

KİM 458

Biyoteknolojinin Temelleri

Biyoteknolojik Prosesler ve Enzim Teknolojisi

Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

BİYOTEKNOLOJİK PROSESLER

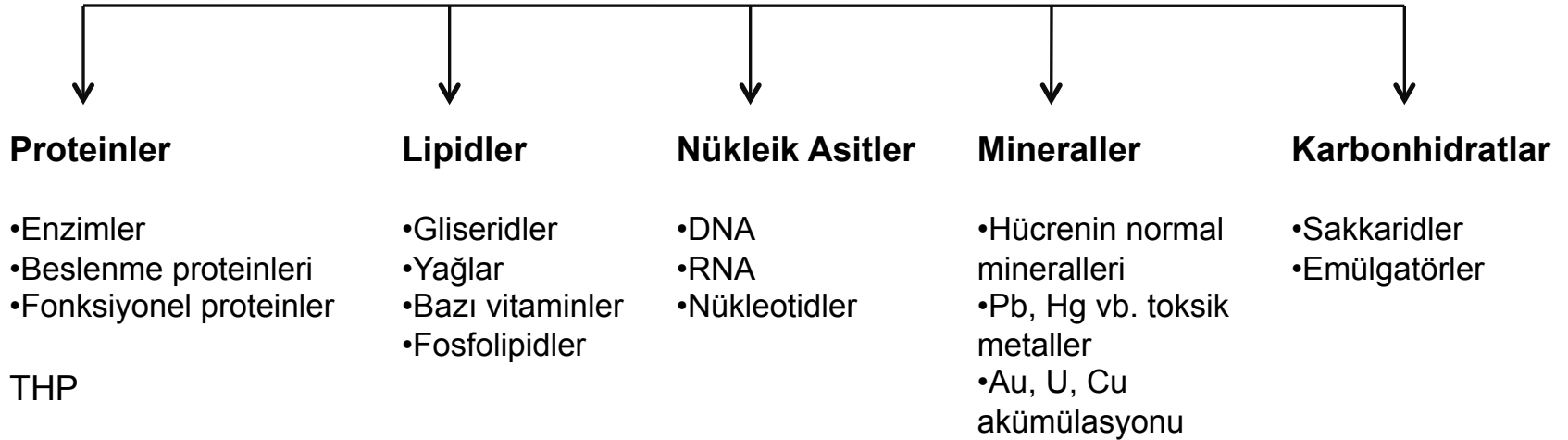
• Mikrobiyal Biyokütle(Biyomas) Üretimi



C-Kaynağı

Biyokütle

Biyokütle Bileşenleri



TEK HÜCRE PROTEİNİ (SCP) ÜRETİMİ

- İnsanlarda minimum protein ihtiyacı: 0,35 g/kg vücut ağırlığı(FAO)
(normalde 0,84 g/kg)

Yetişkin bir insan (70 kg) için günlük minimum esansiyel amino asit gereksinimi(g)
(normalde x >2)

Amino asit	(g)	Amino asit	(g)
L-Fenilalanin + Tirozin	0,98	L-Metiyonin	0,91
L-İzolösin	0,70	L-Treonin	0,49
L-Lösin	0,98	L-Triptofan	0,25
L-Lizin	0,84	L-Valin	0,70

Mikrobiyal Kaynaklardan Protein Üretimi

THP üretiminin klasik protein kaynakları üretimine avantajları:

- Yüksek oranda protein içerirler.
- Mikroorganizmaların ağırlıkları daha kısa sürede iki katına çıkar.
- Üretim koşulları iklime bağımlı olmadan ve hassas bir şekilde kontrol edilebilir.
- Mikrobiyal proteinler dengeli proteinler olup, biyolojik değerleri yüksektir.
- Üretimleri için oldukça küçük alanlar yeterlidir.
- Substrat olarak çeşitli maddeler kullanılabilir.

THP üretiminde kullanılacak mikroorganizmalarda aranan bazı özellikler:

- Değişik substratlardan kolayca yararlanabilme,
- Üreme hızının yüksek olması,
- Temel azot kaynağı olarak anorganik tuzları kullanabilme ve organik azota hızlı dönüştürebilme,
- Yüksek karbon-biyomas dönüşümü sağlayabilme
- Geniş pH aralığında üreyebilme,
- Fermentasyon ortamından kolayca ayrılabilme,
- Besin değeri ve protein içeriği yüksek, güzel koku ve tatta biyomas verebilme,
- Toksik olmama.

Değişik THP ve diğer bazı proteinlerin bileşimleri (%)

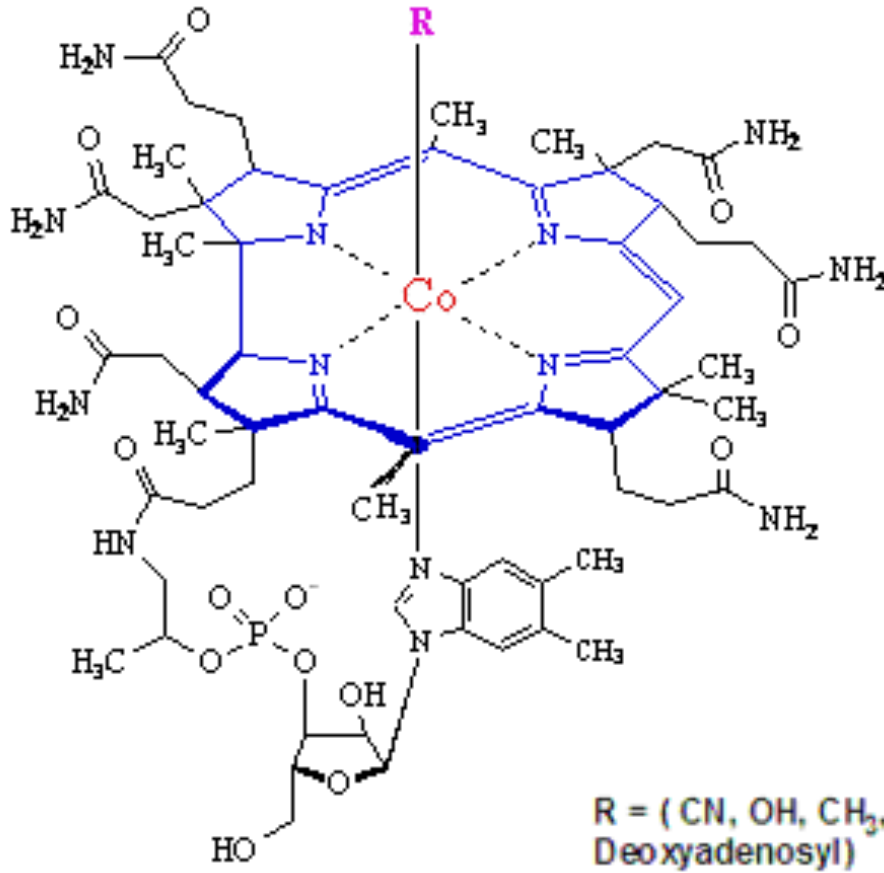
Protein Kaynağı	Ham Protein	Nükleik Asit *	Lizin	Metiyonin	Yağ
Balık eti	60-65	-	7,5	2,6	5
Soya unu	45-50	-	6,5	1,4	2
Bakteri	78	16	6,4	2,5	6
Maya	53	9	6,6	1,4	7

Nükleik asit oranındaki yükseklik, proteinin ortamdan ayrılmasını güçlendirir.

Tek hücre proteini üretimi için C- içeren substratlar

Substrat	Substrat Kaynağı
CO ₂	Solunum ve oksidasyon sonucu oluşan CO ₂ , fermentör gazı
Diğer C ₁ - bileşikleri (CH ₄ , CH ₃ OH)	Doğal gaz, çürüme prosesleri, kömür ve odunun gazlaştırılması
C ₂ - bileşikleri (C ₂ H ₅ OH, CH ₃ COOH)	Etilen, CO+H ₂ , mayalanma
Karbonhidratlar	Nişasta, glukoz şurubu, pancar şekeri, kamış şekeri, selüloz ve lignin
Kitin	Kabuklu böcek atıkları
C ₁₀₋₂₃ – bileşikleri	Gaz yağı

B₁₂ Vitamini Üretimi

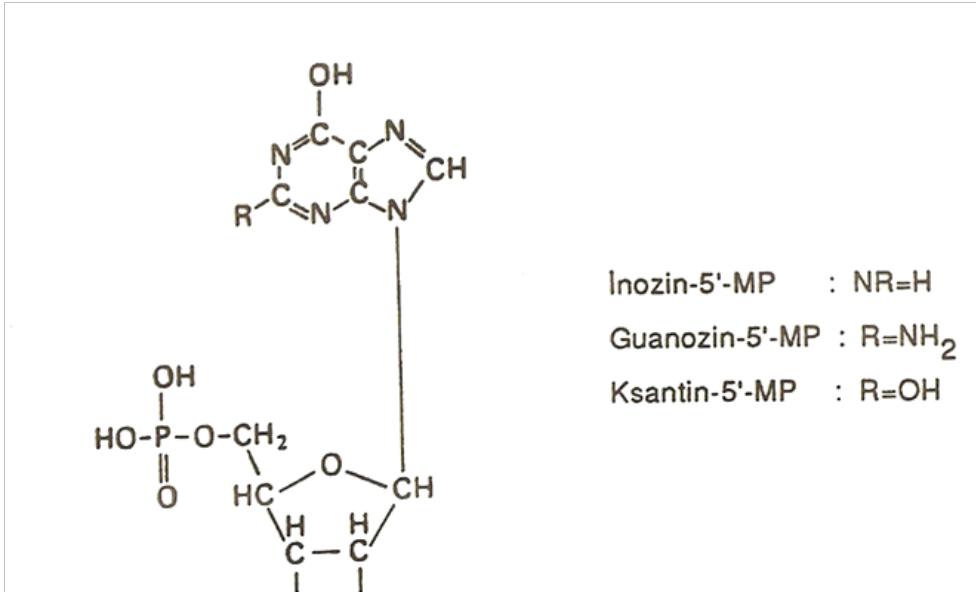


Üretime uygun türler:
Propionibacterium, Pseudomonas sp.

Atık su arıtımında ve antibiyotik fermentasyonunda yan ürün olarak çöker.

Nükleotid Üretimi

Enzimatik reaksiyonlar yanında fermentatif, yöntemlerle de nükleotidler üretilebilir. Az miktarda guanin içeren glukoz çözeltisi Bacillus, Micrococcus veya Brevibacter türleri ile fermente edildiğinde üç gün sonra kültür ortamında **5-7 g/l ksantin-5' monofosfat** oluşur. Bu ürünün aroma özelliği düşük olduğundan B.ammoniagenes' in özel bir mutanı yardımı ile **guanozin-5' -monofosfata** dönüştürülür.



-Farmakolojik Etkiler

-Aroma Arttırıcı

Vitamin Üretimi

Vitaminler esansiyel besin bileşenleri olup sentezi yapamayan organizma bunları dışarıdan yeterli miktarda sağlayamazsa bazı rahatsızlıklar ortaya çıkar. Bu durumun çok uzun sürmesi ölümlle sonuçlanabilir.

İnsanda söz konusu olabilecek **avitaminozlar:**

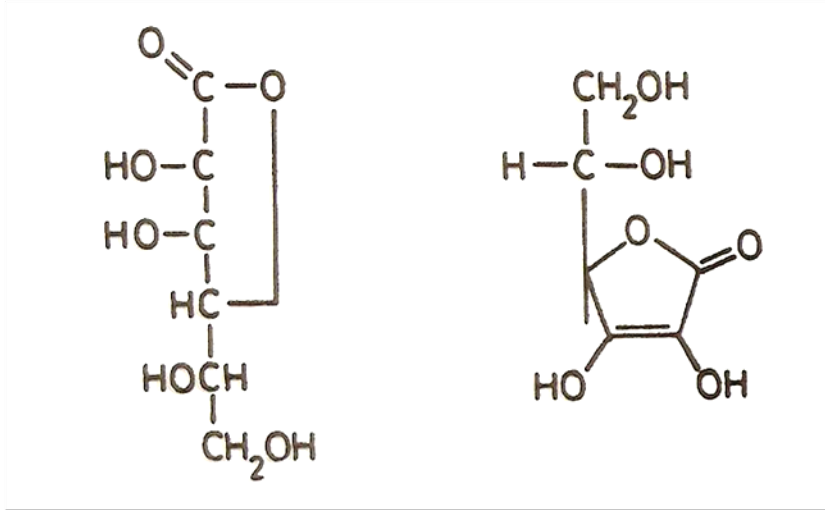
- Kretomalasia, kseroftalmi (A-Vitami ni noksanlığı)
- Beriberi (B-vitami ni noksanlığı)
- Skorbut (C-Vitami ni noksanlığı)
- Raşitis (D-Vitami ni noksanlığı)
- Pernisioz Anemi (B₁₂ -Vitami ni noksanlığı)

Revitaminasyon: Gıdaların işlenmesi sırasında kaybedilen vitaminlerin yerine konması.

Standardizasyon ve Zenginleştirme: Özellikle meyve suyu endüstrisi ve margarin üretiminde.

Meyve Suyu: C-Vitami ni, Süt: A-Vitami ni, Margarin: D-Vitami ni

L-Askorbik Asit Üretimi



L-Askorbik Asit (C-Vitamini)

Askorbik asit yarı fermentatif bir üründür. Acetobacter türleri sorbitolu L-sorboza dönüştürür ve bundan çıkılarak da askorbik asit sentezi mümkündür.

Amino Asitlerin Üretimi

- 1950' li yıllardan itibaren özellikle L-glutamik asidin fermentatif üretimi için uygun mikroorganizma tür ve suşu tesbiti, ayrıca mutasyon ve genetik tür iyileştirmesi ile verim arttırıcı yönde çalışmalar büyük önem kazanmıştır.
- Fermentasyon tüm amino asitler için aynı prensibe göre yürür.

Üretim tekniği	:	Derin kültür tekniği
Substrat(C-kaynağı)	:	Karbonhidratlar (%10)
Katkı maddeleri	:	Vitaminler ve mineraller
Fermentasyon sıcaklığı	:	35 °C
Azot kaynağı	:	Genellikle üre

Fermentasyon ile üretilen aminoasitler

Amino asit	Mikroorganizma	C- kaynağı
L(-)-Alanin	<i>Corynebacter, Bacillus</i>	Karbonhidratlar
L(+)-Arginin	<i>Bacillus subtilis, Brevibacter flavum</i>	Glukoz
L(+)-Aspartik Asit	<i>Escherichia, Pseudomonas</i>	Fumarik asit
L(-)-Fenilalanin	<i>Corynebacter, flavum ve glutamicum</i>	Karbonhidrat, melas
L(+)-Glutamik Asit	<i>Corynebacter, Glutamicum, Brevibacter flavum Nocardia erythropolis</i>	Karbonhidratlar, Asetik asit n-parafinler
L(-)-Histidin	<i>Corynebacter glutamicum</i>	Glukoz, Sakkaroz, melas
L(+)-İzoloisin	<i>Brevibacter flavum</i>	Karbonhidratlar
L(-)-Lösin	<i>Brevibacter flavum, Corynebacter flavum</i>	Karbonhidratlar
L(+)-Lizin	<i>Nocardia</i>	Melas, Asetik asit, Karbonhidratlar
L(-)-Prolin	<i>Corynebacter glutamicum</i>	Melas
L- Serin	<i>Nocardia</i>	Glukoz
L(-)-Treonin	<i>E.coli</i>	Fruktoz, melas, asetik asit
L- Triptofan	<i>C.utilis, B.subtilis</i>	Karbonhidratlar
L(-)-Tirozin	<i>Corynebacter glutamicum</i>	Karbonhidratlar

Sitrat Çevriminin Diğer Asitlerinin Üretimi

Sitrat ve fumarik asitler yanında diğer birçok organik asidin de mikrobiyal üretimi mümkündür. Ancak bazıları için kimyasal sentez yolu daha ekonomiktir.

Biyoteknolojik üretimi mümkün bazı organik asitler

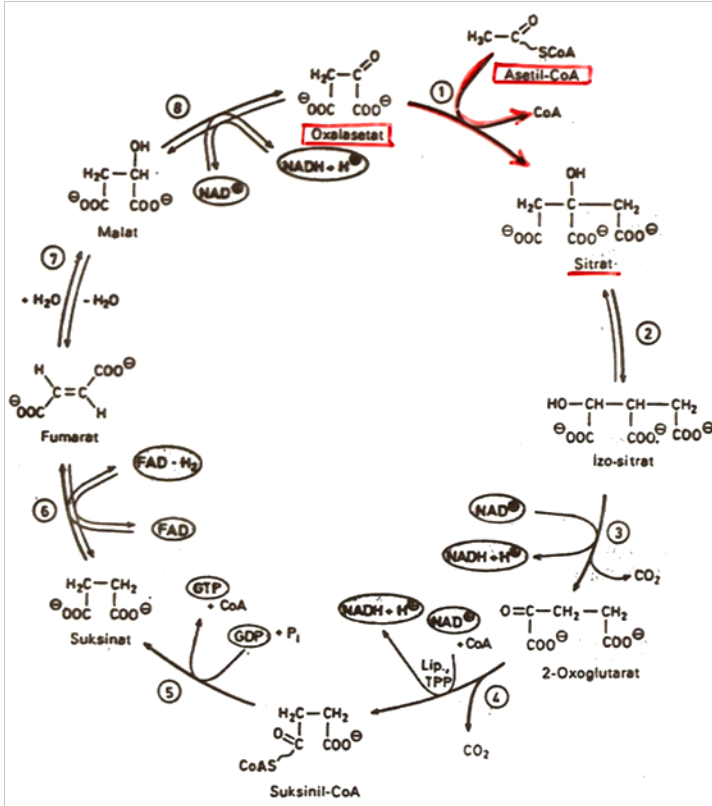
Organik Asit	Üretim Mikroorganizması
Pirüvik asit	Acetobacter suboxydans, Xanthomonas türleri
Okzalik asit	Aspergillus niger
Akonitik asit (cis)	Aspergillus niger
İso-sitrik asit	Penicillium purpurogenum
α -Ketoglutarik asit	Aerobacter aerogenes, Achromobacter orientalis
Süksinik asit	Rhizopus türleri
Fumarik asit	Rhizopus türleri
Malik asit	Rhizopus türleri, A.oryzae, Lactobacillus brevis
Glukonik asit	Acetobacter türleri, Aspergillus niger

PRİMER METABOLİTLERİN ÜRETİMİ

(Metabolizmanın ara veya son ürünleri)

➤ Sitrik Asit Üretimi

Fermentasyonun ilk uygulamalarından (içkiler ve sirkeden sonra):



Aspergillus sp. küf mantarı
Candida sp. mayalar

Başlıca Kullanımı:

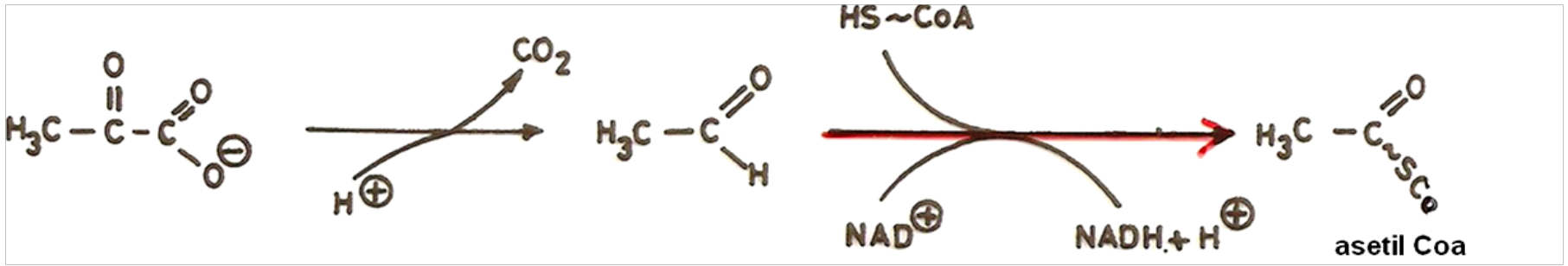
- Gıda, ilaç end.
- Boya, matbaa end.
- Sentetik polimer end.

İlk dolaşımda okzaloasetatin her iki karboksil grubu CO₂ olarak ayrılır. Ve okzaloasetat dehidrojenasyon ile rejenere edilir. Çevrimin sürekli olması için indirgenmiş koenzimler solunum üzerinden tekrar oksitlenmelidir.

- Glikolizin toplam reaksiyonu:



- Oksidatif dekarboksilasyon reaksiyonu:



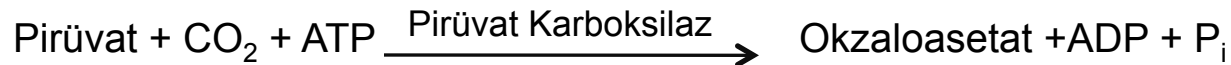
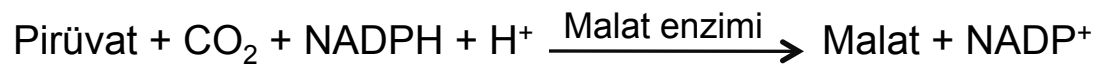
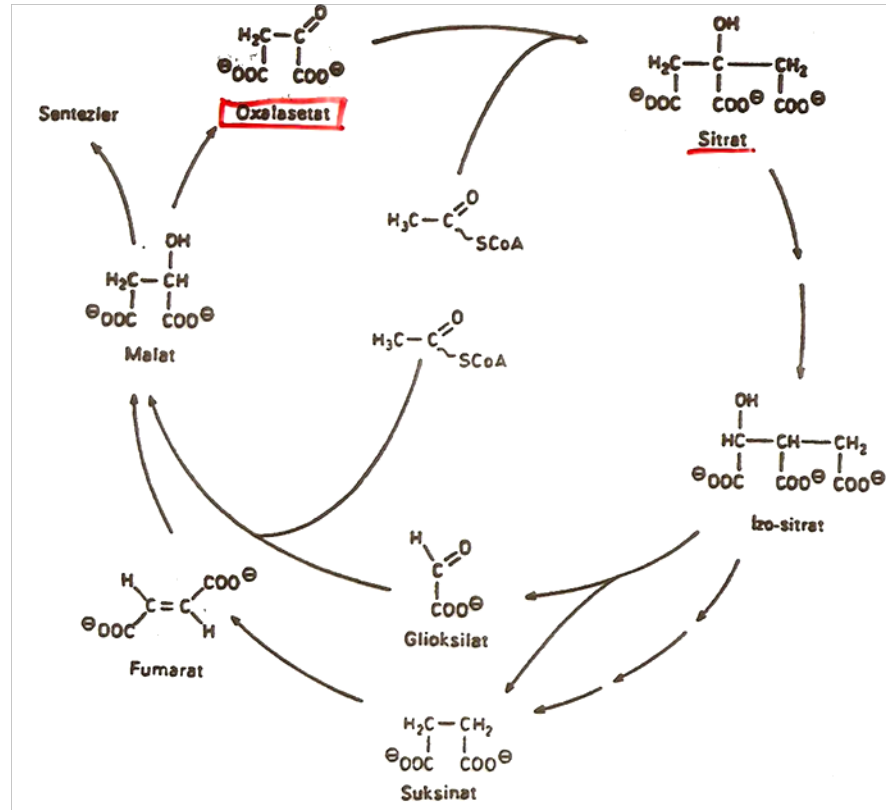
-Sitrata Çevriminin Ana Yakıtı

: Asetil-CoA

-Sitrata Çevriminin Motoru

: Okzaloasetat

Okzalasetat Oluşturan Yollardan: Gliksilat Çevrimi



THP' nin Önemli Uygulama Alanları

- a) Hayvan beslenmesi (dana, kümes hayvanları, ev hayvanları ve domuz)
- b) İnsan gıdası olarak kullanımı
 - Aroma kaynağı
 - Vitamin kaynağı
 - Emülgatör destekleyicisi
 - Çorba katkı maddesi
 - Hazır yemekler
 - Diyet yiyecekler
- c) Teknikteki uygulama alanları
 - Kağıt üretimi
 - Dericilik
 - Köpük stabilizasyonu

Mikroorganizmalar protein ve nükleik asit sentezi için azotlu bileşiklere ihtiyaç duyarlar.

Azot kaynağı olarak aşağıdaki bileşiklerden yararlanılır:

- N_2 : Azot bağlayan mikroorganizmalarca havadan sağlanır.
- NO_3^- : Çoğu mikroorganizmalarca NH_3 ' a indirgenebilir.
- NH_3 ve NH_4^+ tuzları : En ucuz ve en çok kullanılan N- kaynağıdır.
- Proteinler, amino asitler, pepton ve üre : Pahalı N- kaynaklarıdır.

Üretim Tekniği:

Ensütriyel boyutta biyomas üretim prosesleri

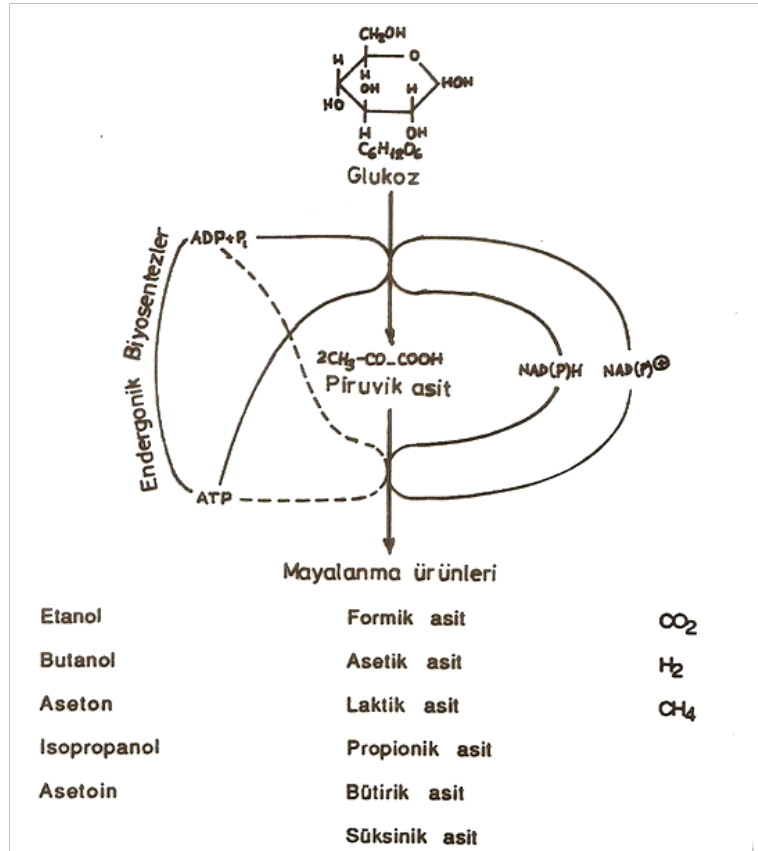
- Substratın hazırlanması,
- Fermentasyon,
- Deriřtirme,
- Kurutma,
- Ürünün işlenmesi işlemlerini kapsar.

Biyomas üretiminde fermentör özellikleri:

- Tüm reaksiyon bileşenleri fermentörde homojen dağılmalıdır,
- Substrat konsantrasyonu yüksek olmalıdır,
- Oksijen transferi yüksek olmalıdır,
- Sıcaklık ve pH sabit olmalıdır,
- Proses kesintisiz olmalıdır,
- İşletme enerji gereksinim az olmalıdır,
- Kapasite yüksek olmalıdır.

MAYALANMALAR

- Mayalanmalar, karbonhidrat parçalanma ürünlerinden çıkan indirgeme ekivalentlerinin (elektronlar veya ind. koenzimler) bir başka organik moleküle transfer olduğu anaerobik ve enerji veren proseslerdir. Anaerobik koşullarda solunum zinciri devre dışı olduğundan ATP sentezi substrat zinciri fosforilasyonu sayesinde gerçekleşir.

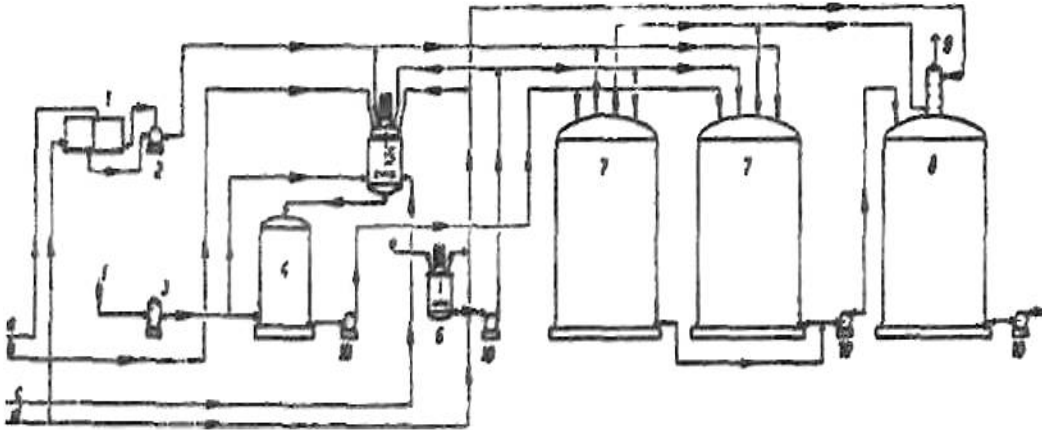


Mayalanma olayları için ortak şema

Mayalanma olayında üç ayrı faz bulunur:

- *Hazırlık fazı* (12-24 saat): Hızlı bir maya üremesi olur.
- *Ana mayalanma faz* (12-48 saat): Alkol oluşur, oligosakkaritler parçalanır, maya üremesi çok düşüktür.
- *Mayalanma sonrası faz* (48-72 saat): Alkol oluşumu hızla düşer, maya üremesi çok önemsizdir.

Ana mayalanma fazında ısı açığa çıktığından fermentörün soğutulması gerekir. Ayrıca mayalanma sırasında açığa çıkan CO₂' in sürüklediği alkol özel bir yıkama işlemi ile yakalanır.



- 1: Melas karıştırma
 - 2: Karıştırma pompası
 - 3: Üfleç
 - 4: Ön mayalandırma tankı
 - 5: Melas kaynatma tankı
 - 6: Besi tuzları karışımı hazırlanması
 - 7: Ana mayalandırma tankı
 - 8: Ara depolama tankı
 - 9: CO₂ yıkayıcı
 - 10: Pompa
- a: Melas
b: H₂SO₄
c: Buhar
d: Proses suyu
e: Besi tuzları
f: Hava
g: CO₂
h: mayalanmış mayşe

Klasik proses ile alkol mayalanmasının akım şeması

Biyoteknolojik üretimde verimi artırabilmek için;

a) Besi ortamı bileşimi, sıcaklık, pH, pO_2 , aşı yoğunluğu, besleme sistemi ve karıştırma hızı parametrelerine bağımlı olarak fermentasyonun optimize edilmesi,

b) Biyogenez ve metabolit biyosentezinin araştırılması,

c) Mikroorganizma suşunun;

- Yüksek ürün verimi elde edilecek şekilde mutasyona uğratılması,
- Ürün yapı taşlarını yüksek verimle sentezleyen mutantların türetilmesi.
- Yüksek metabolit konsantrasyonuna dirençli mutantların türetilmesi.
- Fermentasyon prosesi için uygun diğer özellikleri taşıyan mutantların türetilmesi,
- Hücre geçirgenliği artan mutantların elde edilmesi önlemlerine başvurulur.

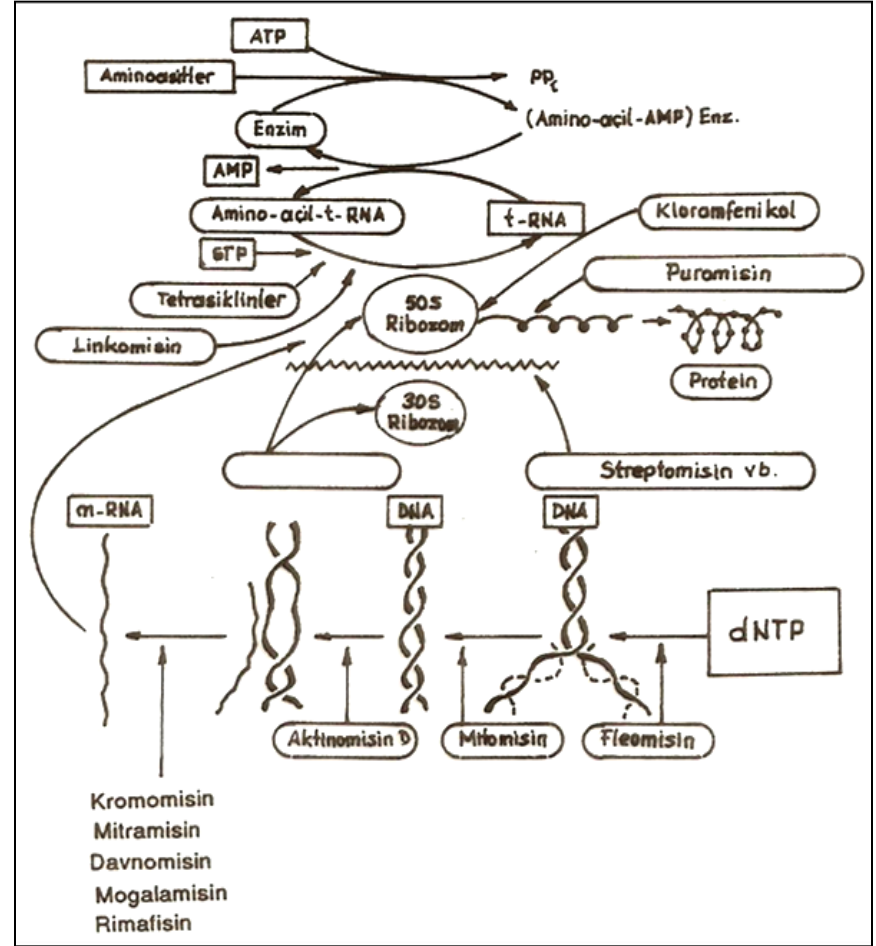
Antibiyotik Üretimi

Antibiyotiklerin bilimsel tarihçesi Pasteur ve Joubert'in 1867'de *Bacillus anthracis*'in havadan izole edilen bakterileri zehirlediğini bulmaları ile başladığı varsayılsa da gerçek tarihçe 1929 da **A. Fleming'in** penisilini buluşu ile başlar.

1940' lı yıllardan sonra streptomisin ve diğer birçok yeni antibiyotik üretimi başarılmıştır.

Teknik boyutta antibiyotik üretimine 1941 yılında geçilmiş ve biyoteknolojik yöntemlerdeki gelişme sayesinde A.Fleming *Penicilium* ile fermentasyon sonucu bir litre kültür ortamında ancak 1,2-6 mg penisilin üretebilirken bugün bir litre kültür ortamında yaklaşık 5000 kat daha derişik (20 g/l) üretim mümkündür.

Antibiyotikler metabolizmayı değişik noktalarda etkilemektedir.

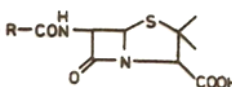
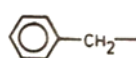
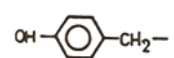


Bazı antibiyotiklerin nükleik asit ve protein biyosentezindeki etki noktaları

β -Laktam Antibiyotikler

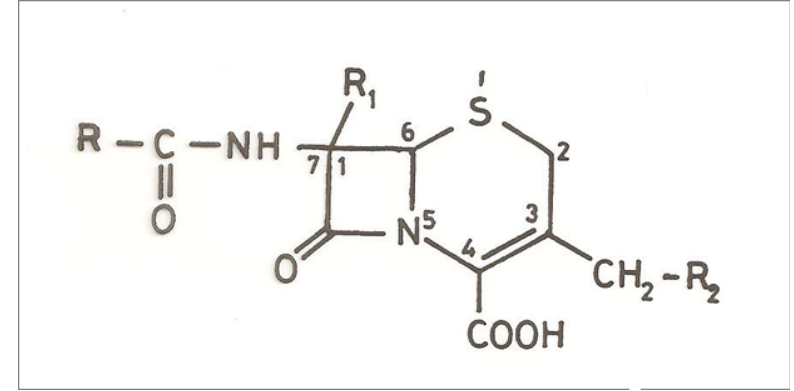
- β -Laktam antibiyotiklerin hepsi de yapılarında bir β -laktam halkası taşırlar ve bakteri hücre membranı sentezinin son adımında etki gösterirler. Fakat farklı etki gösteren β -laktam antibiyotikleri de vardır(örneğin; klavulanik asit β -laktamaz inhibitörüdür).
- Penisilinler:** *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri penisilin sentezleyebilirler de üretimde *P. chrysozenum* ve *P. notatum* kullanılır.

Penicillium chrysogenum' un fermentasyon ortamında oluşturduğu doğal penisilinler

Adı	Ana Yapı	Yapısı(R)
		
Penisilin G		
Penisilin F		$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2-$
Dihidropenisilin F		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4-$
Penisilin K		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6-$
Penisilin N		
İzopenisilin N(Penisilin M)		$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-(\text{CH}_2)_3-$
Penisilin X		$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{COOH}}{\text{CH}}-(\text{CH}_2)_3-$

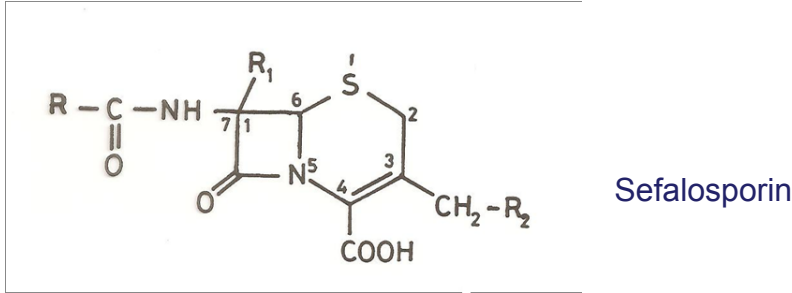
Sefalosporinler

- *Cephalosporium acremonium*' un modifiye halka sistemli bir β -laktam antibiyotik(*Sefalosporin C*) sentezlediği 1956 yılında bulunmuştur.
- Bu antibiyotik β -laktamaz enzimlerine karşı penisiline kıyasla 5000 kat daha dirençlidir. Penisilindeki kükürt içeren beş üyeli halka sefalosporin C de altı üyelidir.



Sefalosporinlerin genel formülü

- 1970' li yıllarda birçok mantar türününün de sefalosporin C antibiyotiğini sentezlediği hatta bazı *Streptomyces* türlerinin 7-metoksisefalosporin C sentezledikleri bulundu. 7-Pozisyonuna metoksi grubunun bağlanması sefalosporinin β -laktamlara karşı direncinin daha da artmasını sağlar.



- Sefalosporin ana yapısı biyoteknolojik olarak kazanılır:
 - Sefalosporin C fermentasyonu
 - Penisilin fermentasyonu ve ardından kimyasal yöntemler ile penisilindeki 5' li halkanın 6' lı halkaya dönüştürülmesi

Aminoglikozid Antibiyotikler

- Bu grup antibiyotiklerin ilk temsilcisi olan **Streptomisin**' in 1944 yılında Waksman ve arkadaşları tarafından bulunması ve bu antibiyotiğin etkinliği aminoglikozidler üzerinde yoğun çalışılması sonucunu doğurmuştur.
- 1949 yılında **Neomisin**, 1957 yılında **Kanamisin** ve 1963 yılında ise **Gentamisin** keşfedilmiştir. Bugün birkaç yüz doğal aminoglikan bilinmektedir. Ayrıca mutasentez yolu ile çok sayıda yeni aminoglikozid sentezlenebilmiştir.

1. Streptomisin Grubu

2. Neomisin Grubu

3. Paramomisinler

4. Gentamisin ve Sisomisin

5. Kanamisin Grubu

6. Lividomisin

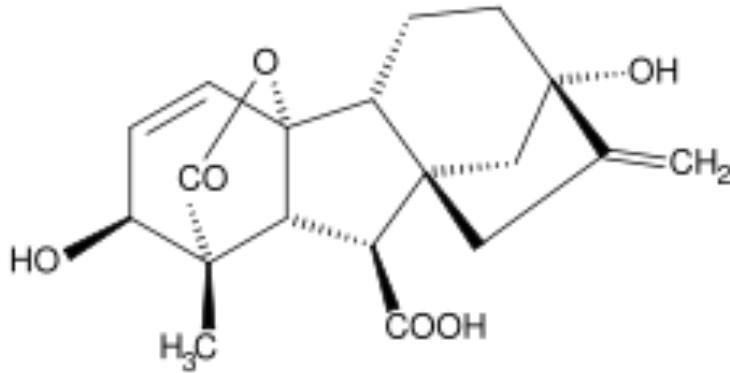
7. Ribostamisin

Tetrasiklinler(I)

- Tetrasiklinler ilk keşfedilen antibiyotiklerden olup en yaygın tanınanları *Streptomyces aureofaciens* tarafından sentezlenen **Klortetrasiklin**(eski adı *Aureomisin*) ve *Streptomyces rimosus* tarafından sentezlenen **Oksitetrasiklin**dir (eski adı *Terramisin*). Kimyasal sentezleri mümkün olmakla birlikte tetrasiklinler günümüzde fermentasyon ile üretilirler.
- Tetrasiklinlerin etki mekanizması çok iyi araştırılmıştır (Prokaryotlarda protein biyosentezini inhibe ederler). Mikroorganizmalar tetrasiklinlere karşı zor direnç oluştururlar. Bu sebeple diğer preparatlara tetrasiklinler karıştırılır.

Gibberellinlerin Üretimi

- *Gibberella fitfikuroi*'nin kültür ortamından izole edilen ve gibberellin adı verilen bir grup maddenin güçlü bir bitki büyütücü etkiye sahip oldukları bulunmuştur. Bu sebeple bahçecilikte ve arpadan malt üretiminde kullanım alanı bulmuşlardır.
- Gibberellinler terpen sınıfı maddelerdir ve Asetil-CoA den çıkılarak biyosentezlenirler.



Gibberellik asit

Gibberellinler sekonder metabolit olup mantar bunları ancak belirli koşullar altında sentezler. Besi ortamındaki C/N oranına bağılı olarak büyüme fazı sona erdikten sonra salgılanırlar. Kültür ortamındaki konsantrasyonları 1.0-1.5 g/l arasında değişir.

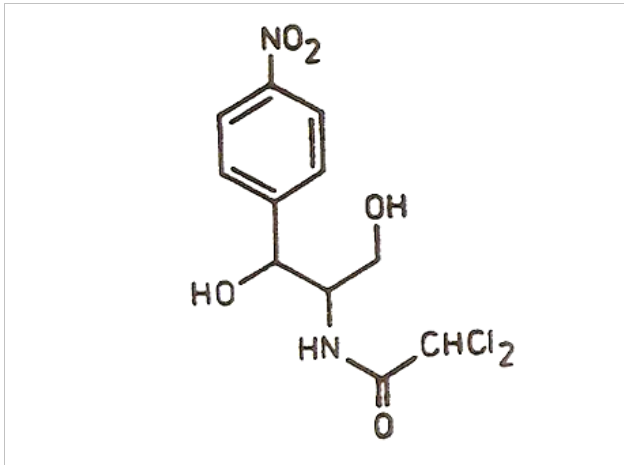
Fermentasyon dört adımda tamamlanır:

- *Birinci adımda*, yoğun bir büyüme gerçekleşir.
- *İkinci adımda*, ortamda bir kısım minör faktörlerin bitmesine rağmen hala bol miktarda bulunan karbonhidratların tüketimi sonucu misellerin yağ ve karbonhidrat içerikleri yükselir.
- *Üçüncü adımda*, hücrelerin dışarıdan madde alımları sona erer ve gibberellinler sentezlenir.
- *Son adımda* ise miseller depoladıkları karbonhidrat ve yağları parçalarlar ve neticede ölürler. Böylece hücre içindeki gibberellinler kültür ortamına salınırlar.

Fermentasyon 25-30°C de pH 3,5-4,0 arasında 4-7 gün devam eder.

Kloramfenikol (Kloromisetin)

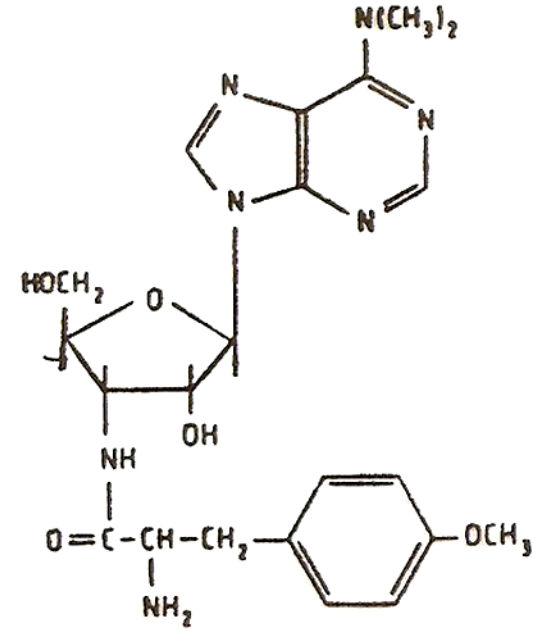
- *Streptomyces venezuelae* tarafından üretilen bu antibiyotik özellikle salmonellalara karşı çok etkilidir. Yapısı oldukça basit olup fenilalanin türevidir. Bu antibiyotik hem sentez yolu ile hem de fermentasyon ile büyük ölçekte üretilir. Ucuzdur ve geniş bir etki spektrumu vardır.



Kloroamfenikolun yapısı

Puromisin

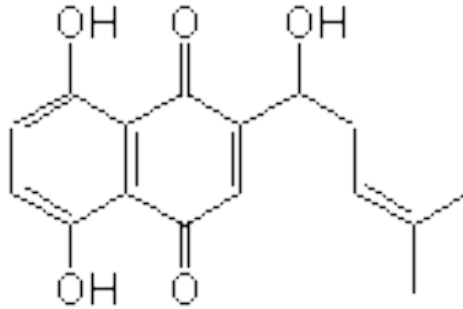
- Puromisin yapı olarak tRNA ya benzediğinden protein biyosentezinin inhibisyonunda görev alır. *Streptomyces alboniger* tarafından üretilir ve geniş bir etki alanı vardır. Protein biyosentez mekanizmasının araştırılmasında önemli rol oynamıştır.



puromisin

Şikonin Üretimi

- Şikonin özellikle Asya'da yaygın olarak kullanılan bir halk ilacı (kocakarı ilacı) olup kimyasal yapı bakımından bir naftakinon türevidir. İltihap giderici ve antibiyotik etkisi vardır.
- Bugün Japonya'da *Lithospermum erythrorhizon* hücre kültürleri yardımı ile yüksek verimli biyoteknolojik üretimi gerçekleştirilmiştir.



Şikonin

Biyotransformasyon

BİYOTRANSFORMASYONLAR (I)

Mikroorganizmalar veya enzimleri tarafından katalizlenen kimyasal dönüşümlere biyotransformasyonlar adı verilir. Enzim katalizli reaksiyonların kimyasal katalize aşağıda belirtilen önemli üstünlükleri vardır

- a) **Spesifiklik** : Enzimatik reaksiyonlarda prensip olarak yan ürün oluşmaz (Etki spesifikliği) ve çoğu enzimler yalnız belirli bir substrat ile oluşan reaksiyonu katalizlerler (Substrat spesifikliği). Ayrıca enzim katalizli reaksiyonlarda regiospesifiklik ve stereospesifiklik de söz konusudur.
- b) **Reaksiyon Koşullarının İlimliliği** : Enzimatik reaksiyonlar sulu ortamda nötral pH dolayında ve genellikle 40° C den daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşir.
- c) **Aktivasyon Enerjisinin Düşürülmesi** : Enzimatik reaksiyonlarda ara madde katalizi mekanizması sonucu aktivasyon enerjisi çok düşmekte ve reaksiyon yüksek hızla gerçekleşmektedir.

BİYOTRANSFORMASYONLAR (II)

Belirtilen bu üstünlükler kimyasal olarak çok kompleks yollardan gerçekleştirilebilen veya hiç gerçekleştirilemeyen birçok reaksiyonun enzimler yardımı ile kolayca yürütmesine olanak sağlar.

Bu reaksiyonlar:

- Benzeri fonksiyonel gruplardan yalnız birinin reaksiyona sokulması,
- Enantiomerlerden birinin seçimli dönüşüme uğratılması ile rasemik karışımların ayrılması,
- Asimetrik merkeze bir grup sokulması,
- Aktive edilmemiş C- atomunun seçimli olarak fonksiyonel grup haline dönüştürülmesidir.

Biyotransformasyon Teknikleri (I)

□ Büyüyen/Çoğalan Hücreler ile Biyotransformasyon:

Hücreler ideal besi ortamında üretilir ve yapılan ön-testlerle belirlenen fazda ortama biyotransformasyona uğrıtılacak substrat katılır. Bu tekniğin en önemli üstünlüğü induksiyona olanak sağlaması böylece verimin artmasıdır.

□ Stasyoner Hücreler ile Biyotransformasyon:

Mikroorganizma ideal besi ortamında üretilir, filtrasyon veya santrifüjleme ile ayrıldıktan sonra biyotransformasyon ortamında dağıtılır ve substrat ilave edilir. Hücrelerin canlılığını koruyabilmesi için az miktarda glikoz katılır. Bu yöntemin üstünlüğü büyüme ve biyotransformasyonun farklı ortamlarda gerçekleşmesi ve dönüşüm süresince ortamdaki hücre sayısının önemli bir değişim göstermemesidir. Ayrıca substratın büyümeyi inhibisyon olasılığı ortadan kalktığı gibi ürünün izolasyonu da kolaydır.

Biyotransformasyon Teknikleri (II)

□ Sporlar ile Biyotransformasyon

Mikroorganizmalar spor oluşumu için ideal koşullarda üretilir ve sporlar misellerden ayrılıp soğukta saklanır. Biyotransformasyon yapılacağı zaman bu spordan yararlanılır. Bu tekniğin üstünlüğü sporların depolanmasının kolaylığı ve tekrar kullanılabilmesidir.

□ İmmobilize Hücreler ile Biyotransformasyon

Mikroorganizmalar ürün ve substratın geçişine izin veren bir polimer matrikste (poliakrilamid, kappa-karragenan, alginat, selüloz, nişasta vb.) tutuklanır. İmmobilize hücreler istenildiği anda ortamdan uzaklaştırılabilir, yeniden kullanılabilir ve kesiksiz proseslere uygundur.

□ Serbest ve İmmobilize Enzimler ile Biyotransformasyon

İmmobilize hücrelerin biyotransformasyonlarda kullanılması daha ekonomik olmasına rağmen çok basit yapıları bir hücre bile binlerce enzim içerdiğinden istenmeyen yan reaksiyonların oluşması ve ortamın bu reaksiyonların ürünleri ile kirletilmesi söz konusudur.

Amino Asitlerin Dönüşümleri

Amino asitlere uygulanan biyotransformasyonlar ya rasemik karışımların resolusyonuna veya amino asitlerin sentezlenmesine ya da amino asitlerin parçalanmasına dayanır.

Amino Asit Rasemik Karışımlarından L-Amino Asit Üretimi

Fizyolojik aktif form olmaları sebebiyle amino asitlerin L-formlarının üretimi büyük bir ekonomik öneme sahiptir.

Amino asit üretimi mikrobiyal veya kimyasal yöntemler ile gerçekleştirilebilir. Mikrobiyal proseslerde yalnız L- amino asitler kazanılırken kimyasal üretim sonunda rasemik karışım (DL-) elde edilir ve bu karışımdan L-formunun ayrılması çok önemlidir.

Tirozin Sentezi

β -Tirozinaz enzimi triptofanaz enzimine benzer özellikler gösterir ve fenol, piruvat ve amonyaktan çıkılarak L-tirozin sentezi reaksiyonunu katalizler.



Bu reaksiyonda fenol yerine substrat olarak pirokatekol kullanılırsa L-DOPA (Dihidroksifenilalanin) elde edilir.

Amino Asitlerin Parçalanması

Bazı amino asitlerin değişik mikroorganizmalar veya enzimler ile biyotransformasyonu ile ekonomik değeri olan ürünler elde edilir

Amino asitlerin yıkımına dayalı biyotransformasyonlar

Biyotransformasyon reaksiyonu	Mikroorganizma (Enzim)	Ürün
L-Aspartik Asit—>L-Alanin + CO ₂	<i>Pseudomonas dacunhea</i> (Aspartat-β-dekarkboksilaz)	L-Alanin
meso-α-α' -Diaminopimelik asidin dekarkboksilasyonu	<i>Bacillus sphaericus</i> (Dekarkboksilaz)	L-Lizin
L-Arginin Schiff bazının hidrolizi	<i>Pseudomonas putida</i> (Arginin Deiminaz)	L-Sitrulin
L-Histidin—>Ürokanik Asit + NH ₃	<i>Achromobacter liquidum</i> (L-Histidin - Amonyak liyaz)	Ürokanik Asit

Antibiyotik Dönüşümleri

3-Laktamaz örneğinde olduğu gibi antibiyotiklerin enzimatik dönüşümlerinin yalnız inaktivasyona yönelik olabileceği sanılırken bu dönüşümlerden aşağıdaki amaçlara yönelik olarak faydalanılabileceği belirlenmiştir:

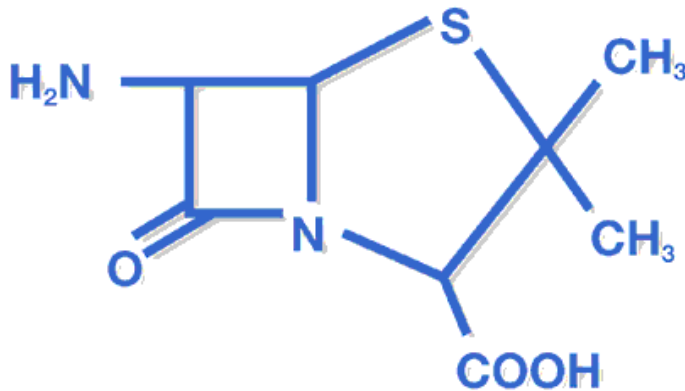
- ❑ Mikrobiyolojik değişim sonucu mevcut antibiyotikten daha iyi özellikleri ve geniş bir etki spektrumu olan yeni antibiyotikler elde edilebilir.
- ❑ Mikrobiyal parçalama ürünleri yan sentetik antibiyotikler için çıkış maddesi olarak kullanılabilir.
- ❑ İnaktivasyon mekanizması öğrenildikten sonra aktif grupların etki sürelerini artırıcı önlemler alınabilir.
- ❑ Antibiyotiğin doğal biyosentez mekanizması inhibitörler, promotörler ve yapay prekürsörler ile etkilenip yönlendirilebilir.
- ❑ Mutantlar yardımı ile de antibiyotiğin doğal biyosentez mekanizması etkilenebilir.

6-Aminopenisilanik Asit (6-APA) Üretimi

Penisilin molekülün aktivite veya toksikliği C₆-pozisyonundaki yan zincir substitüenti tarafından doğrudan etkilenmektedir.

Penisilin çekirdeği olan 6-Aminopenisilanik asidin (6-APA) C₆ pozisyonundaki substitüsyon, reaktif asit klorür veya anhidritleri ile gerçekleştirilir.

6-APA'in doğrudan fermentasyonla üretimi mümkünse de verim çok düşük olduğundan, 6-APA, fermentasyonla üretimleri oldukça yüksek verimlerle gerçekleştirilebilen Penisilin G ve Penisilin V'nin kimyasal veya enzimatik hidrolizi ile üretilmektedir.



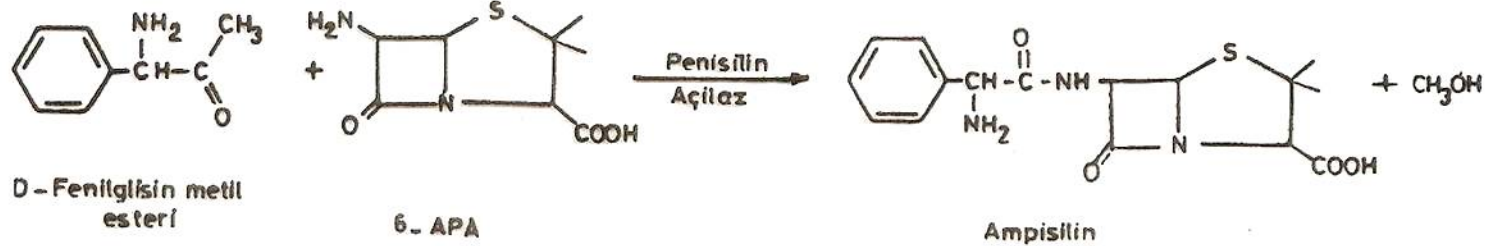
6-Aminopenisilanik Asit (6-APA)

Kesikli Proses

- Sodyum dihidrojen fosfatla tamponlanmış sulu çözeltinin sıcaklığı 35°C ye, pH'ı 7,8' e ayarlanır ve suda suspanse edilmiş immobilize açılaz ortama eklenir.
- Sıcaklık ve pH ayarlanan değerlerde sabit kaldıktan sonra potasyum benzilpenisilin katı halde ortama ilave edilir. Ortam kuvvetli bir şekilde karıştırılır ve bir pH-stat sistemiyle sodyum hidroksit çözeltisi eklenerek pH 7,8'de sabit tutulur.
- İstenen dönüşüm sağlandıktan sonra ürün çözeltisi plakaları yıkanabilen tipteki bir baskılı filtreden (filtre pres) geçirilerek süzülür ve diğer bir tanka aktarılır.
- Filtrede tutulan immobilize açılaz enzimi ise alt bölmede toplanarak tekrar bir pompa ile reaktöre geri gönderilir, işlem dikkatli yürütüldüğünde immobilize açılazın taze enzim eklenmeksizin yüz defadan fazla kullanımını mümkün olmaktadır.

Yarı Sentetik Penisilin Üretimi

- Penisilin açilaz enzimlerinin veya bunları içeren mikroorganizmaların immobilize türevleri 6-APA'nin açilasyonunda yani penisilin sentezinde kullanılabilir.
- Ekonomik önemi fazla olmadığından yarı sentetik penisilinlerin hazırlanması için 6-APA'nin enzimatik açilasyonu yerine kimyasal açilasyonu tercih edilmektedir. Bununla beraber immobilize enzim ve mikroorganizma teknolojilerinden bu alanda da yararlanmak için bazı çalışmalar yapılmaktadır.



İmmobilize penisilin açılaz ve mikroorganizmalar yardımıyla yarı sentetik penisilin üretimi

Enzim Kaynağı	İmmobilizasyon Yöntemi	Üretici Firma
<i>Bacillus megaterium</i> veya <i>Achromobacter</i>	Hücre DEAE-Sellülozda adsorplanmıştır.	Toyo Joza
<i>Bacillus circullans</i>	Enzim izole edilmiş ve DEAE Sephadex'e bağlanmıştır.	Otsuka Pharmaceutical
E. Coli	Sellüloz triasetatda tutuklama	SNAM Progetti
*E. Coli	Sellüloz triasetatda tutuklama	SNAM Progetti

*D-fenilglisinmetilester yerine p-hidroksifenilglisinmetilester kullanılmıştır.

Gerii D6ng6l6 Proses

- Immobilize ailaz g6zenekli iki filtre plakası arasına yerleştirilerek bir dolgulu tabaka oluşturulur. Ayrıca bu işlemde ceketli ve etkin olarak karıştırılabilen bir kap kullanılır.
- Kaptaki monosodyum fosfatla tamponlanmış 6zeltinin pH'ı 7,8'e, sıcaklığı 37°C'a ayarlanır ve s6rekli kontrol edilir. Potasyum benzilpenisilinin eklenmesiyle 6zelti dolgulu tabakaya pompalanır.
- Bu 6zelti istenen d6n6ř6m sağlanana kadar sistemde sirk6le edilir. Elde edilen 6r6n 6zeltisi ekstraksiyon tankına aktarılır.
- pH 2,5'a ayarlandıktan sonra oluşan yan 6r6n fenilasetik asidi ayırmak için ortama 6zelti hacminin yaklaşık yarısı kadar metil izob6til keton eklenir.
- Sulu faz alınır, pH 7,8'e ayarlanır ve vakum altında buharlaştırılır. Daha sonra hidroklorik asit ile pH 4,5'a ayarlanarak 6-APA 6kt6r6l6r.
- 6kelti filtre edilir, soğuk suyla yıkanır ve vakum altında kurutulur. Bu proseste elde edilen 6-APA % 98 saflıktadır ve işlemin toplam verimi yaklaşık % 90 dır.

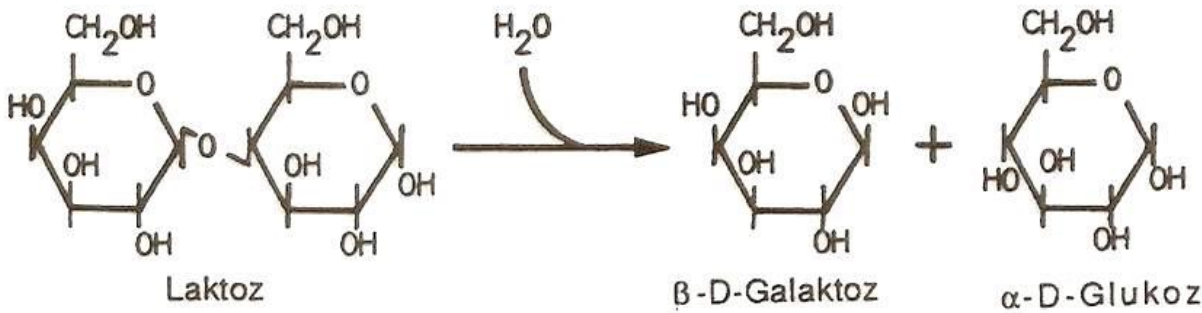
Yarı Sentetik Sefalosporin Üretimi

Sefaleksın sentezinde selüloz triasetat fiberlerde tutuklanmış E.Coli açılaz kullanılmıştır. Aynı immobilize enzim sistemi penisilin çekirdeğinin asitilasyonunda da kullanılmıştır.

Japon firması Toyo Jozo sefaleksın sentezi için bazı immobilize mikroorganizma sistemleri geliştirmiştir.

Sütteki Laktozun Hidrolizi

- Siyah ve sarı ırktan olanlarda yaygın bir laktoz intolerantlık söz konusudur. Özellikle yetişkin kişiler süt içtiklerinde karın ağrısı ve aşırı gazlanmadan hatta diyareden şikayet etmektedir. Yapılan araştırmalar bunun nedeninin sütteki laktozu parçalayan β -galaktosidaz enziminin organizmada ya yetersiz veya hiç sentezlenmemesi olduğunu göstermiştir.
- Bu sorunun çözümü, ya süt içilmeden önce içerisine β -galaktosidaz enzimi katmak veya üretim sırasında sütü ambalajlamadan önce immobilize β -galaktosidaz kolonlarından geçirmektir.



Enzim Teknolojisi

ENZİM TEKNOLOJİSİ

- Enzimler canlı organizmalarda substratların kimyasal değişimini katalizleyen kompleks yapıdaki protein molekülleridir.
- *In vitro* koşullarda da katalitik aktivite gösterirler. Bu nedenle mikroorganizmalar tarafından bol miktarda üretilebilen enzimler izole edilerek çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır.
- Enzimlerin endüstriyel süreçlerde kullanılmaları işlemlerine **enzim teknolojisi** denir.

Enzim teknolojisi,

- Mikrobiyal işlemler (üretici suşların seçimi ve geliştirilmesi vb.)
- Enzimlerin fermentasyon yoluyla üretimleri (büyük ölçekteki üretimler için yapılan besiyeri, ortam koşulları vb. düzeylerdeki optimizasyonlar),
- Katalitik etkinliğin artırılması için enzimlerin üç boyutlu yapılarının değiştirilmesi (protein mühendisliği),
- İzolasyonları ve
- İmmobilizasyonları (enzimlerin çözünmeyen destek materyaller yardımıyla suda çözünmeyen hale getirilmesi) çalışmalarını kapsar.

- Enzimler binlerce yıldır bilinçsizce de olsa insanlar tarafından peynir, bira ve ekmek yapımında kullanılmışlardır.
- Günümüzde enzimlerin kullanıldığı endüstriyel alanlar oldukça çeşitlenmiş ve mikroorganizmalar kullanılarak her yıl üretilen saf enzimlerin miktarları 500 ton gibi değerlere ulaşmıştır.
- Mikrobiyal enzimler,
 - süt ürünlerinin eldesinde,
 - biracılıkta,
 - etlerin işlenmesinde,
 - meyve sularının berraklaştırılmasında,
 - Fruktoz şurubu üretiminde
 - deterjan endüstrisinde,
 - tekstilde,
 - teşhis ve tedavi amacıyla tıpta kullanılmaktadırlar.

ENDÜSTRİ	ENZİM	KULLANIM ALANLARI
SÜT ÜRÜNLERİ	Hayvan türevli renin	Peynir imalatı (Renin üretimi sadece genç hayvanlardan elde edilebilir.Yaşlanınca üretim azalır.)
	Mikrobiyal renin	Hayvan türevli reninin yerini hızlı bir şekilde almaktadır.
	Lipaz	<i>Penicillium roquoferti</i> 'den izole edilen hücre dışı lipaz özel bir peynir üretiminde
BİRA END.	Arpadaki amilaz ve proteaz, endüstride üretilen amilaz proteaz, glukanaz	Nişasta ve protein, şeker ve aa'lerin yıkımı (malt oluşumu sırasında), malttaki proteinlerin ve polisakkaritlerin yıkımı
	β -glukanaz	Maya hücre duvarının yıkımı ve biranın berraklaştırılması
	Proteaz	Mayanın parçalanması ve biranın berraklaştırılması
EKMEK ve PASTA ENDÜSTRİSİ	Proteaz	Bisküvi üretimi için düşük proteinli un üretimi
	Maya α -amilazı	Undaki nişastanın şekerlere yıkılması ve mayanın kullanıma hazır olması
DETERJAN	Bakteriyel Ekstrasellüler proteazlar	Organik lekelerin uzaklaştırılması
ŞEKERLEME	<i>B.subtilis</i> α -amilazı	Tatlandırıcı olarak glukoz şurubu eldesi
TARIM VE ORMAN	Ligninaz	Odunsu atıklardaki lignoselülozik yapıdaki selülozun hayvanların kullanmasını sağlamak ve endüstriyel organik substrat olarak kullanmak
TEKSTİL	Bakteriyel amilaz	Dokumadan önce nişasta banyosuna batırılan ipliklerden nişastanın uzaklaştırılması.
DERİ	Mikrobiyal tripsin	Deriden tüy veya kılların uzaklaştırılması.
TIP	Tripsin	Kan pıhtılarının eritilmesinde ve yaraların temizlenmesi
	Çeşitli enzimler	Laboratuvar tanılarında

- Endüstriyel enzim pazarının yaklaşık 2/3 nü kapsayan deterjan katkısı olan enzimlerin pazardaki payı 2002 yılı için 980 milyon dolardır.
- Nişasta işleme endüstrisi ikinci büyük pazarı oluşturmaktadır. Gıda katkıları ve gıda işlenmesinde kullanılan endüstriyel enzimlerin pazardaki değeri 700 milyon dolardır (2002).
- Endüstriyel enzimler için bir diğer önemli alan hayvan yemlerine katılan enzimlerdir. Yaklaşık 200 milyon dolarlık (2002) bir değere sahip olan enzimler yemlerde parçalama yaparak sindirimi kolaylaştırmaktadır.

ENDÜSTRİYEL ENZİMLER

ENZİM	KULLANIM ALANI	MİKROORGANİZMA
α -amilaz	Maltoz ve dekstrinin yıkılması Leke çıkarıcı Unun zenginleştirilmesi ve Glukoz şurubu	Bacillus subtilis Aspergillus oryzae B. licheniformis
β -glukanaz	β -glukanın parçalanması yoluyla biranın berraklaştırılması	A. Oryzae, B.subtilis
Katalaz	İçeceklerin bozulmasını önleme	A. Niger
Selülaz	Deterjan katkı maddesi , Atıkların değerlendirilmesi	Penicillum spp.
Glukoz izomeraz	Glukoz \rightleftharpoons Fruktoz	Aspergillus spp. Streptomyces spp
Glukoz oksidaz	Biyosensör	A.niger
Laktaz	Laktöz \rightleftharpoons Glukoz+Galaktöz (Peynir altı suyu) laktozsus gıda üretimi	Kluyveromyces laktis
Lipaz	Deterjan katkı maddesi Peynir Endüstrisi	Gıda Mühendisliği ile oluşturulan A. oryzae
Pektinaz	Meyve suyu ekstraksiyonu Şarap ve meyve suyu berraklaştırılması	Erwinia spp
Proteaz	Deterjan katkı maddesi Deri Endüstrisi, et ekstraksiyonu	B. Subtilis
Renin	Peynir Endüstrisi	Kluyveromyces laktis, Mucor spp.
Sukraz (invertaz)	Şekerleme Endüstrisi	Saccharomyces spp.

Mikrobiyal Enzim Üretimi

- İlk aşama uygun katalitik özgülük ve istenilen fiziksel özellikleri taşıyan mikroorganizmanın seçimidir.
- Mikroorganizma düzeyindeki modifikasyonlar genellikle hücre başına üretilen enzim miktarının artırılmasına yöneliktir. Ayrıca kültür ortamı ve fermentasyon koşulları da enzim üretim maliyetini düşürmeye yönelik olan önemli parametrelerdendir.
- Suş seçiminde uygun fiziksel özellikler taşıyan enzimlerin seçimi genellikle bir organizmanın optimum üreme koşulları ile enzim özellikleri arasında pozitif korrelasyonun varlığı esasına dayanır.
- Farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen ve aynı reaksiyonu katalizleyen enzimlere **izofonksiyonel enzimler** denir. Mikroorganizma seçiminde izofonksiyonel enzimlerin farklı pH optimumları gibi değişik özelliklerinden de yararlanır.

Mikroorganizma seçiminden sonra suşun endüstriyel kullanımını için dikkate alınması gerekenler;

- Endüstriyel ırk enzimi yüksek konsantrasyonda üretmelidir.
- Kural olarak yabancı tiplerin enzim üretimi ticari kullanım için yeterli değildir. Bu durum katabolit represyon nedeniyledir.
- Glukoz gibi karbon kaynaklarının varlığında birçok parçalayıcı enzimin sentezi baskılanır (KATABOLİT REPRESYON).

Katabolit represyon besiyeri bileşimini değiştirerek ya da genetik olarak azaltılabilir.

MUTASYON

2-deoksiglukoza dirençli Trichoderma türlerinin selülozu fazla miktarda sentezledikleri saptanmıştır.

Besiyeri bileşenleri değiştirilir

Karbon kaynağı azar azar verilir ve katabolit represyon kırılır.

Kural olarak parçalayıcı enzimlerin üretilmesi için indüktörlere gerek duyulur. İndüktörler genellikle represör proteinlerin etkisiz hale gelmesi için gereklidir (**Negatif Kontrol**).

Büyük ölçekte üretim için indüktör gereksinimi maliyeti artırır.

Sorunun Konstitütif Mutant Eldesi İle Giderilmesi

Represörün bağlanacağı regülatör bölgedeki ya da regülatör protein genindeki bir mutasyon sonucu elde edilen konstitütif mutantlarda indüktör gereksinimi ortadan kalkar.

Endüstriyel Enzim Üretim Metodları

- Koji prosesi (Solid-state fermentasyon): Klasik yöntemdir.
 - ❑ Mikroorganizmalar katı ya da yarı katı tavalardaki besiyerlerinde üretilirler. Bu katı substratlar buğday kepeği, buğday sapı, pirinç kabuğu, arpa, suyu çıkarılmış şeker kamışı vb. dir.
 - ❑ Çoğunlukla bu katı substratlar proteazlar, lipazlar, selülazlar ve oksidazlar gibi enzimlerin üretiminde funguslar için kullanılır.
 - ❑ Bu tip fermentasyonda kontaminasyondan korunmak, sabit sıcaklık, havalandırma ve nemlendirme sağlamak zordur.

Endüstriyel Enzim Üretim Metodları

- **Fermentör Kullanımı:** Modern yöntemdir. Bu fermentörlerin kullanımı kontaminasyondan korunma, sabit sıcaklık, havalandırma ve nemlendirme gibi gerekliliklerin sağlanmasındaki olumsuzlukları ortadan kaldırır.

Mikrobiyal enzim üretiminde başlıca 4 çeşit fermentör kullanılır.

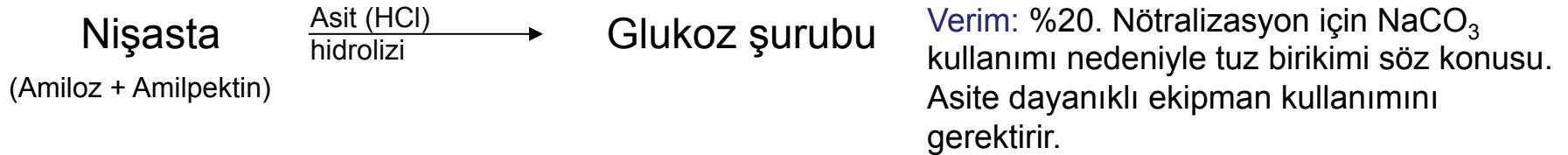
- ✓ Karıştırmalı tank tipi fermentör,
- ✓ Kabarcık kolon(bubble column),
- ✓ Air lift,
- ✓ Dolgulu yatak(packed bed)

- Bir enzim fermentasyonunun %50-80'i substratın harcanmasını içerir. Bu nedenle de mikro-organizmanın ucuz besiyerlerinde hızlı bir biçimde üremesi önemlidir.
- Ucuz besiyerindeki başlıca karbohidratlar: Melas, arpa, mısır, buğday, hidrolize nişasta ve laktoz,
- Azot kaynakları: soya fasulyesi, pamuk tohumu, mısır maserasyon sıvısı, hidrolize maya, gluten, jelatin, kesilmiş süttür.
- Ayrıca besiyerine inorganik tuzlar, iz elementler ilave edilmelidir.

Gıda Endüstrisinde Enzimler

Tatlandırıcı Yapımı (nişasta işlenmesi):

- Fruktozun tatlandırıcı özelliği glukozun iki katıdır. Bu nedenle düşük kalorili gıdalarda sükrozun yarı ağırlığındaki ancak iki katı tatlandırıcı özellikteki fruktoz tercih edilir.
- Glukozun fruktoza çevrilmesi alkali koşullarda ve yüksek sıcaklıkta kimyasal olarak mümkündür. Bu koşullarda istenmeyen yan ürünler oluştuğundan; enzim kullanılarak nişastadan yüksek fruktoz şurubu edilmektedir.



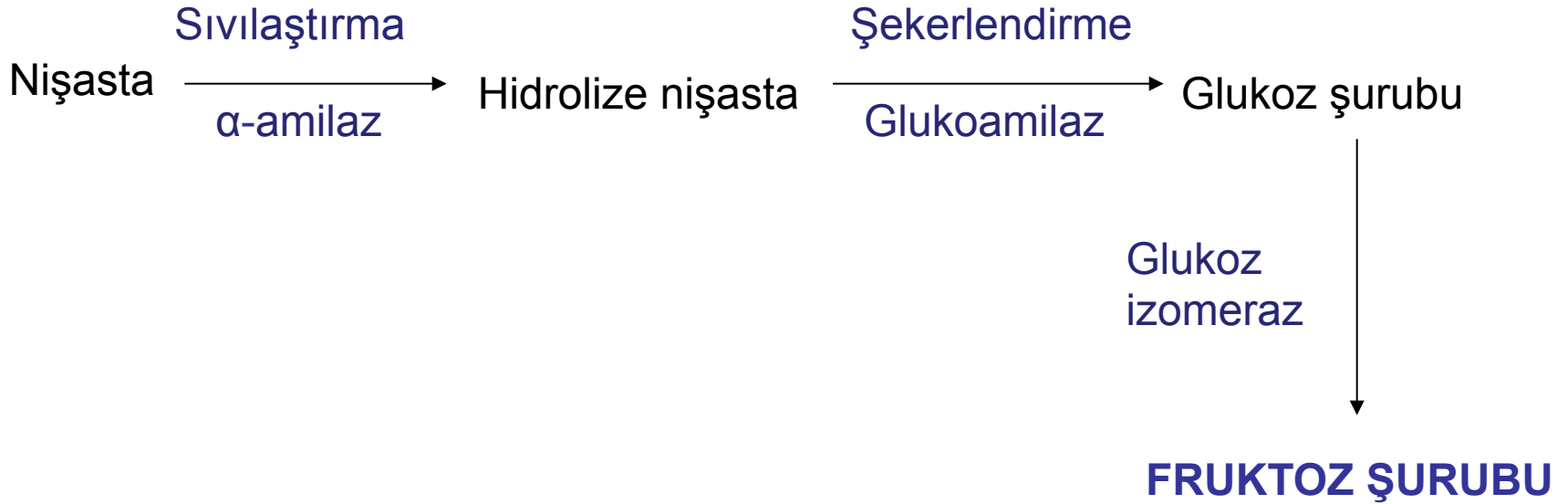
- Nişasta endüstrisinde ticari olarak kullanılan en önemli enzimlerden; α -amilazlar molekülün α -1,4 glikozit bağlarını, glukoamilazlar α -1,4 ve β -1,4 glikozit bağlarını, pullulanazlar ve diğer dallanma kırıcı enzimler α -1,6 glikozit bağlarını hidrolizlerler.

Tatlandırıcı Yapımı(II)

- Nişastadan glukoz ve fruktoz şurubu eldesinde ilk aşama **liquefaction** (sıvılaştırma) dır. α -amilazlarla (*Bacillus licheniformis*) nişastadan maltoz, az miktarda glukoz ve esas olarak da dekstrinler oluşturulur. Bu işlem nişastanın vizkozitesini düşürür ve çözünürlüğünü artırır.
- Glukoamilazlar ise şekerlerin oluşumuna yol açar. Bu olaya ise **sakkarifikasyon** (şekerlendirme) denir.
 - *Aspergillus niger* glukoamilazı nişasta ve dekstrinlerde α ,1-4 glikozit bağlarına etki ederek zincir ucundan glukoz monomerlerinin birer birer ayırırlar. α ,1-6 glikozit bağlarına da yavaşça etki ederek dallanmaları kırarlar.
 - *Bacillus pullulonazi* ise α ,1-6 glikozit bağlarını hızlı bir biçimde kırarlar.
- Bakteriyal glukoz izomeraz ile D-glukoz çok tatlı olan D-fruktoza çevrilir. Normalde reaksiyon denge durumundadır ve glukoz ile fruktozun eşit karışımı elde edilir.

Tatlandırıcı Yapımı(III)

Özetle;



Fruktoz şurubu sıvı tatlandırıcı olarak sükrozun yerini almakta; marmelat, reçel, çikolata, kola gibi alkolsüz içki yapımında kullanılmaktadır.

Deterjan Endüstrisi' nde Enzimler

- Deterjan endüstrisinde enzimler önemli yer tutarlar.
- Çamaşır deterjanlarının % 80'i ağırlıklarının % 0.015- 0.025'i kadar proteolitik enzim içerirler.
- Yine bulaşık deterjanlarında kullanılan α -amilazlar nişastalı artıkların uzaklaştırılması için kullanılmaktadırlar.
- Proteazlar ve amilazların yanı sıra lipazlar ve selülazlar da deterjan katkısı olarak kullanılmaktadır.

İMMOBİLİZE ENZİMLER

- Enzimlerin çözünmeyen destek materyalleri (matriksler) yardımıyla suda çözünmeyen hale getirilmeleri işlemine immobilizasyon denir.
- Mikrobiyal hücreler de enzimler gibi immobilize edilir.
- Tüm hücrelerin immobilize edilmesi saf enzimin gerekli olmadığı proseslerde kullanılan ucuz ve hızlı bir yöntemdir.
- Immobilize hücreler atıkların kullanımında, azot fiksasyonunda, steroid sentezinde, yarı sentetik antibiyotikler ve diğer tıbbi ürünlerin eldesinde kullanılır.

Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

- **Kovalent bağlama:** Enzimler kimyasal olarak kovalent bağlarla selüloz, sefadesks, agaroz, poliakrilamid, porlu seramik gibi suda çözünmeyen taşıyıcılara bağlanırlar.
- **Çapraz bağlama:** Enzimler glutaraldehit, alifatik diaminler gibi bifonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlanırlar. Bu reaktifler enzim molekülleri arasında bağ oluştururlar. Glutaraldehit enzim moleküllerinin amino gruplarından, diaminler ise karboksil gruplarından çapraz bağlarlar.

- **Adsorbsiyon:** Enzim moleküllerinin taşıyıcıların yüzeyine adsorblanmaları esasına dayanır. Kolay bir yöntemdir. Agaroz, sefadeks türevleri, selüloz türevleri, metal tuzları ve mineraller adsorban olarak kullanılırlar.
- **Tutuklama:** Enzimler yapay ya da doğal polimer kafesleri içinde tutuklanırlar. Polimer kafesler içine substrat girer ve ürün dışarı çıkar. Çapraz bağlı poliakrilamid jeller, Ca alginat, kapa karragenan bu polimerlerin örneklerindedir.
- **Kapsülleme:** Enzimler çeşitli tipteki membranlar içine alınırlar. Bu membranlar yarı geçirgendir. Düşük molekül ağırlıklı substratı ve molekülleri geçirirler. Hegza metilen diamin mikrokapsüllemeye kullanılır.

Ayrıca bu yöntemlerin kombinasyonları da, tutuklama-çapraz bağlama, kapsülleme-çapraz bağlama gibi, enzim immobilizasyonunda kullanılır.

İmmobilize Enzimlerin Avantajları

- İmmobilize enzimler tekrar tekrar kullanılabilirler. Özellikle üretimi zor ve pahalı enzimler için bu önemlidir.
- Ürün enzimle kontamine olmaz, çünkü enzim matrikste tutulur.
- Matriks enzimi fiziksel bir bariyer olarak koruduğundan, enzim aşırı pH ve sıcaklık gibi etkenlere dayanıklı hale gelir.
- Sürekli prosesler için daha elverişlidir.
- İmmobilize enzimler çok daha doğru bir şekilde kontrol edilirler.
- İmmobilize hücrelerle bir çok enzim de immobilize olacağından aynı anda birden fazla reaksiyon gerçekleşebilir.