

TEKNOFEST**HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ****BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI****PROJE DETAY RAPORU****FİKİR KATEGORİSİ****TAKIM ADI**

HELYA

PROJE ADI

Enzim membran reaktör sistemi kullanılarak SO₂'den helal ve vegan sistein aminoasiti
üretimi

BAŞVURU ID

81996

KATEGORİ

Biyoteknoloji İnovasyon

İÇİNDEKİLER

1. PROJE ÖZETİ (PROJE TANIMI)	2
2. PROBLEM/SORUN:	4
3. ÇÖZÜM	5
4. YÖNTEM	7
4.1 SO ₂ 'nin SBF Metoduyla Diğer Gazlardan Ayrılması	7
4.2 SO ₂ 'nin Sulu Ortamda Çözülmesi.....	7
4.3 Sulfite reductase, Hydroxymethyltransferase ve OASS-A Enzimlerinin Eldesi	7
4.4 Jel Membranın Hazırlanması ve Enzimlerin İmmobilizasyonu.....	11
4.5 Sisteyinin Toplanması/Saflaştırılması.....	11
5. YENİLİKÇİ (İNOVATİF) YÖNÜ	12
6. UYGULANABİLİRLİK	12
7. TAHMİNİ MALİYET VE PROJE ZAMAN PLANLAMASI	13
8. PROJE FİKRİNİN HEDEF KİTLESİ (KULLANICILAR):	15
9. RİSKLER	15

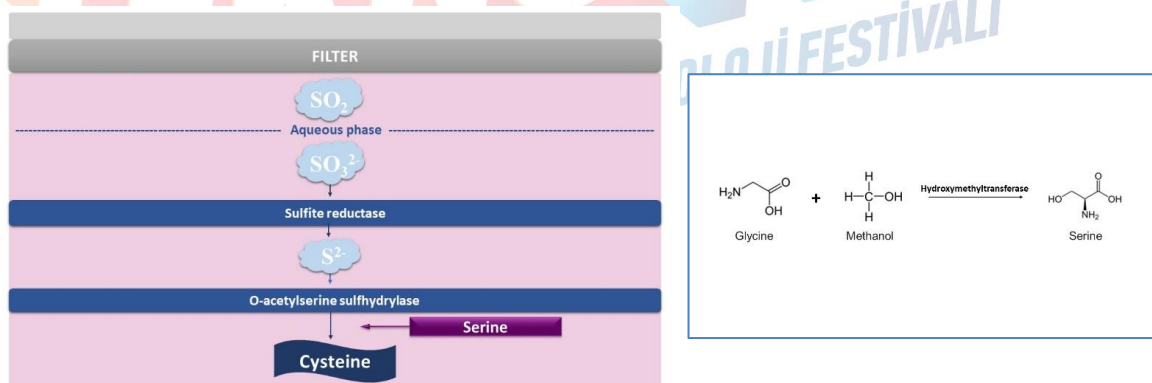


1. PROJE ÖZETİ (PROJE TANIMI)

Kükürt ve oksijenden oluşan inorganik bileşik SO_2 , volkanik patlamalar, elektrik üretimi, endüstriyel kazanlar, petrol arıtımı ve metal işleme sonucu açığa çıkar. Yüksek konsantrasyonda solunumuna maruz kalınması astım gibi ciddi sağlık sorunlarına yol açarken çevre üzerindeki olumsuz etkileri de yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Iwasawa v.d., 2008) Diğer yandan 20 aminoasitten birini oluşturan ve $C_3H_7NO_2S$ formülü ile bilinen sistein, gıdadan kozmetiğe, kozmetikten eczacılığa kadar çeşitli alanlarda kullanılan bir aminoasittir. Başlıca üretimi Çin’ de yapılan sistein aminoasitinin temininde ülkemizin dışa bağımlı olmasının önüne geçmek amacıyla yurt içinde üretiminin gerçekleştirilmesi projemiz hedeflerindedir. E910, E920 ve E921 kodlarıyla gıda katkı maddesi olarak da geniş bir kullanım alanına ve pazar hacmine sahip olan sisteinin yurt dışında üretiliyor olması, üretim proseslerinin ve kullanılan hammaddelerin kontrolünün sağlanamaması ve genellikle helal olmayan yöntemlerle elde edilmesi sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (Berehoiu v.d, 2013). Bu iki sorun göz önüne alınarak SO_2 fiksasyonunun sistein aminoasitine dönüştürülmesi ile sonuçlanması projemizin ana hedefini oluşturmaktadır. (Ermiş v.d., 2018)

SO_2 ’nin sisteine dönüşümü sürecindeki kimyasal yolak baz alınarak gerekli enzimler bu süreçte enzim membran reaktör sisteminin entegre edildiği filtreleme tekniği kullanılacak olup, tepkime basamaklarında gerekli Sulfite reductase, Hydroxymethyltransferase ve O-acetylserine sulfhydrylase (OASS-A) enzimlerinin immobilize enzim metodlarından biri olan tutuklama (entrapment) yöntemiyle hareketsizleştirilmesi ve tepkimenin in vitro ortamda gerçekleştirilmesi sağlanacaktır.

Sizlere bu raporda bu projeyi gerçekleştirmekteki amacımızın tam olarak anlaşılması amacıyla karşı karşıya olduğumuz problemlerin kısa bir özetini, bu sorunları çözmek için tasarlanmış olduğumu filtre sisteminin bileşenlerini ve aşamalarını sunacağız, bu aşamalarda bizler için gerekli olan malzemeleri ve bunları nasıl ve nerelerden temin ettiğimizden bahsedeceğiz son olarak ise tasarlanmış olduğumu filtre sisteminden istediğimiz sonuca ulaşmamız durumunda uygulayabileceğimiz B planımızdan bahsedeceğiz.



Şekil 1: a) SO_2 ’nin, sistein amino asitine dönüşümündeki basamakları ve gerekli enzimlerin gösterimi. b) Glisin and methanolün, serine hydroxymethyltransferase enzimi varlığında serine amino asitinin elde edilme tepkimesi.

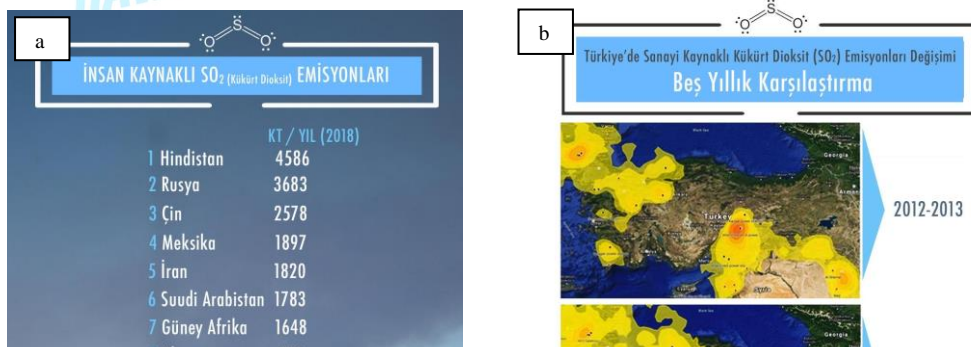
2. PROBLEM/SORUN:

Dünyanın atmosferini oluşturan gaz karışımı olan havanın içerisine çevresel faktörlerle salınımı yapılarak kirliliğine neden olan emisyonlar CO_2 , SO_x , NO_x kimyasal formülleriyle gösterilen karbondioksit, sulfuroksitli ve azotmonoksitli bileşiklerdir. Bu maddeler genellikle proses fırınları ve kazan bacalarından, rejeneratörlerden, alev bacalarından ve yakma fırını bacalarından kaynaklanırlar. Kirlenici gazların insan ve çevre sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Iwasawa v.d,2008).

Kükürt-dioksitler (SO_x) olarak adlandırılan kimyasal bir grubun parçası olan kükürt-dioksit (SO_2), renksiz, kötü kokulu ve toksik bir gazdır. Özellikle kömür, petrol ve dizel gibi fosil yakıtların veya kükürt içeren diğer bileşiklerin yanma tepkimeleri sonucu atmosfere salınan kükürt-dioksit, insan ve çevre üzerinde kayda değer olumsuz etkilere sahiptir (Tortora v.d, 2019). Kükürt-dioksitin solunulması durumunda üst solunum rahatsızlıkları dahil kalp hastalıklarının da tetiklendiği yapılan araştırmalarda ortaya konulmuştur (Sharon & Australia, 1984). İnsan sağlığı üzerindeki etkisinin dışında, SO_2 'nin atmosferdeki varlığı asit yağmurlarına öncü olmakla beraber; SO_2 'nin atmosferde sülfürik asite okside olması sonucu oluşan bulutlar, güneşin dünyaya ulaşması gereken enerjisi (güneş ışığına) önünde engel oluşturarak küresel iklim değişikliğine de yol açmaktadır (Tortora v.d, 2019). Son 30 yılda bu olumsuz etkileri en aza indirmek amacıyla çalışmalar yapılmıştır, fakat SO_2 'nin atmosferdeki miktarını azaltmaya yönelik çalışmalar yüksek maliyetli uygulamalardır (Datta v.d, 2013).

Greenpeace'in 2018 yılında yayınladığı "İnsan Kaynaklı SO_2 Emisyonları" raporunda Türkiye ilk 10'da yer alırken, yine aynı yıl içerisinde Temiz Hava Hakkı Platformu'nun yayınladığı raporla birlikte, Türkiye'deki hava kirliliğinin sebep olduğu ölümler trafik kazalarının sebep olduğu ölümlerin neredeyse on katı olduğu kaydedilmiştir. Bu raporlara göre SO_2 kaynaklı hava kirliliği çözülmeyi bekleyen bir sorun niteliği taşımaktadır (Greenpeace, 2018).

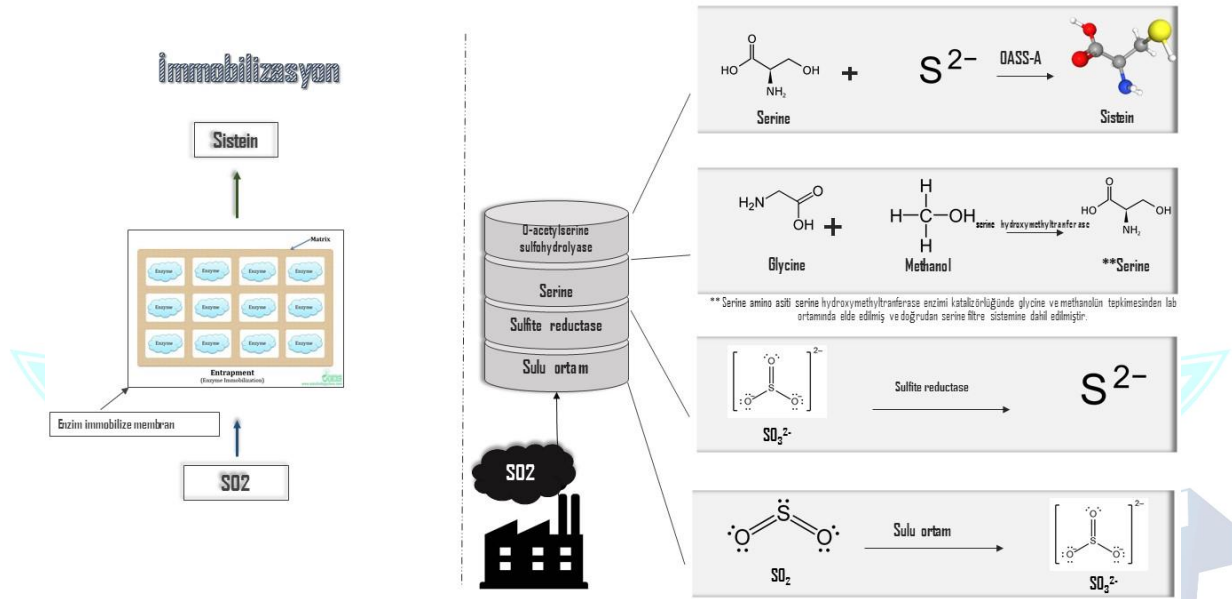
Bir diğer küresel sorun ise helal sistein (Cys) amino-asiti üretimidir. Protein açısından zengin yiyeceklerde bulunan sistein amino-asiti; yemek, eczacılık ve kişisel bakım endüstrisi de dahil olmakla birlikte birçok alanda kullanılmaktadır. Sistein Avrupa, Kuzey Amerika ve Asya başta olmak üzere büyük bir market hacmine sahiptir. Sisteinin sahip olduğu kimyasal özellikler nedeniyle bu marketin daha da genişlemesi beklenmektedir. Sistein amino-asiti ihtiyacının



Şekil 2: (a) 2018 yılı insan kaynaklı SO_2 emisyonları dünya geneli sıralama, (b) Türkiye'de sanayi kaynaklı SO_2 emisyonların 5 yıllık değişim haritası (Tokyo, 2018).

büyük bir kısmı hayvan (özellikle domuz ve kümes hayvanları) kılırları kullanılarak karşılanmaktadır. Fakat bu yöntem, helal ürün ihtiyacı güden ve dünyanın 2021 ile beraber %13'ünü oluşturan Müslümanları ve sayıları hızla artmaya devam eden veganları tatmin eden bir ürün marketi sunmamaktadır. Bu boyutuyla da küresel helal sistein ihtiyacı, çözüm bekleyen bir sorun olarak beklemektedir (Hogan,2010) (Papi v.d, 2018)

3. ÇÖZÜM



Şekil 3: Immobilizasyon sistemin genel çalışma mekanizması ve baca entegre planlaması (entrapment metodu kullanılarak immobilize edilmiş sülfite reductase ve OASS-A enzimleri aşamalarından geçen SO₂'nin sisteine dönüşme yoluyla).

Enzimler bir diğer ifadeyle biyokatalizörler, üretim kolaylıkları, substrat özgüllükleri ve çevre için avantajlı yapıya sahip olmaları nedeniyle biyoteknoloji alanında geniş bir kullanım alanına sahiptirler. Yeniden kullanılabilir yapıda bulunmaları ekonomiklik ve çevreci olmak gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Fonksiyonel verimlilik ve tekrarlanabilir yapıya sahip olan immobilize enzimler, enzimin substratlar ve ürünler için olandan farklı bir matrise hapsedilmesi prensibine dayanmaktadır. Genellikle taşıyıcı matris olarak polimerler ve inorganik malzemeler kullanılmaktadır. İdeal bir matris, inertlik, fiziksel güç, stabilite, enzim aktivitesini / özgüllüğünü artırma ve ürün inhibisyonunu, spesifik olmayan absorpsiyon ve mikrobiyal kontaminasyonu azaltma kabiliyetine sahip olmalıdır (Giorno, 2001).

Enzim immobilizasyonu, enzimlerin çözelti içerisinde aktif bir halde kullanılmasından ziyade belirli sabitleştirme süreçlerine tabi tutularak içsel destekler yardımıyla enzimlerin kullanım verimliliğini artırma sürecidir. Yapılan araştırmalara göre immobilize edilmiş enzimlerin endüstriyel kullanımın açısından üç temel avantajı olduğu not edilmiştir. Bunlar; (i) sabitlenmiş enzimi yüksek verimli kullanım imkânı, (ii) enzimlerin tekrar kullanılabilirliği ve (iii) reaksiyon sonucunda elde edilen ürünlerin enzimden arınmış olması. Bunların yanı sıra,

immobilize enzimlerle yapılan çalışmalar in vivo çalışmalarla karşılaştırıldığında, biyolojik atık anlamında immobilize enzimlerle yapılan çalışmalarda atık probleminin daha minimal bir sorun olduğu kaydedilmiştir. İmmobilizasyon, yüksek yatırım / kapasite oranı, yüksek saflıkta ürün kazanımı, ekonomik açıdan sürekli kazanım gibi çeşitli açılardan avantaj sağlamaktadır.

Enzim immobilizasyonu 3 ana başlık altında incelenir.

Bunlar;

- Taşıyıcıya bağlama; Polisakkarit türevleri, sentetik polimerler ve cam gibi suda çözünmeyen taşıyıcılar kullanılarak gerçekleştirilir. Kullanılan teknikler kovalent bağlanma, iyonik bağlanma ve adsorpsiyon şeklindedir.
- Çapraz bağlanma: Bisdiazobenzidin, glutaraldehit ve heksametilen diizosiyanat gibi iki / çok fonksiyonlu reaktifler kullanılarak gerçekleştirilir.
- Tutuklama: Kolajen, selüloz ve κ-karragenan gibi polimerler kullanılır. Kullanılan teknikler jel tutuklama, mikrokapsülleme ve fiber tutuklama şeklindedir (Datta, 2013)

Hangi immobilizasyon tekniğinin yapılacak çalışma için daha iyi sonuçlar vereceğini anlamak için kullanılacak enzim ve sentezlenecek ürün özelliklerinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. 1969'da yapılan ilk immobilize enzim çalışmasında (L-amino asit asilaz) etkili tekniğin bulunması için deneme yanılma yöntemi kullanılmış, 40 denemenin ardından sadece 3 tanesinin etkili sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

Enzimlerinin immobilizasyonunda birçok metodun varlığıyla beraber endüstriyel anlamda kullanım için en uygulanabilir ve düşük maliyetli olanı seçilmelidir. Bunlar dikkate alındığında projemiz çerçevesinde tasarlamayı hedeflediğimiz enzim membran reaktör sistemi için en uygun enzim immobilizasyon metodu tutuklama (entrapment) yöntemidir. Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinden olan adsorpsiyon ve kovalent bağlama yöntemlerinden farklı olarak, entrapment metodunda çapraz bağlanmaya ve jel oluşumuna neden olan polimerizasyon reaksiyonlarının çoğu, destek materyali ile enzim molekülleri arasında doğrudan bağ oluşumunu içermez. Enzim molekülleri doğrudan yüzeye bağlanmazlar, kafesli bir jel yapı içerisinde fiziksel olarak tutulurlar. Kafesli jel yapıyı oluşturan ise polimerlerin çapraz bağlanmasıdır. Yüksek düzeyde çapraz bağlı bir jel, ince bir tel-ağ yapısına sahiptir ve kafeslerinde daha küçük enzimleri daha etkili bir şekilde tutabilir. Taşıyıcıya bağlama yöntemleride kullanılan bağların enzim proteininin yapısını değiştirdiğine ve enzim özelliklerini değiştirdiğine dair yapılan deneylerle kanıtlanmıştır (Stein & Schwedt, 1993). Enzim molekülleri, tutma yönteminde polimerizasyon reaksiyonuna kendileri katılmadıkları için, aynı tutma teknikleri, farklı enzimler arasında sadece küçük modifikasyonlarla çok çeşitli enzimlere başarıyla uygulanabilir. Bunlar dikkate alındığında projemizde kullanılan Sulfite reductase, Hydroxymethyltransferase ve OASS-A enzimlerinin immobilizasyonu için entrapment en uygun yöntem olarak seçilmiştir.

Bu yöntemde kullanılacak olan enzimler organik veya inorganik membran ile tutularak membran içeriğini oluşturan jel matriks içine hapsedilir. (Sigurdardottir, et al., 2017). Jel membran substrat ile ürün arasında seçici bariyer olmanın yanı sıra tepkimenin yürütüldüğü

taşıyıcı görevi görmektedir. Entrapment metodunda en yaygın kullanılan jel membranlar poliakrilamid, kalsiyum aljinat ve jelatindir. 3 medyanın hazırlanması süreci de yaklaşık olarak aynı prosedürleri ve ekipmanları içerir. Enzimler bir çözelti içinde monomerler/polimerler ve çapraz bağlama ajanları (cross-linking agents) ile karıştırılır. Çözelti daha sonra jel oluşumu sürecini başlatmak için polimerizasyon hızlandırıcılarına maruz bırakılır. Daha sonra istenen şekilleri elde etmek için çözelti bir kalıba dökülür. İmmobilizasyon işleminin verimliliği için enzimlerin yüksek bir yüzdesinin başlangıçta jel matrislerinde tutulması gerekir ve enzim aktivitesi korunmalıdır.

4. YÖNTEM

4.1 SO₂'nin SBF Metoduyla Diğer Gazlardan Ayrılması

Sunulan çözüm önerisinin ilk aşaması SO₂ gazının diğer baca gazlarından (karbon monoksit, nitrojen oksit) ayrıştırılmasıdır. Bu ayrıştırma sürecinde havadaki gaz halinde bulunan SO₂ gazını yüksek bir oranda filtre içine hapsedebilen bir yöntem olan SBF (strong-base ion Exchange materials) kullanılacaktır. SBF'nin hazırlanma süreci klorometillenmiş polistiren ve trimetilamin ile aminasyon sonucu oluşan tepkimeye dayanmaktadır. Krometillenmiş polistirenin ilk olarak polipropilen lifler üzerine aşılır. Daha sonra uygulanan aminasyon tepkimesi SO₂ gazının anyon formunda filtre içerisinde emilimini sağlar (Soldatov v.d, 1986).

Yapılan çalışmalarda, SO₂ gaz yoğunluğunun düşük olduğu ortamlarda dahi yüksek verimli emilim sağlayabilen SBF yöntemi, karbon filtreleri kullanılarak yapılan işlemlerin yaklaşık olarak %20'sinden daha az paraya mal olmaktadır. Buna ek olarak, 100 °C aşkın sıcaklıklarda dahi verim kaybetmeyen kimyasal özellikleri, SBF yöntemini baca sistemine uygulanabilir bir seçenek olarak göz önüne çıkarmaktadır (Soldatov, et. al., 1986).

4.2 SO₂'nin Sulu Ortamda Çözülmesi

SBF yöntemi kullanılarak filtre içerisinde sabitlenen SO₂ gazının sulu ortam kullanılarak SO₃²⁻ 'ye dönüştürülmesi çözümün ikinci basamağını oluşturmaktadır. SO₂ gazının filtre içerisinde hapsolmuş olan son formu HSO₃⁻ ile SO₃²⁻ karışımından oluşmaktadır. Bu aşamada fabrika bacasında hali hazırda var olan su buharı (yaklaşık %20 oranında) ve basınç kullanılması planlanmaktadır. Böylelikle gaz bulutu halinde SO₃²⁻ ilk immobilize edilmiş enzim reaktör sistemi olan sülfite redüktaza ulaşacaktır (Soldatov v.d, 1986)

4.3 Sülfite reductase, Hydroxymethyltransferase ve OASS-A Enzimlerinin Eldesi

Bu genlerden Sülfite reductase enzimini kodlayan *cysI* ve Serine hydroxymethyltransferase enzimini kodlayan *glyA* (Gen Bankası Erişim numarası: 947231) *E. coli* K12'den elde edilirken, O-acetylserine sulfhydrylase enzimini kodlayan *cysK* (Gen Bankası Erişim numarası: 946877) geninin dizilimi *Mycobacterium tuberculosis* (Gen Bankası Erişim numarası: 946877) bakterisinden alınacak ve gen dizilimi GenScript Biotech firmasına gönderilecek ve sonrasında pET28a plasmidine üç genin yerleştirilmesini talep edilecektir. Gerekli primerlerin eldesi, PCR yönteminin meşakkati ve maliyeti nedeniyle daha ekonomik, kolay ve hızlı olacağını düşünerek bahsettiğimiz yöntemi uygulamayı planlamaktayız. Elde

edeceğimiz plasmidler *cysI*-pET28a, *cysK*-pET28a ve *glyA*-pET28a olarak adlandırılacaktır ve bu plasmidlerin *E. coli BL21(DE3)* 'ye transformasyonu gerçekleştirilecektir.

Kompetent hücrenin hazırlanması:

Kimyasallar	Ekipmanlar	
Bacterial cell (<i>E. coli BL21(DE3)</i>)	37 °C İnkübatör	Steril Falcon (50 mL)
Steril LB Broth (50 mL)	Su banyosu	Steril Falcon (15 mL)
Cold 0.1 M CaCl ₂	-80 °C Dondurucu	Steril Eppendorf (1.5 mL)
Cold 0.1 M CaCl ₂ / 15 % Gliserol	Mikro Centrifuge	Steril Erlenmeyer Flask (250 mL)
		Kuru Buz

- 50 mL falcon tüpte 5 mL hazırlanan LB medyaya eklenen *E. coli BL21(DE3)* 37 °C'de inkübatörde 16 saat büyütülecektir.
- E. coli* kültürü 12-16 saat boyu inkübe edilir ve LB agar medyasına eklenmektedir.
- Tüpler inkübatörde (37 °C) 150 rpm'de 1.5-3 saat çalkalanır.
- Bakteri hücreleri içeren şişeyi 10 dakika buz üzerinde bekletilir.
- Bakteri hücrelerin 3 dakika 6000 rpm'de santrifüjlenir.
- Süpernatant peletten ayrılır ve 10 mL soğuk 0.1 M CaCl₂ ile süspanse edilir
- 20 dakika buz üzerinde inkübe edilir ve sonrasında ikinci adım tekrarlanır.
- Süpernatant atılır ve pelet 5 mL soğuk 0.1 M CaCl₂/ %15 Gliserol ile yeniden süspanse edilir
- 80 °C'de dondurulur.

Bakteriyel Transformasyon:

Transformasyon için gerekli malzemeler:

Kimyasallar ve Hücre	Ekipmanlar
----------------------	------------

<i>E. coli</i> BL21(DE3)) kompetent hücre	37 °C Inkübatör
Taze LB Broth Medya	42 °C Su banyosu
1pg -100ng <i>cysI</i> pET28a, <i>cysK</i> pET28a ve <i>glyA</i> pET28a plasmid DNA'lar (1-5 µL)	Kanamisin içeren LB Agar plakeler
Kuru buz	

1. *cysI*-pET28a, *cysK*-pET28a ve *glyA*-pET28a plasmidleri kompetent hale getirilmiş hücrelere ayrı ayrı tüplerde eklenir ve buz üzerinde 30 dakika inkübe edilir.
2. Sonrasında tüpler 42 °C'lik bir su banyosunda plasmid DNA'nın hücre içerisine girebilmesi için 45 saniyelik ısı şokuna maruz bırakılır ve 2 dakikalık süre ile buza yerleştirilir.
3. Eppendorf tüplerine önceden otoklavlanmış LB Broth besiyerinden 900 µL eklenir ve Eppendorf tüpleri 225 rpm'de 37 °C'de 50-60 dakika inkübe edilmektedir.
4. Antibiyotik içeren LB Agar plakalarını +4 °C'den çıkarılır ve hücreler 50 µg/mL kanamisin içeren LB Agar plakalarına spatula kullanarak aşılanır.
5. İnoküle edilmiş LB Agar plakalarını gece boyunca 37 °C'de inkübe edilir ve 16 saat sonra inkübatörden alınır.
6. Rekombinant pET28 plazmidini alan hücreler antibiyotiğe direnç göstererek koloni oluştururken, plazmidi alamayanlar antibiyotik direnç genini içermedikleri için antibiyotik nedeniyle ölecektir.
7. *cysI*-pET28a ve *glyA*-pET28a plasmidlerinin aktarıldığı *E. coli* bakterileri 37 °C'de inkübe edilirken, *cysK*-pET28a plasmidinin aktarıldığı *E. coli* bakterileri 28 °C'de inkübe edilmektedir.
8. İnkübasyonu gerçekleştirilen hücre örneklerinden 20 µl'si LB medyasına aktarılır
9. Optical density 600 (OD) değeri 0.8'e ulaşana kadar kültürleme işlemine devam edilir.
10. Lak operonun transkripsiyonunu tetikleyen 1mM izopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit (IPTG) eklenir ve istenilen genlerin ekspresyonu sağlanır.

Native Purification Buffer Hazırlanması

1. 180 mL'lik deiyonize edilmiş su içerisine 7 gram NaH₂PO₄ (8.0 pH) ve 29.2 gram NaCl eklenir.
2. Karışım dikkatli bir şekilde karıştırılır.

3. NaOH kullanarak çözeltinin son pH seviyesi 8.0'a ayarlandıktan sonra su kullanılarak çözeltinin son hacmi 200 mL'ye getirilir.
4. Oda koşullarında saklanabilir.

Ni-NTA Kolonunun Hazırlanması

5. Thermofisher'den satın alınan Ni-NTA Agarose birkaç kere nazikçe ters çevirilerek süspansiyon edilir.
6. 1.5 mL resin 10 mL'lik pürifikasyon kolonuna aktarılır.
7. 800 g'de bir dakika boyunca santrifüj edilir.
8. 6 mL steril su eklendikten sonra hafifçe ters-düz edilerek yeniden süspansiyon edilir.
9. 3. adım tekrar edilir.
10. Native Binding Buffer hazırlanması için, ilk olarak 30 mL 1X Native Purification Buffer ile 100 µL 3M İmidazole (pH 6.0) karıştırılır ve NaOH ve HCl kullanılarak pH seviyesi 8.0 ayarlanır.
11. 6 mL NBB eklenir ve hafifçe ters-düz edilerek süspansiyon edilir.
12. 3. adım tekrar edilir.
13. 6. adım tekrar edildikten sonra 2. adım tekrar edilir.

Pürifikasyon

1. 8 mL lysate ve hücre karışımı hazırlanan Ni-NTA kolonuna eklenir.
2. Çözelti 30-60 dakika boyunca hafif çalkalandıktan sonra 800 g'de 1 dakikalığına santrifüj edilir.
3. Santrifüj sonrasında çökelti dikkatli bir şekilde çıkarılır.
4. 8 mL Native Wash Buffer (50 mL 1X Native Purification Buffer ile 335 µL 3M imidazole karıştırılarak NaOH ve HCl kullanılarak pH 8.0'a ayarlanır) eklenir ve karışım 800 g'de santrifüj edilir.
5. 4. adım üç defa tekrar edilir.
6. Kolon dikey konumda sabitlendikten sonra kolonun alt kısmındaki kapak kapatılır ve 10 mL Native Elution Buffer (13.75 mL 1X Native purification buffer ile 1.25 mL 3M imidazole (6.0 pH) karıştırılarak NaOH ve HCl kullanılarak pH 8.0'a ayarlanır) protein elute edilir.

4.4 Jel Membranın Hazırlanması ve Enzimlerin İmmobilizasyonu

Karıştırmalı tank reaktörü, zar membran içerisinde hareketsizleştirilmiş (immobilize edilmiş) enzimleri içeren zar membran ile iki bölmeye ayrılır. Her iki bölme tepkimelerin optimum koşullarda gerçekleşmesini sağlayan sulu ortamda buffer çözeltisine sahiptir. Diğer bölmelerle bağlantılı olan kısımdan gelen kimyasal, poliakrilamid yapısındaki zar membranda immobilize edilmiş enzim katalizörlüğünde tepkimeye girerek sonraki ürüne dönüşümünü gerçekleştirir. İlk olarak membran karakterizasyonu yapılır. Enzim membran reaktör filtre sistemimizde kullanılacak olan membran, poliasilamidler, akrilamid veya türevlerinden oluşturulan yüksek moleküler ağırlıklı, iyonik olmayan, suda çözünür ve biyoyoumlu bir polimerden oluşacaktır. Polimer, basit bir lineer zincir veya çapraz bağlı bir yapı olarak sentezlenebilir. Nötr Poliakrilamid (PAM), suyun viskozitesini artırır ve suda bulunan partiküllerin topaklanmasını sağlar. Amit grupları su molekülleri ile güçlü hidrojen bağları oluşturduğundan, çapraz bağlı polimer son derece büyük miktarlarda suyu emebilir ve tutabilir. Akril amid jel içerisinde enzimlerin hareketsizleştirilmesi daha önce urease (E.C 3.5.15) enzimi için yapılmış ve aynı jel içerisinde tutuklama metodu kullanılarak farklı enzimlerin de immobilizasyonun kolaylıkla yapılabileceği belirtilmiştir (Trevan, nd). Enzimlerin yükleneceği enzim membranı oluşturmak için kapaklı bir cam şişe içerisinde, 210 mg Methylene-bisacrylamide (MBA) ve 10 mg Acrylamide (ACR) ,10 ml Tris bufferi varlığında, pH 7.0, çözdürülerek solüsyon hazırlandı. 15 mg OASS-A enzimi hazırlanan MBA-ACR solüsyonu içerisinde 20 dakika boyunca, nitrojen gazıyla arındırılarak çözdürüldü. Elde edilen çözelti içerisine 0.2 mL dimetilamino-propionitril eklenerek yavaşça karışımı sağlandı. Daha sonra 0,5 mL potasyum persülfat çözeltisi eklenerek, şişenin kapağı kapatıldı ve polimerizasyonu için oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Bir huni kullanılarak jel hale gelmiş olan karışım filtrelendi ve 0.5M NaCl içeren 50 mL 0.1M Tris bufferi, pH 7.0, ile yıkandı. Bu aşama 6 kez tekrarlandıktan sonra jel 15 mL, 0.1 M Tris bufferi içinde yeniden süspanse edildi. Çapraz akış ultrafiltrasyon metoduyla enzimin membrana yüklenmesi sağlanarak enzim yüklü membran oluşturuldu. Çözelti yaklaşık 2.5 mm kalınlıkta olacak şekilde uygun büyüklükteki petri kabına döküldü ve membran hazırlandıktan sonra membran performansını kontrol etmek ve optimizasyonunu sağlamak amacıyla saf su geçirgenliği distile su kullanılarak ölçüldü. Aynı metod sulfite reductase ve hydroxymethyltransferase enzimlerinin imbolizasyonu için tekrar edilerek membranlar hazırlandı.

4.5 Sisteinin Toplanması/Saflaştırılması

Çözümün son aşaması olan sistein saflaştırılması için yüksek oranlarda saflaştırma sağlayan ve nispeten basit bir uygulama olan amonyum sülfat çökeltme yöntemi kullanılacaktır (Scopes).

1. Buffer içerisinde bulunan saflaştırılacak karışımın hacmi belirlendikten sonra, eklenecek $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile birlikte %60'lık doymaya ulaşacak şekilde yeni bir çözelti hazırlanır.
2. Hazırlanmış karışım soğuk oda koşullarında stir bar yardımıyla yarım saat boyunca karıştırılır. Sonrasında stir bar çıkarılır.
3. İşlem sonrasında çökelmiş olan proteinler 20,000 g'de yârim saatliğine santrifüjlenir.

4. Santrifürj sonrasında elde edilen amino asit çökeltisi 4 °C’de saklanır.
5. Çökeltinin geri kalanında bulunun süpernatant (NH₄)₂SO₄ ile birlikte %90’lık doymaya ulaşacak şekilde yeni bir çözelti hazırlanır.
6. İkinci ve üçüncü adımlar tekrar edilir.
7. Son olarak elde edilen amino asit çökeltisi 4 °C’de saklanır (Bhardwaj v.d., 2013).

5. YENİLİKÇİ (İNOVATİF) YÖNÜ

Halihazırda kükürt dioksit gazının neden olduğu olumsuz etkileri azaltmaya yönelik çeşitli yöntemler mevcuttur. Bu yöntemler; (i) baca gazı kükürt giderme (FGD) olarak adlandırılan yanma/oksidasyon sırasında üretilen SO₂ emisyonları, baca gazlarının bir baca yoluyla atmosfere salınmadan önce arıtılmasıyla azaltılması (ii) Ezilmiş kireçtaşı/kirecin suyla karıştırılarak veya bir bulamaç veya sıvı oluşturmak için su ile seyreltilen kostik sodaya daha sonra kükürt içeren baca gazlarına püskürtülmesi (iii) Püskürtmeli kuru sistem içinde, genellikle sönmüş kireç olan bir alkali sorbent bulamacının, ince bir sprej halinde baca gazlarına enjekte edilmesi prensibine dayanan kuru / yarı-kuru sistemler.

SO₂’nin fiksasyonu ile ilgili hali hazırda kullanılan yöntemler mevcutken, projemizin inovatif yönü SO₂’nin filtrelenmesinin yanı sıra filtrelenen SO₂’nin sistein aminoasitine dönüşümünü gerçekleştirecek olmasıdır. Bir diğer inovatif yönü ise bu dönüşümün gerçekleştirilmesi amacıyla filtre sistemimize, immobilize hale getirilmiş Sulfite reductase, hydroxymethyltransferase ve OASS-A enzimlerinin immobilize enzim yöntemlerinden tutuklama (entrapment) yöntemi ile yerleştirilmesidir. Sulfite reductase, hydroxymethyltransferase ve OASS-A enzimlerinin yaptığımız literatür taramalarına göre daha önce entrapment metodu ile immobilizasyonu gerçekleştirilmemiş olup bu noktada da enzimlerin bu yöntem ile immobilize hale getirilecek olması projemize kendi içinde bir yenilikçi yön daha kazandırmaktadır.

6. UYGULANABİLİRLİK

Filtre sistemimiz için gerekli enzimlerden O-acetylserine enziminin immobilizasyonu yapılmış ve başarıyla sonuçlanmıştır (Vahidi,2016). Sulfite reductase enzimi immobilizasyonunun yapılabileceği yapılan ön çalışmalarla kanıtlanmıştır.

Sanayi ve enerji üretim tesislerinin faaliyeti sonucu atmosfere yayılan is, duman, toz, gaz, buhar ve aerosol halindeki emisyonları kontrol altına almak ve bu kirleticilerin insan sağlığı ve çevresine vereceği zarardan korumak, olumsuz etkileri gidermek amacıyla Sanayi Kaynaklı Hava Kirliliğinin Kontrolü Yönetmeliği gereği tabii tesisler tarafından havaya salınan emisyonların sürekli ve periyodik ölçümlerinin yapılması gerekmektedir.(Sanayi Kaynaklı Hava Kirliliğinin Kontrolü Yönetmeliği) Bu kapsamda salınan SO₂ gazının ölçümü sürekli ve direkt ölçümle yapılmaktadır. Tüm bunlar değerlendirildiğinde SO₂ ölçümünün belirtilen yönetmelikle zorunlu olduğu görülür, bu aşamada filtre sistemimizin tesisler üzerinde

uygulanmak istenmesi ekstra herhangi bir yaptırım gerektirmeyecektir. İmmobilize enzimler entegre edilerek kurulan filtre sistemimizin ilk uygulama alanı için SO₂ salınımının en yüksek olduğu bölgeler değerlendirilecek olup pilot bölgemizde seçimi yapılan fabrikaya uygulaması sağlanacaktır.

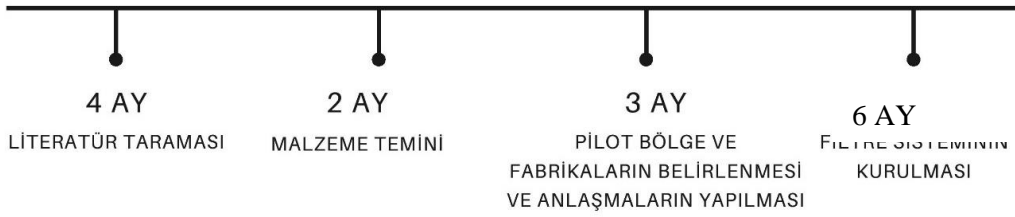
Gram negatif grupta ve ayrıca proteo-bacteri filumunda yer alan *Desulfovibrio desulfuricans* bakterisi, sülfat indirgeme özelliğine sahiptir. Ortamdaki SO₂ gazını sulu ortamda SO₃²⁻'ye ve daha sonra hücrede S²⁻'ye indirger. İmmobilize enzim yöntemine ek bir B planı olarak tasarlanan önerilen çözümde, kükürt dioksitin *Desulfovibrio desulfuricans* bakterileri tarafından sistein ve SO₂'nin sisteine dönüştürülmesi için gerekli olan O-asetilserin sülfhidrilaz enziminin sorumlu cysK geni, sisteinin Escherichia coli bakterisinden klonlanması ve gen düzenleme yöntemiyle *Desulfovibrio* bakterisine aktarılması planlanmaktadır. SO₃²⁻ hücreye girdikten sonra *D. desulfuricans* bakterileri tarafından sülfür iyonuna (S²⁻) indirgenir ve sulu ortamda son elektron alıcısı olan SO₃²⁻'ye dönüştürülür. Reaksiyonun bir sonraki adımında S²⁻, O-asetilserin sülfhidrilaz enzimi ile sistein amino asidine dönüştürülecektir. Bununla birlikte, gen düzenleme ve bakteriyel yöntemlerin kullanılması, immobilize enzim yöntemlerine kıyasla çeşitli dezavantajlar sunar. Bu dezavantajlardan ilki, bakteriyel yöntemlerle üretilen amino asitlerin ek bir saflaştırma aşamasına tabi tutulmasıdır. Bu saflaştırma aşaması hem enzimatik hem de hücrenel saflaştırmayı içerir. İmmobilize yöntemler kullanıldığında, ürün olarak elde edilen amino asit enzim içermeyecektir. Ayrıca hücre içi bir yöntem olmadığı için hücrenel saflaştırma aşamasına da gerek kalmayacaktır. İkinci dezavantaj ise kullanılması planlanan *D. desulfuricans* bakterisinin özellikleridir. *D. desulfuricans*'ın şu ana kadar insanlarda enfeksiyona neden olduğu kaydedilmemiş olsa da gram negatif özellikler göstermesi olumsuz bir durumdur. Ayrıca *D. desulfuricans* anaerobik bakteridir, dolayısıyla atmosferdeki oksijen içeriği öldürücüdür. B planına uyulmasına karar verilirse, tasarlanacak sistemde *D. desulfuricans* bakterisinin bu özelliklerinin dikkate alınması gerekecektir (Papi et.al., Geldstein et.al.).

7. TAHMİNİ MALİYET VE PROJE ZAMAN PLANLAMASI

SO₂ emisyonunun azaltılması için gerekli işlemlerin gerçekleştirilmesi önemli maliyetler içermektedir. Dünyanın her yerindeki tesislerin çoğunda 1 kg SO₂'nin uzaklaştırılmasının maliyeti 2,0-7,5 US\$ civarındadır. Bu nedenle, SO₂ emisyonunun azaltılması pratikte uygun standartların izin verdiği ötesine geçememektedir (Jedrusik, 1998).

Ürün	Fiyat	Kullanım Alanı	Tedarik Firması
cysK	200 \$	O-acetylserine sulfhydrylase enziminin sentezi	GenScript Biotech

<i>glyA</i>	200\$	Serine hydroxymethyltransferase enziminin sentezi	GenScript Biotech
<i>cysI</i>	250\$	Sulfite reductase enziminin sentezi	GenScript Biotech
LB Agar	18\$ (35 g/L)	<i>E. coli</i> bakterisi için besiyeri	The Odin
<i>E. coli BL21(DE3)</i>	90 Euro (freze dry)	Enzimlerin ekspresyonu	German Collection of Cultures
Acrylamide (ACR)	55.00\$ (100 g)	Membran hazırlama	Toronto Research Chemicals
Kuru Buz	0.15 \$ (1 kutu)	Bakteriyel transformasyon aşamasında	AliBaba
Tris Buffer	1\$ (1kutu)	DNA ve RNA degradesyonunu önlemek	EC21 Global B2B Marketplace
Ni-NTA Agarose	300 \$ (25 mL)	Enzim saflaştırma	qiagen.com
CaCl ₂	2\$ (1 kg)	Bakteriyel transformasyon	Sigmaldrich
Kanamisin	50.90 Euro (1 g)	Plasmid içeren hücrelerin ayırt edilmesi amacıyla	Sigmaldrich



Şekil 4: Proje zamanlaması çizelgesi.

PROJE FİKRİNİN HEDEF KİTLESİ (KULLANICILAR):

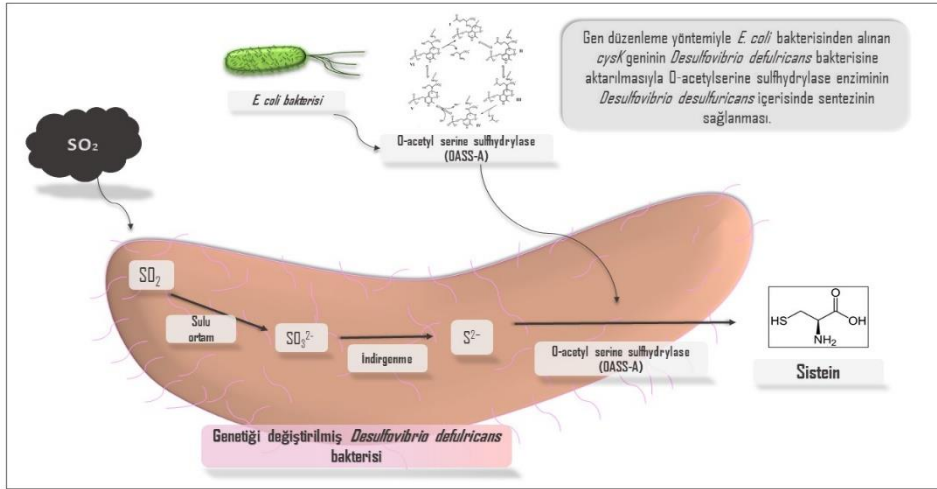
Projemizin başlıca hedef kitlesi Sanayi Kaynaklı Hava Kirliliğinin Kontrolü Yönetmeliği gereği filtre sistemi kullanmak zorunda olan tesislerdir. Oluşturduğumuz filtre sistemi ile normalde gerekli olan filtreleme işlemini yapacak, aynı zamanda da SO₂'nin diğer emisyonlardan ayrılmasını sağlayarak Dünya çapında çok yaygın ve çeşitli bir kullanım alanlarına sahip olan sisteme dönüşümünü gerçekleştireceğiz. Bu durumda hitap ettiğimiz bir diğer kitle de kozmetik alanında, yemek, yiyecek, eczacılık gibi alanlarda sistemin ihtiyacı duyan özellikle Müslümanlar için helal ürün kullanmak isteyen pazar hacmidir. Hiçbir hayvansal gıdanın tüketilmemesine dayanan bir yaşam tarzı olan veganlar için ürettiğimiz sistemin yeni bir pazar hacmi oluşturmaktadır.

8. RİSKLER

Projemizin risk oluşturmaya yatkın olan kısmı immobilize enzimlerin kullanıldığı membran-filtre bölümüdür. Biyolojik tepkimeleri katalizleyen proteinler olan enzimlerin kimyasal yapısı, biyokimyasal karakteri ve aktivitesi bazı durumlarda değişikliğe uğrar ve inaktive olarak çalışamaz duruma gelir. Enzim inaktivitesine neden olan maddelerin başında cıva, gümüş ve arsenik gibi ağır metaller gelir. Filtre sisteminin bu metallere maruz kalması durumunda filtre sistemi düzgün bir şekilde çalışmayıp filtreleme işlemini gerçekleştiremeyecektir. Enzimlerin optimum çalışması hücre içerisinde gerçekleştiğinden bu durumun in-vitro ortama taşınması pH, sıcaklık gibi bazı koşulların sağlanmasını zorlaştırabilir.

Enzimlerin entrapment metodu ile immobilizasyonunda, enzimlerin substrat çözeltisine geri yayılmasının fiziksel olarak kısıtlanması gerekir. Sıkışan enzimlerin matrislerden dışarı sızmasını önlemek için ince ve düzgün bir ağ oluşturmak oldukça zordur ve Öte yandan, yüksek oranda çapraz bağlı matrisler hem substrat hem de ürün için daha yüksek kütle transfer dirençleri ile sonuçlanabilir.

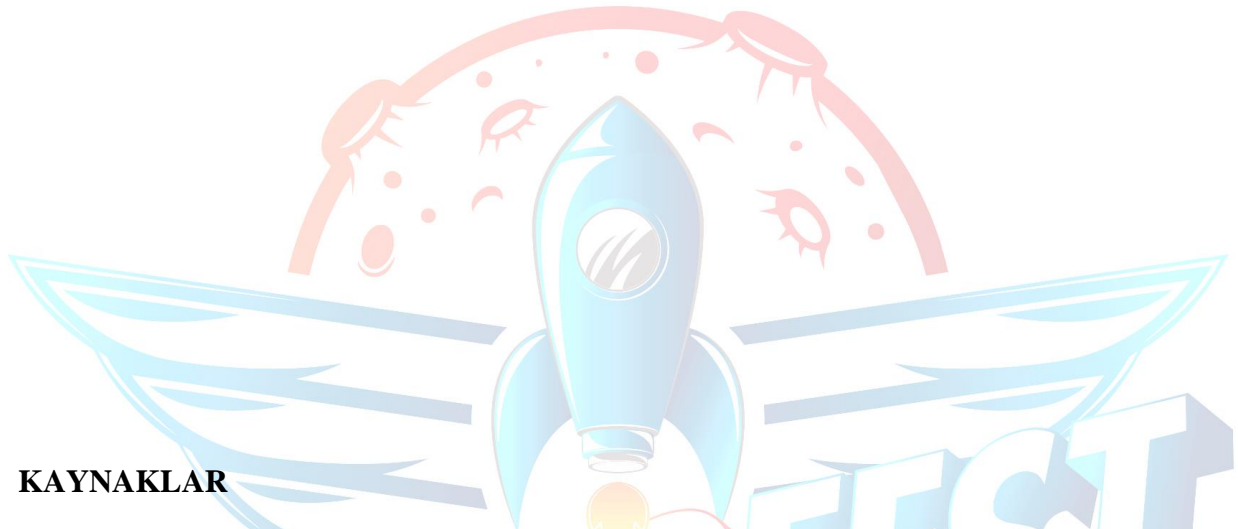
B-PLANI



Şekil 5: Kükürt dioksitin *Desulfovibrio defulricans* bakterisi ile sisteine dönüşümü. SO₂'nin sisteine dönüştürülmesi için gerekli olan O-acetylserine sulfhydrylase enziminin *cysK* geni *E. coli* bakterisinden klonlanarak gen düzenleme yöntemi ile *Desulfovibrio defulricans* bakterisine aktarılır. SO₂'nin hücre içerisine girmesi ile sulu ortamda son elektron alıcısı olan SO₃²⁻'ye dönüşümünün ardından SO₃²⁻, *D. defulricans* bakterisi tarafından sülfid iyonuna (S²⁻) indirgenir. Tepkimenin sonraki aşamasında S²⁻, O-acetylserine sulfhydrylase enzimi ile sistein amino-asitine dönüştürülür.

Gram negatif grubuna ve ayrıca proteobakteri filumuna dahil olan *Desulfovibrio desulfuricans* bakterisi, sülfat indirgeme özelliğine sahiptir. Ortamdaki SO₂ gazını sulu ortamda SO₃²⁻'ye ve daha sonra da S²⁻'ye hücre içerisinde indirger. İmmobilize enzim yöntemine ek B-planı olarak tasarlanan çözüm önerisinde, kükürt dioksitin *Desulfovibrio desulfuricans* bakterisi ile sisteine dönüşümü, SO₂'nin sisteine dönüştürülmesi için gerekli olan O-acetylserine sulfhydrylase enziminin *cysK* geni *Escherichia coli* bakterisinden klonlanarak gen düzenleme yöntemi ile *Desulfovibrio defulricans* bakterisine aktarılması planlanmaktadır. SO₂'nin hücre içerisine girmesi ile sulu ortamda son elektron alıcısı olan SO₃²⁻'ye dönüşümünün ardından SO₃²⁻, *D. defulricans* bakterisi tarafından sülfid iyonuna (S²⁻) indirgenir. Tepkimenin sonraki aşamasında S²⁻, O-acetylserine sulfhydrylase enzimi ile sistein amino asitine dönüştürülecektir. Fakat gen düzenleme ve bakteriyel yöntemlerin kullanılması, immobilize enzim yöntemleri ile karşılaştırıldığında birkaç dezavantaj ortaya koymaktadır (Hicks v.d., 2018). Bu dezavantajlardan ilki, bakteriyel yöntemlerle üretilen amino asitlerin ek olarak arıtma aşamasına tabi tutulmasıdır. Bu arıtma aşaması hem enzimsel hem de hücrel bir arındırmayı içermektedir. İmmobilize yöntemler kullanıldığında ise ürün olarak elde edilen amino-asit enzimlerden arınmış olacaktır. Ayrıca hücre içi bir yöntem olmadığından dolayı da hücrel bir arıtma aşamasına ihtiyaç duyulmayacaktır. İkinci dezavantaj ise kullanılması planlanan *D. desulfuricans* bakterisinin özellikleridir. Yukarıda da belirtildiği üzere *D. desulfuricans* her ne kadar şimdiye kadar insanlar üzerinde bir enfeksiyona sebep olduğu kaydedilmemiş olsa da gram negatif özellik gösteriyor olması bir olumsuzluk teşkil etmektedir. Buna ek olarak *D. desulfuricans* anaerobik bakteridir, dolayısıyla atmosferdeki oksijen oranı ölümcül seviyededir. B-planının izlenmesine karar verilmesi durumunda, tasarlanacak sistemde *D.*

desulfuricans bakterisinin bu özellikleri göz önünde bulundurulması gerekecektir (Goldstein v.d, 2003).



9. KAYNAKLAR

1. Iwasawa, S., Kikuchi, Y., Nishiwaki, Y., Nakano, M., Michikawa, T., Tsuboi, T., ... & Omae, K. (2008). Effects of SO₂ on respiratory system of adult Miyakejima resident 2 years after returning to the island. *Journal of occupational health*, 0811040040-0811040040.
2. Ermiş, E., Güner, C., & Erman, A. (2019). Çeşitli kaynaklardan izole edilen bazı mikroorganizmaların sistein üretim kapasitelerinin belirlenmesi. *İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1(1), 17-21.
3. Trevan, M. D. (n.d.). Enzyme Immobilization by Entrapment. *New Protein Techniques*, 491–494. doi:10.1385/0-89603-126-8:491
4. L. Giorno; E. Drioli; G. Carvoli; A. Cassano; L. Donato (2001). Study of an enzyme membrane reactor with immobilized fumarase for production of L-malic acid. , 72(1), 77–84. doi:10.1002/1097-0290(20010105)72:1<77::aid-bit11>3.0.co;2-1
5. Berehoiu, R. M. T., Popa, C. N., & Popescu, S. (2013). Assessment of the E 920 additive (L-cysteine) in relation to some problems of modern food industry. *ASSESSMENT*, 13(1).
6. Tortora G. J., Funke R. B., & Case C. L. (2019). *Microbiology: An Introduction* (13th edition).
7. GDR, H. B., Sharon, N., & Australia, E. W. (1984). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. *Pure and Applied Chemistry*, 56, 595-624.
8. Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. (2013). Enzyme immobilization: an overview

on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>

9. Greenpeace. (2018). Küresel SO₂ emisyonlarında sıcak nokta veri tabanı.
10. Tokyay, M. (2019, August 20). Rapor: Kükürtdioksit emisyonu açısından Türkiye dünyada 10. sırada. euronews. <https://tr.euronews.com/2019/08/20/turkiye-de-kukurtdioksit-emisyonlari-hava-kalitesini-tehdit-hava-kirliligi-greenpeace>.
11. Hogan, C. M. (2010). Abiotic factor encyclopedia of earth. National Council for Science and the Environment, Washington DC.
12. Papi, S., Montalvo, S., Papić, L., & Borja, R. (2018). Biological removal of gaseous sulfur dioxide through the reduction to hydrogen sulfide by means of *Desulfovibrio desulfuricans*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 21-27.
13. Stein, K., & Schwedt, G. (1993). Comparison of immobilization methods for the development of an acetylcholinesterase biosensor. *Analytica chimica acta*, 272(1), 73-81.
14. Soldatov, V. S., Elinson, I. S., & Shunkevich, A. A. (1986). Purification of air from acid gases (SO₂) by non-woven strong-Base filtering materials. In *Studies in Environmental Science* (Vol. 29, pp. 369-386). Elsevier.
15. Scopes, R. K. (2013). Protein purification: principles and practice. Springer Science & Business Media.
16. Vahidi, A. K., Wang, Z., Wong, W. S., & Li, Z. (2016). Immobilization of O-acetylserine sulfhydrylase as a highly active and recyclable nanobiocatalyst: efficient synthesis of β -pyrazol-1-yl-L-alanine. *Catalysis Science & Technology*, 6(16), 6286-6293.
17. Hicks, J. L., & Mullholland, C. V. (2018). Cysteine biosynthesis in *Neisseria* species. *Microbiology*, 164(12), 1471-1480.
18. Goldstein, E. J., Citron, D. M., Peraino, V. A., & Cross, S. A. (2003). *Desulfovibrio desulfuricans* bacteremia and review of human *Desulfovibrio* infections. *Journal of clinical microbiology*, 41(6), 2752-2754.
19. Bhardwaj, N., Verma, V. K., Chaturvedi, V., & Verma, P. (2020). Cloning, expression and characterization of a thermo-alkali-stable xylanase from *Aspergillus oryzae* LC1 in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Protein expression and purification*, 168, 105551.
20. Hicks, J. L., & Mullholland, C. V. (2018). Cysteine biosynthesis in *Neisseria* species. *Microbiology*, 164(12), 1471-1480.