ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Ali TOPRAK

NİTRİLAZIN FARKLI YÖNTEMLERLE İMMOBİLİZASYONU VE KARBOKSİLİK ASİTLERİN SENTEZİNDE KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA-2021

ÖZ

DOKTORA TEZİ

NİTRİLAZIN FARKLI YÖNTEMLERLE İMMOBİLİZASYONU VE KARBOKSİLİK ASİTLERİN SENTEZİNDE KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

Ali TOPRAK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Yıl:2021, Sayfa: 141
Jüri : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
: Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
: Prof. Dr. Deniz YILDIRIM
: Prof. Dr. Gül ÖZYILMAZ
: Doç. Dr. Hasan KARADAĞ

Tez çalışmasında, substrat özgünlüğü bilinmeyen çeşitli rekombine nitrilaz (NIT) enzimlerinin farklı yöntemler ile immobilizasyonu, en uygun immobilizasyon yönteminin belirlenmesi ve immobilize nitrilazların özgül olduğu nitril bileşiklerinden karşılık gelen karboksilik asitlerin ılımlı koşullarda sentezlenmesi amacıyla kullanımları araştırılmıştır. NIT-104 akrilik asit, NIT-105 benzoik asit, NIT-106 ve NIT-P1-118 mandelik asit sentezi için en uygun nitrilaz olarak belirlenmiştir. Uygulanan immobilizasyon yöntemleri arasında, NIT-104 ve NIT-105 enzimleri için PVA jel, NIT-P1-118 için ise PVA jel ve alginat (ALG) jel hapsetme yöntemleri en uygun yöntemler olarak belirlenmiştir. Ancak, NIT-106 için uygun bir immobilizasyon yöntemi belirlenememiştir. Bütün immobilize enzim örneklerinin optimum pH değeri 7,5 olarak bulunmuştur. Optimum sıcaklık değerleri PVA-NIT-104, PVA-NIT-P1-118 ve ALG-NIT-P1-118 için 30 °C ve PVA-NIT-105 için 35 °C olarak belirlenmiştir. PVA-NIT-104, PVA-NIT-105, PVA-NIT-P1-118 ve ALG-NIT-P1-118 için K_m değerleri sırasıyla 11,7; 4,9; 26,20 ve 26,18 mM, V_{max} değerleri sırasıyla 1,6; 2,0; 6,35 ve 1,96 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. Bütün immobilize enzim örneklerinin termal ve depolama kararlılıklarının serbest enzimlerden oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Kesikli reaktörde 20 kez tekrar kullanımın ardından başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 95'ini koruyan ALG-NIT-P1-118 ve 15 kez kullanımın ardından başlangıç aktivitesinin % 84'ünü koruyan PVA-NIT-104 tekrar kullanım kararlılığı en yüksek olan immobilize nitrilazlar olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda, PVA-NIT-104'ün 0,1 M başlangıç derişimindeki akrilonitrilin tamamını 30 dakika içerisinde akrilik asite dönüştürebilmesi nedeniyle PVA-NIT-104'ün endüstriyel uygulamalarda akrilik asit sentezi için oldukça uygun olacağı değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nitrilaz, İmmobilizasyon, Akrilik asit, PVA, Alginat, Mandelik asit

ABSTRACT

PhD THESIS

IMMOBILIZATION OF NITRILASE BY DIFFERENT IMMOBILIZATION METHODS AND INVESTIGATION OF ITS USES IN THE SYNTHESIS OF CARBOXYLIC ACIDS

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTUTE OF NATURAL APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Supervisor : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
Year:2021, Pages: 141
Jury : Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL
: Prof Dr. Ramazan BİLGİN
: Prof. Dr. Deniz YILDIRIM
: Prof. Dr. Gül ÖZYILMAZ
: Assoc. Prof. Dr. Hasan KARADAĞ

In the thesis study, the immobilization of various recombinant nitrilase (NIT) enzymes with unknown substrate specificity by different methods, the determination of the most appropriate immobilization method, and their use in the synthesis of corresponding carboxylic acids from nitrile compounds for which immobilized nitrilases are specific were investigated. It was determined that the most suitable nitrilase for the synthesis of acrylic acid, benzoic acid and mandelic acid were NIT-104, NIT-105, and NIT-106 and NIT-P1-118, respectively. Among the applied immobilization methods, the entrapments of NIT-104 and NIT-105 enzymes in PVA gel and the entrapments of NIT-P1-118 in PVA gel and alginate (ALG) gel were the most suitable methods. However, a suitable immobilization method could not be determined for NIT-106. The optimum pH value of all immobilized enzyme samples was found to be 7.5. The optimum temperature values were determined as 30 °C for PVA-NIT-104, PVA-NIT-P1-118 and ALG-NIT-P1-118, and 35 °C for PVA-NIT-105. The K_m values for PVA-NIT-104, PVA-NIT-105, PVA-NIT-P1-118 and ALG-NIT-P1-118 were determined as 11.7, 4.9, 26.20 and 26.18 mM, respectively, their corresponding V_{max} values were 1.6, 2.0, 6.35 and 1.96 U/mg protein. It was determined that the thermal and storage stability of all immobilized enzyme samples were considerably higher than their free counterparts. ALG-NIT-P1-118 which retained approximately 95% of its initial activity after 20 reuses and PVA-NIT-104 which retained 84% of its initial activity after 15 reuses, were determined as the immobilized nitrilases with the highest reuse stability in a batch reactor. It has been evaluated that PVA-NIT-104 will be quite suitable for acrylic acid synthesis in industrial applications, since it can convert all acrylonitrile at an initial concentration of 0.1 M into acrylic acid within 30 minutes under the determined optimum conditions.

Keywords: Nitrilase, Immobilization, Acrylic acid, PVA, Alginate, Mandelic acid

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Nitrilazlar çok çeşitli organik nitril gruplarını ılımlı koşullar altında hidrolizleyip karbosilik asitlere dönüştürebilmelerinden dolayı kimyasal katalizörlere alternatif biyokatalizörler olarak bilinirler. Bununla birlikte, nitrilazların endüstriyel kullanımı düşük kararlılıkları, reaksiyon sonunda ortamdan ayrılmalarının maliyet gerektirmesi ve tekrar kullanımlarının olmaması nedeniyle sınırlı kalmıştır. Enzim immobilizasyonu, enzimlerin genellikle kararlılıklarının artırılması, reaksiyon karışımlarından kolay ayrılmalarının mümkün kılınması ve bunların yanı sıra tekrarlanan veya sürekli kullanımlarına izin vermesi nedeniyle serbest enzimlerin endüstriyel koşullara adaptasyonun için en yaygın kullanılan yöntemlerden birisidir. Bu tez çalışması kapsamında ticari nitrilazlar (NIT-106, NIT-104, NIT-105 ve NIT-P1-118) çeşitli desteklere çeşitli yöntemler ile immobilize edilmiş ve elde edilen immobilize nitrilazlar endüstriyel olarak önemli organik karboksiklik asitlerin kendilerine karşılık gelen organik nitril bileşiklerinden ılımlı koşullarda sentezi için kullanılmıştır.

Bu amaçla çalışmada kullanılan ticari nitrilaz enzimlerinin hangi substratlara spesifik olduğunu araştırmak amacıyla akrilonitril, benzonitril, benzoil siyanid, 3-piridin karbonitril ve (R,S)-mandelonitril substrat olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar NIT-104'ün akrilonitrile, NIT-105'in benzonitrile, NIT-106 ve NIT-P1-118 enzimlerinin ise (R,S)-mandelonitrile karşı daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. NIT-106 enzimi rasemik mandelonitrilden (R)-mandelik asit elde etmek amacıyla Florisil® ve nano silika desteklere glutaraldehit ve epiklorohidrin ara kolları üzerinden ve üzerlerinde amino ve oksiran grupları taşıyan ticari Relizyme™ desteklerine kovalent olarak immobilize edilmiş, ancak elde edilen immobilize nitrilaz preparatlarının aktivitesinin oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Yine NIT-106 enzimi alginat boncuklar içerisinde, sol-jel yöntemi, CLEA oluşturma, PVA jel içerisinde hapsetme ve PCMC yöntemleri kullanılarak immobilize edilmiş, ancak elde edilen immobilize preparatların mandelonitrilden

(R)-mandelik asit sentezini düşük verimle gerçekleştirdiği belirlenmiştir.

NIT-105 enzimi ise ticari Purolite® desteklere adsorbe edilmiş ve polivinil alkol içerisinde tutuklanmıştır. Ancak Purolite® desteklere protein bağlanmadığından dolayı immobilize desteklerde aktivite tayini yapılmamıştır. Serbest ve polivinil alkol içerisinde tutuklanan NIT-105 enzim preparatları benzonitril substrat olarak kullanılarak karakterize edilmiştir. Serbest ve immobilize NIT-105 enzim preparatları için optimum pH değerleri 7,5 olarak belirlenmiştir. Serbest NIT-105 enzimi için optimum sıcaklık 25 °C, immobilize NIT-105 enzimi için ise 35 °C olarak belirlenmiştir. Serbest NIT-105 enzimi için benzonitrile karşı K_m değeri 1,85 mM ve V_{max} değeri 3,02 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. İmmobilize NIT-105 için ise K_m değeri 4,9 mM ve *Vmax* değeri de 2,0 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. İmmobilize enzimin 20 kez kesikli reaktörde kullanımı sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 65'ini koruduğu belirlenmiştir.

NIT-104 enzimi ise ticari ReliZyme™ desteklerine kovalent, Montmorillonite K-10 üzerine adsorpsiyon ve polivinil alkol içerisine tutuklama yöntemleri ile immobilize edilmiştir. Kovalent ve adsorpsiyon yöntemleri ile immobilize edilmiş NIT-104 preparatları serbest enzim aktivitesinin % 1-20'sini göstermiş, ancak polivinil alkol içerisine tutuklama yöntemi ile immobilize edilen NIT-104 ise serbest enzim aktivitesinin % 80'ını göstermiştir. Serbest ve polivinil alkol içerisine tutuklama yöntemi ile immobilize edilen NIT-104 enzimleri karakterize edilmiş ve optimum pH ve sıcaklıklar her ikisi içinde sırasıyla 7,5 ve 30 °C olarak belirlenmiştir. Serbest NIT-104 enziminin akrilonitril için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 15,5 mM ve 1,8 U/mg protein olarak, polivinil alkol içerisine immobilize edilen NIT-104 enzimi için ise K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 11,7 mM ve 1,6 U/mg protein olarak belirlenmiştir. Serbest ve immobilize NIT-104 enzimlerinin 30 ve 40 °C'de 24 saatlik inkübasyon süresi boyunca kalan aktiviteleri ölçülmüş 40 °C'de bekletilen serbest NIT-104 preparatı 6 saat sonunda başlangıç aktivitesini tamamen kaybederken 30 °C'de inkübe edilen serbest NIT-104 preparatı

ise 24 saat sonunda aktivitesini tamamen kaybetmiştir. Bunun yanında immobilize NIT-104 preparatının ise 30 ve 40 °C'de başlangıç aktivitelerinin sırasıyla % 60 ve % 54'ünü koruduğu belirlenmiştir. Ayrıca, serbest ve immobilize NIT-104 enzimlerinin kesikli reaktörde pH 7,5 ve 30 °C'de akrilonitrilden akrilik asit sentezleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile zamana karşı incelenmiştir. Akrilonitrilin başlangıç derişimi 100 mM olduğu zaman serbest NIT-104 enzimin akrilonitirili 60 dakikada tamamen akrilik aside dönüştürdüğü belirlenmiştir. Başlangıç derişimi 250 mM olduğunda ise 90 dakika sonundaki dönüşüm % 92 olarak gözlenmiştir. Başlangıç derişimi 500 mM ve 1 M olduğunda ise dönüşüm sırası ile % 50 ve % 39 olarak belirlenmiştir. İmmobilize NIT-104 preparatının 100 mM başlangıç derişimindeki akrilonitrili 30 dakika içerinde tamamen akrilonitrile dönüştürdüğü belirlenirken, 250 mM akrilonitrili ise 90 dakika sonunda ise % 90 oranında akrilik aside dönüştürmüştür. Başlangıç derişimi 500 mM ve 1 M olduğunda ise dönüşüm sırası ile % 72 ve % 67 olarak gözlenmiştir. İmmobilize nitrilazın tekrar kullanım kararlılığı akrilonitril hidrolizi için pH 7,5 ve 30 °C'de incelenmiş ve immobilize nitrilazın 15 kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin % 85'ini koruduğu belirlenmiştir.

NIT-P1-118'in immobilizasyonu için PVA jel, alginat jel ve kalsiyum karbonat mikroküre kapsülasyon yöntemleri ile immobilizasyonları çalışılmış ve aktivitesi yüksek olan PVA jele immobilize NIT-P1-118 (PVA-NIT-P1-118) ve alginat jele immobilize NIT-P1-118 (ALG-NIT-P1-118) ile karakterizasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Serbest ve immobilize enzim örneklerinin optimum pH değeri 7,5 olarak belirlenmiştir. Optimum sıcaklık değerleri serbest enzim için 25 °C, ALG- NIT-P1-118ve PVA- NIT-P1-118 için 30 °C olarak belirlenmiştir. Her iki yöntemle immobilize edilen enzimin termal ve depolama kararlılığının arttığı gözlenmiştir. Serbest NIT-P1-118 enzimi için (R,S)-mandelonitrile karşı K_m değeri 8,52 mM ve V_{max} değeri 5 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. ALG-NIT-P1-118 ve PVA-NIT-P1-118 için ise K_m değerleri sırasıyla 26,18 mM ve 26,20 mM, V_{max}

değerleri de sırasıyla 1,96 ve 6,35 U/mg protein olarak belirlenmiştir. ALG-P1-118 enzim örneklerinin 20 kez kesikli reaktörde kullanımı sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 95'ini koruduğu belirlenmiştir. PVA-NIT-P1-118 örneklerinin 20 kez kesikli reaktörde kullanımı sonucunda başlangıç aktivitelerinin yaklaşık % 50'sini koruduğu belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen, yapıcı ve yönlendirici görüşleri ile bana daima yol gösteren, akademik hayatıma ışık tutan, bu süreçte sabrını esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. S. Seyhan TÜKEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora Tez İzleme Komitesi üyelerinden hocam Sayın Prof. Dr. Ramazan BİLGİN'e çalışmamın tüm aşamalarında yönlendiriciliği ve destekleyici tavrı için çok teşekkür ederim. Çalışmam boyunca desteğini derinden hissettiğim hocam Sayın Prof. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ'e teşekkürlerimi sunarım. Yine Tez İzleme Komitesi üyelerinden hocam Sayın Prof. Dr. Deniz YILDIRIM'a çalışmamın her aşamasındaki soru ve sorunlarımda desteğini ve bilgisini esirgemediği için sonsuz teşekkür ederim.

Her zaman bigisini esirgemediği, manevi desteğini ve yol göstericiliğini hissettiğim hocam Sayın Doç. Dr. Dilek ALAGÖZ'e içten teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamın son dönemine tanıklık eden, yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Nazlı Ece VARAN'a teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca ilgi, sabır ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen anneme, babama, kardeşlerime ve eşime teşekkür ederim.

Çalışmam esnasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Ç.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölüm Başkanlığı'na ve tüm öğretim üyelerine, maddi destek veren Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje no: FDK-2015-5054) içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR VII
İÇİNDEKİLER VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ XIV
ŞEKİLLER DİZİNİ XVI
SİMGELER VE KISALTMALAR XX
1. GİRİŞ 1
1.1. Nitrilaz 1
1.2. İmmobilizasyon 11
1.2.1. Tutuklama Yöntemi 12
1.2.1.1. Kalsiyum Alginat Jelde Tutuklama 13
1.2.1.2. Sol-jel Tutuklama 13
1.2.1.3. PVA jel immobilizasyonu 15
1.2.2. Kovalent İmmobilizasyon 16
1.2.3. Çapraz Bağlı Enzim Agregatları (CLEA) İmmobilizasyonu 17
1.2.4. Adsorbsiyon İmmobilizasyonu 18
1.3. Çalışmanın Amacı ve Önemi 18
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 21
3. MATERYAL VE METOT 35
3.1. MATERYAL 35
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Enzimler 35
3.1.2. Kullanılan Cihazlar 36
3.1.3. Kullanılan Araç-Gereçler 36
3.2. METOT 36
3.2.1. Nitrilaz Enzimlerinin Benzonitrile Karşı Aktivitesinin Belirlenmesi 36

3.2.2. Protein Tayini 37
3.2.3. HPLC Analizleri 37
3.2.4. Nitrilaz Enzimlerinin (R,S)-Mandelonitrile Karşı Aktivitelerinin Belirlenmesi 37
3.2.5. Benzaldehit Kullanılarak Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi 39
3.2.6. NIT-106 Katalizli Reaksiyonda Zamana Bağlı Mandelik Asit Sentezi 39
3.2.7. Organik Çözücülerin NIT-106 Aktivitesi Üzerine Etkisi 39
3.2.8. (R,S)-Mandelonitril Miktarının NIT-106 Aktivitesi Üzerine Etkisi .. 39
3.2.9. NIT-106'nın Kovalent İmmobilizasyonunda Kullanılacak Desteklerin Hazırlanması 40
3.2.9.1. Silika Nanopartikül ve Florisil Desteğe 3-Aminopropiltrietoksisilan (3-APTES) Ara Kolunun Bağlanması ve Glutaraldehit İle Aktifleştirilmesi 40
3.2.9.2. Silika Nanopartiküllerin ve Florisil Desteğin Epiklorohidrin ile Aktifleştirilmesi 41
3.2.9.3. ReliZyme™ Desteklerin Hazırlanması 41
3.2.10. NIT-106 Enziminin Kovalent İmmobilizasyonu 42
3.2.11. NIT-106 Enziminin Sol-jel Yöntemiyle İmmobilizasyonu 43
3.2.12. NIT-106'nın Alginat İçerisinde İmmobilizasyonu 45
3.2.13. NIT-106'nın Protein Kaplı Mikrokristal (PCMC) Yöntemi ile İmmobilizasyonu 45
3.2.13.1. NIT-106 PCMC'nin Aktivite Tayini 46
3.2.14. NIT-106 Polivinil Alkol (PVA) Jel İmmobilizasyonu 46
3.2.15. NIT-106 Enziminin CLEA Oluşturarak İmmobilizasyonu 46
3.3. NIT-105 İmmobilizasyonu 47
3.3.1. NIT-105 Enzimin Purolite® Lifetech™ ECR1090M ve Lifetech™ ECR1030M desteklere İmmobilizasyonu 47

3.3.2. NIT-105'in Polivinil Alkol (PVA) (PVA-NIT-105) Jel İmmobilizasyonu 47
3.3.3. Serbest ve immobilize NIT-105 Enzimlerinin Aktivite Tayini 48
3.3.4. Serbest ve PVA-NIT-105'in Karakterizasyonu 48
3.3.5. PVA-NIT-105'in Tekrar kullanım Kararlılığının Belirlenmesi 49
3.3.6. NIT-105'in Substrat Spesifikliğinin Belirlenmesi 49
3.4. NIT-104 İmmobilizasyonu 50
3.4.1. NIT-104'ün İmmobilizasyonunda Kullanılacak Desteklerin Hazırlanması 50
3.4.2. NIT-104'ün Farklı Yöntemlerle İmmobilizasyonu 51
3.4.3. NIT-104'ün Aktivitesinin Belirlenmesi 52
3.4.4. Serbest ve İmmobilize NIT-104'ün Karakterizasyonu 53
3.4.5. Farklı Substrat Konsantrasyonlarında Zamana Bağlı Akrilonitril Hidrolizi 54
3.4.6. HPLC Analizleri 55
3.4.7. PVA-NIT-104'ün Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi 55
3.5. NIT-P-118 İmmobilizasyonu 56
3.5.1. P Serisi Nitrilazların (R,S)-Mandelonitrile Karşı Aktivitelerinin Belirlenmesi 56
3.5.2. HPLC Analizleri 56
3.5.3. NIT-P1-118 Aktivite Tayini 56
3.5.4. NIT-P1-118'in Farklı Yöntemlerle İmmobilizasyonu 57
3.5.5. Serbest ve İmmobilize NIT-P1-118 Enzimlerinin Karakterizasyonu. 58
3.5.6. İmmobilize Nıt-P1-118 Enzimlerinin Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi 60
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 61
4.1. Bulgular 61
4.1.1. HPLC Analizleri 61

4.1.2. Nitrilaz Enzimlerinin Benzonitril ve (R,S)-mandelonitrile Karşı Aktivitesinin Belirlenmesi 61
4.1.3. NIT-106 Aktivitesi Üzerine Çözücülerin Etkisi 64
4.1.4. NIT-106'nın İmmobilizasyonu 65
4.1.4.1. Kovalent Bağlanma ile İmmobilizasyon 65
4.1.4.2. Sol-jel Oluşturarak İmmobilizasyon 66
4.1.4.3. Alginat Jel Oluşturarak İmmobilizasyon 66
4.1.4.4. Protein Kaplı Mikro Kristal (PCMC) Oluşturarark İmmobilizasyon 67
4.1.4.5. Polivinil Alkol (PVA) Jel Oluşturarak İmmobilizasyon 67
4.1.4.6. Çapraz Bağlı Enzim Agregatları (CLEA) Oluşturarak İmmobilizasyon 67
4.1.5. NIT-105 İmmobilizasyonu 67
4.1.5.1. Adsorbsiyon ile İmmobilizasyon 67
4.1.5.2. Polivinil Alkol (PVA) Jel Oluşturarak İmmobilizasyon 68
4.1.5.3. Serbest ve PVA-NIT-105'in Aktivitesine pH ve Sıcaklığın Etkisi 68
4.1.5.4. Serbest ve PVA-NIT-105'in Termal Kararlılığı 70
4.1.5.5. Serbest ve PVA-NIT-105'in Depolama Kararlılığı 71
4.1.5.6. PVA-NIT-105'in Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi 72
4.1.5.6. Serbest ve PVA-NIT-105'in Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi 73
4.1.6. NIT-104 İmmobilizasyonu 75
4.1.6.1. NIT-104'ün Farklı Yöntemlerle İmmobilizasyonu 75
4.1.6.2. PVA ile Jel Oluşturarak NIT-104'ün (PVA-NIT-104) İmmobilizasyonu 76
4.1.6.3. Serbest ve PVA-NIT-104'ün Aktivitesine pH ve Sıcaklığın Etkisi 77

4.1.6.4. Serbest ve PVA-NIT-104'ün Termal Kararlılığı 79
4.1.6.5. Serbest ve PVA-NIT-104'ün Depolama Kararlılığı 81
4.1.6.6. PVA-NIT-104'ün Tekrar Kullanım Kararlılığı 82
4.1.6.7. Serbest ve PVA-NIT-104'ün Akrilik Asit Sentezinde Kullanılması 83
4.1.6.8. Serbest ve PVA-NIT-104'ün Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi 85
4.1.7. NIT-P1-118 İmmobilizasyonu 90
4.1.7.1. İmmobilizasyonda kullanılacak P Serisi Nitrilazın ve İmmobilizasyonunda Kullanılacak En Uygun Yöntemin Belirlenmesi 90
4.1.7.2. NIT-P1-118'in PVA ve Alginat Jel Oluşturarak İmmobilizasyonu 91
4.1.7.3. Serbest, PVA-NIT-P1-118 ve ALG- NIT-P1-118'in Aktivitesine pH ve Sıcaklığın Etkisi 94
4.1.7.4. Serbest, PVA-NIT-P1-118 ve ALG-NIT-P1-118'in Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi 96
4.1.7.5. Serbest, PVA-NIT-P1-118 ve ALG-NIT-P1-118'in Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi 100
4.1.7.6. PVA-NIT-P1-118 ve ALG-NIT-P1-118'in Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi 102
4.1.7.7. Serbest, PVA-NIT-P1-118 ve ALG-NIT-P1-118'in Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi 104
4.2. Tartışma 107
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 119
5.1. Sonuçlar 119
5.2. Öneriler 121
KAYNAKLAR 123
ÖZGEÇMİŞ 141

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. Nitrilaz enziminin izole edildiği bazı bitki, mantar ve bakteri türleri .. 2
Çizelge 1.2. Farklı kaynaklardan saflaştırılan bazı nitrilazların karakterizasyonu ... 4
Çİzelge 3.1. NIT-106 enziminin aktivitesininin belirlenmesinde kullanılan nitril bileşikleri ve karşılık gelen karboksilik asit bileşikleri 38
Çİzelge 3.2. İmmobilizasyonda kullanılan ReliZyne^{TM} destekler ve fonksiyonel grupları 42
Çİzelge 3.3. NIT-105'in substrat spesifikliğinin belirlenmesinde kullanılan nitril bileşikleri ve karşılık gelen karboksilik asit bileşikleri 50
Çizelge 4.1. Farklı yöntemlerle immobilize edilen NIT-104 örneklerinin protein ve aktivite geri kazanımları 75
Çizelge 4.2. ReliZyme^{TM} desteklerin partikül boyutu ve fonksiyonel grupları 76
Çizelge 4.3. Serbest ve NIT-104-PVA-jel enzimlerin 30 ve 40 °C'deki yarılanma süresi ($t_{1/2}$) ve kararlılık faktörleri (KF) 81
Çizelge 4.4. Serbest ve immobilize örneklerin farklı nitril bileşiklerine karşı kinetik parametreleri 86
Çizelge 4.5. Serbest ve immobilize NIT-P1-118 enzimlerin 30 ve 45 °C'deki yarılanma süresi ($t_{1/2}$) ve kararlılık faktörleri (KF) 99
Çizelge 4.6. Serbest ve immobilize NIT-P1-118'lerin (R,S)-mandelonitrile karşı kinetik parametreleri 106
Çizelge 4.7. İmmobilizasyonda kullanılan enzim türleri ve spesifik substratları için bazı deneysel parametreleri 117

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Nitrilaz enziminin katalizlediği genel reaksiyon (a) ve mekanizması (b)..... 5
Şekil 1.2. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması 12
Şekil 1.3. Enzimlerin sol-jel tutuklanması 14
Şekil 4.1. Nitrilaz enzimlerinin benzonitrile karşı bağıl aktivite değerleri..... 62
Şekil 4.2. Nitrilaz enzimlerinin (R,S)-Mandelonitrile karşı bağıl aktivite değerleri..... 63
Şekil 4.3. NIT-106 katalizli zamana bağlı mandelik asit sentezi..... 64
Şekil 4.4. NIT-106 aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi..... 65
Şekil 4.5. İmmobilizasyonunda kullanılan NIT-105'in derişimine bağlı aktivite değişimi 68
Şekil 4.6. Serbest ve NIT-105-PVA-jel'in aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi ... 69
Şekil 4.7. Serbest ve PVA-NIT-105'in aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi 70
Şekil 4.8. Serbest NIT-105'in 25 ve 35 ^{o}C'de bekletilme süresine bağlı aktivite değişimi 71
Şekil 4.9. PVA-NIT-105'in 25 ve 35 ^{o}C'de bekletilme süresine bağlı aktivite değişimi 71
Şekil 4.10. Serbest ve PVA-NIT-105'in 5 ^{o}C'deki depolama süresine bağlı aktivite değişimi 72
Şekil 4.11. PVA-NIT-105 örneğinin kesikli reaktörde tekrar kullanımına bağlı olarak aktivitesindeki değişim..... 73
Şekil 4.12. Serbest NIT-105'in benzonitril için Lineweaver-Burk grafiği..... 74
Şekil 4.13. PVA-NIT-105'in benzonitril için Lineweaver-Burk grafiği 74
Şekil 4.14. İmmobilizasyonda kullanılan enzim derişiminin immobilize NIT-104 aktivitesi üzerine etkisi 76
Şekil 4.15. Serbest ve PVA-NIT-104'ün aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimi..... 78

Şekil 4.16. Serbest ve PVA-NIT-104 enzimlerinin aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimi 79
Şekil 4.17. Serbest ve PVA-NIT-104'ün aktivitelerinin depolama süresi ve koşullarına bağlı değişimi 80
Şekil 4.18. Serbest ve PVA-NIT-104 enzimlerinin aktivitelerinin depolama süresi ve koşullarına bağlı değişimi 82
Şekil 4.19. PVA-NIT-104 örneğinin kesikli reaktörde tekrar kullanımına bağlı olarak aktivitesindeki değişim 83
Şekil 4.20. Serbest NIT-104 tarafından katalizlenen reaksiyonda zamana bağlı akrilonitrilin hidrolizi 84
Şekil 4.21. PVA-NIT-104 tarafından katalizlenen reaksiyonda zamana bağlı akrilonitrilin hidrolizi 85
Şekil 4.22. Serbest NIT-104'ün akrilonitril için Lineweaver-Burk grafiği 86
Şekil 4.23. Serbest NIT-104'ün Benzonitril için Lineweaver-Burk grafiği 87
Şekil 4.24. Serbest NIT-104'ün 3-piridinkarbonitrile için Lineweaver-Burk grafiği 87
Şekil 4.25. Serbest NIT-104'ün benzoil siyanid için Lineweaver-Burk grafiği 88
Şekil 4.26. PVA-NIT-104'ün akrilonitril için Lineweaver-Burk grafiği 88
Şekil 4.27. PVA-NIT-104'ün Benzonitril için Lineweaver-Burk grafiği 89
Şekil 4.28. PVA-NIT-104'ün 3-piridinkarbonitril için Lineweaver-Burk grafiği .. 89
Şekil 4.29. PVA-NIT-104'ün benzoil siyanid için Lineweaver-Burk grafiği 90
Şekil 4.30. NIT-P1-118 enziminin PVA jel immobilizasyonunda kullanılan enzim derişimine bağlı olarak aktivite değişimi 91
Şekil 4.31. NIT-P1-118 enziminin immobilizasyonunda kullanılan alginatın derişimine bağlı olarak aktivite ve bağlanma yüzdesindeki değişimler 92
Şekil 4.32. NIT-P1-118 enziminin immobilizasyonunda kullanılan kalsiyum klorürün derişimine bağlı olarak aktivite ve bağlanma yüzdesindeki değişimler 93

Şekil 4.33. NIT-P1-118 enziminin immobilizasyonunda kullanılan NIT-P1-118 derişimine bağlı olarak aktivite ve bağlanma yüzdesindeki değişimler 94
Şekil 4.34. Serbest ve PVA-NIT-P1-118 ve ALG-NIT-P1-118'in aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimi..... 95
Şekil 4.35. Serbest, PVA-NIT-P1-118 ve ALG-NIT-P1-118'in aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimi 96
Şekil 4.36. Serbest NIT-P1-1118 için aktivitelerin bekletilme süresine bağlı değişimi 97
Şekil 4.37. ALG-NIT-P1-118 için aktivitelerin bekletilme süresine bağlı değişimi 98
Şekil 4.38. PVA-NIT-P1-118 için aktivitelerin bekletilme süresine bağlı değişimi 99
Şekil 4.39. Serbest NIT-P1-118 enzimlerin aktivitelerinin depolama süresi ve koşullarına bağlı değişimi..... 100
Şekil 4.40. ALG-NIT-P1-118'in aktivitelerinin depolama süresi ve koşullarına bağlı değişimi 101
Şekil 4.41. ALG-NIT-P1-118'in aktivitelerinin depolama süresi ve koşullarına bağlı değişimi 102
Şekil 4.42. ALG-NIT-P1-118 örneğinin kesikli reaktörde tekrar kullanımına bağlı olarak aktivitesindeki değişim 103
Şekil 4.43. PVA-NIT-P1-118 örneğinin kesikli reaktörde tekrar kullanımına bağlı olarak aktivitesindeki değişim 103
Şekil 4.44. Serbest NIT-P1-118 enziminin (R,S)-mandelonitril için Lineweaver-Burk grafiği..... 104
Şekil 4.45. ALG-NIT-P1-118 enziminin (R,S)-mandelonitril için Lineweaver-Burk grafiği..... 105
Şekil 4.46. PVA-NIT-P1-118 enziminin (R,S)-mandelonitril için Lineweaver-Burk grafiği..... 105

SİMGELER VE KISALTMALAR

3-APTES : 3-aminopropil trietoksi silan
CLEA : Çapraz bağlı enzim agregatları
dk. : Dakika
DKM : Dikolorometan
DMSO : Dimetil sülfoksit
DTT : Ditiyotreitol
Flo-ECH : Florisil-Epiklorohidrin
Flo-GLU : Florisil-Glutaraldehit
k_{cat} : Turnover sayısı
k_i : İnaktivasyon hız sabiti
MTOS : Metiltrimetoksisilan
MTMOS : Metiltrimetoksi silan
Nano-ECH : Nano silika-Epiklorohidrin
Nano-GLU : Nano silika-Glutaraldehit
NIT : Nitrilaz
PCMC : Protein kaplı mikro kristal
Prot. : Protein
PVA : Polivinil alkol
$t_{1/2}$: Yarılanma süresi
TEOS : Tetraetil ortosilikat
TFA : Trifloro asetik asit
TBME : Tersiyer bütil metil eter
TMOS : Tetrametoksi silan
V_{max} : Doygun substrat konsantrasyonunda enzimin ulaşabileceği maksimum hız

1. GİRİŞ

1.1. Nitrilaz

Nitrilaz (EC 3.5.5.1) enzimi ilk olarak 1964 yılında Thimann ve Mahadevan (Thimann ve Mahadevan, 1964) tarafından tanımlanmıştır. Arpa yapraklarından izole edilen enzim ilk olarak, indolasetonitrili indol asetik asite dönüştürdüğü için indolasetonitrilaz olarak adlandırılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise nitrilaz enziminin geniş bir substrat çeşitliliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Enzimin 3-siyanopiridini hidroliz oranı indolasetonitrili hidroliz oranından sekiz kat fazla olduğundan, enzimin geniş substrat aralığını belirtmesi için yeniden nitrilaz olarak adlandırılmıştır (Thimann ve Mahadevan, 1964). İlk bakteriyel nitrilaz ise toprak bakterilerinden (*Pseudomonas* türü) izole edilmiştir (Hook ve Robinson, 1964).

Nitrili hidrolize eden enzimlerin biyoteknolojik potansiyeli olması nedeniyle, nitrilazlar birçok bakteri ve mantarlardan izole edilmişlerdir. Nitrilaz enziminin izole edildiği bazı bitki, mantar ve bakteri türleri Çizelge 1.1.'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Nitrilaz enziminin izole edildiği bazı bitki, mantar ve bakteri türleri

Bakteri	
Nocardia (Rhodococcus) NCIB11215	Harper 1985
Klebsiella pneumoniae ssp. Ozaenae	Stalker ve ark., 1988
Acido vorax facilis 72W	Gavagan ve ark., 1999
Pseudomonas sp. (SI)	Dhillon ve ark., 1999
Pseudomonas DSM 7155	Layh ve ark., 1998
Nocardia (Rhodococcus) NCIB11216	Harper 1977b
Bacillus sp. strain OxB-1	Kato ve ark., 2000
Rhodococcus rhodococcus K22	Kobayashi ve ark., 1990
Rhodococcus rhodochrous J1	Kobayashi ve ark., 1989
Comamonas testosteroni	Levy-Schil ve ark., 1995
Rhodococcus rhodochrous PA-34	Bhalla ve ark., 1992
Arthrobacter nitroguajacolicus ZJUTB06-99	Shen ve ark., 2009
Rekombine *Labrenzia aggregata*	Zhang ve ark., 2012
Rekombine *Sphingomonas wittichii* RW1	Qiu ve ark., 2014
Stenotrophomonas maltophilia AC21	Badoei-Dalfard ve ark., 2016
Pyrococcus sp. M24D13	Dennett ve Blamey, 2016
Antarctic Pyrococcus sp. MC-FB	Cabrera ve Blamey, 2017
Mantar	
Fusarium oxysporum f.sp. melonis	Goldlust ve Bohak 1989
Fusarium solani IMI196840	Harper 1977a
Fusarium Solani O1	Vejvoda ve ark., 2008
Fusarium solani IMI196840	Vejvoda ve ark., 2010
Rekombine *Pseudomonas putida*	Banerjee ve ark., 2009
Bitki	
Arabidopsis thaliana	Piotrowski ve ark., 2001; Osswald ve ark., 2002
Arpa	Mahadevan ve Thimann 1964
Çin lahanası	Rausch ve Hilgenberg 1980

Nitrilaz üzerine yapılan çalışmalar enzimin substrat spesifikliğinin oldukça geniş bir aralıkta olduğunu göstermiştir. Yapılan ilk çalışmalarda nitrilaz enziminin sadece aromatik nitrillere spesifik olduğu düşünülmekteydi. Alifatik nitrillere ise nitril hidrataz enziminin spesifik olduğu düşünülmekteydi. Hem nitrilaz hem de nitril

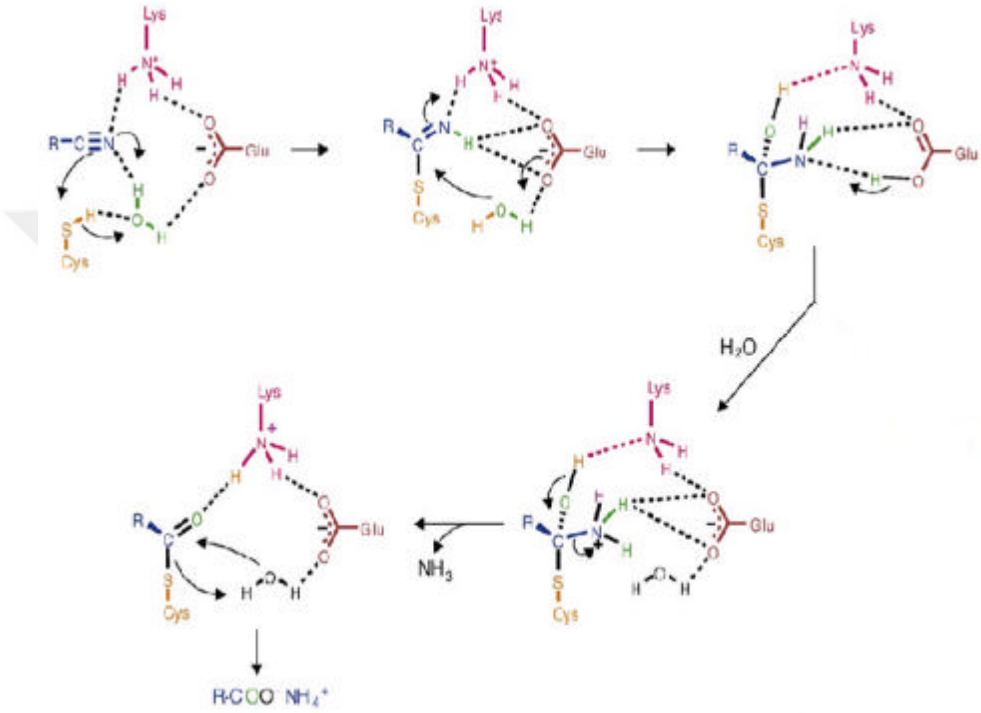
hidrataz enzimi ile ilgili yeni bilgilere ulaşıldığı zaman bu ayrımın geçersiz olduğu fikrine ulaşılmıştır (O'Reilly ve Turner, 2003). Saflaştırılan birçok nitrilaz enziminin substrat spesifikliği belirlenmiş ve substrat spesifikliğinin enzimin saflaştırıldığı kaynağa göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Saflaştırılan nitrilaz enzimlerinin birçoğu aromatik nitrillere karşı yüksek aktivite göstermekte, bazı nitrilazlar arilasetonitrillere yüksek ilgili, bazılarıda alifatik nitrillere yüksek ilgi duymaktadır (Çizelge 1.2). Farklı kaynaklardan saflaştırılan nitrilaz enzimlerinin biyokimyasal özellikleri Çizelge 1.2.'de verilmiştir. Substrat spesifikliği, doğal yapı ve optimum pH bakımından enzimlerin farklı özelliklere sahip oldukları Çizelge 1.2.'de görülmektedir.

Birçok nitrilaz enziminin doğal yapısı ve alt ünitelerinin molekül ağırlıkları belirlenmiştir (Çizelge 1.2). Birçoğu ortalama molekül ağırlığı 40 kDa (32-45 kDa) olan tek polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Bazı nitrilaz enziminde sayısı 6-26 arasında değişen alt birimler bulunur. *R. Rhodochrous* PA-34 enzimi 45 kDa molekül ağırlığına sahip bir monomer ile aktif olarak reaksiyonları katalizlerken, *Fusarium solani* IMI196840 nitrilazı 72 kDa molekül ağırlığında 8 tane alt birime sahiptir (Harper, 1977a).

Çizelge 1.2. Farklı kaynaklardan saflaştırılan bazı nitrilazların karakterizasyonu

Organizma	Farklı Substratlar için Bağıl Aktivite (%)	Molekül Ağırlığı (kDa)		pH	Opt. Sıc.(°C)	Referans
		Doğal	Alt ünite			
Acinebacter sp. AK226	Ibu-CN (% 100) Akrilonitril (% 144) Benzonitril (% 94)	580	43 41	8,0	50	Yamamoto ve Komatsu 1991
Alcaligenes faecalis ATCC 8750	Mandelonitril (% 100) *p*-aminobenzil siyanid (% 1670) Benzonitril (% 1,1)	460	32	7,5	40-45	Yamamoto ve ark., 1992
Alcaligenes faecalis JM3	Mandelonitril (% 8,62) *p*-aminobenzil siyanid (% 49,1) 2-tiyofenasetonitril (% 100)	260	44	7,5	45	Nagasawa ve ark., 1990; Kobayashi ve ark., 1993
Bacillus pallidus Dac521	Benzonitril (% 100) Krotononitril (% 80,3) Akrilonitril (% 8,9)	600	41+72	6,0-9,0	65	Almatawah ve ark., 1999
Fusarium solani IMI196840	Benzonitril (% 100) Asetonitril (% 6,6) 1,4-Benzonitril (% 213,3)	620	76	7.8-9,1		Harper 1977a
Rhodococcus ATCC39484	Benzonitril (%100) 2-furanokarbonitril (%171)	560	40	7,5	30	Stevenson ve ark., 1992
Rhodococcus rhodochrous PA-34	Benzonitril (% 100) Akrilonitril (% 22,4) Krotononitril (% 20,9)	45	45	7,5	35	Bhalla ve ark., 1992
Pyrococcus sp. M24D13	Benzonitril (% 82) Bütironitril (% 100)	38,5	37	7,5	85	Dennett ve Blamey, 2016
Antarctic Pyrococcus sp. MC-FB	2-syanopiridin (% 100) 3-siyanopiridin (%30) 3-klorobenzonitril (% 14) 3-nitrobenzonitril (% 16)	60	30	7,0	90	Cabrera ve Blamey, 2017

Nitrilazlar, nitrilleri karşılık geldikleri karboksilik asitlere ve amonyağa doğrudan dönüştürmektedir. Nitrilazların katalizlediği bu reaksiyon ve reksiyon mekanizması Şekil 1.1'de verilmiştir.



Şekil 1.1. Nitrilaz enziminin katalizlediği genel reaksiyon (a) ve mekanizması (b)

Bazı nitril bileşikleri oldukça toksik, mutajenik ve kanserojen olarak bildirilse de önemli kimyasal yapı taşlarıdır (Banerjee ve ark., 2002; Brenner, 2002; Martinkova ve Mylerova, 2003; Kiziak ve Stolz, 2009; Ramteke ve ark., 2013). Nitril bileşiklerinin karşılık gelen karboksilik asitlere kimyasal hidrolizi esas olarak mineral asitlerin, yüksek sıcaklıklarda katalizör olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilir (Liu ve Sibi, 2002). Ancak, bu süreç istenmeyen yan ürünler ve inorganik atıklar oluşturur (Ramteke ve ark., 2013). Oysaki nitril bileşiklerinin enzimatik hidrolizi iki farklı yöntemle ılımlı reaksiyon koşullarında istenmeyen yan ürünler ve inorganik atık oluşturmadan gerçekleştirilebilir. Bu yöntemlerden ilki; iki

aşamalı bir reaksiyonda nitril hidrataz ve nitril amidazın sırayla kullanılması şeklinde olup ikinci yöntem ise tek aşamalı bir reaksiyonda nitrilaz ile enzimatik hidrolizdir (Gong ve ark., 2012).

Nitrilaz enzimi ile katalizlenen reaksiyonların, karboksilik asit üreten kimyasal yöntemlerle karşılaştırıldığında, birçok açıdan daha avantajlı olduğu belirlenmiştir. Enzimatik yöntemin daha ılıman koşullarda, konuma seçici ve stereoseçici olarak olarak gerçekleşmesi kimyasal yöntemlere göre üstünlüklerindendir (Vejvoda ve ark., 2010; Wang ve ark., 2014). Bu nedenle, nitrilazlar birçok değerli karboksilik asit ürünlerini elde etmek için kullanılır. Bahsedilen bu özellikleri ve aynı zamanda çevre dostu reaksiyon koşulları nedeniyle nitrilazlar, 1-(siyanosikloheksil) asetik asit, (R)- mandelik asit, akrilik asit, benzoilformik asit, p-hidroksibenzoik asit, indol-3-asetik asit gibi yüksek katma değerli karboksilik asitlerin hazırlanmasında etkili ve yeşil katalizörler olarak kabul edilmektedirler (Zhang ve ark., 2014; Agarwal ve Nigam, 2014; Xue ve ark., 2010; Kumar ve Bhalla, 2013; He ve ark., 2012). Bununla birlikte, serbest nitrilazların üretim maliyetleri ve tekrar kullanılabilirlik eksikliği gibi nedenlerden dolayı endüstriyel uygulamalar için dezavantajları vardır (Zhang ve ark., 2014; Li ve ark., 2015). Ayrıca, nitrilazların multimerik yapıya sahip oldukları ve çok ılımlı reaksiyon koşullarında bile alt birimlerinin ayrışmasıyla aktivitelerini kolaylıkla kaybedebilecekleri bildirilmiştir. (Mateo ve ark., 2007; Thuku ve ark., 2009). Endüstriyel talepleri karşılamak için nitrilazların mümkün olduğunca aktivitesi korunarak termal ve tekrar kullanım kararlılığının iyileştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle nitrilaz enzimlerinin immobilize edilerek reaksiyon koşullarında kararlılıkları artırılmaya çalışılmakta ve böylece serbest nitrilazların kullanım alanlarının sınırlı olduğu değerli karboksilik asit sentezi için kullanımları araştırılmaktadır. Bu amaçla immobilizasyon çalışmalarında hücre immobilizasyonu yöntemi yaygın olarak kullanılmakla birlikte, sınırlı sayıda serbest enzimin immobilize edildiği çalışmalar da mevcuttur (Nıgam ve ark., 2009; He ve ark., 2011; Ni ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2014; Jiang ve ark., 2017). Hücre immobilizasyonu

yöntemi, biyoproseslerin maliyetini düşürmektedir. Tekrar ve sürekli kullanımının artırılması, yüksek hücre yoğunluğununun korunması ve hücre ayrımı için minimum maliyetle bir sistemin sağlanması gibi nedenlerle maliyetlerin düşürülmesi sağlanmaktadır. Bunun yanısıra bu yöntemler önemli dezavantajlara da sahiptirler. İmmobilizasyon ile canlı hücrelerin büyümeye devam etmesi önemli bir dezavantajdır. Çünkü kontrolsüz büyüme hücrelerin patlamasına ve böylece aktivitenin düşmesine ve ürünü kirletmesine neden olur. Ayrıca yüksek hücre yoğunluğundan dolayı immobilizasyon matrisi tarafından oluşturulan difüzyon bariyeri de enzim aktivitesini düşürebilmektedir. Doğrudan immobilizasyon yönteminde ise ürünlere kirlilik karışması ve difüzyon bariyeri oluşturma riski daha düşüktür. Ayrıca immobilizasyonda tek bir ezim kullanıldığından dolayı hücre immobilizasyonunun aksine substratın reaksiyon ortamında farklı bir ürüne dönüşme riski bulunmamaktadır.

Substrat olarak nitril bileşikleri kullanılarak nitrilaz katalizli bir çok değerli karboksilik asit türevlerinin sentezi gerçekleştirilmektedir. Aşağıda nitrilaz katalizi ile üretilen bazı karboksilik asit türevlerinin önemi açıklanmıştır.

İminodiasetik asit nitrilaz katalizli üretilen önemli karboksilik asit ara ürünlerinden biridir. Birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle glifosat herbisitleri, şelatlayıcı ajanlar ve yüzey aktif maddelerinin üretiminde kullanılmaktadır. Kimyasal yöntemlerle elde edilen iminodiasetik asit üretimin birçok dezavantajı bulunmaktadır. Kimyasal yöntemde oldukça fazla atık su üretilmekte ve çevre için zararlı yan ürünler de oluşmaktadır. Ayrıca ılımlı koşullar, düşük maliyet ve çevre dostu olması nedeniyle enzimatik yöntem daha avantajlıdır (Cai ve ark., 2014).

Nikotinik asit (niasin, B_3 vitamin) genellikle gıda katkı maddesi olarak kullanılır. Ayrıca ilaç uygulamalarında da kullanımı söz konusudur (Shimizu, 2001). Nikotinik asit vitamin takviyesi olarak kullanılmasının yanı sıra antilipidemik özellikliklerinden dolayı kalp rahatsızlıkları ve ateroskleroz riskini azaltmak için kullanılır. Yağlar, karbohidratlar ve proteinlerin metabolizmasıyla ilgili birçok

biyokimyasal reaksiyonların kofaktörü olarak kullanılan NAD^+ ve NADPH yapısında nikotinik asit bulunmaktadır (Pai, 2014)

Mandelik asit (α-hidroksifenilasetik asit) özel yapısından dolayı geniş bir farmasötik uygulama alanına sahiptir. Aspirin, siklandelat ve bazı antibiyotiklerin sentezinde kullanılabilmektedir. Ayrıca idrar yolları enfeksiyonunun tedavisinde de kullanılmaktadır (Tian ve ark., 2019). (R)-mandelik asit yarı-sentetik penisilin, sefalosforin, antitümör ajanları anti-obezite ajanları gibi farmosotik maddelerin üretimi için önemli bir ara maddedir (Terreni ve ark., 2001; Xiao ve ark., 2008; Tang ve ark., 2009). Aynı zamanda rasemik alkoller ve aminlerin çözünürlüğü için kiral çözücü ajan olarak da kullanılmaktadır (Whitesell ve ark., 1983; Zingg ve ark., 1988). (R,S)-mandelonitril'den R-(-)mandelik asit sentezi nitrilaz enziminin en önemli kantitatif endüstriyel uygulamalarından biridir. Kimyasal yöntemlerle yapılan R-(-)-mandelik asit sentezi yüksek sıcaklıkta, güçlü asidik veya bazik koşullarda gerçekleşmektedir. Ayrıca reaksiyon ortamında istenmeyen yan ürünler de oluşmaktadır (Liu ve Sibi, 2002). Bu dezavantajlardan dolayı R-(-)mandelik asit sentezi için lipazlar, esterazlar, glioksalaz ve mandelat dehidrogenaz gibi biyokatalizörlerin kullanımı yaygınlaşmıştır (Yadav ve Sivakumar, 2004; Zhang ve ark., 2011; Patterson ve ark., 1981; Vasic-Racki, 1989). Kullanılan biyokatalizörler arasında, ucuz başlangıç maddesi (mandelonitril), çok iyi enantiyo seçiciliği ve teorik olarak % 100 ürün verimliliği gibi avantajlardan dolayı nitrilaz enzimi yaygın olarak kullanılmaktadır (Chen ve ark., 2010; Xue ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2011). Ancak, serbest nitrilaz enziminin fiyatının diğer enzimlere göre göreceli olarak daha yüksek olması nitrilazların endüstriyel kullanımını sınırlandırmıştır. Bu nedenle enzimin immobilizasyon çalışmaları önem kazanmıştır.

Enantiyomerik saflıktaki hidroksi karboksilik asitler çeşitli ilaçların ve yararlı kimyasalların üretimi için gerekli önemli ara ürünlerdendir (Gröger, 2001; Asano ve ark., 2005; Zhang ve ark., 2010; Dong ve ark., 2010). Bunların arasında, (*R*)-2-kloromandelik asit Clopidogrel® sentezi için önemli bir öncül maddedir. Bu ilaç trombosit çöktürücü inhibitörü olarak kullanılmaktadır. Kanda meydana gelen

pıhtılaşmanın neden olduğu kalp krizi ve inmenin önlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (Osprian ve ark., 2003; Ma ve ark., 2008). Nitrilazlar bu önemli maddeyi 2-kloromandelonitril'den ılıman koşullarda yüksek stereoseçicilikle sentezleyabilmektedir. Reaksiyona girmeyen ve kararlı olmayan (S)-hidroksinitrillerin rasemikleşmesinden dolayı teorik olarak % 100 verimle nitrilazların bu reaksiyonları katalizlediği bildirilmiştir. Bundan dolayı *2*-kloromandelonitrilin biyotransformasyonu sonucu elde edilen enantiyomerik saflıktaki (*R*)-2-kloromandelik asit üretimi umut verici yollardan biri haline gelmiştir. (Zhang ve ark., 2012)

Akrilik asit, endüstriyel kaplamalar, yapıştırıcılar, dekoratif maddeler, duvarcılık, kağıt, tekstil ürünleri, reçineler, flokülantlar, hedeflenen ilaç taşıyıcı sistemler gibi endüstrilerde kullanılan metil akrilat, etil akrilat, bütil akrilat ve 2-etilhekzil gibi çeşitli akrilik asit esterlerinin geleneksel üretiminde kullanılmaktadır (Tsukamoto ve ark., 2008). Poliakrilik asit (PAA) jelleri BioMEMS cihazlarının üretiminde sensör ve aktüatör olarak kullanılmaktadır. Süper emici polimerler ve deterjan polimerlerinin üretiminde de akrilik asit kullanılmaktadır (Brown, 1979; Jabbari ve ark., 2007; Pal ve ark., 2005; Zhang ve Yang 2005; Zohuriaan-Mehr ve ark., 2008). Akrilik aside yönelik mevcut endüstriyel talep kimyasal üretim süreciyle karşılanmaktadır. Bu üretim, gaz-fazı katalitik oksidasyon yöntemiyle propilenin akrolein aracıyla tek veya iki adımlı prosesi ile gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemlerin dezavantajları arasında yan reaksiyonlar, çok yüksek sıcaklıklar ve akrilik asidin dimerizasyonu olasılığı ile radikal olarak başlatılan ekzotermik polimerizasyon riski yer almaktadır (Kurland ve Bryant, 1987). Çevre güvenliği ve maliyet etkinliği de diğer dezavantajları arasında yer almaktadır. Ekonomik, çevreci ve güvenilir olması nedeni ile bioteknolojik ve biyokatalitik yöntemlerle akrilik asit elde edilmesi çalışmaları yapılmaktadır (Alcalde ve ark., 2006).

Benzoil formik asit antihipertansiyon ajanları olarak bilinen tromboksan sentetaz inhibitör ilaçları için önemli bir ara üründür. Kimyasal olarak benzoil syanidin hidrolizi, mandelik asidin dehidrojenerasyonu, fitalik asitin açilasyonu ve

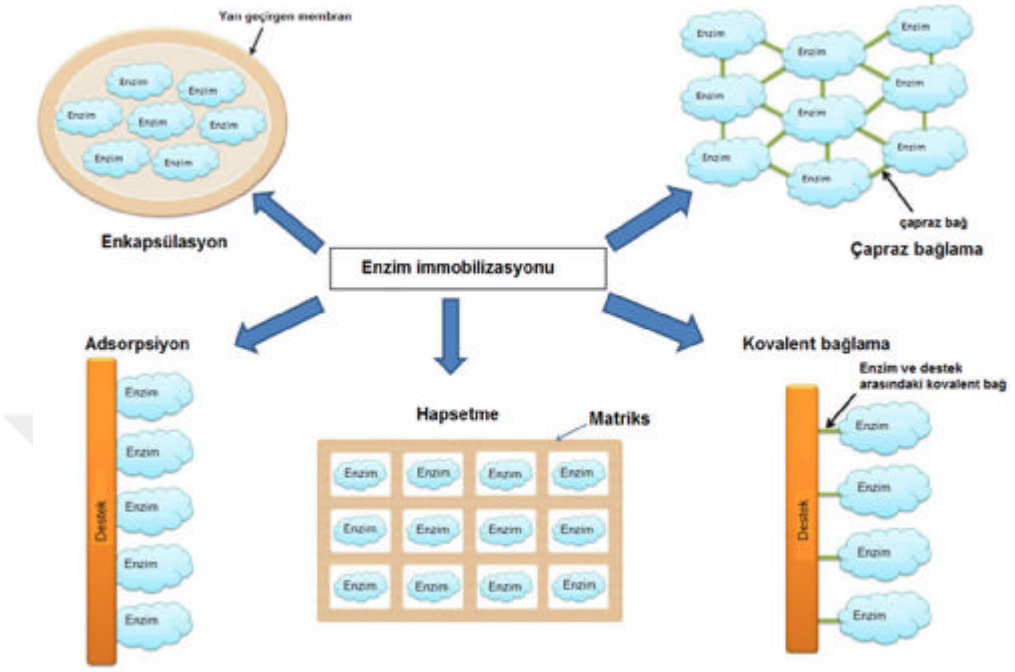
sitirenin oksidasyonu ile hazırlanabilmektedir (Winfried ve ark., 1986; He ve ark., 2008; Liron ve Yoel 1994; Nongkynrih ve Mahanti, 1993). Nitrili metabolize eden biyokatalizörlerin, bazı değerli asitlerin ılıman koşullar altında endüstriyel üretimi için kullanılan güçlü araçlar olduğu iyi bilindiğinden dolayı benzoil formik asitin benzoil siyanidden nitrilaz katalizli elde edilmesi çalışmaları gerçekleştirilmektedir (Banerjee ve ark., 2002; Brady ve ark., 2004; Kaul ve ark., 2004; He ve ark., 2012).

Benzoik asit ve tuzları gıda işlemede (koruyucu olarak), homeopatik formülasyonlarda, patiska baskıda, glikol benzoat üretiminde, volumetrik ve kalorimetrik analizde kullanılır (Raj ve ark., 2007). Benzoik asidin kimyasal sentezi, katalizör olarak kobalt ve manganez tuzları varlığında 200 °C'de toluenin oksijenle reaksiyonunu ile gerçekleştirilmektedir. Ayrıca benzenin konsantre H_2SO_4 ile oksidasyonu ile de elde edilmektedir. Benzoik asit sentezine yönelik bu yöntemler, yüksek enerji girdileri olan sert asidik veya bazik koşullar gerektirmesiyle birlikte ayrıca kanserojen organik klorürler, hidrojen siyanür ve büyük miktarda tuz gibi istenmeyen toksik yan ürünlerin üretilmesine neden olmaktadır (Kobayashi ve ark., 1990). Bu nedenle, benzoik asit üretimi için biyo-dönüşüm süreçlerini araştırmak faydalı olmuştur. Çünkü bunlar ılımlı sıcaklık ve pH koşulları altında çalışırlar ve normalde toksik yan ürünler üretmezler.

Enzimler yüksek seçicilik ve aktiviteye sahip olmaları nedeniyle oldukça etkili ve verimli katalizörler olarak bilinmektedir. Buna ek olarak enzimler, reaksiyon aşamalarının sayısını ve ihtiyaç duyulan tehlikeli çözücü miktarını azaltabiliyor olmasından dolayı bir reaksiyonu daha ucuz ve çevre dostu haline getirebilmektedir. Bu nedenlerden dolayı enzimler, gıdadan ilaç endüstrisine kadar değişen alanlardaki birçok pratik uygulamada büyük potansiyel sergileyen son derece önemli katalizörler haline gelmiştir. Enzimlerin çoklu katalitik işlemlerde kullanılması, enzim özelliklerinin önemli ölçüde iyileştirilmesine yol açan çalışmalarla sonuçlanmıştır. En önemli ve yaygın olarak kullanılan tekniklerden biri katalizörlerin reaksiyon karışımında çözünmeyen katı bir desteğe bağlandığı enzim immobilizasyonudur.

1.2. İmmobilizasyon

İmmobilizasyon, çeşitli reaksiyon koşulları altında biyomoleküllerin stabilitesini önemli ölçüde geliştirir ve biyomoleküllerin ardışık katalitik döngülere göre yeniden kullanılabilirliğini artırır. Dahası enzim molekülleri bağlandıktan sonra, katalizörler homejen formdan heterojen forma dönüşür. Bu sayede biyokatalitik sistemin reaksiyon karışımından basit bir şekilde ayrılması kolaylaşır ve daha yüksek saflıkta ürünler elde edilir. Adsorpsiyon, kovalent bağlanma, hapsetme, kapsülleme ve çapraz bağlama dahil olmak üzere çeşitli immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir (Şekil 1.2). En uygun immobilizasyon yönteminin ve destek malzemesinin seçimi, enzimin türü kadar katalitik işlemin türüne ve koşullarına da bağlıdır. Enzim immobilizasyonu için çok çeşitli destek maddeleri kullanılabilir. Bu destek maddeleri organik, inorganik, hibrit veya kompozit malzemeden olabilmektedir. Destek materyali, enzimin yapısını sert reaksiyon koşullarına karşı korumalı ve bu sayede immobilize enzimin yüksek katalitik aktivitesinin korunmasına yardım edebilmelidir. Dahası uygun bir destek maddesinin seçimi enzimlerin aktivitesinide artırabilir. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak destek maddesi kimyasal ve termal kararlılık, reaksiyon koşullarında çözünmeme, enzime yüksek ilgi duyma, rejenerasyon ve tekrar kullanılabilirlik, kolay bulunabilme ve düşük maliyet, reaktif fonksiyonel gruba sahip olma gibi özelliklere sahip olmalıdır.



Şekil 1.2. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Sirisha ve ark., 2016)

1.2.1. Tutuklama Yöntemi

Tutuklama yöntemi en basit immobilizasyon yöntemlerinden biridir. Bu yöntemde, enzim molekülünün kimyasal veya fiziksel yollarla herhangi bir taşıyıcıya bağlanmadan belirli bir ortamda tutulması sağlanır. Tutuklama işlemleri sırasında enzim moleküllerinin polimer matris içindeki kafeslerde veya yarı geçirgen membranlar içinde veya mikrokapsülleme ve misellerde tutulması sağlanır. Bu metotta enzim molekülleri çözeltide serbest olup jelin kafes yapısı tarafından sadece hareketi kısıtlanmıştır. Jel kafesin geçirgenliği enzim veya hücrelerin kaçışını önleyecek, ancak aynı zamanda substrat ve ürünün serbest hareketin izin verecek kadar sıkı bir yapı oluşturularak kontrol edilir (Uluğ, 2011).

1.2.1.1. Kalsiyum Alginat Jelde Tutuklama

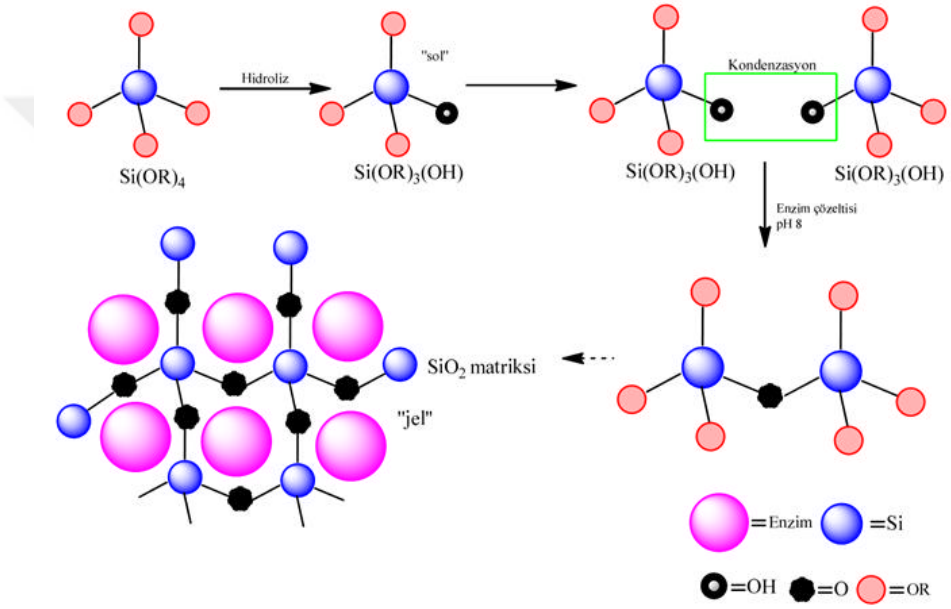
Alginatlar, suda çözünür sodyum alginatlar olarak ticari formda mevcuttur. Gıda ve farmosötik endüstrilerinde kıvamlaştırıcı, emülsiye edici, film oluşturucu ve jelleşme ajanı olarak kullanılmaktadır. Çözünmeyen kalsiyum alginat jelde tutuklama enzimlerin ve hücrelerin immobilizasyonu için hızlı, toksik ve pahalı olmayan ve çok yönlü bir yöntemdir.

Alginik asit; deniz yosunlarından elde edilen bir poliüronik asittir.1-4 bağlı β-D- mannuronik (M) ve α-L- guluronik asidin (G) farklı miktarlarından oluşur. G, M miktarları kaynağa göre değişir. Heteropolimerik bölgelerin (MG blokları) değişen bölgelerinin aralarına katılmış homopolimerik (MM blokları ve GG bloklar) bölgelerinden oluşmuş blok kalıplarında düzenlenir. İki değerli katyonların bağlanması ve jel oluşumu artık blokların kompozisyonlarına ve düzenlenmelerine bağlıdır. Özellikle jel dayanıklılığı G içeriği ile ilgilidir. Deniz yosunu kaynağına göre (G formu) % 20 - 75 arasında değişir GG blokları arasında Ca+2 gibi divalent katyonlar için seçimli bağlanma bölgeleri vardır ve bağlanmış iyonlar jel oluşumuna neden olan bağlanmaları oluşturmak üzere diğer GG blokları ile etkileşir. Elde edilen jel biyokimyasal olarak inerttir ve hücre immobilizasyonu için uygun olan küçük ve dar boşluklar ile mekaniksel olarak kararlıdır. Ca iyonlarını uzaklaştıran şelatlama ajanları ve Ca iyonları ile yerdeğiştirebilen başka iki değerli katyonlar kalsiyum alginatın kararlılığının bozulmasına neden olur (Kocatürk, 2008).

1.2.1.2. Sol-jel Tutuklama

Sol-jel teknikleri tetraalkoksisilan bileşiklerinin[$Si(OR)_4$] asit ya da baz katalizli hidrolizini içermektedir (Hench ve West,, 1990; Brinker ve ark.,, 1990; Reetz, 2006; Guisan, 2006). Şekil 1.3'deki gibi ilk basamakta tetrametoksisilan (TMOS; $Si(OCH_3)_4$) veya metiltrimetoksisilan (MTMOS; $H_3Si(OCH_3)_3$) eklenerek bir ya da iki metal alkoksitlerin asidik pH da, su ortamında silisyum hidroksit gruplarının (Si-OH) oluşumuyla hidrolizi gerçekleşir. İkinci basamakta, bazik pH' da, silisyum hidroksit fonsiyonel grupları arasında kondenzasyon reaksiyonu

biyomoleküllerin tutuklanacak (Si-O-Si) matriksini oluştururlar (Guisan, 2006; Campàs ve Marty, 2006). Bir başka deyişle Sol-jel prosesinde reaksiyon ilk silan bileşiğinin hidrolizi sonunda oluşan silisyum hidroksit (Si-OH) monomerlerinin kondenzasyonundan oluşmaktadır. Polikondenzasyon jel oluşumuyla sonuçlanır. Bu adımlar Şekil.1.3'de gösterilmiştir (Gao, 2004).



Şekil 1.3. Enzimlerin sol-jel tutuklanması (Nouger, 2002; Gao, 2004)

Sol-jel yönteminin avantajları:

Yöntemin uygulanması kolay ve tekrarlanabilirliği oldukça yüksektir. Ayrıca yöntem karmaşık cihazlar gerektirmemektedir. Bu yöntemde enzimler, herhangi bir yapısal modifikasyon veya ek bir kimyasal bağlayıcıya ihtiyaç duymadan immobilize edilmektedir. Ayrıca tutuklanmış enzimlerin jelden uzaklaşması da sınırlanmıştır.

Sol-jel yönteminin dezavantajları:

Hidroliz esnasında oluşan alkol, enzimin aktivitesini ve kararlılığını etkileyebilmektedir. Ancak hidroliz esnasında oluşan alkolü uzaklaştıracak yöntemler kullanılarak bu problem çözülebilmektedir. Jellerin gözenek boyutlarının küçük olmasından dolayı substrat ve ürünlerin bu gözeneklerden geçişleri zorlaşacağından dolayı enzimatik reaksiyonlar sınırlanabilmektedir.

1.2.1.3. PVA jel immobilizasyonu

PVA sahip olduğu pek çok özelliği nedeniyle çeşitli farmasötik, biyomedikal ve ayırma uygulamalarında kullanılmaktdır. PVA asılı hidroksil grubu içeren nispeten basit bir kimyasal yapıya sahiptir. PVA vinil asetatın polimerleşerek polivinil asetata dönüşmesinin ardından PVA'e hidrolizi sonucunda üretilir. PVA geniş bir uygulama alanında kullanılabilmesi için ise çapraz bağlanması gerekmektedir. Kimyasal ve fiziksel yöntemlerle jelleşme gerçekleştirilmektedir. Çapraz bağlama sonucunda hidrojeller elde edilir. Hidrojeller suda çözünmeden şişerek büyük miktarda su tutabilen çapraz bağlı polimer olarak tanımlanabilir. Potansiyel olarak toksik ajanların salınmasına yol açan çapraz bağlanma süreçlerinden kaçınmak için bazı polimerlerin özellikle PVA'nın fiziksel bir jelleşme ve katılaştırma yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde PVA örnekleri soğukta bekletilerek jelleşmesi sağlanmaktadır (Christie ve Peppas, 2000). Jelleşme esnasında ortamda bulunan enzimler bu jellerin içerisinde hapsedilerek immobilize edilmektedir. PVA toksik olmadığından ve endüstriyel ölçekli uygulamalar için ekonomik olduğundan dolayı enzim immobilizasyonda kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra yüksek enzim yüklemesi, enzim yapısının dış arayüzlerden korunması, alt ünitelerinin ayrılmasının engellenmesi, basit jel hazırlanması, düşük difüzyon limitleri, düşük matriks maliyeti, reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılabilmesi, ucuz ve mükemmel mekanik kararlılığına sahip olması nedeni ile enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Rebroš ve ark., 2007; Ge ve ark., 2009)

1.2.2. Kovalent İmmobilizasyon

Enzimler katı desteğe adsorpsiyon, iyonik veya kovalent etkileşim yoluyla fiziksel olarak bağlanır. Bu fiziksel bağlanma hapsetme ve çapraz bağlama yöntemlerine göre bazı avantajlar sağlar. Destek maddesi ile daha güçlü etkileşimler oluşturması nedeni ile fiziksel bağlanma hapsetme yöntemine kıyasla enzim sızıntısına karşı daha fazla malzeme stabilitesi sağlar. Bununla birlikte immobilizasyon adsorpsiyon veya iyonik etkileşimler ile gerçekleştiriliyorsa reasksiyon koşullarına bağlı (pH, sıcaklık ve çözeltinin iyonik gücü) olarak enzim sızıntısı yine de gerçekleşebilir. Enzimlerin desteklere kovalent olarak bağlanması, bazı uygulamalarda enzimin kararlılığını bozmadığından dolayı tercih edilmektedir. Kovalent immobilizasyon, enzim üzerindeki reaktif bir grup ile kimyasal olarak aktif bir yüzey arasında meydana gelen kovalent bağ aracılığı ile gerçekleşir. Kovalent olarak immobilize edilen enzimler, desteğe güçlü bir şekilde bağlandığından dolayı destekten ayrılmada herhangi bir artış gözlenmeden çok çeşitli reaksiyon ortamında kullanılabilirler. Bununla birlikte güçlü bağlanma enzimin hareketini sınırlandırabilir. Bundan dolayı enzimin kararlığının artması ile birlikte enzimin konformasyonel değişikliklerini engelleyerek enzimin aktivitesinde de düşüş gerçekleşebilir (Allen ve ark., 2011).

Enzimlerin yapısında bulunan 20 çeşit amino asitin çoğu hidrokarbonlardan oluşan nispeten inert yan zincirlere sahiptir. Bununla birlikte amino asitlerin dokuzunun yan zincirlerinde kimysal olarak aktif fonksiyonel gruplar (amino, tiyol, hidroksil vb.) vardır. Bir enzimin konfigürasyonu bu yan grupların kendi aralarında ve çevre ile etkileşimleri (hidrofobik ve hidrofilik etkileşimler gibi) ile belirlenir. Bu etkileşimler sayesinde enzimlerin katı bir yüzeye bağlanması mümkün olmaktadır. Sisteinin tiyol grubu daha güçlü nükleofil olmasına rağmen, proteinlerdeki amino gruplarının bağıl oranının daha yüksek olmasından dolayı amino grupları daha önemli bir hedef haline gelmiştir. Buna ek olarak sülfidril grupları genellikle disülfid bağları oluşturur ve protein yapısını güçlü bir şekilde etkilerler. Bu sülfid bağlarının

modifikasyonu enzimin aktivitesi üzerine zararlı etkisi olabilmektedir. Bu nedenle tercih edilen bağlanma noktası lizin yan zincirleri üzerindeki amino kalıntısı olmaktadır (Tischer ve ark., 1999).

1.2.3. Çapraz Bağlı Enzim Agregatları (CLEA) İmmobilizasyonu

Protein çapraz bağlama tekniği ilk olarak 1960'larda glutaraldehitin protein yüzeyindeki reaktif amino grupları ile reaksiyonu sonucu geliştirilmiştir (Doscher ve ark., 1963). Bununla birlikte çapraz bağlı enzimlerin (CLEs) üretilmesi için kullanılan bu yöntemde, düşük aktivite geri kazanımı, düşük tekrar kullanım sayısı, düşük mekanik kararlılık ve jelatinleşmedeki güçlükler gibi dezavantajlar ihtiva etmekteydi. Bu dezavantajları önlemek ve çapraz bağlı enzimleri endüstriyel amaçlı kullanmak amacıyla enzimlerin kristal halini kullanarak çapraz bağlı enzim kristalleri (CLECs) oluşturma yöntemi geliştirilmiştir (Quiocho ve ark., 1992). CLECs immobilizasyonunda yüksek saflıkta enzim kullanılması gerektiğinden zahmetli bir kristalleştirme prosedürü gerektirmektedir. Bu nedenle enzimi basit teknikler kullanarak, sulu çözeltide çökelterek ve çapraz bağlama sonucu enzim moleküllerinin agregatlarını oluşturmak suretiyle yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) olarak adlandırılmıştır. CLEA'nın hazırlanması bir çöktürme ve parçacık boyutunun arttığı bir çapraz bağlama aşamasını içerir. Proteinlerin sulu çözeltilerine tuzların, organik çözücülerin veya iyonik olmayan polimerlerin eklenmesinin proteinleri denatüre etmeden protein moleküllerinin fiziksel kümeleri şeklinde çökelmesine neden olduğu bilinmektedir (Brown ve ark., 1986). Protein saflaştırma aşamalarında çöktürme için genellikle amonyum sülfat, polietilenglikol ve bazı organik çözücüler kullanılmaktadır. Benzer çözücüler CLEA yönteminde de kullanılmaktadır. Çapraz bağlayıcı olarak pahalı olmadığı ve kolay bulunabildiği için glutaraldehit yaygın olarak kullanılmakla birlikte kloroformat, karbonilimidazol, epiklorohidrin, heterosiklik halojenürler gibi reaktifler de kullanılmaktadır. 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 (Alagöz, 2012).

1.2.4. Adsorbsiyon İmmobilizasyonu

Adsorbsiyon yöntemi enzim immobilizasyonunda kullanılan ilk immobilizasyon yöntemlerinden biridir. Fiziksel adsorpsiyonda enzim desteğe Vander Waals, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimlerle bağlanır. İmmobilizasyon işlemi ılıman koşullarda gerçekleştirilir. Kullanılan desteğin aktifleştirme gerektirmemesi, ekonomik olarak avantajlı olması ve immobilizasyon ile enzimin aktivitesinde önemli bir düşüş olmaması bu yöntemin tercih edilmesindeki en önemli nedenlerdendir. Ancak destek materyali ve enzim molekülü arasındaki etkileşimlerin zayıf olması nedeni ile ortam koşullarının değişmesi (pH, iyonik şiddet, sıcaklık gibi) ile destek yüzeyinden protein kaçışı mümkün olmaktadır (Messing, 1976; Rexova-Benkova ve ark., 1982; Woodward, 1985).

1.3. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Bu doktora tez çalışmasınının amacı;

1. Kit halinde satılan rekombine olarak üretilmiş, CODEXIS® NIT-101, NIT-102, NIT-103, NIT-104, NIT-105 ve NIT-106 olarak kodlanmış 6 farklı nitrilaz ile yine rekombine olarak üretilen NIT-P1-118, NIT-P1-120, NIT-P1-121, NIT-P1-122, NIT-P1-126 ve NIT-P1-130 olarak kodlanan P serisindeki 6 adet nitrilazın farklı substratlara (benzonitril, (R,S)-mandelonitril ve akrilonitil) karşı aktivitelerinin ölçülmesi ve substrat spesifikliğinin belirlenmesi,

2. (R,S)-mandelonitrile karşı en yüksek aktiviteyi gösteren enzim kaynağının belirlenmesi, bu enzimin farklı yöntemlerle (kovalent, hapsetme, sol jel, alginat jel, PCMC ve CLEA) immobilize edilmesi, serbest ve immobilize enzimlerin karakterizasyonları, termal ve depolama kararlılıkları ile immobilize enzimlerin tekrar kullanım kararlılıklarının belirlenmesi,
3. Serbest ve immobilize nitrilaz kullanımı ile (R)-mandelik asit ve türevlerinin sentezlenebilmesi için optimum reaksiyon koşullarının belirlenmesi,
4. Benzonitrile karşı yüksek aktivite gösteren enzim kaynağının adsorpsiyon ve PVA jel yöntemi ile immobilize edilmesi, serbest ve immobilize enzim örneklerinin karakterizasyonu, termal ve depolama kararlılıkları ile immobilize enzimlerin tekrar kullanım kararlılıklarının belirlenmesi,
5. Akrilonitrile karşı yüksek aktivite gösteren enzim kaynağının farklı yöntemlerle (kovalent, hapsetme ve adsorpsiyon) immobilize edilmesi, en uygun immobilizasyon yönteminin belirlenmesi, serbest ve immobilize nitrilazların kullanımı ile akrilik asit sentezlenebilmesi için optimum reaksiyon koşullarının belirlenmesi,
6. P serisi enzimlerde (R,S)-mandelonitirle karşı en yüksek aktivite gösteren enzim türünün farklı yöntemlerle (alginat jel, PVA jel ve kalsiyum karbonat) immobilize edilmesi, serbest ve immobilize enzimlerin karakterizasyonları, termal ve depolama kararlılıkları ile immobilize enzimlerin tekrar kullanım kararlılıklarının belirlenmesi, serbest ve immobilize enzimler kullanılarak mandelik asit sentezinin yapılması amaçlanmıştır.

Yapılması amaçlanan çalışmalar neticesinde elde edilen sonuçlar literatüre katkı sağlaması bakımından büyük önem arz etmektedir. Bu çalışma kapsamında en yüksek aktivite gösteren nitrilazların uygun yöntemlerle immobilize edilmeleri, mekanik ve termal kararlılığının yüksek olması, mikrobiyal ataklara ve organik çözücülere dirençli olması, kolay bulunabilirliği ve ucuz olması nedeniyle katma değeri yüksek karboksilik asit türevlerinin elde edilebilmesi sağlayabilmesi

bakımından endüstriyel uygulamalarda da ekonomik açıdan büyük katkı sağlayacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Xie ve ark., (2006), tarafından yapılan çalışmada farklı bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilen on tane nitrilaz geni klonlanmış ve substrat spesifikliği belirlenmiştir. Enantiyoseçiciliği yüksek olan *Arabidopsis thaliana* nitrilazı (AtNit1) ile izobütilsüksinonitrilden'den (3S)-3-siyano-5metil hekzanoik asit sentezlenmiştir. AtNit1 nitrilazı saflaştırılmış ve boyut eleme kromatografisi ile alt ünite sayısı 12 olan bir oligomer olduğu belirlenmiştir. Enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 440 kDa olarak belirlenmiştir. Enzimin aktivitesinin artırılması amacıyla gen ekspreksiyonu yardımıyla mutant nitrilazlar oluşturulmuştur. AtNit1'i N-terminal 6xHis-tag ile pET24 ve pET SUMO'ya klonladıklarını ve ardından bunları birkaç *E. coli* suşuna aktardıklarını rapor etmişlerdir. Oluşturulan bu mutantların aktivitelerinin üç kat daha fazla olduğu saptanmıştır.

Kaul ve ark., (2007), *Alcaligenes faecalis* DSMZ 30030'dan elde edilen enantiyoseçici nitrilaz genini *Escherichia coli* suşuna aktarıldığını bildirmişlerdir. Rekombine enzimin hücre ekstraktlarından saflaştırıldığını ve enzimin çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) oluşturularak immobilize edildiğini rapor etmişlerdir. Enzim immobilizasyon koşullarının optimize edilmesi çalışmalarının yapıldığını ve yapılan çalışmalar sonucunda optimum koşulların % 85 izopropil alkol ve 30 mM glutaraldehit kullanılarak yapılan çalışmalarda elde edildiğini bildirmişlerdir. İmmobilizasyondan sonra enzimin başlangıç aktivitesinin % 80'ini koruduğunu belirlemişlerdir. Serbest ve immobilize nitrilaz enzimi ile mandelonitrilin (R)-mandelik asite katalizlenmesi çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. CLEA örneklerin 30 ^{o}C ve 60 ^{o}C'deki aktivitelerin serbest enzime göre 5 kat daha yüksek olduğu ve CLEA örneklerinin 5 kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinde sadece % 10'luk bir düşüş gözlendiği rapor edilmiştir. Serbest ve CLEA örnekleri ile yapılan kataliz reaksiyonlarında rasemik mandelonitirilden R-mandelik asit üretimi deneylerinde sıcaklığın artması (10-50 ^{o}C) ile birlikte her iki enzimin de aktivitesinde düşüş olduğu ama CLEA örneklerindeki aktivite düşüşünün serbest enzime göre çok az

olduğu bildirilmiştir. Ayrıca enzimin enantiyoseçiciliği üzerine kullanılan çözücünün etkisi de araştırılmıştır. Reaksiyon ortamına % 10 olacak şekilde organik çözücüler eklenmiş ve DMSO eklenen örnekte enantiyoseçicilikte küçük bir artış gözlenmiştir.

Vejvoda ve ark., (2008), *Fusarium solani* O1 kültüründen intraselüler nitrilaz enzimini saflaştırmışlardır. Enzimin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 40 kDa olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan enzim, benzonitril ve 4-siyanopiridin'e karşı çok yüksek spesifik aktivite gösterirken (sırasıyla 156 U/mg^{-1} ve203 U/mg) diğer aromatik nitrillere (3-klorobenzonitril (135,72 U/mg) ve 3-hidroksibenzonitril (124,8 U/mg) karşıda oldukça yüksek spesifik aktivite göstermiştir. Enzimin aktivitesinin Hg^{+2} ve Ag^{+1} iyonları tarafından inhibe edildiği rapor edilmiştir. Enzimin tekrar kullanım kararlılığı sürekli ve karıştırmalı bir ultrafiltrasyon membran reaktörü içinde substrat olarak 4-siyanopiridin kullanılarak incelenmiştir. 35 ve 45 ºC'de yapılan çalışma sonucunda nitrilaz enziminin yarı ömrü sırasıyla 277 ve 10,5 saat olarak belirlenmiştir.

Shen ve ark., (2009), akrilonitrilden akrilik asit üretebilen ve nitrilaz içeren ZJUTB06-99 suşunu toprak örneklerinden izole etmişlerdir. Bu dönüşüm için en uygun reaksiyon koşulları belirlenmiştir. Nitrilaz aktivitesinin Hg^{+2} ve Ag^{+1} katyonları tarfından inhibe edildiği fakat Ni^{+2} and Ca^{+2} katyonları tarafından ise aktivitesinin güçlü bir şekilde arttığı bildirilmişitir. Enzimin substrat spesifikliği ile ilgili yapılan çalışmalarda da enzimin fenilasetonitril gibi aromatik nitrillere karşı da yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Nıgam ve ark., (2009), *Streptomyces sp.* MTCC 7546 izolatından elde ettikleri termofilik nitrilazı akrilonitrilin akrilik asite dönüşümünü katalizlemek için kullanmışlardır. Hücresel immobilizasyon yöntemi ile nitrilazı agar-agar destek içerisinde immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimler 50 ^{o}C'de 25 kez tekrar kullanılmıştır. Tekrar kullanımı sırasında aktivitede çok düşük bir kayıp yaşandığını bildirmişlerdir. Serbest hücre tarafından katalizlenen reaksiyonda 3 saatte % 100 dönüşüm gerçekleşirken, çok az miktarda immobilize enzim kullanıldığında ise 0,5

M akrilonitrilin % 71'inin 6 saatte akrilik aside dönüştüğünü rapor etmişlerdir.

Yoshida ve ark., (2013), *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrilaz genini, pKK223-3 aktarım vektörünü kullanarak *E. coli'*ye aktarmışlardır. Rekombine *E. Coli* JM109 hücrelerini, enantiyo seçici olarak 2-metil-2-propilmalononitrilden (S)-2-siyano-2-metilpentanoik acid (CMPA) elde etmek için enzim kaynağı olarak kullanmışlardır. Sentez sonucunda % 96 enantiyomerik aşırılıkta (*e.e*) CMPA elde edilmiştir. Optimum koşullarda, 30 ºC ve 24 saat sonra herhangi bir yan ürün oluşmadan % 97 verim ile dönüşümün gerçekleştiğini rapor etmişlerdir.

Chmura ve ark., (2013), enantiyomerik saflıkta (S)-mandelik asiti sıralı hidrosiyanürleştirme yoluyla benzaldehitten sentezlemişlerdir. (S)-seçici *Manihot esculenta* oksinitrilazı ve seçici olmayan *Pseudomonas fluorescens* EBC 191 nitrilazı kullanılarak çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA) oluşturulmuş ve biyokatalizör olarak kullanılmıştır. Standart koşullarda, nitrilaz enziminin (S)-mandelonitrilden yaklaşık eşit miktarda (S)-mandelik asit ve (S)-mandelik amit oluşturduğu bildirilmiştir. Yüksek derişimlerde (0,5 M) HCN konsantrasyonlarında ürünün (S)-mandelik amit yönüne doğru kaydığı rapor edilmiştir. *Rhodococcus erythopolis* amidazı ilave edilerek oluşturulan CLEA örneklerinde ise S-mandelik asit veriminin % 90 ve enantiyomerik saflığınında % 99' dan daha büyük olduğu bildirilmiştir.

Ni ve ark., (2013), *Burkholderia ceno*cepacia J2315 nitrilaz geni aktarılan rekombinant *Escherichia coli* M15/BCJ2315 hücrelerini, demir oksit ile manyetik özellik kazandırılan kateşolik kitosana immobilize etmişlerdir. İmmobilize hücreler, 15 defa kullanılarak hiçbir aktivite kaybı olmadan 1 saatte 100 mM mandelonitrili sulu faz içerisinde hidroliz etdiği bildirilmiştir. Etil asetat-su ikili faz sistemi oluşturulmuş ve optimize edilmiştir. Optimum koşullarda, yüksek bir konsantrasyon olan 1 M mandelonitrilin 4 saatte % 99 verim ve % 95 e.e. hidroliz edildiği rapor edilmiştir.

Jin ve ark., (2014), nitrilaz enzimi içeren rekombinant *Escherichia coli* hücrelerini sodyum alginat boncuklara immobilize etmişlerdir. İmmobilize hücreler

yardımıyla önemli bir ürün olan metiyoninin 2-amino-4-metiltiyobutan nitril'den sentezini gerçekleştirmişlerdir. Metiyonin sentezi için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 7,5 ve 40 ^{o}C olarak bulunmuştur. 300 mM substratın metiyonine % 100 dönüşümünün 2 saatte gerçekleştiği rapor edilmiştir. İmmobilize nitrilazın reaksiyon kararlılığının yüksek olduğu ve 100 saat kullanımdan sonra, başlangıç aktivitesinin % 80'ini koruduğu gözlenmiştir. Reaksiyon sonunda yapılan ayrım sonucu metiyoninin saflığı % 99 ve verimin % 97 olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar ışığında, bu rekombine nitrilaz enziminin metiyonin üretim uygulamalarında kullanılabileceği öngörülmüştür.

Pai ve ark., (2014), *Alcaligenes faecalis* MTCC 166 nitrilaz genini içeren rekombine *Escherichia coli* JM109 hücrelerini kullanarak 3-siyanopiridinden nikotinik asit (niasin) üretimi için etkili bir yöntem geliştirmişlerdir. Serbest hücrelerin enzim aktivitesi üzerine yüksek konsantrasyonlarda subsrat ve ürün derişimlerinin hiçbir etkisinin olmadığı rapor edilmiştir. Hücrelerin immobilizasyonu ile enzimim substrat toleransının, kararlılığının ve tekrar kullanılabilirliğinin önemli ölçüde arttığı belirtilmiştir. İmmobilize hücrelerin 3-siyanopiridinden nikotinik asit dönüşümünün, optimum koşullar altında (37 ^{o}C, 100 mM Tris buffer, pH 7,5) 5 saat sonra % 100 verimle gerçekleştiğini bildirmişlerdir. İmmobilize hücrelerin yüksek substrat/ürün toleransından ve kararlılığından dolayı endüstriyel amaçlar için uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Zhang ve ark., (2014), *Alcaligenes* sp. nitrilaz genini içeren rekombinant *Escherichia coli* hücreleri çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılarak doğrudan immobilize etmişlerdir. Optimum immobilizasyon koşullarında, substrat olarak mandelonitril kullanıldığı zaman, immobilize enzimin aktivite geri kazanım oranı % 85 olarak belirlemişlerdir. İmmobilize nitrilazın tekrar kullanım kararlılığın serbest enzime göre oldukça üstün olduğu ve 15 kullanımdan sonra immobilize enzimin aktivitesinde önemli bir düşüş gözlenmediği rapor edilmiştir.

Agarwal ve ark., (2014), enzim kaynağı olarak termostabil nitrilaz içeren *Streptomyces sp.* MTCC7546 hücrelerini kullanarak indol-3-asetonitrilden indol-3-

asetik asit sentezlemişlerdir. Nitrilaz enziminin pH aralığının oldukça geniş olduğu (6,0-8,0) ve optimum pH'nın 7,5 olduğu rapor edilmiştir. Maksimum ürün dönüşümünün 60 ^{o}C'de olduğu ve enzimin termal kararlılığının oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir. İndol-3-asetik asitin yapısının ve miktarının belirlenmesinde TLC, HPLC, FTIR ve kütle spektroskopisi kullanılmıştır. Nitrilaz enziminin K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 1,3 mM ve 28 µM/dk olarak hesaplanmıştır.

Yusuf ve ark., (2015), *Fusarium proliferatum* AUF-2'dan elde edilen bir mantar nitrilaz genini *Escherichia coli* BL21 suşuna aktarmışlardır. Saflaştırılan enzim 35-40 ^{o}C aralığında ve pH 8,0'da maksimum aktivite göstermiştir. EDTA, Mg^{+2}, Zn^{+2}, Ca^{+2}, Fe^{+2}, Fe^{+3} ve Mn^{+2} varlığında enzimin aktivitesinin arttığı, Cu^{+2}, Co^{+2} ve Ni^{+2} varlığında enzimin aktivitesinde düşüş gözlendiği rapor edilmiştir. Ag+ iyonların rekombine enzimin aktivitesine güçlü bir inhibitör etkisinin olduğu bildirilmiştir. Rekombine enzimin alifatik, heterosiklik ve aromatik nitrillere karşı aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Rekombine enzimin benzonitrile karşı V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 14,6 µmol/dk.mg protein ve 1,55 mM olarak hesaplanmıştır. Homoloji modellemesi ve moleküler docking çalışmaları ile enzimin substrat spsifikliğinin ve aktif merkezde bulunan 3 amino asitin (Glu-54, Lys-133 ve Cys-175) katalitik etkinliği hakkında bilgi verdiğini rapor etmişlerdir.

Zhang ve ark., (2015), *Alcaligenes faecalis* nitrilaz geninin aktarıldığı *Escherichia coli* hücrelerini farklı yöntemleriyle immobilize ederek serbest ve immobilize hücreleri (R,S)-mandelonitrilinden R-mandelik asit üretmek için kullanmışlardır. İmmoblizasyonda kapsülleme yöntemlerini (sodyum alginat, agar jel, kitosan jel, poliakrilamid jel, silika jel) ve çapraz bağlı hücre agregatları (sodyum alginat-glutaraldehit jel, sodyum alginat-polietilen imin, sodyum alginat-glutaraldehit-polietilen imin jel, doğrudan glutaraldehit ile CLEA hücre immobilizasyonu, diatomit(DA)–glutaraldehit(GA)-polietilenimin (PEİ)) yöntemlerini kullanmışlardır. İmmobilize DA-GA-PEİ nitrilaz enziminin aktivitesinin serbest hücre enzimi aktivitesinden bağıl olarak % 135,95 daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Tekrar kullanım kararlılığının serbest enzimden daha yüksek

olduğu ve 28 kullanımdan sonra immobilize enzimin aktivitesinde önemli bir düşüş olmadığı, bunun yanında R-mandelik asit veriminin 1,88 M olduğu bildirilmiştir. İmmobilize hücrelerin 4 ^{o}C'de 30 gün depolamadan sonra başlangıç aktivitesinin % 58'ini koruduğu belirtilmiştir.

Li ve ark., (2015), *Gibberella intermedia* CA3-1 hücrelerinin serbest ve immobilize formlarını 3-syanopiridinden nikotinik asit sentezlemek için kullanmışlardır. İmmobilizasyonda kapsülleme yöntemlerini kullanmışlardır. İmmobilizasyonda 4 farklı kapsülleme yöntemi kullanmışlar ve maksimum aktiviteye sodyum alginat kullanılarak gerçekleştirilen immobilizasyonda ulaşmışlardır. İmmobilize alginat hücreleri kullanılarak yapılan aktiviyte tayininde maksimum aktiviteye % 2 alginat, % 0,6 $CaCl_2$, 0,4 g hücre/alginat ve alginat boncuklarının boyutu 1,8 mm olduğu şartlarda ulaşıldığı rapor edilmiştir. 3-syanopiridin konsantrasyonu 700 mM olduğu durumda bile immobilize hücrelerin aktivitelerinin çok yüksek olduğunu bildirmişlerdir. İmmobilize hücrelerin 30, 40 ve 50 ^{o}C'deki yarılanma ömürleri sırasıyla 315, 117,5 ve 10,9 saat iken, serbest hücrelere göre 1,4, 1,6 ve 1,7 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanım kararlılığının yüksek olduğunu ve 28 kullanımdan sonra enzimin başlangıç aktivitesinin % 85'ini koruduğu rapor edilmiştir.

Yu ve ark., (2016), çevresel örneklerden elde edilen nitrilaz genini (NIT 190) *Escherichia coli* BL21 (DE3)'ye aktararak elde ettikleri rekombine hücreleri immobilize ederek 3-hidroksipropiyonik asit sentezinde kullanmışlardır. İmmobilizasyonda sodyum alginat yöntemini kullanmışlardır. Maksimum substrat derişiminde (4,5 mol/L) ve optimum koşullar altında (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 30 ^{o}C)) serbest hücrelerin subtratı tamamen hidroliz ettiğini, bunun yanında immobilize hücrelerin substrat toleransını 7,0 mol/L'ye kadar çıkardığını, termal ve tekrar kullanım kararlılığını artırdığını rapor etmişlerdir. İmmobilize hücrelerin 30 kullanıma kadar aktivitesini koruduğu, 74 kullanımdan sonra ise aktivitesinin % 70'ini koruduğunu rapor etmişlerdir.

Dennett ve Blamey (2016), hipertermofilik arkea olan *Pyrococcus sp.* M24D13'den termofilik nitrilaz enzimini saflaştırıp karekterize etmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığı 85 ^{o}C ve optimum pH'sı 7,5 olarak bulmuşlardır. Enzimin termal kararlılığının çok yüksek olduğunu ve 85 ^{o}C'de 8 saatlik inkübasyondan sonra aktivitesinin % 50'den fazlasını koruduğu rapor edilmiştir. Termofilik nitrilazın birçok substrata karşı aktivite gösterdiği ve bunlardan benzonitril (60 mM) ve bütironitrile (60 mM) karşı spesifik aktivitesinin sırasıyla 3286 U/mg protein ve 4008,2 U/mg protein olarak hesaplandığı rapor edilmiştir. Enzimin benzonitrile karşı Km ve Vmax değerleri sırasıyla 0,3 mM ve 333,3 µM/dk ve kcat/Km değeri 2,05 x10^{5} $s^{-1}M^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

He ve ark., (2016), *E. coli* BL21(DE3) pET21a-NIT (rekombine nitrilaz suşu) hücrelerini nano-Fe_3O_4 ve alginattan elde edilen magnetik Fe_3O_4/alginat jel boncuklara kapsülasyon yöntemi ile immobilize etmişlerdir. İmmobilize alginat boncuklar Gabapentin sentezinde bir ara ürün olan 1-syanosiklohekzan asetik asitin 1-syanosiklohekzanasetonitril'den sentezlenmesi için kullanılmıştır. Optimum immobilizasyon koşullarına % 3(a/v)'lük sodyum alginat ve 50 g/L Fe_3O_4 kullanıldığı şartlarda ulaşılmıştır. Fe_3O_4 kulanılarak elde edilen alginat boncukların mekanik mukavemetinin Fe_3O_4 kullanılmadan elde edilen alginat boncuklara göre daha çok iyileştiği rapor edilmiştir. İmmobilize enzim hücrelerinin pH ve termal kararlılığının serbest enzimi göre daha iyi olduğu bildirilmiştir. Manyetik alginat boncukların 35 tekrar kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin % 90'ını koruduğu rapor edilmiştir.

Jyoti ve ark., (2017), tam hücre immobilizasyonu ile *Rhodococcus pyridinivorans* NIT-36 enzimini kitosan mikroküre lere immobilize edildiğini bildirmişlerdir. Kitosan mikroküreciklerin kitosan ile gulutaraldehitin etkileştirilmesi sonucunda oluşturulduğunu ve gözenekli yapının SEM ile desteklendiğini rapor etmişlerdir. Elde edilen mikroküre lerin 450 mg/g hücre immobilizasyon kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir. İmmobilize edilmiş hücrelerinin serbest hücrelere kıyasla 60 °C'deki termal kararlılığının önemli ölçüde

yüksek olduğu bildirilmiştir. İmmobilize kürelerin substrat toleransının yüksek olduğu rapor edilmiştir. İmmobilize nitrilaz örneklerinin aktivitesi, 4°C'de 10 günlük inkübasyondan sonra başlangıç aktivitesinin % 80'ini koruduğu bildirilmiştir. Tekrar kullanım çalışmasında ise immobilize enzimin 7 kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin % 50'sini koruduğu rapor edilmiştir. Kitosan mikroküre lerinin kullanılması ile enzimin kararlılığının ve tekrar kullanılabilirliğinin arttığı bildirilmiştir.

Cabrera ve Blamey (2017), hipertermofilik arkea olan *Antarctic Pyrococcus* sp. MC-FB bulunan temofilik nitrilazı bildirmişlerdir. Nitrilaz enzimini kodlayan geni *Escherichia coli*'ye aktarmışlardır. rekombine nitrilazın (NitMC-FB) homodimer (60 kDa) olduğunu, bunun yanında enzimin optimum sıcaklık ve pH'sının 90 ^{o}C ve 7,0 olarak belirlendiğini rapor etmişlerdir. Substrat olarak 2-syanopiridin kullanıldığında K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 13,9 mM ve 3,7 µmol/dk.mg protein olarak belirlemişlerdir. Ayrıca, rekombine nitrilaz enziminin termal kararlılığın yüksek olduğunu 90 ^{o}C'de enzimin yarılanma süresinin 8 saat olduğunu rapor etmişlerdir.

Jiang ve ark., (2017), nitrilaz enzimini L-lizin ile modifiye edilmiş D155 reçineye immobilize etmişlerdir. Schiff bağ oluşumunu FTIR spektrumu kullanarak göstermişlerdir. Mandelonitrilin hidroliz edilmesini şartlarını optimize etmişlerdir. Hidrolizat karakterize edilerek hidrolizatın R-mandelik asit olduğu belirlenmiştir. İmmobilize nitrilaz örnekleri kullanılarak, optimum koşullarda (45 ^{o}C, pH 9,6, immobilize nitrilaz/mandelonitril=5) 5 saatte % 53,42 ±0,63 verimle ve % 99'un üzerinde enantiyomerik aşırılıkta R-mandelik asit sentezi gerçekleştirildiğini bildirmişlerdir. İmmobilizasyonla enzimin K_m ve termal kararlılığının arttığını rapor etmişlerdir. İmmobilize enzimin 15 kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin % 92,48 ± 0.32'ini koruduğu rapor edilmiştir.

Liu ve ark., (2018), yaptıkları çalışmada iminodiasetik asit üretimi için substrat toleransını ve aktiviteyi artırmak için, *Acidovorax facilis* nitrilazını gen bölgesi doygunluk mutagenez yöntemi ile daha fazla modifiye ederek

kullanmışlardır. Spesifik aktivitesi en yüksek olan mutantı (Mut-F168V/T201N/S192F/M191T/F192S) belirlemişlerdir. Yabani tip nitrilaz ile karşılaştırıldığında, mutant enzimin spesifik aktivitesinin % 136 oranında arttığı bildirilmiştir. Co^{+2} nitrilaz aktivitesini arttığı bildirilirken Cu^{+2}, Zn^{+2} ve Tween 80'in güçlü bir inhibitör etkisinin olduğu rapor edilmiştir. Mutant enziminin V_{max} ve k_{cat} değerlerinin 1,23 kat artarken K_m değerinin 1,53 kat azaldığı bildirilmiştir. Substrat olarak 630 mM iminodiasetonitril kullanıldığı zaman 5 saat sonunda mutant enzimin katalizlediği reaksiyonun iminodiasetikasit verimini % 71,9 olarak hesaplamışlardır.

Zou ve ark., (2018), rekombine *Acidovorax facilis* nitrilazını polietilenimin ile floküle ettikten sonra glutaraldehit ile çapraz bağlayarak çapraz bağlı hücre agregatlarını oluşturarak immobilize etmişlerdir. Belirlenen optimum agregat hazırlama koşullarında enzimin aktivite geri kazanımının % 68 olduğu bildirilmiştir. İmmobilizasyonla enzimin optimum pH'sının etkilenmediği, bunun yanında optimum sıcaklıkta ise küçük bir farklılık gözlenmiştir. İmmobilize enzimim 45 ^oC'deki yarılanma ömrünün 266,5 saat olduğu ve serbest enzimden 11,6 kez daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. 2 L'lik karıştırmalı reaktörde, yüksek konsantrasyonda (1M) 1-syanosiklohekzanasetonitril yüklemesi yapılarak immobilize enzimler katalizör olarak kullanılmıştır. Yapılan aktivite tayini sonucunda 1-syanosiklohekzanasetonitril'den 1-syanosiklohekzanasetik asit üretimi veriminin % 91 olduğunu hesaplamışlardır. İmmobilize hücrelerin termal kararlılığının yüksek olduğunu ve 30 kullanım sonunda başlangıç aktivitesinin % 80'ninden fazlasını koruduğu rapor edilmiştir.

Zhang ve ark., (2018), *Alcaligenes faecalis* nitrilaz genini içeren rekombine *Escherichia coli* hücreleri tris(hidroksimetil)fosfin kullanılarak immobilize edilmiştir. İmmobilize hücrelerin optimum pH ve sıcaklığını 8,0 ve 55 ^oC olarak belirlemişlerdir. İmmobilize hücrelerin 35, 45 ve 50 ^oC'deki yarılanma süresi sırasıyla 1800, 965 ve 163 saat olarak rapor edilmiştir. Substrat olarak (R-S)-mandelonitril kullanmışlardır. İmmobilize hücre katalizörü eşliğinde 500 mM (R-S)-mandelonitril kullanılarak yapılan enzimatik reaksiyon sonucunda 1 saatte 358 mM

R-mandelik asit üretildiğini rapor etmişlerdir. İmmobilize hücrelerle 40 ^{o}C de ve 100 mM (R-S)-mandelonitril kullanılarak yapılan tekrar kullanım çalışmalarında 60 kez tekrar kullanım sonucunda immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin % 64'ünü koruduğu bildirilmiştir.

Xu ve ark., (2019), etilenamin aracılı silifikasyon ile elde edilen gözenekli silika partikülleri kullanarak *Acidovorax facilis* nitrilazını (NitA) enkapsülasyon yöntemi ile immobilize ettiklerini rapor etmişlerdir. Enkapsülasyonda başlatıcı olarak trietilentetraamin kullanıldığında en yüksek immobilizasyon etkinliğine (% 98,3) ulaşıldığı ve spesifik aktivitenin 672,6 U/g olduğu bildirilmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin optimum sıcaklığı 40 ^{o}C ve optimum pH'ları 7,0 olarak bildirilmiştir. İmmobilize enzimin daha geniş bir pH aralığında yüksek aktiviteye sahip olduğu ve termal kararlılığının da serbest enzime göre yüksek olduğu rapor edilmiştir. Serbest enzimin Km ve Vmax değerlerinin 141 mM ve 9,97 mM dk-1, immobilize enzimin ise 280 mM ve 9,02 mM.dk^{-1} olarak hesaplamışlardır. İmmobilize enzimin tekrar kullanımının iyi olduğunu ve 16 kullanım sonucunda başlangıç aktivitesinin % 94,2'sini koruduğunu bildirmişlerdir. 4 °C de 17 gün yapılan depolama deneylerinde immobilize enzimin aktivitesinin yüksek oranda korunduğu rapor edilmiştir. İmmobilize enzimler katalizör olarak kullanılarak 2 L'lik karıştırmalı reaktörde 1-syanosiklohekzanasetonitril'den 1-syanosiklohekzanasetik asit sentezi çalışmaları yapılmış, 8 saatlik inkübasyondan sonra % 90,09'luk reaksiyon verimi ile 152 g/L 1-syanosiklohekzanasetik asit üretiminin gerçekleştirildiği rapor edilmiştir.

Jamwal ve ark., (2019), nitrilaz enzimini sentezledikleri akriloil çapraz bağlı selüloz dialdehit üzerine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize enzimin mandelonitirili hidroliz edeceği optimum koşulları belirlemek için farklı paremetrelerin (sıcaklık, pH, substrat derişimi vb.) hidrolize etkisini araştırmışlardır. İmmobilize enzimin optimum sıcaklık ve pH değeri 55 ^{o}C ve 8,0 olarak belirlenirken serbest enzimin optimum sıcaklık ve pH değeri 40 ^{o}C ve 6,0 olarak belirlenmiştir. İmmobilize enzimin termal ve depolama kararlılığının serbest

enzimden üstün olduğunu ve immobilize enzimin 16 kez tekrar kez kullanımdan sonra bile aktivite gösterebildiğini rapor etmişlerdir.

Zhang ve ark., (2019), *Brassica rapa* nitrilazını (BrNIT) barındıran *Escherichia coli* hücrelerini immobilize ederek izobütilsüksinonitrilin enantiyo seçici olarak hidrolizi çalışmasını gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir. İmmobilize hücrelerinin enantiyoseçiciliğinin yüksek olduğunu ve 100 g/L substrat kullanıldığında 12 kullanım sonunda immobilize hücrelerin substaratın % 41,1'den fazlasını ürüne dönüştürdüğünü rapor etmişlerdir.

Zhang ve ark., (2019), pregabalin sentezinde önemli bir ara ürün olan (S)-3-syano-5-metilhekzanoik asiti, konuma spesifik ve enantiyoseçici *Brassica rapa* nitrilazının aktrarıldığı immobilize *Escherichia coli* hücrelerini kullanarak izobütilsüksinonitrilden sentezlemişlerdir. İmmobilize hücrelerin katalitik etkinliğini araştırmışlardır. İmmobilize hücreler ile 100 g/L derişimde substrat kullanılarak yapılan çalışmada, immobilize hücrelerin enantiyoseçiciliğinin yüksek olduğu (E >150) ve 12 kullanımdan sonra substratın % 41,1'den fazlasını ürüne dönüştürdüğü rapor edilmiştir. Reaksiyona girmeyen (R)-izobütilsüksinonitrilin rasemizasyon ile % 94,5'inin geri dönüştüğünü ve ortaya çıkan (S)-3-syano-5-metilhekzanoik asitin hidrojenasyonla % 99,6 saflıkta ve % 99,4 optik saflıkta pregabaline dönüştüğü rapor edilmiştir.

Zhang ve ark., (2020), yaptığı çalışmada bir sulu sistemde stereospesifik bir nitrilaz tarafından katalizlenen büyük ölçekli R-Mandelik asit üretimi için enzimatik bir yöntem geliştirdiklerini bildirmişlerdir. *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET-Nit hücrelerinin nitrilaz aktivitesinin 20000 L'lik bir fermentörde 136,6 U/g'a ulaştığını bildirmişlerdir. Katalizör olarak *E. coli* hücreleri kullanıldığında, 500 mM R,S-mandelonitrilin 8 saat sonunda 426 mM R-mandelik asite dönüştüğünü ve enantiyomerik aşırılığında % 99 olduğunu bildirmişlerdir. saflaştırma basamaklarında ise R-mandelik asitin geri kazanım oranını % 78,8 olarak hesaplamışlardır.

Sunder ve ark., (2020), genom madenciliği yoluyla, bakterilerden dokuz yeni nitrilaz sekansı belirlemişler ve bunların endüstriyel uygulamaları olan 23 nitril substratı üzerindeki aktivitelerini değerlendirmişlerdir. *Zobellia galactanivorans, Achromobacter insolitus* ve *Cupriavidus necator* nitrilazların çeşitli nitril sınıfları üzerinde oldukça yüksek aktiviteye sahip olduğunu ve laboratuvarda tam hücre biyokatalizörleri olarak kullanımına uygun olduğunu bildirmişlerdir. *Z. galactanivorans* nitrilazının 3 saat içinde 4-syanopiridinden 1,79 M izonikotinik asit üretimini katalizlediği bildirilmiştir. *A. insolitus*'den elde edilen nitrilazın 630 mM iminodiasetonitrili 1 saat içinde % 86 verimle iminodiasetik aside dönüştürdüğü rapor edilmiştir. *C. necator* nitrilazının, 4 saat içinde 740 mM mandelonitrili enantiyoseçici olarak R- mandelik asite hidroliz ettiğini bildirmişlerdir.

Toprak ve ark., (2021), nitrilaz enzimini kovalent immobilizasyon yöntemiyle modifiye ReliZyme^{TM} desteklere, adsorpsiyon yöntemiyle montmorillonite K-10 desteğine ve hapsetme yöntemiyle de PVA hidrojellere immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyonda eklenen proteinin % 80-90 oranında desteklere bağlanmasına rağmen her iki kovalent immobilizasyonda ve adsorpsiyon yönteminde tatmin edici enzim aktivitesi geri kazanımı elde edilememiştir. PVA jel immobilizasyonunda ise protein bağlanma veriminin % 100 ve aktivite geri kazanımının % 80 olduğu rapor edilmiştir. Karakterizasyon çalışmalarında PVA jel örneklerinin kullanıldığı bildirilmiştir. Serbest ve immobilize PVA jele immobilize edilen enzim örneklerinin maksimum aktivite gösterdikleri pH ve sıcaklık değerleri her iki enzim için 7,5 ve 30 ^{o}C olarak belirlenmiştir. 30 ^{o}C'de yapılan termal kararlılık çalışmasında 24 saat sonunda serbest enzim aktivitesinin tamamını kaybederken, aynı koşullarda immobilize enzimin aktivitesinin % 60'ını koruduğu bildirilmiştir. Serbest ve immobilize enzim kullanırak akrilik asit sentezi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 0,1 M akrilonitril varlığında, immobilize enzim 30 dakikada akrilonitrilin tamamını akrilik asite dönüştürüken, serbest enzim aynı miktardaki akrilonitrili 60 dakikada akrilik asite dönüştürmüştür. PVA jel örneklerinin tekrar kullanım kararlılığının belirlenmesi çalışmasında immobilize enzimin 15

kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin % 84'ünü koruduğu rapor edilmiştir. Deneysel sonuçlarının PVA jele immobilize edilen nitrilazın ılımlı koşullarda akrilik asit sentezinde katalizör olarak kullanılabileceğini gösterdiğini rapor etmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Enzimler

Nitrilaz (CODEXIS®, NIT-101, NIT-102, NIT-103, NIT-104, NIT-105, NIT-106, NIT-P1-118, NIT-P1-120, NIT-P1-121, NIT-P1-122, NIT-P1-126 ve NIT-P1-130), (R,S)-Mandelonitril (> % 85, v/v), (R)-mandelik asit (% 99, w/w), (S)-mandelik asit (% 99, w/w), (R)-mandelonitril (% 99, w/w), (S)-mandelonitril (% 99, w/w), (R)-mandelamid (% 99, w/w), (S)-mandelamid (% 99, w/w), akrilonitril (% 99, v/v), akrilik asit (% 99, v/v), benzoil siyanid (% 99, v/v), benzoil formik asit (% 99, w/w), 3-piridin karbonitril (% 99, w/w), nikotinik asit (% 99, w/w), benzonitril (% 99, v/v), benzoik asit (% 99, w/w), benzaldehit, potasyum siyanür, aseton siyanohidrin, epikoloro hidrin (ECH, 1-kloro-2,3-epoksipropan), 3-APTES (3-aminopropil trietoksi silan), EDTA (etilendiamin tetra asetik asit), TFA (trifloro asetik asit), 2-propanol, hekzan, glutaraldehit, % 2'lik ninhidrin çözeltisi, sitrik asit, fosforik asit (H_3PO_4, (% 85, v/v), sodyum hidroksit, sodyum sülfit, BSA (sığır serum albümin), nitrik asit, PVA, dimetil sülfoksit (DMSO), DKM (diklorometan), toluen, etanol, dietil eter (DEE), etil asetat, heptan, sodyum periyodat, TBME (tersiyer bütil metil eter), Florisil® (partikül büyüklüğü150-250 µM, gözenek büyüklüğü 6-8 nm ve yüzey alanı 170-300 m^2/g) , nano silika (partikül boyutu 10-20 nm), Coomassie® Brilliant blue G 250, (ReliZyme™ HA 403/S, EP 403/S, EA/S 403/S ve HG/S 403), Purolite® Lifetech™ ECR1090M, Purolite® Lifetech™ ECR1030M, ditiyotreitol (DTT), HCl (% 37, v/v), aseton, nitrik asit polietilen glikol (PEG), Tris-HCl, kalsiyum klorür ($CaCl_2$), sodyum alginat, potasyum sülfat (K_2SO_4), etilen diamin, sodyum florür (NaF), tetraetilortosilikat (TEOS), metiltrimetoksi silan (MTMS), tetrametil orto silsikat (TMOS), *N*-siklohekzil-*N*'-(2-morfolinoetil)karbodiimid-metho-p-toluensülfonat. Kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Merck firması tarafından sağlanmıştır.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

- UV-Vis spektrofotometre (SHIMADZU UV-1800)
- HPLC (SHIMADZU LC-20AT)
- Soğutmalı inkübatör (BINDER)
- Soğutmalı santrifüj (HETTICH)
- pH metre (HANNA 8424)
- Su banyoları (Nüve NB 20)
- Çalkalayıcılı inkübatörler (PolyScience®)
- Analitik terazi (KERN)
- Magnetik karıştırıcı (ISOLAB)

3.1.3. Kullanılan Araç-Gereçler

Bu çalışmada Nucleocel Delta S chiral HPLC kolonu, Alltech® Anion Exclusion HPLC kolonu, cam tüpler, erlenler, beherler, plastik pipetler, otomatik pipetler, manuel dereceli pipetler, huniler, termometre süzgeç kağıdı, spatul, parafin kullanılmıştır.

3.2. METOT

3.2.1. Nitrilaz Enzimlerinin Benzonitrile Karşı Aktivitesinin Belirlenmesi

Rekombine olarak üretilmiş 6 farklı nitrilaz enziminin (CODEXIS®, NIT-101, NIT-102, NIT-103, NIT-104, NIT-105 ve NIT-106) aktivitesi substrat olarak benzonitril kullanılarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi benzonitrilin enzim ile etkileşmesi sonucu oluşan benzoik asitin absorbansının 290 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. 2mM DTT (ditiyotreitol) ve 1mM EDTA içeren 2,90 mL fosfat tamponu (50mM, pH 7,5) üzerine DMSO içerisinde hazırlanmış 100 µL benzonitril çözeltisi (200 mM) eklenip 30 °C de 3 dakika bekletilerek bu çözelti içerisine 50 µL (5 mg/mL) enzim çözeltisi ilave edilmiştir. 60 dakikalık inkübasyon süresinin

ardından enzimatik reaksiyonu durdurmak için ortama 1mL (1M) HCl ilave edilerek 290 nm'deki absorbans değeri kaydedilmiştir. Kör olarak 3,0 mL 50 mM fosfat tamponu(pH 7,5) içerisine 50 µL enzim çözeltisi ilave edilerek hazırlanmış çözelti kullanılmıştır.

3.2.2. Protein Tayini

Bu çalışmalarda protein konsantrasyonunun belirlenmesi için Bradford (1976) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır.

3.2.3. HPLC Analizleri

(R)-Mandelik asit, **(**S)-Mandelik asit (R)-mandelonitril, (S)-mandelonitril, (R)-mandelamid ve (S)-mandelamid maddelerinin analizinde HPLC kullanılmıştır. Bu maddelerin farklı derişimlerde (1; 2,5; 5; 10; 25; 50 ve 100 mM, çözücü olarak etanol kullanılmış) hazırlanmış çözeltilerinden 100 µL alınıp üzerine 900 µL 50 mM fosfat tamponu (pH 7,5) ilave edilmiştir. Çözelti ortamını asitlendirmek için 100 µL derişik HCl ilave edilmiştir. Bu maddeleri eter fazına almak için 1mL TBME ilave edilmiştir. Oluşan eter fazı alınıp HPLC'de Dedektör: Diyod array (220 nm), akış hızı:1 mL/dk, Hareketli faz: Hekzan/2-propanol/TFA (Trifloro asetik asit) (96/4/0,1 (v/v/v)), Kolon: Nucleocel Delta S chiral olan sistem koşullarında analiz edilmiştir.

3.2.4. Nitrilaz Enzimlerinin (R,S)-Mandelonitrile Karşı Aktivitelerinin Belirlenmesi

NIT-101, NIT-102, NIT-103, NIT-104, NIT-105 ve NIT-106 enzimlerinden 50 µL (5 mg/mL) alınıp üzerlerine 850 µL fosfat tamponu (pH 7,5) ilave edilmiştir. 5 dk inkübasyon işleminden sonra, reaksiyonu başlatmak için ortama 100 µL 50 mM (R,S)-mandelonitril ilave edilmiştir. 1 saat sonra enzimatik reaksiyonu durdurmak için ortama 100 µL derişik HCl ilave edilmiş ve oluşan reaksiyon ürünleri 1 mL tersiyer bütil metil eter (TBME) ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraktlar bölüm 3.2.3'de anlatıldığı şekilde HPLC ile analiz edilmişlerdir.

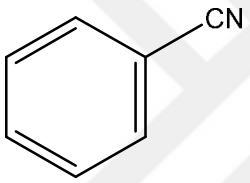
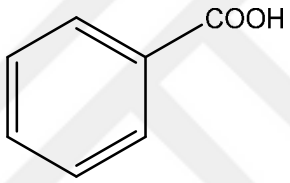
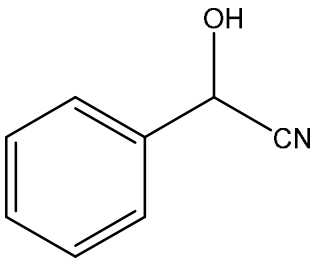
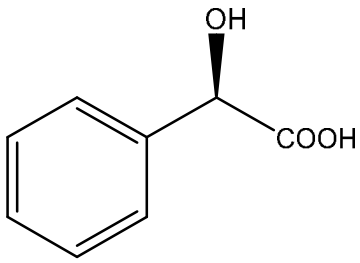
Oluşan (R) asit ve (S) asitin enantiyomerik aşırılıkları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$(\%)\ ee = \frac{[R]_{asit} - [S]_{asit}}{[R]_{asit} + [R]_{asit}} * 100$$

ee=enantiyomerik aşırılığı, $[R]_{asit}$ =(R) enantiyomerinin konsantrasyonu, $[S]_{asit}$= (S) enantiyomerinin konsantrasyonunu ifade etmektedir.

NIT-106 enziminin aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan substrat ve ürünlerin kimyasal yapısı Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çİzelge 3.1. NIT-106 enziminin aktivitesininin belirlenmesinde kullanılan nitril bileşikleri ve karşılık gelen karboksilik asit bileşikleri

Substrat	**Ürün**
 Benzonitril	 Benzoik asit
 (R,S)-Mandelonitril	 (R)-Mandelik asit

3.2.5. Benzaldehit Kullanılarak Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Sentez işleminde farklı başlangıç maddeleri kullanılarak elde edilen mandelonitriller kullanılarak NIT-106 enziminin mandelik asit sentezi verimi belirlenmiştir. Bu amaçla KCN ve asetosiyanohidrin kullanılarak reaksiyon ortamında (R,S)-mandelonitril oluşturulmuş ve nitrilaz enzimiyle etkileşmesi sağlanmıştır.

100 µL 50 mM benzaldehit üzerine 750 µL fosfat tamponu (pH 7,5) ilave edilmiş sonra 50 µL (5 mg/mL) NIT-106 eklenerek 3 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyonu başlatmak için ortama 100 µL asetosiyanohidrin veya 100 µL KCN ilave edilmiştir. 30 °C'de 24 saat bekletme işleminden sonra enzimatik reaksiyonu durdurmak için ortama 100 µL derişik HCl ilave edilmiş ve oluşan reaksiyon ürünleri 1 mL TBME ile ekstrakte edilmiştir. Elde edilen eter fazları kullanılarak bölüm 3.2.3'de anlatıldığı şekilde HPLC'de ürünlerin analizi yapılmıştır.

3.2.6. NIT-106 Katalizli Reaksiyonda Zamana Bağlı Mandelik Asit Sentezi

Bölüm 3.2.4'te belirtildiği gibi farklı sentez süreleri için (2, 4, 8, 16 ve 24 saat) NIT-106 enziminin aktivite tayini yapılmıştır. Bu sürelerin sonunda NIT-106 enziminin katalizlemesiyle oluşan (R,S)-mandelik asit miktarı belirlenmiştir.

3.2.7. Organik Çözücülerin NIT-106 Aktivitesi Üzerine Etkisi

(R,S)-mandelonitrili çözmek için kullanılan etanolün yerine farklı organik çözücüler kullanılarak bölüm 3.2.4'te belirtildiği şekilde NIT-106'nın aktivitesi belirlenmiştir. Çözücü olarak polaritesi birbirinden farklı ve reaksiyon ortamında iki fazlı sistem oluşturan dietil eter, diklorometan, etil asetat, hekzan, heptan, toluen ve TBME ve su ile karışabilen DMSO çözücüleri kullanılmıştır.

3.2.8. (R,S)-Mandelonitril Miktarının NIT-106 Aktivitesi Üzerine Etkisi

Derişimleri 50, 100, 250 ve 500 mM olacak şekilde etanol içerisinde hazırlanmış 100 µL'lik (R,S)-mandelonitril çözeltileri üzerine 800 µL fosfat

tamponu (pH 7,5) ilave edilmiştir. Reaksiyonu başlatmak için ortama 100 µL NIT-106 (2,8 mg/mL) ilave edilmiş ve 30 °C'de farklı inkübasyon sürelerinde (1, 2, 4, 6, 8, 16, 24 saat) bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası örneklere 100 µL derişik HCl ilave edilerek reaksiyon durdurulmuş ve 1 mL TBME kullanılarak reaksiyon ortamındaki organik bileşikler ekstrakte edilmiştir. Elde edilen eter fazları kullanılarak reaksiyon ürünleri HPLC'de analiz edilmiştir.

3.2.9. NIT-106'nın Kovalent İmmobilizasyonunda Kullanılacak Desteklerin Hazırlanması

3.2.9.1. Silika Nanopartikül ve Florisil Desteğe 3-Aminopropiltrietoksisilan (3-APTES) Ara Kolunun Bağlanması ve Glutaraldehit İle Aktifleştirilmesi

Nitrilazın immobilizasyonunda kullanılacak olan silika nanopartikül desteklerin nitrilaz immobilizasyonundan önce yüzeyleri aktifleştirilmiş ve daha sonra glutaraldehit ile muamele edilmiştir. Desteğin aktifleştirilmesinde Weethal (1976) tarafından bildirilen yöntem esas alınarak, 3-APTES ile desteğin alkil amin türevi (silanlama) oluşturulmuştur. 10 g destek materyali 50 mL % 5 (v/v)'lik nitrik asit ile 80-90 ºC'de 1 saat muamele edildikten sonra su ile yıkanmış ve bir gece kurutulmuştur. Kurutulmuş desteğin 1,0 gramı % 4'lük (v/v) 3-APTES'in aseton içerisindeki çözeltisine eklenerek 45 ºC'de 24 saat bekletilmiştir. Saf su ile yıkanarak 115 ºC'de etüvde 24 saat kurutulmuştur. Alkilamin türevine glutaraldehitin bağlanmasında Cho ve Rhee (1993) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 1 g aktifleştirilmiş desteğe 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda % 2,5 (w/v) olacak şekilde hazırlanmış glutaraldehit çözeltisinden 25 mL eklenerek oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Destek saf su ile süzüntüde glutaraldehit gözlenmeyinceye kadar yıkanmıştır. Aynı deneysel işlemler florisil desteği için de uygulanmıştır.

3.2.9.2. Silika Nanopartiküllerin ve Florisil Desteğin Epiklorohidrin ile Aktifleştirilmesi

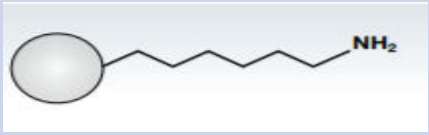
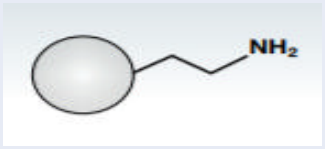
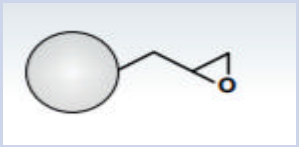
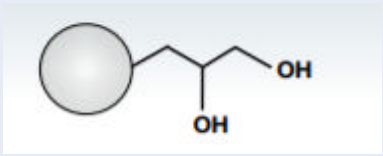
Silika nanopartiküllere 1-kloro-2,3-epoksipropan'ın (epiklorohidrin) bağlanmasında Axen ve ark., (1975) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. 2,0 g destek üzerine 10 mL 1,7 M'lık NaOH (0.68 g $NaBH_4$ içeren) olacak şekilde hazırlanmış çözeltisi eklenerek 4 °C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra NaOH ile muamele edilen silika nanopartiküllere 7,2 mL epiklorohidrin eklenerek oda sıcaklığında 17 saat bekletilmiştir. Epiklorohidrin ile aktifleştirilen silika nanopartiküller süzülerek yıkanmış ve 24 saat süresince kurutulmuştur. Daha sonra desteğin oksiran halkası açılarak aldehit grubu oluşturulmuştur. Bunun için 1 g destek 10 ml 0,5 M H_2SO_4 içerisinde bir gece bekletilmiştir. Süzme işleminden sonra oksiran grupları daha iyi açılması için destek etüvde kurutulmuştur. Oksiran grupları açılan destekte sodyum periyodat kullanılarak aldehit grupları oluşturulmuştur. Bu amaç için 1 g kurutulmuş desteğin üzerine içerisinde 0,4 g sodyum periyodat içeren 10 mL çözelti ilave edilmiştir. 2 saat bekletme işleminden sonra destek süzülerek etüvde kurutulmuştur. Silika nanopartiküller için önerilen yöntem florisil destek için de uygulanmıştır.

3.2.9.3. ReliZyme™ Desteklerin Hazırlanması

İmmobilizasyon çalışmalarında ReliZyme™ HA 403/S, EP 403/S, EA/S 403/S ve HG/S 403 destekleri kullanılmıştır (Çizelge 3.2.). Destekler metakrilatın kopolimerlerin çapraz bağlanmasıyla elde edilmiştir. ReliZyme™ HA 403/S desteği 6 C'lu bir amino grupları barındırırken ReliZyme™ EA 403/S desteği 2 C'lu bir amino grupları barındırmaktadır. ReliZyme™ EP 403/S desteği epoksi grupları içerirken ReliZyme™ HG 403/S desteği diol grupları içermektedir. Desteklerin ortalama gözenek çapları 40-60 nm aralığında bulunmaktadır. Alkin amin türevi içeren HA 403/S ve EA 403/S destekleri Cho ve Rhee (1993) tarafından önerilen yöntem kullanılarak glutaraldehit ile aktifleştirilmiştir. Yapısında diol bulunan HG 403/S desteği ise $NaIO_4$ ile muamele edilerek yapısında immobilizasyon için gerekli

olan aldehit grupları oluşturulmuştur. Yapısında epoksi grubu bulunduran EP 403/S desteği ise immobilizasyon işleminde doğrudan kullanılmıştır.

Çİzelge 3.2. İmmobilizasyonda kullanılan ReliZyne™ destekler ve fonksiyonel grupları

Destek	Fonksiyonel grup
ReliZyme™ HA 403/S	
ReliZyme™ EA 403/S	
ReliZyme™ EP 403/S	
ReliZyme™ HG 403/S	

3.2.10. NIT-106 Enziminin Kovalent İmmobilizasyonu

NIT-106 enzimi farklı destekler kullanılarak kovalent immobilize edilmiştir. İmmobilizasyonda gulutaraldehit ve epiklorohidrin ile aktifleştirilmiş florisil ve silika nanopartiküller kullanılmıştır. Ayrıca bölüm 3.2.9.3.'de belirtilen ReliZyme™ destekler kullanılarak NIT-106 enzimi immobilize edilmiştir.

NIT-106'nın silika nano partiküllere (nano-GLU ve nano-ECH) immobilizasyonunda 1,0 mg/mL derişimindeki NIT-106 çözeltisi 50 mM ve pH 7,5 fosfat tamponu içinde hazırlanmıştır. Desteklerin (nano-ECH ve nano-GLU) 1,0

gramına 4 mL NIT-106 çözeltisinden eklenerek 5 °C'de 4 saat süreyle bekletilmiştir. Daha sonra immobilizasyon tamponuyla desteğe tutunmayan proteinler yıkanmış ve protein tayini yapılmıştır. İmmobilizasyon işleminin başında ortama ilave edilen protein miktarından süzüntüdeki protein miktarı çıkartılarak immobilizasyon verimi hesaplanmıştır.

NIT-106 enzimi florisil desteğe iki farklı ara kol (glutaraldehit ve epiklorohidrin) üzerinden immobilize edilmiştir. Yöntemde Mateo ve ark., (2000) önerdiği yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Yöntemde; 1,0 mg/mL derişimindeki NIT-106 çözeltisi 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içinde hazırlanmıştır. Desteklerin (Flo-ECH ve Flo-GLU) 1,0 gramına 4 mL NIT-106 çözeltisinden eklenerek 5 °C'de 4 saat süreyle bekletilmiştir. Daha sonra immobilizasyon tamponuyla desteğe tutunmayan proteinler yıkanmış ve protein tayini yapılmıştır. Sonuçlar değerlendirilip immobilizasyon verimi hesaplanmıştır.

NIT-106 enziminin ReliZyme™ destekler (HA 403/S, EA 403/S, EP 403/S ve HG 403/S) üzerine kovalent immobilizasyonu işleminde 1g destek üzerine derişimi 1 mg/mL olacak şekilde 50 mM pH 7,5 fosfat tamponunda hazırlanmış NIT-106 çözeltisinin 4 mL'si ilave edilmiş ve 5 °C'de 4 saat süreyle bekletilmiştir. İmmobilizasyon süresi olarak EP 403 (24 saat) hariç 4 saat olarak belirlenmiştir. İmmobilizasyon süresi sonunda immobilize NIT-106 örnekleri tampon ile yıkanarak desteğe bağlanmayan serbest nitrilaz enzimlerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkamanın ardından süzüntüde protein tayini yapılmıştır.

3.2.11. NIT-106 Enziminin Sol-jel Yöntemiyle İmmobilizasyonu

NIT-106 enziminin sol-jel yöntemiyle immobilizasyonunda Sachdeva, S., (2011) Reetz ve ark., (1996) ve Weetall (1996) önerdiği 3 farklı yöntem kullanılmıştır.

Sachdeva, S., (2011) önerdiği yöntemde NIT-106 enziminin sol-jel immolizasyonu iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak asidik pH'da öncül sol-jel çözeltisi hazırlanmış ve daha sonra uygun tampon çözeltideki enzim çözeltisi ilk

aşamada hazırlanan çözeltiye ilave edilmiştir. İlk aşamada, konsantre HCl ile pH 2,85'e ayarlanmış çözeltiden 1,38 mL, metiltrimetoksisilan (MTMS), tetrametoksisilan (TMSO) ve damıtık su (10,4 mL)' dan oluşan karışıma ilave edilmiştir. Bu karışım yuvarlak dipli balonda homojen karışım oluşuncaya kadar karıştırılmıştır. Daha sonra karışım 0 ºC'ye kadar soğutulmuş ve toplam hacim, ilk MTMS / TMSO hacim oranına karşılık gelene kadar su ilave edilmiştir. Hazırlanan bu öncül çözelti vakit kaybetmeden immobilizasyon için kullanılmıştır.

50 mM fosfat tamponunda (pH 7,5) 1 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanmış nitrilaz çözeltisi ile taze hazırlanmış sol-jel öncül çözeltisi (1:1 hacimsel oranda) karıştırılmıştır. Sol-jel karışımları manyetik olarak 20 saniye aralıklarla karıştırılmıştır. Karışım jelleştiğinde karıştırma işlemi sonlandırılmıştır. Elde edilen jeller 50 mM fosfat tamponu (pH 7,5) ile yıkanmış ve 4 ºC'de farklı bekletme sürelerinde (12, 24, 48 ve 72 saat) kurutmak için soğutmalı inkübatörde bekletilmiştir.

Reetz ve ark., (1996) önerdiği yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Yapılan immobilizasyonda silan bileşikleri ile birlikte sodyum florür (NaF) kullanılmıştır. 1 mL tampon (pH 7,5 Tris-HCl, 50 mM) çözeltisi, 400 µL PEG (% 4'lük, pH 7,5 Tris-HCl içerisinde hazırlanmış) ve 200 µL NaF (1 M) çözeltisi vortekslenmiş ve üzerine 3 mL (4 mg/mL NIT-106) enzim çözeltisi ilave edilip homojenize edilmiştir. Bu çözelti üzerine 684 µL TEOS (Tetraetilortosilikat) ve 442 µL MTMS (Metiltrimetoksisilan) ilave edilmiş ve 5 saniye vortekslenmiştir. Yaklaşık 30 saniye karışımın berrak homojen bir çözelti oluşturması beklenerek ve daha sonra jelleşme oluşana kadar ısıtılmıştır (yaklaşık 15 saniye). Bu işlemlerin ardından jelleşen madde 5 dakika bir buz banyosunda bekletildi. Jelleşmenin tamamen gerçekleşmesi için inkübatörde (5 ºC) 8 saat bekletilmiş ve daha sonra oluşan sol-jel pH 7,5 (50 mM) fosfat tamponu ile yıkanarak süzüntüde protein tayini yapılmıştır. Yıkanan sol-jel örnekleri inkübatörde (5 ºC) kurutularak aktivite tayininde kullanılmıştır.

Sol-jel immobilizasyonunda üçüncü olarak Weetall (1996)'nın önerdiği yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Yöntemde 7 ml TMOS, 3 ml damıtık saf su ve 0,04 M HCl birlikte 20 dakika karıştırılmıştır. Elde edilen bu silikat karışımının 1 mL'si üzerine 1 mL borat tamponu (pH 9,0, 50 mM) ve 1 mL enzim çözeltisi (4 mg/mL NIT-106) ilave edilip homojen bir karışım elde edilinceye kadar karıştırılmıştır. Jelleşmenin tamamen gerçekleşmesi için örnekler inkübatörde (5 ^{o} C) 4 saat bekletilmiştir. Daha sonra oluşan sol-jel pH 7,5 (50 mM) fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Elde edilen sol-jel örnekleri inkübatörde kurutularak aktivitesi belirlenmiştir. Süzüntüde ise Bradford yöntemine göre bağlanmayan enzim miktarının belirlenmesi için protein tayini gerçekleştirilmiştir.

3.2.12. NIT-106'nın Alginat İçerisinde İmmobilizasyonu

NIT-106'nın alginat içerisinde imobilizasyonunda Mondal ve ark., (2004) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. 2 mL NIT-106 çözeltisi (2 mg/mL) pH 7,5 fosfat tamponu kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu enzim çözeltisi üzerine % 3'lük 5 mL alginat çözelttisi eklenmiştir. Daha sonra hazırlanan alginat enzim karışımı bir şırınga yardımıyla 0,2 M $CaCl_2$ çözeltisi üzerine damla damla ilave edilmiştir. Oluşan alginat boncukları saf su ile yıkanmış ve yıkama suyu toplanarak süzüntüdeki protein miktarı belirlenmiştir. Elde edilen alginat boncukları aktivitesi belirlenene kadar 5 °C'de pH 7,5 Tris-HCl (50 mM) tampon içerisinde bekletilmiştir.

Aktivite üzerine enzim derişiminin etkisinin belirlenmesi amacı ile farklı başlangıç derişimlerinde (1, 2, 2,5, 4 ve 5 mg/mL) NIT-106 kullanılarak immobilizasyon uygulaması gerçekleştirilmiştir.

3.2.13. NIT-106'nın Protein Kaplı Mikrokristal (PCMC) Yöntemi ile İmmobilizasyonu

4 mg NIT-106 1,5 ml fosfat tamponu (pH 7,5) içerisinde çözülmüş üzerine 3 mL doymuş K_2SO_4 çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra bu karışım üzerine 30 mL

aseton yavaş yavaş ilave edilmiştir. Supernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen destek asetonla yıkanmıştır. Asetonla yıkanan immobilize enzimler 4 °C'deki inkübatörde kurutulmuştur.

3.2.13.1. NIT-106 PCMC'nin Aktivite Tayini

40 mg immobilize enzim üzerine 20 µL tampon (pH 7,5 fosfat), 880 µL etanol ilave edilmiş ve reaksiyonu başlatmak için ortama 100 µL 50 mM (R, S)-mandelonitril ilave edilmiştir. Belirli saat aralıklarında (2,4,6 ve 16 saat) enzimatik reaksiyonu durdurmak için ortama 100 µL derişik HCl ilave edilmiş ve 1 mL TBME ile ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Ekstraktlar Bölüm 3.2.3'de belirtildiği şekilde HPLC'de analiz edilmiştir.

3.2.14. NIT-106 Polivinil Alkol (PVA) Jel İmmobilizasyonu

İmmobilizasyonda %10'luk (pH 7,5, 50 mM fosfat tamponunda hazırlanmış) polivinil alkol çözeltisi kullanılmıştır. 1,0 mL polivinil alkol çözeltisi üzerine 1,0 mL derişimi 4,0 mg/mL NIT-106 olan enzim ilave edilip homojen çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltilerden 100 µL'lik kısımlar halinde mikropipet yardımıyla jeller oluşturulmuştur. Oluşturulan jeller daha sonra 4 °C'deki inkübatörde 10 saat kurutulduktan sonra aktivite tayini için kullanılmıştır.

3.2.15. NIT-106 Enziminin CLEA Oluşturarak İmmobilizasyonu

NIT-106'nın CLEA'ları hazırlanmasında Yu ve ark., (2006) önerdiği yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. 4 mg/ml derişimindeki 2,5 mL (50 mM, pH 7,5) fosfat tamponunda çözülmüş nitrilazın üzerine 1 mL aseton eklenerek çöktürülmüştür. Daha sonra nitrilazın tamamının çökmesi için 4ºC'de 15 dakika bekletilmiş ve çöktürme sağlandıktan sonra üzerine 0,6 mL glutaraldehit (% 50 v/v) eklenerek sürekli karıştırılmıştır. Karışım, 4ºC' de çalkalayıcılı su banyosunda 6 saat bekletilmiştir. Deneysel aşamalarda kullanılabilecek CLEA preparatları elde edilemediğinden dolayı kimyasal aminasyon işlemi uygulanmıştır. Enzim üzerindeki

karboksil gruplarını amino grubuna dönüştürmek için kimyasal aminasyon yöntemi kullanılmıştır. Yöntemde; 4 mg/ml derişimindeki 2,5 mL (50 mM, pH 7,5) fosfat tamponunda çözülmüş NIT-106 üzerine 5 mL kimyasal aminasyon çözeltisi (10 mM N-siklohekzil-NI-(2-morfolinoetil)karbodiimid-metho-p-toluensülfonat içeren pH 4,7'ye ayarlanmış 1M etilendiamin) ilave edilip 1 saat oda koşullarında (25 ^{o}C) bekletilmiştir. Elde edilen çözeltiye 1 mL aseton ilave edilerek 5 ^{o}C'de 20 dk bekletilmiş ve nitrilazın çökmesi sağlanmıştır. Çöktürme işleminden sonra 0,6 mL glutaraldehit (% 50, v/v) eklenerek 5 ^{o}C'de 6 saat boyunca çalkalayıcılı su banyosunda bekletilmiştir. Deneysel aşamalarda kullanılabilecek enzim preparatları elde edilemediğinden yıkama işlemi uygulanmamıştır.

3.3. NIT-105 İmmobilizasyonu

3.3.1. NIT-105 Enzimin Purolite® Lifetech™ ECR1090M ve Lifetech™ ECR1030M desteklere İmmobilizasyonu

100'er mg'lık Lifetech™ ECR1090M ve Lifetech™ ECR1030M desteklere farklı miktarlarda (0,4, 0,8, ve 1,2 mg) NIT-105 enzimi ilave edilerek immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyonda 50 mM fosfat tamponu (pH 7,5, 50 mM) kullanılmıştır. İmmobilizasyondan sonra süzüntüde protein tayinleri yapılmış ve immobilizasyon verimi hesaplanmıştır.

3.3.2. NIT-105'in Polivinil Alkol (PVA) (PVA-NIT-105) Jel İmmobilizasyonu

İmmobilizasyonda %10'luk (pH 7,5, 50 mM fosfat tamponunda hazırlanmış) polivinil alkol çözeltisi kullanılmıştır.1 mL polivinil alkol çözeltisi üzerine 1 mL farklı derişimlerde (05, 1, 2, ve 4 mg/mL) NIT-105 olan enzim ilave edilip homojen çözelti elde edilinceye kadar karıştırılmıştır Bu çözeltilerden 100 µL'lik kısımlar halinde mikropipet yardımıyla jeller oluşturulmuştur. Oluşturulan jeller daha sonra 4 °C'deki inkübatörde 10 saat kurutulduktan sonra aktivite tayini

için kullanılmıştır. Substrat olarak benzonitril kullanılarak Nessler yöntemi ile aktivite tayini yapılmıştır.

3.3.3. Serbest ve immobilize NIT-105 Enzimlerinin Aktivite Tayini

Serbest ve immobilize NIT-105 enzimlerinin aktivite tayininde, aktivite sonucu oluşan amonyumun nessler reaktifi ile belirlenmesi prensibinden yararlanılmıştır. Yöntem nessler çözeltisi içindeki tetraiyodomerkurat'ın amonyumla oluşturduğu kırmızı-kahverengi renkli kompleksinin 480 nm dalga boyunda UV-Vis spektrofotometrede absorbansının okunması prensibine dayanmaktadır. Standart amonyum grafiğinin çizilmesin de amonyum sülfat standart olarak kullanılmıştır.

Yöntemde 10 mg immobilize enzim veya 50 µL serbest enzim üzerine 900 µL (serbest enzim için 800 µL) Tris-HCl tamponu (pH 7,5) ilave edilmiş ve reaksiyonu başlatmak için ortama 100 µL 100 mM benzonitril ilave edilmiştir. 30 ^{o}C'de 10 dk inkübasyondan sonra enzimatik reaksiyonu durdurmak için ortama 100 µL derişik 1 M HCl ilave edilmiştir. Bu karışım üzerine 100 µL Nessler ayıracı ilave edildikten sonra üzerine 2,8 mL su ilave edilmiş ve 10 dk bekletilerek 480 nm'de oluşan ürün ölçülmüştür Bir ünite (U) nitrilaz aktivitesi, deneysel koşullarda bir dakikada 1 µmol amonyum oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.3.4. Serbest ve PVA-NIT-105'in Karakterizasyonu

NIT-105'in immobilizasyonda en uygun enzim derişimi belirlendikten sonra serbest ve immobilize enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği koşullar ve bu koşullardaki kinetik parametreler belirlenmiştir.

- Serbest ve immobilize nitrilaz için optimum pH'nın belirlenmesinde pH 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0 ve 10,0' da aktiviteler ölçülmüştür.
- Serbest ve immobilize nitrilaz örnekleri için optimum sıcaklığın belirlenmesi için 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 ºC'de nitrilaz aktivitesi ölçülmüştür.

- Serbest ve immobilize nitrilaz örneklerinin termal kararlılığının belirlenebilmesi için, 25 ve 35 ºC'de belirli sürelerde bekletildikten sonra kalan aktiviteleri ölçülmüştür.
- Serbest ve immobilize nitrilazın depolama kararlılığının belirlenmesinde nitrilaz örnekleri 5 ºC'de bekletilerek belirli aralıklarla belirli günlerde kalan aktivitesi ölçülmüştür
- Belirlenmiş olan optimum koşullarda, benzonitrilin farklı derişimleri için serbest ve immobilize nitrilaz aktiviteleri ölçülmüştür. Maksimum aktivite (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitinin (K_m), grafiksel değerlendirilmesinde, 1/V'ye karşı 1/[S] değerlerinin çizilmesi ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği kullanılmıştır.

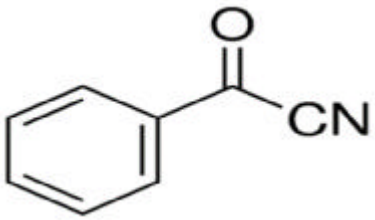
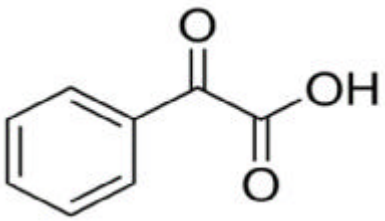
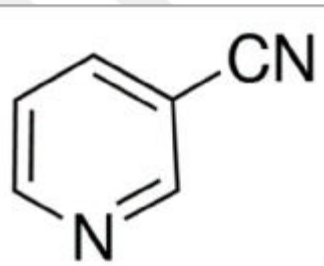
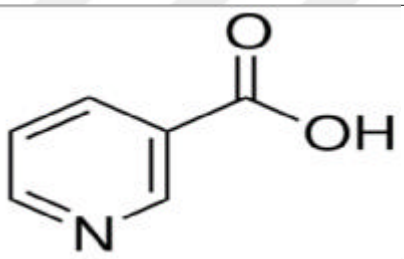
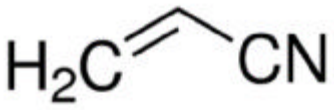
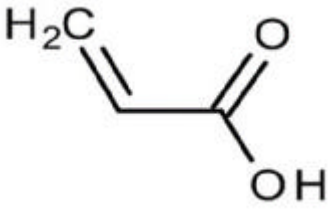
3.3.5. PVA-NIT-105'in Tekrar kullanım Kararlılığının Belirlenmesi

PVA-NIT-105'in tekrar kullanımı ile ilgili çalışmalar kesikli reaktörde (1,1x5 cm) ve belirlenen optimum koşullarda yapılmıştır. 50 mg immobilize NIT-105 enzimi üzerine 900 µL Tris-HCl tamponu (pH 7,5) 100 µL 100 mM benzonitril substrat çözeltisi ilave edilmiştir. 10 dakika sonra kolon musluğu açılarak reaksiyon karışımı immobilize enzimden ayrılmış ve reaksiyon karışımı Nessler yöntemi ile analiz edilmiştir. İmmobilize enzim 5 ml tampon ile yıkandıktan sonra üzerine yeniden tampon ve substrat çözeltisi yüklenmiştir. Bu işlemler 20 kez tekrarlanmıştır.

3.3.6. NIT-105'in Substrat Spesifikliğinin Belirlenmesi

Substrat spesifikliğinin belirlenmesi amacı ile asit formları değerli olan benzoil syanid, 3-pridin karbonitril, ve akrilonitril kullanılmıştır (Çizelge 3.3.). Serbest ve immobilize enzimlerinin aktivite tayini substratların farklı derişimlerde (1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250 ve 500 mM) hazırlanan çözeltileri kullanılarak bölüm 3.3.3.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çİzelge 3.3. NIT-105'in substrat spesifikliğinin belirlenmesinde kullanılan nitril bileşikleri ve karşılık gelen karboksilik asit bileşikleri

Substrat	**Ürün**
 Benzoil syanid	 Benzoilformik asit
 3-piridin karbonitril	 Nikotinik asit
 Akrilonitril	 Akrilik asit

3.4. NIT-104 İmmobilizasyonu

3.4.1.NIT-104'ün İmmobilizasyonunda Kullanılacak Desteklerin Hazırlanması

Kovalent immobilizasyonda kullanılacak olan ReliZyme™ EA 403/S ve ReliZyme™ HA 403/S destekleri Alptekin ve ark., (2009) tarafından önerilen

yönteme göre glutaraldehit ile aktifleştirilmiştir. Bu amaçla ReliZyme™ EA 403/S ve ReliZyme™ HA 403/S desteklerinin 1 gramı fosfat tamponu (100 mM pH 7,0) içerisinde hazırlanmış % 2,5 glutaraldehit içeren çözelti ile muamele edilmiştir. Karışım, oda sıcaklığında 2 saat hafifçe karıştırılıp ardından fazla glutaraldehit moleküllerini uzaklaştırmak için vakum altında süzme işlemi uygulanmıştır. Glutaraldehit ile aktifleştirilmiş destekler oda sıcaklığında kurutularak immobilizasyon için uygun hale getirilmiştir.

1,2-diol fonksiyonel grubu içeren ReliZyme™ HG 403/S üzerinde reaktif serbest aldehit grupları oluşturmak için sodyum periyodatla ($NaIO_4$) yükseltgenmiştir (Binay ve ark., 2016). Yöntemde 1 g destek üzerine 25 mL $NaIO_4$ (Saf su içerisinde hazırlanmış) çözeltisi ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 2 saat yavaşça karıştırılmıştır. 2 saat sonunda destek vakum altında süzülerek oda sıcaklığında kurutulmuştur.

3.4.2. NIT-104'ün Farklı Yöntemlerle İmmobilizasyonu

NIT-104'ün immobilizasyonu literatürde belirlenen koşullara göre gerçekleştirilmiştir. ReliZyme™ HG 403/S desteklerine kovalent immobilizasyonda Binay ve ark., (2016) önerdiği yöntem ve ReliZyme™ EA 403/S ve ReliZyme™ HA 403/S desteklere enzimin immobilizasyonunda ise Bilgin ve ark., (2016) önerdiği yöntem kullanılmıştır. Yöntemde 1 g destek üzerine 5,0 mL fosfat tamponu (pH 7,0) içinde çözülmüş NIT-104 (1,75 mg protein/mL) ilave edilmiştir. Enzim-destek karışımı 2 saat 5 °C'de ve 100 rpm de çalkalayıcılı su banyosunda bekletilmiştir. Belirtilen süre sonunda immobilize nitrilaz örneklerine immobilizasyon tamponu ile süzme işlemi uygulanmış ve immobilize örnekler 4 °C'de depolanmıştır. Filtrasyon sonucu elde edilen süzüntüler toplanarak protein tayini yapılmıştır.

Montmorillonite K-10 desteğe immobilizasyonda Yıldırım ve ark., (2019) önerdiği yöntem kullanılmıştır. 1 g Montmorillonite K-10 destek üzerine NIT-104 (1,75 mg protein/mL) içeren 5 mL fosfat tamponu (100 mM pH 7,5) ilave edilmiştir. Süspansiyon 4 saat 5 °C'de ve 100 rpm'de çalkalayıcılı su banyosunda bekletilmiştir.

Daha sonra immobilize nitrilaz örnekleri sodyum fosfat tamponu (100 mM pH 7,5) ile yıkanmış ve süpernatant protein analizi için muhafaza edilmiştir. İmmobilize enzim örnekleri de kullanılıncaya kadar 4 ºC'de depolanmıştır.

NIT-104 enziminin polivinil alkol (PVA) içerisinde immobilize edilmesinde Rebros ve ark., (2007)'nın önerdiği yöntem kullanılmıştır. Yöntemde 2 mL PVA (% 10'luk) çözeltisi NIT-104 (1,75 mg protein/mL) içeren 1 mL sodyum fosfat çözeltisi (100 mM, pH 7,5) ile karıştırılmıştır.0,1 mL'lik örnekler polistiren tabakalara damlatılarak PVA jeller oluşturulmuştur. Bu işlemin ardından immobilize enzim örnekleri 24 saat 5 ºC'deki soğutmalı inkübatörde bekletilmiştir. Kurutulmuş lens şeklindeki örnekler kullanılıncaya kadar 4 º C'de depolanmıştır. Protein ve aktivite geri kazanımına NIT-104 konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacı ile farklı derişimlerde (0,44-3,5 mg/mL, pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış) enzim kullanılarak immobilizasyon gerçekleştirilmiştir.

3.4.3. NIT-104'ün Aktivitesinin Belirlenmesi

NIT-104 enziminin aktivitesinin belirlenmesi, akrilonitrilin akrilik aside hidrolizi esnasında ortaya çıkan amonyum miktarının belirlenmesi prensibine göre gerçekleştirilmiştir. Kapaklı tüp içerindeki 800 µL sodyum fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) ve 100 µL NIT-104 (1,75 mg protein/mL, 100 mM sodyum fosfat, pH 7,5) enzim karışımı 30 ºC'de 2 dakika inkübe edilmiştir. 30 ºC'de bekletilen karışım üzerine 100 µL akrilonitril çözeltisi (1 M, DMSO içerisinde hazırlanmış) ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyon ortamındaki akrilonitrilin son derişimi 100 mM olmuştur. 10 dakikalık reaksiyon süresinin sonunda enzimatik reaksiyonu durdurmak için ortama 100 µL HCl çözeltisi (1 M) ilave edilmiştir. Daha sonra oluşan amonyum miktarını belirlemek için çözeltiyi renklendirmek amacı ile 100 µL Nessler ayıracı ilave edilmiş ve 2 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Çözelti 4 mL'ye seyreltilerek oluşan renkli kompleks 480 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Kör olarak 900 µL fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) ve 100 µL akrilonitril çözeltisi (1 M, DMSO içerisinde hazırlanmış) karışımı kullanılmıştır. Bir

ünite (U) nitrilaz aktivitesi, deneysel koşullarda bir dakikada 1 µmol amonyum oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.4.4. Serbest ve İmmobilize NIT-104'ün Karakterizasyonu

NIT-104'ün PVA jel içerisinde immobilize edildiği (PVA-NIT-104) optimum koşullar belirlendikten sonra immobilize nitrilazın maksimum aktivite gösterdiği koşullar ve bu koşullardaki kinetik parametreleri belirlenmiştir.

- Serbest ve PVA-NIT-104 için optimum pH'nın belirlenmesinde pH 5,5, 6,0, (100 mM, sodyum sitrat) 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 (100 mM, sodyum fosfat) ve 8,5 (100 mM, Tris)'ta aktiviteler ölçülmüştür.
- Serbest ve PVA-NIT-104 örnekleri için optimum sıcaklığın belirlenmesi için 20, 25, 30, 35, 40 ve 50 ºC'de fosfat tamponu (100 mM, sodyum fosfat) kullanılarak nitrilaz aktivitesi ölçülmüştür.
- Serbest ve PVA-NIT-104 örneklerinin termal kararlılığının belirlenebilmesi için, immobilize nitrilazın 30 ºC ve 40 ºC'de belirli sürelerde (2, 4, 8, 16 ve 24 saat) bekletildikten sonra kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Enzim preperatlarının başlangıç aktiviteleri % 100 olarak kabul edilip, belirlenen süreler sonunda kalan aktivitelerinin miktarı başlangıçta kabul edilen aktivite oranına bağlı olarak verilmiştir. Bütün deneysel çalışmalar üç tekrarlı ve ortalama ± standart sapma olarak gerçekleştirilmiştir. birinci dereceden inaktivasyon sabiti (k_i) Sadana ve Henley (1987) tarafından önerilen doğrusal olmayan bozulma modeline göre hesaplanmıştır (Eşitlik 1).

  $\ln V = \ln Vo - k_i \times t$

  V_0: Başlangıçtaki enzim aktivitesi; V: t süre sonunda ölçülen aktivite; k_i: 1.dereceden inaktivasyon sabiti.
- Serbest ve PVA-NIT-104 örneklerinin yarı ömrü ($t_{1/2}$), aşağıdaki

matematiksel eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Eşitlik 2).

$t_{1/2} = -\ln (0,5)/k_i = 0,693/k_i$

- Kararlılık faktörü (KF) serbest ve PVA-NIT-104'ün yarılanma süresi oranı olarak hesaplanmıştır.
- Serbest ve PVA-NIT-104'ün depolama kararlılığının belirlenmesinde nitrilaz örnekleri 5 ºC ve oda sıcaklığında bekletilerek belirli aralıklarla belirli günlerde kalan aktivitesi ölçülmüştür. Depolamada serbest nitrilaz, fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış çözeltisi olarak (1,75 mg protein/mL, 100 mM, pH 7,5) PVA-NIT-104 örnekleri ise kapalı tüp içerinde tamponsuz olarak bekletilmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerinin başlangıç aktiviteler % 100 olarak belirlenmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin kalan aktiviteleri gözlenen aktivite ile başlangıç aktivitelerinin oranı olarak verilmiştir.
- Belirlenmiş optimum koşullarda (pH 7,5 ve 30 °C), 100 mM sodyum fosfat çözeltisi içinde akrilonitril, benzonitril, 3-piridinkarbonitril ve benzoil siyanür gibi çeşitli nitrillerin farklı konsantrasyonları için serbest ve PVA-NIT-104 numunelerinin başlangıç reaksiyon hızları ölçülerek serbest ve immobilize nitrilazın kinetik parametreleri (K_m *ve* V_{max}) belirlenmiştir. Maksimum aktivite (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitinin (K_m), grafiksel değerlendirilmesinde, 1/V'ye karşı 1/[S] değerlerinin sigmaPlot programıyla çizilmesi ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği kullanılmıştır.

3.4.5. Farklı Substrat Konsantrasyonlarında Zamana Bağlı Akrilonitril Hidrolizi

Serbest ve PVA-NIT-104'ün farklı substrat derişimlerinde zamana bağlı akrilonitril hidrolizi ile ilgili çalışmalar kesikli reaktörde (1,3x7,0 cm) ve belirlenen

optimum koşullarda yapılmıştır. Farklı konsantrasyon aralığında (0,1-1,0 M) hazırlanmış akrilonitril çözeltilerinin 100 µL'si, 30 °C'de 2 dakika inkübe edilmiş 800 µL nitrilaz çözeltisi (1,75 mg protein/mL, pH 7,5, 100 mM sodyum fosfat çözeltisi içinde hazırlanmış) ilave edilmesiyle reaksiyon başlatılmıştır. Farklı zaman aralıklarında reaksiyon çözeltisinden alınan 20 µL örnekler üzerine 80 µL 20 M H_2SO_4 çözeltisi ilave edilmiş ve HPLC'de analiz edilmiştir. Aynı deneysel işlemler 10 mg immobilize enzim kullanılarak da gerçekleştirilmiştir.

3.4.6. HPLC Analizleri

Reaksiyon sonucu oluşan akrilonitril, akrilik asit ve akrilamid çözeltilerinin konsantrasyonları HPLC kullanılarak belirlenmiştir. Hareketli faz olarak 1,0 mL/dk akış hızına sahip 20 mM H_2SO_4 çözeltisi kullanılmıştır. Reaksiyon ürünleri anyon dışlama kolonu (Alltech Anion Exclusion IC Col-MF, 100x7,5 mm) kullanılarak ayrılmıştır. Reaksiyon ürünlerinin belirlenmesi için ise 210 nm'de DAD dedektörle ölçüm yapılmıştır.

3.4.7. PVA-NIT-104'ün Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi

PVA-NIT-104'ün tekrar kullanım kararlılığının belirlenmesi çalışmaları kesikli reaktör kolonu (1,3x7,0 cm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.10 mg enkapsüllenmiş enzim örnekleri fosfat tamponu (100mM, pH 7,5) içerisinde 5 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyon DMSO içerinde hazırlanmış 100 µL 1M akrilonitril ilavesiyle başlatılmıştır. Böylece reaksiyon ortamında akrilonitrilin derişimi 100 mM olmuştur. 1 saat sonunda reaksiyon karışımı süzülmüş ve süzüntüyü asitlendirmek için 100 µL 1M HCl ilave edilmiştir. Bu çözeltiden 20 µL alınıp üzerine 80 µL 20 mM H_2SO_4 ilave edilmiş ve HPLC'de analiz edilmiştir. Her bir döngüde immobilize nitrilaz örnekleri fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5) ile yıkanmıştır. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde hesaplanmıştır.

3.5. NIT-P-118 İmmobilizasyonu

3.5.1. P Serisi Nitrilazların (R,S)-Mandelonitrile Karşı Aktivitelerinin Belirlenmesi

Rekombine olarak üretilen P serisi 6 adet nitrilaz enzimlerinin (NIT-P1-118, NIT-P1-120, NIT-P1-121, NIT-P1-122, NIT-P1-126 ve NIT-P1-130) aktivitesi (R,S)-mandelonitrile karşı belirlenmiş ve HPLC'de analiz edilmiştir. Enzimlerden 50 µL (2 mg protein/mL) alınıp üzerlerine 850 µL fosfat tamponu (pH 7,5 50 mM) ilave edilmiştir. 5 dk inkübasyon işleminden sonra, reaksiyonu başlatmak için ortama 100 µL 50 mM (R,S)-mandelonitril ilave edilmiştir. 2 saat sonra enzimatik reaksiyonu durdurmak için ortama 100 µL derişik HCl ilave edilmiş ve oluşan reaksiyon ürünleri 1 mL TBME ile ekstrakte edilmiştir. Reaksiyon karışımlarından alınan örnekler HPLC'de analiz edilmişlerdir.

3.5.2. HPLC Analizleri

P serisi enzimlerinin aktivitelerinin belirlenmesi deneyinde oluşan reaksiyon ürünlerinin analizi bölüm 3.2.3'de belirtilen koşullarda HPLC'de analiz edilmiştir. Serbest ve immobilize NIT-P1-118 enzimlerinin karakterizasyonunda ise bölüm 3.4.6'da belirtilen HPLC şartlarında analiz yapılmıştır.

3.5.3. NIT-P1-118 Aktivite Tayini

Serbest NIT-P-118 enziminin 100 µL (2 mg/mL) veya 10 mg immobilize enzim alınıp üzerine 800 µL fosfat tamponu (pH 7,5) ilave edilmiştir. 5 dk inkübasyon işleminden sonra, reaksiyonu başlatmak için ortama 100 µL 50 mM (R,S)-mandelonitril ilave edilmiştir. 15 dakika sonra enzimatik reaksiyonu durdurmak için ortama 100 µL derişik HCl ilave edilmiş ve reaksiyon karışımlarından alınan örnekler HPLC ile bölüm 3.4.6'da anlatıldığı şekilde analiz edilmişlerdir. Bir ünite (U) nitrilaz aktivitesi, deneysel koşullarda bir dakikada 1 µmol mandelik asit oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.5.4. NIT-P1-118'in Farklı Yöntemlerle İmmobilizasyonu

NIT-P1-118 enzimi farklı yöntemler kullanılarak immobilize edilmiştir. Kapsülasyon yönteminden sodyum alginat, PVA ve $CaCO_3$ mikroküre kullanılarak üç farklı yöntemle enzim immobilize edilmiştir.

NIT-P1-118 enziminin PVA içerisinde immobilizasyonunda % 10'luk (pH 7,5 50 mM fosfat tamponunda hazırlanmış) polivinil alkol çözeltisi kullanılmıştır.1,0 mL polivinil alkol çözeltisi üzerine 1,0 mL derişimi 2,0 mg/mL NIT-106 olan enzim ilave edilip homejen çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltilerden 100 µL'lik kısımlar halinde mikropipet yardımıyla jeller oluşturulmuştur. Oluşturulan jeller daha sonra 4 °C'deki inkübatörde 10 saat kurutulduktan sonra aktivite tayini için kullanılmıştır.

İmmobilizasyonda kullanılan enzim miktarının aktiviteye olan etkisinin belirlenmesi için farklı derişimlerde NIT-P1-118 (0,25, 0,5, 1, 2 ve 4 mg/mL) enzimi kullanılarak immobilizasyon deneyleri yapılmış ve optimum enzim derişimi belirlenmiştir.

Alginat immobilizasyonu yönteminde Özyılmaz ve Gezer (2010) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. pH 7,5 Tris-HCl tamponu içerinde hazırlanmış 4 mg NIT-P1-118 içeren % 2,5'luk alginat çözeltisinin 4 mL'si bir şırınga yardımı ile 100 mL % 4'lük $CaCl_2$ çözeltisi üzerine damla damla ilave edilmiştir. Oluşan alginat boncukları saf su ile yıkanmış ve yıkama suyu toplanarak süzüntüdeki protein miktarı belirlenmiştir. Elde edilen alginat boncukları aktivitesi belirlenene kadar 5 °C'de pH 7,5 Tris-HCl (50 mM) tampon içerisinde bekletilmiştir.

İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu çalışmalarında sodyum alginat ve kalsiyum klorür çözeltilerinin farklı derişimlerde hazırlanan çözeltileri kullanılmıştır. Bu amaçla alginat konsantrasyonu % 1; 2; 2,5; 3 ve 4 olacak şekilde immobilizasyon gerçekleştirilmiş ve optimum alginat konsantrasyonu belirlenmiştir. Alginat konsantrasyonunun optimum değeri bulunduktan sonra $CaCl_2$ konsantrasyonu % 1; 2; 2,5; 3; 4 ve 5 olacak şekilde yapılan deneysel çalışmalar sonucunda optimum $CaCl_2$ konsantrasyonu da belirlenmiştir.

Enzim miktarının immobilize enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacı ile optimum koşullarda farklı miktarlarda (0,5, 1, 1,5, 2, ve 2,5 mg) NIT-P1-118 enzimi kullanılarak immobilizasyon gerçekleştirilmiş ve optimum enzim miktarı belirlenmiştir.

Kapsülleme yöntemi olarak Cui ve ark., (2017) önerdiği yöntem kullanılmıştır. Yöntemde 1 mL 0,3 M $CaCl_2$ çözeltisi ile 1 mL NIT-P1-118 (2 mg/mL) nitrilaz enzimi homojen bir hal alıncaya kadar karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışımın üzerine 1mL 0,3 M Na_2CO_3 çözeltisi damla damla ilave edilmiştir. Na_2CO_3 ilavesinin ardından karışım üzerine 0,2 ml 0,1 M CTAB ilave edilip 40 ^oC'deki su banyosu üzerine alınmış ve 1 dakika su banyosu üzerinde bekletildikten sonra üzerine 0,2 mL TMOS ilave edilmiştir. Su banyosunda 2 dakika daha bekledikten sonra partiküller oluşmuştur. Oluşan partiküller 3 saat 5 ^oC'de bekletilmiş ve daha sonra saf su ve tampon ile yıkanarak süzüntüde protein tayini yapılmıştır.

3.5.5. Serbest ve İmmobilize NIT-P1-118 Enzimlerinin Karakterizasyonu

NIT-P1-118 enziminin PVA (PVA-NIT-P1-118) ve sodyum alginat (ALG-NIT-P1-118) içesinde immobilize edildiği optimum koşullar belirlendikten sonra immobilize nitrilazın maksimum aktivite gösterdiği koşullar ve bu koşullardaki kinetik parametreleri belirlenmiştir.

- Serbest ve immobilize nitrilazlar için optimum pH'nın belirlenmesinde pH 5,0, 6,0, (100 mM, sodyum sitrat) 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 (100 mM, sodyum fosfat), 8,5 (100 mM, Tris), 9,0, 10,0 (100 mM, borat)'da aktiviteler ölçülmüştür.
- Serbest ve immobilize nitrilaz örnekleri için optimum sıcaklığın belirlenmesi için 20, 25, 30, 35, 40 ve 50 ^oC'de fosfat tamponu (100 mM, pH 7,5, sodyum fosfat) kullanılarak nitrilaz aktivitesi ölçülmüştür.
- Serbest ve immobilize nitrilaz örneklerinin termal kararlılığının belirlenebilmesi için, immobilize nitrilazın maksimum aktivete

gösterdikleri sıcaklıkta (30 ºC ve 45 ºC'de) belirli sürelerde (2, 4, 6, 8, 16 ve 24 saat) bekletildikten sonra kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Enzim preperatlarının başlangıç aktiviteleri % 100 olarak kabul edilip, belirlenen süreler sonunda kalan aktivitelerinin miktarı başlangıçta kabul edilen aktivite oranına bağlı olarak verilmiştir. Bütün deneysel çalışmalar üç tekrarlı ve ortalama ± standart sapma olarak gerçekleştirilmiştir.

- Serbest ve immobilize nitrilaz örneklerinin yarı ömrü ($t_{1/2}$), bölüm 3.4.4'de anlatıldığı şekilde hesaplanmıştır.
- Kararlılık faktörü (KF) serbest ve immobilize enzimin yarılanma süresi oranı olarak hesaplanmıştır.
- Serbest ve immobilize nitrilazların depolama kararlılığının belirlenmesinde nitrilaz örnekleri 5 ºC ve oda sıcaklığında bekletilerek belirli aralıklarla belirli günlerde kalan aktivitesi ölçülmüştür. Depolamada serbest nitrilaz, fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış çözeltisi olarak (2,0 mg/mL, 100 mM, pH 7,5) immobilize nitrilaz örnekleri ise kapalı tüp içerinde alginat örnekleri tampon içerisinde (100 mM pH 7,5), immobilize PVA örnekleri ise tamponsuz olarak bekletilmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerinin başlangıç aktiviteleri % 100 olarak belirlenmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin kalan aktiviteleri, gözlenen aktivite ile başlangıç aktivitelerinin oranı olarak verilmiştir.
- Belirlenmiş optimum koşullarda (pH 7,5 ve 30 ºC), 100 mM sodyum Tris-HCl içinde R-S-Mandelonitrilin farklı konsantrasyonları için serbest ve immobilize nitrilaz numunelerinin başlangıç reaksiyon hızları ölçülerek serbest ve immobilize nitrilazın kinetik parametreleri (K_m ve V_{max}) belirlenmiştir. Maksimum aktivite (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitinin (K_m), grafiksel değerlendirilmesinde, 1/V'ye karşı

1/[S] değerlerinin çizilmesi ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği kullanılmıştır.

3.5.6. İmmobilize Nıt-P1-118 Enzimlerinin Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi

PVA-NIT-P1-118 ve ALG-NIT-P1-118'in tekrar kullanımı ile ilgili çalışmalar kesikli reaktörde (1,1x5 cm) ve belirlenen optimum koşullarda yapılmıştır. 50 mg immobilize NIT-P1-118 enzimi üzerine 900 µL Tris-HCl tamponu (pH 7,5) 100 µL 500 mM (R,S)-mandelonitril substrat çözeltisi ilave edilmiştir. 15 dakika sonra kolon musluğu açılarak reaksiyon karışımı immobilize enzimden ayrılmış ve reaksiyon karışımı HPLC'de bölüm 3.5.2.'de belirtildiği şekilde analiz edilmiştir. İmmobilize enzim 5 ml tampon ile yıkandıktan sonra üzerine yeniden tampon ve substrat çözeltisi yüklenmiştir. Bu işlemler 20 kez tekrarlanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

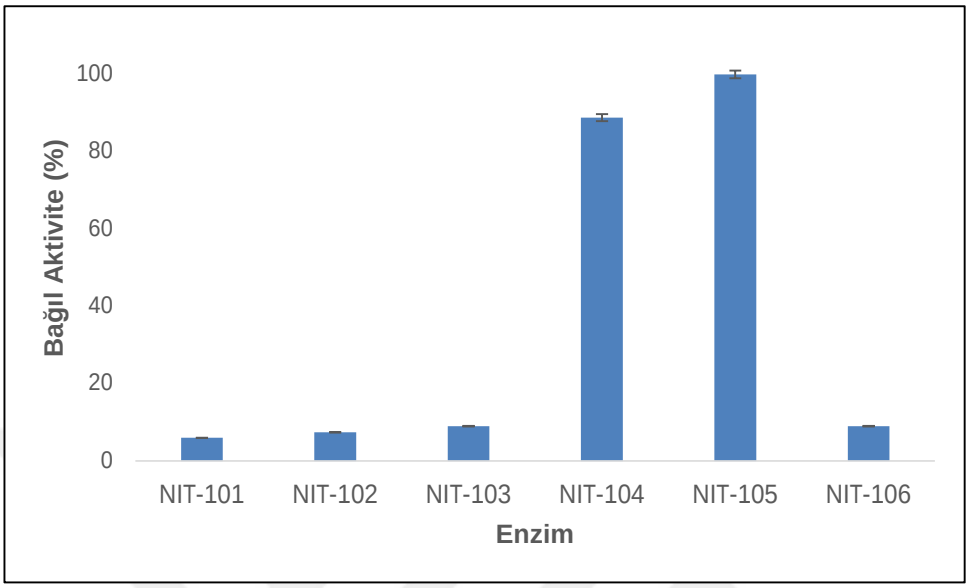
Bu tez çalışmasında kit halinde satılan rekombine olarak üretilmiş 6 farklı nitrilazın (CODEXIS®, NIT-101, NIT-102, NIT-103, NIT-104, NIT-105 ve NIT-106) benzonitrile ve (R,S)-mandelonitrile karşı aktiviteleri ölçülmüştür. (R,S)-mandelonitrile karşı en yüksek aktivite gösteren enzim kaynağı R-mandelik asit elde edilmesi amacıyla farklı yöntemlerle immobilize edilmiştir. Ayrıca akrilonitrile karşı aktivitesi yüksek olan NIT-104 enzimi, benzonitrile karşı yüksek aktivite gösteren NIT-105 enzimi ve P serisi enzimlerden (R,S)-mandelonitrile karşı yüksek aktivite gösteren NIT-P1-118 enzimi farklı yöntemlerle immobilize edilip karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.1.1. HPLC Analizleri

Nucleocel Delta S chiral HPLC kolonu kullanılarak yapılan analiz sonucunda R-Mandelik asit, S-Mandelik asit, R-Mandelonitril, (S)-Mandelonitril, (R)-mandelamid ve (S)-mandelamid bileşiklerinin alıkonma zamanları sırasıyla 43, 37, 18, 16, 56 ve 46 dk olarak bulunmuştur.

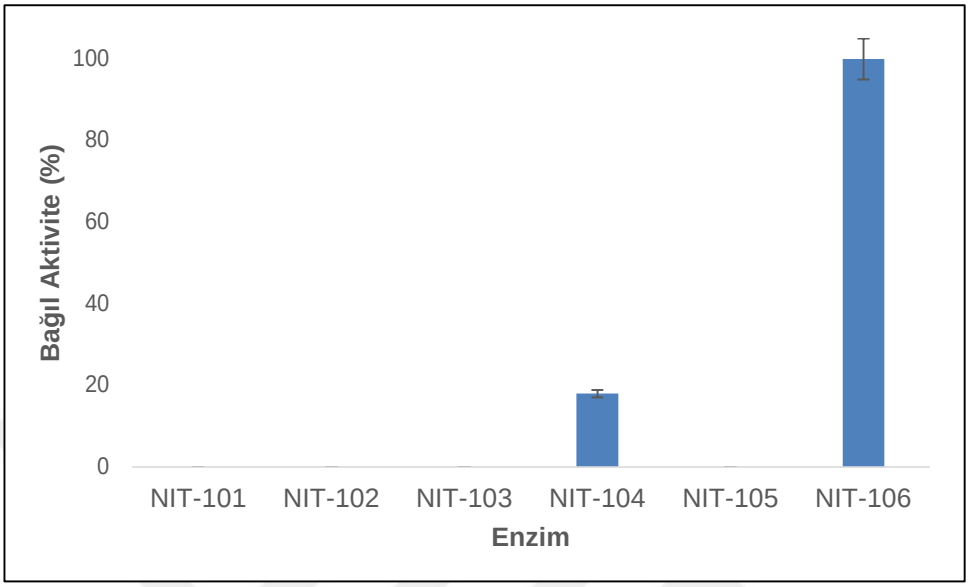
4.1.2. Nitrilaz Enzimlerinin Benzonitril ve (R,S)-mandelonitrile Karşı Aktivitesinin Belirlenmesi

Substrat olarak benzonitril ve (R,S)-mandelonitril kullanıldığında elde edilen aktivite değerleri sırasıyla Şekil 4.1. ve şekil 4.2.'de verilmiştir. Substrat olarak benzonitril kullanıldığında spektrofotometrik ölçüm yöntemi sonrasında hesaplanan aktivite değerleri Şekil 4.1'de verilmiştir. Şekil 4.1.'den de görüldüğü gibi NIT-104 ve NIT-105'in aktivitesi oldukça yüksek ve birbirine yakın olmakla beraber benzonitrile karşı en yüksek aktivitesine sahip olan enzim NIT-105 olarak bulunmuştur. Benzonitrile karşı aktivitesi en düşük olan enzim ise NIT-101 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1. Nitrilaz enzimlerinin benzonitrile karşı bağıl aktivite değerleri

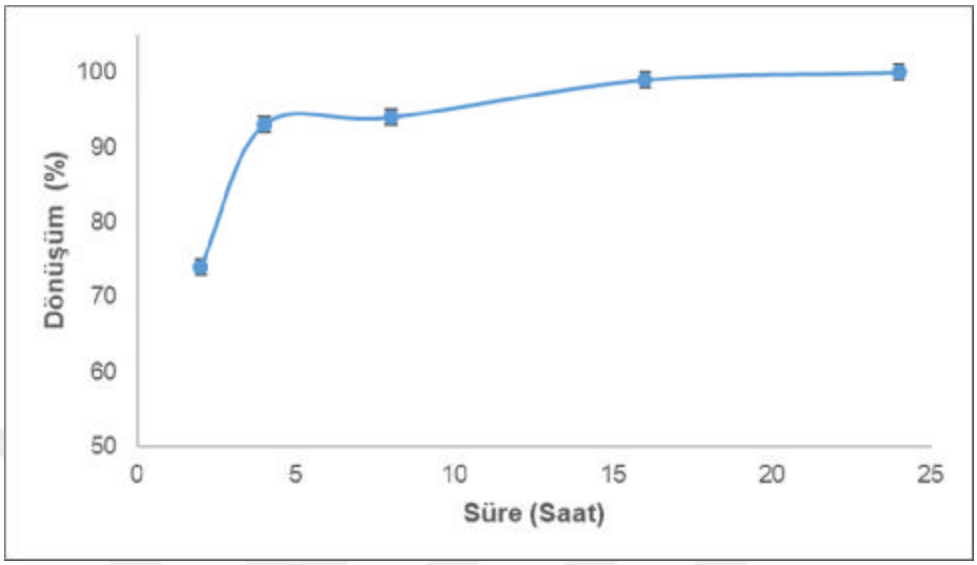
Substrat olarak (R,S)-mandelonitril kullanıldığında HPLC ile yapılan ölçüm sonuçlarından hesaplanan aktivite değerleri Şekil 4.2'de verilmiştir. Şekil 4.2'den de görüldüğü gibi NIT-101, NIT-102, NIT-103, NIT-104, NIT-105 ve NIT-106'nın (R,S)-mandelonitrile karşı aktivite değerleri karşılaştırıldığında spesifik aktivitesi en yüksek olan enzimin aktivitesi % 100 olarak kabul edilmiştir. Analiz sonucunda en yüksek (R)-mandelik asit veriminin NIT-106'nın kullanıldığı reaksiyonda elde edildiği belirlenmiştir. NIT-101, NIT-102, NIT-103 ve NIT-105 enzimlerinin (R,S)-mandelonitrile karşı aktivitelerinin olmadığı belirlenmiştir. NIT-104'ün bağıl aktivitesinin NIT-106'ya göre oldukça düşük (% 19) olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle daha sonraki çalışmalarda yapılacak (R)-mandelik asit sentezlerinde NIT-106 enzimi kullanılmıştır.



Şekil 4.2. Nitrilaz enzimlerinin (R,S)-Mandelonitrile karşı bağıl aktivite değerleri

Substrat olarak doğrudan (R,S)-mandelonitril kullanmak yerine daha yaygın olarak bulunan benzaldehit kullanılarak da aktivite tayini yapılmıştır. Reaksiyon ortamına benzaldehit ile birlikte mandelonitril oluşturmak üzere KCN ve asetosiyanohidrin ayrı ayrı ilave edilerek aktivite tayini yapılmıştır. NIT-106 enziminin reaksiyon ortamında oluşan mandelonitrili mandelik asite dönüştürdüğü belirlenmiştir. 24 saat'lik reaksiyon süresinin ardından KCN ve asetosiyanohidrin kullanılarak yapılan çalışmada substratın tamamının ürüne dönüştüğü belirlenmiştir.

NIT-106 enzimi kullanılarak zamana bağlı mandelik asit sentez veriminin belirlenmesi deneyleri gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında reaksiyon ortamından alınan örnekler HPLC'de analiz edilmiş ve oluşan (R)-mandelik asit miktarından reaksiyonun verimi hesaplanmıştır (Şekil 4.3). 50 mM (R,S)-mandelonitril kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada 4 saat sonunda reaksiyon veriminin yaklaşık % 93 ve enantiyomerik aşırılık (ee) değerinin >99 olduğu belirlenmiştir.

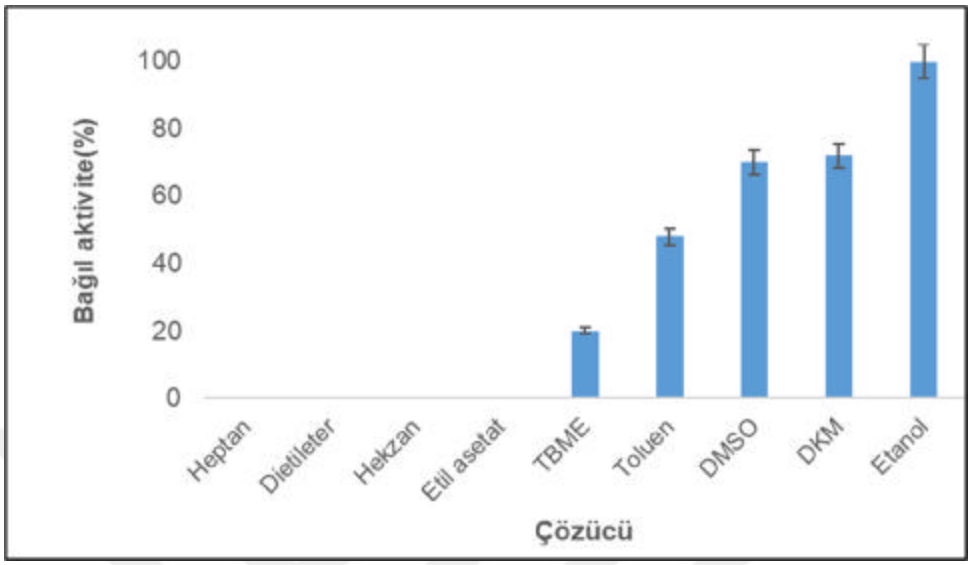


Şekil 4.3. NIT-106 katalizli zamana bağlı mandelik asit sentezi

Substrat miktarının NIT-106 enzim aktivitesi üzerine etkisi ile ilgili yapılan deneysel çalışmalar sonucunda 250 mM (R,S)-mandelonitril derişimine kadar NIT-106'nın aktivitesinde düşüş gözlenmeden 24 saat sonunda dönüşümün % 100 olduğu belirlenmiştir. 500 mM (R,S)-mandelonitril kullanımında ise 24 saat sonunda dönüşüm % 48 olarak belirlenmiştir.

4.1.3. NIT-106 Aktivitesi Üzerine Çözücülerin Etkisi

Substrat örneği polariteleri farklı olan çözücülerde çözülerek NIT-106 enziminin aktivitesi üzerine çözücülerin etkisi incelenmiştir. Çözücülerin reaksiyon ortamında hacimsel oranının % 10 olduğu şartlarda en yüksek aktivite değerine etanol kullanılarak ulaşılmıştır. Heptan, dietileter, hekzan ve etil asetatta ise hiçbir aktivite gözlenmemiştir. DMSO ve DKM çözücülerinin aktivite üzerine etkisi benzer oranda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. NIT-106 aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi

4.1.4. NIT-106'nın İmmobilizasyonu

4.1.4.1. Kovalent Bağlanma ile İmmobilizasyon

Aktifleştirilmiş silika nanopartiküller (nano-GLU ve nano-ECH) ile yapılan kovalent immobilizasyondan sonra NIT-106 enziminin her iki desteğe bağlanma oranları % 62 olarak belirlenmiştir. İmmobilizasyon sonucu elde edilen enzim preperatları ile yapılan aktivite tayini sonucu aktivite gözlenmemiştir. Benzer şekilde aktifleştirilmiş Florisil® destekler (Flo-GLU ve Flo-ECH) ile yapılan immobilizasyondan sonra elde edilen enzim preperatlarında da aktivite gözlenmemiştir. NIT-106 enziminin Florisil® desteklere bağlanma oranları ise Flo-GLU destek için % 42 ve Flo-ECH destekler için % 90 olarak belirlenmiştir.

NIT-106 enziminin ReliZyme™ destekler (HA 403/S, EA 403/S, EP 403/S ve HG 403/S) üzerine immobilize edilmesinin ardından yapılan aktivite tayini sonucu immobilize enzimlerde oldukça düşük aktivite gözlenmiştir. Gram destek başına farklı miktarlarda (3, 4, 6 ve 9 mg) NIT-106 kullanılarak yapılan immobilizasyonda, enzimimin desteklere bağlanma oranı her destekte ve bütün derişimlerde % 100 olarak belirlenmiştir. ReliZyme™ desteklerin protein bağlama kapasitesinin nano silika ve Florisil® desteklerden oldukça yüksek olduğu

gözlenmiştir.

Sekiz farklı destekle yapılan kovalent immobilizasyon sonucu elde edilen immobilize enzim örneklerinde oldukça düşük aktivite gözlendiğinden dolayı sonraki deneysel aşamalarda bu desteklerden yararlanılmamıştır.

4.1.4.2. Sol-jel Oluşturarak İmmobilizasyon

Literatür araştırmalarında sol-jel hazırlanmasında farklı silan bileşikleri ve reaktiflerinin kullanıldığı belirlenmiştir. NIT-106 enziminin sol-jel immobilizasyonunda bu yöntemlerden 3 tanesi kullanılarak enzimin immobilize edilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sachdeva (2011)'nın önerdiği yöntemle yapılan immobilizasyon sonucu immobilize enzim örneklerinde aktivite gözlenemediğinden dolayı, yöntem değişikliğine gidilerek Reetz ve ark., (1996) ve Weetall (1996)'ın önerdiği yöntemler kullanılmıştır. Sol-jel elde edilmesinde katalizör olarak farklı kimyasallar kullanılmaktadır. Sachdeva (2011)'nın önerdiği yöntemdeki asit katalizörlü jelleşme yerine diğer iki yöntemde katalizör olarak borat ve NaF kullanılmıştır. Bu üç farklı şekilde elde edilen immobilizasyon süzüntülerinde yapılan protein tayini sonucunda immobilizasyon verimi her üç yöntem için % 75 olarak hesaplanmıştır. Fakat yapılan aktivite tayini sonucu, üç yöntemle de elde edilen immobilize enzimlerde aktivite gözlenmemiştir.

4.1.4.3. Alginat Jel Oluşturarak İmmobilizasyon

NIT-106'nın alginat jel içerisinde immobilizasyonunun ardından (R,S)-mandelonitrile karşı yapılan aktivite tayini sonucu enzim örneklerinde tekrarlanabilir sonuçlar elde edilememiştir. İmmobilizasyonda farklı derişimlerde (1, 2, 2,5, 4 ve 5 mg/ml) NIT-106 kullanılarak immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Ancak bütün derişimlerden elde edilen enzim preperatlarındaki aktivite değerlerinin tekrarlanabilir sonuçlar olmadığı belirlenmiştir. Bu enzim derişimlerdeki protein kapsüllenme verimi sırasıyla % 61, % 100, % 78, % 76 ve % 78 olarak hesaplanmıştır.

4.1.4.4. Protein Kaplı Mikro Kristal (PCMC) Oluşturarark İmmobilizasyon

NIT-106 enzimi kullanılarak elde edilen PCMC örneklerinde yapılan aktivite tayini sonucunda, farklı reaksiyon süreleri sonunda elde edilen ekstraktlarda yapılan (R)-mandelik asit analizi sonucunda NIT-106'nın immobilizasyonun ardından aktivitesinin tamamını kaybettiği belirlenmiştir.

4.1.4.5. Polivinil Alkol (PVA) Jel Oluşturarak İmmobilizasyon

NIT-106 PVA jel örneklerinde yapılan aktivite tayinlerinde tekrarlanabilir sonuçlar elde edilememiştir.

4.1.4.6. Çapraz Bağlı Enzim Agregatları (CLEA) Oluşturarak İmmobilizasyon

NIT-106'nın Yu ve ark., (2006)'nın önerdiği yönteme göre yapılan CLEA oluşturarak immobilize edilmesi çalışmalarında aktif enzim preperatları elde edilememiştir. Enzimin yapısında bulunan amino grubu sayısını artırmak için enzime bölüm 3.2.13'de belirtildiği şekilde kimyasal aminasyon işlemi uygulanarak enzimin yüzeyindeki amino gruplarını sayısını artırmak için karboksil gruplarını amino grubuna dönüştürme uygulaması yapılmıştır. Kimyasal aminasyon uygulanmış enziminin CLEA oluşturarak immobilize edilmesi çalışmasının ardından da aktif enzim preperatları elde edilememiştir.

4.1.5. NIT-105 İmmobilizasyonu

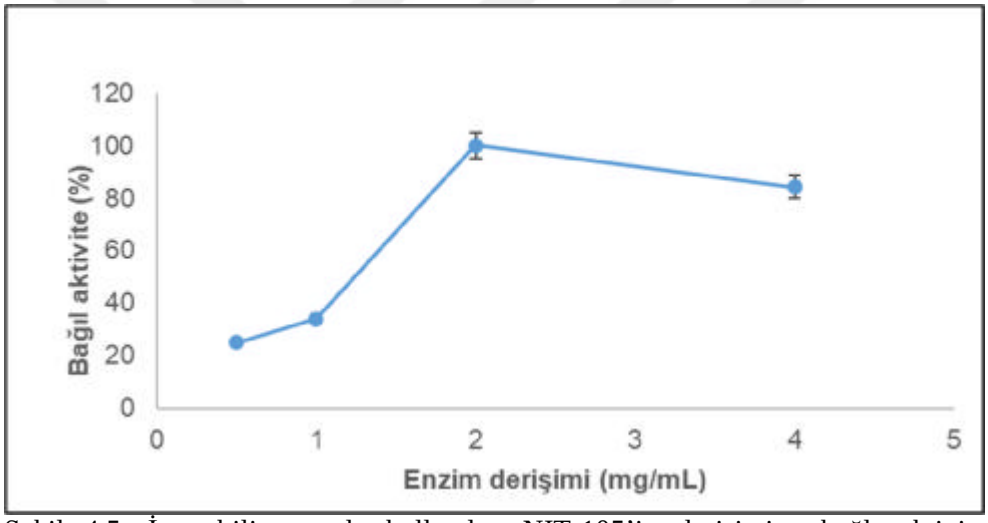
4.1.5.1. Adsorbsiyon ile İmmobilizasyon

NIT-105 enziminin adsorbsiyon yöntemi ile Lifetech™ ECR1090M ve Lifetech™ ECR1030M desteklere immobilizasyonunda farklı derişimlerde (0,4, 0,8 ve 1,2 mg) enzim kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyondan sonra süzüntüde protein tayinleri yapılmış ve immobilizasyon verimi hesaplanmıştır. Yapılan protein tayinleri sonucu her iki destekte ve farklı NIT-105 miktarları ile yapılan immobilizasyonda desteklere NIT-105 enziminin bağlanmadığı tespit

edilmiştir. Desteklere protein bağlanmadığından dolayı immobilize desteklerde aktivite tayini yapılamamıştır. Bundan dolayı süzüntüde aktivite tayini yapılmış ve serbest enzimin aktivitesinin tamamının süzüntüde olduğu tespit edilmiştir.

4.1.5.2. Polivinil Alkol (PVA) Jel Oluşturarak İmmobilizasyon

PVA içerisinde immobilize edilen NIT-105 (PVA-NIT-105) enziminin aktivitesinin enzim derişimine bağlı olarak değişimi Şekil 4.5'de verilmiştir. İmmobilizasyon verimi her enzim derişimi için % 100 olarak belirlenmiştir. En uygun enzim derişimi 2 mg/mL olarak belirlenmiştir.



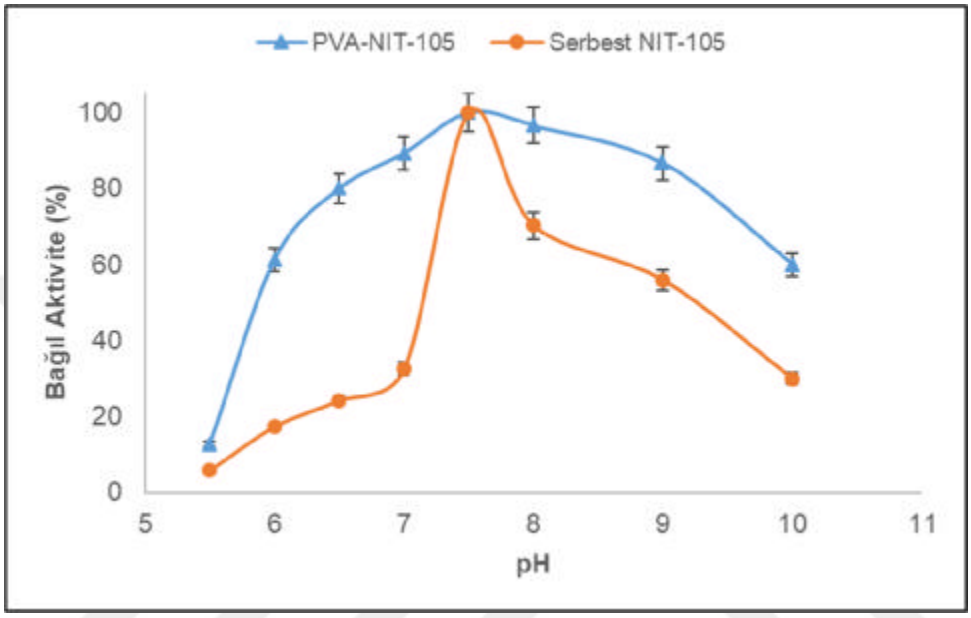
Şekil 4.5. İmmobilizasyonda kullanılan NIT-105'in derişimine bağlı aktivite değişimi

4.1.5.3. Serbest ve PVA-NIT-105'in Aktivitesine pH ve Sıcaklığın Etkisi

Serbest ve PVA-NIT-105 enzimlerinin optimum pH'sının belirlenmesinde pH'sı 5,5 ile 10,0 arasında değişen 50 mM farklı tampon çözeltileri (5,5, asetat, 6,0 sitrat, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 fosfat, 9,0, 10,0 borat) kullanılmış ve sonuçlar Şekil 4.6.'da verilmiştir.

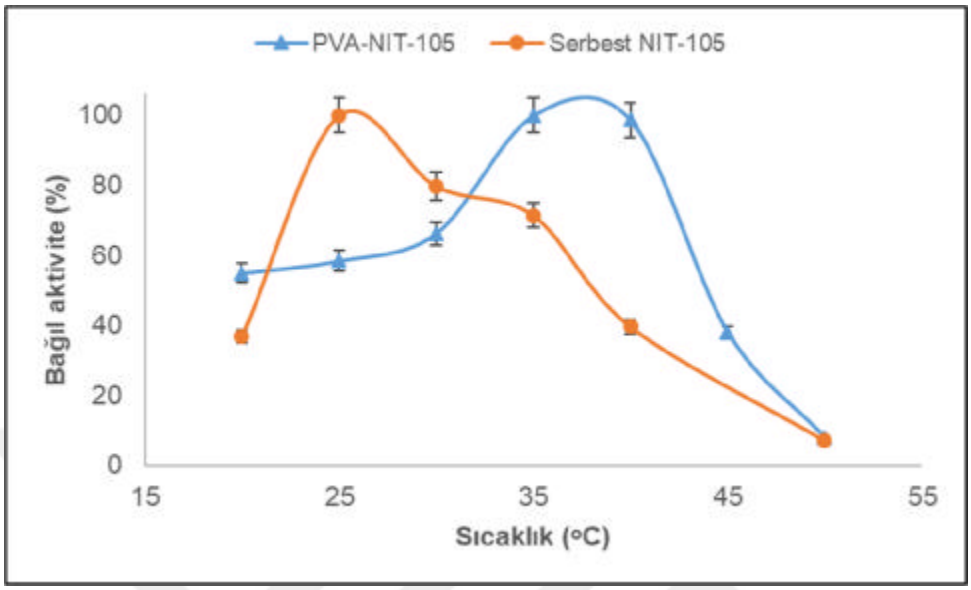
Şekil 4.6'da görüldüğü gibi serbest ve PVA-NIT-105 enzimleri için optimum pH 7,5 olarak belirlenmiştir. PVA-NIT-105'in daha geniş bir pH aralığında

(pH 6,5-9,0) maksimum aktivite gösterdiği halde serbest NIT-105 enziminin daha dar bir pH aralığında (pH 7,5-8,0) yüksek aktivite göstermiştir.



Şekil 4.6. Serbest ve NIT-105-PVA-jel'in aktivitesinin pH'ya bağlı değişimi

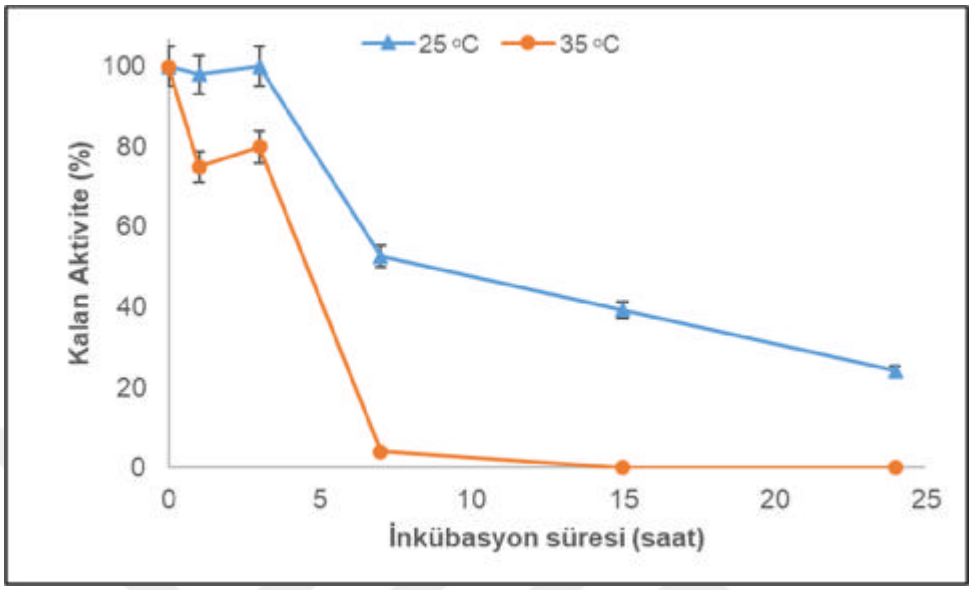
Serbest ve PVA-NIT-105 için belirlenen optimum pH'da farklı sıcaklıklarda (20-50 °C) aktiviteleri Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Serbest NIT-105 enziminin optimum çalışma sıcaklığı 25 °C olarak olarak belirlenmiştir PVA-NIT-105'in optimum sıcaklığı 35 °C olarak belirlenmiştir. PVA-NIT-105'in 20-30 °C ve 35-40 °C aralığında aktivitesinde değişim olmadığı ve 40 °C'den sonra ise enzimin aktivitesinde hızlı bir düşüş yaşandığı gözlenmiştir.



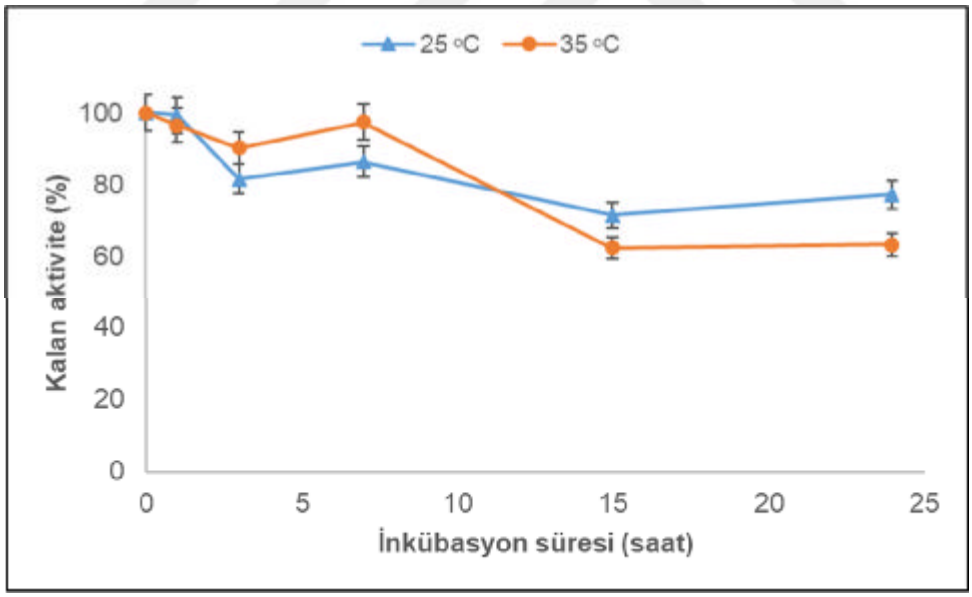
Şekil 4.7. Serbest ve PVA-NIT-105'in aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi

4.1.5.4. Serbest ve PVA-NIT-105'in Termal Kararlılığı

Serbest ve PVA-NIT-105'in termal kararlılığının belirlenmesi için hazırlanmış enzim örnekleri 25 ve 35 °C'de 24 saat boyunca bekletilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (1, 2, 4, 6, 15 ve 24 saat) serbest ve immobilize enzimlerden örnekler alınarak belirlenen optimum koşullarda kalan aktiviteler belirlenmiştir (Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.). Serbest enzim 35 °C'de 15 saat sonunda aktivitesini tamamen kaybederken 25 °C'de 24 saat sonunda aktivitesinin yaklaşık % 25'ini koruduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8). PVA-NIT-105 ise 25 ve 35 °C'de 24 saatlik bekletilme sonucu başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 77 ve % 63'ünü koruduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9). Serbest NIT 105'in 25 ve 35 °C'deki termal kararlılık çalışmasındaki yarılanma süresi ($t_{1/2}$) 10,34 ve 1,97 saat olarak belirlenirken immobilize enzimin aynı sıcaklıklardaki yarılanma süreleri ise sırasıyla 27,39 ve 21,24 saat olarak belirlenmiştir. Sonuçlar dikkate alındığında immobilizasyonla enzimin termal kararlılığının arttığı belirlenmiştir.



Şekil 4.8. Serbest NIT-105'in 25 ve 35 °C'de bekletilme süresine bağlı aktivite değişimi

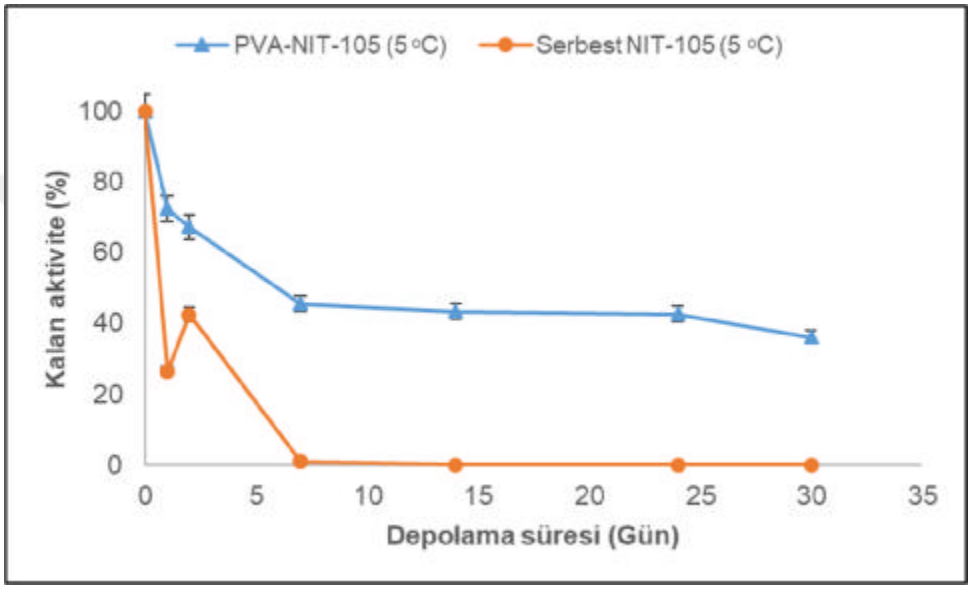


Şekil 4.9. PVA-NIT-105'in 25 ve 35 °C'de bekletilme süresine bağlı aktivite değişimi

4.1.5.5. Serbest ve PVA-NIT-105'in Depolama Kararlılığı

Serbest ve PVA-NIT-105 enzimlerinin depolama kararlılıklarının belirlenmesi için 5 °C sıcaklığında bekletilmiş örneklerden belirli gün aralıklarında

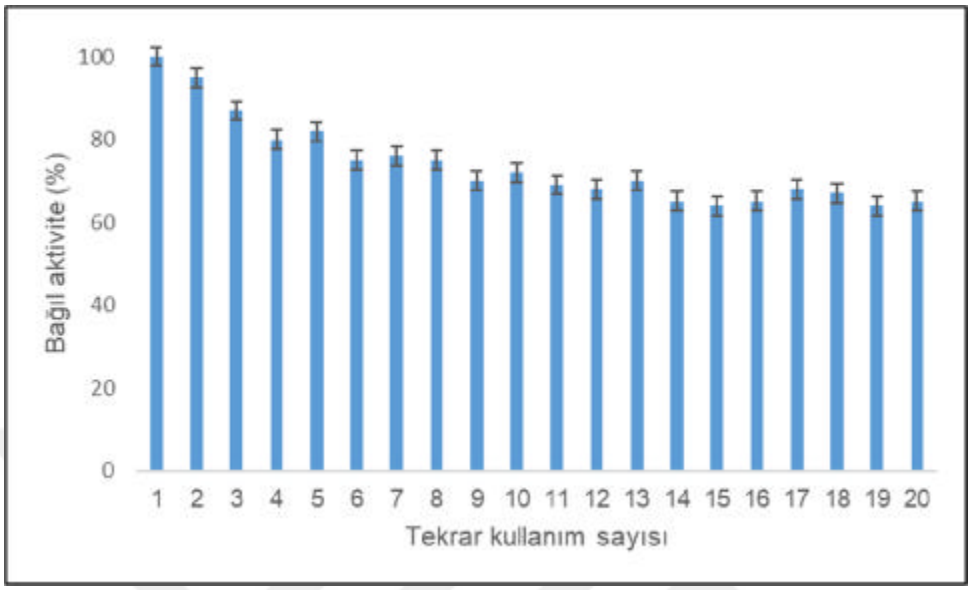
alınan örneklerde aktivite tayini yapılmıştır (Şekil 4.10). Örneklerde yapılan aktivite tayini sonucu serbest enzim örneklerindeki 6. gün sonunda aktivite gözlenemezken, PVA-NIT-105 örneklerindeki aktivite ise 30 günün sonunda başlangıç aktivitesinin % 40'ını koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Serbest ve PVA-NIT-105'in 5 °C'deki depolama süresine bağlı aktivite değişimi

4.1.5.6. PVA-NIT-105'in Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi

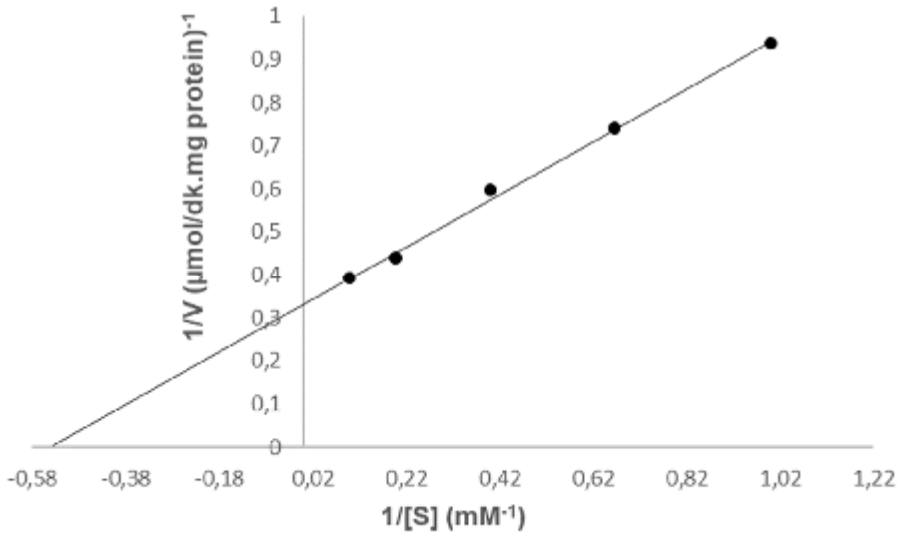
PVA jel yöntemi ile immobilize edilen NIT-105 için tekrar kullanım kararlılığı Şekil 4.11'de gösterilmiştir. 20 kez kesikli reaktörde kullanım sonunda immobilize NIT-105 PVA jel enziminin başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 65'ini koruduğu belirlenmiştir.



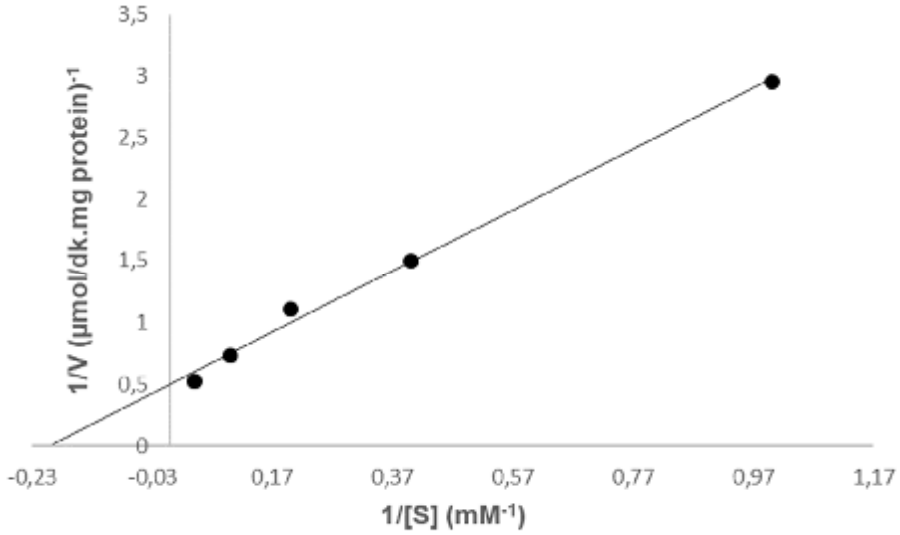
Şekil 4.11. PVA-NIT-105 örneğinin kesikli reaktörde tekrar kullanımına bağlı olarak aktivitesindeki değişim

4.1.5.6. Serbest ve PVA-NIT-105'in Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Serbest ve PVA-NIT-105 örneklerinin benzonitrilin farklı derişimlerde hazırlanan çözeltilerine karşı aktiviteleri belirlenmiş ve Lineweaver-Burk grafikleri verilmiştir (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13). Serbest NIT-105 enzimi için benzonitrile karşı K_m değeri 1,85 mM ve V_{max} değeri 3,02 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. PVA-NIT-105 için ise *Km* değeri 4,9 mM ve V_{max} değeri de 2,0 U/mg protein olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.12.Serbest NIT-105'in benzonitril için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.13. PVA-NIT-105'in benzonitril için Lineweaver-Burk grafiği

4.1.6. NIT-104 İmmobilizasyonu

4.1.6.1.NIT-104'ün Farklı Yöntemlerle İmmobilizasyonu

NIT-104 enzimi farklı yöntemlerle immobilize edilmiş ve en uygun immobilizasyon yönteminin belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. NIT-104'ün immobilizasyon sonrasında her bir immobilizasyon yöntemi için, protein geri kazanımları ve aktivite geri kazanım değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Kovalent immobilizasyonda kullanılan desteklerin fonksiyonel grupları, partikül boyutları ve içerdiği amino grubu içeriği Çizelge 4.2'de verilmiştir. Kovalent immobilizasyon yöntemlerininde protein bağlanma oranları yüksek olmasına rağmen immobilize enzimlerde çok düşük aktivite gözlenmiştir. Benzer şekilde adsobsiyon yöntemi sonucu elde edilen immobilize enzimlerin de aktivitesinin oldukça düşük bir düzeyde olduğu belirlenmiştir. Bundan dolayı en uygun immobilizasyon yöntemi PVA jel yöntemi olarak belirlenmiş ve sonraki deneysel aşamalarda immobilize PVA jel örnekleri kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. Farklı yöntemlerle immobilize edilen NIT-104 örneklerinin protein ve aktivite geri kazanımları

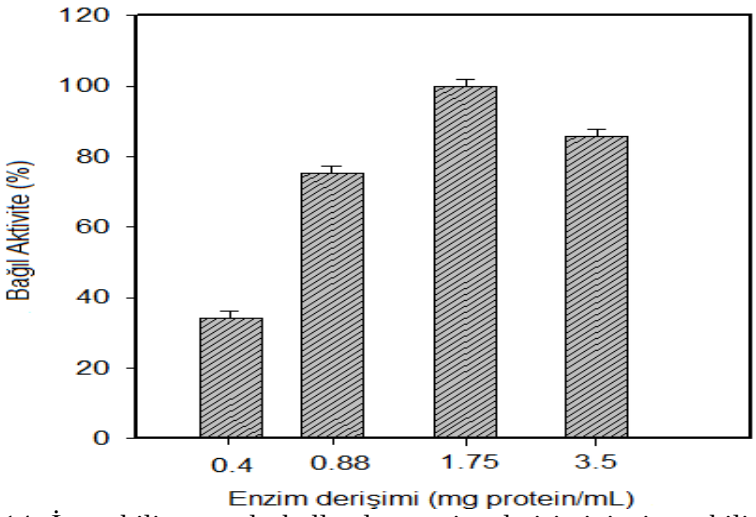
Destek	İmmobilizasyon tekniği	Protein geri kazanımı (%)	Aktivite geri kazanımı (%)
-Modifiye ReliZyme^{TM} HG 403/S	Kovalent	90	Aktivite yok
-Glutaraldehit ile aktifleştirilmiş ReliZyme^{TM} EA 403/S	Kovalent	80	10
- Glutaraldehit ile aktifleştirilmiş ReliZyme^{TM} HA 403/S	Kovalent	80	20
-Montmorillonite K-10	Adsorbsiyon	75	1
-PVA	Hapsetme	100	80

Çizelge 4.2. ReliZyme™ desteklerin partikül boyutu ve fonksiyonel grupları

Destek	Partikül boyutu (µm)	Fonksiyonel grup	Primer –NH_2 grubu miktarı (µmol/g destek)	Glutaraldehit reaksiyonundan sonra kalan Primer –NH_2 grubu miktarı (µmol/g destek)
EA403/S	200-500	Etilamino	550-600	40-45
HA403/S	200-500	Hekzametilamino	550-600	37-40
HG403/S	200-500	1,2-Diol	-	-

4.1.6.2.PVA ile Jel Oluşturarak NIT-104'ün (PVA-NIT-104) İmmobilizasyonu

PVA içerisinde hapsetme metodu ile yapılan immobilizasyonda, en uygun NIT-104 enzim konsantrasyonunun belirlenmesi amacı ile farklı konsantrasyonlarda (0,44-3,5 mg protein/mL) enzim kullanılarak yapılan immobilize örneklerde aktivite tayini yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.13'de verilmiştir. En yüksek aktiviteye 1,75 mg/mL protein derişiminde immobilize edilen NIT-104 için ulaşılmıştır.

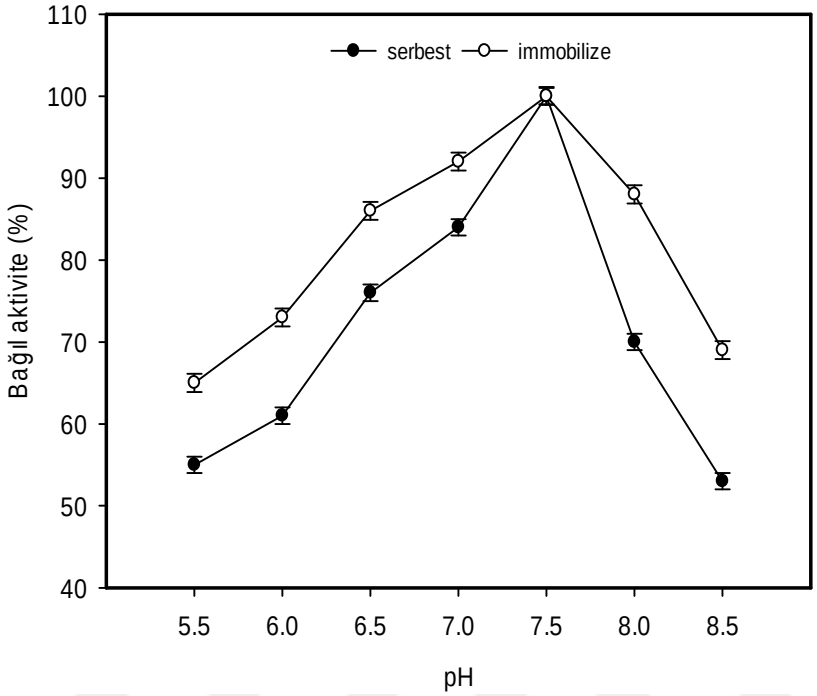


Şekil 4.14. İmmobilizasyonda kullanılan enzim derişiminin immobilize NIT-104 aktivitesi üzerine etkisi

4.1.6.3. Serbest ve PVA-NIT-104'ün Aktivitesine pH ve Sıcaklığın Etkisi

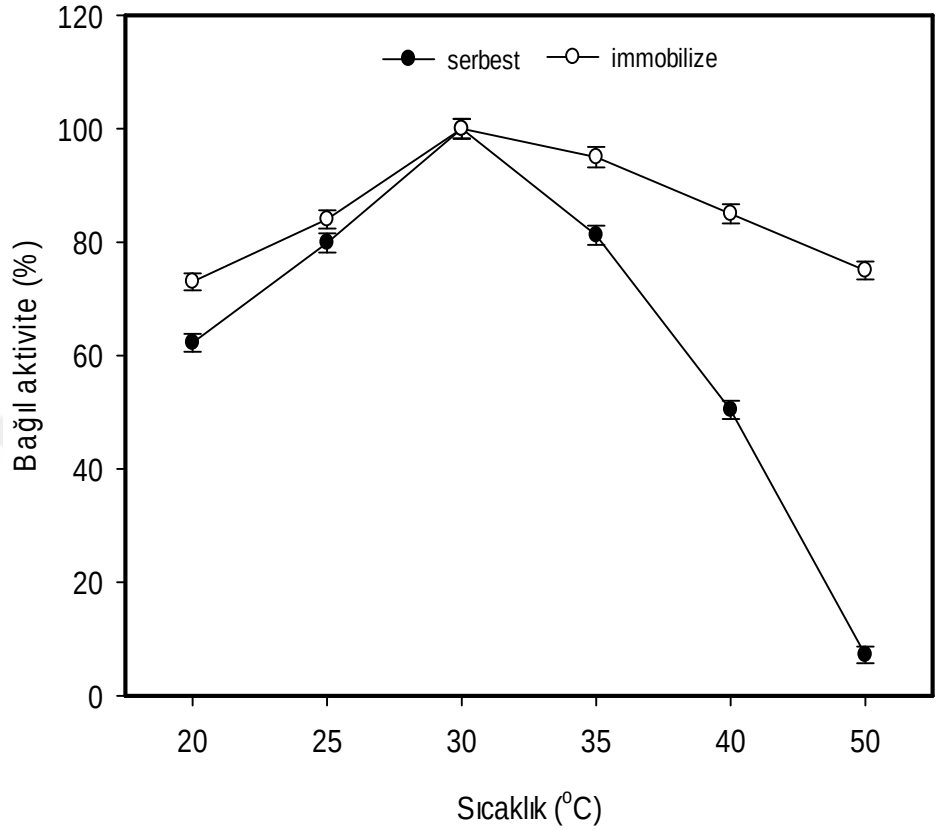
Serbest ve PVA-NIT-104 enzimlerinin optimum pH'sının belirlenmesinde pH'sı 5,5 ile 8,5 arasında değişen 100 mM farklı tampon çözeltileri (5,5 asetat, 6,0 sitrat, 7,0, 7,5, 8,0, fosfat 8,5 borat) kullanılmıştır ve sonuçlar Şekil 4.15.'de gösterilmiştir.

Şekil 4.15'de görüleceği gibi serbest ve PVA-NIT-104 (immobilize) enzimleri için optimum pH 7,5 olarak belirlenmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerinin her ikisinin de pH'nın artmasıyla birlikte aktivitelerinin arttığı ve pH 7,5'te maksimum olduğu görülmektedir. pH'nın daha da artmasıyla birlikte her iki enzimin aktivitelerinin düştüğü gözlenmekle birlikte immobilize enzimin aktivitesindeki düşüşün daha az olduğu gözlenmektedir. pH 8,0 ve 8,5'te serbest enzim başlangıçtaki aktivitesinin sırasıyla % 70 ve % 53'ünü korurken, immobilize enzim aynı pH değerlerinde sırasıyla başlangıç aktivitesinin % 88 ve % 69'unu koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.15. Serbest ve PVA-NIT-104'ün aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimi

Serbest ve PVA-NIT-104 için belirlenen optimum pH'da farklı sıcaklıklardaki (20-50 °C) aktiviteleri Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



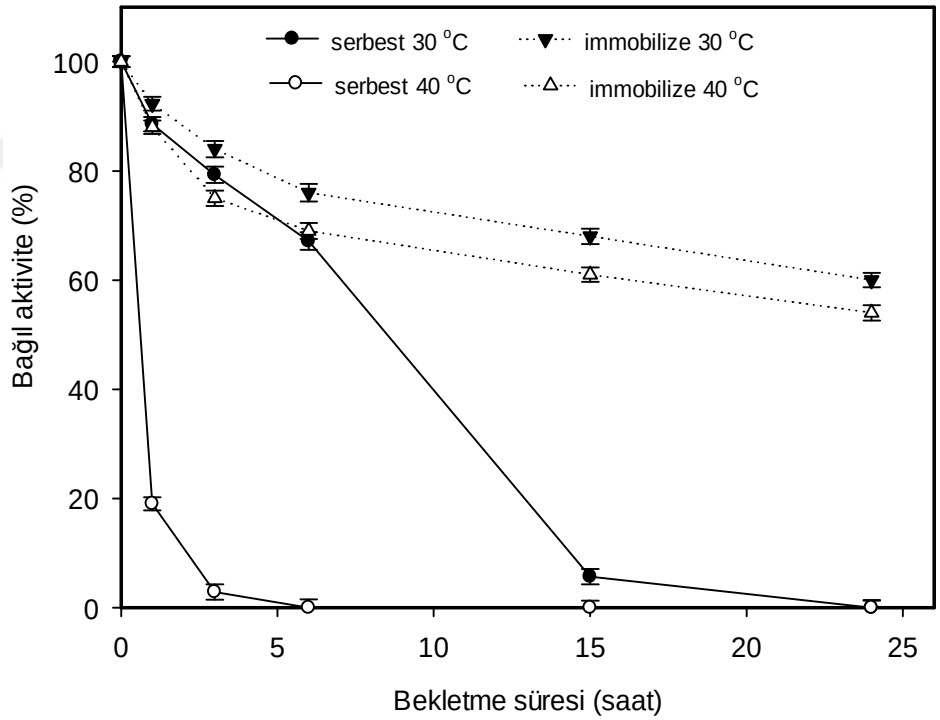
Şekil 4.16. Serbest ve PVA-NIT-104 enzimlerinin aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimi

Serbest ve PVA-NIT-104'in optimum sıcaklığı 30 °C olarak belirlenmiştir. Serbest enzimin aktivitesi 30 °C'den sonra hızlı bir şekilde düşerken PVA-NIT-104'ün daha kararlı olduğu belirlenmiştir. PVA-NIT-104'ün yüksek sıcaklıklarda (50 °C) daha kararlı olduğu (% 75) serbest enzimin ise aktivitesinin tamamen azaldığı (% 7) belirlenmiştir.

4.1.6.4. Serbest ve PVA-NIT-104'ün Termal Kararlılığı

Serbest ve PVA-NIT-104 enzimlerinin 30 ve 40 °C'de 24 saatlik inkübasyon süresi boyunca kalan aktiviteleri ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.17'de verilmiştir. 40 °C'de bekletilen serbest enzim örnekleri 6 saat sonunda aktivitesini tamamen

kaybederken 30 ºC'de inkübe edilen serbest enzim örnekleri ise 24 saat sonunda aktivitesini tamamen kaybetmiştir. Bunun yanında PVA-NIT-104 örnekleri ise aynı sıcaklıklarda (30 ve 40 ºC'de) başlangıç aktivitelerinin sırasıyla % 60 ve % 54'ünü koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.17. Serbest ve PVA-NIT-104'ün aktivitelerinin depolama süresi ve koşullarına bağlı değişimi

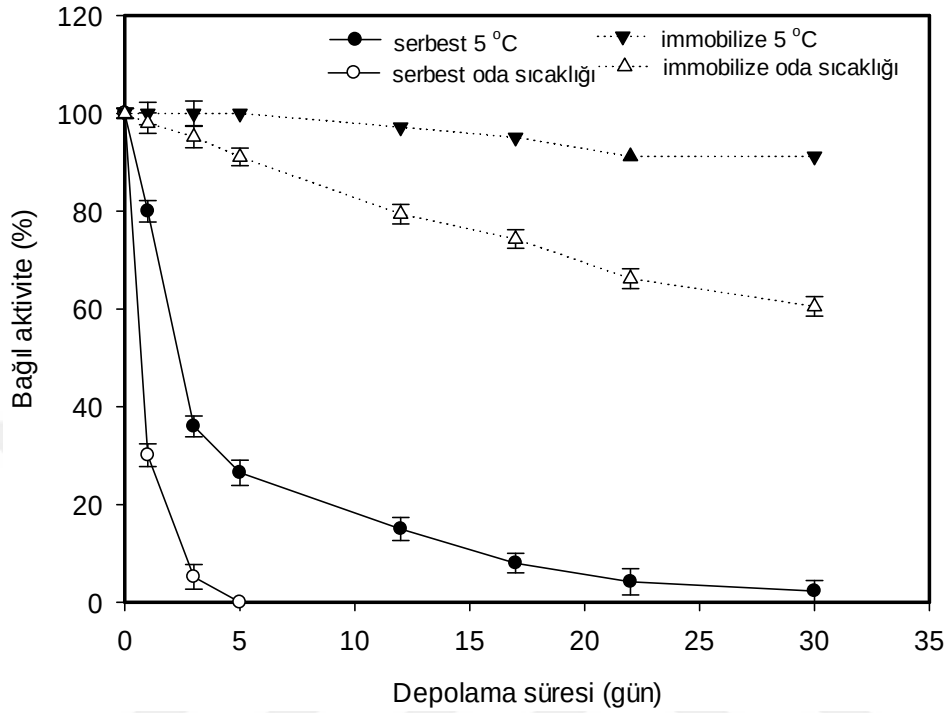
Serbest ve PVA-NIT-104 enzimlerin 30 ve 40 °C'deki termal kararlılıklarının belirlenmesi çalışmalarında serbest ve PVA-NIT-104 enzimlerinin yarılanma süreleri ($t_{1/2}$) ve kararlılık faktörleri değerleri Çizelge 4.3.'de verilmiştir ve immobilizasyonla enzimin termal kararlılığının arttığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Serbest ve NIT-104-PVA-jel enzimlerin 30 ve 40 °C'deki yarılanma süresi ($t_{1/2}$) ve kararlılık faktörleri (KF)

Enzim	$t_{1/2}$ (30 °C)	KF (30 °C)	$t_{1/2}$ (40 °C)	KF (40 °C)
Serbest	4.1 saat	-	0.56 saat	-
İmmobilize	15.3 saat	3.7	10.1 saat	18

4.1.6.5. Serbest ve PVA-NIT-104'ün Depolama Kararlılığı

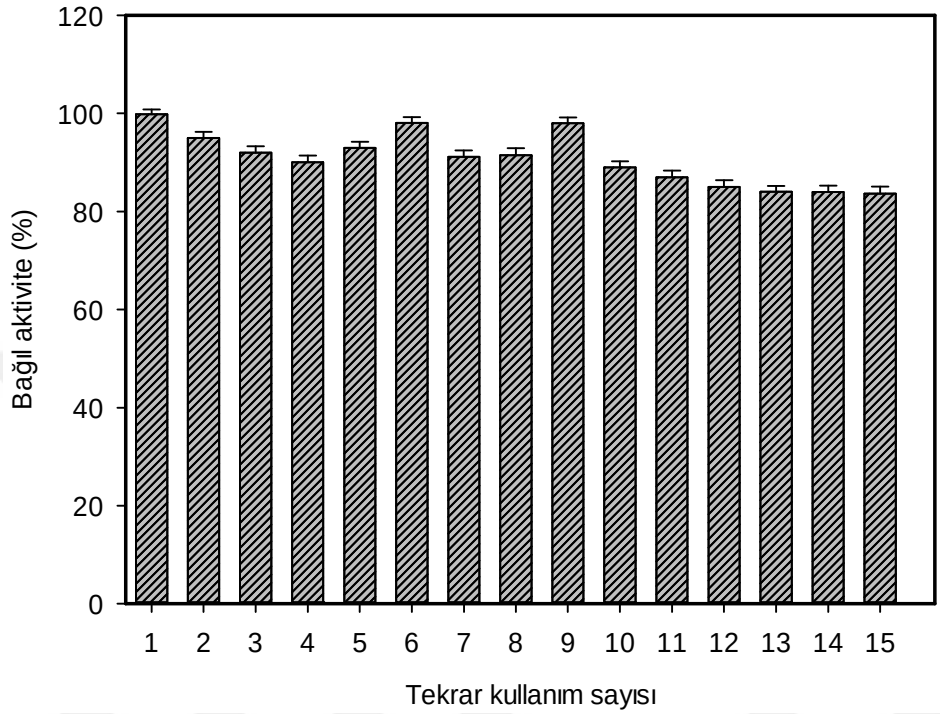
Serbest ve PVA-NIT-104 enzim örneklerinin depolama kararlılıklarının belirlenmesinde ise 5 °C ve oda sıcaklığında bekletilmiş örneklerden belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde aktivite tayin edilmiş ve başlangıç aktivitesindeki azalma hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 4.18'de verilmiştir. Her iki sıcaklıkta yapılan 30 günlük depolama süresi sonunda serbest enzim oda sıcaklığında 5 günün sonunda aktivitesini tamamen kaybederken PVA-NIT-104'in ise başlangıç aktivitesinin % 60'ını koruduğu belirlenmiştir. 5 °C'deki örneklerde ise 30 günlük inkübasyondan sonra serbest enzimin başlangıç aktivitesi % 98 azalırken, PVA-NIT-104 örnekleri başlangıç aktivitesinin % 92'ini koruduğu saptanmıştır.



Şekil 4.18. Serbest ve PVA-NIT-104 enzimlerinin aktivitelerinin depolama süresi ve koşullarına bağlı değişimi

4.1.6.6. PVA-NIT-104'ün Tekrar Kullanım Kararlılığı

PVA-NIT-104'ün tekrar kullanım kararlılığı Şekil 4.19'da verilmiştir. 3 kullanım sonunda aktivitenin biraz düştüğü ve 15 kez kesikli reaktörde kullanım sonunda immobilize NIT-104'ün başlangıç aktivitesinin % 84'ünü koruduğu belirlenmiştir.

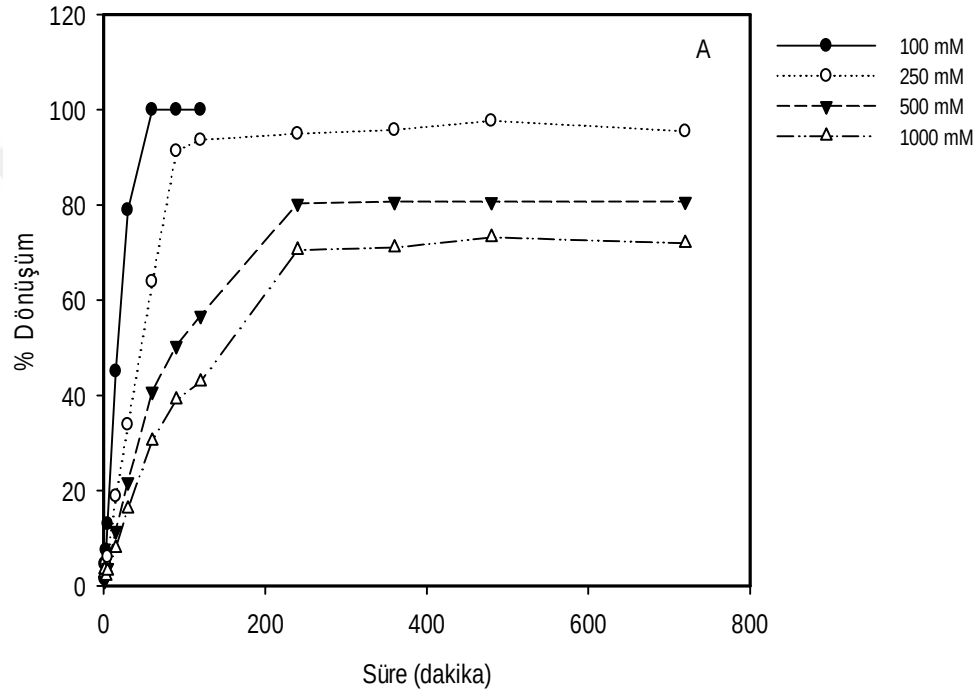


Şekil 4.19. PVA-NIT-104 örneğinin kesikli reaktörde tekrar kullanımına bağlı olarak aktivitesindeki değişim

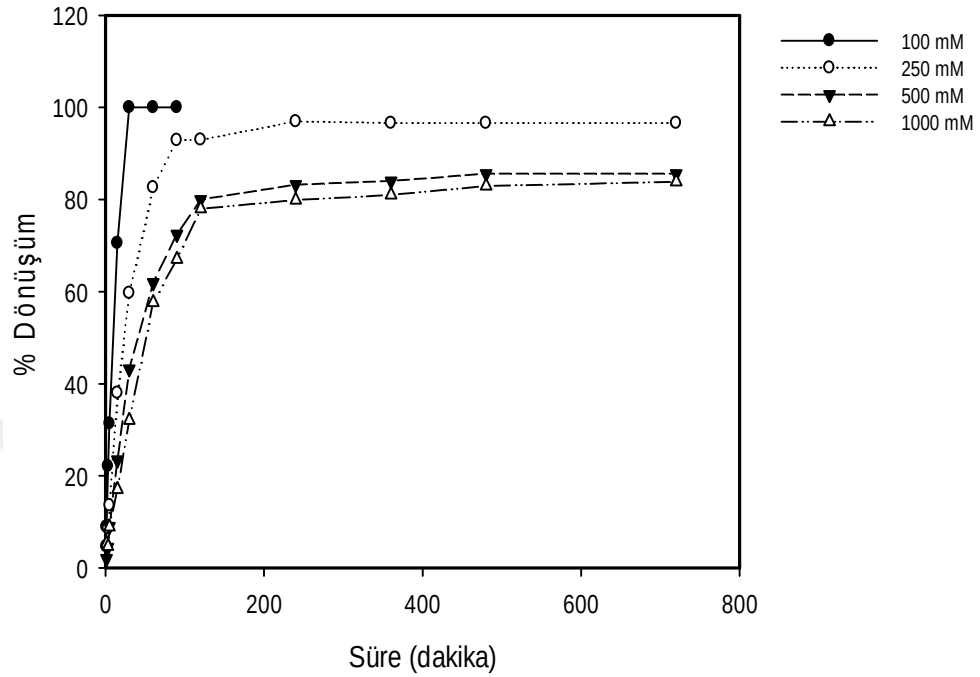
4.1.6.7. Serbest ve PVA-NIT-104'ün Akrilik Asit Sentezinde Kullanılması

Farklı konsantrasyonlarda substrat (akrilonitril) çözeltileri kullanılarak zamana bağlı akrilik asit üretimi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda serbest ve immobilize nitrilaz örnekleri kullanılmıştır. Sonuçlar serbest ve immobilize NIT-104 örnekleri için sırasıyla Şekil 4.20. ve Şekil 4.21.'de verilmiştir. Akrilonitrilin başlangıç konsantrasyonu 100 mM olduğu zaman serbest enzimin akrilonitirili 60 dakikada akrilik aside dönüştürdüğü belirlenmiştir. 250 mM derişimde ise 90 dakika sonundaki dönüşüm % 92 olarak gözlenmiştir. Substrat konsantrasyonu artırılmaya devam edildiğinde ise 500 mM ve 1 M derişimindeki dönüşüm sırası ile % 50 ve % 39 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte immobilize enzim örneklerinde ise daha yüksek bir dönüşüm oranına ulaşılmıştır. İmmobilize

enzim örneklerinin 100 mM akrilonitrili 30 dakikada akrilik aside dönüştürdüğü belirlenirken, 90 dakika sonunda ise 250 mM akrilonitrili % 90 oranında akrilik aside dönüştürmüştür. 500 mM ve 1M sustrat derişimlerindeki dönüşüm ise sırası ile % 72 ve % 67 olarak gözlenmiştir.



Şekil 4.20. Serbest NIT-104 tarafından katalizlenen reaksiyonda zamana bağlı akrilonitrilin hidrolizi



Şekil 4.21. PVA-NIT-104 tarafından katalizlenen reaksiyonda zamana bağlı akrilonitrilin hidrolizi

4.1.6.8. Serbest ve PVA-NIT-104'ün Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

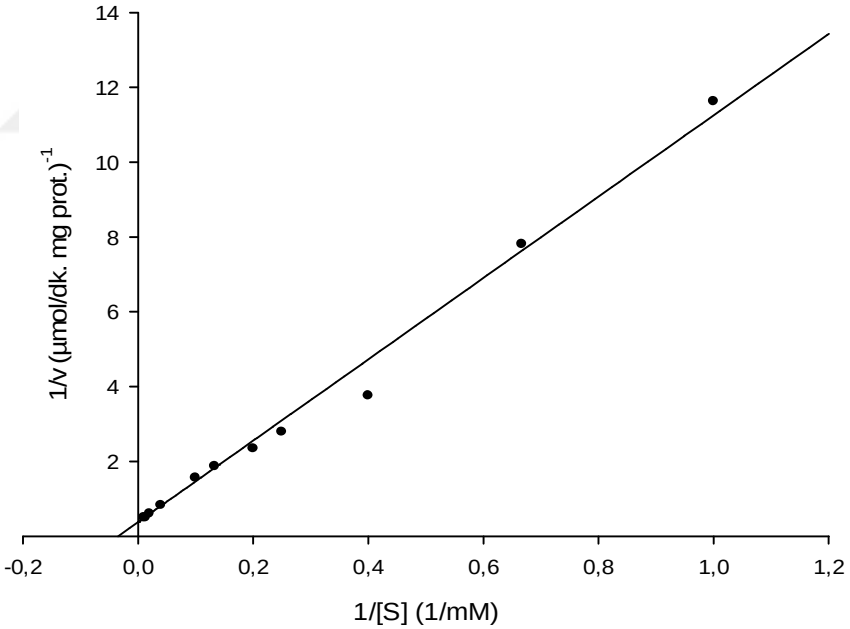
Serbest ve PVA-NIT-104'ün farklı nitril bileşiklerinin (akrilonitril, benzonitril, 3-pridinkarbonitril, ve benzoil siyanid) farklı derişimlerde hazırlanan çözeltilerine karşı aktiviteleri belirlenmiş ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Serbest NIT-104 enzimi için akrilonitril (Şekil 4.22), benzonitril (Şekil 4.23), 3-pridinkarbonitril (Şekil 4.24) ve benzoil syanid (Şekil 4.25) için K_m değerleri sırası ile 15,5, 6,5, 4,6, ve 1,2 mM ve V_{max} değerleri sırasıyla 1,8, 1,6, 1,1, ve 0,2 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. İmmobilize NIT-104 için ise *Km* değerleri sırasıyla8 11,7, 5,8, 3,4 ve 3,0 mM ve V_{max} değerleri de sırasıyla 1,6, 1,4, 0,5 ve 0,1 U/mg (Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28 ve Şekil 4.29) protein olarak hesaplanmıştır.

Serbest ve PVA-NIT-104 örneklerinin farklı nitrillere karşı kinetik paremetreleri ve katalitik etkinlik oranı Çizelge 4.4'de verilmiştir. İmmolize NIT-104'ün en yüksek katalitik etkinlik oranı akrilonitrile karşı belirlenmiştir. Benzonitril

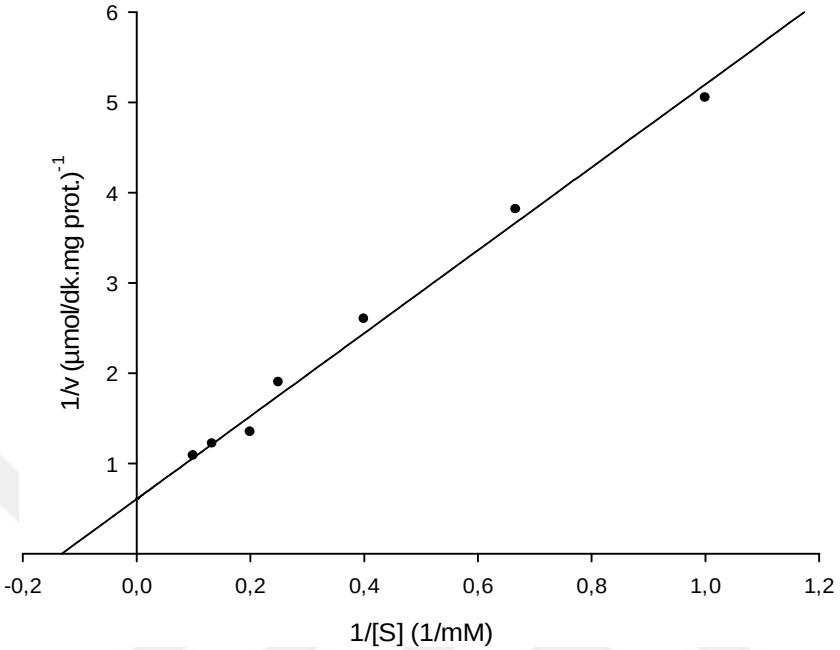
katalitik etkinlik oranı da oldukça yüksek (0,98) belirlenirken en düşük katalitik etkinlik oranı benzoil syanide karşı belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Serbest ve immobilize örneklerin farklı nitril bileşiklerine karşı kinetik parametreleri

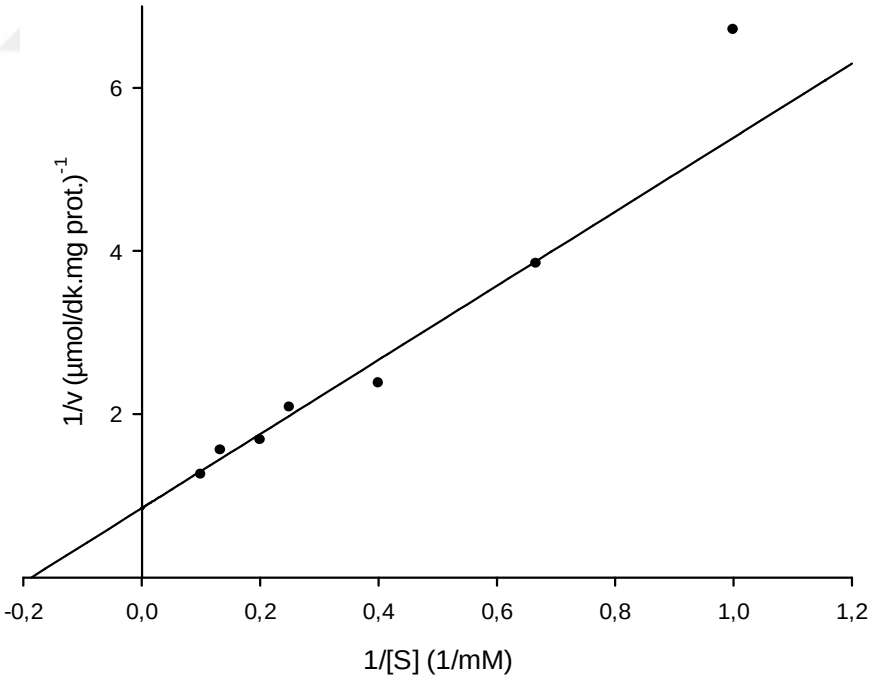
	Serbest		İmmobilize		
Substrat	K_m (mM)	V_{max} (U/mg prot.)	K_m (mM)	V_{max} (U/mg prot.)	Katalitik etkinlik oranı $(V_{max}/K_m)_{immobilize}/(V_{max}/K_m)_{serbest}$
Akrilonitril	15,5	1,8	11,7	1,6	1,18
Benzonitril	6,5	1,6	5,8	1,4	0,98
3-piridinkarbonitril	4,6	1,1	3,4	0,5	0,615
Benzoil syanid	1,2	0,2	3,0	0,1	0,18



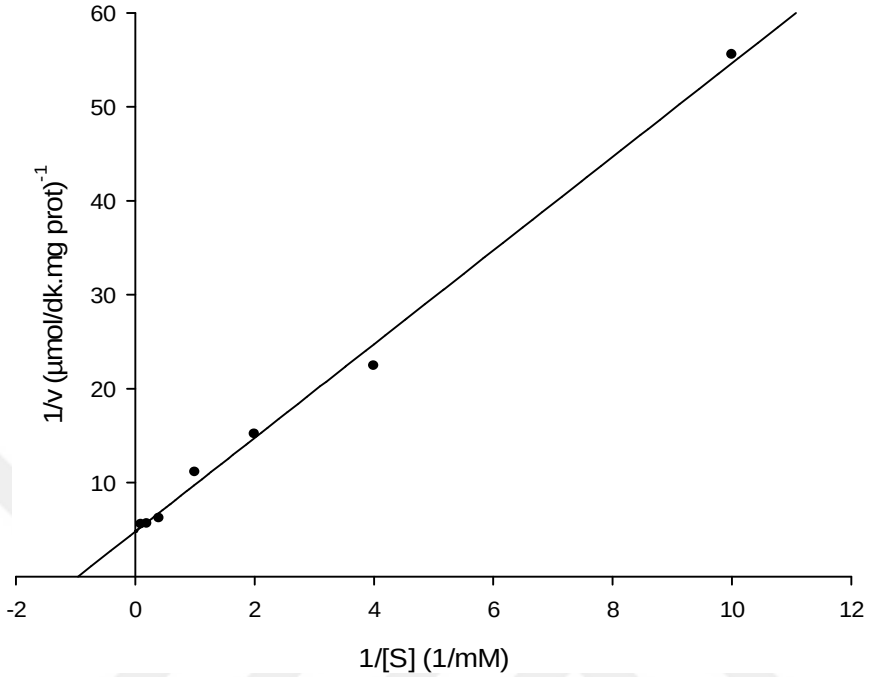
Şekil 4.22. Serbest NIT-104'ün akrilonitril için Lineweaver-Burk grafiği



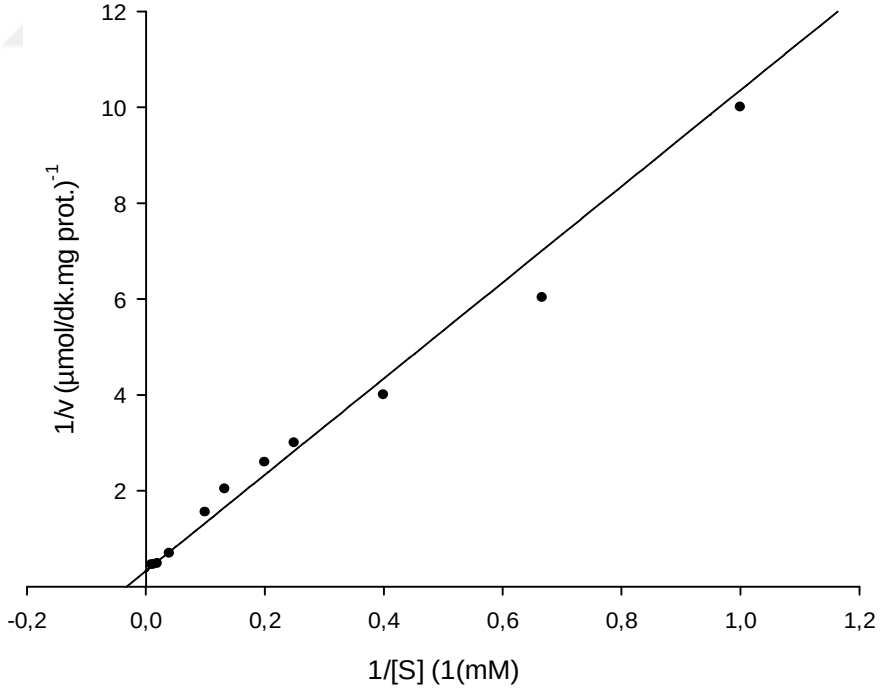
Şekil 4.23. Serbest NIT-104'ün Benzonitril için Lineweaver-Burk grafiği



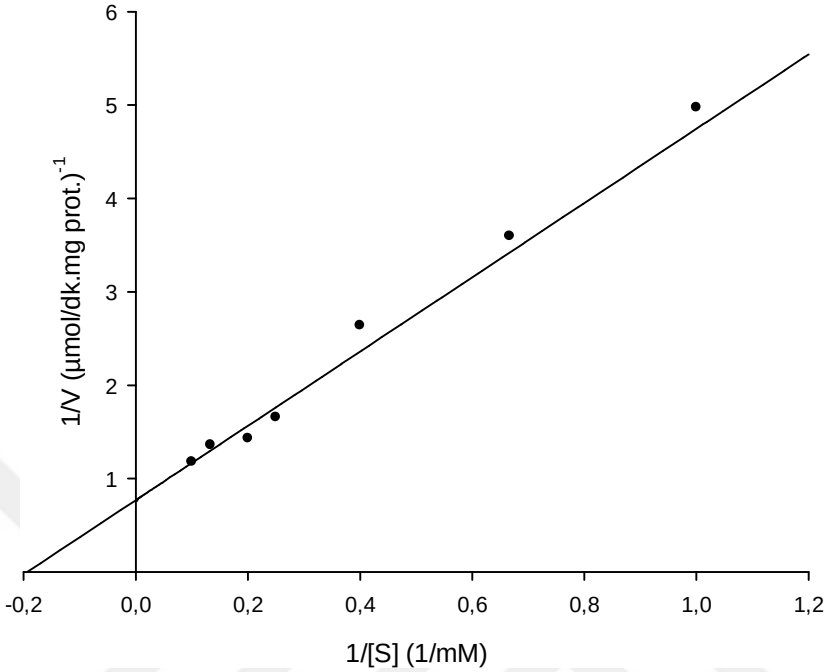
Şekil 4.24. Serbest NIT-104'ün 3-piridinkarbonitrile için Lineweaver-Burk grafiği



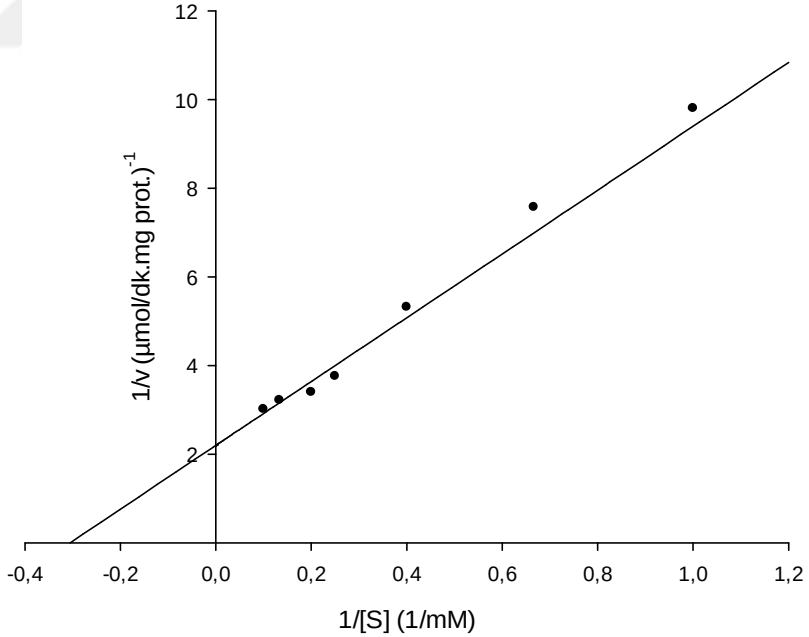
Şekil 4.25. Serbest NIT-104'ün benzoil siyanid için Lineweaver-Burk grafiği



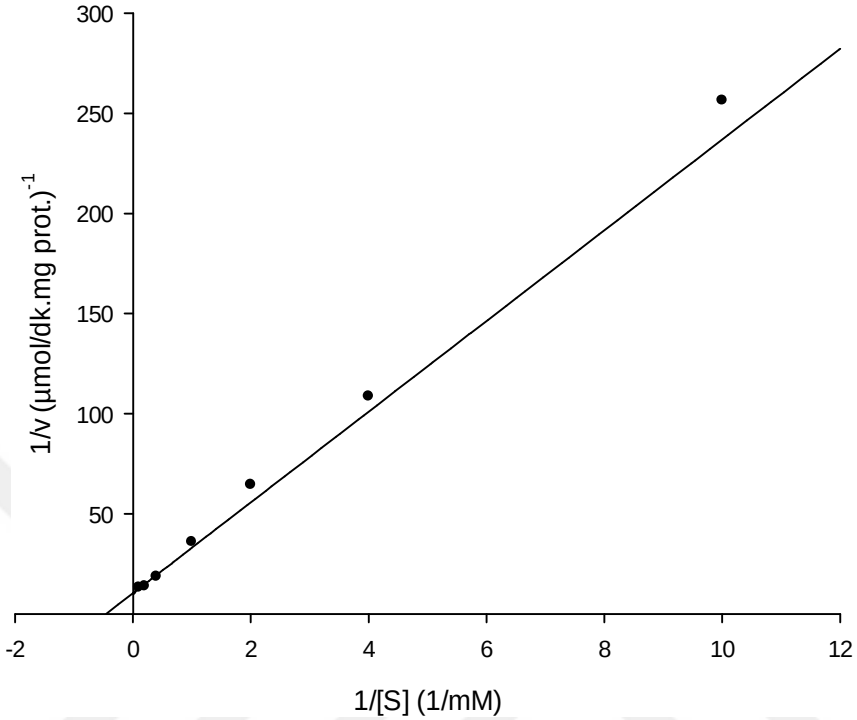
Şekil 4.26. PVA-NIT-104'ün akrilonitril için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.27. PVA-NIT-104'ün Benzonitril için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.28. PVA-NIT-104'ün 3-piridinkarbonitril için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.29. PVA-NIT-104'ün benzoil siyanid için Lineweaver-Burk grafiği

4.1.7. NIT-P1-118 İmmobilizasyonu

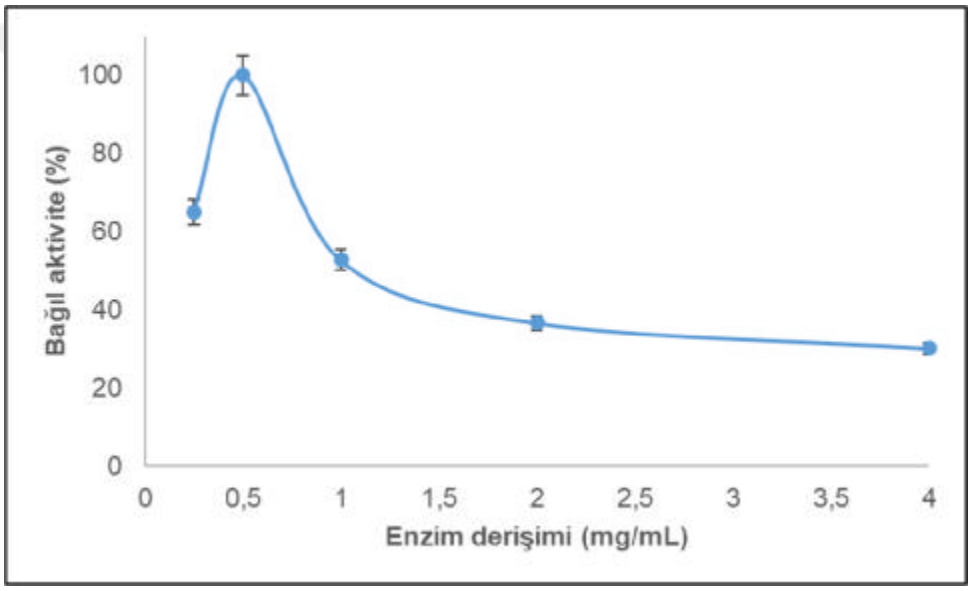
4.1.7.1. İmmobilizasyonda kullanılacak P Serisi Nitrilazın ve İmmobilizasyonunda Kullanılacak En Uygun Yöntemin Belirlenmesi

P serisi enzimlerin (R-S)-mandelonitrile karşı yapılan aktivite tayini sonucu en yüksek aktivite değerine sahip enzim NIT-P1-118 olarak belirlenmiştir. NIT-P1-118 örneklerinin kullanıldığı reaksiyonda verim ve enantiyomerik aşırılık (ee) değeri sırasıyla % 40 ve % 88 olarak elde edilmiştir. Bu nedenle immobilizasyon çalışmalarında NIT-P1-118 enzimi kullanılmıştır.

Cui ve ark., (2017) tarafından önerilen yönteme göre yapılan kapsülasyonun ardından immobilize enzimlerde yapılan aktivite tayini sonucunda, immobilize enzimlerin aktivitesi çok düşük olduğundan dolayı sonraki deneysel aşamada PVA ve alginat jel yöntemleri kullanılmıştır.

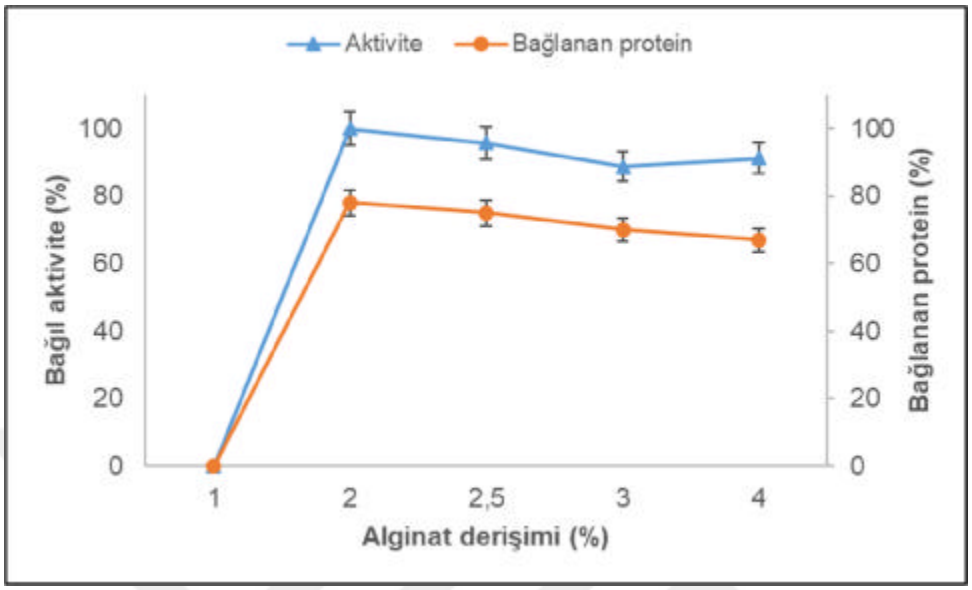
4.1.7.2. NIT-P1-118'in PVA ve Alginat Jel Oluşturarak İmmobilizasyonu

PVA jel içerisinde immobilize edilen NIT-P1-118 (PVA-NIT-P1-118) enziminin aktivitesinin enzim derişimine bağlı olarak değişimi Şekil 4.30'da verilmiştir. En yüksek aktiviteye 0,5 mg/mL NIT-P1-118 derişiminde immobilize edilen örneklerde ulaşılmıştır. Enzim derişiminin artmasıyla birlikte aktivitede önemli bir azalma olmuştur. 4 mg/mL NIT-P1-118 derişimindeki bağıl aktivite düşüşü % 70 olarak belirlenmiştir.



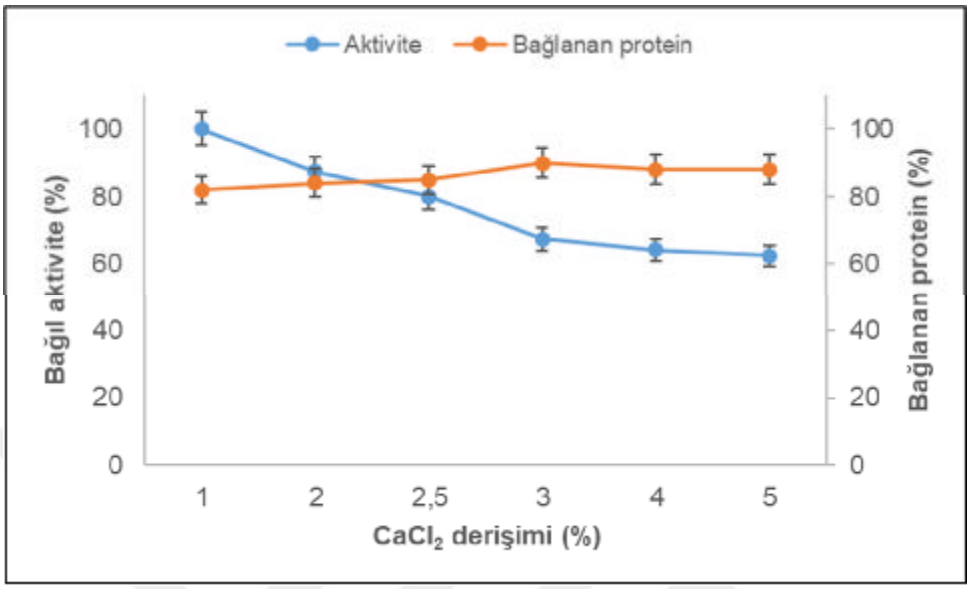
Şekil 4.30. NIT-P1-118 enziminin PVA jel immobilizasyonunda kullanılan enzim derişimine bağlı olarak aktivite değişimi

Sodyum alginat içerisinde immobilize edilen NIT-P1-118 (ALG- NIT-P1-118) enziminin aktivitesinin ve bağlanma yüzdesinin alginat derişimine bağlı olarak değişimi Şekil 4.31.'de verilmiştir. % 1 alginat kullanılarak yapılan immobilizasyonda uygun alginat jelleri elde edilememiştir. En yüksek aktivite ve bağlanma yüzdesine % 2'lik alginat kullanıldığında elde edilen immobilize enzim örneklerinde ulaşılmıştır.



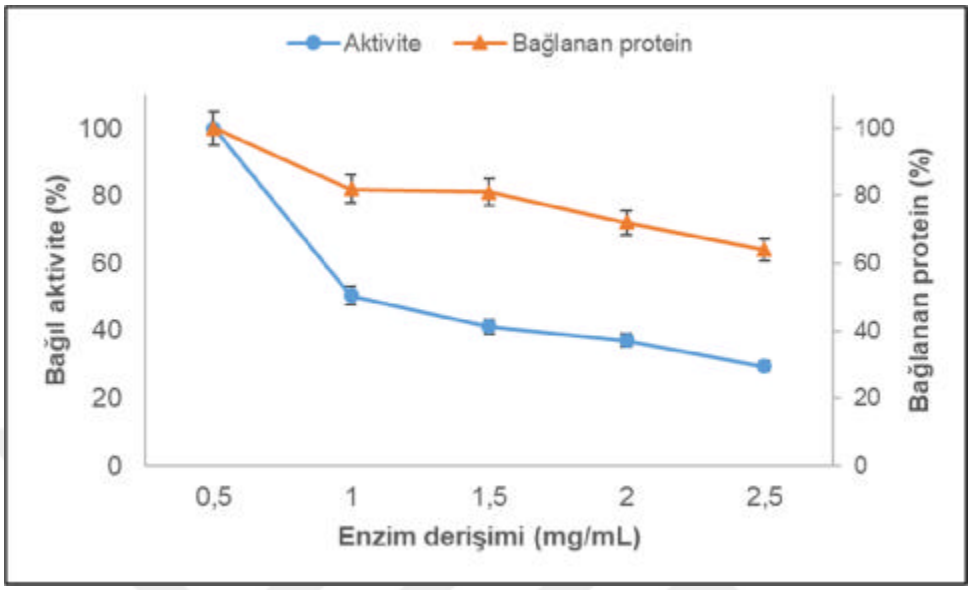
Şekil 4.31. NIT-P1-118 enziminin immobilizasyonunda kullanılan alginatın derişimine bağlı olarak aktivite ve bağlanma yüzdesindeki değişimler

NIT-P1-118 enziminin alginat immobilizasyonunda kullanılan $CaCl_2$ derişiminin immobilize enzim aktivitesi üzerine etkisi ve bağlanma yüzdesi Şekil 4.32'de verilmiştir. Kalsiyum klorür derişimine bağlı olarak aktiviteler incelendiğinde en yüksek aktiviteye % 1'lik $CaCl_2$ derişiminde ulaşılmıştır. En yüksek protein bağlanma oranına, kalsiyum klorür derişiminin % 3 olduğu konsantrasyonda ulaşılmış ve protein bağlanma oranı % 90 olarak hesaplanmıştır. Protein bağlanma oranı % 1'lik derişime göre yüksek olmasına rağmen enzimin spesifik aktivitesinde bağıl olarak önemli bir düşüş belirlenmiştir.



Şekil 4.32. NIT-P1-118 enziminin immobilizasyonunda kullanılan kalsiyum klorürün derişimine bağlı olarak aktivite ve bağlanma yüzdesindeki değişimler

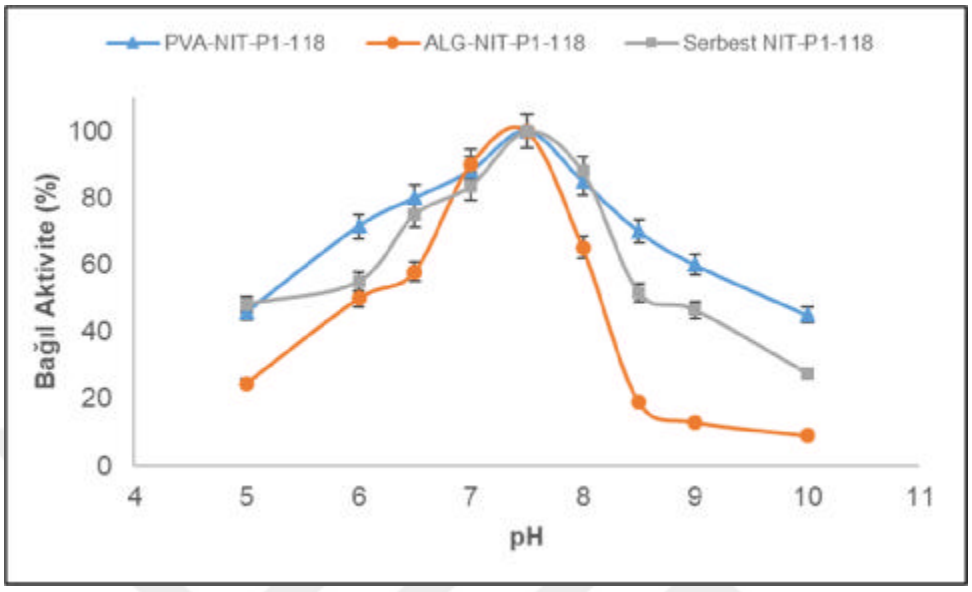
NIT-P1-118 enziminin alginat immobilizasyonunda en uygun alginat ve $CaCl_2$ derişimleri belirlendikten sonra enzim aktivitesi üzerine NIT-P1-118 derişiminin etkisi belirlenmiştir (Şekil 4.33). 0,5 mg/mL enzim derişiminden elde edilen immobilize enzim örneklerinde en yüksek aktivite ve bağlanma yüzdesine ulaşılmıştır. Yüksek enzim derişimlerinde yüzde bağlanma oranında ve aktivitede düşüş belirlenmiştir. Enzim derişimi 2,5 mg/mL olduğu durumda protein bağlanma verimi % 64 ve bağıl aktivite % 29 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.33. NIT-P1-118 enziminin immobilizasyonunda kullanılan NIT-P1-118 derişimine bağlı olarak aktivite ve bağlanma yüzdesindeki değişimler

4.1.7.3. Serbest, PVA-NIT-P1-118 ve ALG- NIT-P1-118'in Aktivitesine pH ve Sıcaklığın Etkisi

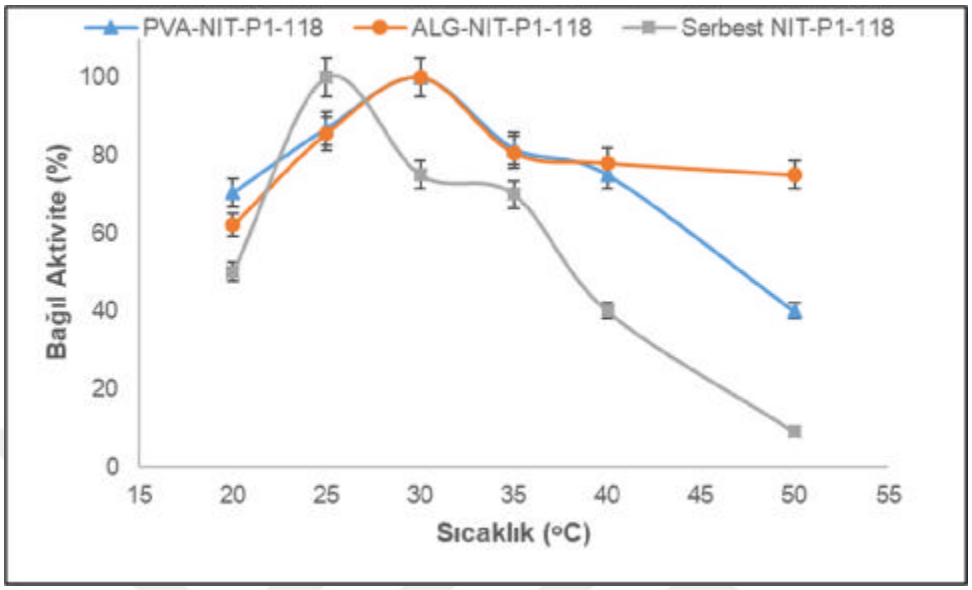
Serbest ve immobilize enzimlerin optimum pH'sının belirlenmesinde pH'sı 5,0 ile 9,0 arasında değişen 50 mM farklı tampon çözeltileri (5,0, 6,0 sitrat, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 fosfat, 9,0, 10,0 borat) kullanılmış ve sonuçlar Şekil 4.34.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.34. Serbest ve PVA-NIT-P1-118 ve ALG-NIT-P1-118'in aktivitelerinin pH'ya bağlı değişimi

Şekil 4.33'den görüleceği gibi serbest ve immobilize NIT-P1-118 enzimlerinin optimum pH'ları 7,5 olarak belirlenmiştir. İmmobilizasyonla enzimin pH'sında değişiklik gözlenmemiştir. PVA- NIT-P1-118 örneklerinin pH değişimine karşı serbest ve immobilize alginat örneklerine karşı daha dirençli olduğu belirlenmiştir. ALG-NIT-P1-118 örneklerinin düşük pH'da (pH 5) aktivitesinin oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Yüksek pH değerinde (pH 10) ise aynı şekilde alginat örneklerinin aktivitesinin daha düşük olduğu ve PVA jel örneklerinin kararlılığının ise daha yüksek olduğu belirlenmiştir**.**

Serbest ve immobilize NIT-P1-118 enzimlerinin belirlenen optimum pH'da farklı sıcaklıklardaki (20-50 ^{o}C) aktiviteleri Şekil 4.35.'de verilmiştir.

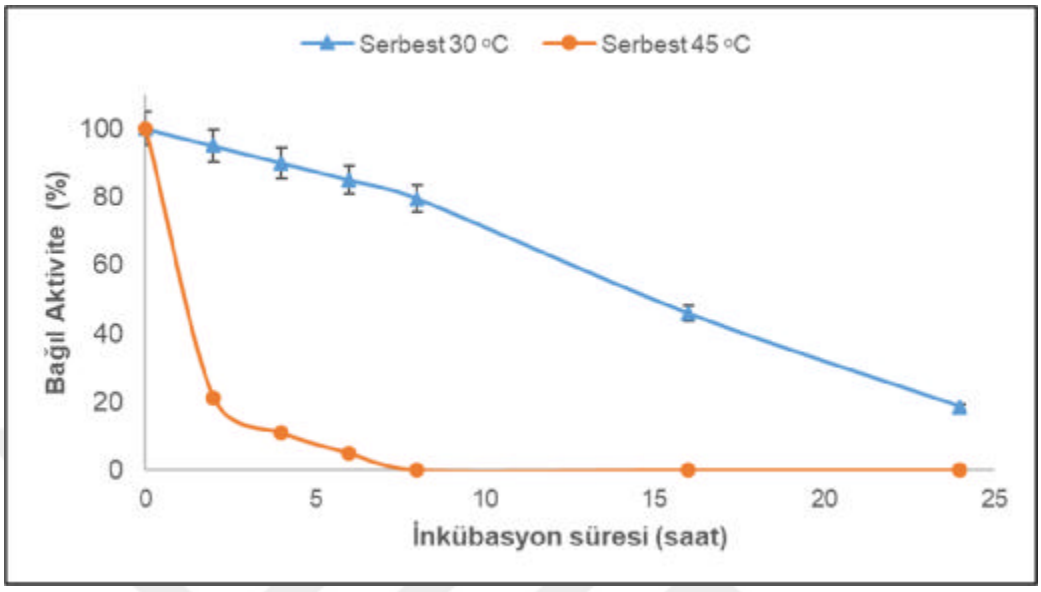


Şekil 4.35. Serbest, PVA-NIT-P1-118 ve ALG-NIT-P1-118'in aktivitelerinin sıcaklığa bağlı değişimi

Serbest NIT-P1-118 enziminin optimum çalışma sıcaklığı 25 °C olarak belirlenmiştir. PVA-NIT-P1-118 ve ALG-NIT-P1-118'in optimum çalışma sıcaklığı ise 30 °C olarak belirlenmiştir. Serbest enzimin aktivitesi 25 °C'nin üstünde keskin bir şekilde düşerken benzer şekilde PVA-NIT-P1-118 örneklerin aktivitesi ise 30 °C'nin üstünde serbest enzime göre daha az da olsa düştüğü Şekil 4.35'den görülmektedir. ALG-NIT-P1-118 örneklerin ise sıcaklık değişimine karşı daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir. İmmobilize alginat örnekleri 50 °C'de maksimum aktivitesinin % 75'ini koruduğu belirlenmiştir.

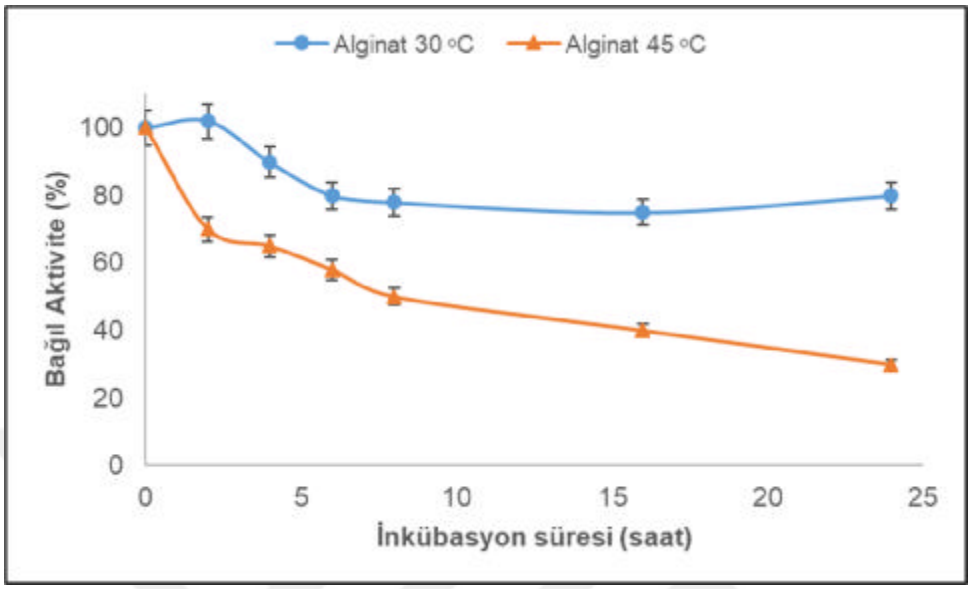
4.1.7.4. Serbest, PVA-NIT-P1-118 ve ALG-NIT-P1-118'in Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi

Serbest NIT-P1-118 enzim örneklerinin termal kararlılıklarını saptamak için yapılan çalışmaların sonuçları Şekil 4.36'da verilmiştir. Serbest enzim örnekleri 30 °C'de 24 saat bekletildiğinde başlangıç aktivitelerinin % 19'unu koruduğu, 45 °C'de ise 8 saat sonunda başlangıç aktivitelerinin tamamını kaybettiği belirlenmiştir.



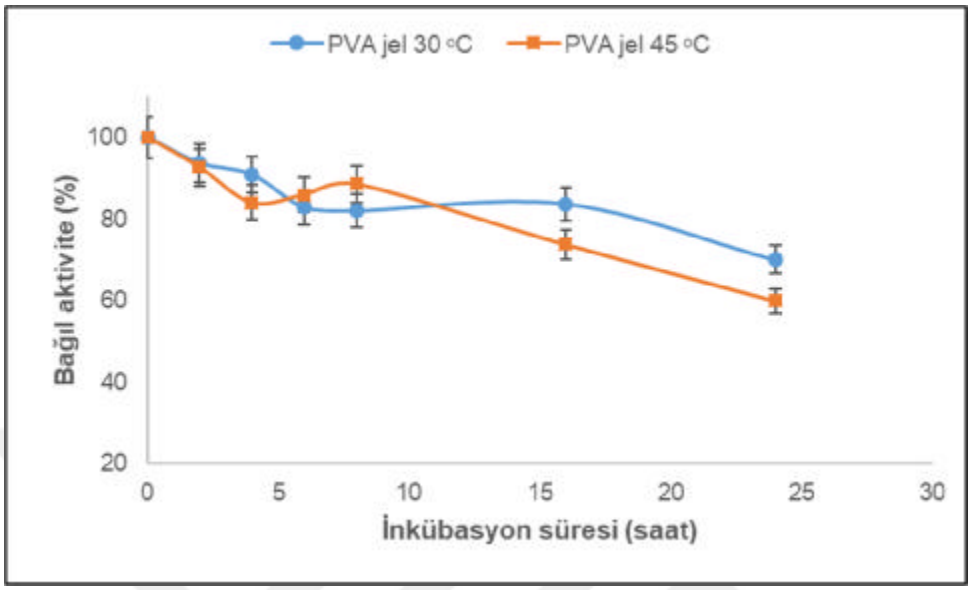
Şekil 4.36. Serbest NIT-P1-1118 için aktivitelerin bekletilme süresine bağlı değişimi

ALG-NIT-P1-118 enzim örneklerinin termal kararlılıklarını saptamak için yapılan çalışmaların sonuçları Şekil 4.37'de verilmiştir. İmmobilize alginat enzim örnekleri 30 °C'de 24 saat bekletildiğinde başlangıç aktivitelerinin % 80'ini koruduğu, 45 °C'de ise 24 saat sonunda başlangıç aktivitelerinin % 30'unu koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.37. ALG-NIT-P1-118 için aktivitelerin bekletilme süresine bağlı değişimi

PVA-NIT-P1-118 enzim örneklerinin termal kararlılıklarını saptamak için yapılan çalışmaların sonuçları Şekil 4.38'de verilmiştir. PVA-NIT-P1-118 örnekleri 30 °C'de 24 saat bekletildiğinde başlangıç aktivitelerinin % 70'ini koruduğu, 45 °C'de ise 24 saat sonunda başlangıç aktivitelerinin % 60'ını koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.38. PVA-NIT-P1-118 için aktivitelerin bekletilme süresine bağlı değişimi

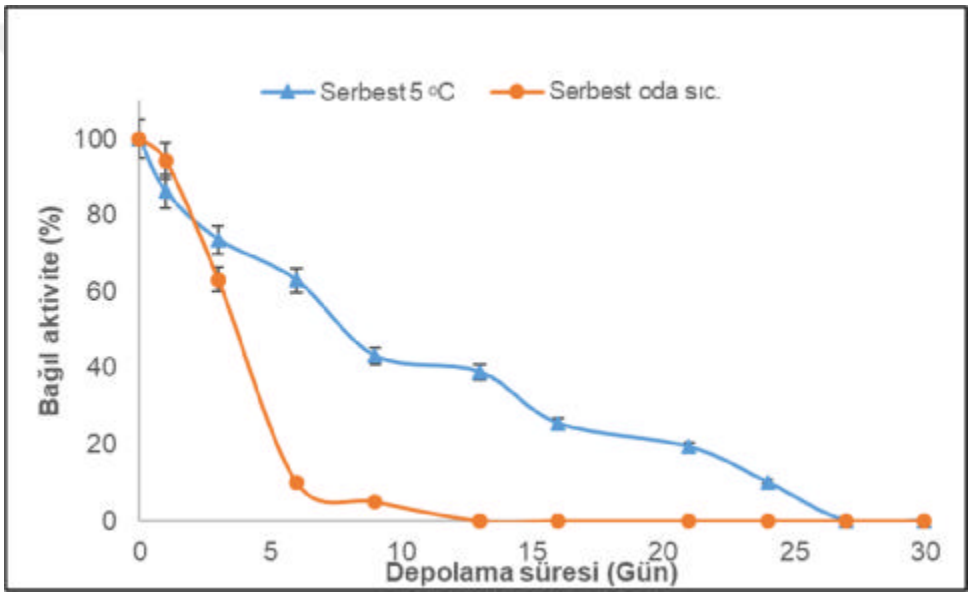
Serbest ve immobilize enzimlerin 30 ve 45 °C'deki termal kararlılıklarının belirlenmesi çalışmalarında serbest ve immobilize enzimlerinin yarılanma süreleri (t1/2) ve kararlılık faktörleri değerleri Çizelge 4.5'de verilmiştir ve immobilizasyonla enzimin kararlılığının arttığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Serbest ve immobilize NIT-P1-118 enzimlerin 30 ve 45 °C'deki yarılanma süresi ($t_{1/2}$) ve kararlılık faktörleri (KF)

Enzim	$t_{1/2}$ (30 °C)	KF (30 °C)	$t_{1/2}$ (45 °C)	KF (45 °C)
Serbest	14,54 saat	-	1,25 ssat	-
ALG-NIT-P1-118	28,94 saat	2,0	8,60 saat	6,88
PVA-NIT-P1-118	32,72 saaat	2,25	26,28 saat	21,0

4.1.7.5. Serbest, PVA-NIT-P1-118 ve ALG-NIT-P1-118'in Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi

Serbest NIT-P1-118 örnekleri oda sıcaklığında ve 5 °C'de 50 mM pH 7,5 Tris-HCl tamponunda bekletilerek belirli günlerde kalan aktiviteleri ölçülmüştür. Serbest NIT-P1-118 örneklerinin depolama süresine bağlı aktivite değişimleri Şekil 4.35'de gösterilmiştir. Oda sıcaklığında bekletilen Serbest NIT-P1-118 örnekleri 13 gün sonunda aktivitelerini tamamen kaybederken, 5 °C'de bekletilen serbest enzim örnekleri ise aktivitelerini 27 gün sonunda tamamen kaybetmişlerdir.

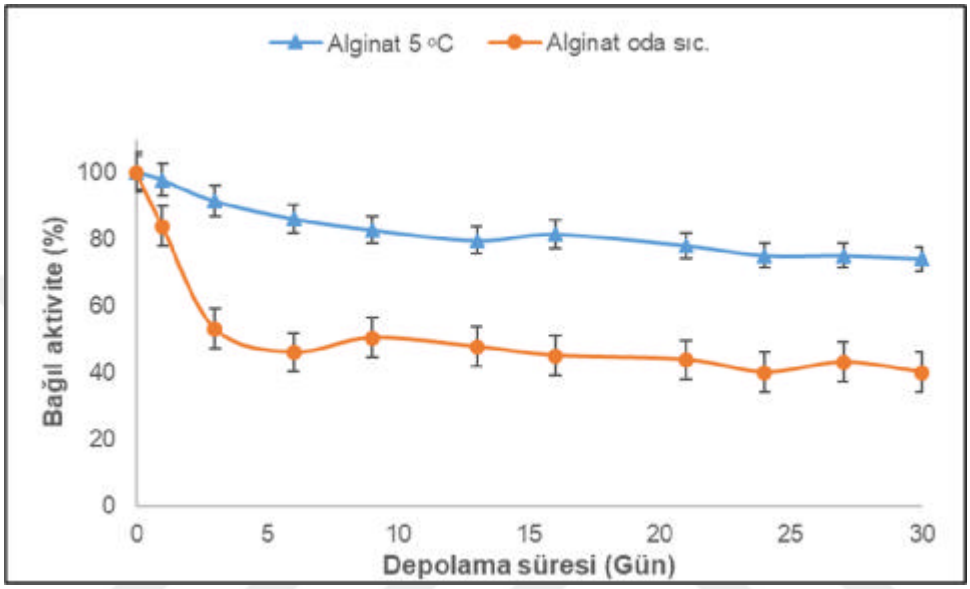


Şekil 4.39. Serbest NIT-P1-118 enzimlerin aktivitelerinin depolama süresi ve koşullarına bağlı değişimi

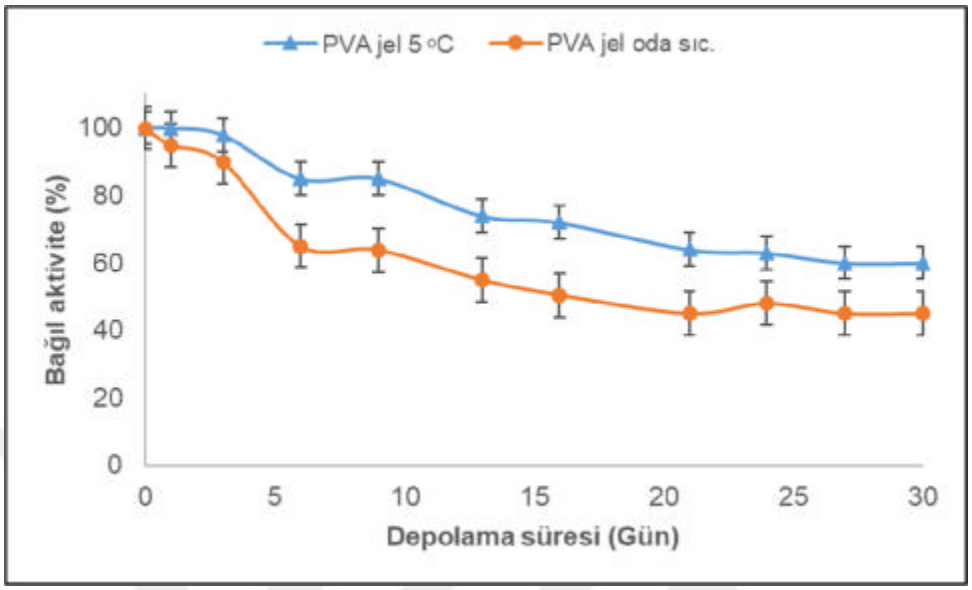
ALG-NIT-P1-118 enzim örnekleri oda sıcaklığında ve 5 °C'de 50 mM pH 7,5 Tris-HCl tamponunda bekletilerek belirli günlerde kalan aktiviteleri ölçülmüştür. 5 °C'de bekletilen immobilize enzim örnekleri 30 günün sonunda başlangıç aktivitesinin % 74' ünü koruduğu belirlenirken, oda sıcaklığında bekletilen örneklerin ise başlangıç aktivitesinin % 40'ını koruduğu belirlenmiştir (Şekil 4.40).

PVA-NIT-P1-118 enzim örnekleri oda sıcaklığında ve 5 °C'de 50 mM pH 7,5 Tris-HCl tamponunda bekletilerek belirli günlerde kalan aktiviteleri ölçülmüştür

(Şekil 4.41). 5 °C'de bekletilen immobilize enzim örnekleri 30 günün sonunda başlangıç aktivitesinin % 60'ını koruduğu belirlenirken, oda sıcaklığında bekletilen örneklerin ise başlangıç aktivitesinin % 45'ini koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.40. ALG-NIT-P1-118'in aktivitelerinin depolama süresi ve koşullarına bağlı değişimi

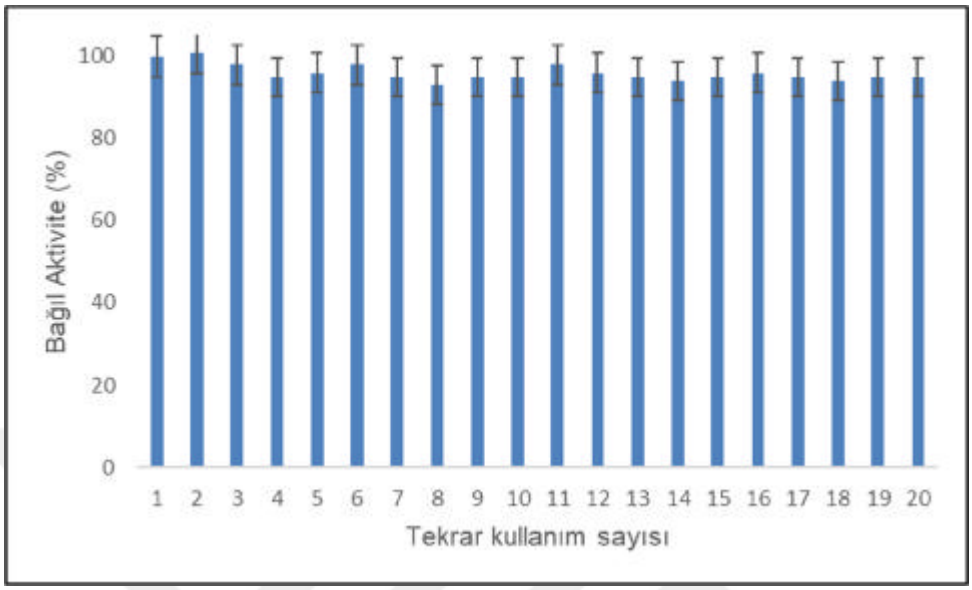


Şekil 4.41. ALG-NIT-P1-118'in aktivitelerinin depolama süresi ve koşullarına bağlı değişimi

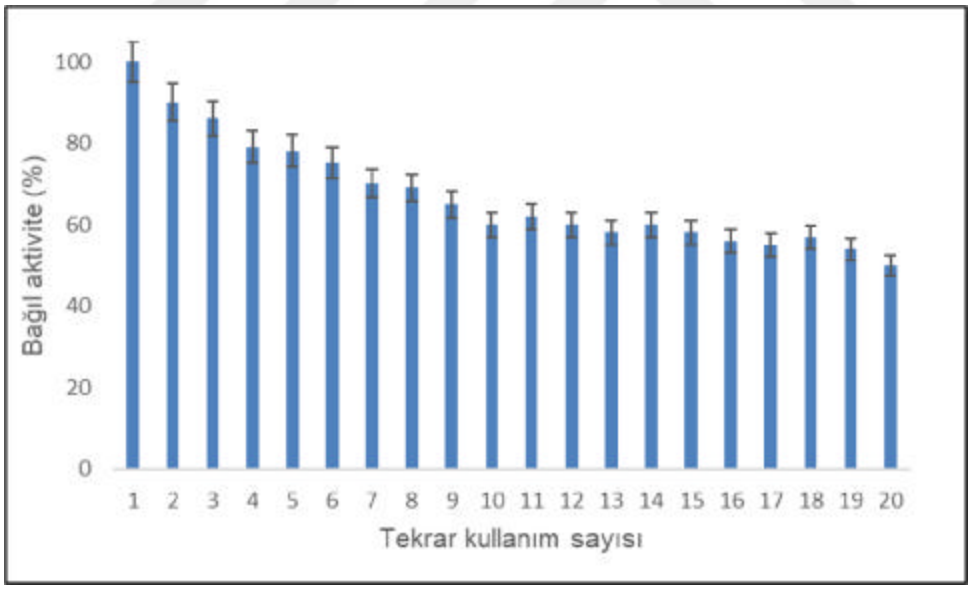
4.1.7.6. PVA-NIT-P1-118 ve ALG-NIT-P1-118'in Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi

ALG-NIT-P1-118 için tekrar kullanım kararlılığı Şekil 4.42'de gösterilmiştir. 20 kez kesikli reaktörde kullanım sonunda ALG-NIT-P1-118'in başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 95'ini koruduğu belirlenmiştir.

PVA-NIT-P1-118 için tekrar kullanım kararlılığı Şekil 4.43'de gösterilmiştir. 20 kez kesikli reaktörde kullanım sonunda PVA-NIT-P1-118'in başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 50'sini koruduğu belirlenmiştir.



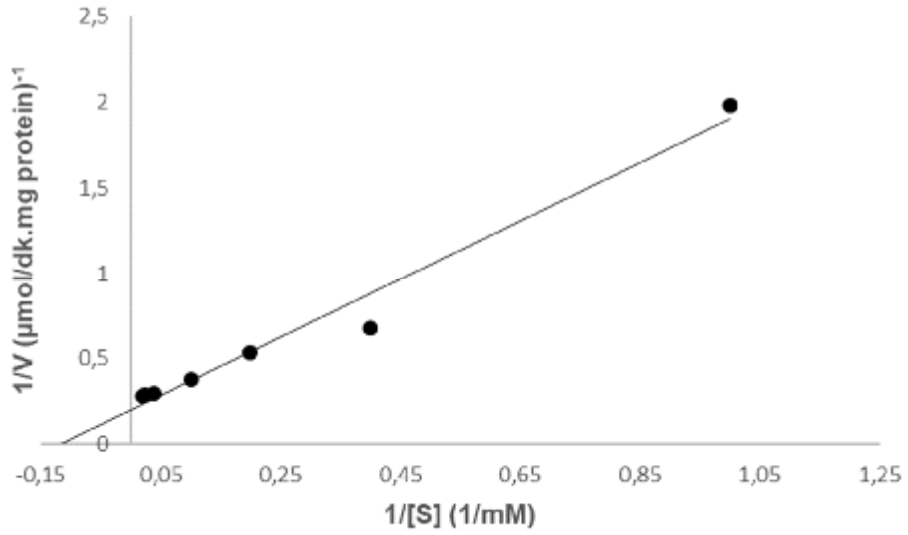
Şekil 4.42. ALG-NIT-P1-118 örneğinin kesikli reaktörde tekrar kullanımına bağlı olarak aktivitesindeki değişim



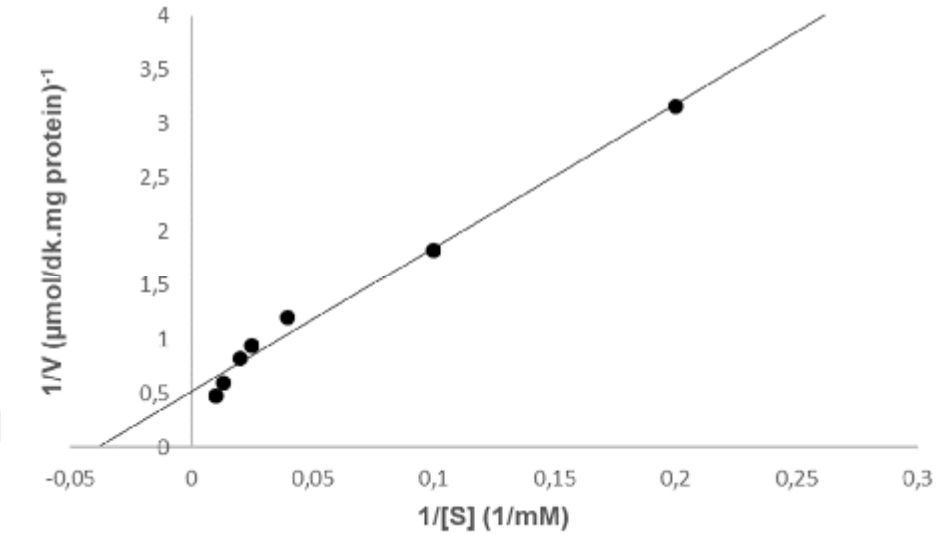
Şekil 4.43. PVA-NIT-P1-118 örneğinin kesikli reaktörde tekrar kullanımına bağlı olarak aktivitesindeki değişim

4.1.7.7. Serbest, PVA-NIT-P1-118 ve ALG-NIT-P1-118'in Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

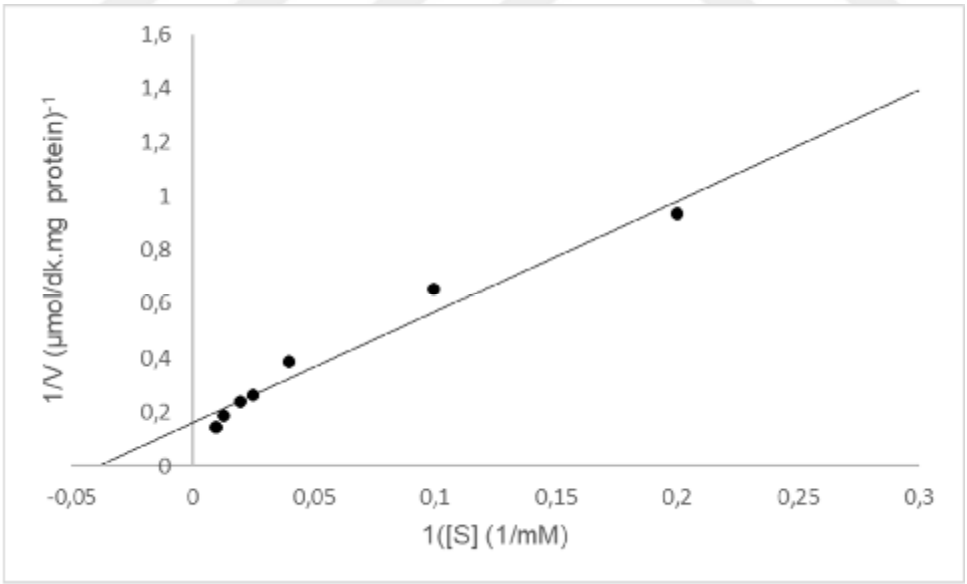
Serbest ve immobilize NIT-P1-118 enzimlerinin (R,S)-mandelonitrilin farklı derişimlerde hazırlanan çözeltilerine karşı aktiviteleri belirlenmiş ve Lineweaver-Burk grafikleri verilmiştir (Şekil 4.44, Şekil 4.45 ve Şekil 4.46). Serbest NIT-P1-118 enzimi için(R,S)-mandelonitre karşı K_m değeri 8,52 mM ve V_{max} değeri sırasıyla 5 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. Alginat jel ve PVA jel yöntemiyle immobilize edilen NIT-P1-118 enzim örnekler için ise *K*m değerleri sırasıyla 26,18 mM ve 26,20 mM, V_{max} değerleri de sırasıyla 1,96 ve 6,35 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. Serbest ve immobilize NIT-P1-118 örneklerinin (R,S)-mandelonitrile karşı kinetik paremetreleri ve katalitik etkinlik oranı Çizelge 4.6.'da verilmiştir. Katalitik etkinlik oranı yüksek olan immobilize enzim PVA-NIT-P1-118 (0,41) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.44. Serbest NIT-P1-118 enziminin (R,S)-mandelonitril için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.45. ALG-NIT-P1-118 enziminin (R,S)-mandelonitril için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.46. PVA-NIT-P1-118 enziminin (R,S)-mandelonitril için Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.6. Serbest ve immobilize NIT-P1-118'lerin (R,S)-mandelonitrile karşı kinetik parametreleri

	Km (mM)	Vmax (U/mg prot.)	Katalitik etkinlik oranı $(V_{max}/K_m)_{immobilize}/(V_{max}/K_m)_{serbest}$
Serbest	8,52	5	-
PVA-NIT-P1-118	26,20	6,35	0,41
ALG-NIT-P1-118	26,18	1,96	0,13

4.2. Tartışma

Son yıllarda, kimyasal katalizörler veya biyokatalizörler kullanılarak nitril bileşiklerinden yüksek değerli karboksilik asitlerin üretimi çalışmaları bu bileşiklerin endüstriyel önemi nedeniyle çok dikkat çekmiştir (Martinkova ve Kren, 2010). Bitkilerde, mantarlarda ve bakterilerde bulunan ve kofaktör gerektirmeyen nitrilazlar (EC 3.5.5.1) bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır (O'Reilly ve Turner, 2003; Ramezani-Pour ve ark., 2015). Bölüm 1.1.'de belirtildiği gibi nitrilaz enzimleri sahip oldukları özellikleri ve kimyasal katalizörlere göre üstünlüklüklerinden dolayı tercih edilmektedirler (Martinkova ve Kren, 2010; Thakur ve ark., 2019). Nitrilazlar endüstriyel ölçekli uygulamalarda tekrar tekrar kullanılarak maliyeti düşürmek amacıyla doğrudan veya hücre immobilizasyonu yöntemleriyle immobilize edilmektedirler (Nigam, 2014; Xue ve ark,. 2010; Kumar ve Bhalla, 2013; He ve ark., 2012). Bölüm 1.1.'de belirtildiği gibi hücre immobilizasyonunun çeşitli dezavantajlarından dolayı bu çalışmamızda doğrudan enzim immobilizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada nitrilazların immobilizasyonunda mekanik ve termal kararlılığının yüksek olması, mikrobiyal ataklara ve organik çözücülere direçli olması, kolay bulunabilirliği ve ucuz olması nedeniyle destek olarak ReliZyme^{TM} (HA 403/S, EP 403/S, EA/S 403/S ve HG/S 403), florisil ve nano silika destekler kullanılmıştır. Ayrıca kovalent immobilizasyona göre enzimin hareket kabiliyetinin daha fazla olduğu sol-jel, PVA ve sodyum alginata hapsetme yöntemleri de nitrilaz immobilizasyonu için araştırılmıştır. İmmobilizasyon çalışmalarında rekombine olarak üretilmiş NIT-104, NIT-105, NIT-106 ve NIT-P1-118 enzimleri ilk defa tarafımızdan kullanılmıştır.

İmmobilizasyon yöntemleri enzim kararlığı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Bolivar ve ark., 2012). Bu nedenle çalışmada oligomerik yapıdaki nitrilaz enziminin kararlılığını artırmak için farklı immobilizasyon yöntemlerinin kullanımı araştırılmıştır. Bu amaçla NIT-104 enziminin immobilizasyonunda modifiye edilmiş HG 403/S, glutaraldehit ile aktifleştirilmiş EA 403/S ve HA 403/S, Montmorillonite K-10 ve PVA kullanılmıştır. NIT-104'ün modifiye ReliZyme^{TM} HG 403/S desteğe

kovalent immobilizasyonu için pH 10,0 tamponu kullanılırken, glutaraldehit ile aktifleştirilmiş ReliZyme™ EA 403/S ve ReliZyme™ HA 403/S için ise pH 7,0 kullanılmıştır. İmmobilizasyondan sonra desteklere bağlanan protein ve aktivite geri kazanım yüzdesi Çizelge 4.1.'de verilmiştir. İmmobilizasyon pH 10,0'da gerçekleştirildiğinde, kovalent bağ enzim üzerindeki lizin artığı ile destek üzerindeki aldehit grubu arasında meydana gelmektedir (Mateo ve ark., 2005). Çizelge 4.1'de belirtildiği gibi belirtilen desteklere kovalent immobilizasyon sonrasında başlangıçta ortama eklenen NIT-104'ün yaklaşık % 75-100 arasında bağlanmış olduğu ancak modifiye ReliZyme™ HG 403/S'e immobilize edilmiş NIT-104'ün aktivite göstermediği, sadece glutaraldehit ile aktifleştirilmiş ReliZyme™ EA 403/S ve ReliZyme™ HA 403/S'e immobilize edilmiş NIT-104'ün sırasıyla % 10 ve % 20 aktivite geri kazanımı olduğu hesaplanmıştır. Bunun sebebi olarak, nitrilazların çoğunun aktif merkezinde sistein, glutamik asit ve lizin amino asit artıklarının bulunması gösterilebilir (Thuku ve ark., 2009). Destek ile enzim arasındaki reaksiyon destek üzerindeki aldehit grubu ile aktif bölgedeki lizin artığı arasında da meydana gelebileceğinden dolayı enzimin aktivitesini kaybettiği sonucuna varılmıştır.

pH 7,0'de kovalent bağ enzimin terminal amino grubu ile desteğe bağlı glutaraldehitin diğer aldehit grubu arasında meydana gelmektedir. Çizelge 4.1'de verilen değerlerden de görüldüğü gibi amino ara kol uzunluğu daha fazla olan HA 403/S desteğinin EA 403/S desteğe göre daha fazla aktivite geri kazanımına sahiptir. Ara kol uzunluğunun immobilize enzimin aktivitesi üzerine olumlu etkisinin olduğu daha önce çeşitli araştırıcılar tarafından rapor edilmiştir (Takahashi ve ark., 1984; Weetall, 1969). Ara kol uzunluğu arttıkça immobilize enzimin moleküler hareketliliği serbest enzime yaklaşacağından dolayı immobilize enzimin aktivitesinde artış gözlenebilmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar, immobilize enzimin aktivitesinin desteğin amino ara kolunun uzunluğuna bağlı olarak arttığını göstermektedir.

NIT-104 enziminin montmorillonite K 10 desteğine adsorbsiyon yöntemi ile immobilize edilmesindeki protein bağlanma verimi % 80 olarak belirlenmesine rağmen aktivite geri kazanımı sadece % 1 düzeyindedir. Montmorillonite K 10 desteği üzerinde enzimlerin amino grubu ile bağ yapacak birçok asidik bölge bulunmaktadır. Enzimin aktif bölgesinde bulunan lizin artığı ile montmorillonite K 10 üzerindeki karboksilik asit arasında oluşacak muhtemel bir iyonik bağ nedeniyle immobilizasyondan sonra enzimin aktivitesinde önemli bir düşüş gözlenmiştir.

PVA-NIT-104 için protein bağlanma verimi ve aktivite geri kazanım oranı sırasıyla % 100 ve % 80 olarak belirlenmiştir. Deneysel sonuçlara bakıldığında enzimin aktif formunun bu yöntem ile korunduğu görülmüştür. Bu nedenle bu enzim preperatları karakterizasyon çalışmaları için kullanılmıştır.

PVA-NIT-104 için enzimin başlangıç derişiminin enzimin aktivitesi üzerine etkisi belirlenmiştir (Şekil 4.14). Enzimin başlangıç derişiminin 0,44 mg/ml ‘den 0,875 mg/mL derişime artırıldığında bağıl aktivitenin % 34’ten % 75’e arttığı görülmüştür. İmmobilizasyonda kullanılan enzim derişimi 1,75 mg /mL olduğu durumda ise bağıl aktivitenin maksimum değere ulaştığı (% 100) belirlenmiştir. Enzim derişimi 1,75 mg/mL’nin üzerine artırıldığında ise PVA-NIT-104’ün bağıl aktivitesinde düşüşlere neden olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç yüksek enzim konsantrasyonun kütle transferini engellediğini göstermektedir.

NIT-105’in Lifetech™ ECR1090M ve Lifetech™ ECR1030M üzerine adsopsiyon yöntemi ile immobilizasyonu çalışılmış ve enzimin desteğe adsorbe olmadığı belirlenmiştir. İmmobilizasyonda kullanılan destekler, stiren ve divinil benzenin kopolimerleşmesiyle elde edilen hidrofobik etkileşim adsorpsiyon yöntemine uygun desteklerdir. NIT-105’in bu deteklere immobilize edilememesi, NIT-105’in hidrofobik etkileşimi gerçekleştirecek amino asit varlığına sahip olmadığını göstermektedir. NIT-105’in PVA jel içerisine hapsetme ile immobilizasyonu (PVA-NIT-105) gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon için en uygun enzim derişimi 2 mg/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5). İmmobilizasyonda kullanılan enzim derişiminin 2 mg/mL’nin üzerindeki değerlerinde ise NIT-104

enziminde olduğu gibi bağıl aktivitenin düştüğü gözlenmiştir.

NIT-106 için yapılan immobilizasyon çalışmalarında farklı yöntemleri denemek için farklı destek materyalleri seçilmiş, protein bağlanma oranları ile aktivite geri kazanım oranları hesaplanmıştır. NIT-106'nın kovalent immobilizasyonu için seçilen nano-GLU, nano-ECH, Flo-GLU ve Flo-ECH üzerine immobilizasyonunda protein bağlanma oranları sırasıyla % 62, % 62, % 42 ve % 90 olarak belirlenmiş fakat aktivite gözlenmemiştir. ReliyZme^{TM} desteklerden HA 403/S, EA 403/S, EP 403/S ve HG 403/S için başlangıç protein derişimi için 3, 6 ve 9 mg/mL enzim kullanıldığında % 100 protein bağlanma verimi hesaplanmış fakat aktivite ölçülememiştir. NIT-106'nın jele hapsetme yöntemi ile immobilizayonunda sol-jel, alginat jel ve PVA jel kullanılmış, yüksek oranda protein bağlanma verimi elde edilmesine rağmen tekrarlanabilir aktivite sonuçları elde edilememiştir. Bu yöntemleri yanısıra NIT-106'nın CLEA ve PCMC preparatları hazırlanmasıyla elde edilen immobilize NIT-106 için benzer şekilde protein bağlanmasına rağmen aktivite gözlenmemiştir.

NIT-P1-118'in immobilizasyonu için PVA jel, alginat jel ve kalsiyum karbonat mikroküre kapsülasyon yöntemleri ile immobilizasyonları çalışılmış ve aktivitesi yüksek olan PVA jele immobilize NIT-P1-118 (PVA-NIT-P1-118) ve alginat jele immobilize NIT-P1-118 (ALG-NIT-P1-118) ile karakterizasyon çalışmalarına devam edilmiştir. PVA-NIT-P1-118 için en uygun başlangıç enzim derişimi 0,5 mg/mL olarak belirlenmiştir. ALG-NIT-P1-118 için en uygun alginat derişimi % 2 ve $CaCl_2$ derişimi % 1 ve enzim derişimi % 0,5 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Serbest ve immobilize nitrilazların aktivitelerine pH'nın etkisini araştırmak için yapılan çalışmalarda serbest ve immobilize NIT-104, NIT-105 ve NIT-P1-118 preparatları için optimum pH değeri 7,5 olarak hesaplanmıştır. Nitrilazların tutuklama yöntemleriyle (PVA ve alginat jel) immobilizasyonları optimum aktivitenin görüldüğü pH değerini değiştirmemiştir. Sonuçlar dikkate alındığında PVA jel ile yapılan immobilizasyonlarda her bir enzimin pH değişimine karşı

direncinin arttığı gözlenmiştir. İmmobilizasyonun ardından enzimlerin üç boyutlu yapısının korunduğunu göstermektedir. ALG-NIT-P1-118 örneklerinde ise enzimin pH değişimine karşı direnci azalmıştır. Cai ve ark. (2014) *Arthrobacter aurescens* nitrilazının asidik bölgede (pH 5,5-7,0) yüksek aktivite gösterdiğini hafif alkali pH değerlerinde ise aktivitesinde keskin bir düşüşün gözlendiğini rapor etmişlerdir. Vejvoda ve ark. (2008*)* serbest *Fusarium solani* O1 nitrilazının optimum pH'sının 7,0-9,0 aralığında olduğunu ve pH 10,0'da ise maksimum aktivitesinin % 29'unu koruduğunu bildirmişlerdir. Xu ve ark. (2019) *Acidovorax facilis* nitrilazını enkapsülasyon yöntemi ile immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyonla enzimin optimum pH değerinin değişmediğini (7,0) olduğunu rapor etmişlerdir. İmmobilize enzimin daha geniş bir pH aralığında yüksek aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Zou ve ark. (2018) rekombine *Acidovorax facilis* nitrilazını çapraz bağlayarak çapraz bağlı hücre agregatlarını oluşturarak immobilize etmişler ve immobilizasyonla optimum pH'nın (7,0) etkilenmediğini rapor etmişlerdir.

Serbest ve immobilize nitrilazların aktivitelerine sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. NIT-104 ve PVA-NIT-104 için optimum sıcaklık değeri 30 ℃ olarak hesaplanmış ve immobilizasyonun optimum sıcaklığı değiştirmediği belirlenmiştir. NIT-105 ve PVA-NIT-105 için optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 25 ℃ ve 35 ℃ olarak belirlenmiştir. NIT-P1-118 için optimum sıcaklık değeri 25 ℃ olarak belirlenirken immobilizasyon sonrasında PVA- NIT-P1-118 ve ALG-NIT-P1-118 için 30 ℃ olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu yüksek sıcaklıklarda immobilize enzimlerin bağıl aktivitelerinin serbest enzimlere göre oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, immobilizasyon ile nitrilazların sıcaklığa bağlı denatürasyona karşı korunduğunu göstermektedir. Cai ve ark. (2014) *Arthrobacter aurescens* nitrilazının optimum sıcaklığının 25 ºC olduğunu ve 45 ºC 'de enzimin başlangıç aktivitesinin % 95'ini kaybettiğini rapor etmişlerdir. Literatürde nitrilazların optimum sıcaklığının immobilizasyonun ardından değiştiğini bildiren bazı çalışmalar bulunmakla birlikte immobilizasyonun enzimin optimum sıcaklığını değiştirmediği gösteren çalışmalar da mevcuttur (Zou ve ark., 2018; Xu ve ark.,

2019; Jamwal ve ark., 2019).

Serbest ve immobilize nitrilazların termal kararlılıklarını araştırmak için yapılan çalışmalar sonucunda immobilize enzimlerin termal kararlılığının özellikle yüksek sıcaklıklarda serbest enzime göre oldukça yüksek oranda arttığı belirlenmiştir. PVA-NIT-105'in 35 ºC'deki yarı ömrü serbest enzime göre 10,78 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. NIT-104-PVA örneklerinin 40 ºC'deki yarı ömrü ise serbest enzimden 18 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. ALG-NIT-P1-118 ve PVA-NIT-P1-118 enzim preperatlarının 45 ºC'deki yarı ömrü serbest enzime göre sırasıyla 6,88 ve 16,8 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. PVA jel örneklerinin termal kararlılığının alginat jelden 2,44 kat yüksek olduğu hesaplanmıştır. Jin ve ark. (2016) kapsülasyon yöntemi ile biyo-esinlenmiş silika içerisinde immobilize edilen nitrilazın 50 ve 60 ºC'de 30 saatlik inkübasyonun ardından enzimin başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 85 ve % 50'sini koruduğunu rapor etmişlerdir. Bununla birlikte serbest enzimin 50 ºC'de 30 saat inkübasyonun ardından başlangıç aktivitesinin % 24'ünü koruduğunu ve 60 ºC'deki 8 saatlik inkübasyondan sonra serbest enzimin başlangıç aktivitesinin tamamını kaybettiği bildirilmiştir. Kaul ve ark. (2007) *Alcaligenes faecalis* nitrilazının CLEA yöntemi ile immobilize edilmesi ile elde edilen enzim preperatları ile 30 ve 50 ºC'de yaptıkları termal kararlılık çalışmaları sonucu, immobilize enzimlerin termal kararlılığının serbest enzime göre 5 kat fazla olduğunu bildirmişlerdir.

İmmobilize nitrilaz örneklerinin 5℃ ve oda sıcaklığında depolama kararlılıkları incelenmiştir. NIT-104 oda sıcaklığında 5 gün sonrasında aktivitesinin tamamını kaybederken PVA-NIT-104 ise 30 günün sonunda başlangıç aktivitesinin % 60'ını korumuştur. 30 günlük inkübasyon süresi sonunda 5℃ deki NIT-104 aktivitesinin sadece % 2'sini korurken PVA-NIT-104 ise başlangıç aktivitesinin % 92'sini korumuştur. NIT-105 örnekleri 5℃'de 6 günlük inkübasyonun sonunda aktivitesinin tamamını kaybederken PVA-NIT-105 30 günün sonunda başlangıç aktivitesinin halen % 40'ını korumuştur. NIT-P1-118, ALG- NIT-P1-118 ve PVA-NIT-P1-118 örneklerinin 5℃'de depolanma sonrasında NIT-P1-118'in 27 günün

sonunda aktivitesini tamamen kaybettiği, ALG-NIT-P1-118 ve PVA- NIT-P1-118'in ise 30 günün sonunda başlangıç aktivitelerinin sırasıyla % 74 ve % 60'ını koruduğu belirlenmiştir. Oda sıcaklığında bekletilen NIT-P1-118 13 günün sonunda aktivitesinin tamamını kaybederken, ALG-NIT-P1-118 ve PVA- NIT-P1-118 örnekleri 30 günün sonunda sırasıyla başlangıç aktivitesinin % 40 ve % 45'ini korumuştur. Tüm immobilize nitrilaz örneklerinin depolama kararlılığı serbest nitrilazların depolama kararlılığından oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. İmmobilizasyon ile enzimin çevre şartlarına karşı direncinin arttığı gözlenmiştir. Jamwal ve ark. (2019) nitrilaz enzimini Schiff bazı yoluyla elde edilen akriloil çapraz bağlı selüloz dialdehite immobilize etmişler ve ayrıca farklı bir yöntem olarak Schiff bazın indirgenmesi için $NaBH_4$ kullanmışlardır. 4 ºC'de yapılan depolama kararlılığı çalışmalarında 30 günün sonunda, Schiff bazı indirgenmemiş ve indirgenmiş enzim örneklerinin kalan aktiviteleri sırasıyla % 48 ve % 58 olarak belirlemişlerdir. Aynı koşullarda serbest enzim başlangıç aktivitesinin % 21'ini korumuştur. Xu ve ark. (2019) serbest ve immobilize enzimin 4 ºC'deki depolama kararlılığının belirlenmesi için yaptıkları çalışmada, 17 günlük depolama süresi sonunda serbest enzimin başlangıç aktivitesinin % 52,1'ini kaybettiğini, immobilize enzimin ise başlangıç aktivitesnin % 90'ını koruduğunu rapor etmişlerdir.

İmmobilize nitrilazların tekrar kullanım kararlılığının belirlenmesi amacıyla substrat olarak PVA-NIT-104 için akrilonitril, PVA-NIT-105 için benzonitril, PVA-NIT-P1-118 ve ALG-NIT-P1-118 için (R,S)-mandelonitril kulanılarak, pH 7,5 ve 25 ºC'de kesikli reaktörde gerçekleştirilmiştir. PVA-NIT-104 için 3 kullanım sonunda aktivitenin biraz düştüğü ve 15 kez kesikli reaktörde kullanım sonrasında başlangıç aktivitesinin % 84'ünü koruduğu belirlenmiştir. PVA-NIT-105'in kesikli reaktörde 20 kullanım sonrasında başlangıç aktivitesinin % 65'ini koruduğu belirlenmiştir. ALG- NIT-P1-118 ve PVA- NIT-P1-118'in kesikli reaktörde 20 kez kullanımı sonrasında başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 95 ve % 50'sini koruduğu belirlenmiştir. Xu ve ark. (2019) biyoesinlenmiş silika içerisinde enkapsülasyon yöntemi ile immobilize ettikleri enzim ile yaptıkları tekrar kullanım kararlılığı

çalışmasında 16 kullanımın ardından enzimin başlangıç aktivitesinin % 94,2'sini koruduğunu rapor etmişlerdir. Kaul ve ark. (2007) immobilize nitrilaz CLEA örneklerinin 5 kullanımın ardından başlangıç aktivitesinin % 90'ını koruduğunu bildirmişlerdir. Jamwal ve ark. (2019) akriloil çapraz bağlı selüloz dialdehit üzerine kovalent olarak immobilize ettikleri nitrilazı kullanarak yaptıkları çalışmada, 16 kullanımın ardından enzimin başlangıç aktivitesinin % 19'unu koruduğunu bildirmişlerdir. Nigam ve ark. (2009) nitrilaz içeren *Streptomyces sp*. hücrelerini agar-agar içerisinde immobilize ederek akrilonitrilin akrilik asite dönüşümünü katalizlemek için kullanmışlar ve immobilize hücrelerin 25 kez tekrar kullanımının ardından başlangıç aktivitelerinin % 35'ini kaybettiğini rapor etmişlerdir

Serbest ve immobilize nitrilazların pH 7,5'da ve optimum aktivite gösterdikleri sıcaklıklarda farklı başlangıç derişmlerindeki farklı substratlar kullanılarak aktiviteleri belirlenmiştir. (Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.4). Elde edilen aktivite değerlerine karşı substrat derişimleri kullanılarak çizilen Lineweaver–Burk grafiklerinden yararlanılarak kinetik parametreler hesaplanmıştır. NIT-104 için hesaplanan K_m değerleri, akrilonitril, benzonitril, 3-piridinkarbonitril ve benzoil syanid için sırasıyla 15,5; 6,5; 4,6 ve 1,2 mM, V_{max} değerleri ise sırasıyla 1,8; 1,6; 1,1 ve 0,2 U/mg protein olarak belirlenmiştir. PVA-NIT-104 için hesaplanan Km değerleri ise akrilonitril, benzonitril, 3-piridinkarbonitrilve benzoil syanid için sırasıyla 11,7; 5,8; 3,4; ve 3,0 mM, V_{max} değerleri ise sırasıyla 1,6; 1,4; 0,5 ve 0,1 U/mg protein olarak belirlenmiştir. Akrilonitril, benzonitril, 3-piridinkarbonitril ve benzoilsyanid için katalitik etkinlik oranları $((V_{max}/K_m)_{immo}./(V_{max}/K_m)_{serb}.)$ sırasıyla 1,18, 0,98, 0,62 ve 0,18 olarak hesaplanmıştır. NIT-105 ve PVA-NIT-105 için substrat olarak benzonitril kullanıldığında hesaplanan K_m değerleri sırasıyla 1,85 mM ve 4,9 mM olarak hesaplanırken V_{max} değerleri ise sırasıyla 3,02 U/mg protein ve 2,0 U/mg protein olarak belirlenmiştir. (R,S)-mandelonitril substrat olarak kullanıldığında NIT-P1-118, ALG-NIT-P1-118 ve PVA-NIT-P1-118 için hesaplanan K_m değerleri sırasıyla 8,52 mM, 26,18 mM ve 26,20 mM olarak, V_{max} değerleri ise sırasıyla 5,0 U/mg protein, 1,96 U/mg protein ve 6,35 U/mg protein

olarak belirlenmiştir. K_m değerlerinin serbest enzimden farklı olması, difüzyon sınırlamalarından, immobilizasyondan sonra enzimin yapısında meydana gelen değişikliklerden ve enzimin mikro çevresi ile çözelti arasındaki substrat konsantrasyonunun farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir (Wiseman, 1986; Rogalski ve ark., 1997). NIT-104 enzimine benzer sonuçlar Jamwal ve ark. (2019) yaptığı çalışmada da rapor edilmiştir. İmmobilize enzimin (R,S)-mandelonitrile karşı K_m değeri serbest enzimle karşılaştırıldığında azaldığı rapor edilmiştir. İmmobilize nitrilazların V_{max} değerlerindeki düşüş enzimin immobilizasyon sonrasında yapısında değişiklikler olduğunu göstermektedir. Dhillon ve ark. (1999) *Pseudomonas sp.*'den kısmi olarak saflaştırdığı nitrilazın akrilonitril ve benzonitril için K_m değerlerini sırasıyla 5,88 ve 12,27 mM olarak bulmuşlardır. Shen ve ark. (2009) *Arthrobacter nitroguajacolicus* ZJUTB06-99 nitrilazının akrilonitril için K_m değerini 11,71 mM olarak rapor etmişlerdir. Vejvoda ve ark. (2008) *Fusarium solani* O1 nitrilazının 3-piridinkarbonitril için K_m değerini 3,2 mM olarak belirlemişlerdir. Jiang ve ark. (2017) L-lizin ile modifiye edilmiş D155 reçineye immobilize ettikleri nitrilaz için substrat olarak mandelonitril kullanıldığında K_m değerlerini serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 10,33 mM ve 12,74 mM olarak belirlemişlerdir.

NIT-104 ve PVA-NIT-104 örnekleri (pH 7,5 ve 30 ºC) farklı başlangıç derişimindeki akrilonitrilin akrilik aside dönüşmesini için kullanılmıştır (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21). Akrilonitrilin akrilik aside dönüşme oranı, PVA-NIT-104 kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada daha yüksek orana ulaşmıştır. Örneğin; 0,1 M akrilonitril kullanıldığı durumda, NIT-104'ün substratın tamamını 60 dakika da ürüne dönüştürebildiği halde PVA-NIT-104 için bu süre 30 dakika olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde 1 M akrilonitril kullanıldığında NIT-104 katalizli dönüşüm % 39 olurken, PVA-NIT-104 katalizli dönüşüm % 67 olarak belirlenmiştir. Nigam ve ark. (2009) serbest ve immobilize Streptomyces *sp.* hücrelerini kullanarak pH 7,5 ve 50 ºC'de akrilonitrilin akrilik aside katalizlenmesi çalışmasını yaptıklarını rapor etmişlerdir. 0,5 M akrilonitril kullanıldığında immobilize hücrelerinin 6 saatlik inkübasyonun ardından substratı ürüne dönüştürme oranının % 71 olduğunu ve

serbest hücrelerin ise 3 saatte substratın tamamını ürüne dönüştürdüğünü rapor etmişlerdir.

Serbest ve immobilize NIT-104 enzimlerinin seçiciliğinin belirlenmesi amacı ile asid/amid oranı hesaplanmıştır. NIT-104 asit/amid oranı 8/1, PVA-NIT-104 asit/amid oranı 9/1 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar ana ürünün akrilik asit ve immobilize enzimin seçiciliğinin serbest enzimden daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.7. İmmobilizasyonda kullanılan enzim türleri ve spesifik substratları için bazı deneysel parametreleri

Enzim	NIT-104	NIT-105	NIT-106	NIT-P1-118
İmmobilizasyon Yöntemi*	-HA 403/S (K) -EA 403/S (K) -HG 403/S (K) -Mont. K 10 (A) -PVA jel (H)	- Lifetech™ ECR1090M (A) - Lifetech™ ECR1030M (A) -PVA jel (H)	-Nano GLU ve nano-ECH (K) -Flo-GLU ve Flo-ECH (K) -ReliyZme™ (HA 403/S, EA 403/S, EP 403/S, HG 403/S) (K) -Sol-jel (H) -Alginat jel (H) -PVA jel (H) -CLEA (ÇB) -PCMC (A)	-PVA jel (H) -Alginat jel (H) -$CaCO_3$ mikroküre (H)
En Uygun İmmobilizasyon Yöntemi	PVA jel	PVA jel	Uygun değil	-PVA jel -Alginat jel
Substrat	Akrilonitril	Benzonitril	(R,S)-mandelonitril	(R,S)-mandelonitril
Optimum pH	-Serbest 7,5 -İmmobilize 7,5	-Serbest 7,5 -PVA 7,5	-	Serbest 7,5 ALG-NIT 7,5 PVA-NIT 7,5
Optimum Sıcaklık (ºC)	-Serbest 30 -İmmobilize 30	-Serbest 25 -PVA 35	-	-Serbest 25 -ALG-NIT 30 -PVA-NIT 30
K_m (mM)	-Serbest 15,5 -PVA 11,7	-Serbest 1,85 -PVA 4,9	--	-Serbest 8,52 -ALG. 26,18 -PVA 26,20
V_{max} (U/mg protein)	-Serbest 1,8 -PVA 1,6	-Serbest 3,02 -PVA 2,0	-	-Serbest 5 -ALG. 1,96 -PVA 6,35

*A:Adsorbsiyon, K:kovalent, H:hapsetme, ÇB:çapraz bağlama,

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. NIT-105'in PVA jel yöntemiyle immobilizasyonunda en uygun enzim derişimi 2 mg /mL olarak belirlenmiştir. Serbest NIT-105 için optimum pH, sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 7,5, 25 ºC, 1,85 mM ve 3,02 U/mg prot. olarak belirlenmiştir. PVA-NIT-105 için optimum pH, sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 7,5, 35 ºC, 4,9 mM ve 2,0 U/mg prot. olarak belirlenmiştir.
2. İmmobilizayon ile NIT-105'in termal ve depolama kararlılığının arttığı, tekrar kullanım kararlılığında ise 20 kez kullanımının ardından başlangıç aktivitesinin % 65'ini koruduğu belirlenmiştir.
3. NIT-104'ün immobilizasyonunda en uygun immobilizasyon yöntemi olarak PVA jel immobilizasyon yöntemi belirlenmiştir. NIT-104'ün PVA jel yöntemiyle immobilizasyonunda en uygun enzim derişimi 1,75 mg protein /mL olarak belirlenmiştir.
4. Serbest NIT-104 için optimum pH ve sıcaklık değerleri 7,5 ve 30 ºC olarak belirlenmiştir. K_m ve V_{max} değerleri akrilonitril, benzonitril, 3-piridinkarbonitril ve benzoil syanid için sırasıyla 15,5, 6,5, 4,6 ve 1,2 mM; 1,8, 1,6, 1,1 ve 0,2 U/mg prot. olarak belirlenmiştir. PVA-NIT-104 için optimum pH ve sıcaklık değerleri 7,5 ve 30 ºC olarak belirlenmiştir. K_m ve V_{max} değerleri akrilonitril, benzonitril, 3-piridinkarbonitril ve benzoil syanid için sırasıyla 11,7, 5,8, 3,4 ve 3,0 mM; 1,6, 1,4, 0,5 ve 0,1 U/mg prot. olarak belirlenmiştir.
5. PVA-NIT-104 enzim örneklerinin termal ve depolama kararlılıklarının serbest enzime göre oldukça yüksek olduğu, tekrar kullanım kararlığında ise 15 kullanımın ardından immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin % 84'ünü koruduğu belirlenmiştir.

6. PVA-NIT-104 enzim örneklerinin yüksek derişimlerde akrilonitril kullanılarak yüksek verimlerde akrilik asit sentezi için uygun olduğu belirlenmiştir.
7. NIT-P1-118 enzimi için en uygun immobilizasyon yöntemi olarak PVA ve alginat jel immobilizasyon yöntemi belirlenmiştir. NIT-P1-118 enziminin alginat jel immobilizasyonunda en uygun alginat ve kalsiyum klorür derişimi sırasıyla % 2 ve % 1 olarak belirlenmiştir. NIT-P1-118 enziminin alginat jel immobilizasyonunda en uygun enzim derişimi 0,5 mg/mL olarak belirlenmiştir. PVA jel yöntemiyle NIT-P1-118'in immobilizasyonunda enzim derişimi 0,5 mg/mL olarak belirlenmiştir.
8. Serbest NIT-P1-118 için optimum pH, sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 7,5, 25 ºC, 8,52 mM ve 5,0 U/mg prot. olarak belirlenmiştir. ALG-NIT-P1-118 için optimum pH, sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 7,5, 30 ºC, 26,18 mM ve 1,96 U/mg prot. olarak belirlenmiştir. PVA-NIT-P1-118 için optimum pH, sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 7,5, 30 ºC, 26,20 mM ve 6,35 U/mg prot. olarak belirlenmiştir.
9. (R,S)-mandelonitrile karşı aktivite yönünden tekrar kullanım kararlılığı en yüksek olan NIT-P1-118 örneği ALG-NIT-P1-118 olarak belirlenmiştir.
10. ALG-NIT-P1-118 ve PVA-NIT-P1-118 enzim örneklerinin oda sıcaklığında yapılan depolama kararlılığının biririne yakın olduğu ancak 5 ºC'deki depolama kararlılığının ALG-NIT-P1-118 örneklerinde daha yüksek olduğu belirlenmiştir.
11. Benzonitrile karşı en yüksek aktiviteye sahip enzim NIT-105 ve (R,S)-mandelonitrile karşı kiral seçiciliği en yüksek olan enzim NIT-106 olmakla birlikte NIT-P1-118 enziminin de kiral seçiciliğinin yüksek olduğu belirlenmiştir.

12. NIT-106 aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi olduğu ve en yüksek aktivite değerine etanol kullanılarak ulaşılmıştır.
13. NIT-106 immobilizasyonu için denenen kovalent immobilizasyon (nano-GLU, nano-ECH, Flo-ECH, Flo-GLU, Relizyme^{TM} destekler), alginat ve PVA jel ile hapsetme, PCMC ve CLEA yöntemlerinden hiçbirisinde aktif immobilize nitrilaz elde edilememiştir.

5.2. Öneriler

1. PVA jel yöntemiyle immobilize edilen NIT-104 enzimi endüstriyel ölçekli akrilik asit sentezinde kullanımının araştırılması önerilmektedir.
2. PVA-NIT-P1-118 ve ALG-NIT-P1-118 enzim örnekleri diğer mandelik asit türevlerinin sentezlenmesindeki kullanımı araştırılabilir.
3. Enantiyoseçiciliği olan NIT-P1-118 enzimi (R)-mandelik asit sentezlenmesindeki kullanımının belirlenmesi amacıyla reaksiyon koşullarının optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilebilir.
4. Enantiyoseçiciliği olan NIT-106 enziminin immobilizasyonu çalışmasında pek çok farklı yöntem denenmiş olmasına rağmen daha farklı bir immobilizasyon yöntemi kullanılarak (R)-mandelik asit ve türevlerinin (Örneğin; (R)-2-kloro mandelik asit) elde edilmesindeki kullanımı araştırılabilir.
5. Farklı boyutlarda çeşitli tipte reaktörler tasarlanarak akrilik asit, enantiyosaf mandelik asit ve benzoik asitin gram düzeyinde sentezi çalışılabilir.

KAYNAKLAR

Agarwal, A., Nigam, V.K., 2014. Nitrilase mediated conversion of indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 3:351-357.

Alagöz, D., 2012. Hidroksilnitril Liyaz'ın Çeşitli Meyve Çekirdeklerinden Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Adana, 1431.

Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F.J., Ballesteros, A., 2006. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. TRENDS in Biotechnology, 24:281-287.

Almatawah, Q.A., Cramp, R., Cowan, D.A., 1999. Characterization of an inducible nitrilase from a thermophilic bacillus. Extremophiles, 3:283-291.

Alptekin, Ö., Tükel, S.S., Alagöz, D., Yıldırım, D., 2009. Characterization and properties of catalase immobilized onto controlled pore glass and its application in batch and plug flow type reactors. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 58:124-131.

Asano, Y., TAMURA, K.i., Doi, N., Ueatrongchit, T., H-KITTIKUN, A., Ohmiya, T., 2005. Screening for new hydroxynitrilases from plants. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 69:2349-2357.

Badoei-Dalfard, A., Karami, Z., Ramezani-pour, N., 2016. Bench scale production of nicotinic acid using a newly isolated Stenotrophomonas maltophilia AC21 producing highly-inducible and versatile nitrilase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 133:552-559.

Banerjee, A., Dubey, S., Kaul, P., Barse, B., Piotrowski, M., Banerjee, U., 2009. Enantioselective nitrilase from Pseudomonas putida: cloning, heterologous expression, and bioreactor studies. Molecular Biotechnology, 41:35-41.

Banerjee, A., Sharma, R., Banerjee, U., 2002. RETRACTED ARTICLE: The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. Applied Microbiology and Biotechnology, 60:33-44.

Bhalla, T.C., Miura, A., Wakamoto, A., Ohba, Y., Furuhashi, K., 1992. Asymmetric hydrolysis of α-aminonitriles to optically active amino acids by a nitrilase of Rhodococcus rhodochrous PA-34. Applied Microbiology and Biotechnology, 37:184-190.

Bhatia, K., Chauhan, K., Attri, C., Seth, A., 2017. Improving stability and reusability of *Rhodococcus pyridinivorans* NIT-36 nitrilase by whole cell immobilization using chitosan. International Journal of Biological Macromolecules, 103:8-15.

Bilgin, R., Yalcin, M.S., Yildirim, D., 2016. Optimization of covalent immobilization of Trichoderma reesei cellulase onto modified ReliZyme HA403 and Sepabeads EC-EP supports for cellulose hydrolysis, in buffer and ionic liquids/buffer media. Artif Cells Nanomed Biotechnol., 44:1276–1284.

Binay, B., Alagoz, D., Yildirim, D., Celik, A., Tukel, S.S., 2016. Highly stable and reusable immobilized formate dehydrogenases: promising biocatalysts for in situ regeneration of NADH. Beilstein J Org Chem., 12:271–277.

Bolivar, J.M., Rocha-Martín, J., Mateo, C., Guisan, J.M., 2012. Stabilization of a highly active but unstable alcohol dehydrogenase from yeast using immobilization and post-immobilization techniques. Process Biochem., 47:679–686.

Boratyński, J., Żal, T., 1990. Colorimetric micromethods for glutaraldehyde determination by means of phenol and sulfuric acid or phenol and perchloric acid. Analytical Biochemistry, 184, 259-262.

Brady, D., Beeton, A., Zeevaart, J., Kgaje, C., Van Rantwijk, F., Sheldon, R., 2004. Characterisation of nitrilase and nitrile hydratase biocatalytic systems. Applied Microbiology and Biotechnology, 64:76-85.

Brena, B., González-Pombo, P., Batista-Viera, F., 2013. Immobilization of enzymes: a literature survey. Immobilization of Enzymes and Cells:15-31.

Brinker, C.J., Scherer, G.W., 2013. Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing. Academic press.

Brown, D.L., Glatz, C.E., 1987. Aggregate breakage in protein precipitation. Chemical Engineering Science, 42:1831-1839.

Brown, L., 1979. High-performance liquid chromatographic determination of acrylic acid monomer in natural and polluted aqueous environments and polyacrylates. Analyst, 104:1165-1170.

Cabrera, M.Á., Blamey, J.M., 2017. Cloning, overexpression, and characterization of a thermostable nitrilase from an Antarctic Pyrococcus sp. Extremophiles, 21:861-869.

Cai, W., Su, E., Zhu, S., Ren, Y., Wei, D., 2014. Characterization of a nitrilase from Arthrobacter aurescens CYC705 for synthesis of iminodiacetic acid. The Journal of General and Applied Microbiology, 60:207-214.

Campàs, M., Marty, J.-L., 2006. Encapsulation of enzymes using polymers and sol-gel techniques, In: Immobilization of Enzymes and Cells. Springer, 77-85.

CHEN, Y., XUE, Y.-p., LIU, Z.-q., ZHENG, Y.-g., 2010. Review on biocatalytic synthesis of R-mandelic acid. Fine and Specialty Chemicals 2.

Chmura, A., Rustler, S., Paravidino, M., van Rantwijk, F., Stolz, A., Sheldon, R.A., 2013. The combi-CLEA approach: enzymatic cascade synthesis of enantiomerically pure (S)-mandelic acid. Tetrahedron: Asymmetry, 24:1225-1232.

Cho, S.W., Rhee, J.S., 1993. Immobilization of lipase for effective interesterification of fats and oils in organic solvent. Biotechnology and Bioengineering, 41:204-210.

Cui, J., Tan, Z., Han, P., Zhong, C., Ja, S., 2017. Enzyme Shielding in a Large Mesoporous Hollow Silica Shell for Improved Recycling and Stability

Based on CaCO3 Microtemplates and Biomimetic Silicification. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65:3883−3890.

David, A.E., Yang, A.J., Wang, N.S., 2011. Enzyme stabilization and immobilization by sol-gel entrapment, In: Enzyme Stabilization and Immobilization. Springer, 49-66.

Dennett, G.V., Blamey, J.M., 2016. A new thermophilic nitrilase from an Antarctic hyperthermophilic microorganism. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 4:5.

Dhillon, J., Chhatre, S., Shanker, R., Shivaraman, N., 1999. Transformation of aliphatic and aromatic nitriles by a nitrilase from *Pseudomonas* sp. Canadian Journal of Microbiology, 45:811-815.

Dong, H.-P., Liu, Z.-Q., Zheng, Y.-G., Shen, Y.-C., 2010. Novel biosynthesis of (R)-ethyl-3-hydroxyglutarate with (R)-enantioselective hydrolysis of racemic ethyl 4-cyano-3-hydroxybutyate by Rhodococcus erythropolis. Applied Microbiology and Biotechnology, 87:1335-1345.

Doscher, M.S., Richards, F.M., 1963. The activity of an enzyme in the crystalline state: Ribonuclease S. Journal of Biological Chemistry, 238:2399-2406.

Ema, T., Ide, S., Okita, N., Sakai, T., 2008. Highly efficient chemoenzymatic synthesis of methyl (R)-o-chloromandelate, a key intermediate for clopidogrel, via asymmetric reduction with recombinant *Escherichia coli.* Advanced Synthesis & Catalysis, 350:2039-2044.

Feldberg, L., Sasson, Y., 1994. Copper-catalysed oxidation of hydroxy compounds by tert-butyl hydroperoxide under phase-transfer conditions. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1807-1807.

Fruhwirth, G., Paar, A., Gudelj, M., Cavaco-Paulo, A., Robra, K.-H., Gübitz, G., 2002. An immobilised catalase peroxidase from the alkalothermophilic Bacillus SF for the treatment of textile-bleaching effluents. Applied Microbiology and Biotechnology, 60:313-319.

Gao, X., 2004. Immobilization of lipases via sol-gel procedures and application of the immobilized lipases in oleochemical reactions. The University of Nebraska-Lincoln.

Gavagan, J., DiCosimo, R., Eisenberg, A., Fager, S., Folsom, P., Hann, E., Schneider, K., Fallon, R., 1999. A Gram-negative bacterium producing a heat-stable nitrilase highly active on aliphatic dinitriles. Applied microbiology and biotechnology, 52:654-659.

Ge, J., Lu, D., Wang, J., Liu, Z., 2009. Lipase nanogel catalyzed transesterification in anhydrous dimethyl sulfoxide. Biomacromolecules, 10:1612-1618.

Goldlust, A., Bohak, Z., 1989. Induction, purification, and characterization of the nitrilase of Fusarium oxysporum f. sp. melonis. Biotechnology and Applied Biochemistry, 11:581-601.

Gröger, H., 2001. Enzymatic routes to enantiomerically pure aromatic α-hydroxy carboxylic acids: a further example for the diversity of biocatalysis. Advanced Synthesis & Catalysis, 343:547-558.

Guisan, J.M., 2006. Immobilization of enzymes and cells. Springer.

Guo-yan, Z., Jin, T., Liang-yu, Z., Shu-gui, C., 2011. Molecular basis for stereospecific hydrolysis of ethyl mandelate by thermophilic esterase. ChemıcaL Research IN Chınese Unıversıtıes, 27:841-844.

Harper, D.B. 1977b. Microbial metabolism of aromatic nitriles. Biochem. Journal, 165:309-319.

Harper, D.B., 1977. Microbial metabolism of aromatic nitriles. Enzymology of C–N cleavage by Nocardia sp.(Rhodochrous group) NCIB 11216. Biochemical Journal, 165:309-319.

Harper, D.B., 1977a. Fungal degradation of aromatic nitriles: enzymology of C-N cleavage by Fusarium solani. Biochem. Journal, 167:685–692.

Harper, D.B., 1985. Characterization of a nitrilase from Nocardia sp.(Rhodochrous group) NCIB 11215, using p-hydroxybenzonitrile as sole carbon source. The International Journal of Biochemistry, 17:677-683.

Hassan, C.M., Peppas, N.A., 2000. Structure and applications of poly (vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. Biopolymers· PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites, 37-65.

He, L., Chen, Y., Wu, X., Xu, Y., 2016. Magnetic Fe_3O_4/Alginate Cell Beads: Application in Enzymatic Synthesis of Pharmaceutical Intermediate. Journal of Computational and Theoretical Nanoscience, 13:2264-2268.

He, Y.-C., Xu, J.-H., Pan, J., Ouyang, L.-M., Xu, Y., 2008. Preparation of (R)-(−)-mandelic acid and its derivatives from racemates by enantioselective degradation with a newly isolated bacterial strain Alcaligenes sp. ECU0401. Bioprocess and Biosystems Engineering, 31:445-451.

He, Y.-C., Zhou, Q., Ma, C.-L., Cai, Z.-Q., Wang, L.-Q., Zhao, X.-Y., Chen, Q., Gao, D.-Z., Zheng, M., Wang, X.-D., 2012. Biosynthesis of benzoylformic acid from benzoyl cyanide by a newly isolated Rhodococcus sp. CCZU10-1 in toluene–water biphasic system. Bioresource Technology, 115, 88-95.

Hench, L. L., West, J. K., 1990.The sol-gel process. Chem. Rev., 90:33-72.

Hook, R.H., Robinson, W.G., 1964. Ricinine nitrilase: II. Purification and properties. Journal of Biological Chemistry, 239:4263-4267.

Jabbari, E., Tavakoli, J., Sarvestani, A.S., 2007. Swelling characteristics of acrylic acid polyelectrolyte hydrogel in a dc electric field. Smart Materials and Structures, 16:1614.

Jamwal, S., Dautoo, U.K., Ranote, S., Dharela, R., Chauhan, G.S., 2019. Enhanced catalytic activity of new acryloyl crosslinked cellulose dialdehyde-nitrilase Schiff base and its reduced form for nitrile hydrolysis. International Journal of Biological Macromolecules, 131:117-126.

Jin, L. Q., Guo, D.J., Li, Z.T., Liu Z.Q., Zheng, Y.G., 2016. Immobilization of nitrilase on bioinspired silica for efficient synthesis of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid from 2-hydroxy-4-(methylthio) butanenitrile. Journal Industrial Microbiol Biotechnology, 43:585–593.

Jin, L. Q., Li, Z.T., Liu, Z.Q., Zheng, Y.G., Shen,Y., 2014. Efficient production of methionine from 2-amino-4-methylthiobutanenitrile by recombinant Escherichia coli harboring nitrilase. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 41:1479–1486.

Jiang, W., Tao, R., Yang, Y., Xu, Y., Kang, H., Zhou, X., Zhou, Z., 2017. Production of (R)-(-)-mandelic acid with nitrilase immobilized on D155 resin modified by L-lysine. Biochemical Engineering Journal, 127:32-42.

Jyoti, Bhatia, K., Chauhan, K., Attri, C., Seth, A., 2017. Improving stability and reusability of Rhodococcus pyridinivorans NIT-36 nitrilase by whole cell immobilization using chitosan. International Journal of Biological Macromolecules, 103:8–15.

Kato, Y., Nakamura, K., Sakiyama, H., Mayhew, S.G., Asano, Y., 2000. Novel heme-containing lyase, phenylacetaldoxime dehydratase from *Bacillus sp.* strain OxB-1: purification, characterization, and molecular cloning of the gene. Biochemistry, 39800-809.

Kaul, P., Banerjee, A., Mayilraj, S., Banerjee, U.C., 2004. Screening for enantioselective nitrilases: kinetic resolution of racemic mandelonitrile to (R)-(−)-mandelic acid by new bacterial isolates. Tetrahedron: Asymmetry, 15:207-211.

Kaul, P., Stolz, A., Banerjee, U.e.C., 2007. Cross-linked amorphous nitrilase aggregates for enantioselective nitrile hydrolysis. Advanced Synthesis & Catalysis, 349:2167-2176.

Kobayashı, M., Nagasawa, T., Yamada, H., 1989. Nitrilase of Rhodococcus rhodochrous J1: purification and characterization. European Journal of Biochemistry, 182:349-356.

Kobayashi, M., Izui, H., Nagasawa, T., Yamada, H., 1993. Nitrilase in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile: cloning of the Alcaligenes gene and site-directed mutagenesis of cysteine residues. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90:247-251.

Kobayashi, M., Yanaka, N., Nagasawa, T., Yamada, H., 1990. Nitrilase catalyzed production of pyrazinoic acid, an antimycobacterial agent, from cynopyrazine by resting cells of *Rhodococcus rhodochrous* J1. Antibiotics J., 43(10):1316-1320.

Kobayashi, M., Yanaka, N., Nagasawa, T., Yamada, H., 1990. Purification and characterization of a novel nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* K22 that acts on aliphatic nitriles. Journal of Bacteriology, 172:4807.

Kocatürk, S. 2008. Enginar polifenol oksidazının alginat ve karragenan jellerde immobilizasyonu ve bazı biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Kurland, J., Bryant, D., 1987. Shipboard polymerization of acrylic acid. Plant/Operations Progress, 6:203-207.

Kumar, V., Bhalla, T.C., 2013. Transformation of p-hydroxybenzonitrile to p-hydroxybenzoic acid using nitrilase activity of Gordonia terrae. Biocatalysis and Biotransformation, 31:42-48.

Layh, N., Parratt, J., Willetts, A., 1998. Characterization and partial purification of an enantioselective arylacetonitrilase from Pseudomonas fluorescens DSM 7155. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 5:467-474.

Levy-Schil, S., Soubrier, F., Crutz-Le Coq, A.-M., Faucher, D., Crouzet, J., Pétré, D., 1995. Aliphatic nitrilase from a soil-isolated Comamonas testosteroni sp.: gene cloning and overexpression, purification and primary structure. Gene, 161:15-20.

Li, H., Yang, T., Gong, J.-S., Xiong, L., Lu, Z.-M., Li, H., Shi, J.-S., Xu, Z.-H., 2015. Improving the catalytic potential and substrate tolerance of Gibberella intermedia nitrilase by whole-cell immobilization. Bioprocess and Biosystems Engineering, 38:189-197.

Liron, F., Yoel, S., 1996. Copper catalyzed oxidation of tetralin to 1-(tert-butylperoxy)-tetralin by aqueous tert-butylhydroperoxide under phase transfer conditions. Tetrahedron Letters, 37(12):2063-2066

Liu, M., Sibi, M.P., 2002. Recent advances in the stereoselective synthesis of β-amino acids. Tetrahedron, 40:7991-8035.

Liu, Z.-Q., Lu, M.-M., Zhang, X.-H., Cheng, F., Xu, J.-M., Xue, Y.-P., Jin, L.-Q., Wang, Y.-S., Zheng, Y.-G., 2018. Significant improvement of the nitrilase activity by semi-rational protein engineering and its application in the production of iminodiacetic acid. International Journal of Biological Macromolecules, 116:563-571.

Lunkenheimer, W., Wittig, A., Draber, W., Timmler, H., 1986. Process for the preparation of phenylglyoxylic acid esters. Google Patents.

Mahadevan, S., Thimann, K.V., 1964. Nitrilase: II. Substrate specificity and possible mode of action. Archives of Biochemistry and Biophysics, 107:62-68.

Martınkova, L., Kren, V., 2010. Biotransformations with nitrilases. Curr Opin Chem Biol., 14:130-137.

Mateo, C., Abian, O., Bernedo, M., Cuenca, E., Fuentes, M., Fernandez-Lorente, G., Palomo, J.M., Grazu, V., Pessela, B.C.C., Giacomini, C., 2005. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. Enzyme Microbial Technology, 37:456–462.

Messing, R.A., 1976. Adsorption and inorganic bridge formations, In: Methods in enzymology. Elsevier, 148-169.

Miller, J.M., Conn, E.E., 1980. Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants. Plant Physiology, 65:1199-1202.

Mondal, K., Mehta, P., Gupta, M.N., 2004. Affinity precipitation of *Aspergillus niger* pectinase by microwave-treated alginate. Protein Expression and Purification, 33:104-109.

Ni, K., Wang, H., Zhao, L., Zhang, M., Zhang, S., Ren, Y., Wei, D., 2013. Efficient production of (R)-(−)-mandelic acid in biphasic system by immobilized recombinant *E. coli*. Journal of Biotechnology, 167:433-440.

Ni, L.-B., Zhang, R.-H., Liu, Q.-X., Xia, W.-S., Wang, H., Zhou, Z.-H., 2009. pH- and mol-ratio dependent formation of zinc (II) coordination polymers with

iminodiacetic acid: Synthesis, spectroscopic, crystal structure and thermal studies. Journal of Solid State Chemistry, 182:2698-2706.

Nigam, V., Khandelwal, A., Gothwal, R., Mohan, M., Choudhury, B., Vidyarthi, A., Ghosh, P., 2009. Nitrilase-catalysed conversion of acrylonitrile by free and immobilized cells of *Streptomyces sp*. Journal of Biosciences, 34:21-26.

Noguer, T., Tencaliec, A., Calas-Blanchard, C., Avramescu, A., Marty, J.-L., 2002. Interference-free biosensor based on screen-printing technology and sol-gel immobilization for determination of acetaldehyde in wine. Journal of AOAC International, 85:1382-1389.

Nongkynrih, I., Mahanti, M.K., 1993. Quinolinium dichromate oxidations. Kinetics and mechanism of the oxidative cleavage of styrenes. The Journal of Organic Chemistry, 58:4925-4928.

O'reilly, C., Turner, P., 2003. The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes–a comparative study. Journal of Applied Microbiology, 95:1161-1174.

Osprian, I., Fechter, M.H., Griengl, H., 2003. Biocatalytic hydrolysis of cyanohydrins: an efficient approach to enantiopure α-hydroxy carboxylic acids. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 24:89-98.

Osswald, S., Wajant, H., Effenberger, F., 2002. Characterization and synthetic applications of recombinant AtNIT1 from *Arabidopsis thaliana*. European Journal of Biochemistry, 269:680-687.

Ozyılmaz, G., Gezer, E., 2010. Production of aroma esters by immobilized Candida rugosa and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 64:140-145.

Pai, O., Banoth, L., Ghosh, S., Chisti, Y., Banerjee, U.C., 2014. Biotransformation of 3-cyanopyridine to nicotinic acid by free and immobilized cells of recombinant *Escherichia coli.* Process Biochemistry, 49:655-659.

Pal, K., Banthia, A., Majumdar, D., 2005. Esterification of carboxymethyl cellulose with acrylic acid for targeted drug delivery system. Trends Biomaterials & Artificial Organs, 19:12-14.

Patterson, M.A., Szajewski, R.P., Whitesides, G.M., 1981. Enzymic conversion of. alpha.-keto aldehydes to optically active. alpha.-hydroxy acids using glyoxalase I and II. The Journal of Organic Chemistry, 46:4682-4685.

Piotrowski, M., Schönfelder, S., Weiler, E.W., 2001. The Arabidopsis thaliana isogene NIT4 and its orthologs in tobacco encode β-cyano-L-alanine hydratase/nitrilase. Journal of Biological Chemistry, 276:2616-2621.

Qiu, J., Su, E.-Z., Wang, H.-L., Cai, W.-W., Wang, W., Wei, D.-Z., 2014. Cloning, overexpression, and characterization of a high enantioselective nitrilase from Sphingomonas wittichii RW1 for asymmetric synthesis of (R)-phenylglycine. Applied Biochemistry and Biotechnology, 173:365-377.

Quiocho, F.A., Richards, F.M., 1964. Intermolecular cross linking of a protein in the crystalline state: carboxypeptidase-A. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 52:833.

Raj, J., Sıngh, N., Prasad, S., Seth, A., Bhalla, T. C., 2007. Bioconversion of benzonitrile to benzoic acid using free and agar entrapped cells of *Nocardıa globerula* NHB-2. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 54 (1):79-88.

Rausch, T., Hilgenberg, W., 1980. Partial purification of nitrilase from Chinese cabbage. Phytochemistry, 19:747-750.

Ramezani-Pour, N., Badoei-Dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A., Karami, Z., 2015. Nitrile-metabolizing potential of Bacillus cereus strain FA12; Nitrilase production, purification, and characterization. Biocatalysis and Biotransformation, 33:156-166.

Rebroš, M., Rosenberg, M., Mlichová, Z., Krištofíková, Ľ., 2007. Hydrolysis of sucrose by invertase entrapped in polyvinyl alcohol hydrogel capsules. Food Chemistry, 102:784-787.

Reetz, M.T., 2006. Practical protocols for lipase immobilization via sol-gel techniques, In: Immobilization of Enzymes and Cells. Springer, 65-76.

Rexová-Benková, L., Omelková, J., Kubánek, V., 1982. Endo-d-galacturonanase immobilized by adsorption on porous polyethyleneterephthalate. Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 47:2716-2723.

Robinson, W.G., Hook, R.H., 1964. Ricinine nitrilase: I. Reaction product and substrate specificity. Journal of Biological Chemistry, 239:4257-4262.

Rogalski, J., Szczodrak, J., Pleszczyńsk, M., Fiedurek, J., 1997. Immobilisation and kinetics of Penicillium notatum dextranase on controlled porous glass. Journal of Mol. Cataly. B Enzym., 3:271-283.

Shen, M., Zheng, Y.-G., Shen, Y.-C., 2009. Isolation and characterization of a novel Arthrobacter nitroguajacolicus ZJUTB06-99, capable of converting acrylonitrile to acrylic acid. Process Biochemistry 44:781-785.

Shimizu, S., 2001. Vitamins and related compounds: microbial production. Biotechnology: special processes 10:318-340.

Sirisha, V.L., Jain, A., Jain, A., 2016. Enzyme ımmobilization: An overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. Advances in Food and Nutrition Research, 79:179-211.

Stalker, D.M., Malyj, L.D., McBride, K.E., 1988. Purification and properties of a nitrilase specific for the herbicide bromoxynil and corresponding nucleotide sequence analysis of the bxn gene. Journal of Biological Chemistry, 263:6310-6314.

Stevenson, D., Feng, R., Dumas, F., Groleau, D., Mihoc, A., Storer, A., 1992. Mechanistic and structural studies on Rhodococcus ATCC 39484 nitrilase.“. Biotechnology and Applied Biochemistry, 15:283-302.

Sunder, A.V., Shah, S., Rayavarapu, P., Wangikar, P.P., 2020. Expanding the repertoire of nitrilases with broad substrate specificity and high substrate tolerance for biocatalytic applications. Process Biochemistry, 94:289-296.

Takahashi, K. Yoshimoto, T., Ajima, A., Tamaura, Y., Inada, Y., 1984. Modified Lipoprotein Lipase Catalyzes Ester Synthesis in Benzene. Enzyme, 32:235-240.

Tang, K., Yi, J., Huang, K., Zhang, G., 2009. Biphasic recognition chiral extraction: a novel method for separation of mandelic acid enantiomers. Chirality, 21:390-395.

Terreni, M., Pagani, G., Ubiali, D., Fernández-Lafuente, R., Mateo, C., Guisán, J.M., 2001. Modulation of penicillin acylase properties via immobilization techniques: one-pot chemoenzymatic synthesis of cephamandole from cephalosporin C. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 11:2429-2432.

Thimann, K.V., Mahadevan, S., 1964. Nitrilase: I. Occurrence, preparation, and general properties of the enzyme. Archives of Biochemistry and Biophysics, 105:133-141.

Thuku, R.N., Brady, D., Benedik, M.J., Sewell, B.T., 2009. Microbial nitrilases: versatile, spiral forming, industrial enzymes. J Appl Microbiol., 106:703–727.

Tian, B.R., Zhang, R.X., Chu, H.M., Huang, Q., Wang, Z.Z., 2019. Preparation of α-hydroxyphenylacetic acid with cyclodextrins as an effective phase-transfer catalyst and its reaction mechanism. Turkish Journal of Chemistry, 43:359-368.

Tischer, W., Wedekind, F., 1999. Immobilized enzymes: methods and applications. Biocatalysis-from Discovery to Application, 95-126.

Toprak, A., Tukel, S.S., Yıldırım, D., 2021. Stabilization of multimeric nitrilase via different immobilization techniques for hydrolysis of acrylonitrile to acrylic acid. Biocatalysis and Biotransformation, 39;221-231.

Tsukamoto, J., Haebel, S., Valenca, G.P., Peter, M.G., Franco, T.T., 2008. Enzymatic direct synthesis of acrylic acid esters of mono-and disaccharides. Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology, 83:1486-1492.

Uluğ, N., 2011. Alginat+jelatin jel karışımlarında lipaz immobilizasyonu ve immobilize enzimin bazı biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Edirne, 285439.

Vasič-Racki, D., Jonas, M., Wandrey, C., Hummel, W., Kula, M., 1989. Continuous (R)-mandelic acid production in an enzyme membrane reactor. Applied Microbiology and Biotechnology, 31:215-222.

Vejvoda, V., Kaplan, O., Bezouška, K., Pompach, P., Šulc, M., Cantarella, M., Benada, O., Uhnáková, B., Rinágelová, A., Lutz-Wahl, S., 2008. Purification and characterization of a nitrilase from Fusarium solani O1. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 50:99-106.

Vejvoda, V., Kubáč, D., Davidová, A., Kaplan, O., Šulc, M., Šveda, O., Chaloupková, R., Martínková, L., 2010. Purification and characterization of nitrilase from *Fusarium solani* IMI196840. Process Biochemistry, 45:1115-1120.

Wang, H., Li, G., Li, M., Wei, D., Wang, X., 2014. A novel nitrilase from *Rhodobacter sphaeroides* LHS-305: cloning, heterologous expression and biochemical characterization. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 30:245-252.

Weetall, H.H., 1976. Covalent coupling methods for inorganic support materials, In: Methods in enzymology. Elsevier, 134-148.

Whitesell, J.K., Reynolds, D., 1983. Resolution of chiral alcohols with mandelic acid. The Journal of Organic Chemistry, 48:3548-3551.

Wıseman, 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, 3-17.

Xia, Y.-M., Cho, H.-Y., Fang, Y., Liou, X.-Y., Suh, J.-M., 2002. Relationship between structure and performance of polyacrylates used as chelator in detergents. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 8:108-113.

Xiao, M.-T., Huang, Y.-Y., Ye, J., Guo, Y.-H., 2008. Study on the kinetic characteristics of the asymmetric production of R-(−)-mandelic acid with

immobilized Saccharomyces cerevisiae FD11b. Biochemical Engineering Journal, 39:311-318.

Xie, Z., Feng, J., Garcia, E., Bernett, M., Yazbeck, D., Tao, J., 2006. Cloning and optimization of a nitrilase for the synthesis of (3S)-3-cyano-5-methyl hexanoic acid. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 41:75-80.

Xu, Z., Huang, J.-W., Xia, C.-J., Zou, S.-P., Xue, Y.-P., Zheng, Y.-G., 2019. Enhanced catalytic stability and reusability of nitrilase encapsulated in ethyleneamine-mediated biosilica for regioselective hydrolysis of 1-cyanocycloalkaneacetonitrile. International journal of Biological Macromolecules, 130:117-124.

Xue, Y.-P., Xu, S.-Z., Liu, Z.-Q., Zheng, Y.-G., Shen, Y.-C., 2011. Enantioselective biocatalytic hydrolysis of (R, S)-mandelonitrile for production of (R)-(−)-mandelic acid by a newly isolated mutant strain. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 38:337-345.

Yadav, G.D., Sivakumar, P., 2004. Enzyme-catalysed optical resolution of mandelic acid via RS (∓)-methyl mandelate in non-aqueous media. Biochemical Engineering Journal, 19:101-107.

Yamamoto, K., Fujimatsu, I., Komatsu, K.-I., 1992. Purification and characterization of the nitrilase from *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 responsible for enantioselective hydrolysis of mandelonitrile. Journal of Fermentation and Bioengineering, 73:425-430.

Yamamoto, K., Komatsu, K.-i., 1991. Purification and characterization of nitrilase responsible for the enantioselective hydrolysis from *Acinetobacter sp.* AK 226. Agricultural and Biological Chemistry, 55:1459-1466.

Yildirim, D., Alagöz, D., Toprak, A., Tükel, S., Fernandez-Lafuente, R., 2019. Tuning dimeric formate dehydrogenases reduction/oxidation activities by immobilization. Process Biochemistry, 85:97-105.

Yoshida, T., Mitsukura, K., Mizutani, T., Nakashima, R., Shimizu, Y., Kawabata, H., Nagasawa, T., 2013. Enantioselective synthesis of (S)-2-cyano-2-methylpentanoic acid by nitrilase. Biotechnology Letters, 35:685-688.

Yu, S., Yao, P., Li, J., Ren, J., Yuan, J., Feng, J., Wang, M., Wu, Q., Zhu, D., 2016. Enzymatic synthesis of 3-hydroxypropionic acid at high productivity by using free or immobilized cells of recombinant *Escherichia coli*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 129:37-42.

Yusuf, F., Rather, I.A., Jamwal, U., Gandhi, S.G., Chaubey, A., 2015. Cloning and functional characterization of nitrilase from *Fusarium proliferatum* AUF-2 for detoxification of nitriles. Functional & Integrative Genomics, 15:413-424.

Zhang, C.-S., Zhang, Z.-J., Li, C.-X., Yu, H.-L., Zheng, G.-W., Xu, J.-H., 2012. Efficient production of (R)-o-chloromandelic acid by deracemization of o-chloromandelonitrile with a new nitrilase mined from *Labrenzia aggregata*. Applied Microbiology and Biotechnology, 95:91-99.

Zhang, Q., Wu, Z.-M., Liu, S., Tang, X.-L., Zheng, R.-C., Zheng, Y.-G., 2019. Efficient chemoenzymatic synthesis of optically active pregabalin from racemic isobutylsuccinonitrile. Organic Process Research & Development, 23:2042-2049.

Zhang, W., Yang, M., 2005. Study on siloxane-acrylic aqueous dispersions for use in exterior decorative coatings. Surface Coatings International Part B: Coatings Transactions, 88:107-111.

Zhang, X.-H., Liu, Z.-Q., Xue, Y.-P., Wang, Y.-S., Yang, B., Zheng, Y.-G., 2018. Production of R-mandelic acid using nitrilase from recombinant E. coli cells immobilized with tris (hydroxymethyl) phosphine. Applied Biochemistry and Biotechnology 184, 1024-1035.

Zhang, X.H., Liu, Z.Q., Xue, Y.P., Xu, M., Zheng, Y.G., 2016. Nitrilase-catalyzed conversion of (R,S)-mandelonitrile by immobilized recombinant

Escherichia coli cells harboring nitrilase. Biotechnology and Applied Biochemistry, 63:479-489.

Zhang, X.-H., Wang, C.-Y., Cai, X., Xue, Y.-P., Liu, Z.-Q., Zheng, Y.-G., 2020. Upscale production of (R)-mandelic acid with a stereospecific nitrilase in an aqueous system. Bioprocess and Biosystems Engineering, 1-9.

Zhang, Z.-J., Pan, J., Li, C.-X., Yu, H.-L., Zheng, G.-W., Ju, X., Xu, J.-H., 2014. Efficient production of (R)-(−)-mandelic acid using glutaraldehyde cross-linked *Escherichia coli* cells expressing *Alcaligenes sp.* nitrilase. Bioprocess and Biosystems Engineering, 37:1241-1248.

Zhang, Z.-J., Xu, J.-H., He, Y.-C., Ouyang, L.-M., Liu, Y.-Y., 2011. Cloning and biochemical properties of a highly thermostable and enantioselective nitrilase from Alcaligenes sp. ECU0401 and its potential for (R)-(−)-mandelic acid production. Bioprocess and Biosystems Engineering, 34:315-322.

Zhang, Z.-J., Xu, J.-H., He, Y.-C., Ouyang, L.-M., Liu, Y.-Y., Imanaka, T., 2010. Efficient production of (R)-(−)-mandelic acid with highly substrate/product tolerant and enantioselective nitrilase of recombinant *Alcaligenes sp*. Process Biochemistry, 45:887-891.

Zingg, S., Arnett, E.M., McPhail, A.T., Bothner-By, A.A., Gilkerson, W., 1988. Chiral discrimination in the structures and energetics of association of stereoisomeric salts of mandelic acid with. alpha.-phenethylamine, ephedrine, and pseudoephedrine. Journal of the American Chemical Society, 110:1565-1580.

Zou, S.-P., Huang, J.-W., Xue, Y.-P., Zheng, Y.-G., 2018. Highly efficient production of 1-cyanocyclohexaneacetic acid by cross-linked cell aggregates (CLCAs) of recombinant *E. coli* harboring nitrilase gene. Process Biochemistry, 65:93-99.

ÖZGEÇMİŞ

İlköğrenimine Hasanbey Köyü İlkokulunda başladı ve J&J Konuralp İlköğretim Okulunda tamamladı. Lise öğrenimini ise Şht. Yzb. H.İ. Sert Lisesinde (YDA) tamamladı. 2006 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde üniversite eğitimine başladı ve 2010 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü'nde Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2011 yılında Çukurova Üniversitesi Kimya Bölümü'ne yatay geçiş yaparak 2013 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nın Biyokimya bilim dalında doktora eğitimine başladı. 2011-2019 yılları arasında Çukurova Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak görev yaptı. 2019 yılından itibaren Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Acıgöl Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu Laboratuvar Teknolojisi Programı'nda öğretim görevlisi olarak görev yapmaktadır.