA aktivitesinin depolama süresine ve koşullarına bağlı değişimi.

Oda sıcaklığında 50 mM pH 6,2 fosfat tamponunda depolanan tüm HNL-CLEA örnekleri 15-20 gün depolama süresi sonunda başlangıç aktivitelerinin tamamını yitirirken, oda sıcaklığında kuru HNL-CLEA preparatları halinde bekletilen kültür formu badem, acıbadem, kayısı, zerdali, kültür erik ve yabani erik HNL-CLEA örnekleri ise sırasıyla başlangıç aktivitelerinin %62, 58, 67, 65, 54 ve 58'ini korumuşlardır. Buna karşın 5 °C'de 50 mM pH 6,2 fosfat tamponunda 30 gün bekletilen kültür formu badem, acıbadem, kayısı, zerdali, kültür erik ve yabani erik HNL-CLEA örnekleri sırasıyla başlangıç aktivitelerinin %10, 1, 14, 13, 7 ve 7'sini korurken 5 °C'de kuru HNL-CLEA preparatları halinde bekletilen kültür formu badem, acıbadem, kayısı, zerdali, kültür formu erik ve yabani erik HNL-CLEA örnekleri ise başlangıç aktivitelerinin sırasıyla %80, 83, 83, 75, 70 ve 73'ini korumuşlardır.

4.5. Serbest ve İmmobilize HNL'ların Rasemik Mandelonitrilin Kinetik Rezolusyonunda ve Enantiyosaf Siyanohidrin Sentezlerinde Kullanılmaları ile İlgili Bulgular

4.5.1. Rasemik Mandelonitrilin Kinetik Rezolusyonu İle İlgili Bulgular

Serbest ve immobilize HNL'lar kullanılarak gerçekleştirilen (*R/S*)-mandelonitrilin kinetik rezolusyonunda 4 saat reaksiyon süresi için elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7'de verilmiştir. Çizelge 4.7'den de görüleceği gibi, serbest ve immobilize HNL'lar (*R/S*)-mandelonitrilin kinetik rezolusyonu reaksiyonunda (*R*)-mandelonitrili seçici olarak benzaldehit ve HCN'ye ayrıştırmıştır. Serbest HNL örneklerinin kullanıldığı reaksiyonlarda (*S*)-mandelonitril yaklaşık %45 verim ve %80-96 arasında değişen enantiyomerik aşırılık (ee) değerleri ile elde edilmiştir. İmmobilize HNL'ların kullanıldığı (*R/S*)-mandelonitrilin kinetik rezolusyonunda ise (*S*)-mandelonitril yaklaşık %40-46 arası verim ve %88-95 arasında değişen ee değerleri ile elde edilmiştir. Sonuçlar immobilize HNL'ların rasemik mandelonitrilin kinetik rezolusyonu için serbest HNL'lar kadar etkin olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.7.Serbest ve immobilize HNL örnekleri ile gerçekleştirilen (*R*/*S*)-mandelonitrilin kinetik rezolüsyonu reaksiyonu için elde edilen verim ve ee değerleri.

Enzim	Verim (%)	ee (%)
Serbest Acıbadem HNL	45	90
Serbest Badem HNL	45	92
Serbest Zerdali HNL	45	94
Serbest Kayısı HNL	44	96
Serbest Yabani erik HNL	46	92
Serbest Kültür eriği HNL	45	80
Acıbadem HNL-Eup CM	44	90
Badem HNL-Eup CM	45	91
Zerdali HNL-Eup CM	42	94
Kayısı HNL-Eup CM	45	93
Yabani erik HNL-Eup CM	43	91
Kültür eriği HNL-Eup CM	42	89
Acıbadem HNL-CLEA	41	93
Badem HNL-CLEA	46	91
Zerdali HNL-CLEA	43	95
Kayısı HNL-CLEA	42	94
Yabani erik HNL-CLEA	42	92
Kültür eriği HNL-CLEA	43	89

4.5.2. Serbest ve İmmobilize HNL'ların Enantiyosaf (*R*)-mandelonitril, (*R*)-2-kloro mandelonitril, (*R*)-3,4-dihidroksimandelonitril ve (*R*)-2-hidroksi-4-fenil bütironitril Sentezlerinde Kullanılmaları İle İlgili Bulgular

Serbest ve immobilize HNL örnekleri kullanılarak gerçekleştirilen enantiyosaf (*R*)-mandelonitril, (*R*)-2-kloromandelonitril, (*R*)-3,4-dihidroksimandelonitril ve (*R*)-2-hidroksi-4-fenilbütironitril sentezleri için elde edilen sonuçlar sırasıyla Çizelge 4.8–4.11'de verilmiştir. Çizelge 4.8'den görüldüğü gibi (*R*)-mandelonitril, 96 saat reaksiyon süresi sonunda tüm immobilize enzim örnekleri için %100 verim ve %94-99 aralığında değişen ee ile sentezlenmiştir. Bu değerler serbest HNL için bulunan verim (%87-91) ve ee (%92-94) değerlerinden daha yüksektir. Ayrıca, (*R*)-mandelonitril sentezinde en yüksek ee değerlerine Eupergit CM üzerine immobilize edilen badem ve kayısı HNL'ları ve CLEA yöntemi ile immobilize edilen badem, kayısı ve kültür eriği HNL'larının kullanıldığı reaksiyonlarda ulaşılmıştır.

(*R*)-2-kloromandelonitril sentezinde immobilize HNL örnekleriyle elde edilen verimler yüksek (%85-100) olmasına rağmen elde edilen ee değerleri (%1-21) serbest HNL örnekleri kullanılarak gerçekleştirilenlerinkine (%52-60 verim, %44-47 ee) göre oldukça düşük bulunmuştur (Çizelge 4.9). Örneğin, Eupergit CM üzerine immobilize edilen HNL örnekleri ile gerçekleştirilen (*R*)-2-kloromandelonitril sentezi için elde edilen ürün rasemiktir.

(*R*)-3,4-dihidroksi mandelonitril sentezinde ise hemen hemen tüm immobilize HNL örnekleri için %100 verime ve %99'un üzerindeki ee değerine ulaşılmıştır (Çizelge 4.10). Serbest HNL örnekleri kullanımı ile elde edilen verim %90-95, ee ise %99'un üzerindedir.

Serbest HNL'lar kullanıldığında (*R*)-2-hidroksi-4-fenilbütironitril sentezinde %82-88 arası verim ve %82-94 arası ee değerleri elde edilmiştir. İmmobilize HNL'lar kullanıldığında aynı reaksiyon için verim ve ee değerleri ise sırasıyla %80-92 ve %89-99 aralıklarında elde edilmişlerdir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.8. Serbest ve immobilize HNL'lar ile gerçekleştirilen (*R*)-mandelonitril sentezi için verim ve ee değerleri.

Enzim	Verim (%)	ee (%)
Serbest Acıbadem HNL	91	93
Serbest Badem HNL	87	93
Serbest Zerdali HNL	90	94
Serbest Kayısı HNL	88	92
Serbest Yabani erik HNL	85	93
Serbest Kültür eriği HNL	86	92
Acıbadem HNL-Eup CM	100	97
Badem HNL-Eup CM	100	>99
Zerdali HNL-Eup CM	100	96
Kayısı HNL-Eup CM	100	>99
Yabani erik HNL-Eup CM	100	95
Kültür eriği HNL-Eup CM	100	97
Acıbadem HNL-CLEA	100	95
Badem HNL-CLEA	100	>99
Zerdali HNL-CLEA	100	97
Kayısı HNL-CLEA	100	>99
Yabani erik HNL-CLEA	100	94
Kültür eriği HNL-CLEA	100	>99

Çizelge 4.9. Serbest ve immobilize HNL'lar ile gerçekleştirilen (*R*)-2-kloromandelonitril sentezi için verim ve ee değerleri.

Enzim	Verim (%)	ee (%)
Serbest Acıbadem HNL	60	45
Serbest Badem HNL	52	45
Serbest Zerdali HNL	58	46
Serbest Kayısı HNL	66	47
Serbest Yabani erik HNL	54	44
Serbest Kültür eriği HNL	59	46
Acıbadem HNL-Eup CM	90	2
Badem HNL-Eup CM	88	2
Zerdali HNL-Eup CM	85	1
Kayısı HNL-Eup CM	90	1
Yabani erik HNL-Eup CM	87	2
Kültür eriği HNL-Eup CM	85	1
Acıbadem HNL-CLEA	100	19
Badem HNL-CLEA	100	21
Zerdali HNL-CLEA	100	20
Kayısı HNL-CLEA	100	21
Yabani erik HNL-CLEA	100	17
Kültür eriği HNL-CLEA	100	19

Çizelge 4.10. Serbest ve immobilize HNL'lar ile gerçekleştirilen (*R*)-3,4-dihidroksi mandelonitril sentezi için verim ve ee değerleri.

Enzim	Verim (%)	ee (%)
Serbest Acıbadem HNL	92	>99
Serbest Badem HNL	90	>99
Serbest Zerdali HNL	94	>99
Serbest Kayısı HNL	92	>99
Serbest Yabani erik HNL	95	>99
Serbest Kültür eriği HNL	91	>99
Acıbadem HNL-Eup CM	100	>99
Badem HNL-Eup CM	100	>99
Zerdali HNL-Eup CM	100	>99
Kayısı HNL-Eup CM	100	>99
Yabani erik HNL-Eup CM	100	>99
Kültür eriği HNL-Eup CM	90	>99
Acıbadem HNL-CLEA	100	>99
Badem HNL-CLEA	100	>99
Zerdali HNL-CLEA	100	>99
Kayısı HNL-CLEA	100	>99
Yabani erik HNL-CLEA	100	>99
Kültür eriği HNL-CLEA	100	>99

Çizelge 4.11. Serbest ve immobilize HNL'lar ile gerçekleştirilen (*R*)-2-hidroksi-4-fenilbütiro nitril sentezi için verim ve ee değerleri.

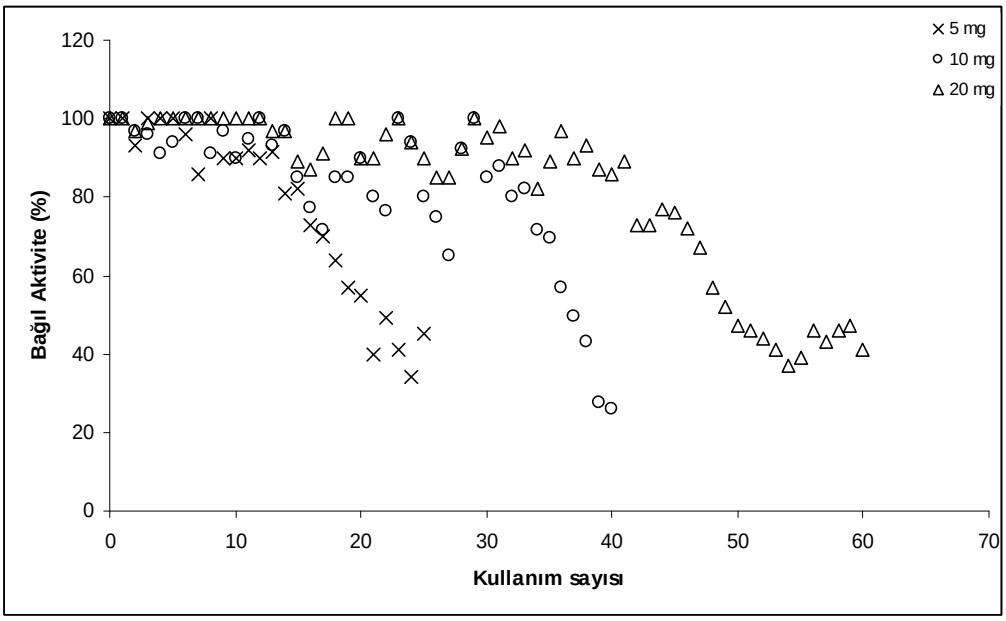
Enzim	Verim (%)	ee (%)
Serbest Acıbadem HNL	87	94
Serbest Badem HNL	83	89
Serbest Zerdali HNL	82	87
Serbest Kayısı HNL	88	83
Serbest Yabani erik HNL	83	82
Serbest Kültür eriği HNL	82	90
Acıbadem HNL-Eup CM	90	>99
Badem HNL-Eup CM	80	90
Zerdali HNL-Eup CM	85	92
Kayısı HNL-Eup CM	90	90
Yabani erik HNL-Eup CM	88	93
Kültür eriği HNL-Eup CM	90	92
Acıbadem HNL-CLEA	92	92
Badem HNL-CLEA	83	91
Zerdali HNL-CLEA	89	93
Kayısı HNL-CLEA	81	91
Yabani erik HNL-CLEA	87	89
Kültür eriği HNL-CLEA	83	90

Bu tez çalışmasında sentezlenen siyanohidrinlerin verimleri ve ee değerleri HPLC analizleri sonucunda ilgili siyanohidrin kromatogramlarının alanlarından hesaplanmıştır (EK 1-8). Yapıları ise FT-IR ve NMR kullanılarak belirlenmiştir (EK 11-22). FT-IR analizleri sonucunda elde edilen spektrumlar değerlendirildiğinde 1710-1690 cm^{-1}'de sentezlerde çıkış maddesi olarak kullanılan aldehitlerdeki karbonil (-C=O) grubuna ait pikin kaybolduğu, buna karşın sentezlenen siyanohidrinler için –OH gruplarının 3400-3300 cm^{-1}'de, $-C\equiv N$ gruplarının ise 1500-1400 cm^{-1}'de verdiği pikler açık bir şekilde görülmektedir. Siyanohidrin sentezi sonucunda oluşan –OH gruplarının varlığı ^{1}H NMR (mandelonitril için 4,1 ppm, 2-kloromandelonitril için 3,5 ppm, 3,4-dihidroksi mandelonitril için 3,4 ppm, 2-hidroksi-4-fenil bütironitril için 3,6 ppm) spektrumu ile de belirlenmiştir. Örneklerin ^{13}C NMR spektrumları değerlendirildiğinde mandelonitril, 2-kloromandelonitril, 3,4-dihidroksi mandelonitril ve 2-hidroksi-4-fenil bütironitril için

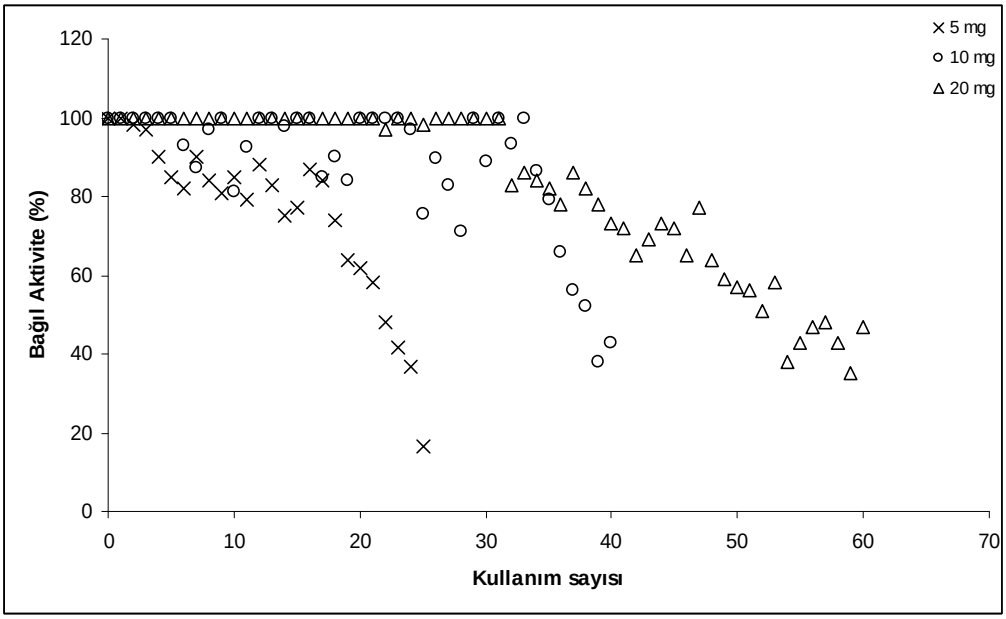
sırasıyla 63,2, 60,9, 60,1 ve 60 ppm'de oluşan pikler C atomuna –OH grubunun bağlı olduğunu, 119,2, 117,9, 120, 120 ppm'de oluşan pikler ise —C≡N grubunun varlığını göstermektedir.

4.6. İmmobilize HNL Örneklerinin Kesikli Ve Sürekli Reaktörde Kullanımı İle İlgili Bulgular

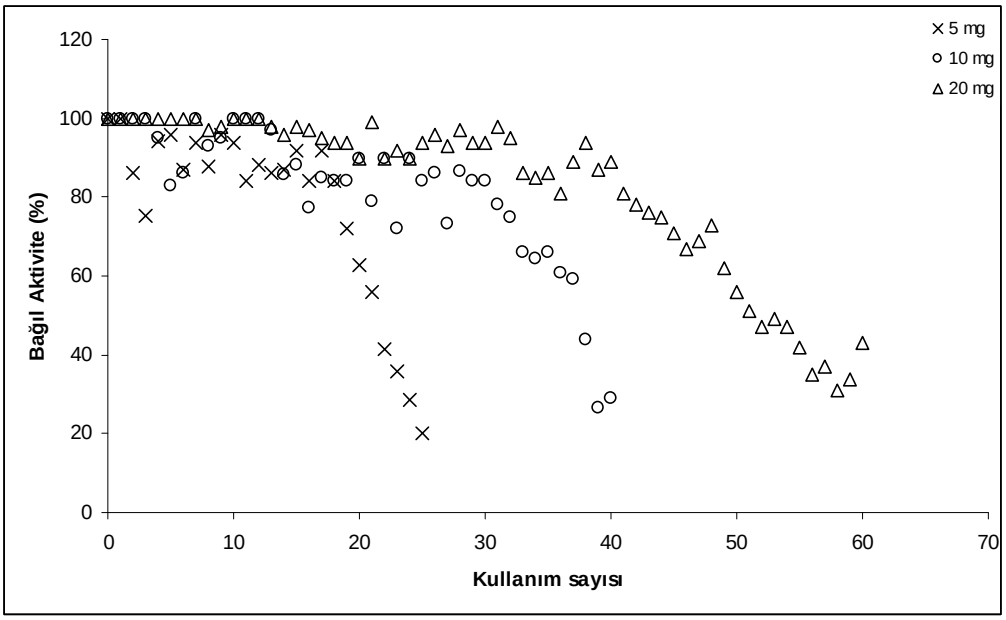
HNL-Eupergit CM'lerin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim için elde edilen bulgular Şekil 4.22a-22f'de verilmiştir.



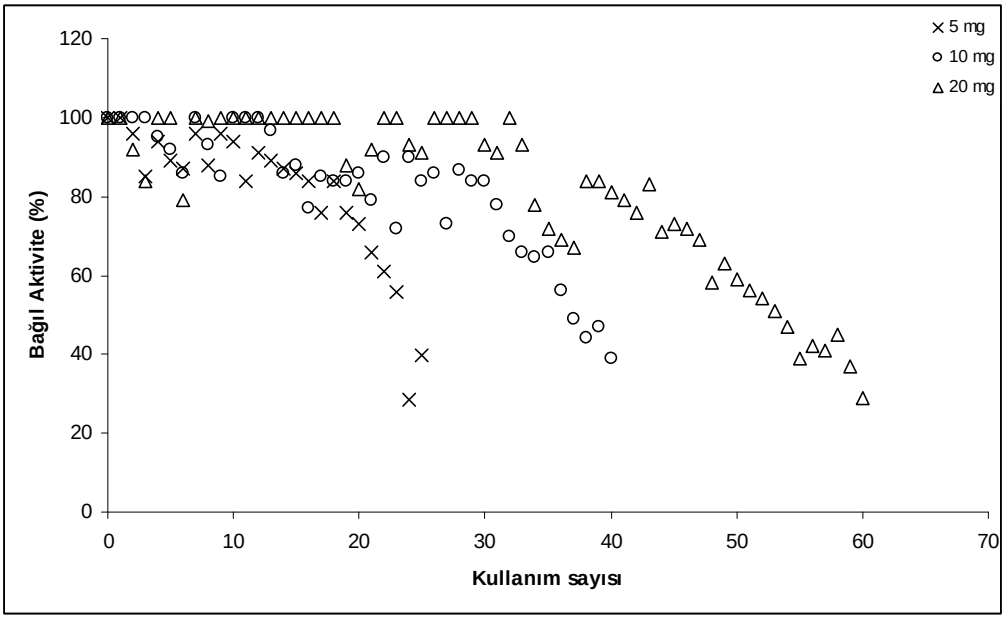
Şekil 4.22a.Kültür formu badem HNL-Eupergit CM örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim.



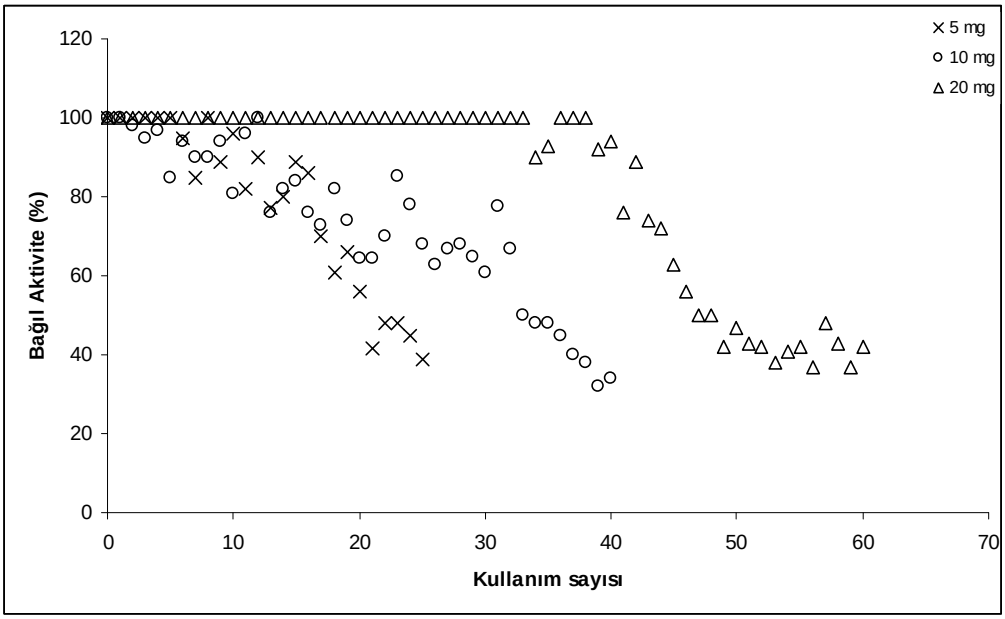
Şekil 4.22b. Acıbadem HNL-Eupergit CM örneklerinin 5,10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim.



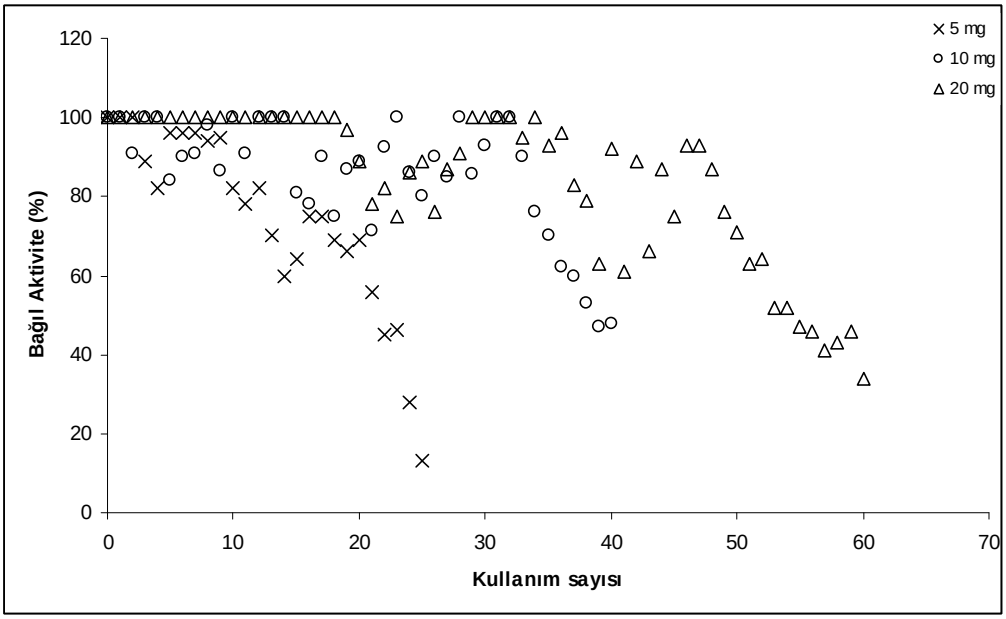
Şekil 4.22c. Kayısı HNL-Eupergit CM örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim.



Şekil 4.22d. Zerdali HNL-Eupergit CM örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim.



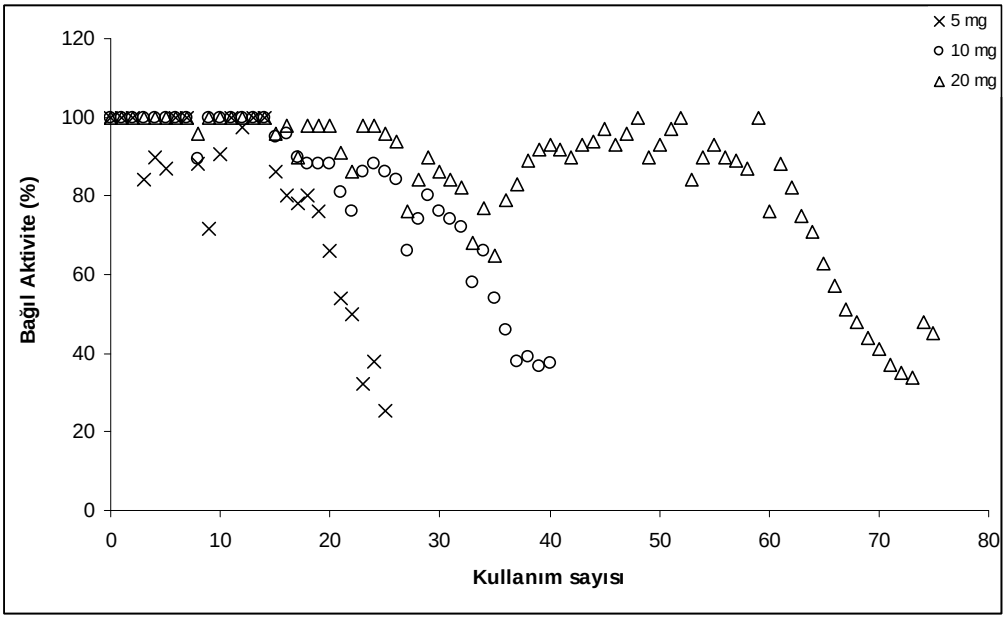
Şekil 4.22e.Kültür formu erik HNL-Eupergit CM örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim.



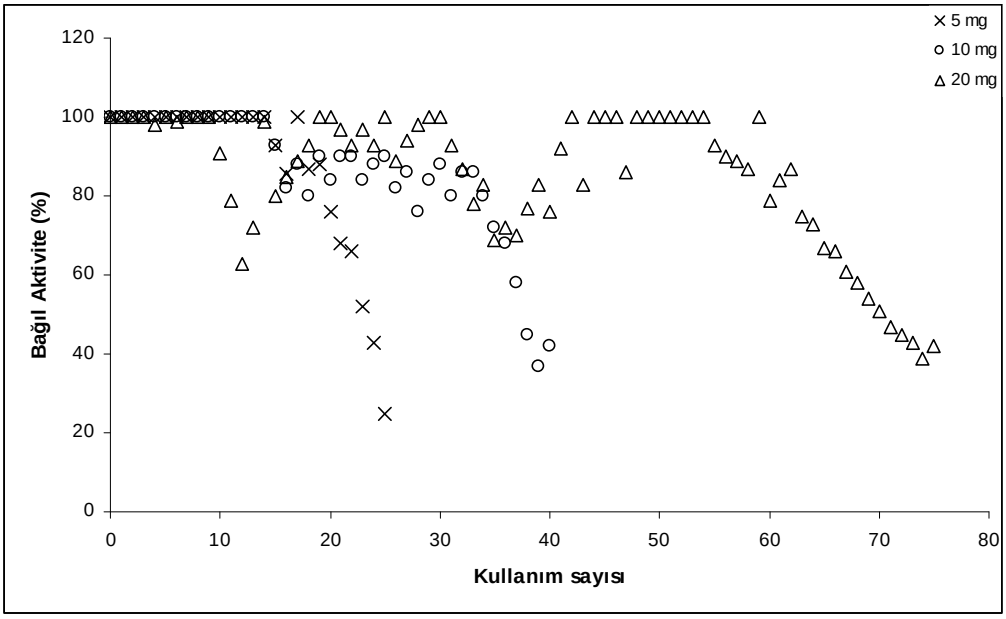
Şekil 4.22f.Yabani erik HNL-Eupergit CM örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim.

Kesikli reaktörde, HNL-Eupergit CM örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'ları kullanıldığında kültür formu badem HNL sırasıyla 22, 37 ve 49; acıbadem HNL sırasıyla 22, 38 ve 52; kayısı HNL sırasıyla 21, 38 ve 51; zerdali HNL sırasıyla 23, 37 ve 53; kültür formu erik HNL sırasıyla 22, 33 ve 47; yabani erik HNL sırasıyla 22, 38 ve 54 tekrar kullanımdan sonra başlangıç aktivitelerinin yaklaşık %50'sini kaybetmişlerdir.

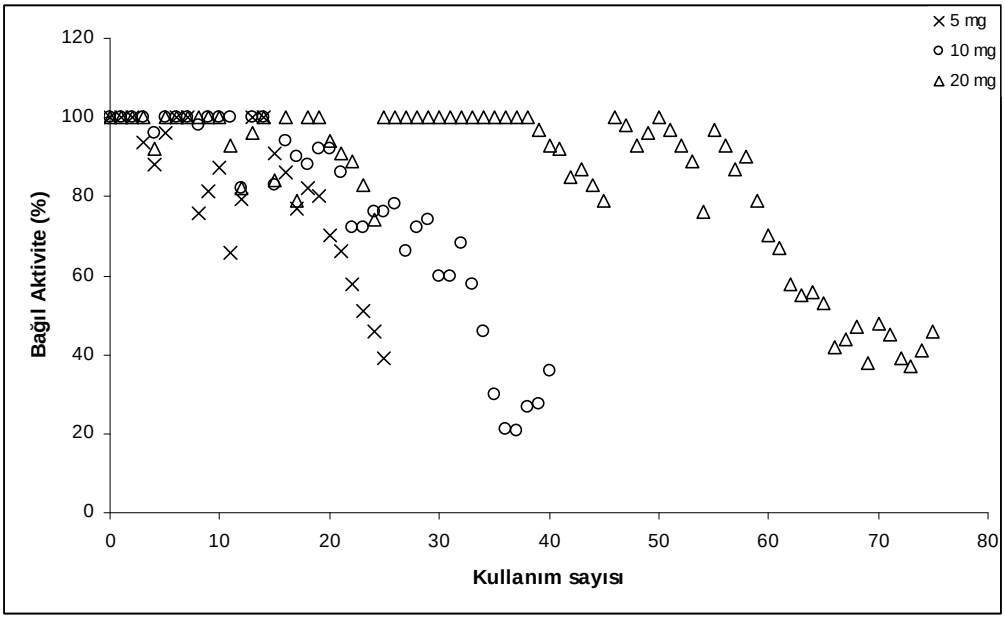
HNL-CLEA örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim için elde edilen bulgular Şekil 4.23a-23f'de verilmiştir.



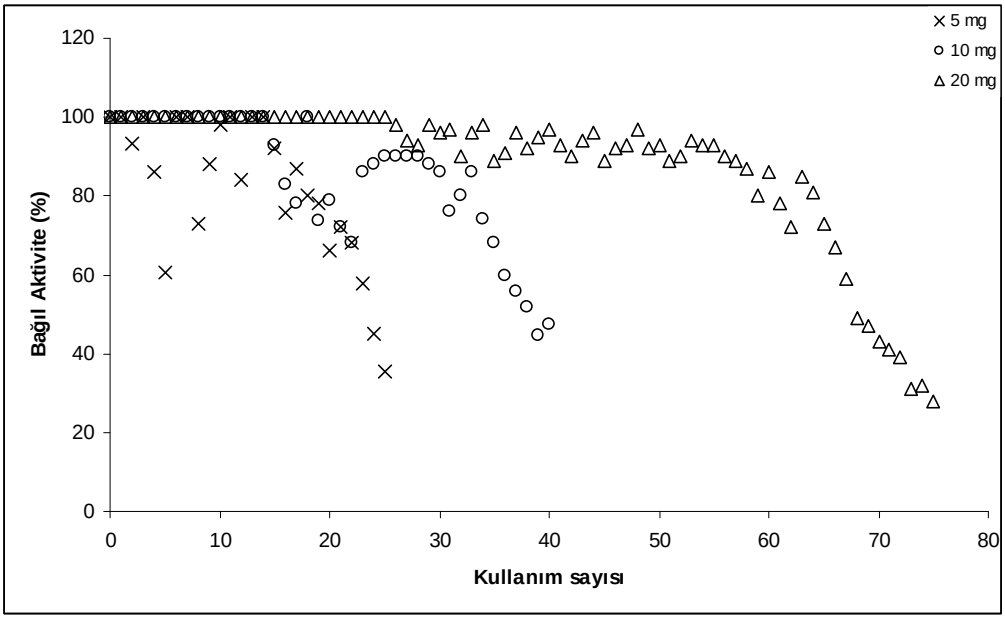
Şekil 4.23a. Kültür formu badem HNL-CLEA örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim.



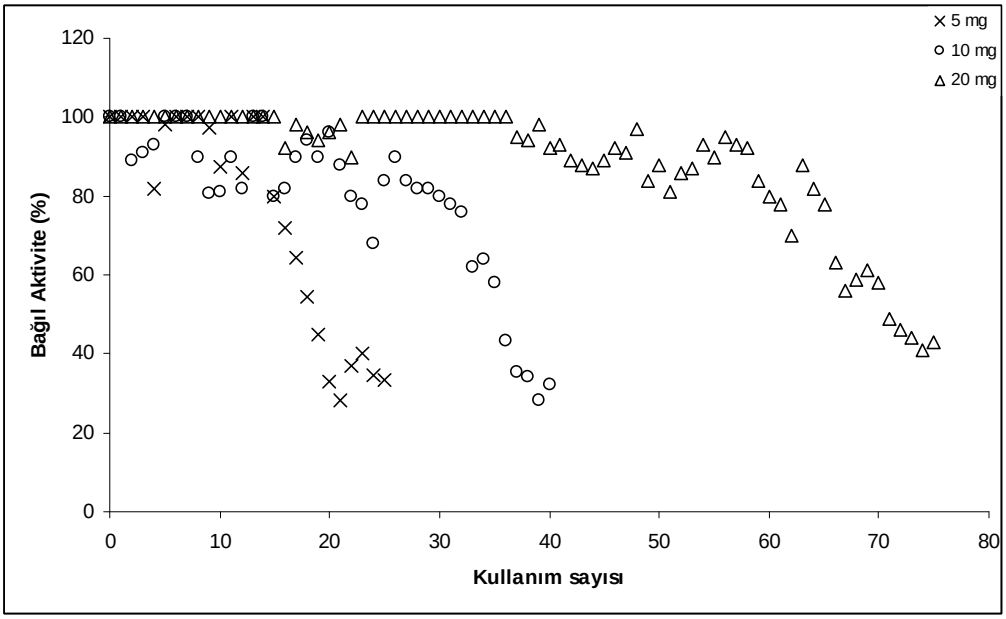
Şekil 4.23b.Acıbadem HNL-CLEA örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim.



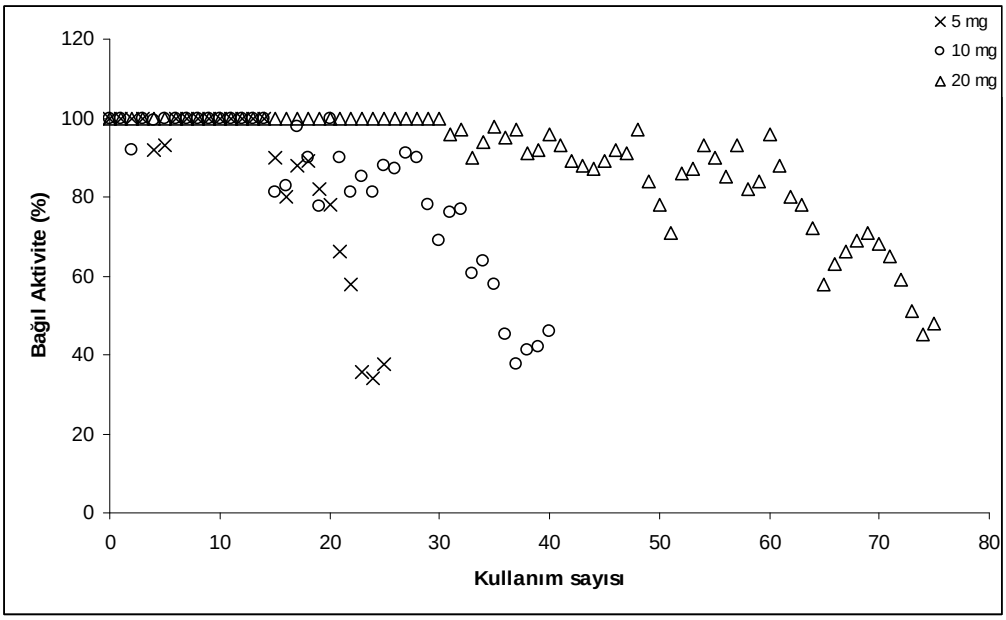
Şekil 4.23c. Kayısı HNL-CLEA örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim.



Şekil 4.23d.Zerdali HNL-CLEA örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim.



Şekil 4.23e.Kültür formu HNL-CLEA örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim.



Şekil 4.23f.Yabani erik HNL-CLEA örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'larının kesikli reaktörde tekrar kullanımlarına bağlı olarak bağıl aktivitelerindeki değişim.

Kesikli reaktörde, HNL-CLEA örneklerinin 5, 10 ve 20 mg'ları kullanıldığında kültür formu badem HNL-CLEA sırasıyla 22, 36 ve 67; acıbadem HNL-CLEA sırasıyla 23, 38 ve 70; kayısı HNL-CLEA sırasıyla 23, 34 ve 65; zerdali HNL-CLEA sırasıyla 24, 38 ve 68; kültür formu erik HNL-CLEA sırasıyla 19, 35 ve 71; yabani erik HNL-CLEA sırasıyla 22, 36 ve 73 tekrar kullanımdan sonra başlangıç aktivitelerinin yaklaşık %50'sini kaybetmişlerdir.

İmmobilize HNL'ların farklı miktarları kesikli reaktörde %50 aktiviteleri kalıncaya kadar kullanıldığında elde edilen aktivite toplamları (prodüktivite) Çizelge 4.12'de verilmiştir. Eupergit CM üzerine immobilize edilen HNL'lar arasında kültür eriği HNL'nın diğerlerine göre; HNL-CLEA örnekleri arasında ise yabani erik HNL-CLEA'ın diğer HNL CLEA'ların aktivite toplamlarına göre yüksek olduğu görülmüştür.

Bu tez çalışmasında immobilize HNL örneklerinin sürekli reaktörde tekrar kullanımları ile ilgili çalışmalar yapılmış, farklı etanol/tampon (50 mM, pH 4,0) oranlarına sahip substrat çözeltileri kullanılmış ve farklı akış hızlarında reaktör sistemine gönderilmiş, ancak başarılı sonuçlar alınamamıştır. Zira substrat çözeltisinin sürekli reaktör sisteminden geçirilmesinin reaktör sisteminde basınca neden olduğu ve oluşan bu basıncın (*R/S*)-mandelonitrilin kendiliğinden parçalanma hızını arttırdığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.12. İmmobilize HNL'ların farklı miktarları kesikli reaktörde %50 aktiviteleri kalıncaya kadar kullanıldığında elde edilen aktivite toplamları.

HNL kaynağı	İmmobilize HNL (mg)	Aktivite toplamları
Kültür Bademi Eup. CM	5	1,79x10^3 U/g Eup CM
	10	2,35x10^3 U/g Eup CM
	20	2,49 x10^3 U/g Eup CM
Acıbadem Eup. CM	5	0,66x10^3 U/g Eup CM
	10	0,93x10^3 U/g Eup CM
	20	1,17 x10^3 U/g Eup CM
Kayısı Eup. CM	5	0,37x10^3 U/g Eup CM
	10	0,55x10^3 U/g Eup CM
	20	0,92 x10^3 U/g Eup CM
Zerdali Eup. CM	5	0,67x10^3 U/g Eup CM
	10	0,87x10^3 U/g Eup CM
	20	1,24 x10^3 U/g Eup CM
Kültür erik Eup. CM	5	3,38x10^3 U/g Eup CM
	10	3,96x10^3 U/g Eup CM
	20	4,21 x10^3 U/g Eup CM
Yabani Erik Eup. CM	5	0,54x10^3 U/g Eup CM
	10	0,66x10^3 U/g Eup CM
	20	0,89 x10^3 U/g Eup CM
Kültür Bademi CLEA	5	0,84x10^3 U/g CLEA
	10	0,97x10^3 U/g CLEA
	20	1,36 x10^3 U/g CLEA
Acıbadem CLEA	5	1,33x10^3 U/g CLEA
	10	1,88x10^3 U/g CLEA
	20	2,14 x10^3 U/g CLEA
Kayısı CLEA	5	1,29x10^3 U/g CLEA
	10	1,32x10^3 U/g CLEA
	20	1,45 x10^3 U/g CLEA
Zerdali CLEA	5	0,64x10^3 U/g CLEA
	10	0,93x10^3 U/g CLEA
	20	1,18 x10^3 U/g CLEA
Kültür erik CLEA	5	0,69x10^3 U/g CLEA
	10	0,86x10^3 U/g CLEA
	20	0,94x10^3 U/g CLEA
Yabani Erik CLEA	5	1,98x10^3 U/g CLEA
	10	2,54x10^3 U/g CLEA
	20	2,67x10^3 U/g CLEA

4.8. Tartışma

HNL kaynağı olarak bilinen meyvelerle taksonomik olarak akraba olan, daha önce HNL kaynağı olarak kullanılmamış, kolay bulunabilen meyve çekirdeklerinden HNL'ın saflaştırılması için yapılan ön çalışmalarda sırasıyla $NH_4(SO_4)_2$ çöktürmesi, hidrofobik etkileşim kromatoğrafisi ve moleküler eleme kromatoğrafisi ile saflaştırma çalışmalarına devam edilmiştir. HNL şimdiye kadar HNL kaynağı olarak kullanılmamış olan zerdali (*Prunus pseudoarmeniaca*), kayısı (*Prunus armeniaca*) doğal olarak yetişen badem (acıbadem) (*Prunus amygdalus turcomenica*), kültür formu badem (*Prunus dulcis*), yabani erik (*Prunus cerasifera*) ve kültür formu erik stanley (*Prunus domestica*) meyvelerinin çekirdeklerinden sırasıyla 21, 29, 14, 11, 14 ve 20 kat saflaştırma oranları ve %29, 52, 19, 28, 26 ve 34 verimle saflaştırılmıştır.

Literatürlerde çeşitli kaynaklardan çeşitli saflaştırma metodları kullanılarak yapılan HNL'ın saflaştırılması ile ilgili çalışmaların sonuçları bulunmaktadır. Bu çalışmaların sonuçlarında oldukça farklı saflaştırma oranları ve verimleri rapor edilmiştir. Wajant ve ark. (1995) *Phlebodium aureum* yapraklarından HNL'ı saflaştırmak için ham ekstrakta sırasıyla anyon değiştirici Q sefaroz FF, kromatofokuslama, jel filtrasyonu, Mono Q (pH 7,5) ve Mono S (pH 3,9) olmak üzere 5 farklı kolon kromatoğrafisi uygulanmışlar ve %21 verimle 1600 kat saflaştırmışlardır. Ueatrongchit ve ark. (2010) *Passiflora edulis* yapraklarından HNL'ı saflaştırmak için %20-30 $NH_4(SO_4)_2$ çöktürmesinden sonra sırasıyla DEAE-Toyopearl, Bütil-Toyopearl, DEAE-Toyepearl, ConA Sefaroz ve Fenil sefaroz kolon kromatoğrafisi uygulamışlar ve %0,27 verimle 55 kat saflaştırmışlardır. Fukuta ve ark., (2011) Japon kayısısı (*Prunus mume*) çekirdeklerinden HNL'ı saflaştırmak için (%0-30) $NH_4(SO_4)_2$ çöktürmesi ve sırasıyla DEAE-Toyopearl, Phenyl-Toyopearl ve Superdex 200 10/30 kolon kromatoğrafisi yöntemlerini kullanmışlar ve HNL'ı %14,6 verimle 24,4 kat saflaştırdıklarını bildirmişlerdir.

Prunus türü altı çeşit meyvenin çekirdeklerinden saflaştırdığımız HNL'ların her birinin yaklaşık 25 kDa ağırlığında özdeş 4 alt üniteye sahip oldukları belirlenmiştir. Jansen ve ark. (1992) *Prunus amygdalus* HNL'ın 72 kDa ağırlığında

ve tek bir alt birime sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bizim bulgularımızda ***Prunus amygdalus turcomeniaca*** için de molekül ağırlığı 100 kDa ve alt birim sayısı 4 olarak belirlenmiştir. Literatürde çeşitli bitkilerin çeşitli toprak üstü organlarından saflaştırılmış olan HNL'lar için bildirilen moleküler ağırlıkları ve alt birimleri ile ilgili bazı örnekler Çizelge 4.13'de verilmiştir. Çizelge 4.13'den de görüleceği gibi çeşitli bitkisel kaynakların toprak üstü organlarından elde edilen HNL'ların moleküler ağırlıkları oldukça geniş bir aralıktadır ve alt birim sayıları çeşitlilik göstermektedir.

Saflaştırılan HNL'ların FAD prostetik grubu içerip içermediği araştırıldığında elde edilen HPLC kromatoğramlarına (Ek 9, 10) göre FAD içerdiği belirlenmiştir. Bu sonuç, literatürde de belirtildiği gibi ***Prunus*** türü meyvelerin çekirdeklerinden elde edilen HNL'ların FAD içerdiği bilgisini desteklemektedir.

Çizelge 4.13. Çeşitli bitkilerin çeşitli toprak üstü organlarından saflaştırılan HNL'ların moleküler ağırlıkları ve sahip olduğu alt birim sayıları.

HNL	Bitki Organı	Moleküler ağırlık (kDa)	Alt birim sayısı	Literatür
Prunus seritona	çekirdek	50	1	Wu ve Poulton, 1991
Prunus amygdalus	çekirdek	72	1	Jansen ve ark.,,1992
Linum usitatissimum	tohum	108	2	Wajant ve ark.,, 1995
Manihot esculenta	yaprak	92–124	4	Hughes, 1994
Sorghum bicolor	tohum	82-87	2	Wajant ve ark., 1996
Manihot esculenta	yaprak sapı	102	4	Chueskul ve Chulavatnatol, 1996
Passiflora edulis	yaprak	15	1	Ueatrongchıt ve ark., 2010
Prunus mume	çekirdek	58	1	Fukuta ve ark., 2011

Saflaştırılan HNL'lara pH'nın etkisinin araştırılması ile ilgili çalışmalarımızda maksimum liyaz aktivitesinin ölçüldüğü pH değeri kayısı HNL için 5,5 (50 mM asetat tamponu), diğerleri için ise 6,0 (50 mM sitrat tamponu) olarak belirlenmiştir. pH 6,5'dan daha yüksek pH değerinde, kör denemede (HNL içermeyen), mandelonitrilin benzaldehit ve HCN'e spontan ayrışmasının arttığı; bu nedenle pH 6,5'in üzerindeki pH değerlerindeki enzimatik aktivite ölçüm sonuçlarının sadece enzimatik aktiviteyi yansıtmadığı belirlendiğinden yüksek pH'larda aktivite ölçülmemiştir. Literatürde *Prunus amygdalus, Prunus serotinal, Prunus capuli, Prunus lyonii* ve *Prunus laurocerasus* gibi çeşitli Prunus türü meyvelerin çekirdeklerinden saflaştırılan HNL'lar için maksimum aktivitenin ölçüldüğü pH değerinin 5,5-7,0 arasında olduğu bildirilmiştir (Sharma ve ark.,, 2005).

Saflaştırılan HNL'lar için en uygun sıcaklık 25°C olarak belirlenmiştir. 30° C'den daha yüksek sıcaklıklara çıkıldıkça mandelonitrilin benzaldehit ve HCN'e spontan ayrışmasının arttığı; sıcaklık 25°C'den daha düşük olduğunda ise mandelonitrilin spontan ayrışmasının olmadığı ancak HNL aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir.

Saflaştırılan HNL'ların liyaz aktiviteleri için yapılan kinetik çalışmaların sonucunda K_m–V_{max} değerleri kültür formu badem HNL için 0,07 mM–21 U/mg prot.; acıbadem HNL için sırasıyla 0,38 mM–197,2 U/mg prot.; kayısı HNL için 0,55 mM–125,4 U/mg prot.; zerdali HNL için 0,07 mM–28,2 U/mg prot; yabani erik HNL için 0,31 mM–174 U/mg prot.; kültür formu erik HNL için 0,41 mM–51 U/mg prot. olarak hesaplanmıştır. Literatürde, Dadashipour ve Asano'nun diğer bilimsel makalelerden derledikleri derleme makalesinde çeşitli kaynaklardan saflaştırılan HNL'lar için substrat olarak mandelonitril kullanılarak yapılan çalışmalarda K_m değerleri *Prunus serotina* HNL, *Prunus dilcus* HNL, *Sorghum bicolor* HNL ve *Prunus lyonii* HNL için sırasıyla 0,172, 0,290, 0,790, ve 0,093 mM olarak rapor edilmiştir (Dadashipour ve Asano, 2011). Bu tez çalışmasında kullandığımız HNL kaynakları ile ilgili literatür bilgisi bulunmadığından dolayı HNL'lar için K_m değerlerinin literatürdeki verilerle birebir karşılaştırılmaları mümkün olamamıştır.

Bu tez çalışması önerilirken saflaştırılan HNL'lardan liyaz aktivitesi bakımından katalitik etkinliği en yüksek olanın immobilizasyonu planlanmıştı. Ancak saflaştırılan HNL'ların katalitik etkinliklerinin birbirine yakın olması ve seçim yapılamamasından dolayı tüm kaynaklardan saflaştırılan HNL'lar Eupergit CM üzerine immobilize edilmişlerdir. Eupergit CM üzerine yapılan immobilizasyon çalışmasında HNL'ların 1'er g Eupergit CM üzerine bağlanma verimleri kültür formu badem HNL'ı için %82, acıbadem HNL için %86, kayısı-HNL için %82, zerdali-HNL'ı için %90, yabani erik HNL'ı için %84, kültür formu erik HNL'ı için %89 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar HNL'nin Eupergit CM üzerine bağlanan HNL miktarının yüksek olduğunu göstermektedir. Ancak, bağlanan HNL miktarının yüksek olması, immobilize HNL'ların yüksek aktivite göstermesi gerektiği anlamına gelmemektedir. HNL'ların Eupergit CM üzerine immobilizasyon sonrasında liyaz aktivitesi açısından korunan aktiviteleri kültür formu badem HNL'ı için %95, acıbadem HNL için %13, kayısı-HNL için %14, zerdali-HNL'ı için %36, yabani erik HNL'ı için %7, kültür formu erik HNL'ı için %53 olarak belirlenmiştir.

Eupergit CM üzerine immobilize edilen HNL için optimum pH değeri 5,5 olarak belirlenmiştir. İmmobilizasyondan sonra optimum pH'nın serbest HNL'lardan daha düşük olmasının nedenini HNL'ın oksiran grupları ile kovalent bağlanması sonucu Eupergit desteklerin hidrofobik karakterlerinden dolayı mikroçevredeki dielektrik sabitlerinin azalması ve sonucunda immobilize enzim üzerindeki asidik ve bazik grupların asitlik sabitlerinin değişmesi olabilir. HNL-CLEA örnekleri için bir kıyaslama yapıldığında ise maksimum liyaz aktivitesinin hesaplandığı pH değerinde serbest HNL örneklerininkinden önemli bir fark görülmemiştir.

İmmobilize HNL'ların liyaz aktivitesine sıcaklığın etkisi incelendiğinde immobilize HNL'lar için en uygun sıcaklık 25°C olarak belirlenmiştir. 30° C'den daha yüksek sıcaklıklara çıkıldıkça mandelonitrilin benzaldehit ve HCN'e spontan ayrışmasının arttığı; sıcaklık 25°C'den daha düşük olduğunda ise mandelonitrilin spontan ayrışmasının olmadığı ancak HNL aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir.

Belirlenen optimum koşullarda immobilize HNL'lar için kinetik parametrelerin belirlenmesi için yapılan çalışmaların sonuçları (Çizelge 4.14) değerlendirildiğinde hem serbest hem de immobilize HNL'lar içerisinde genel olarak

en yüksek k_{cat}/K_m değerine kayısı HNL'ların sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer immobilize HNL'ların katalitik etkinlikleri yaklaşık 10 kat düzeyinde azalmış olmakla beraber kayısı HNL-Eup CM'nin k_{cat}/K_m değeri serbest ile aynı bulunmuştur. HNL-CLEA'lar hazırlanırken yöntem gereği immobilizasyon süresinin sonunda eter ve aseton ile muamele edilen HNL-CLEA'lardan elde edilen süzüntüde eter, aseton ve glutaraldehit bulunmasından dolayı agregat oluşturmayan HNL miktarı protein tayini yöntemleri ile belirlenememiş ve HNL-CLEA'lar için K_m ve V_{max} değerleri hesaplanabilirken k_{cat} değerleri hesaplanamamıştır. Bu nedenle diğer immobilize HNL'ların katalitik etkinlikleri ile karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak Çizelge 4.14'den görüleceği gibi HNL-CLEA'lar arasında en yüksek V_{max} değerinin kayısı HNL-CLEA'ya ait olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.14. Serbest HNL, HNL-Eupergit CM ve HNL-CLEA örnekleri için kinetik parametreler (V_{max}, k_{cat} ve k_{cat}/K_m).

	V_{max} (U/mg prot.)	V_{max} (U/g destek)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1}M^{-1}$)
Zerdali serbest HNL	28,2	-	$5,17x10^4$	$7,4x10^8$
Kayısı serbest HNL	125,4	-	$2,29x10^5$	$4,16x10^8$
Acıbadem serbest HNL	197,2	-	$3,62x10^5$	$9,52x10^8$
Yabanik Erik serbest HNL	174	-	$3,18x10^5$	$1,02x10^8$
Kültür Erik serbest HNL	51	-	$9,34x10^4$	$2,27x10^8$
Badem serbest HNL	21	-	$3,84x10^4$	$5,48x10^8$
Zerdali HNL-Eup CM	10	81 U/g Eup CM	$1,8x10^4$	$1,2x10^7$
Kayısı HNL-Eup CM	17,1	126,2 U/g Eup CM	$3,13x10^4$	$4,16x10^8$
Acıbadem HNL-Eup CM	26	201,2 U/g Eup CM	$4,76x10^4$	$3,66x10^7$
Yabani Erik HNL-Eup CM	11,7	88,5 U/g Eup CM	$2,15x10^4$	$2,8x10^7$
Kültür Erik HNL- Eup CM	27	216,3 U/g Eup CM	$4,9x10^4$	$7,0x10^6$
Badem HNL- Eup CM	22,4	165,3 U/g Eup CM	$4,1x10^4$	$9,8x10^6$
Zerdali HNL-CLEA	-	16 U/g CLEA	-	-
Kayısı HNL-CLEA	-	48 U/g CLEA	-	-
Acıbadem HNL-CLEA	-	18 U/g CLEA	-	-
Yabanik Erik HNL-CLEA	-	22 U/g CLEA	-	-
Kültür Erik HNL-CLEA	-	20 U/g CLEA	-	-
Badem HNL-CLEA	-	18 U/g CLEA	-	-

İmmobilize HNL'ların örneklerinin 25 ve 50°C'deki termal kararlılıklarının serbest HNL'lara göre arttığı belirlenmiştir. Bunun nedeni HNL'ın Eupergit

desteklere kovalent immobilizasyonu ile enzimin destek tarafından sıcaklık değişimlerine karşı tamponlamış olması ile fiziksel ve mekaniksel kararlılıklarının artması; HNL-CLEA'larda ise bir çok noktadan çapraz bağlanmaların olması ve böylece HNL'ın termal kararlılığının artması olabilir.

Tüm immobilize HNL'lar arasında kuru preparatlar (HNL-CLEA'lar yaklaşık %15 internal su içeriyor) halinde bekletilerek depolanan immobilize HNL'lar tampon içerisinde bekletilen immobilize HNL'lara göre daha yüksek depolama kararlılıkları göstermişlerdir.

HNL'lar kofaktör gerektirmemeleri ve karboligasyon aktiviteleri ile enantiyosaf siyanohidrinlerin sentezini ılımlı koşullarda yüksek verim ve ee değerleri ile gerçekleştirebilmeleri nedeniyle enantiyosaf siyanohidrinlerin sentezlerinde kimyasal katalizörlere alternatif olmuşlardır. HNL'lar tarafından katalizlenen enantiyosaf siyanohidrin seztezlerinde en önemli problemlerden birisi enzimatik olmayan (kimyasal) reaksiyonun baskılanmasında karşılaşılan zorluktur. Reaksiyon ortamı olarak tampon çözeltilerin kullanıldığı sistemlerde bu baskılanma kullanılan tampon çözeltinin pH'sını düşürmek (3,5-4,0 aralığı) ile kısmen sağlanabilinir. Kimyasal reaksiyonun diğer bir baskılanma yolu ise suyla karışmayan bir organik çözücü (etil asetat, diizopropil eter, *tert*-butil metil eter gibi) ve bir tampondan oluşan karışımın reaksiyon ortamı olarak kullanılmasıdır. Tükel ve ark. (2010) kısmi saflaştırılmış *Prunus pseudoarmeniaca* HNL'ı Eupergit C ve Eupergit C 250 L üzerine immobilize edilen *Prunus pseudoarmeniaca* HNL'ların karboligasyon aktivitesini enantiyosaf (*R*)-mandelonitril sentezi için sitrat tamponu/TBME karışımı içerisinde farklı pH'larda (4,0-6,0) test etmişlerdir. Reaksiyon ortamının pH'sı 4,0'den 6,0'a değiştirildiğinde (*R*)-mandelonitril veriminin %100'lerden %25-32 aralığına düştüğünü, (*R*)-mandelonitrilin ee değerinin ise %99'dan %80'a düştüğünü rapor etmişlerdir. Nanda ve ark. (2005) kısmi saflaştırılmış *Prunus mume* HNL'ı kullanılarak farklı tamponlarda gerçekleştirilen (*R*)-mandelonitril sentezi için pH'nın (*R*)-mandelonitrilin ee değerine etkisini incelemişlerdir. Reaksiyon pH'sı 4,0'den 6,5'ya çıkartıldığında (*R*)-mandelonitrilin ee değerinin %99'dan 0'a düştüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca, organik çözücü/sitrat tamponu (pH 4,0) ortamının (*R*)-mandelonitrilin ee değerini etkisini araştırmışlar ve diisopropil eter (DIPE), TBME

ve di-n-butileterin (DBE) *Prunus mume* HNL tarafından katalizlenen (*R*)-mandelonitril sentezi için test edilen diğer organik çözücülere (dietileter, siklohekzan, etil asetat, toluen) göre daha uygun olduklarını belirlemişlerdir. Ueatrongchit ve ark. (2009) *Eriobotrya japonica* HNL'ı tarafından katalizlenen (*R*)-mandelonitril sentezini %20 (v/v) sitrat tamponu içeren (500 mM, pH 4,0) log P değerleri 0,67-3,5 arasında değişen farklı organik çözücü ortamında incelemişlerdir. Reaksiyon için en iyi organik çözücünün dietil eter olduğunu ve reaksiyon hızının log P değerinin 0,85'ten küçük veya büyük olduğu organik çözücü ortamlarında azaldığını bildirmişlerdir. Bu nedenlerle bu çalışmada reaksiyon ortamı olarak log P değeri 1,4 olan TBME kullanılmıştır.

HNL'lar tarafından katalizlenen enantiyosaf siyanohidrin sentezlerinde oluşan ürünün verimini ve ee değerini etkileyen diğer önemli faktörlerden birinin reaksiyon sıcaklığı olduğu ve düşük sıcaklıklarda (4-10°C) kimyasal reaksiyonun baskılandığı ve elde edilen ürünün ee değerinin arttığı bildirilmiştir (Ueatrongchit ve ark., 2009; Tükel ve ark., 2010). Bu nedenle çalışmamızda enantiyosaf siyanohidrinlerin sentezi 5 °C'de gerçekleştirilmiştir.

Literatürde çeşitli HNL'lar kullanılarak gerçekleştirilen (*R*)-mandelonitril sentezi için verimler %32-100 aralığında, ee'ler ise %95-99 aralığında bildirilmiştir (Nanda ve ark., 2005; Cabirol ve ark., 2006; Koch ve ark., 2008; Tükel ve ark., 2010; Ueatrongchit ve ark., 2010). Bu çalışmada ise serbest HNL'lar için (*R*)-mandelonitril verimleri 72 saat reaksiyon süresi sonunda %85-91 aralığında elde edilmiştir. Aynı şartlarda immobilize HNL'ların kullanıldığı (*R*)-mandelonitril sentezlerinin tümünde ise %100'lük bir verime ulaşılmıştır. Bu sonuçlar immobilize HNL'ların serbest HNL'lara göre (*R*)-mandelonitril sentezinde daha aktif olduğunu göstermektedir. Serbest HNL'ların kullanıldığı (*R*)-mandelonitril sentezinde ee değerleri %92-94 aralığında elde edilmişlerdir. İmmobilize HNL'ların kullanıldığı (*R*)-mandelonitril sentezi için ise ee değerleri %94-99 aralığında hesaplanmıştır. Bu sonuçlar (*R*)-mandelonitril sentezinde tüm immobilize HNL'ların serbest HNL'lara göre daha etkin olarak kullanılabileceklerini göstermektedir.

Literatürde, Nanda ve ark.(2005) serbest *Prunus mume* HNL'ın katalizör olarak kullanıldığı (*R*)-2-kloromandelonitril sentezi için verim ve ee değerlerinin

sırasıyla %37 ve %56 olarak hesapladıklarını, bu sonuçlara göre orto sübstitüye aromatik aldehit türevlerinin HNL için iyi bir substrat olmadığını ve elde edilen ürünlerin ee değerlerinin düşük olduğunu bildirmişlerdir (Nanda ve ark., 2005). Van Langen ve ark. (2003) ise kaba badem HNL preparatı kullanarak gerçekleştirdikleri (*R*)-2-kloromandelonitril sentezi için %98 verim ve %90 ee değeri elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, serbest HNL tarafından katalizlenen (*R*)-2-kloromandelonitril sentezi için %52-66 aralığında verim, %44-47 aralığında ee değerleri elde edilirken hem Eupergit CM üzerine kovalent immobilize edilen HNL'lar hem de HNL-CLEA'lar ile yüksek verimler fakat düşük ee değerleri elde edilmiştir. (Çizelge 9). Özellikle Eupergit CM üzerine kovalent immobilize edilen HNL'ların kullanıldığı (*R*)-2-kloromandelonitril sentezlerinde enantiyomerik aşırılıkların %1, HNL-CLEA'lar için ise en yüksek %21 olması, reaksiyonun enzimatik olarak gerçekleşmediğini, aksine kimyasal reaksiyonun baskın olduğunu göstermektedir.

(*R*)-3,4-dihidroksimandelonitril sentezlerinin tümünde ee değeri >%99 olarak elde edilmiştir, ayrıca immobilize HNL'ların kullanıldığı reaksiyonlarda serbest HNL'lara göre nisbeten daha yüksek verim değerlerine ulaşılmıştır (Çizelge 10).

İmmobilize HNL'lar için elde edilen (*R*)-2-hidroksi-4-fenilbütiro nitril verimleri ve ee değerleri immobilizasyon sonucu HNL'ların katalizlediği reaksiyonların veriminde ve elde edilen ürünlerin ee değerlerinde bir artışın (özellikle (*R*)-mandelonitril ve (*R*)-2-hidroksi-4-fenil bütironitril sentezi için) söz konusu olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar immobilizasyon sonrasında HNL'ın enantiyoseçiciliğinde bir değişmenin olduğunu göstermektedir. Literatürde multimerik bir enzimin enantiyoseçiciliğinin kovalent immobilizasyon sırasında oluşabilecek modifikasyonlar sonrasında değişebileceği bildirilmiştir (Fernández-Lafuente ve ark., 2001).

Bu tez çalışmasında immobilize HNL örneklerinin sürekli reaktörde tekrar kullanımları ile ilgili çalışmalar yapılmış, farklı etanol/tampon (50 mM, pH 4,0) oranlarına sahip substrat çözeltileri kullanılmış ve farklı akış hızlarında reaktör sistemine gönderilmiş, ancak başarılı sonuçlar alınamamıştır. Zira substrat çözeltisinin sürekli reaktör sisteminden geçirilmesinin reaktör sisteminde basınca

neden olduğu ve oluşan bu basıncın (*R/S*)-mandelonitrilin kendiliğinden parçalanma hızını arttırdığı düşünülmektedir. Bu nedenle, denenen sürekli reaktör sisteminin immobilize HNL'ların tekrar kullanımları için uygun olmadığı ancak daha ileri reaktör sistemlerinin tasarım ve kullanımı ile belki başarılı sonuçlar alınabileceği düşünülmektedir. İmmobilize HNL'ların kesikli reaktörlerdeki tekrar kullanım kararlılıkları ile ilgili bulgular değerlendirildiğinde, Çizelge 4.12'den de görüleceği gibi, immobilize HNL miktarının artması ile başlangıç aktivitesinin %50'si kalana kadar ki aktiviteleri toplamlarının (prodüktivite) arttığı ancak, aktivite toplamlarındaki artışın kullanılan immobilize HNL miktarı ile aynı oranda olmadığı bulunmuştur. Bunun nedeni kesikli reaktör sistemine yüklenen immobilize HNL miktarının artmasına bağlı olarak eksternal difüzyon sınırlamalarının daha fazla olması ile açıklanabilir.

Çalışmalarımızda sentezlenen siyanohidrinlerin karakterizasyonu FT-IR, ^{1}H ve ^{13}C NMR spekstrokopileri ile yapılmış ve spektrum sonuçları sentezlenen moleküllerin yapılarını doğrulamıştır (EK 11-22).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1.Sonuçlar

1- Daha önceden HNL kaynağı olarak kullanılmamış *Prunus* türü, üçü yabani ve üçü kültür formu olmak üzere altı çeşit meyvenin herhangi bir alanda etkin olarak değerlendirilmemiş olan çekirdeklerinden HNL saflaştırılmış ve saflaştırılan HNL'ların herbirinin molekül ağırlığının yaklaşık 100 kDa olan homotetramer bir enzim olduğu belirlenmiştir.

2- Saflaştırılan HNL'lar kovalent olarak Eupergit CM üzerine veya çapraz bağlı HNL agregatları (HNL-CLEA) şeklinde immobilize edilmişlerdir.

3- Saflaştırılan HNL'lar arasında liyaz aktivitesi cinsinden en yüksek katalitik etkinlik (k_{cat}/K_m) acıbadem HNL için $9{,}52x10^8$ $s^{-1}M^{-1}$ olarak belirlenmiş ancak diğerleri için de 10^8 $s^{-1}M^{-1}$ düzeyinde ve birbirine yakın bulunmuştur. Eupergit CM üzerine immobilize edilen HNL'lar arasında en yüksek k_{cat}/K_m değerleri kayısı HNL için $4{,}16x10^8$ $s^{-1}M^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. HNL-CLEA'lar arasında ise en yüksek aktivitenin 48 U/g CLEA olarak kayısı HNL-CLEA'ya ait olduğu belirlenmiştir.

4- Serbest ve immobilize HNL'ların termal kararlılıkları karşılaştırıldığında yüksek sıcaklıklarda uzun süreli inkübasyonlar için Eupergit CM'ye immobilize edilen kültür formu erik HNL'nin diğer HNL örneklerine göre daha yüksek bağıl aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

5- Serbest ve immobilize HNL'lar farklı koşullarda depolandıklarında, 5°C'de bekletilen serbest ve tampon içerisinde bekletilen immobilize HNL'lar aktivitelerinin tamamını kaybederken, kuru preparatlar (HNL-CLEA'lar yaklaşık %15 internal su içeriyor) halinde bekletilen HNL'lar 30 gün sonunda bile başlangıç aktivitelerinin yaklaşık %66-86 'sını korumuşlardır.

6- İmmobilize HNL örneklerinin liyaz aktivitesi ölçülerek belirlenen tekrar kullanım kararlılıklarının belirlenmesi ile ilgili çalışmalarda Eupergit CM'ye immobilize edilen HNL'lar arasında kültür formu erik HNL'nin, HNL-CLEA örnekleri arasında ise yabani erik HNL-CLEA'nın aktivite toplamlarının diğer immobilize HNL örneklerine göre daha yüksek olduğu hesaplanmıştır.

7-(*R/S*)-mandelonitrilin kinetik rezolusyonunda serbest ve immobilize HNL örneklerinin kullanımı karşılaştırıldığında, (*S*)-mandelonitril için hesaplanan verim ve ee değerleri değişmemiştir ve yaklaşık %41-46 arası verim, %88-95 ee değerleri hesaplanmıştır.

8-(*R*)-mandelonitril, (*R*)-3,4 dihidroksimandelonitril, (*R*)-2-hidroksi-4-fenilbütironitril için immobilize HNL'lar kullanıldığında serbest HNL'ların kullanılmasına göre daha yüksek verim ve ee değerleri elde edilmiştir. (*R*)-2-kloromandelonitril sentezinde ise immobilize HNL'lar kullanıldığında özellikle enantiyomerik aşırılıkların oldukça azaldığı bulunmuştur.

5.2.Öneriler

1-Bu çalışmada HNL kaynağı olarak denenen *Prunus* türleri HNL için uygun birer kaynak olarak kullanılabilir.

2-Bu tez çalışmasında kullanılan immobilizasyon yöntemlerinin HNL immobilizasyonu için uygun olması, immobilizasyon ile birlikte HNL'nin termal ve depolama kararlılığının artması, immobilize enzimlerin tekrar kullanım kararlılıklarının yüksek olması, (*R*)-mandelonitril, (*R*)-3,4-dihidroksimandelonitril ve (*R*)-2-hidroksi-4-fenilbütironitril sentezinde immobilize HNL'larla serbest HNL'lara göre daha yüksek verim ve ee değerlerine sahip ürünlerin sentezlenmesi nedeniyle bu sentezlerde immobilize HNL'ların kullanımı önerilebilir.

3-HNL-CLEA'lar hazırlanırken saf proteine gerek olmaması, kolay, hızlı ve ucuz bir immobilizasyon yöntemi olması ve HNL-CLEA'lar ile de başarılı sonuçlar alınması nedeniyle CLEA oluşturma ile HNL immobilizasyonunun uygun olacağı önerilebilir.

KAYNAKLAR

BAHULEKAR, R., AYYANGAR, N. R., and PONRATHNAM, S., 1991. Polyethyleneimine in immobilization of biocatalysts. Enzyme and Microbial Technology, 13:858-868.

BHUNYA, R., MAHAPATRA, T., NANDA, S., 2009. *Prunus armeniaca* hydroxynitrile lyase (*Pars*HNL)-catalyzed asymmetric synthesis of cyanohydrins from sterically demanding aromatic aldehydes. Tetrahedron: Asymmetry, 20:1526-1530.

BLUM, H., BEİER, H., GROSS, H.J., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis, 8:93-99.

BORATYNSKI, J., and ZAL, T., 1990. Colorimetric micro methods for glutaraldehyde determination by means of phenol and sulfuric acid or phenol and perchloric acid. Analytical Biochemistry, 184:259-262.

BRADFORD M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72:248-254.

CABIROL, F.L., HANEFELD, U., SHELDON, R.A., 2006. Immobilized hydroxynitrile lyases for enantioselective synthesis of cyanohydrins: Sol-gels and cross-linked enzyme aggregates, Advanced Synthesis and Catalysis. 348:1645-1654.

CABIROL, F.L., TAN, P.L., TAY, B., CHENG, S., HANEFELD, U., SHELDON, R.A., 2008. *Linum usitatissimum* Hydroxynitrile Lyase Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Recyclable Enantioselective Catalyst. Advanced Synthesis and Catalysis 350:2329 – 2338.

CABRAL, J. M. S., NOVAIS, J. M., and KENNEDY J. F., 1986. Immobilization studies of whole microbial cells on transition metal activated inorganic supports. Applied Microbiology and Biotechnology, 23:157-162.

CAO, L., LANGEN, L.V., and SHELDON, R.A., 2003. Immobilised Enzyme: Carrier bound or Carrier-free. Current Opinion in Biotechnology, 14: 387-394.

CAO, L., 2005. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design.Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, p:174.

CHUESKUL, S. ve CHULAVATNATOL M., 1996. Properties of alphahydroxynitrile lyase from the petiole of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz), Archives of Biochemistry and Biophysics, 334: 401-405.

CONN, E.E., The biochemistry of plants, ed: Stumpf P.K., Conn E.E., Vol: 7, Academic press, New York, (1981). Pp: 479.

DADASHIPOUR, M., and ASANO, Y., 2011. Hydroxynitrile Lyases: Insights into Biochemistry, Discovery, and Engineering. ACS Catalaysis, 1:1121-1129.

DREVENY, I., GRUBER, K., GLİEDER, A., THOMPSON, A., KRATKY, C., 2001. The hydroxynitrile lyase from almond: a lyase that looks like an oxidoreductase. Structure, 9:803-805.

EFFENBERGER, F., STELZER, U., 1995. A convenient preparation of 2-substituted (*S*)-aziridines. Tetrahedron: Asymmetry, 6:283-286.

EFFENBERGER, F., SCHWÄMMLE, A., 1996. Preparation of (*S*)-Cyanohydrins by Enantioselective Cleavage of Racemic Cyanohydrins with (*R*)-Hydroxynitrile Lyase. Biocatalysis and Biotransformation, 14:167-169.

ERARSLAN, A., 2000. Enzim Kinetiği Notları. TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Kocaeli, 84.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., HERNÁNDEZ-JÚSTIZ O., MATEO C., TERRENI M., FERNÁNDEZ-LORENTE G., MORENO M.A., ALONSO J., GARCIA-LÓPEZ J.L., GUISAN J.M., 2001. Biotransformations Catalyzed By Multimeric Enzymes: Stabilization Of Tetrameric Ampicillin Acylase Permits The Optimization Of Ampicillin Synthesis Under Dissociation Conditions. Biomacromolecules, 2:95-104.

FUKUTA, Y., NANDA, S.,KATO, Y., YURIMOTO, H., SAKAI, Y., KOMEDA, H., ASANO, Y., 2011. Characterization Of A New (R)-Hydroxynitrile Lyase from The Japanese Apricot *Prunus mume* and cDNA Cloning And Secretory Expression Of One *Pichia Pastoris.* Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 75:100187-1-7.

GUISAN, J.M., 2006. Immobilization of Enzymes and Cells, Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.

GOVARDHAN, C.P., 1999. Crosslinking Of Enzymes For Improved Stability And Performance. Current Opinion in Biotechnology, 10:331-335.

GREGORY, R.J.H., 1999. Cyanohydrins İn Nature And The Laboratory: Biology, Preparations, And Synthetic Applications. Chemical Reviews, 99, 3649-3652.

GRÖGER, H., 2001. Enzymatic Routes To Enantiomerically Pure Aromatic A-Hydroxy Carboxylic Acids: A Further Example For The Diversity Of Biocatalysis. Advanced Synthesis and Catalysis, 343:547-558.

HAN, S.Q., OUYANG, P.K., WEİ, P., HU, Y., 2006. Enzymatic synthesis of (R) cyanohydrins by a novel (R)-oxynitrilase from *Vicia sativa* L. Biotechnology Letters, 28:1909–1912.

HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., and SMITH, P.K., 1992. Immobilized affinity ligand techniques, Academic Press, London, pp: 283-284.

HUGHES, J., DECARVALHO, J.P.C., HUGHES, M.A. 1994. Purification, Characterization, and Cloning of α-Hydroxynitrile Lyase from Cassava (Manihot esculenta Crantz). Archives of Biochemistry and Biophysics, 311, 496-502.

JANSEN, I., WOKER, R., KULA, M.R., 1992. Purification And Protein Characterization Of Hydroxynitrile Lyases From Sorghum And Almond. Biotechnology and Applied Biochemistry. 15:90–99.

KENNEDY, J.F., and CABRAL, J.M.S., 1985. Immobilization Of Biocatalysts By Metallink/Chelation Processes. Immobilized Cells and Enzymes, 1:19-37.

KOCH, K., VAN DEN BERG, R.J.F., NIEUWLAND, P.J., WIJTMANS, R, WUBBOLTS M.G., SCHOEMAKER H.E., RUTJES F.P.J.T., VAN HEST J.C.M., 2008, Enzymatic Synthesis Of Optically Pure Cyanohydrins In Microchannels Using A Crude Cell Lysate. Chemical Engineering Journal, 135: 89–92.

LAEMMLI U.K., 1970. Cleavage Of Structural Proteins During The Assembly Of The Head Of Bacteriophage T4. Nature, 227:680-685.

LOWRY O., 1951. Rosebrough A., Farr A., Randall R., Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193:265-275.

MATEO, C., FERNANDEZ-LORENTE, G., ABIAN, O., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., GUISAN, J.M., 2000. Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. Biomacromolecules, 1:739-745.

MATEO, C., TORRES, R., FERNANDEZ-LORENTE, G., ORTIZ, C., FUENTES, M., HIDALGO, A., LOPEZ-GALLEGO, F., ABIAN, O., PALOMO, J.M., BETANCOR, L., PESSELA, B.C.C., GUISAN, J.M., FERNANDEZ-LAFUENTA, R., 2003. Epoxy-Amino Groups: A New Tool for Improved Immobilization of Proteins by the Epoxy Method. Biomacromolecules, 4:772-777.

MESSING, R.A., 1976. Adsorption and inorganic bridge formations, Methods in Enzymology, 44:148-169.

MONTERDE, M.I., NAZABADİOKO, S., ROBOLLEDO, F., BRİEVA, R., GOTOR,V., 1999. Chemoenzymatic Synthesis Of Azacycloalkan-3-Ols, Tetrahedron: Asymmetry, 10:3449-3455.

NAHRSTEDT, A., 1985. Cyanogenic Compounds As Protecting Agents For Organisms. Plant Systematics And Evolutıon, 150:35-47.

NANDA, S., KATO, Y., ASANO, Y., 2005. A New (*R*)-Hydroxynitrile Lyase From *Prunus Mume*: Asymmetric Synthesis Of Cyanohydrins. Tetrahedron, 61:10908-10916.

O'DRISCOLL, K. F., 1976. Techniques Of Enzyme Entrapment In Gels, Methods in Enzymology, 44:169-183.

PURKARTHOFER, T., SKRANC, W., SCHUSTER, C., GRİENGL, H., 2007. Potential And Capabilities Of Hydroxynitrile Lyases As Biocatalysts In The Chemical Industry. Applied Microbiology and Biotechnology, 76:309-320.

REGEN, S.L., SINGH, M., and SAMEUL, N.K., 1984. Functionalized polymeric liposomes, efficient immobilisation of α-Chymotrypsin. Biochemical and Biophysical Research Communications, 119:646-651.

REXOVA-BENKOVA, L., OMELKOVA, J., and KUBANEK, V., 1982. Endo-d-Galacturonanase immobilised by adsorption on porous poly(ethylene terephthalate). Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 47:2716-2723.

ROSENTHALER L., 1908. Durch Enzyme bewirkte asymmetrische Synthesen, Biochem Z, 14, 238-243.

SCHOEVAART, R., WOLBERS, M.W., GOLUBOVIC, M., OTTENS, M., KIEBOOM, A.P.G., RANTWIJK, F.V., VAN DER WIELEN, L.A.M., and SHELDON, R.A., 2004. Preparation, Optimization, and Structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). Biotechnology and Bioengineering, 6:754-762.

SHAH, S., SHARMA, A, and GUPTA, M.N., 2006. Preparation Of Cross-Linked Enzyme Aggregates By Using Bovine Serum Albumin As A Proteic Feeder. Analytical Biochemistry, 351:207-213.

SHARMA, M., SHARMA, N.N., BHALLA, T.C., 2005. Hydroxynitrile Lyases: At The Interface Of Biology And Chemistry. Enzyme and Microbial Technology, 37: 279–294.

SHELDON, R.A., SCHOEVAART, R., and VAN LANGEN, L.M., 2005. Cross-Linked Enzyme Aggregates (Cleas): A Novel And Versatile Method For Enzyme Immobilization A Review. Biocatalysis and Biotransformation, 23:141-147.

SHELDON R.A., SCHOEVAART, R., VAN LANGEN, L.M., 2006. Cross-Linked Enzyme Aggregates, Immobilization of Enzymes and Cells Second Edition, ed: Guisan J.M., Humana Press, New Jersey, Pp: 31.

SOLAS, M.T, VICENTE, C., XAVIES, L., and LEGAZ, M.E., 1994. Ionic Adsorption Of Catalase On Bioskin: Kinetic And Ultra Structural Studies. Journal of Biotechnology, 33:63-70.

SOLIS, A., SOLIS-OBA, M., PEREZ, H.I., MANJARREZ, N., CASSANI, J., 2011. Hydroxynitrile Lyases From Prunus Seeds In The Preparation Of Cyanohydrins. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 75:100725-1-2.

SPERINDE, J.J., and GRIFFITH, L.G., 1997. Synthesis And Characterization Of Enzymatically Crosslinked Poly(Ethylene Glycol) Hydrogels. Macromolecules, 30:5255-5264.

STELZER, U., 1993. Effenberger F., Preparation of (*S*)-fluoronitriles. Tetrahedron: Asymmetry, 4:161-164.

TISCHER, W., and WEDEKIND, F., 1998. Immobilized Enzymes:Methods and Applications.Topics in Current Chemistry, 20:96-126.

TÜKEL, S.S., YILDIRIM, D., ALAGÖZ, D., ALPTEKİN, Ö., YÜCEBİLGİÇ, G., BİLGİN, R., 2010. Partial Purification And İmmobilization Of A New (R)-Hydroxynitrile Lyase From Seeds Of *Prunus Pseudoarmeniaca*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 66:161-165.

TWYMAN, R.M., 2005, Immobilized Enzymes. Encyclopedia of Analytical Science 523-529.

UEATRONGCHIT, T., KOMEDA, H., ASANO, Y., KITTIKUN, A.H., 2009. Parameters İnfluencing Asymmetric Synthesis Of (R)-Mandelonitrile By A Novel (R)-Hydroxynitrile Lyase From *Eriobotrya Japonica*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 56:208-214.

UEATRONGCHIT, T., TAMURA, K., OHMİYA, T., H-KİTTİKUN, A., ASANO, Y., 2010. Hydroxynitrile lyase from *Passiflora edulis*: Purification, characteristics and application in asymmetric synthesis of (*R*)-mandelonitrile. Enzyme and Microbial Technology, 46:456-465.

VAN LANGEN, L.M., VAN RANTWIJK, F., SHELDON, R.A., 2003. Enzymatic Hydrocyanation Of A Sterically Hindered Aldehyde: Optimization Of A Chemoenzymatic Procedure For (R)-2-Chloromandelic Acid, Organic Process Research & Development,7:828-831.

VAN LANGEN, L.M., SELASSA, R.P., VAN RANTWİJK, F., SHELDON, R.A., 2004. Cross-Linked Aggregates of (R)-Oxynitrilase: A Stable, Recyclable Biocatalyst for Enantioselective Hydrocyanation. Organic Letters, 7:327-329.

VETTER, J., 2000. Plant cyanogenic glycosides. Toxicon, 38:11-26.

VEUM, L., HANEFELD, U., PİERRE, A., 2004. The first encapsulation of hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis* in a sol–gel matrix. Tetrahedron, 60:10419-10425.

WAGNER, U.G., HASSLACHER, M., GRİENGL, H., SCHWAB, H., KRATKY, C., 1996. The crystal structure of the hydroxynitrile lyase from the rubber tree *Hevea brasiliensis* suggests that this enzyme is structurally and mechanistically related to α/β hydrolases. Structure, 4:811-822.

WAJANT, H., FORSTER, S., SELMAR, D., EFFENBERGER, F., PFIZENMAIER, K., 1995. Purification And Characterization Of A Novel (R)-Mandelonitrile Lyase From The Fern *Phlebodium Aureum*. Plant Physiology. 109:1231–1238.

WAJANT, H., and FÖRSTER, S., 1996. Purification And Characterization Of Hydroxynitrile Lyase From *Hevea Brasiliensis*. Plant Science, 115:25-31.

WEETHALL, H.H., 1976. Covalent Coupling Methods For Inorganic Support Materials. Methods of Enzymology, 44:134-148.

WEHTJE, E., ADLERCREUTZ, P., MATTİASSON, B., 1988. Activity And Operational Stability Of İmmobilized Mandelonitrile Lyase İn Methanol/Water Mixtures. Applied Microbiology and Biotechnology, 29:419-425.

WISEMAN, A. 1986. Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd Edit., John Wiley & Sons, Chichester, England.

WOODWARD, J., 1985. Immobilized Enzymes: Adsorption And Covalent Coupling, Immobilized Cells And Enzymes: A Practical Approach, IRL, Oxford, UK, pp: 3-17.

WU, H-C., and POULTON, J.E., 1991Immunocytochemical localization of mandelonitrile lyase in mature black cherry (Prunus serotina Ehrh.) seeds, Plant Physiology, 96, 1329-1337

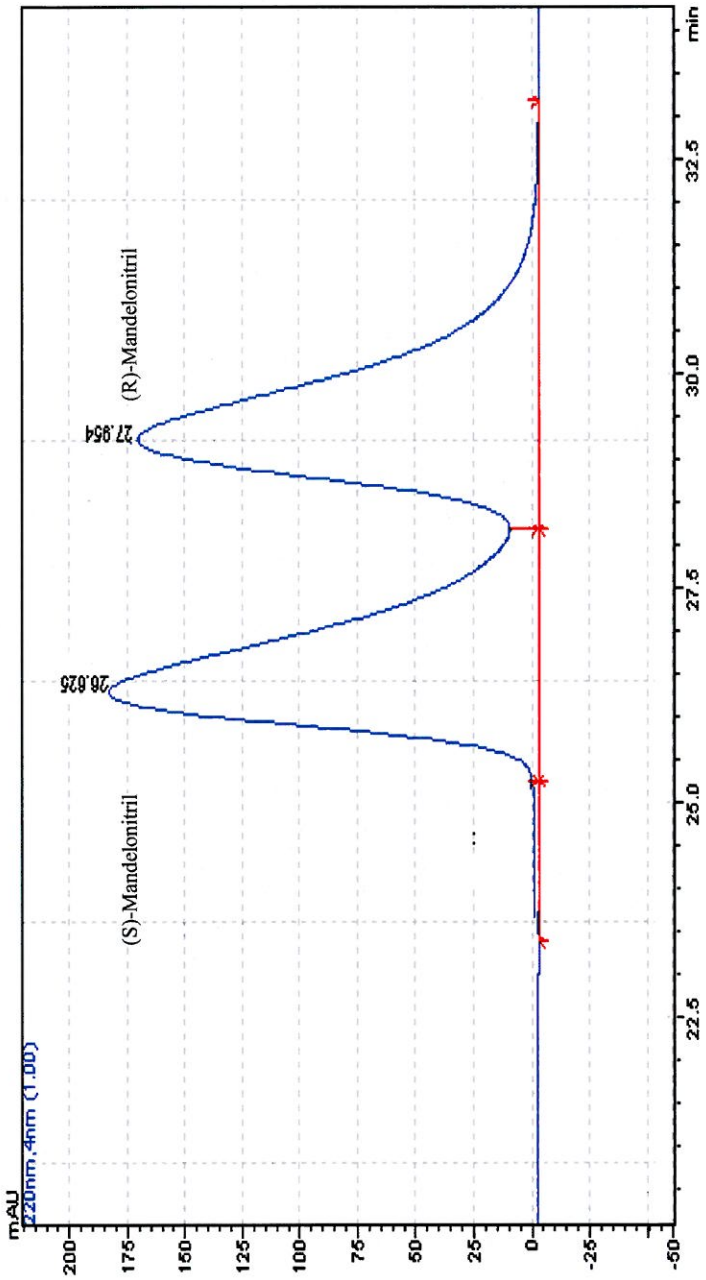
ZAGROBELNY, M., BAK, S., RASMUSSEN, A.V., JORGENSEN, B., NAUMANN, C.M., MOLLER, B.L., 2004. Cyanogenic Glucosides And Plant–Insect Interactions. Phytochemistry, 65:293-296.

ZANDBERGEN, P., BRUSSEE, J., VAN DER GEN, A., 1992. Stereoselective Synthesis Of B-Hydroxy-A-Amino Acids From Chiral Cyanohydrins. Tetrahedron: Asymmetry, 3:769-774.

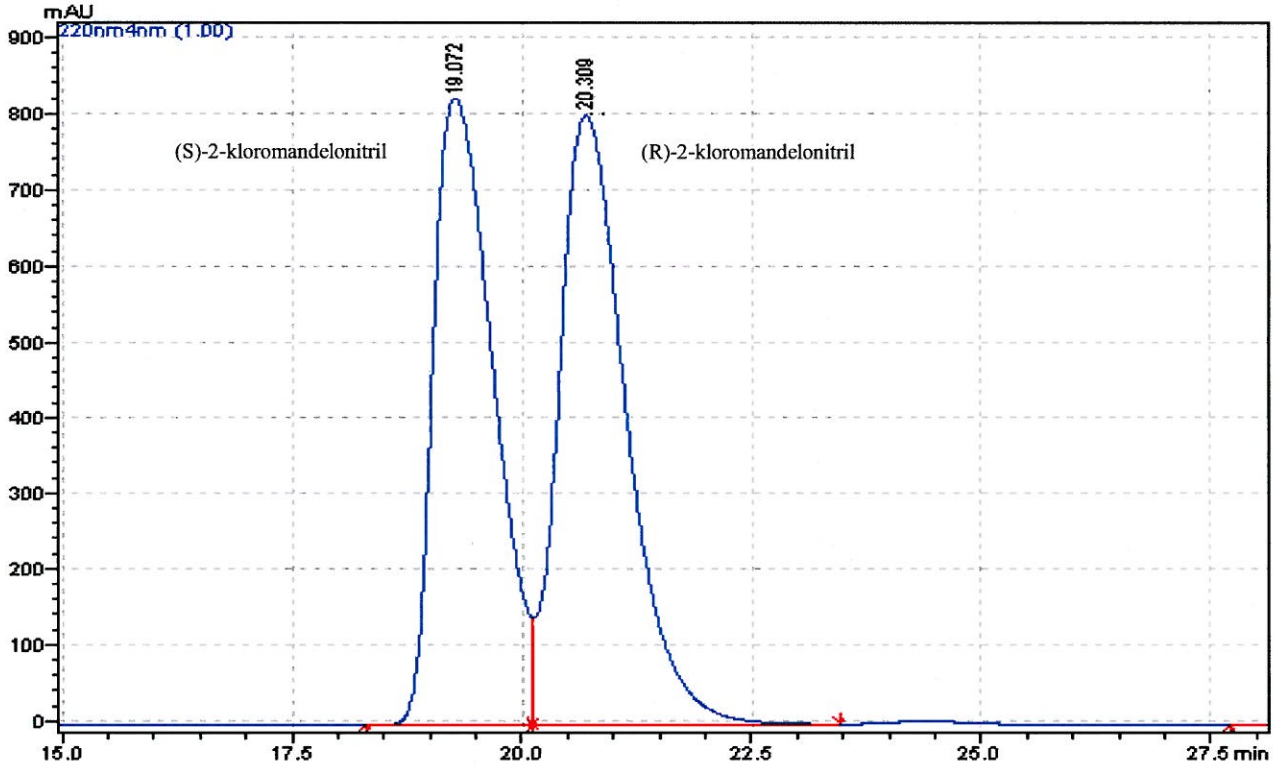
ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Düzce'de doğdu. İlköğrenimine Nizip/Gaziantep'e bağlı Korkmazlar Köyü İlkokulu'nda başladı ve Doğubeyazıt/Ağrı İshakpaşa İlkokulunda tamamladı. Ortaokulu Nizip Alkan Kız Meslek Lisesi'nin ortaokul kısmında okuduktan sonra lise öğrenimine Nizip Hüseyin Yalçın Çapan Lisesi'nde devam etti. 1999 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde üniversite eğitimine başladı ve 2003 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Çukurova Üniversitesi Kimya Bölümü'nde Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2007 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladıktan sonra aynı yıl doktora eğitimine başladı.

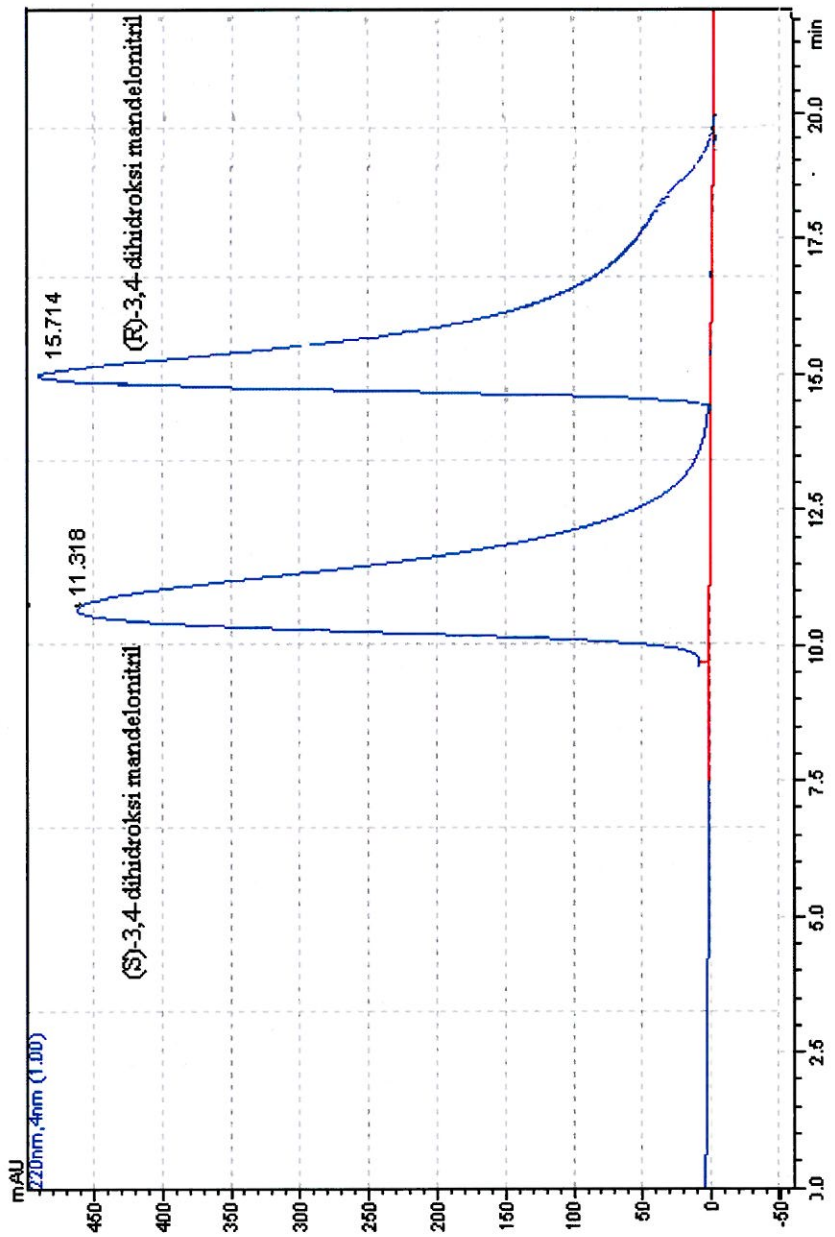
EKLER



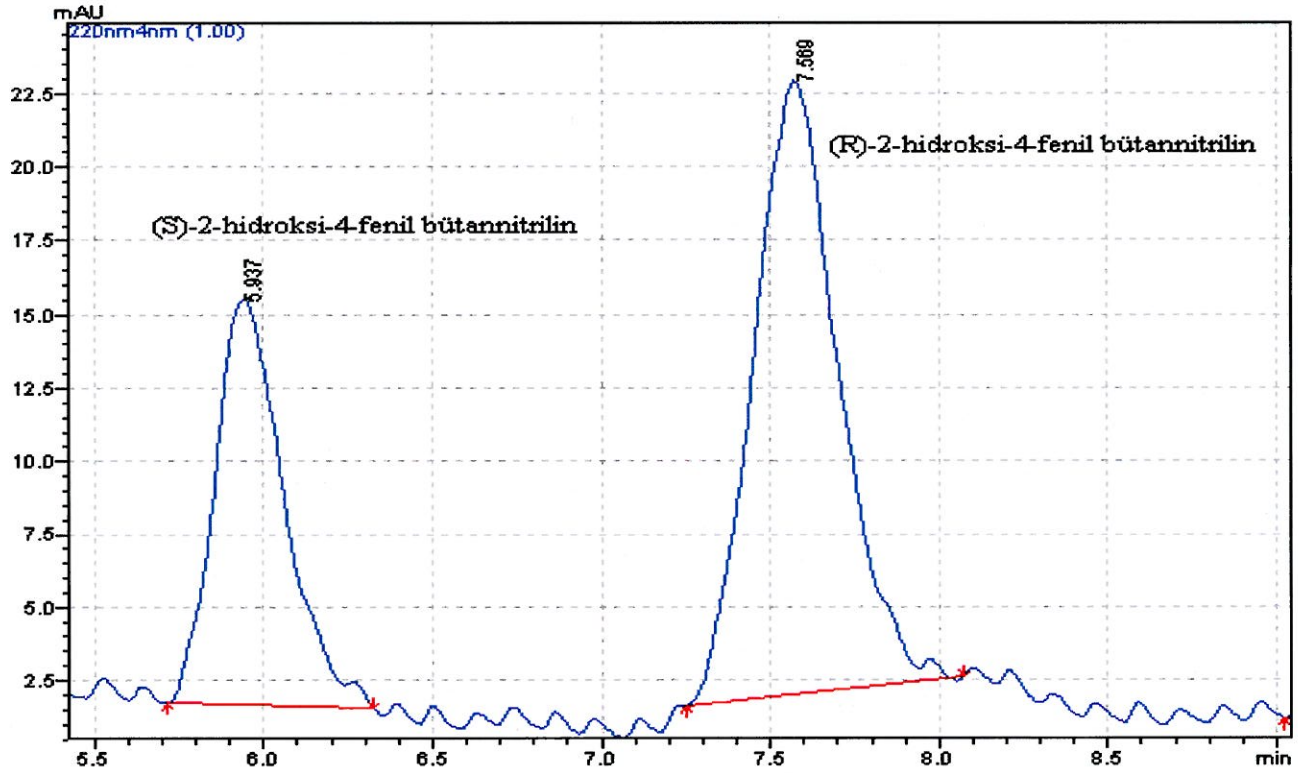
Ek 1. Rasemik mandelonitrilin kiral HPLC kromatoğramı.



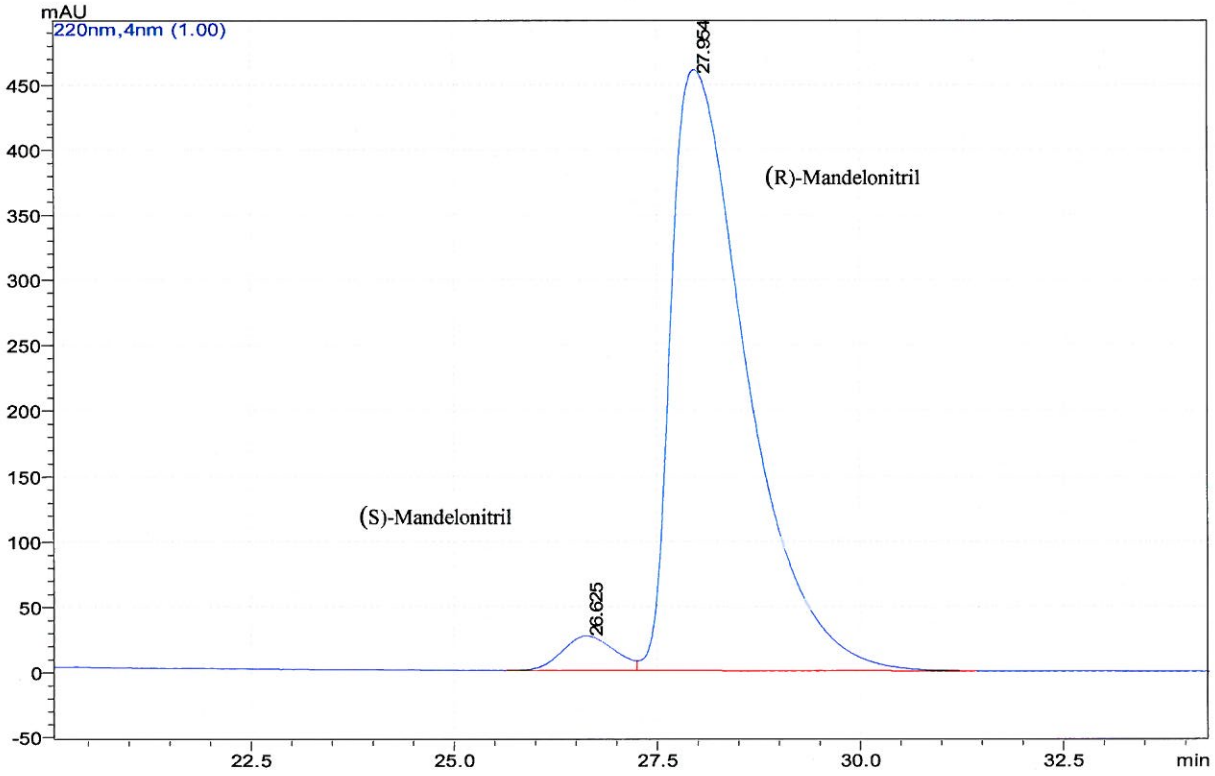
Ek 2. Rasemik 2-kloromandelonitrilin kiral HPLC kromatoğramı.



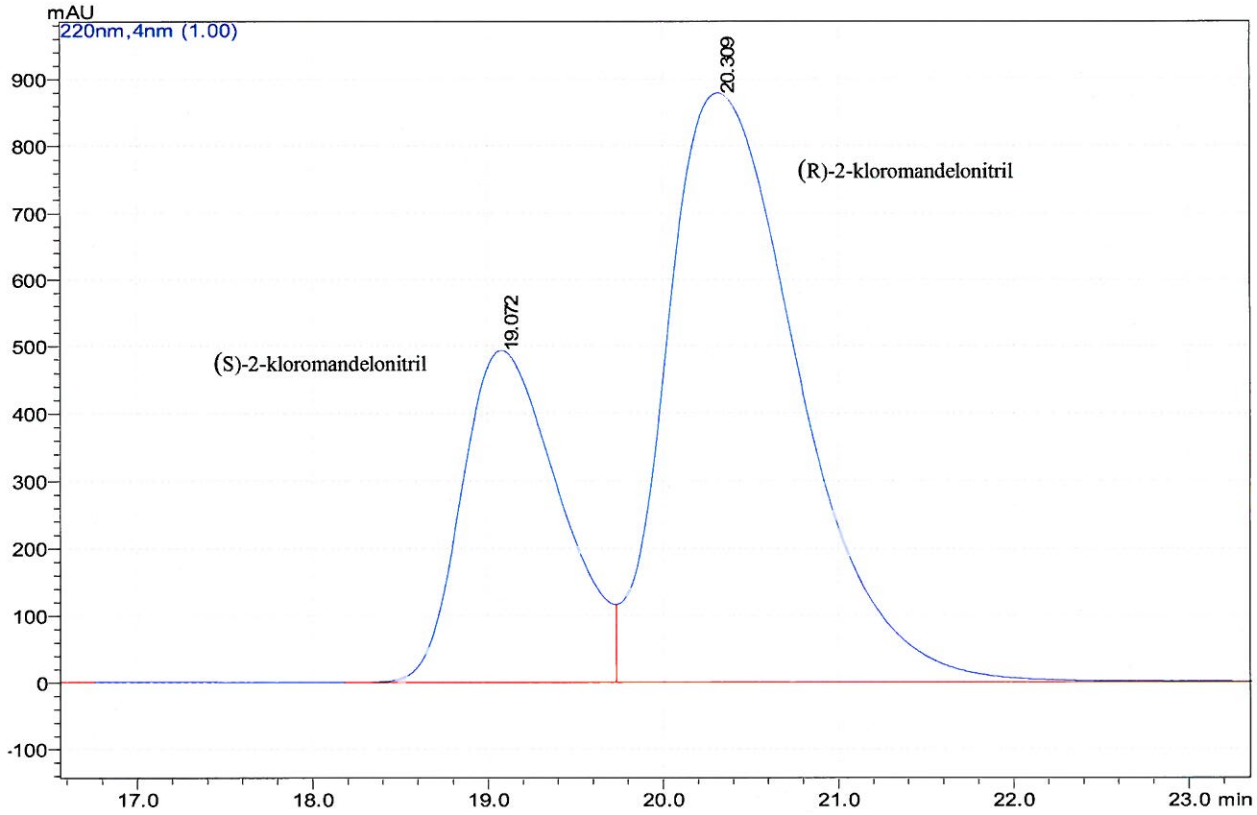
Ek 3. Rasemik 3,4-dihidroksimandelonitrilin kiral HPLC kromatoğramı.



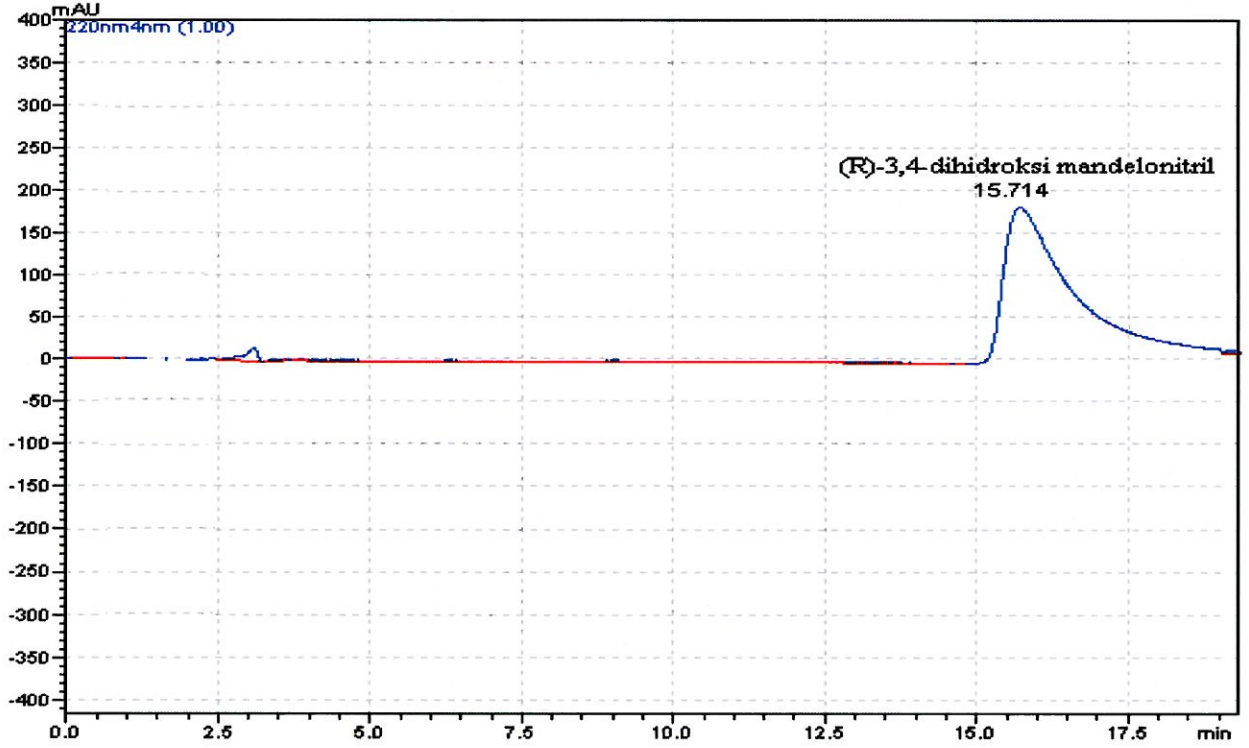
Ek 4. Rasemik 2-hidroksi-4-fenil bütannitrilin kiral HPLC kromatoğramı.



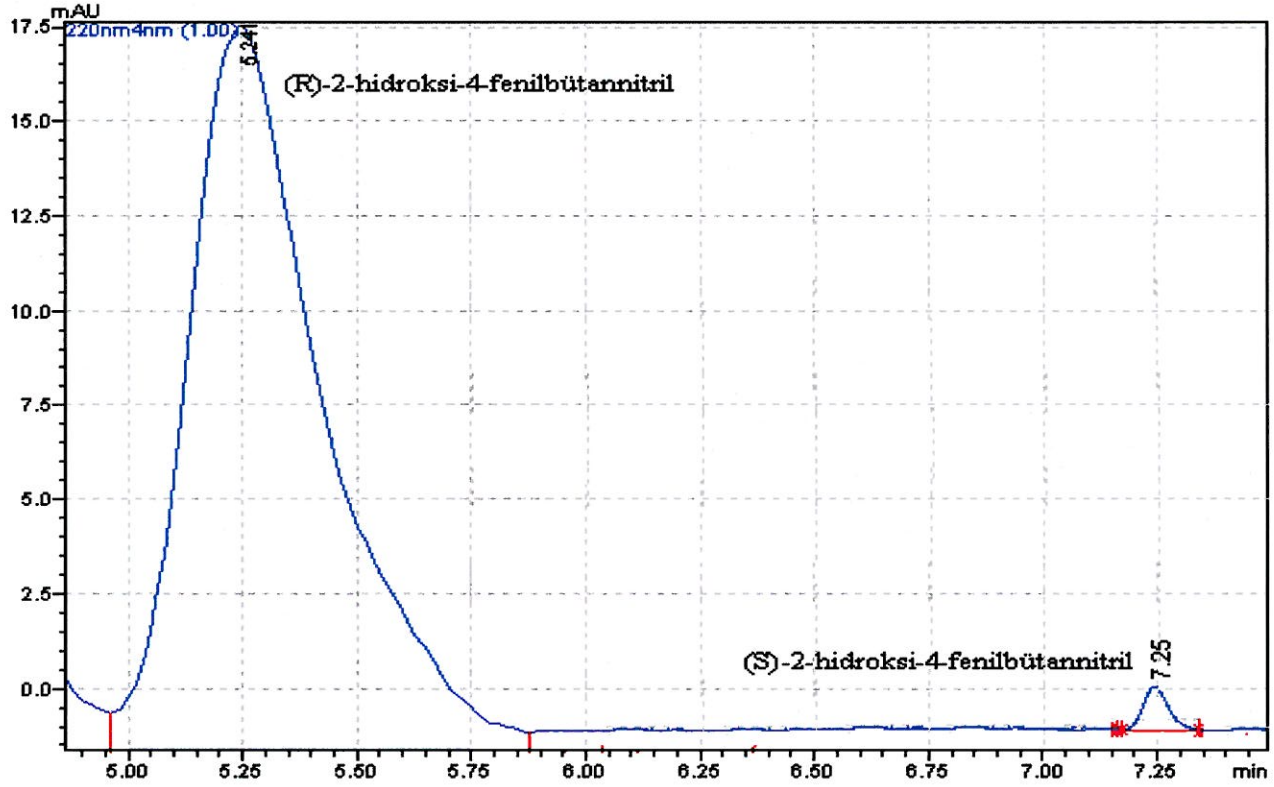
Ek 5. HNL tarafından sentezlenen (*R*)-Mandelonitril için örnek kiral HPLC kromatoğramı.



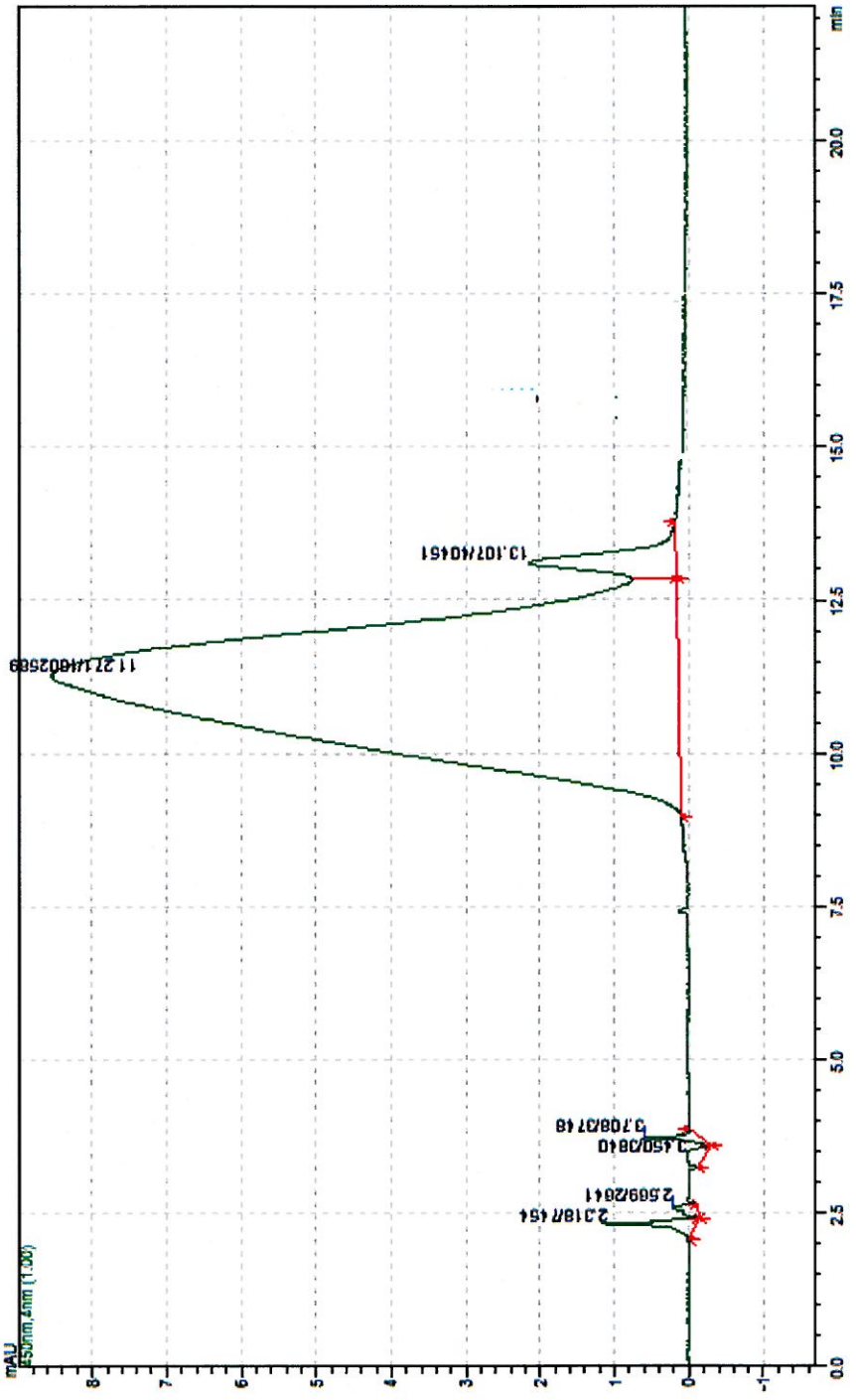
Ek 6. HNL tarafından sentezlenen (*R*)-2-kloromandelonitril için örnek kiral HPLC kromatoğramı.



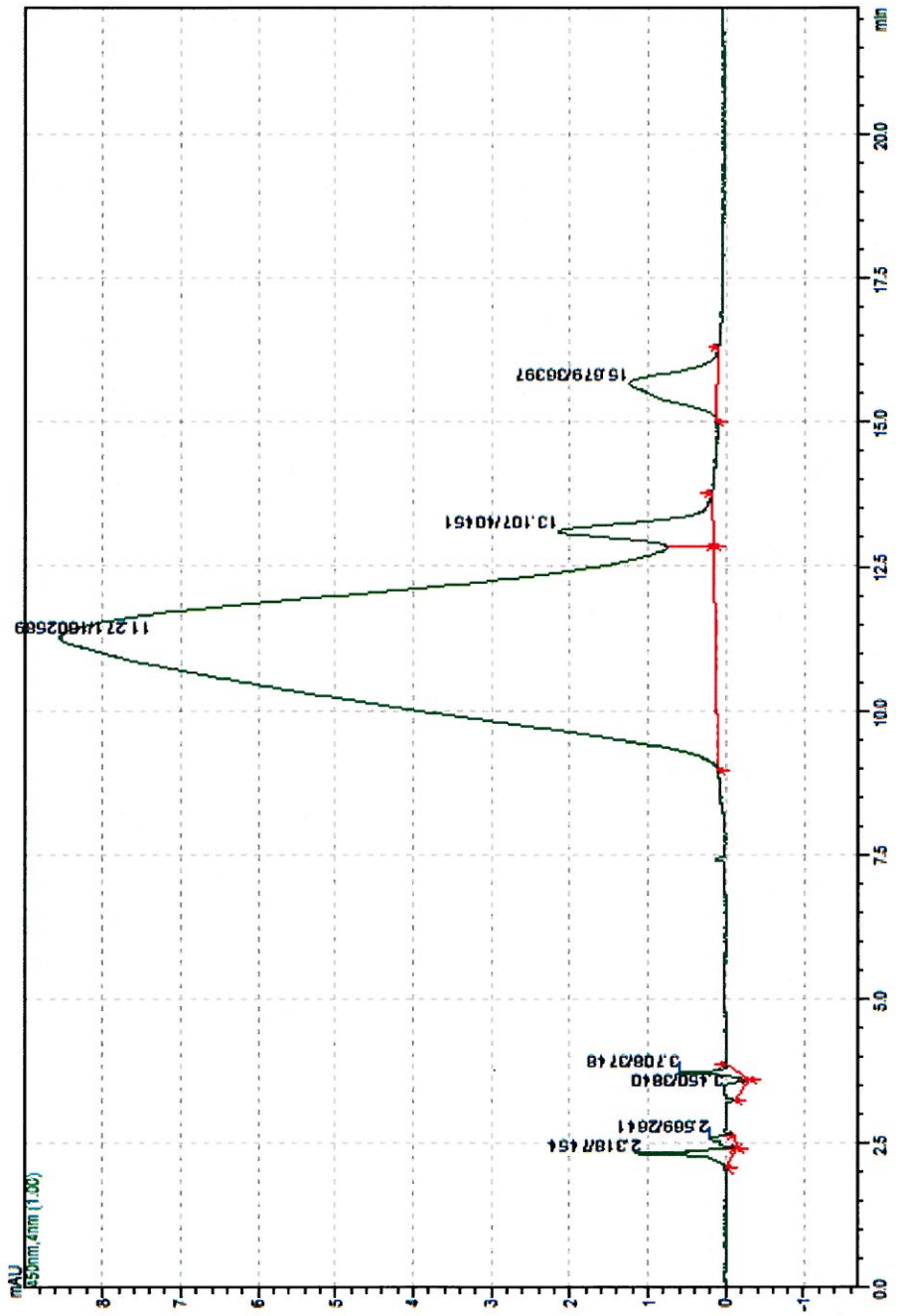
Ek 7. HNL tarafından sentezlenen (*R*)-3,4-dihidroksimandelonitril için örnek kiral HPLC kromatoğramı.



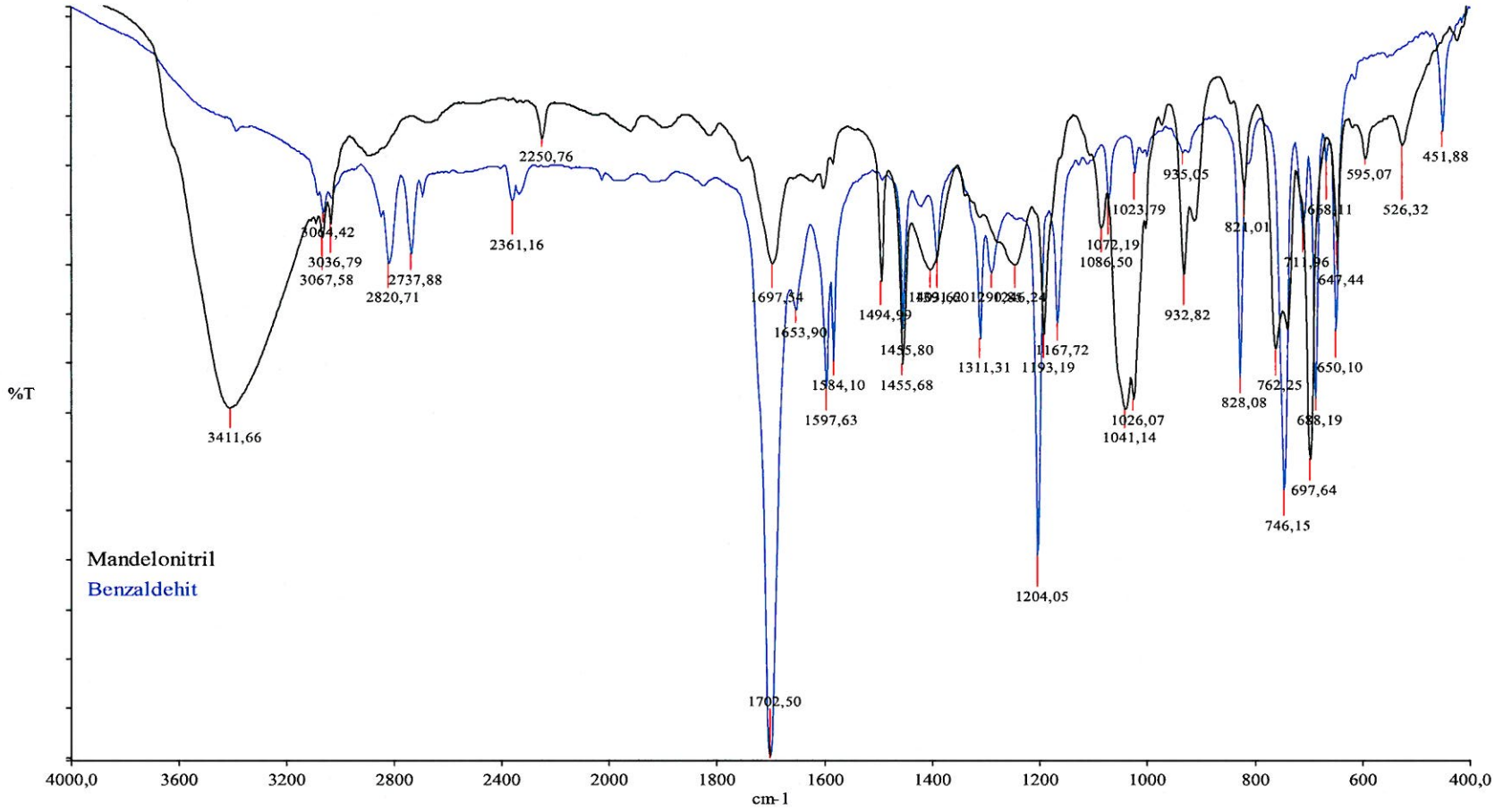
Ek 8. (*R*)-2-hidroksi-4-fenil bütannitrilin için örnek kiral HPLC kromatoğramı



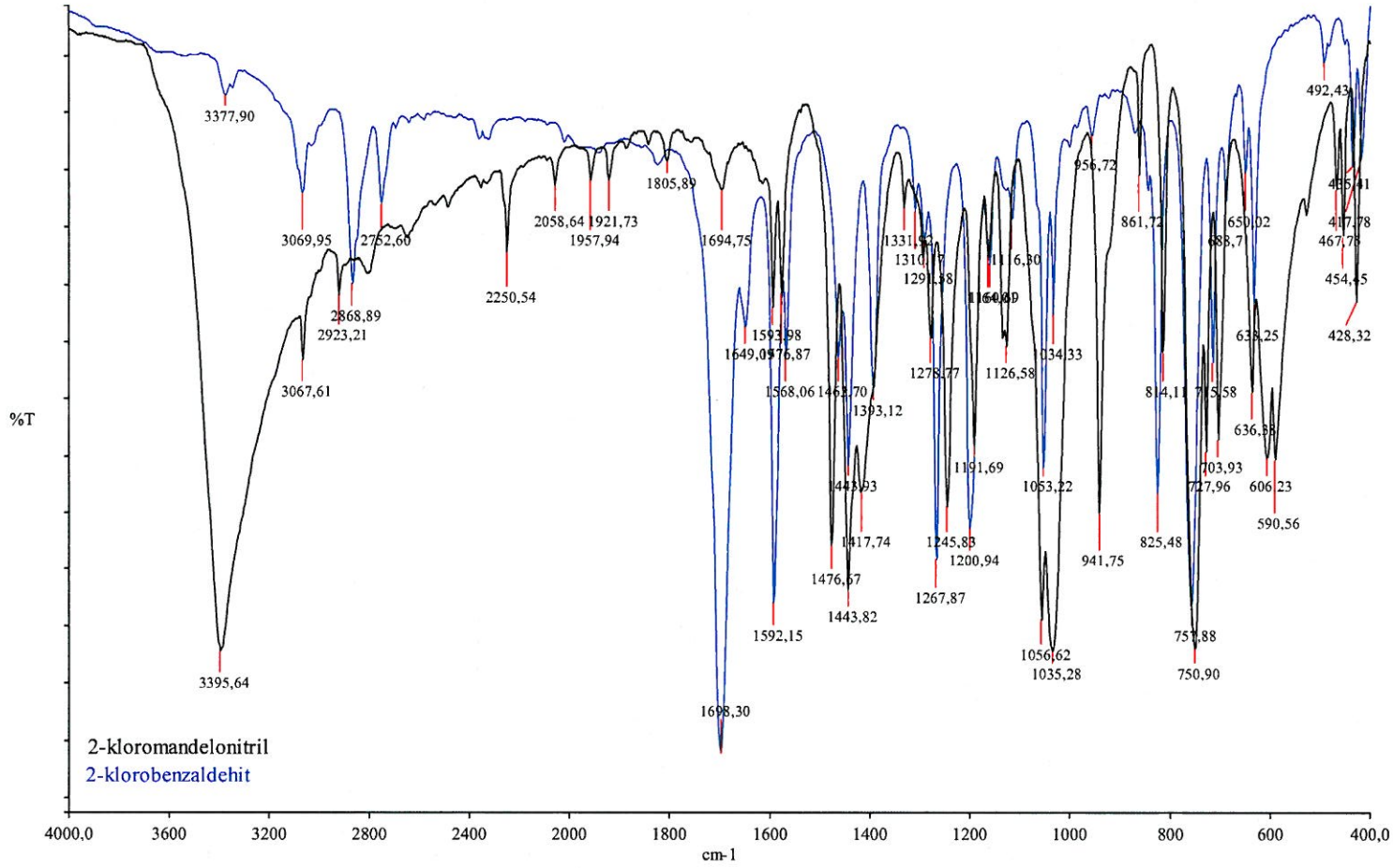
Ek 9. FAD çözeltisi için HPLC kromatoğramı



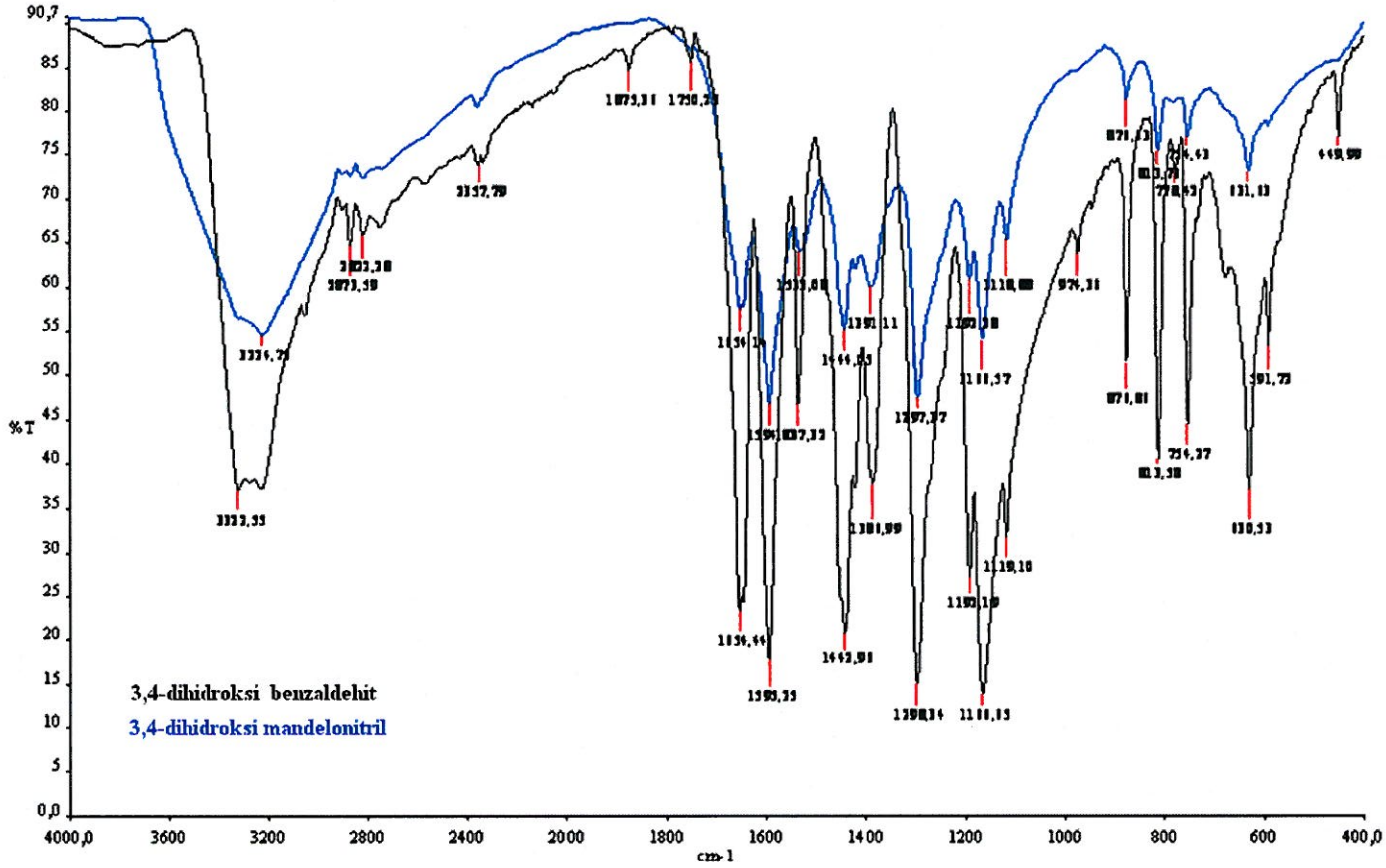
Ek 10. FAD içeren enzim örnekleri için örnek HPLC kromatoğramı



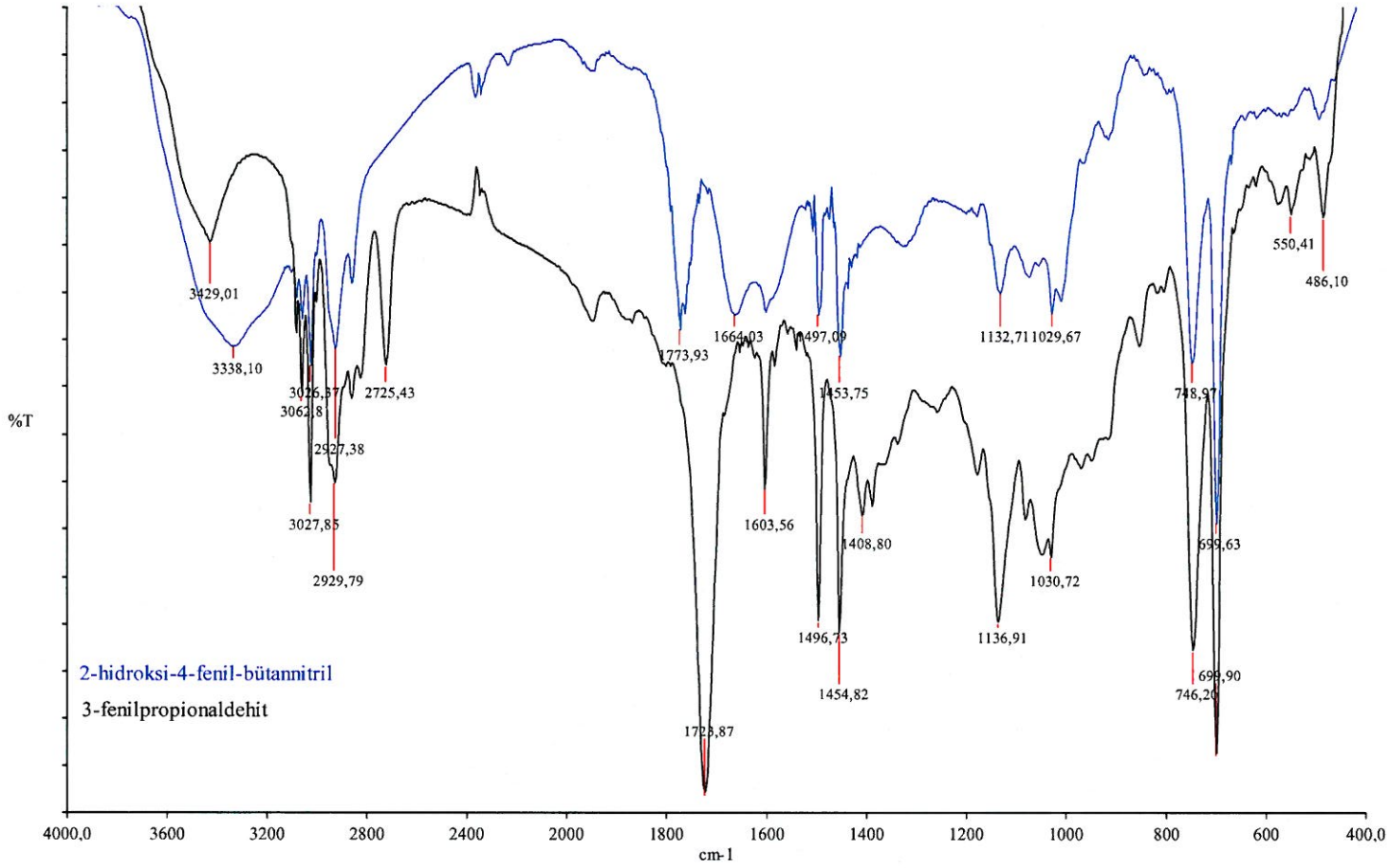
Ek 11. Mandelonitrilin ve benzaldehitin FT-IR spektrumu



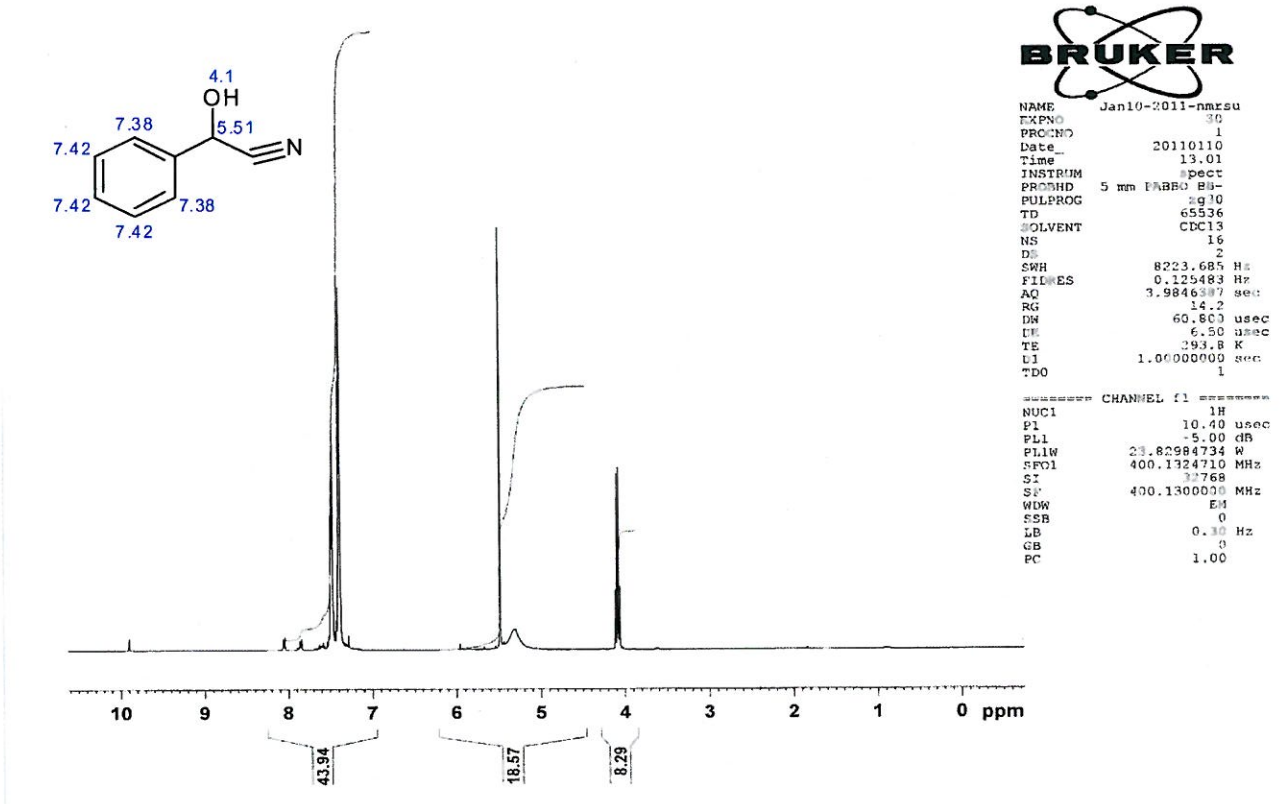
Ek 12. 2-kloromandelonitril ve 2-klorobenzaldehitin FT-IR spektrumu.



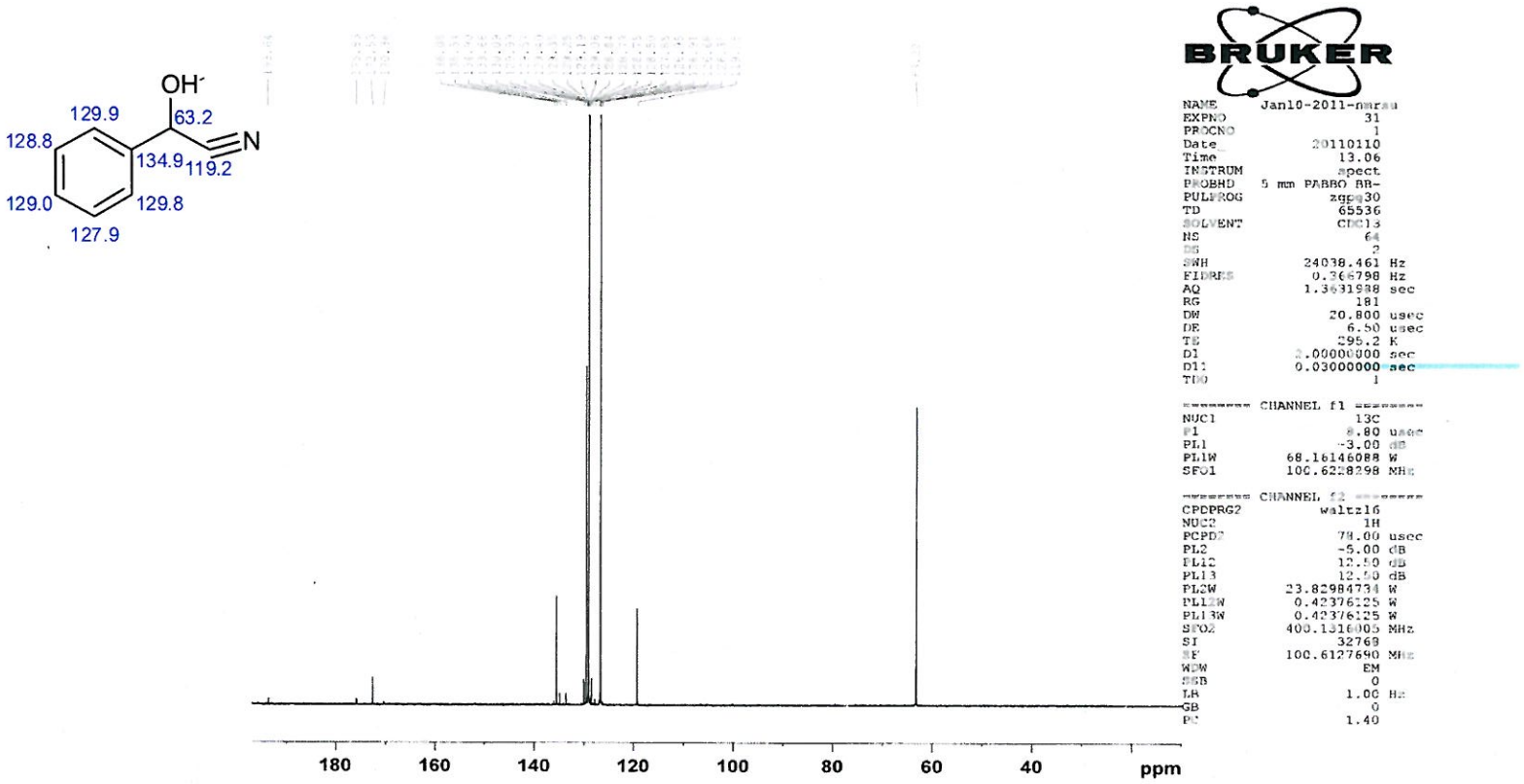
Ek 13. 3,4-dihidroksimandelonitrilin ve 3,4-dihidroksibenzaldehitin FT-IR spekturumu.



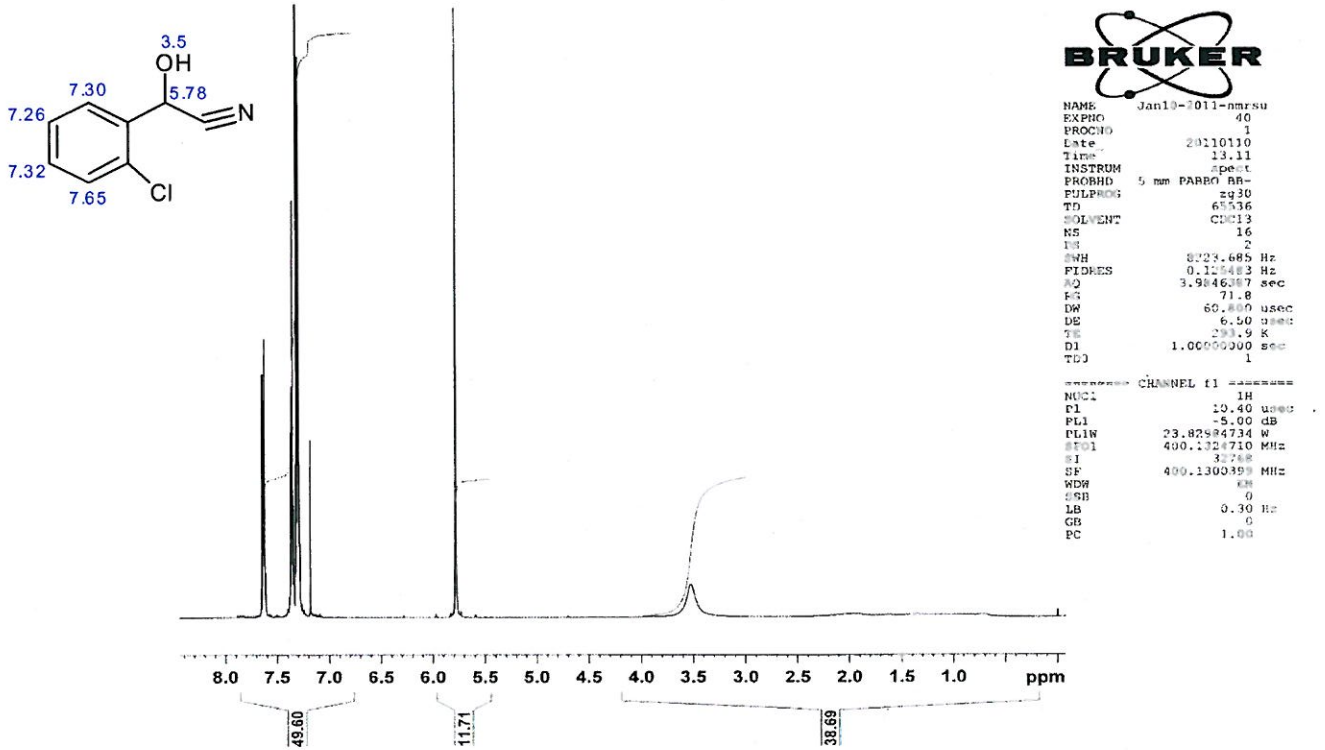
Ek 14. 2-hidroksi-4-fenilbütironitril ve 3-fenilpropiyonaldehitin FT-IR spekturumu.



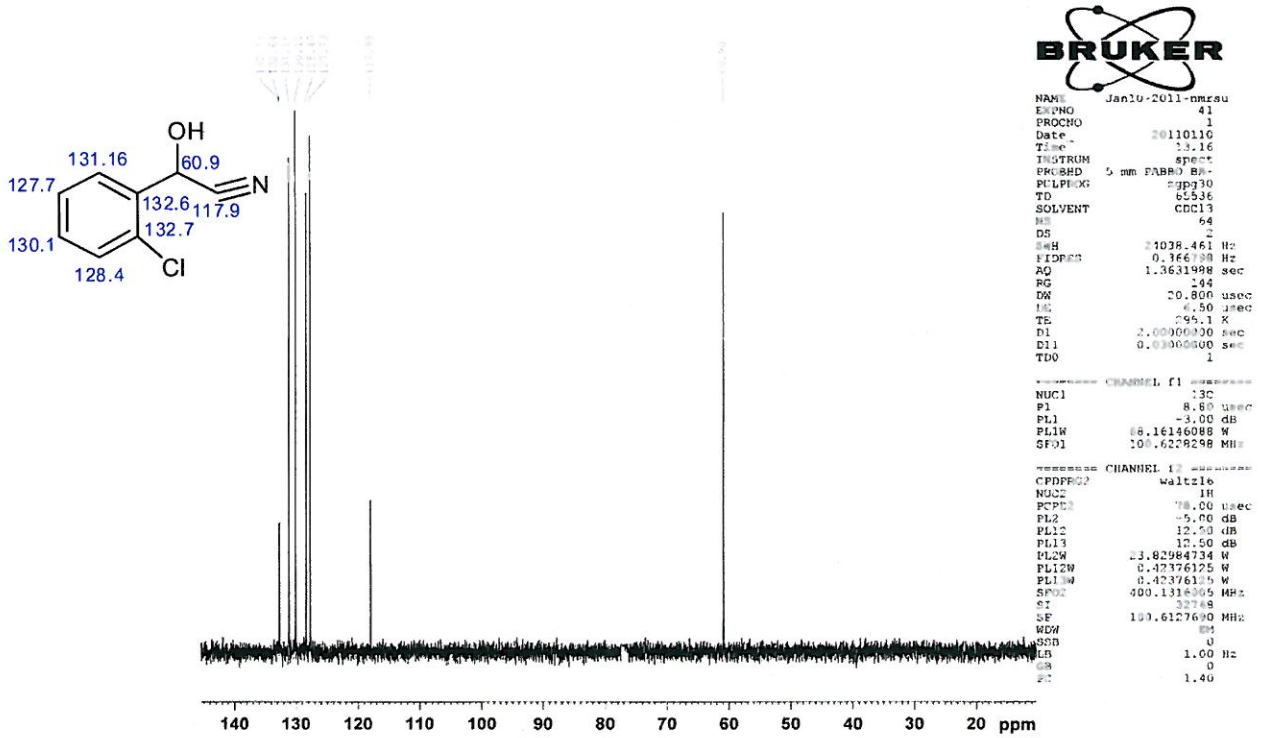
Ek 15. Mandelonitril'in ^{1}H NMR spektrumu.



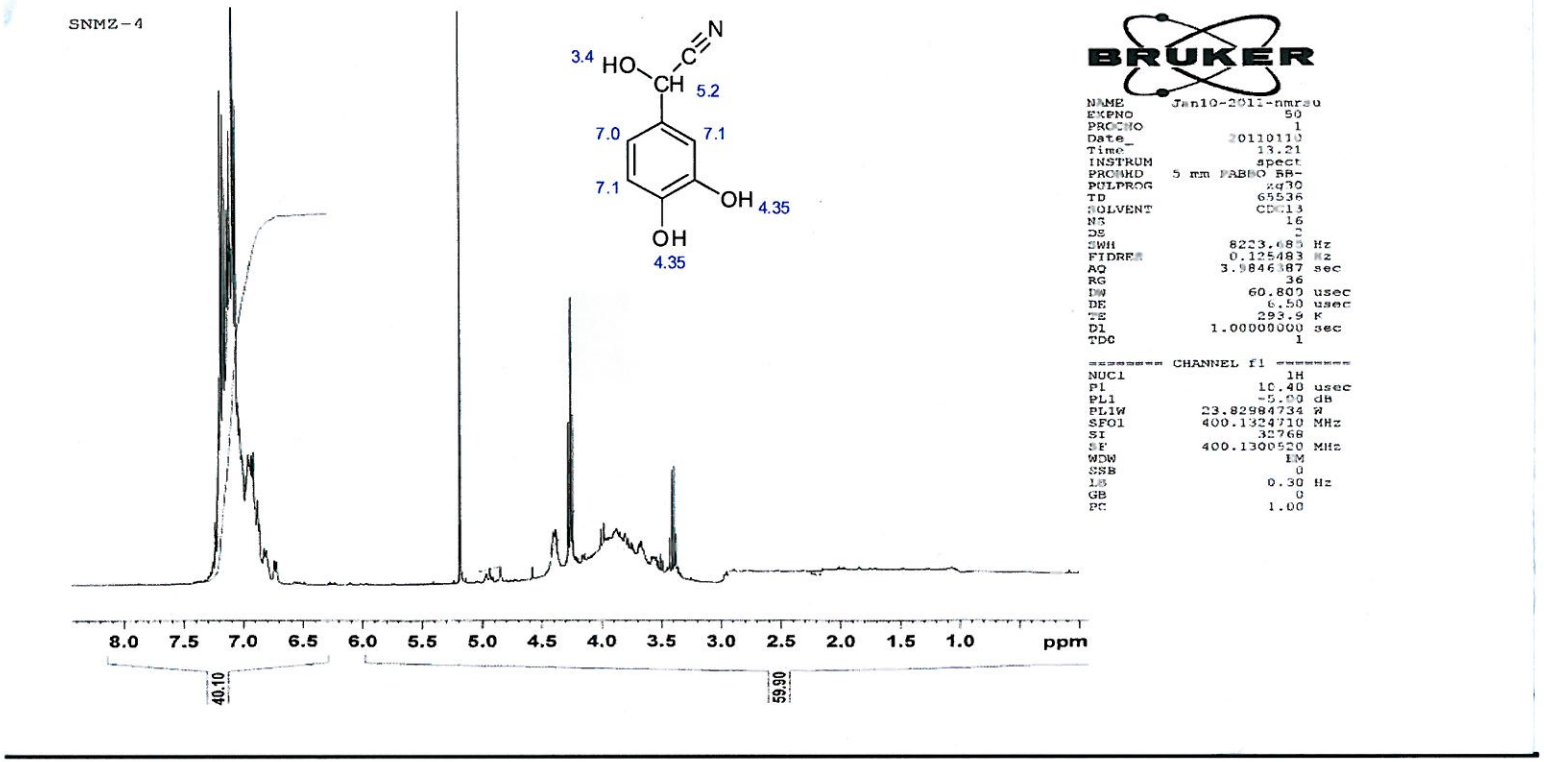
Ek 16. Mandelonitril'in ^{13}C NMR spektrumu.



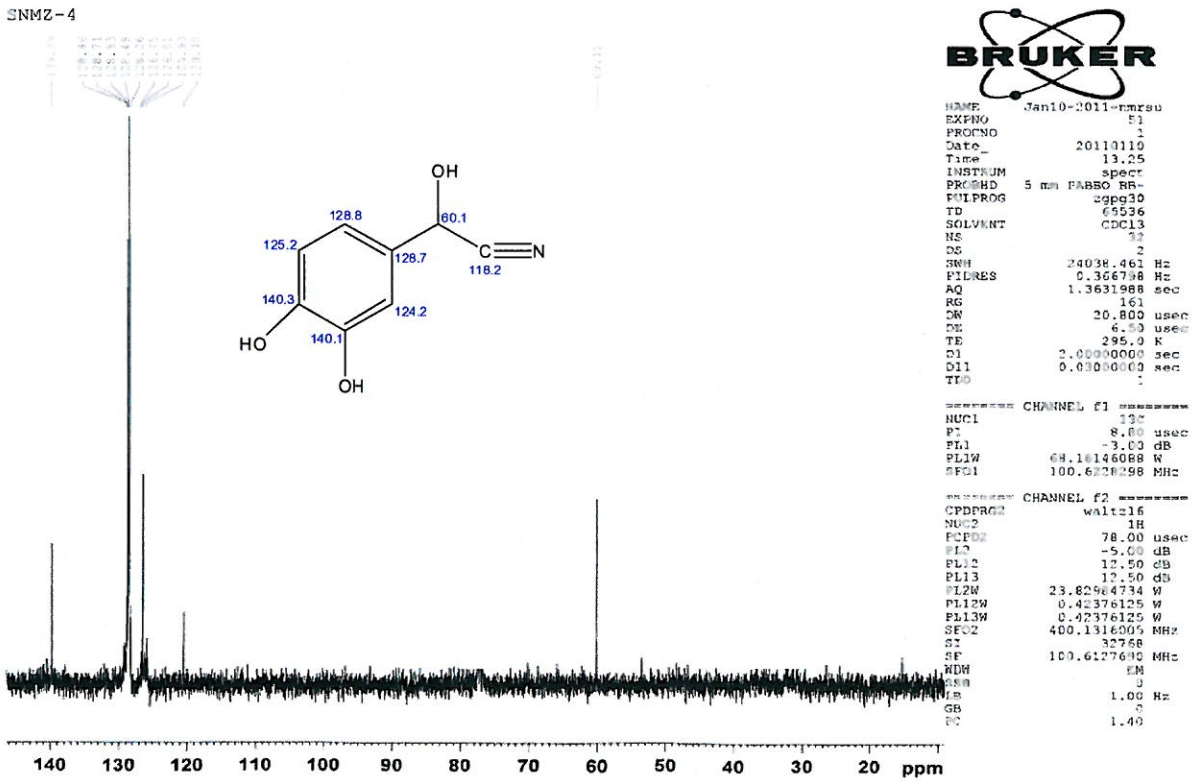
Ek 17. 2-kloromandelonitril'in ^{1}H NMR spektrumu.



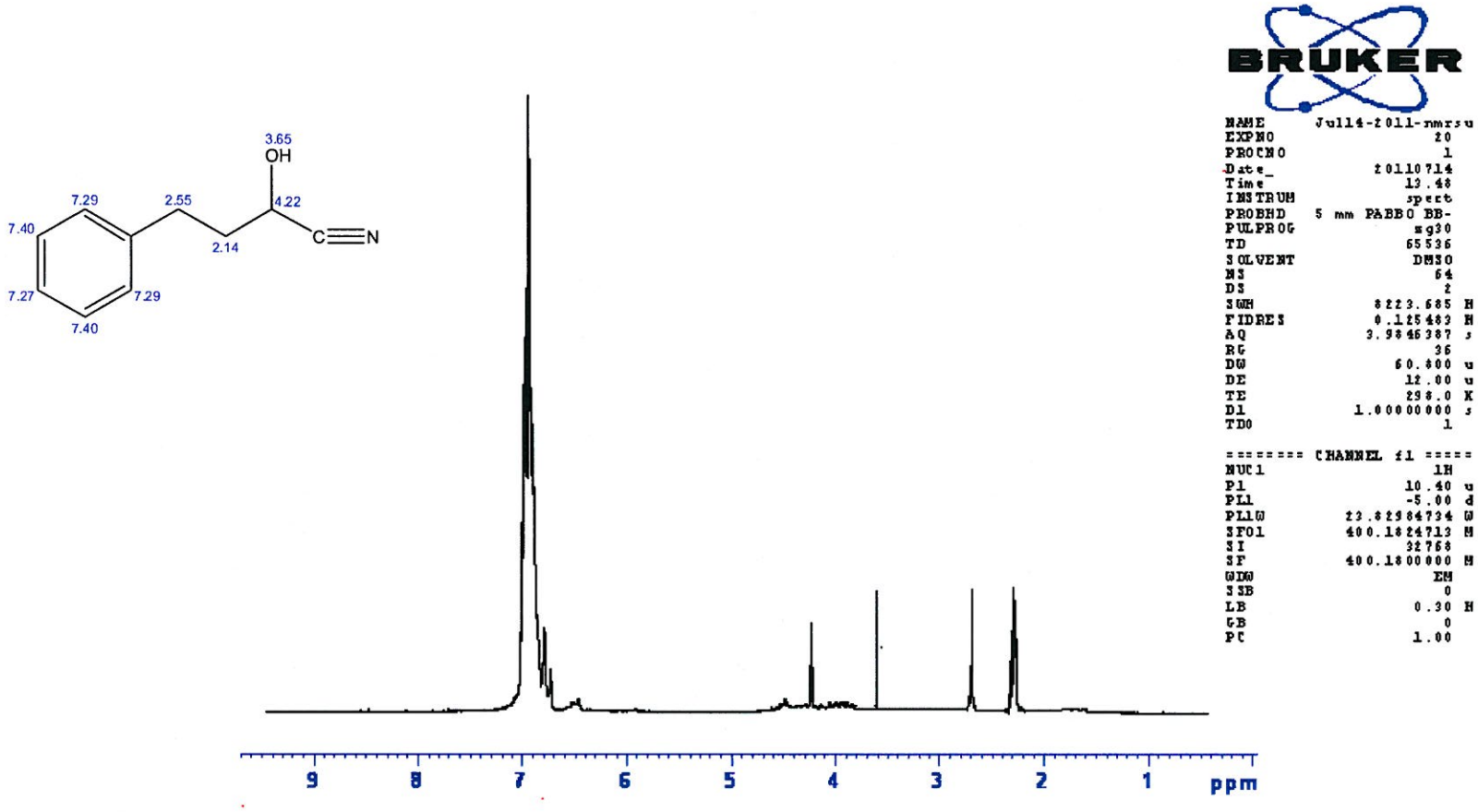
Ek 18. 2-kloromandelonitril'in ^{13}C NMR spektrumu.



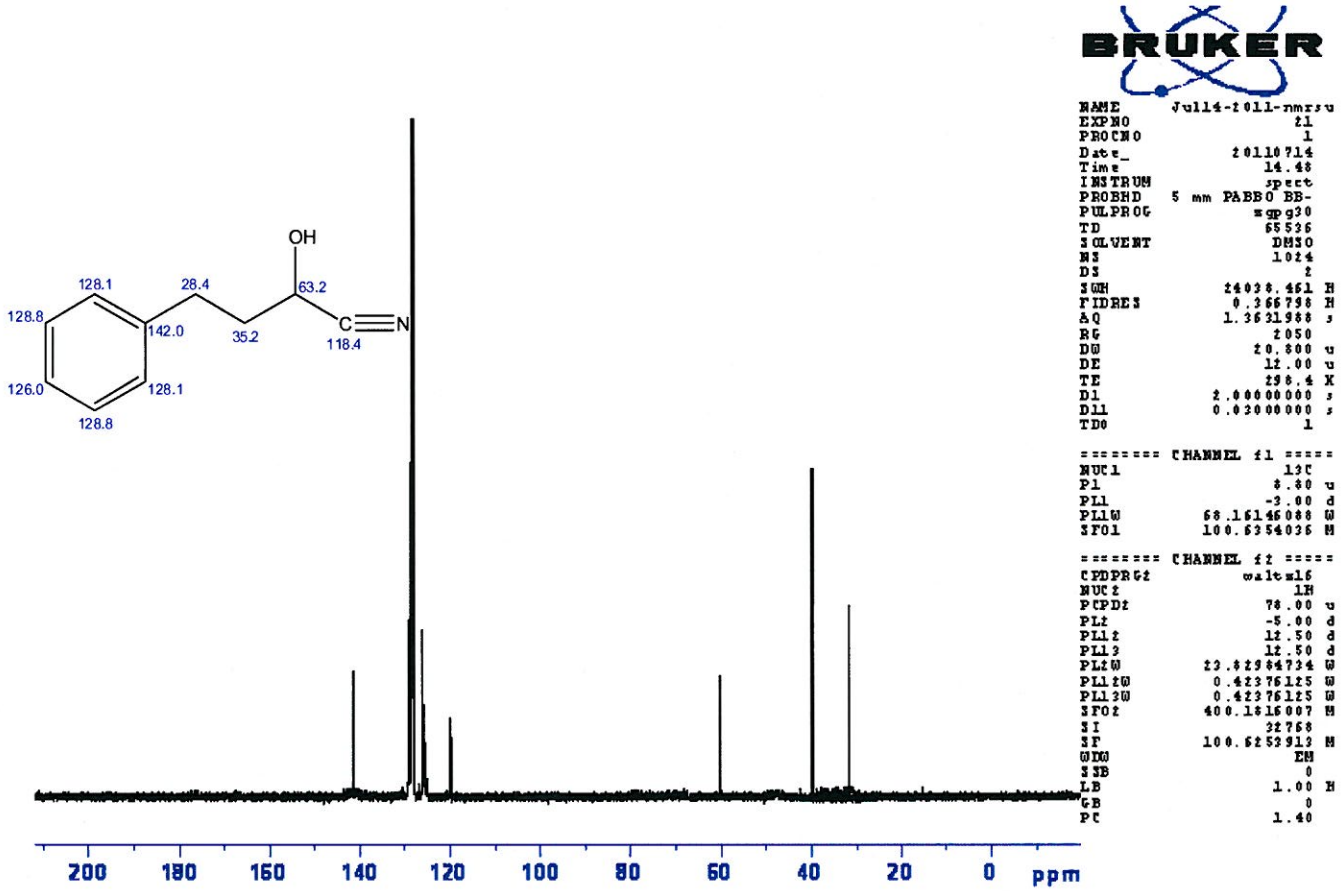
Ek 19. 3,4-dihidroksimandelonitrilin ^{1}H NMR spektrumu.



Ek 20. 3,4-dihidroksimandelonitrilin ^{13}C NMR spektrumu



Ek 21. 2-hidroksi-4-fenilbütironitrilin ^{1}H NMR spekturumu.



Ek 22. 2-hidroksi-4-fenilbütironitrilin ^{13}C NMR spekturumu.