

Biyokatalistlerin İmmobilizasyonu

Yard. Doç. Dr. Filiz ÖZÇELİK

Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi, Tarım Ürünleri Tekn. Böl. — ANKARA

1. GİRİŞ

Biyokatalistlerin yüksek fiyatı birçok durumda bunların yeniden veya sürekli kullanımlarını gerektirmektedir. Buna rağmen doğal enzimlerin veya diğer biyokatalistlerin (organeller veya hücreler) yeniden kullanımı, uygulamada genellikle pek mümkün olmaz. Çünkü bunların reaksiyon karışımından geri alınmaları zordur veya ekonomik değildir.

Biyokatalistler uygulanan işlemle istenilen dönüşümü sağladıktan sonra fiziksel veya kimyasal yöntemlerle inaktif hale getirilir ve bir daha kullanılmaz. Ancak, ilgili dönüşümü gerçekleştiren biyokatalist inaktive edilmeden ortamdan uzaklaştırılabilirse defalarca kullanılması mümkün olur. Bu amaçla, son 15-20 yıl içerisinde biyokatalistlerin immobilizasyonu teknikleri geliştirilmiştir ve özellikle immobilize enzimler endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır (8, 14).

İmmobilizasyon; biyokatalistleri suda çözünmeyen bir taşıyıcıya bağlayarak veya yine suda çözünmeyen bir matris içerisinde tutuklamak suretiyle hareketlerini engellemek, buna karşın substrat ve ürünün hareketine olanak veren bir sistem oluşturmaktır (8, 12, 13).

İmmobilizasyon bilinçli bir biçimde uygulanmazdan önce, sirke üretiminde ve atık su arıtılmasında, taşıyıcılara bağlanmış canlı hücreler olarak, endüstriyel boyutlarda zaten kullanılmıştır. 19. yüzyılın başlarından bu yana odun yongası üzerine adsorbe edilmiş asetik asit bakterileriyle sirke üretilmektedir. Atık su arıtılmasında kullanılan damlatmalı filtrede (trickling filter) çeşitli protophyta ve protozoaların karışık kültürleri çamur partiküllerine yapışır ve atık içerisindeki organik bileşiklerin parçalanmasını katalize ederler (4).

Enzim immobilizasyonu Nelson ve Griffin tarafından 19. yüzyılın başlarında rapor edilmiştir. Buna karşın ancak son 15-20 yıl içerisinde ciddi araştırma ve gelişmelerle, immo-

bilizasyon tekniğinde endüstriyel proseslere uygulanabilecek önemli ilerlemeler elde edilmiştir. Bu konudaki araştırmaların çoğu, enzim üreten şirketler tarafından gerçekleştirilmiş olup, temel amaç enzimin kullanımını ve verimliliğini artırarak ürünün maliyetini düşürmek ve yeni ürünler elde etmek yönünde olmuştur (2, 14).

1971 yılında yapılan 3. Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Simpozyumu (Henniker, USA) ve 1. Enzim Mühendisliği Konferansı'nda «İmmobilize enzim» teriminin kullanılması tavsiye edilmiştir (12).

İmmobilize enzimin serbest (doğal) enzime üstünlükleri şöylece özetlenebilir (4, 12, 13):

- enzimin tekrar kazanılması ve tekrar kullanımı,
- çevre koşullarına (sıcaklık, pH v.s.) karşı dayanıklılık,
- enzimin kinetik özelliklerinin iyileştirilmesi,
- sürekli işlemlere uygulanabilirlik,
- son ürünün enzim içermemesi,
- ürün oluşumunun kontrol altında tutulabilmesi,
- birbirini izleyen çok kademeli reaksiyonlar için uygun oluşu,
- enzimin kendi kendini parçalaması (autolysis, self-digestion) olasılığının azalması.

Hücre içi enzimlerin immobilizasyonu için enzimin hücreden ayrılması gereklidir. Bu işlemi ortadan kaldırmak amacıyla hücrelerin doğrudan immobilizasyonu teknikleri üzerinde çalışılmıştır. İmmobilize hücreler; enzimin izolasyonu, saflaştırılması ve geri alınmasına gerek duyulmayacağı için immobilize enzim sistemlerine kıyasla üstünlük gösterirler. Ayrıca enzim hücre içerisindeyken, kendi doğal çevresinde olduğu için daha karardır (2, 10).

Başlangıçta, hücreler tek aşamalı enzim reaksiyonları için immobilize edilmişlerdir. Bu sistemde enzimler aktif ve stabil olmasına karşılık hücreler ölüdür. Buna karşın özellikle fermentasyon yoluyla elde olunan birçok yararlı bileşik, canlı hücreler içinde bir grup enzim tarafından katalize edilen çok aşamalı reaksiyonlar sayesinde oluşur. Aynı zamanda bu reaksiyonlar çoğunlukla ATP, NAD, NADP ve ko - enzimin ortamda bulunmasına gereksinim gösterirler. Immobilize hücreler canlı olduklarında, böyle çok aşamalı reaksiyonlar için kullanılabilirler. Bu şekildeki immobilize hücreler «immobilize canlı hücreler» olarak tanımlanır (2, 9).

Bu immobilize canlı hücreler sistemi, fermentasyon ve geleneksel immobilize hücre sistemlerinin kombinasyonu olarak görülen yeni bir sistem olup, şu üstünlüklere sahiptir (2, 4, 9);

- Immobilizasyon için kullanılan hücre sayısı azdır,
- Matriks içindeki hücre konsantrasyonu sıvı ortamdakinden fazladır,
- Verimlilik yüksektir, çünkü yoğun hücre tabakası gelişme ile jel taneciğinin yüzeyine yakın yerde oluşur,
- Verimlilik stabilitesi uzun süre korunur, çünkü proses sırasında matriks içindeki hücreler yeniden ürerler,
- ko - faktörleri alıkoyar ve rejenere edebilirler,
- Dilüsyon hızı (μ) hücrenin özgül gelişme hızından bağımsız bir biçimde artırılabilir.

immobilize biyokatalistlerin endüstriyel boyutlardaki uygulamalarından birkaçı Çizelge 1'de gösterilmektedir.

Çizelge 1. Immobilize biyokatalistlere ilişkin bazı endüstriyel uygulamalar *

Biyokatalist	Immobilizasyon yöntemi	Uygulama	Başlama Yılı
Aminoakilaz	Taşıyıcıya bağlama	L. amino asit üretimi	1969
Glikoz izomeraz, hücre	Çapraz bağlama veya hücrenin taşıyıcıya bağlanması	Glikozdan früktoz içeren şurup üretimi	1973
Penisilin akilaz, hücre	Taşıyıcıya bağlama, tutuklama	6 - amino penisilanik asit üretimi	1973
L - aspartaz içeren E.coli hücreleri	Tutuklama	Fumarik asitten L. aspartik asit üretimi	1974
Laktaz (veya β - galaktozidaz)	Taşıyıcıya bağlama	Sütte laktoz hidrolizi	1977
S. cerevisiae hücreleri	Ca - alginat'ta tutuklama	Etanol üretimi	1981

* 4 ve 7 nolu kaynaklardan derlenmiştir.

Serbest enzimlerin ucuz olduğu ve prosesin zaten geliştirilmiş olduğu durumlarda immobilize sistem için yapılacak değişiklik faydalı olmayabilir. Bu nedenle, nişasta hidrolizi gibi geleneksel bazı enzim uygulamalarında immobilize sistem hala kullanılmamaktadır (4).

2. Immobilizasyon Yöntemleri

Biyokatalistler immobilize edilirlerken, hücre veya enzim aktivitesinin bu işlemde kesinlikle etkilenmemesi gerekir. Immobilizasyon işlemi yumuşak koşullarda gerçekleştirilmelidir. Yüksek sıcaklık, kuvvetli asidik veya bazik ortam, organik çözücüler veya yüksek tuz konsantrasyonu aktivite kaybına neden olur (3, 6).

Immobilizasyon yöntemleri; taşıyıcıya bağlama, çapraz bağlama ve tutuklama yöntemleri olarak üç ana grupta sınıflandırılabilir (2, 4, 12, 13).

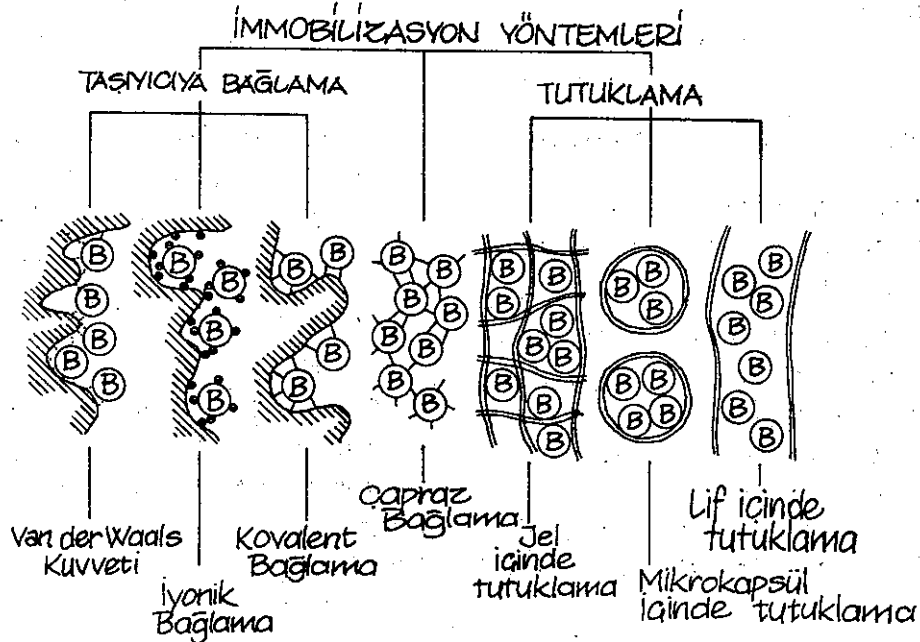
Immobilizasyon yönteminin seçimi, immobilize edilecek biyokatalistin tipine son derece bağlıdır. Polimerik matrisler içinde fiziksel alıkoyma tüm hücre veya hücre organelleri için en uygun tekniktir. Halbuki enzimler daha çok taşıyıcıya bağlanırlar veya çapraz bağlanırlar (3, 4).

5. Uygun Immobilizasyon Yöntemi ve Taşıyıcının Seçimi

Kullanılacak immobilizasyon yöntemi prosesin bilimsel, mühendislik ve ekonomik durumuna bağlıdır. Yöntem; kolay, ucuz, farklı koşullarda uygulanabilir olmalı ve en önemlisi aktivite kaybına neden olmamalıdır (7).

Laboratuvarda gerçekleştirilen birçok immobilizasyon tekniği büyük ölçekte üretim için uygun değildir. Araştırılmış yöntemlerden birinin seçimi gereksinimler ve mevcut bilgiler göz önüne alınarak yapılmalıdır.

Immobilizasyon yöntemi taşıyıcı ve reaktör seçimini etkileyen faktörler Çizelge 3'de verilmiştir.



Şekil 1. Immobilizasyon Yöntemleri (4, 13).

Çizelge 3. İmmobilizasyon yöntemi, taşıyıcı ve reaktör seçimini etkileyen faktörler (12).

İmmobilizasyon yöntemi	Taşıyıcı	Reaktör
Güvenirlilik	İmmobilizasyon yöntemi	İşlem gereksinimleri
Maliyet	Substratın tabiatı	Reaktör masrafı
Aktivitenin korunması	Reaktör tipi	Katalizatör rejenerasyonu
Kararlılık	Mekanik özellikler	Reaksiyon kinetiği

Çizelge 4'de İmmobilizasyon yöntemleri değişik özellikleri yönünden kıyaslanmıştır.

Çizelge 4. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması (12).

Karakteristik	Taşıyıcıya bağlama yöntemi				
	Kovalent bağlama	Adsorbsiyon	İyonik bağlama	Çapraz bağlama yöntemi	Tutuklama yöntemi
Preparasyon	zor	kolay	kolay	zor	zor
Aktivite	yüksek	düşük	yüksek	orta	yüksek
Bağ gücü	kuvvetli	zayıf	orta	kuvvetli	kuvvetli
Substrat spesifikliği	değişebilir	değişmez	değişmez	değişebilir	değişmez
Rejenerasyon	mümkün değil	mümkün	mümkün	mümkün değil	mümkün değil
Genel uygulanabilirlik	orta	düşük	orta	düşük	yüksek
İmmobilizasyon masrafı	yüksek	düşük	düşük	orta	düşük

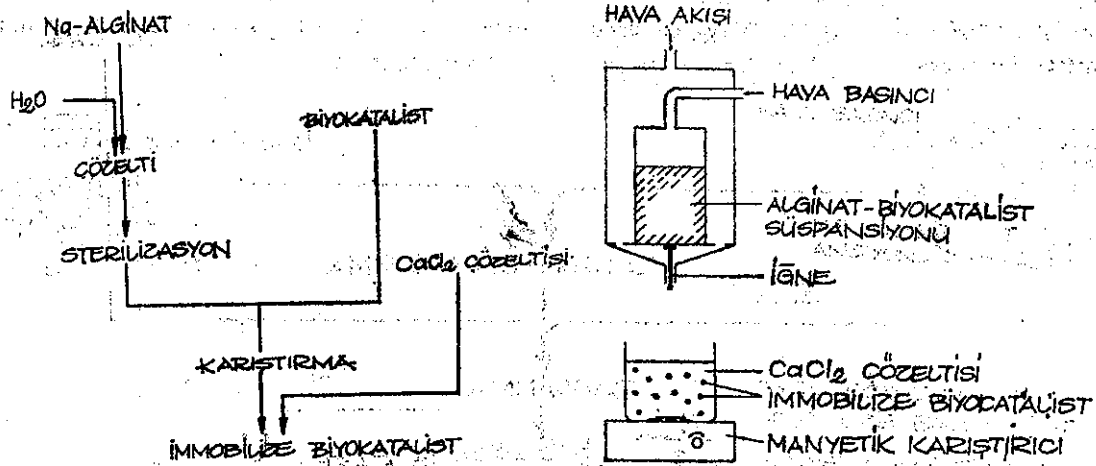
3. Alginat içerisinde İmmobilizasyon

Ca - alginat jeli 1975'den bu yana biyokatalistlerin, özellikle canlı hücre immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (2).

Yöntem kalsiyum klorür çözeltisi içerisine biyokatalist içeren Na - alginat çözeltisinin basınçla verilmesi şeklinde gerçekleştirilir. Sodyum iyonları kalsiyum iyonları ile değişir, su da erimeyen ve biyokatalistleri yakalayan Ca - alginat jel formu oluşur. Bu işlem kolaylıkla, yeterince kuvvetli ve yüksek aktivite ile uygun

formda (tanecikli) immobilize biyokatalist hazırlanmasına olanak verir. Buna karşın substratta kalsiyumla kompleks oluşturan iyonlar varsa, jelde çözünme meydana gelebilir (1, 5, 13).

Ca - alginat içerisinde immobilizasyon Şekil 3'de görüldüğü gibi yapılıdır. Alginat - biyokatalist karışımı bir iğneden, damlalar iğne ucundan düşecek fakat fışkırmayacak bir hızla zorlanarak akıtılır. Basıncı ayarlamak suretiyle jel taneciklerinin boyutları düzenlenebilir.



Şekil 2. Hücrelerin Ca-alginat içerisinde immobilizasyonu (5, 6, 13).

Bu işlem basit ve kolay uygulanabilir olmasına karşın, büyük ölçekte uygun değildir. Immobilizasyon işleminde ölçek büyütme doğal olarak, daha çok genel bir sorundur.

3.1. Rezonans Başlık Kullanılarak Immobilizasyon

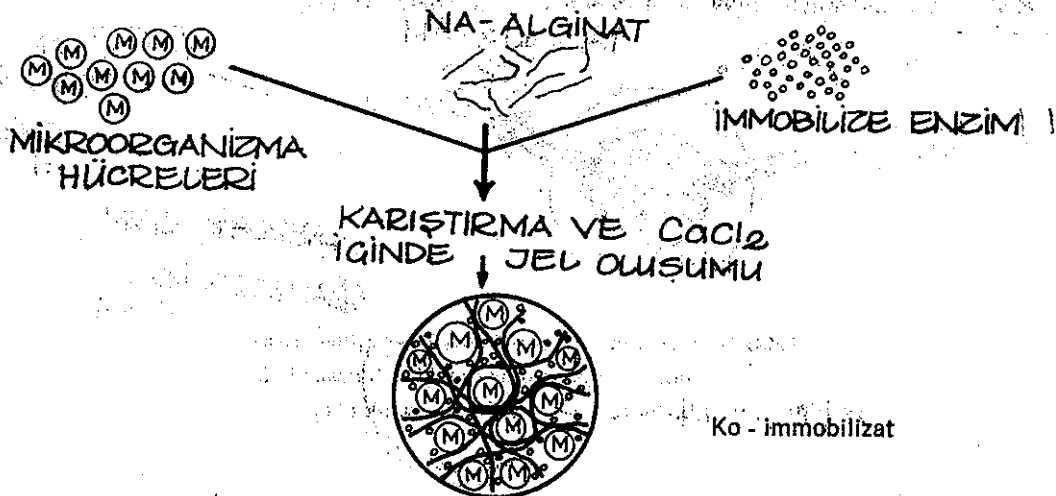
Kapılar biçimde fişkıran sıvıya uygulanacak titreşim fişkırmayı eşit boyutta damlalar şeklinde parçalayabilir. Bu prensibi uygulamak bize iğnenin üretim kapasitesini artırma olanağını verir. Alginat - biyokatalist karışımı rezonans başlıktan fişkıracak bir hızla çıkacak şekilde zorlanır. Dalga jeneratörünün sinyalleri başlıktaki sıvıya taşınır ve bu fişkırmayın düzenli olmamasını sağlar. Belli frekans genişliklerinde bu titreşim fişkırmayı eşit boyutlarda

damlalara parçalar. Böylece daha kısa sürede ve fazla miktarda jel elde edilebilir (5, 13).

Rezonans başlık yalnızca alginat taneciklerinin oluşması için değil, aynı zamanda damla (veya tanecik) oluşması esasına dayanan immobilizasyon işlemlerinde tüm destek maddeleri için uygundur (13).

4. Farklı Biyokatalistlerin Ko-immobilizasyonu

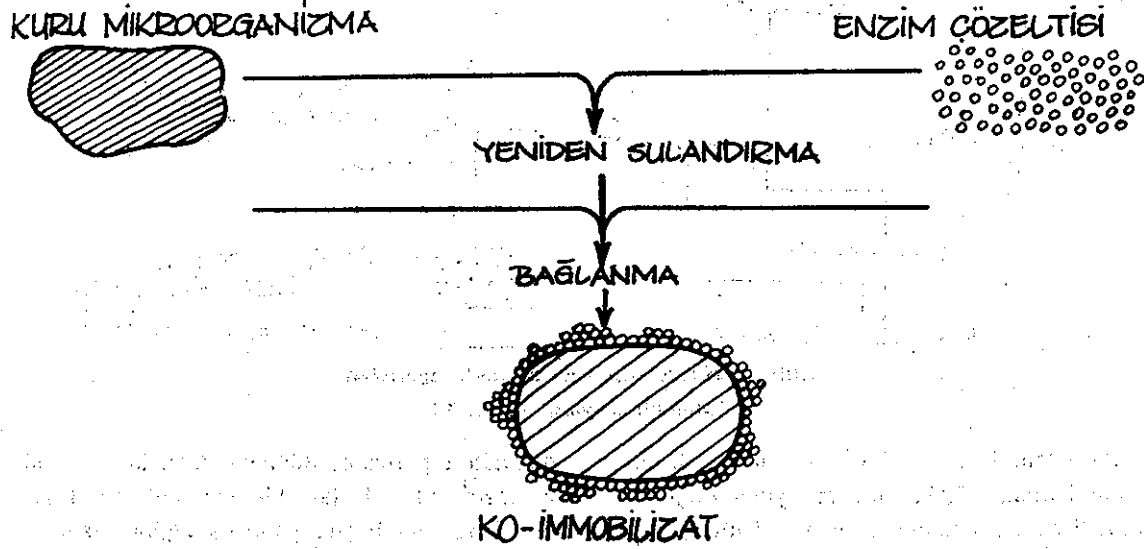
Son zamanlarda birleştirilmiş biyokatalistlerin ko-immobilizasyonu geliştirilmiştir. Bunlar, mikroorganizma hücreleri veya farklı hücrelerden enzimler olabilir. Önceden immobilize edilmiş enzimlerin mikroorganizma hücreleri ile birlikte yaygın bir matriks içinde tutuklanması Şekil 4'de görülmektedir (4).



Şekil 3. Mikroorganizma hücreleri ve enzimlerin bir matriks içinde tutuklanmasıyla oluşan ko-immobilizat (4).

Enzimin doğrudan mikroorganizmalara bağlandığı bir diğer yöntem Şekil 5'de şematize edilmiştir. Bu işlem maya hücrelerinin veya

misellerin bir enzim zarfı sayesinde yakalanmalarına olanak verir ve canlılık % 95 oranında korunabilir (4).

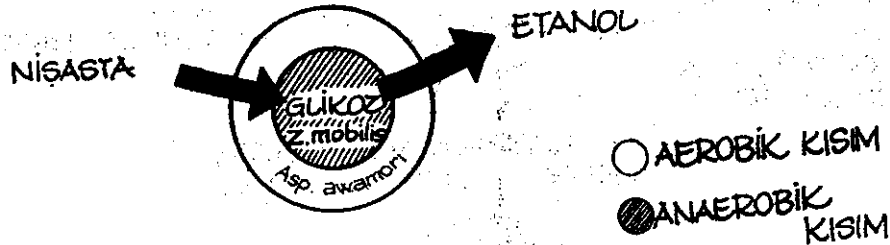


Şekil 4. Mikroorganizma hücrelerinin doğrudan enzimle kaplanmasıyla gerçekleştirilen ko-immobilizasyon (4).

Henüz araştırma aşamasında olan hücre - enzim ko-immobilizasyonuna bir örnek vermek gerekirse; *Saccharomyces cerevisiae* ve β -galaktozidaz ko-immobilizataı sayesinde laktöz fermentasyonunu söyleyebiliriz.

Tanaka ve arkadaşları (1986) ko-immobilize karışık kültür sistemiyle nişastadan etanol

üretimi üzerinde çalışmışlardır. Amilolitik bir küf olan *Aspergillus awamori* ile etanol üreticisi olan *Zymomonas mobilis* karışık kültürü alginat jeli içerisinde tutuklanmış, aerob özellikteki küf mantarı jel taneciğinin yüzeyinde gelişerek jel taneciğinin merkezinde gelişen *Z. mobilis* için anaerob koşulları kolaylaştırmıştır (Şekil 5) (11).



Şekil 5. Ca-alginat içerisinde *Aspergillus awamori* ve *Zymomonas mobilis* karışık kültürünün ko-immobilizasyonu (11).

KAYNAKLAR

1. BURNS, M.A., G.I. KVESITADZE, D.J. GRAVES, 1985. Dried Calcium Alginate/Magnetic Spheres: A New Support for Chromatographic Separations and Enzyme Immobilization, *Biotech. Bioeng.* 17, 137 - 145.
2. CHIBATA I., T. TOSA, M. FUJIMURA, 1983. Immobilized Living Microbial Cells, *Ann. Reports on Ferm. Processes* 6, 1 - 22.
3. DAINTY, A.L., K.H. GOULDING, P.K. ROBINSON, I. SIMPKINS and M.D. TREVAN, 1985. Effect of immobilization on plant cell physiology, real or imaginary? *Trends in Biotechnology* 3, 3, 59 - 60.
4. HARTMEIER, W., 1985. Immobilized biocatalysts - from simple to complex systems. *Trends in Biotechnology* 3, 6, 149 - 153.
5. HULST, A.C., J. TRAMPER, K. Van't RIET and J.M.M. WESTERBEEK, 1985. A New Technique for the Production of Immobilized Biocatalyst in Large Quantities. *Biotech. Bioeng.* 17, 870 - 876.
6. NAGASHIMA, M., M. AZUMA, S. NOGUCHI, K. INUZUKA and H. SAMEJIMA, 1984. Continuous Ethanol Fermentation Using Immobilized Yeast Cells. *Biotech. Bioeng.* 17, 992 - 997.
7. ODA, G., H. SAMEJIMA and T. YAMADA, 1983. Continuous Alcohol Fermentation Technologies Using Immobilized Yeast Cells. *Proc. Biotech.* 83, 597 - 611.
8. ÖZÇELİK, F. 1983. Tutuklanmış Bakteri Kültürü ile Sürekli Etil Alkol Üretimi. *KÜKEM Dergisi* 6, 2, 125.
9. ÖZÇELİK, F. 1985. Ethanol Production by *Zymomonas mobilis*, ALKO, Publication number: A - 13048. Helsinki, 28 s.
10. PEKİN, B., 1982. Mikroorganizmaların İmmobilizasyonunda Genel İlkeler ve İmmobilize Mikroorganizmaların Önemi. *KÜKEM Dergisi*, 5, 2, 56.
11. TANAKA, H., H. KUROSAWA and H. MURAKAMI, 1986. Ethanol Production from Starch by a Coimmobilized Mixed Culture System of *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis*. *Biotech. Bioeng.* 18, 1761 - 1768.
12. TELEFONCU, A. 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. *Biyokimya Lisansüstü Yazokulu* (22.9 - 3.10.1986 Çeşme - İzmir) Notları, 326 s.
13. TRAMPER, J., 1985. Immobilizing biocatalysts for use in syntheses. *Trends in Biotechnology* 3, 2, 45 - 50.
14. WINGRAD, L.B., K.K. EPRAHİM and L. GOLDSTEIN, 1979. *Enzyme Technology, Appl. Biochem. Bioeng.* Vol: 2, Academic Press, New York, 306 s.