

## BİYOKATALİSTLERİN İMMOBİLİZASYONU

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 işlemlerle istenilen dönüşümü sağladıktan sonra fiziksel veya kimyasal yöntemlerle inaktif hale getirilir ve bir daha kullanılamaz. Ancak, ilgili dönüşümü gerçekleştiren biyokatalist inaktive edilmeden ortamdan uzaklaştırılabilirse defalarca kullanılması mümkün olur. Bu amaçla, son 25-30 yıl içerisinde biyokatalistlerin immobilizasyonu teknikleri geliştirilmiştir ve özellikle immobilize enzimler endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır.

**İmmobilizasyon;** biyokatalistleri suda çözünmeyen bir taşıyıcıya bağlayarak veya yine suda çözünmeyen bir matriks içerisinde tutuklamak suretiyle hareketlerini engellemek, buna karşın substrat ve ürünün hareketine olanak veren bir sistem oluşturmaktadır.

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 bakterisiyle sirke üretilmektedir. Atık su arıtılmasında kullanılan damlatmalı filtrede (trickling filter) çeşitli *Protophyta* ve *Protozoa*'ların karışık kültürleri çamur partiküllerine yapışır ve atık içerisindeki organik bileşiklerin parçalanmasını katalize ederler.

Enzim immobilizasyonu Nelson ve Griffin tarafından 19. yüzyılın başlarında rapor edilmiştir. Buna karşın ancak son 25-30 yıl içerisinde ciddi araştırma ve gelişmelerle, immobilizasyon tekniğinde endüstriyel proseslere uygulanabilecek önemli ilerlemeler elde edilebilmiştir. Bu konudaki araştırmaların çoğu, enzim üreten şirketler tarafından gerçekleştirilmiş olup, temel amaç enzimin kullanımı ve verimliliğini artırarak ürünün maliyetini düşürmek ve yeni ürünler elde etmek yönünde olmuştur.

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

İmmobilize enzimin serbest (doğal) enzime üstünlükleri şöylece özetlenebilir:

- enzimin tekrar kazanılması ve tekrar kullanımı,
- çevre koşullarına (sıcaklık, pH vs) 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 kararludur .

Başlangıçta hücreler tek aşamalı enzim reaksiyonları için immobilize edilmişlerdir. Bu sistemde enzimler aktif ve stabil olmasına karşılık hücreler ölüdür. Buna karşın özellikle fermantasyon 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. İmmobilize hücreler canlı olduklarında, böyle çok aşamalı reaksiyonlar için kullanılabilirler. Bu şekildeki immobilize hücreler “**immobilize canlı hücreler**” olarak tanımlanır .

Bu **immobilize canlı hücreler sistemi**, fermantasyon ve geleneksel immobilize hücre sistemlerinin kombinasyonu olarak görülen bir sistem olup, şu üstünlüklere sahiptir ;

- İmmobilizasyon 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 (D) hücrenin özgül gelişme hızından( $\mu$ ) bağımsız bir biçimde artırılabilir.

Serbest enzimlerin ucuz olduğu ve prosesin zaten yeterince gelişmiş olduğu durumlarda immobilize sistem için yapılacak değişiklik,ekonomik anlamda, yararlı olmayabilir. Bu nedenle, nişasta hidrolizi gibi geleneksel bazı enzim uygulamalarında immobilize sistem hala kullanılmamaktadır .

## 1. İmmobilizasyon Yöntemleri

Biyokatalistler immobilize edilirlerken, hücre veya enzim aktivitesinin bu işlemde kesinlikle etkilenmemesi gerekir, İmmobilizasyon işlemi yumuşak koşullarda gerçekleştirilmelidir. Yüksek sıcaklık, kuvvetli asidik veya bazik ortam, organik çözücüler veya yüksek tuz konsantrasyonu aktive kaybına neden olabilir.

İmmobilizasyon yöntemleri; **taşıyıcıya bağlama**, **çapraz bağlama** ve **tutuklama** yöntemleri olarak üç ana grupta sınıflandırılabilir .

İmmobilizasyon yönteminin seçimi, immobilize edilecek biyokatalistin tipine son derece bağlıdır. Polimerik matriksler içinde fiziksel alıkoyma tüm hücre veya hücre organelleri için en uygun tekniktir. Halbuki enzimler daha çok taşıyıcı bağlanırlar veya çapraz bağlanırlar.

## 1.1. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri

Biyokatalistlerin taşıyıcılara bağlanmaları en eski immobilizasyon yöntemidir. Esası, biyokatalistlerin fiziksel adsorbsiyon, iyonik veya kovalent bağlar vasıtasıyla suda erimeyen taşıyıcılara doğrudan bağlanmasıdır.

İmmobilizasyonda kullanılan taşıyıcılar doğal veya sentetik olabilir.

**Doğal taşıyıcılar;** cam boncuklar, silikajel, selüloz, nişasta, agar, alginat, karragenan vb. taşıyıcılardır.

**Sentetik taşıyıcılar;** poliakrilamid, naylon, polivinilalkol, iyon değiştirici reçineler gibi polimerlerdir.

1.1.1. **Kovalent bağlama:** Taşıyıcılara kovalent bağlama enzim zinciri üzerindeki reaktif gruplar üzerinden gerçekleştirilir.

1.1.2. **Adsorbsiyon:** Bu yöntem yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın biyokatalist ile karıştırılması ve biyokatalist fazlasının yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Taşıyıcıya bağlamada etken olan Van der Waals (yüzey gerilimi) kuvvetleridir.

1.1.3. **İyonik bağlama:** İyon değiştirme yeteneğine sahip, suda çözünmeyen taşıyıcılara biyokatalistin iyonik bağlanması temeline dayanır. İyonik bağlama yanında fiziksel adsorbsiyon da etkili olmaktadır.

## 1.2. Çapraz Bağlama Yöntemi:

Bu yöntemde, küçük molekülü çift veya çok fonksiyonlu reaktifler biyokatalistler arasında bağlar yaparak, sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar.

## 1.3. Tutuklama Yöntemleri

Prensip olarak tutuklama, biyokatalisti belirli bir mekanda durmaya zorlamaktır. Bu işlem polimer matriksler içinde gerçekleştirileceği gibi, yarı geçirgen membran içinde mikrokapsülleme ile de gerçekleştirilebilir. Biyokatalistler fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamışlardır.

1.3.1. **Polimer kafeste tutuklama:** Yöntem; çapraşık bağlı bir polimerin oluşturulması, biyokatalistlerin polimerleşme sonucu oluşan çapraz bağ ağları arasında tutulması ve böylece ana çözeltiliye geçmelerinin engellenmesi esasına dayanır. Çapraz bağ oranı biyokatalistlerin tutulabileceği, fakat substrat moleküllerinin biyokatalistlere ulaşmasına engel olmayacak şekilde ayarlanmalıdır.

1.3.2. **Mikrokapsülleme:** Bu yöntem biyokatalistlerin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanmasından ibarettir. Membranın gözenekleri substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarıya çıkışına engel olmayacak büyüklükte olmalıdır.

## 2. Uygun İmmobilizasyon Yöntemi ve Taşıyıcının Seçimi

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

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

## 3. Alginat İçerisinde İmmobilizasyon

Ca-alginat jeli 1975'ten bu yana biyokatalistlerin, özellikle canlı hücrelerin immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Yöntem kalsiyum klorür çözeltisi içerisine biyokatalist içeren Na-alginat çözeltisinin basınçla verilmesi şeklinde gerçekleştirilir. Sodyum iyonları kalsiyum iyonları ile değişir, suda 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.

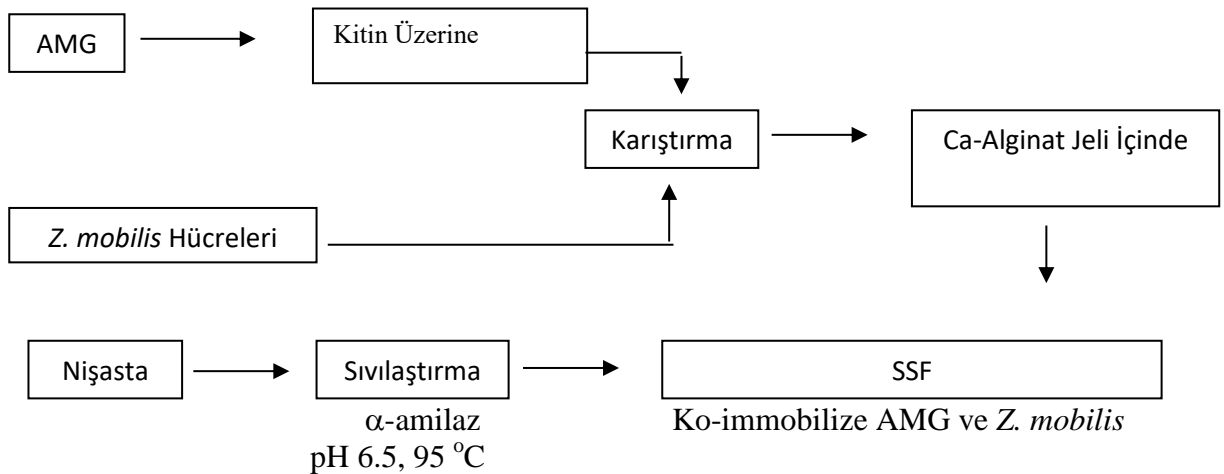
Ca-alginat içerisinde immobilizasyon Şekil 2'de görüldüğü gibi yapılır. Alginat-biyokatalist karışımı bir iğneden, damlalar iğne ucundan düşecek fakat fışkırmayacak bir hızla zorlanarak akıtılır. Basıncı ayarlamak suretiyle jel taneciklerinin boyutları düzenlenebilir. Elde edilecek jel taneciklerinin boyutlarının küçük olması aktiviteyi artıracaktır.

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

## 4. Farklı Biyokatalistlerin Ko-immobilizasyonu

### 5.

Son zamanlarda birleştirilmiş biyokatalistlerin ko-immobilizatları geliştirilmiştir. Bunlar, mikroorganizma hücreleri veya farklı hücrelerden enzimler olabilir. Önceden immobilize edilmiş enzimlerin mikroorganizma hücreleri ile birlikte yaygın bir matris içinde tutuklanması Şekil de görülmektedir.



Şekil: Simultane sakkarifikasyon ve fermantasyon (SSF) prosesinde işlem aşamaları