

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**THERMOMYCES LANUGINOSA LİPAZIN
IMMOBEAD ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU ve
DEĞİŞİK BİTKİSEL YAĞLARIN HİDROLİZİNDE
KULLANIMI**

**ARZU GÜRBÜZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GEBZE
2015**

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***THERMOMYCES LANUGINOSA* LİPAZIN**
IMMOBEAD ÜZERİNE
İMMOBİLİZASYONU ve DEĞİŞİK
BİTKİSEL YAĞLARIN HİDROLİZİNDE
KULLANIMI

ARZU GÜRBÜZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. AZİZ TANRISEVEN

GEBZE
2015

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

IMMOBILIZATION OF *THERMOMYCES*
***LANUGINOSA* LIPASE ONTO IMMOBEAD**
and ITS USE IN HYDROLYSES OF
VARIOUS VEGETABLE OILS


ARZU GÜRBÜZ
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY


THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. AZIZ TANRISEVEN

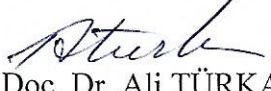
GEBZE
2015

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 24/06/2015 tarih ve 2015/39 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 15/07/2015 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Arzu GÜRBÜZ'ün tez çalışması Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN


ÜYE : Prof. Dr. Bülent KESKİNLER


ÜYE : Doç. Dr. Ali TÜRKAN


ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Bu tez çalışmasında, bitkisel yağların (ayçiçek, soya ve kanola) enzimatik yolla hidrolizi için bir metod geliştirildi. Çalışmada enzim immobilizasyonu ve hidroliz reaksiyonu optimizasyonları gerçekleştirildi. *Thermomyces lanuginosa* lipaz imbead 150-A üzerine kovalent olarak % 100 immobilizasyon ve aktivite verimleriyle immobilize edildi ve bitkisel yağların hidrolizinde başarıyla kullanıldı. İmmobilizasyon optimizasyon çalışmalarında değişik faktörlerin [matriks miktarı, pH, tampon çözelti konsantrasyonu ve immobilizasyon süresi] etkileri çalışıldı. Hidroliz reaksiyonu optimizasyonunda ise tampon çözelti miktarı tampon çözelti konsantrasyonu ve pH, sıcaklık, tuz ve organik çözücü etkileri çalışıldı. Hidroliz reaksiyonlarında ayçiçek, kanola ve soya yağları kullanıldı. Detaylı çalışmalarda yalnızca ayçiçek yağı kullanıldı.

Serbest enzimin optimum pH'sı 6.0 ve sıcaklığı 50°C iken immobilize enzimin optimum pH ve sıcaklığı sırası ile 7.0 ve 55°C olarak bulundu. İmmobilize ve serbest enzim ile gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonlarında, ortama % 5.0 t-amil alkol ilave edildiğinde sırasıyla % 6.5 ve % 8.0 artış gözlemlendi. Enzimatik hidroliz reaksiyonlarına, tuzların (NaCl, MgCl₂, CaCl₂) etkileri olmadığı bulundu. İmmobilize enzimin yağ hidrolizinde tekrarlı kullanılabilirliği ve depolama kararlılığı araştırıldı. İmmobilize enzimin 30 kez tekrarlı kullanım deneyleri sonunda aktivitesinin % 69.5, 60 gün gerçekleştirilen saklama kararlılığı deneylerinde ise aktivitesinin % 89.7 sini koruduğu bulundu. Hidroliz deneylerinde yağın büyük bir kısmının (% 74.0) hidroliz edilebileceği gösterildi. Tez çalışmasında elde edilen bu sonuçlar, immobilize enzimin yağ hidroliz reaksiyonlarında başarılı bir şekilde kullanım potansiyelinin olabileceğini göstermektedir. Elde edilen hidroliz ürünleri değişik alanlarda (gıda, kozmetik, tıp) kullanılabilir. Bu çalışmada, magnetize edilen tampon çözeltinin enzim hidroliz reaksiyonlarına etkisi de incelendi ve aktiviteyi % 8.2 artırdığı bulundu.

Anahtar Kelimeler: Imbead 150-A, immobilizasyon, enzimatik hidroliz, *Thermomyces lanuginosa* lipaz.

SUMMARY

In this thesis work, a method was developed for the enzymatic hydrolysis of vegetable oils (sunflower, soyabean, canola). In the work, immobilization of the enzyme and enzymatic hydrolysis of the vegetable oils were optimized. *Thermomyces lanuginosa* lipase, immobilized covalently onto immobead 150-A with 100% immobilization and activity yields, was used successfully in the hydrolysis of vegetable oils. In optimization of enzyme immobilization studies, effects of different parameters [matrix quantity, pH, buffer solution concentration and immobilization duration] were analyzed. In hydrolysis optimization, effects of pH, buffer concentration, buffer quantity, temperature, organic solvents, and various salts were studied. Detailed hydrolysis reactions were carried out using only sunflower oil although enzymatic hydrolyses of canola, and soybean oils were also studied.

Optimum pH and temperature of soluble lipase were found to be 6.0 and 50°C, respectively. Immobilization has changed the optimum pH and temperature of the enzyme and they were determined as 7.0 and 55°C, respectively. Addition of 5.0 % t-amyl alcohol into the hydrolysis reaction medium resulted in 8.0 and 6.5 % increases using soluble and immobilized enzymes, respectively. It was found that different salts (NaCl, MgCl₂, CaCl₂) had no effects onto the enzymatic hydrolysis reactions. Reusability and storage stability of immobilized enzyme were studied and found that the immobilized enzyme retained 69.5 % and 89.7 % of its initial activity in 30 repeated use and 60 days at storage at 4°C, respectively. The results shows that immobilized enzyme could have a potential to be used in oil hydrolysis. The hydrolysis products could be used in such different fields as food, cosmetics and, medical. In addition, it was found that enzymatic hydrolysis reactions could be increased by 8.2 % by using magnetized buffer solution.

Key Words: Immobead 150-A, immobilization, enzymatic hydrolysis, *Thermomyces lanuginosa* lipase.

TEŞEKKÜR

Başta, yüksek lisans eğitimimde ve akademik hayatımda desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyip bilgisi ile bu çalışmanın oluşmasının yolunu açan danışmanım Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN'e,

Bütün çalışmam boyunca yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli arkadaşlarım Aişe ÜNLÜ, Zehra ÖLÇER, Gülden YETİŞ, Fatma ERTAN, ve Hatice DURMUŞ' a, içten teşekkürlerimi sunarım.

Göstermiş oldukları desteklerinden dolayı sevgili annem İsmihan GÜRBÜZ, babam Haydar GÜRBÜZ, abim Hüseyin GÜRBÜZ ve eşim Serhan ŞEN'e müteşekkirim. Onların destekleri olmadan bu çalışma gerçekleşmeyebilirdi.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	2
2.1. Yağlar	2
2.1.1. Yağların Reaksiyonları	2
2.2. Bitkisel Kaynaklı Bazı Yağların Özellikleri	7
2.2.1. Ayçiçek Yağı	7
2.2.2. Soya Yağı	8
2.2.3. Kanola Yağı	8
2.3. Enzim ve Enzim İmmobilizasyonu	8
2.3.1. Enzim	8
2.4. İmmobilizasyon Çalışmaları	12
2.4.1. Enzim İmmobilizasyonu	13
3. MATERYAL ve METOT	20
3.1. Materyal	20
3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler	20
3.1.2. Kullanılan Enzim	21
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	21
3.2. Metot	22
3.2.1. Asit Sayısı Tayini	22
3.2.2. Yağ Nötralizasyonu	22
3.2.3. Aktivite Tayini	23

3.2.4. Serbest Enzimin Hidroliz Reaksiyonu Optimizasyonu	23
3.2.5. İmmobead 150-A Üzerine Enzim İmmobilizasyon Optimizasyonu	25
3.2.6. İmmobilize Enzimin Hidroliz Reaksiyonu Optimizasyonu	27
3.2.7. İmmobilize enzimin Yağ Hidroliz Reaksiyonuna Sürenin Etkisi	28
3.2.8. Ayçiçek, Soya ve Kanola Yağlarının Hidrolizi	28
3.2.9. Sıcaklık ve pH Kararlılığının Tayini	29
3.2.10. Sürekli Kullanım ve Depolama Kararlılığı	29
3.2.11. TLC Analiz Metodu	29
3.2.12. GC-MS Analiz Metodu	30
4. DENEYSEL SONUÇLAR	31
4.1. Yağ Nötralizasyonu	32
4.2. Ayçiçek, Kanola ve Soya Yağlarının Serbest lipazla Hidrolizi	32
4.3. Serbest Enzimin Ayçiçek Yağı Hidroliz Reaksiyonu Optimizasyonu	32
4.3.1. pH	33
4.3.2. Tampon Çözelti Konsantrasyonu	33
4.3.3. Tampon Çözelti Miktarı	34
4.3.4. Sıcaklık	35
4.3.5. Hidroliz Reaksiyonuna Organik Çözücü Etkisi	35
4.3.6. Hidroliz Reaksiyonuna Tuz Etkisi	36
4.3.7. Yüksek Miktarda Enzim Kullanılarak Hidroliz Reaksiyonu	37
4.3.8. Magnetize Tampon Çözeltinin Hidroliz Reaksiyonuna Etkisi	37
4.4. Serbest Enzimin Sıcaklık ve pH Kararlılığı	39
4.5. TLL 'nin İmmobead 150-A Üzerine İmmobilizasyon Optimizasyonu	40
4.5.1. Matriks miktarı	40
4.5.2. pH	41
4.5.3. Konsantrasyon	41
4.5.4. Süre	42
4.5.5. İmmobilize Enzim Aktivitesinin Glisin Kullanılarak Arttırılması	42
4.6. İmmobilize Enzimin Ayçiçek Yağı Hidroliz Reaksiyonu Optimizasyonu	43
4.6.1. pH	43
4.6.2. Tampon Çözelti Konsantrasyonu	44
4.6.3. Tampon Çözelti Miktarı	45
4.6.4. Sıcaklık	45
4.6.5. Hidroliz Reaksiyonuna Organik Çözücü Etkisi	46

4.6.6. Hidroliz Reaksiyonuna Tuz Etkisi	47
4.7. İmmobilize Enzimin pH ve sıcaklık kararlılığı	47
4.8. Hidroliz Reaksiyonuna Sürenin Etkisi	48
4.9. Tekrar Kullanım Deneyleri	49
4.10. İmmobilize Enzimin Raf Ömrünün Belirlenmesi	50
4.11. TLC Analizi	50
4.12. GC-MS Analizi	51
5. SONUÇLAR ve YORUMLAR	60
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	73

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
A	: Angstrom
°C	: Santigrat derece
Ca(AC) ₂	: Kalsiyum asetat
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
G	: Gram
IU	: Uluslararası enzim birimi
KG	: Kilogauss
KOH	: Potasyum hidroksit
Km	: Enzimin substrata olan ilgisi
M	: Molarite
MgCl ₂	: Magnezyum klorid
Mg	: Miligram
mM	: Milimolar
µL	: Mikrolitre
NaCl ₂	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
pH	: -log[H ⁺]
Rpm	: Bir dakikadaki devir sayısı
NaBH ₄	: Sodyumborhidrür
T	: Torr
Trp	: Triptofan
W	: Kütle
V	: Hacim
V _{max}	: Maksimum reaksiyon hızı
ALA	: Alfa-linolenik asit
AS	: Asit Sayısı
BSA	: Bovin serum albümin
CTAB	: Setiltrimetilamonyumbromid
DGLA	: Di-homo-gamma-linolenik asit

DMSO : Dimetilsülfoksit
LA : Linolenik asit
MUFA : Tekli doymamış yağ asidi
PUFA : Çoklu doymamış yağ asidi
SYA : Serbest yağ asidi

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Yağların transesterifikasyonu.	3
2.2: Bitkisel yağların asit katalizli transesterifikasyonu.	3
2.3: Yağların baz katalizli transesterifikasyonu.	4
2.4: İnteresterifikasyon reaksiyonu.	5
2.5: Yağ hidrolizi.	5
2.6: Magnetik alanla muamale edilen suyun dizilişi.	6
2.7: TLL nin açık ve kapalı formları.	10
2.8: TLL tarafından triaçilgliserollerin hidrolizi.	11
2.9: Adsorpsiyon tekniği ile enzim immobilizasyonu.	14
2.10: Hapsetme tekniği ile enzim immobilizasyonu.	14
2.11: Çapraz bağlama tekniği ile enzim immobilizasyonu.	15
2.12: Kovalent bağlama tekniği ile enzim immobilizasyonu.	16
2.13: Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanması.	18
2.14: İmmobead görüntüsü.	19
3.1: Tampon çözeltinin magnetik alanda aktivasyonu.	25
4.1: Serbest enzimin hidrolitik aktivitesine pH'ın etkisi.	33
4.2: Konsantrasyonunun serbest enzimin hidrolitik aktivitesine etkisi.	34
4.3: Tampon çözelti miktarının serbest enzimin hidrolitik aktivitesine etkisi.	34
4.4: Sıcaklığın serbest enzimin hidrolitik aktivitesine etkisi.	35
4.5: Serbest Enzim kararlılığına pH'nın etkisi.	39
4.6: Serbest enzim kararlılığına sıcaklık etkisi.	40
4.7: Glisinle muamelenin immobilize enzim aktivitesine etkisi.	42
4.8: İmmobilize enzimin hidrolitik aktivitesine pH'ın etkisi.	44
4.9: Konsantrasyonun immobilize enzimin hidrolitik aktivitesine etkisi.	44
4.10: Çözelti miktarının immobilize enzimin hidrolitik aktivitesine etkisi.	45
4.11: Sıcaklığın immobilize enzimin hidrolitik aktivitesine etkisi.	46
4.12: İmmobilize enzim kararlılığına pH etkisi.	48
4.13: İmmobilize enzim kararlılığına sıcaklık etkisi.	48
4.14: İmmobilize enzimin tekrarlı kullanımları.	49
4.15: İmmobilize lipazın depolama kararlılığı.	50

4.16:	Ayçiçek, Soya ve Kanola yağlarının hidroliz ürünlerinin TLC analizi.	50
4.17:	Yağ asidi karışımı için GC analizi sonucu.	51
4.18:	Ayçiçek yağı için GC analizi sonucu.	52
4.19:	Ayçiçek yağına ait 1 numaralı pikin kütle spektrumu.	52
4.20:	Ayçiçek yağına ait 2 numaralı pikin kütle spektrumu.	53
4.21:	Ayçiçek yağına ait 3 numaralı pikin kütle spektrumu.	53
4.22:	Ayçiçek yağına ait 4 numaralı pikin kütle spektrumu.	53
4.23:	Ayçiçek yağına ait 5 numaralı pikin kütle spektrumu.	54
4.24:	Ayçiçek yağına ait 6 numaralı pikin kütle spektrumu.	54
4.25:	Serbest enzim için GC analizi sonucu.	54
4.26:	Serbest enzime ait 1 numaralı pikin kütle spektrumu.	55
4.27:	Serbest enzime ait 2 numaralı pikin kütle spektrumu.	55
4.28:	Serbest enzime ait 3 numaralı pikin kütle spektrumu.	55
4.29:	Serbest enzime ait 4 numaralı pikin kütle spektrumu.	56
4.30:	Serbest enzime ait 5 numaralı pikin kütle spektrumu.	56
4.31:	Serbest enzime ait 6 numaralı pikin kütle spektrumu.	56
4.32:	İmmobilize enzim için GC analizi sonucu.	57
4.33:	İmmobilize enzime ait 1 numaralı pikin kütle spektrumu.	57
4.34:	İmmobilize enzime ait 2 numaralı pikin kütle spektrumu.	57
4.35:	İmmobilize enzime ait 3 numaralı pikin kütle spektrumu.	58
4.36:	İmmobilize enzime ait 4 numaralı pikin kütle spektrumu.	58
4.37:	İmmobilize enzime ait 5 numaralı pikin kütle spektrumu.	58
5.1:	Uzun süreli hidroliz reaksiyonu.	64
5.2:	Magnetize edilen su ile gerçekleştirilen soğan büyütme denemeleri.	65

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Deneyde kullanılan kimyasal malzemeler.	20
3.1: Devam.	21
3.2: Deneyde kullanılan araç ve gereçler.	21
3.2: Devam	22
4.1: Ayçiçek, Kanola ve Soya yağlarının serbest lipazla hidrolizi.	32
4.2: Değişik organik çözücülerin serbest enzim aktivitesine etkisi.	36
4.3: Değişik tuzların serbest enzim aktivitesine etkisi.	36
4.4: Yüksek oranda kullanılan enzimin hidroliz reaksiyonuna sürenin etkisi.	37
4.5: Magnetik alanın enzim aktivitesine etkisi.	37
4.6: Magnetik alan (-) muamele süresinin enzim aktivitesine etkisi.	38
4.7: Magnetik alan ile muamele edilen tampon çözeltinin kararlılığı.	38
4.8: Magnetize tampon çözeltilerine sıcaklığın etkisi.	39
4.9: Matriks miktarının enzim immobilizasyonuna etkisi.	40
4.10: pH'ın enzim immobilizasyonuna etkisi.	41
4.11: Tampon çözelti konsantrasyonunun enzim immobilizasyonuna etkisi.	41
4.12: Sürenin enzim immobilizasyonuna etkisi.	42
4.13: Glisinle muamelenin immobilize enzim üzerine etkisi.	43
4.14: Organik çözücülerin immobilize enzim aktivitesine etkisi.	46
4.15: Değişik tuzların immobilize enzimin aktivitesine etkisi.	47
4.16: Sürenin serbest ve immobilize enzimin aktivitesine etkisi.	49

1. GİRİŞ

Yağ asitleri ilaç, boya, gıda ve kozmetik gibi endüstriyel alanlarda yaygın olarak kullanılır. Endüstriyel uygulamalarda kullanımı olan yağ asitleri yağların hidrolizi reaksiyonu sonucu elde edilir [1], [2]. Yağ asitlerinin üretimi katalizörsüz veya katalizörlü ortamda gerçekleştirilebilmektedir. Katalizörsüz yağ asidi üretimi için yüksek sıcaklık ve basınç gerekmektedir. Kimyasal katalizörlerle (sülfirik asit, nikel, bakır, çinko vb.) gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu daha düşük sıcaklıkta ve atmosfer basıncında yapılabilir. Ancak bazı yan ürünler oluşabilmektedir. Enzimatik katalizörlerle (lipazların immobilize formu) yapılan hidroliz reaksiyonlarında yağ asidi daha düşük sıcaklıklarda yan ürünler oluşmadan elde edilebilmektedir [3], [4].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışmasında, immobilize edilen *Thermomyces lanuginosa* lipazı (TLL) ile omega-3 ve omega-6 açısından zengin değişik bitkisel yağlar (Ayçiçek, soya ve kanola yağı) kullanılarak hidroliz reaksiyonu yapılması amaçlanmaktadır. Endüstride kimyasal katalizör kullanımı ile gerçekleştirilen yağ asidi üretimi, yüksek basınç ve yüksek sıcaklık altında hidroliz reaksiyonu ile gerçekleştirilmektedir. Ancak reaksiyonun gerçekleşmesi için gereken yüksek basınç ve sıcaklık ekstra maliyet gerektirmekte ve tehlikeli olabilmektedir. Bu tez çalışmasında, değişik bitkisel yağların hidroliz reaksiyonunun enzimatik yolla düşük basınç ve düşük sıcaklıkta gerçekleştirilmesi için bir metod geliştirilmiştir. Bitkisel yağların kimyasal metotlarla gerçekleştirildiği yöntemlere alternatif olabilecek tez çalışması ile maliyeti azaltmak ve verimliliği arttırmak amaç edinilmiştir. Bu amaçla imbead 150-A üzerine TLL'nin kovalent olarak bağlanması ve farklı tipteki yağlarla hidroliz reaksiyonu gerçekleştirip optimum hidroliz reaksiyonu şartlarının belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, enzim immobilizasyon optimizasyonu, immobilize ve serbest enzimin hidroliz reaksiyonu optimizasyonları belirlenerek literatürdeki benzer çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

2.1. Yağlar

Yağlar, vücutta enerji kaynağı olarak kullanılır ve hücre membranlarının yapısında bulunur ve eikosonoid sentezinde giriş maddesi olarak rol almaktadır .

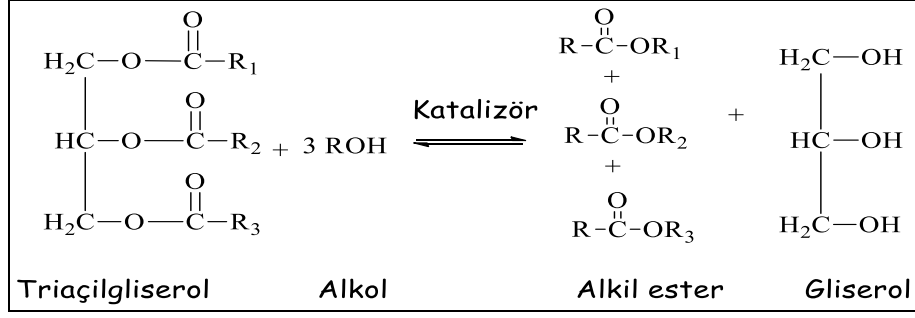
Yağlar, yağ asitleri ve gliserolden oluşmaktadır. Fiziksel ve kimyasal özellikleri yağın yapısındaki karbon sayısı ve doymuşluk derecesi ile belirlenmektedir. Yağ asitleri, katı ve sıvı yağlarda ester formunda, plazmada ise esterleşmemiş yapıdadır.. Saf bir yağın ağırlığının % 95'i trigliseritten meydana gelirken, % 5'lik kısmında mono ve digliseritler, serbest yağ asitleri, fosfatidler, steroller, yağda çözünen vitaminler ve diğer maddeler bulunur.

2.1.1. Yağların Reaksiyonları

2.1.1.1. Transesterifikasyon

Transesterifikasyon, bir esterin R'' grubunun bir alkolün R' grubuyla yer değiştirmesi olarak tanımlanmaktadır [5].

Transesterifikasyon katalizör varlığında gerçekleştirilen bir denge reaksiyonudur. Reaksiyonda fazla miktarda alkol kullanımı verimi arttırırken, gliserolün oluşmasına neden olur [6]. Bitkisel yağların transesterifikasyon reaksiyonu, trigliseridin alkol varlığında katalizör olarak asit ya da baz kullanımı ile gerçekleştirilir. Reaksiyon sonucunda Şekil 2.1'de görüldüğü gibi yağ asidi metil esteri ve gliserol oluşur. Proseslerde geri dönüşümlü reaksiyonların sürekli meydana gelmesi halinde yan ürün olarak monogliseridler meydana gelmektedir [7]. Reaksiyonun yüksek verimde gerçekleştirilebilmesi için yağ/alkol oranı 1/3 mol şeklinde olmalıdır. Sıcaklık, alkol/yağ oranı, ortamda su bulunması, kullanılan ürünlerin saflığı, yağın içerdiği serbest yağ asidi miktarı ve katalizörün türü transesterifikasyon reaksiyonunun verimini etki etmektedir [8].

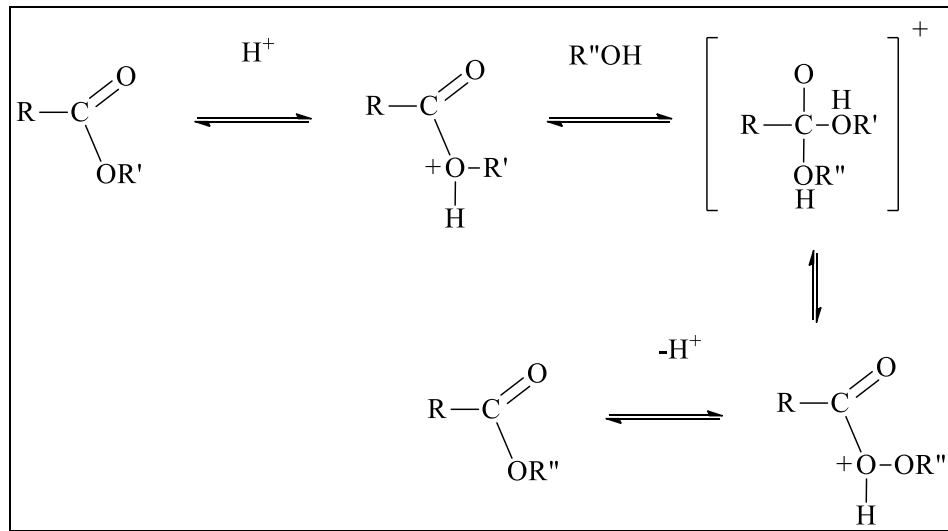


Şekil 2.1: Yağların transesterifikasyonu.

2.1.1.1.1. Asit katalizli Transesterifikasyon

Karboksilik asitler, Şekil 2.2'deki gibi alkollü ortamda uygun katalizör(asit) kullanımı ile alkollerle esterleştirilebilir. Asit katalizör kullanımı ile gerçekleştirilen en bilinen transesterifikasyon reaksiyonunda yağ örnekleri, metanolik hidrojen klorid(%5'lik) varlığında en az 100 kat fazla reaksiyon çözeltisi içerisinde çözülmeli ve ardından reaksiyon iki saat distile edilmeli ya da gece boyunca 50°C'de tutulmalıdır. Serbest yağ asitlerinin transesterifikasyon reaksiyonları 100°C'de 30 dakika tutulması ile gerçekleştirilmelidir.

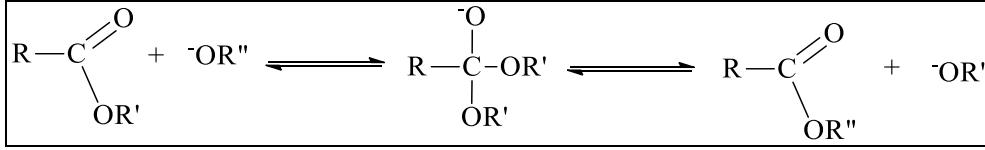
Yağın ihtiva ettiği serbest yağ asitleri sabulaşma reaksiyonu gerçekleştirdiğinden dolayı transesterifikasyon reaksiyonunun verimini düşürür. Asit katalizör kullanımı ile bu yağ asitleri indirgenebilmektedir. Ancak reaksiyon, bir günden fazla sürebilmektedir [9].



Şekil 2.2: Bitkisel yağların asit katalizli transesterifikasyonu.

2.1.1.1.2. Baz katalizli transesterifikasyon

En çok kullanılan bazik katalizörler sodyum ya da potasyum hidroksittir [9]. Biyodizel üretiminde etil esterler için potasyum hidroksit daha kullanışlıyken, metil esterler için her ikisinde kullanılabilir. Bazik katalizör kullanımının avantajı reaksiyonun düşük sıcaklık (303-308 K) ve basınçta (0.1 MPa) gerçekleşip, asit katalizli reaksiyona göre daha hızlı gerçekleşmesidir.



Şekil 2.3: Yağların baz katalizli transesterifikasyonu.

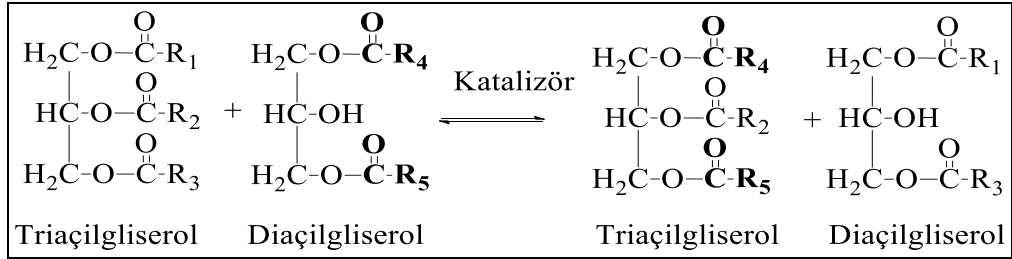
2.1.1.1.3. Enzim katalizli transesterifikasyon

Kimyasal yolla gerçekleştirilen transesterifikasyon reaksiyonu sonucu, saf ürün elde edilememesi prosesin uygulanmasını zor hale getirmektedir [10]. Enzimatik yöntemler, kimyasal yöntem alternatif olarak kullanılmaktadır. Katalizör olarak enzimin kullanılması maliyeti düşürür ve kimyasal katalizör kullanımında yaşanan (reaksiyona girmeden kalan metanol, ortamda kalan katalizör, geri dönen gliserolün uzaklaştırılması gibi) olumsuzlukları giderir [11], [12]. Enzim kullanımı ile gerçekleştirilen transesterifikasyon reaksiyonları sonucunda oldukça saf ürünler elde edilebilmektedir. Enzimatik reaksiyonlarda lipazlar (triacil gliserol açıl hidrolaz) kullanılır. *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Candida antarctica*, *Rhizopus oryzae*, *Thermomyces lanuginosa* yaygın olarak kullanılan enzimlerden bazılarıdır. Enzimatik yöntemle gerçekleştirilen bir çalışmada 45°C'de % 7.5 (w/v) lipaz, yağ/metanol oranı 1/4 olacak şekilde 36 saat reaksiyona sokulmuş ve % 86.2 verimle yağ asidi metil esteri elde edilmiştir [13].

2.1.1.2. İnteresterifikasyon

İnteresterifikasyon reaksiyonları alkoksi ve açıl gruplarının yer değiştirmesi ve farklı bir ester oluşumu ile meydana gelen reaksiyonlardır. Reaksiyon Şekil 2.4'de gösterilmektedir. Kimyasal ve enzimatik olmak üzere iki çeşit interesterifikasyon

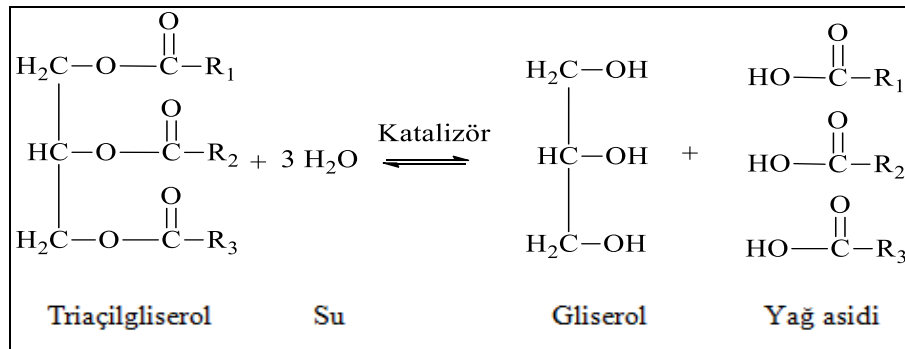
reaksiyonu bulunmaktadır. Kimyasal olarak yağlar ya da serbest yağ asitleri ile sodyum alkoksit gibi bir kimyasal katalizör varlığında yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilmektedir [14]. Enzimatik olarak lipaz gibi enzimler kullanımıyla bitkisel ve hayvansal yağların interesterifikasyonu gerçekleştirilebilir. Enzimatik yöntemin kimyasal yöntemle göre avantajı, enzimlerin seçici olmalarından dolayı belirli bir yağ asidinin değişiminin kolaylıkla ve daha ılımlı şartlarda yapılabilmesidir. Ancak ticari uygulamalarda daha düşük maliyette gerçekleştirildiğinden kimyasal katalizör kullanımı tercih edilmektedir [15], [16]. İnteresterifikasyon reaksiyonu endüstriyel uygulamalarda margarin yapımında, fırıncılıkta, kıvam gerektiren pişmiş ürün ve şekerlemelerde kullanılabilir [17].



Şekil 2.4: İnteresterifikasyon reaksiyonu.

2.1.1.3. Hidroliz

Hidroliz, Şekil 2.5’de gösterildiği gibi yağ ile suyun reaksiyona girmesiyle, gliserin ve üç mol yağ asidi oluşturduğu reaksiyonlardır. Reaksiyon sonucunda di- ve mono-gliseridler oluşmaktadır [18].



Şekil 2.5: Yağ hidrolizi.

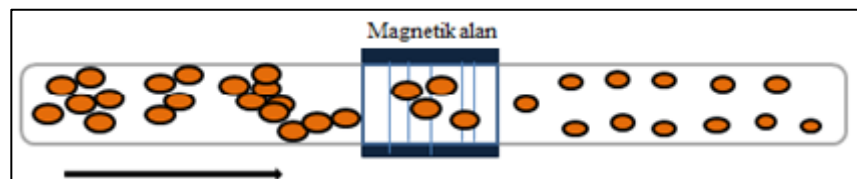
Hidroliz reaksiyonunu su ve yağın birbiriyle yüksek oranda etkileşime girmesiyle yüksek verimde gerçekleşebilmektedir. Reaksiyon verimi katalizör, sıcaklık, basınç, su/yağ oranı, reaksiyon sonunda oluşan gliserinlerin uzaklaştırılması gibi etkenlerin uygun seçilmesi ile arttırılabilir. Yüksek sıcaklık ve basınç suyun yağ fazındaki çözünürlüğünü arttırarak reaksiyon hızına etki eder. Hidroliz reaksiyonu geri dönüşümlü bir reaksiyon olduğundan reaksiyon sonucu meydana gelen gliserin uzaklaştırılmadığı durumda denge noktasına ulaşılır. Reaksiyon tamamlanana kadar devam edebilmesi için ortamdaki gliserinin uzaklaştırılması gerekmektedir.

Hidroliz reaksiyonları kimyasal ve enzimatik yolla gerçekleştirilebilir. Kimyasal reaksiyon yüksek sıcaklık ve basınç altında sülfirik asit, çinko oksit, magnezyum oksit gibi kimyasal katalizörler kullanımı ile gerçekleştirilir. Kimyasal katalizör ile yağ asidi sentezi için yüksek maliyet gerekmekte ve saf ürün elde edilememektedir. Reaksiyonun yüksek sıcaklıkta gerçekleşmesinden dolayı bu sıcaklıkta yağlar bozunabilmektedir[19].

Yağların hidrolizi için ilk endüstriyel proseslerden olan Colgate-Emery prosesinde 700 psi basınç ve 240-250 °C ya da daha üstü sıcaklıklar gerekir. Yüksek sıcaklıktan dolayı reaksiyon sonucu elde edilen üründe bozunmalar gözlenmiş ve yaşanan olumsuzluklar sonucunda, katalizör olarak enzimlerin kullanılması üzerine araştırmalar gerçekleştirilmiştir [20]. Enzimatik hidroliz reaksiyonu, atmosfer basıncı altında ve oda sıcaklığında gerçekleştiğinden dolayı yağ bozunmaz ve reaksiyon sonucunda yüksek saflıkta ürün elde edilebilmektedir.

2.1.1.3.1. Hidroliz Reaksiyonuna Magnetik Alanın Etkisi

Magnetik alan hareket eden elektrik yükleri tarafından, zamanla değişen elektrik alanlardan veya temel parçacıklar tarafından içsel olarak üretilir. Magnetik alan vektörel bir büyüklüktür ve en genel şekilde hareket eden elektrik yüküne etki eden Lorentz kuvveti ile tanımlanır.



Şekil 2.6: Magnetik alanla muamale edilen suyun dizilişi.

Ran Cai ve arkadaşları saf suyu 5 dakika boyunca oda sıcaklığında manyetik alana (0.5 Torr) tabii tutarak, manyetik alanın su üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Muamelenin ardından suyun fizyokimyasal özelliklerinin değiştiğini gözlemlemişlerdir. Suyun yüzey gerilimi azalırken, vizkozitesi artmış, düşük moleküler enerji ve yüksek aktivasyon enerjisi ile su daha kararlı hale gelmiştir [21]. Manyetik alana tabii tutulan su molekülleri daha düzenli yapıda bulunurlar (Şekil 2.6). Suyun hücre içerisine difüzyonunu çalışmış ve manyetik alana tabii tutulmuş suyun magnetize olmamış suya göre daha iyi difüze olabildiğini gözlemlemiştir. Manyetik alana tabii tutulan suyun pH özellikleri, yoğunluğunda değişiklik gösterdiğini tespit etmiştir. Son yıllarda pek çok çalışma manyetik alanın insan sağlığı üzerine olumlu etkilerinin olduğunu göstermektedir. Pek çok araştırmacıya göre canlı hücrelerin dengesi magnetler yardımıyla düzenlenebilir Su ve sulu yapıların manyetik alanla etkileşmesiyle akıcı, mineral ve vitaminlerin kolay çözünebildiği; insan, hayvan ve bitkilere pozitif etki eden ince ve daha homojen yapıya geçerler.

2.2. Bitkisel Kaynaklı Bazı Yağların Özellikleri

2.2.1. Ayçiçek Yağı

Ayçiçeği, çekirdekleri ve yağından faydalanılan sarı çiçekli bir tarım bitkisidir. Doğal ayçiçek yağı ayçiçeği tohumundan üretilir. Ayçiçek yağı % 15 doymuş, % 85 doymamış yağ asidi içermekte, doymamış yağ asitlerinin % 14-43'ünü oleik asit, % 44-75'ini linoleik, en fazla % 0.7'sini de linolenik asit oluşturmaktadır. Ayçiçek yağı; % 0.025-0.031 hidrokarbonlar, % 0.542-0.584 steroller, % 0.008-0.044 vakslar gibi sabunlaşmayan maddeler içermektedir. Toplam tokoferol içeriği ise yaklaşık 640 mg/kg yağ olup, tokoferollerin % 96'sını α -tokoferol oluşturmaktadır.

Dünyada ayçiçeği ekimi yapılan başlıca ülkeler; Rusya, Ukrayna, Arjantin, Macaristan, Fransa, İspanya, Hindistan ve Türkiye'dir. Ülkemizde yüzde 40'lık ayçiçek yağı tüketimi ile Trakya ve Marmara Bölgesi lider durumdadır. Yemeklerde ve kızartma yağı olarak kullanılmasının yanı sıra, kozmetikte, biyodizel üretiminde kullanımı mevcuttur.

2.2.2. Soya Yağı

Soya yağı, hafif tatlı ve kokusuz bir yağdır. Soya tohumu % 18-24 arasında yağ, % 35-45 arasında protein, % 30 karbohidrat ve % 5 oranında mineral içerir. % 4-11 linolenik, % 44-62 oranında linoleik asit ve % 9-20 arasında toplam doymuş yağ asidi içerir.

Üretimi gerçekleştirilen ülkeler ABD, Çin, Arjantin, Brezilya ve Avrupa birliği ülkeleridir. Yüksek oranda doymamış yağ asidi içerdiğinden salatalarda, kızartmalarda ve margarinlerde kullanılmaktadır.

2.2.3. Kanola Yağı

Kanola (*Brassica napus*), kolzanın tohumunun genetiğiyle oynanarak elde edilmiş bir bitkidir. Kolza tohumlarından elde edilen yağlar kanola yağı (canola oil) olarak adlandırılmaktadır.

Kanola yağı % 51-71 oranında oleik asit ve % 15-30 linoleik asit, % 5.0-14.0 linolenik asit, % 0.2-1.2 araşidik asit, % 2.5-7.0 palmitik asit, % 0.8-3.0 stearik asit, % 0.1-4.3 godolik asit içeren bir yağdır [68]. Kabukları çekirdek ağırlığının % 16,5-18,7'sini oluşturur, bu kısım yağsız küspenin %27-30'una karşılık gelmektedir.

Kolza tohumu üretimin en yaygın olduğu ülkeler Çin, Hindistan, Pakistan, Japonya, İsveç, Polonya, Almanya, Şili, Fransa ve Kanada'dır. Ülkemizde de Bursa, İzmir, Van ile Akdeniz Bölgesinde ekimi gerçekleştirilmektedir. Kanola yağı endüstriyel olarak yemeklik yağ sanayi, hayvan yemi, kimya sanayi hammaddesi ve biyodizel hammaddesi olarak kullanılmaktadır.

2.3. Enzim ve Enzim İmmobilizasyonu

2.3.1. Enzim

Enzimler protein yapısında, molekül ağırlığı yüksek biyolojik katalizörlerdir. Reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek hızlanmasını sağlarlar. 20 değişik monomerden meydana gelen enzimlerin yapısını bu monomerlerin sayısı ve dizilişi belirler. Kendi üzerindeki fonksiyonel grupların etkileşimi yanı sıra bulunduğu ortamla etkileşimi sonucu üç boyutlu yapı oluşturacak şekilde aktif bölgesinde katlanma meydana gelir. Substrat bu aktif bölgeye bağlanır ve bu bölgede

fonksiyonel grupların en uygun konuma gelmesiyle maksimum katalitik etki görülür. Enzimlerin etkinliği tepkimenin gerçekleştiği ortam koşullarına (sıcaklık, pH, basınç gibi.) göre değişiklik gösterir. Gıda, kozmetik, ilaç, kâğıt, deri, tekstil endüstrisinde kullanımları yaygın olan enzimler çoğunlukla hidroliz reaksiyonlarında kullanılmaktadır.

Enzim kullanmanın avantajları:

- Katalitik etkinlik
- İlimli reaksiyon koşulları
- Çevreye zararsız, yan ürün oluşturmaz
- Kimyasal seçicilik (kemoselktivite), bölge seçiciliği gösterirler[22].

2.3.1.1. Lipazlar

Lipazlar (triacilgliserol açıl hidrolaz) bitkisel, hayvansal kaynaklardan ve mikroorganizmalardan (doğal ya da genetik olarak iyileştirilmiş) elde edilebilir. Kolay üretilmesi, birçok hidrolitik ve sentetik reaksiyonu katalizleyebilmeleridir. Lipazlar, düşük aktivasyon enerjisine sahip olmalarından dolayı ılımlı koşullarda (düşük sıcaklık ve notral pH) ve ara yüzey aktivasyonu yüksek olan substratlarla reaksiyona girdiklerinde yüksek aktivite gösterirler[23].

Enzimleri kimyasal katalizörlerden ayıran en önemli özellikleri seçici olmalarıdır. Lipazın spesifikliğı pozisyonuna, substratın yapısına ve stereo seçiciliğine bağlıdır. Bu bağlamda lipazlar spesifik olmayan, 1,3-spesifik ve yağ asidi spesifik lipazlar olarak üç grupta toplanır.

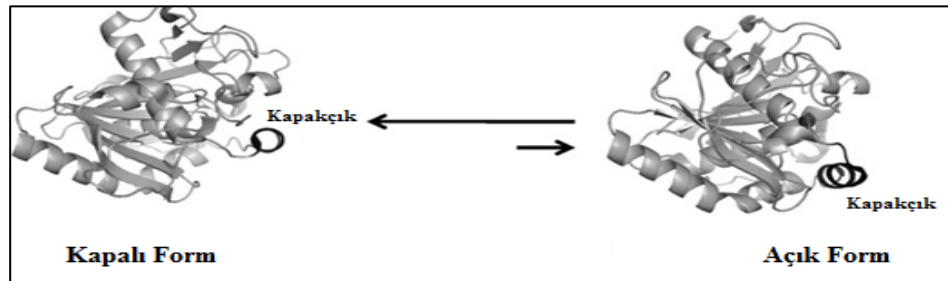
Spesifik olmayan lipazlar yağ asitleri ile yerleşimi önemli olmayan gliserid molekülleri arasındaki bağları rastegele parçalar. *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Choromobacterium viscosum*, *Geotrichum candidum* ve *Penicillium cyclopium* tarafından üretilen lipazlar bu gruba girer [23].

1,3-spesifik lipazlar sadece sn- 1,3 pozisyonundaki ester bağlarını parçalar; triacilgliserinlerden yağ asitleri, 1,2 2,3 diaçilgliserinler ve 2-monoaçilgliserinler oluşur. Domuz pankreas lipazı, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens*, *Humicola Lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *R. Japonicus*, *R. arrhizus* ve *Mucor javanicus* 1,3 spesifik lipazlara örnektir [24].

Lipazlar hayvansal ve bitkisel yağların hidroliz, esterifikasyon, transesterifikasyon gibi reaksiyonlarını katalizlemektedir. Dünyadaki enzim satışlarının %4 lük kısmına sahip olan lipaz enzimleri başta gıda, eczacılık, deterjan, tekstil ve kozmetik olmak üzere pek çok endüstriyel uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır [25], [26].

2.3.1.1.1. Thermomyces Lanuginosa lipaz

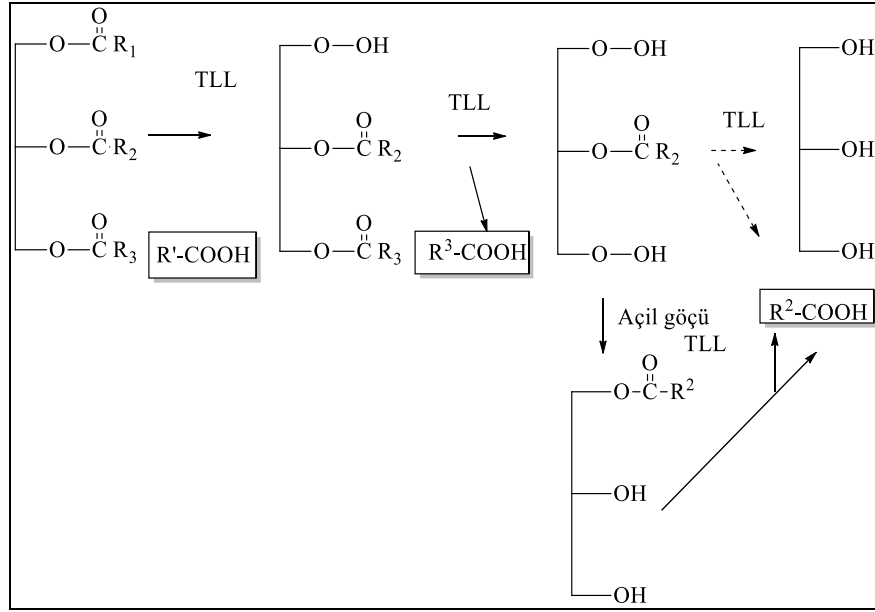
TLL 269 amino asit içeren tek zincirli bir proteindir. Molekül ağırlığı 31,700 g/mol olup izoelektrik noktası 4,4 tür [27]. Yapısı başlangıçta 3.25 Å [24] da araştırılırsa son zamanlarda daha çok 1.8 Å [28] da aydınlatılmıştır. Genel hatlarıyla yuvarlak yapıda olup Şekil 2.7'deki gibi merkezi sekiz kanallı, ağırlıklı olarak birbirine bağlı beş adet alfa heliks ile beta sheetlerle paralel yapıdadır. Kapak aktif bölge üzerinde 86-93 arasındaki aminoasitleri içeren hareketli bir yüzeyin loplarında alfa sarmal yapıdadır [29]. Aktif bölgesinde Serin, histidin ve aspartik asit bulunmaktadır. TLL nin Triptofan (Trp) rezidülerinden Trp89 kapakta yer almaktadır.



Şekil 2.7: TLL nin açık ve kapalı formları.

TLL ile etkileşime giren katkı maddeleri enzim üzerine farklı etkiler yapmaktadır. Örneğin yapılan araştırmalar sonucu betain enzimin termal kararlılığını artırır ve üç boyutlu yapısının guanidin klorid tarafından bozulmasını önler [30]. TLL'nin yapısında bulunan kapakçık zaman zaman kapanıp aktiviteyi etkileyebilir. Deterjanlar kapalı olan enzimin kapakçığının açık forma gelmesinde etkin rol oynarlar [31]. TLL, CTAB (Setiltrimetilamonyumbromid,) gibi deterjanlar ile muamele edildiğinde uygun konsantrasyonlarda aktivitede artış gözlenirken, yüksek konsantrasyonlarda enzimi inhibe eder [32].

TLL, su:organik solvent karışımı ve solventsiz ortamlarda katalizör olarak görev yapabilir. 1,3 pozisyonunda spesifik olup pozisyon ikiden pozisyon bire açıl göçü ile esterlerin hidrolizini Şekil 2.8'deki gibi gerçekleştirir. Endüstriyel uygulamalarda değişik yağlardan serbest yağ asidi üretimi için hidroliz reaksiyonlarında kullanımı bulunmaktadır [33], [34].



Şekil 2.8: TLL tarafından triaçilgliserollerin hidrolizi.

Zhou ve arkadaşları TLL'yi mezaselüler silika köpük ve kafes tipi mezopozoz organosilika metaryelleri üzerine kovalent ve çapraz bağlama tekniği ile immobilize etmişler ve vinil propionat sentezinde kullanmışlardır. Enzimi sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde (pH 7.2, 100 mM) 25°C'de mezaselüler silika köpük üzerine gram matriks başına 23 U/g ve kafes tipi mezopozoz organosilika metaryelleri üzerine 25 U/g aktivite verimi % 100 olacak şekilde kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Enzim sodyum fosfat tamponu içerisinde (pH 7.2, 100 mM) 0.1 mM gluteraldehitli ortamda mezaselüler silika köpük ve kafes tipi mezopozoz organosilika metaryelleri üzerine çapraz bağlama ile immobilize edilmiştir. Mezaselüler silika köpük üzerine % 80 aktivite verimi ile gram matriks başına 100 U/g ve kafes tipi mezopozoz organosilika metaryelleri üzerine 25 U/g aktivite verimi % 100 olacak şekilde çapraz olarak immobilize edilmiştir [35].

TLL' nin kinetik çalışmaları palm yağının sulu organik faz içerisinde hidrolizi ile çalışılmıştır [2]. Ortamdaki su konsantrasyonu % 3,6 (v/v) üzerinde iken enzimin

inhibe olmasına neden olmuştur. Yağ asidi oluşumu reaksiyon sırasında oluşan gliserolün artışıyla sınırlanmıştır [36]. Siklodekstrin, ortamdaki substrat konsantrasyonlarının artmasıyla birlikte reaksiyonu büyük ölçüde hızlandırır. TLL, substrat olarak ayçiçek yağı, soya lesitin ve ikisinin karışımlarının kullanıldığı pH 7.0 tampon/ heptan karışımında 60°C'de hidroliz reaksiyonu gerçekleştirilerek farklı yapılarıdaki diğer enzimlerle karşılaştırılmıştır. TLL ayçiçek yağı (% 85.3) ve lesitin karışımı (% 100) kullanılarak gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonunda en yüksek yağ asidi dönüşümü gerçekleştirirken, substrat olarak lesitin kullanıldığında serbest Rhizomucor miehei lipazı en yüksek dönüşümü göstermiştir(% 35,6) [37]. Lipazlar balık yağlarının hidrolizinde kullanılmaktadır. Güncel çalışmalar palmitik metil esteri ihtiva eden bir sistem ile balık ve kalamar yağının hidroliz edilmesiyle EPA, DHA üretimi sağlayan TLL'inde içerisinde olduğu beş farklı lipazı üzerine gerçekleştirilmiştir [38] Denemeler sonunda tüm lipazlar EPA ve DHA'yı gliserinle gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonuna göre daha kolaylıkla hidroliz etmiştir. DHA, reaksiyon başlangıcında gliserinin hidrolizi ile TLL tarafından daha çok sentezlenirken, reaksiyon süresi uzadıkça Candida Rugosa lipazı ile daha yüksek verimde ürün elde edilmiştir. Başka bir çalışmada TLL, Candida rugosa, porçin pankreatik lipaz kullanılarak yüksek verimde esansiyel yağ asidi sentezi gerçekleştirilmiştir. Soya yağlarının hidrolizi ile gerçekleştirilen serbest yağ asitlerinin sentezinde mikrobiyal lipazlar (% 70'den fazla); porçin pankreatik lipaz ve Candida rugosa (% 24) dan daha etkindir. Buna rağmen porçin pankreatik lipaz bu esansiyel yağ asitleri sentezinde daha kabul edilebilir bir sonuç vermiştir [37].

2.4. İmmobilizasyon Çalışmaları

Enzimlerin, katalitik aktivitelerini kaybetmeden fiziksel olarak belirli bir bölgeye hapsedilerek ya da sınırlandırılarak sürekli ve tekrar kullanılabilir hale getirilmelerine immobilizasyon denir [39]. İmmobilizasyon teknikleri, endüstriyel proseslerdeki uygulamalarının yanı sıra teşhis, biyoafinite kromatografisi ve biyosensörlerin yapımı gibi çok sayıda biyoteknolojik ürüne kaynak teşkil etmektedir [40].

İmmobilizasyon, evreni kapsayan doğal bir olaydır. Doğal ortamdaki mikroorganizmalar sıklıkla biyofilmler içerisinde düzensiz yayılmıştır. Biyofilmler, sulu ortamlarda mikrobiyal toplulukların yüzeye tutunarak oluşturduğu tabakadır

[41]. Biyofilmler ile kapsamlı şekilde ilk olarak 1940 larda çalışılmaya başlanmıştır, ancak neredeyse tüm doğal çevrelerde bulunmalarına rağmen 1970 lere kadar değeri anlaşılmamıştır [42].

İmmobilizasyon teknikleri birçok avantaj sağlar [43];

- Tekrar kullanım,
- Kolay ürün saflaştırılması,
- Sürekli proseslerde kullanılabilirlik,
- Proses kontrolünde kolaylık,
- Kısa alıkonma süresi,
- Kontrollü ürün oluşumu,
- Enzim kararlılığı,
- Birçok enzimin birlikte kullanımı,
- Kültür karışımlarında kullanılabilirlik.

2.4.1. Enzim İmmobilizasyonu

İmmobilize enzimler serbest enzime göre birtakım üstünlüklere sahiptir. Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme vb.) ve saf ürün elde edilir. Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) karşı daha dayanıklıdır ve birçok kez ve uzun süre kullanılabilirler. Sürekli işlemlere uygulanabilirler ve daha kararlıdırlar. Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir. Serbest enzimden daha yüksek aktivite gösterdiği durumlarda gözlenebilir. Enzimin kendi kendini parçalama (otoliz) olasılığı azalır. Endüstriyel uygulamalarda önemli ölçüde ekonomik avantaj sağlarlar [44].

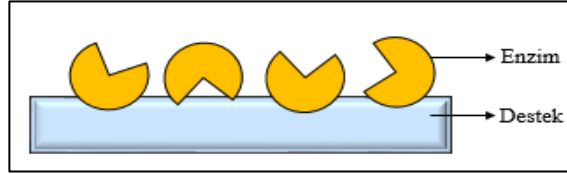
2.4.1.1. Enzim İmmobilizasyon Metodları

Enzimler çeşitli tekniklerle immobilize edilebilirler. Bu teknikler; adsorpsiyon, hapsetme, çapraz bağlama, kovalent bağlama, kopolimerizasyon yöntemleridir.

2.4.1.1.1. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon immobilizasyonu en basit metoddur ve Şekil 2.9'daki gibi enzim ile destek materyal arasında bozulabilir yüzey bağlanmasına dayanmaktadır.

Bağlanma genel olarak hidrojen bağları, tuz köprüleri ve Van der Waal's bağları ile olur. Bu açıdan, metod biyolojik in vivo membranlar için uygundur ve bu tarz sistemlerde model olarak kullanılmaktadır [44]. Enzim ve taşıyıcı arasındaki zayıf bağlardan dolayı sıcaklık, pH, iyonik şiddet ya da substrat yoğunluğundaki değişimlerden dolayı enzim kaçıışı gerçekleşebilmektedir [45].

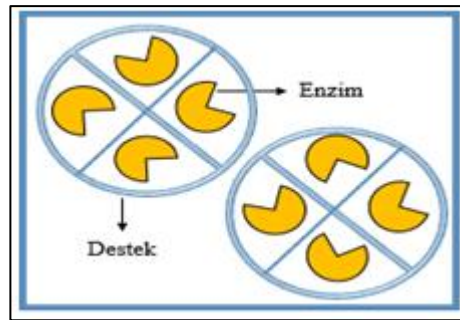


Şekil 2.9: Adsorpsiyon tekniği ile enzim immobilizasyonu.

Bu yöntemin diğerlerine göre avantajı; reaktife ihtiyaç olmaması ve aktivasyonu için minimum basamakların gerekmesinden dolayı kolay uygulanabilir ve ucuz olmasıdır. Dezavantajı spesifik olmamasıdır. Bunun yanı sıra, immobilize enzimler gibi diğer protein ya da maddelerin adsorpsiyonu meydana gelebilmektedir. Eğer adsorbe edilmiş madde enzimin substratıysa, enzim ve substratın yüzeydeki hareketinden dolayı aktivitede düşüş muhtemeldir. Dolayısıyla bu durum immobilize enzimin özelliklerini değiştirebilir [46].

2.4.1.1.2. Hapsetme

Hapsetme ile gerçekleştirilen immobilizasyonda, adsorpsiyon ve kovalent bağlamadan farklı olarak enzim Şekil 2.10'daki gibi solüsyon içerisinde serbest haldedir, fakat jelin ağ yapısından dolayı hareketi kısıtlanmıştır.

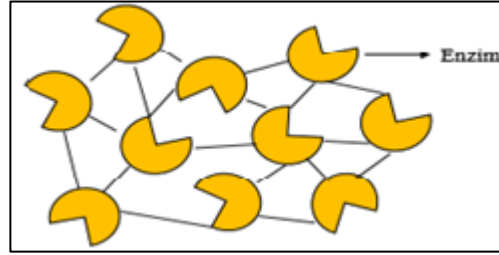


Şekil 2.10: Hapsetme tekniği ile enzim immobilizasyonu.

Bu metotta düşük moleköl ağırlıklı substrat ve reaksiyon ürünleri serbest olarak difüze olabilir. Alışılmış yöntemle göre enzimin sulu çözeltisi içerisindeki hidrofilik matriksin polimerleşmesi gerekir. Ancak, polimerizasyonda oluşan serbets radikaller tutuklanan enzimlerin aktivitesini etkileyebilir. Bu yöntemin diğler bir dezavantajı yalnızca ribonükleaz, tripsin ve dekstranaz gibi düşük moleköl ağırlıklı maddelerin enzim içerisine difüze olabilmesidir [46] .

2.4.1.1.3. Çapraz Bağlama

Enzimlerin immobilizasyonu, proteinlerin moleküllerarası çapraz bağlarıyla, diğler protein molekülleri/polimerize jel (sentetik olan/olmayan) ile ya da çözünmeyen matriks üzerindeki fonksiyonel gruplarıyla yapılabilmektedir. Bu tip immobilizasyonlarda destek materyali olmadan, enzim moleküllerinin geniş bir grup olarak bir araya gelmesiyle, üç boyutlu kompleks yapılarıyla ve kimyasal yada fiziksel metodlarla şekil 2.11'deki gibi gerçekleştirilebilmektedir.

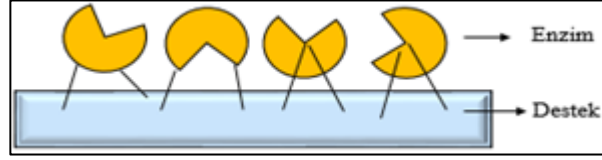


Şekil 2.11: Çapraz bağlama tekniğı ile enzim immobilizasyonu.

Enzimler kendi içerisinde çapraz bağlanmakta, protein materyali her zaman için destek materyali olarak görev yapmaktadır. Yapay çapraz bağlar polipeptid zincirleri içinde (intra moleküler çapraz bağlar) oluşur. İç çapraz bağları stress koşullarına karşı katlanmasını önleyerek proteine kararlılık sağlar. Buda iki polipeptid zinciri ile intra moleküler çapraz bağların bağlanmasıyla mümkündür [44]. Bu özel yapı biyofonksiyonel reaktif ile küçük enzim kristallerinin çapraz bağlarını içerir. Enzimler partikül formunda daha kararlı olduklarından dolayı, kolaylıkla reaksiyon karışımından ayrılıp tekrar tekrar kullanılabilir [45].

2.4.1.1.4. Kovalent Bağlama

Kovalent immobilizasyonun diğer immobilizasyon tekniklerinden üstünlüğü, genellikle bağlanan enzimin daha kararlı ve aktif elde edilmesidir. Kovalent immobilizasyonun avantajı güçlü kovalent bağlanmanın gerçekleşmesidir. Böylece kararlı immobilize enzimler elde edilir, yüksek iyonik şiddete sahip solüsyonlarda bile enzim kaybı olmaz. Dezavantajı ise kovalent olarak yapılacak immobilizasyonun şartlandırmalarının seçilmesinin diğer tekniklere göre daha zorlayıcı olmasıdır. Şartlandırma için gerekenler kısmen zordur. Yüksek aktivite elde edilmek isteniyorsa enzimin aktif bölgesindeki grupları inaktive edecek reaksiyon ortamlarından uzak durulmalıdır.



Şekil 2.12: Kovalent bağlama tekniği ile enzim immobilizasyonu.

Enzimin aktif bölgesindeki grupların korunması için; reaksiyon yarışmalı inhibitör ya da substrat varlığında, geri dönüşümlü enzim inhibitör kompleksi kovalent bağlanarak ve öncü proenzim kullanılarak gerçekleştirilebilir. Bu immobilizasyon Şekil 2.12'deki gibi birbirine kovalent bağ ile bağlı enzim ve destek materyal ile gerçekleşir [42].

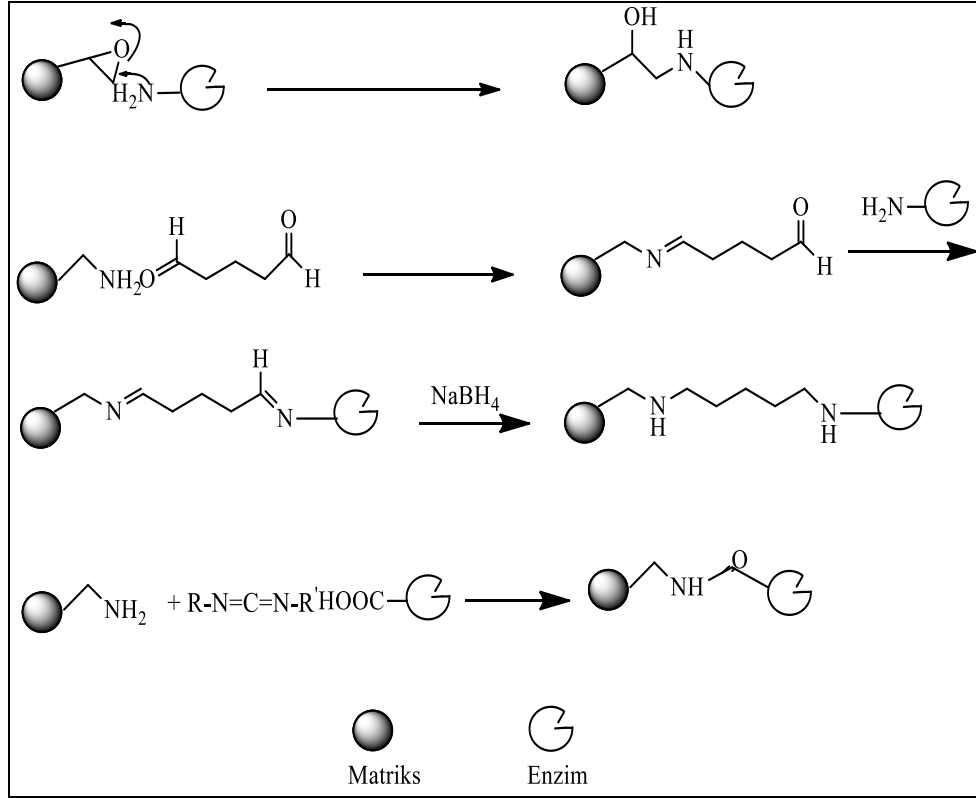
Enzimlerin kovalent immobilizasyonu için dikkate alınan temel faktörler şunlardır;

- Proteinlerin fonksiyonel grupları ılımlı koşullarda kovalent bağlamaya uygun hale getirilmeli [40]. Protein ve destek materyaller arasında bağlanma tepkimesi gerçekleşmeli. Protein desteklerin sahip olması gereken çeşitli karakter özellikleri; geniş yüzey alanı, geçirgenlik, hidrofilik/hidrofobik karakter, çözünmez, kimyasal, mekanik ve termal stabilite, sert, uygun yapı ve partikül büyüklüğünde, mikrobiyal saldırılara karşı dirençli olmalıdır.
- Protein moleküllerinin matrikse bağlanması fonksiyonel taşıyıcıların çeşitli grupları ve proteinlerin aminoasit rezidüleri arasında ılımlı koşullar altında

gerçekleşir. Protein immobilizasyonu için kullanılan bağlanma ana reaksiyonlarının bazıları: diazolama, amido (peptit) bağ oluşumu, alkilasyon ve arilasyon, Schiff bazı reaksiyonu, Ugi reaksiyonu, tiyol disülfid değişim reaksiyonları, mercurry enzim etkileşimidir [42]. Reaksiyon enzimin aktif gruplarının bulunduğu bölgelerin dışında bulunan reaktif gruplarla gerçekleşmelidir. Belirli enzimlerin aktif bölgele hakkında bilgi sahibi olunursa buradaki temel grupların reaksiyonda korunması sağlanır. Bununla birlikte aktif bölgenin korunmasıyla enzimin aktivitesinde de kayıp gözlenmez. Bazı durumlarda bu koruma işlemleri substrat ya da yarışmalı inhibitör kullanılarak gerçekleştirilebilir; Böylece enzimin üç boyutlu yapısında korunmuş olur [47].

- İmmobilize enzim yüzeyinde bulunan hidrojen bağları, elektron geçişi ya da elektron geçiş kompleksi oluşumu enzimin üç boyutlu yapısının korunmasında önemli rol oynamaktadır. İmmobilize enzimin termal kararlılığının iyi ayarlanması da üç boyutlu yapısının korunması için önemli bir faktör olabilir [42]. Bu açıdan termal olarak kararlı olan çözünür enzimin kimyasal yapısının bilinmesi önemlidir [47].
- İstenilen bölgede tutuklanarak ya da çözünmez hale getirilerek enzimin çapraz bağlanma ile immobilize edilmesi mümkündür ve oldukça ucuzdur. Aldehit gibi pek çok çapraz bağlayıcı ajan bu amaç için kullanılmaktadır [40].

Yaygın olarak, enzimin amino grupları kovalent immobilizasyonda kullanılmıştır. Fakat enzim yüzeyindeki diğer şeker rezidüleri içeren fonksiyonel gruplar değerlendirilmiştir. Nükleofil gibi amino grupları epoksi ya da aldehid gruplarına saldırabilir. Aldehidin imin formunda bulunması halinde indirgenebilir (NaBH_4) ve bu reaksiyon geri dönüşümsüz olarak gerçekleşir. Karbodiimidlerde bu amaçla kullanılabilir; taşıyıcı üzerinde ve tam tersi bir asit grubu ile bir amid bağı oluşturabilir. Şekil 2.13'de bazı reaksiyonlar gösterilmektedir. Bir kovalent immobilizasyon yapıldığı zaman, enzimatik reaksiyonun tüm bileşenleri dikkatlice değerlendirilmelidir. Genellikle, doğal enzimler ticari olarak işlenmemiş halde bulunur. Ancak genellikle stabilizatör olarak poliol ve şeker gibi çeşitli katkıları içerirler. Asıl protein içeriği % 5 inde altında olmalıdır ve diğer reaktif kimyasal türlerin engellenmesi her zaman dikkate alınmalıdır [48].



Şekil 2.13: Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanması.

2.4.1.1.5. Kopolimerizasyon

Polimerizasyon, reaktif çift bağlar içeren aynı veya farklı monomerlerin ısı, ışık veya katalizörler yardımıyla oluşturdukları farklı yapılarıdaki kimyasal bileşiklerin meydana geldiği işleme verilen isimdir. Enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranarak matrikse bağlanmaktadır. Enzimler Levin ve arkadaşları [49] tarafından polimer bir matriks ile kopolimerize edilmişlerdir. Kopolimer oluşumu içinde kimyasal olarak katılmış olan enzim böylece immobilize edilir. Hapsetme ve kopolimerizasyon arasındaki fark; ilk olarak enzim fiziksel olarak hapsedilir, ardından kimyasal formda polimere katılır [42].

2.4.1.2. İmmobilizasyon Taşıyıcıları

Çok sayıda polimer hücre immobilizasyonuna yardım etmek veya etkilemek için kullanılmıştır. Bu gibi polimerler küre, küp, membran, fiber, doğal matriks içinde veya tek başına hücre desteği olarak kullanılabilir [42]. İnorganik destekler genel olarak diğer materyallere göre daha büyük avantaj sağlar [50].

Tez çalışmasında kullanılan İmmobead 150–A yeni bir matriks olduğundan yapısı ile ilgili çok az bilgi bulunmaktadır. Üzerinde taşıdığı oksiren grupları sayesinde kuvvetli bir kovalent bağlayıcı kopolimerdir. Matriksin yapısı Şekil 2.14’de gösterilmektedir.



Şekil 2.14: İmmobead görüntüsü.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler

Kullanılan sarf malzemelerin listesi Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1: Deneyde kullanılan kimyasal malzemeler.

Malzemenin Adı	Firma Adı	Katalog Numarası
Lipaz (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	Sigma	L0777.250
Hidroklorik asit	Merck	1.003.172.500
Sodyum hidroksit	Fluka	71692
Sodyum azid	Merck	1.066.880.250
Hekzan	Merck	1.043.682.500
Asetik asit	Merck	100.056
Sodyum klorür	Sigma-Aldrich	7647-14-5
Kalsiyum klorür	Sigma-Aldrich	10043-52-4
Magnezyum klorür	Sigma-Aldrich	7786-30-3
Glisin	Merck	100590
Disodyum hidrojen fosfat dihidrat	Merck	1.06580
Sodyum fosfat mono bazik dihidrat	Sigma	04269
Dietil eter	Merck	1.00921
İzopropil alkol	Sigma	24137
İmmobead 150-A	ChiralVision	IB-150A
Tersiyer bütanol	Merck	8.22264
Tersiyer amil alkol	Merck	8.06193
Kalsiyum asetat	Merck	1.09325
Fenolftaleyn	Riedel de haen	33518
Etanol	Merck	111727
Potasyum hidroksit	VWR	26669368

Tablo 3.1: Devam.

Malzemenin Adı	Firma Adı	Katalog Numarası
Ayçiçek yağı	Kırlangıç (AS:0)	-
Kanola yağı	Doalya (AS:)	-
Soya yağı	Çotanak (AS:)	-
Heptan	Riedel de haen	15677
Siklohekzan	Merck	1.02888
DMSO	Merck	8.02912
Tersiyer bütanol	Merck	8.22264

3.1.2. Kullanılan Enzim

Bu çalışmada ticari bir enzim olan *Thermomyces lanuginosa* lipaz kullanıldı. Enzimin aktivitesi 4261,2 IU/ml, spesifik aktivitesi ise 193,7 IU/mg protein olarak hesaplandı.

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Deneylerde kullanılan cihazlar aşağıda gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Deneyde kullanılan araç ve gereçler.

Kullanılan cihazlar	Firma Adı	Model
pH metre	WTW	Inolab 8F93
Magnetik karıştırıcı	Heidolph	MR3004
İnce tabaka kromatografi ısıtıcısı	Camaq	Heater 3
Hassas terazi	Sartorius	Basic
Otomatik pipet (10µL-1000µL-200µL)	Eppendorf	R311149-R311165- R311157
Mikro Şırınga	Hamilton	7002KH

Tablo 3.2: Devam.

Kullanılan cihazlar	Firma Adı	Model
İnce tabaka kromatografisi	Merck	HX271578
Neodymium magnet (2.16 KG)	Neohobi/İzmir	Silindir, Çap 50mm, kalınlık 10 mm

3.2. Metot

3.2.1. Asit Sayısı Tayini

Asit sayısı (AS), 1 g numunenin ihtiva ettiği serbest yağ asitlerini nötralleştirmek için gereken KOH miktarı (mg) olarak tanımlanır. Asit sayısı tayin edilecek numune (1 g), izopropil alkolde (10 mL) çözülür. Üzerine 3 damla (150 µl) fenolftalein indikatörü ilave edilir ve etanol kullanılarak hazırlanan KOH çözeltisi (0,1 N) ile ortamın rengi pembe olana kadar titrasyon işlemi gerçekleştirilir. Asit sayısı (AS) aşağıdaki denklem kullanılarak bulunur.

$$\text{Asit Sayısı(AS)} = \frac{V_s(\text{ml}) \times 56.1 \times [\text{KOH}]}{\text{Numune(g)}} \quad (3.1)$$

- V_s =Kullanılan potasyum hidroksit miktarı (ml)
- $[\text{KOH}]$ =Potasyum hidroksit çözeltisinin konsantrasyonu (M)

3.2.2. Yağ Nötralizasyonu

Serbest yağ asidi içeren kanola [SYA: % 0,1 (w/w)] ve soya yağları [SYA: % 0,3 (w/w)] NaOH çözeltisi kullanılarak nötralize edildi. 200 g yağ (soya veya kanola) NaOH çözeltisiyle (soya için 0,6 g NaOH, kanola için ise 0,1 g NaOH 1 ml saf suda çözüldü) magnetik karıştırıcı kullanılarak (800 rpm) 60°C'de 1 saat muamele edildi. Reaksiyonda oluşan sabun oda sıcaklığında (23°C) kaba filtre kâğıdından süzülerek uzaklaştırıldı ve serbest yağ asidi ihtiva etmeyen soya (190 g) ve kanola (185 g) yağları elde edildi.

3.2.3. Aktivite Tayini

Thermomyces Lanuginosa Lipazı [0.2 g immobilize, 250 µl serbest enzim] 30g nötral ayçiçek yağı ile tampon çözeltide [(immobilize enzim; 5 ml 100 mM sodyum fosfat tampon çözeltisi, pH 7.0),(serbest enzim; 5 ml 25 mM kalsiyum asetat tampon çözeltisi, pH 6.0)] su banyosu (140 rpm) kullanılarak 30 dakika muamele edildi. Reaksiyon immobilize enzim için 55°C, serbest enzim için ise 50°C'de gerçekleştirildi. Oluşan yağ asidi miktarı asit sayısı tayin metodu ile belirlendi. Aktivite birimi (IU), aktivite tayin şartlarında dakikada 1 µmol yağ asidi oluşturan enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.2.4. Serbest Enzimin Hidroliz Reaksiyonu Optimizasyonu

Serbest enzimin optimum hidroliz şartlarının belirlenmesinde, tampon çözelti pH'ı (4-9), tampon çözelti konsantrasyonu (15-250 mM) , tampon çözelti miktarı (1-30 ml), sıcaklık (30-70°C), tuz (CaCl₂, MgCl₂ ve NaCl) ve organik çözücü [heptan, hekzan, izooktan, sikloheksan, DMSO, t- bütanol ve t- amil alkol (% 1-10 v/v)] etkileri çalışıldı.

3.2.4.1. pH

Serbest enzim (0.25 ml), farklı pH'larda [(4.0-6.0) Ca(Ac)₂, (6.0-9.0) NaH₂PO₄] tampon çözeltisinde (25 mM, 5 ml) ayçiçek yağı (30 g) ile su banyosu (50°C, 140 rpm) kullanılarak 30 dakika inkübe edildi ve oluşan yağ asidi miktarı asit sayısı tayin metodu ile tayin edildi.

3.2.4.2. Tampon Çözelti Konsantrasyonu

Serbest enzim (0.25 ml), farklı konsantrasyonlarda (15-250 mM) Ca(Ac)₂ tampon çözeltilerinde (5 ml, pH 6.0) ayçiçek yağı (30 g) ile su banyosu (50°C, 140 rpm) kullanılarak 30 dakika inkübe edildi ve oluşan yağ asidi miktarı asit sayısı tayini metodu ile tayin edildi.

3.2.4.3. Tampon Çözelti Miktarı

Serbest enzim (0.25 ml), farklı miktarlardaki (1-30 ml) tampon çözeltilerinde (25 mM Ca(Ac)₂ tamponu pH 6.0) ayçiçek yağı (30 g) ile su banyosu (50°C, 140 rpm) kullanılarak 30 dakika inkübe edildi ve oluşan yağ asidi miktarı asit sayısı tayini metodu ile tayin edildi.

3.2.4.4. Sıcaklık

Serbest enzim (0.25 ml), 5ml tampon çözeltisinde (25 mM Ca(Ac)₂ tamponu pH 6.0) ayçiçek yağı (30 g) ile su banyosu (140 rpm) kullanılarak farklı sıcaklıklarda (30-70°C) 30 dakika inkübe edildi ve oluşan yağ asidi miktarı asit sayısı tayini metodu ile tayin edildi.

3.2.4.5. Organik Çözücü ve Tuzların Hidrolitik Aktiviteye Etkisi

Serbest enzim (0.25 ml) optimum şartları belirlendikten sonra 5ml tampon çözelti (25 mM Ca(Ac)₂ tamponu pH 6.0) bulunan erlen içinde ayçiçek yağı (30 g) ile ortama farklı miktarlarda organik çözücüler [heptan, hekzan, izooktan, siklohekzan, DMSO, t- bütanol, t- amil alkol (% 1-10 v/v)] veya tuzlar (NaCl, MgCl₂, CaCl₂ (5-250 mM)) eklenerek su banyosunda (50°C, 140 rpm) 30 dakika inkübe edildi ve oluşan yağ asidi miktarı asit sayısı tayini metodu ile tayin edildi.

3.2.4.6. Yüksek Miktarda Kullanılan Serbest Enzimin Hidroliz Reaksiyonu

Optimum şartları belirlenen serbest enzim yüksek miktarda (3 ml) kullanılarak 2 ml tampon çözelti (25 mM Ca(Ac)₂ tamponu pH 6.0) bulunan erlen içinde ayçiçek yağı (30 g) ile su banyosu (50°C, 140 rpm) kullanılarak 24 saat inkübe edildi. Reaksiyon ortamına 3 ml enzim ve 2 ml tampon ilave edilerek, hidroliz reaksiyonuna 6 saat daha devam edildi ve oluşan yağ asidi miktarı asit sayısı tayini metodu ile tayin edildi.

3.2.4.7. Magnetize Alanın Enzim Reaksiyonuna Etkisi

Manyetik alanın hidroliz reaksiyonuna etkisi serbest enzim için optimum hidroliz reaksiyon şartlarında [kalsiyum asetat çözeltisinde [(5 ml, 25 mM, pH 6.0)], 30 g ayçiçek yağı ile 50°C’de su banyosunda 30 dakika reaksiyon] çalışıldı.

Ca(Ac)₂ tampon çözeltisi (50 ml) bir reaksiyon şişesi (50 ml) içerisinde şekil 4.1 de gösterildiği gibi manyetik alana (± 4,1 KG) değişik sürelerde (1-10 dakika) tabii tutuldu ve hidroliz reaksiyonları 30°C’de gerçekleştirildi.



Şekil 3.1: Tampon çözeltinin magnetik alanda aktivasyonu.

3.2.5. İmmobead 150-A Üzerine Enzim İmmobilizasyon Optimizasyonu

İmmobilizasyon optimizasyonu için matriks miktarı (50-250 mg), pH (4.5-9.0), tampon çözelti konsantrasyonu (25-1500 mM) ve sürenin (2-24 saat) etkileri çalışıldı. Optimum immobilizasyon şartları bulunduktan sonra matriks üzerinde kalan reaktif grupların giderilebilmesi için matriks glisinle (0.1-3M) 24 saat muamele edildi.

3.2.5.1. Matriks Miktarı

Serbest enzim (0.25ml) ve immobead (50-250 mg), Ca(Ac)₂ tampon çözeltisinde (25mM, pH 5.0, 10ml) su banyosu kullanılarak (23°C, 115 rpm) 17 saat inkübe edilerek immobilizasyon gerçekleştirildi. İmmobilize enzim, Ca(Ac)₂ tampon çözeltisi (30 mL, 25 mM, pH 5.0) ve NaCl çözeltisi (20 ml, 1M) ile yıkandı. İmmobilize enzim vakum altında süzüldü. Süzüntüde bulunan protein miktarı ve enzim aktivitesi belirlendi.

3.2.5.2. pH

Serbest enzim (0.25ml) ve immovead (200 mg) farklı pH'lardaki [(4.5-6.0) Ca(Ac)₂, (6.0-9.0) sodyum fosfat] tampon çözeltilerinde (25mM, 10ml) su banyosu kullanılarak (23°C, 115 rpm) 17 saat inkübe edilerek immobilizasyon gerçekleştirildi. İmmobilize enzim, Ca(Ac)₂ tampon çözeltisi (30 mL, 25 mM, pH 5.0) ve NaCl çözeltisi (20 ml, 1M) ile yıkandı. İmmobilize enzim vakum altında süzüldü. Süzüntüde bulunan protein miktarı ve enzim aktivitesi belirlendi.

3.2.5.3. Tampon Çözelti Konsantrasyonu

Serbest enzim (0.25 ml) ve immovead (200 mg) farklı konsantrasyonlardaki (25-1500 mM) Ca(Ac)₂ tampon çözeltilerinde (pH 5.0, 10 ml) su banyosu kullanılarak (23°C,115 rpm) 17 saat inkübe edilerek immobilizasyon gerçekleştirildi. İmmobilize enzim, Ca(Ac)₂ tampon çözeltisi (30 mL, 25 mM, pH 5.0) ve NaCl çözeltisi (20 ml, 1M) ile yıkandı. İmmobilize enzim vakum altında süzüldü. Süzüntüde bulunan protein miktarı ve enzim aktivitesi belirlendi.

3.2.5.4. Süre

Serbest enzim (0.25 ml) ve immovead (200 mg) Ca(Ac)₂ tampon çözeltisinde (25 mM, pH 5.0, 10ml) su banyosu kullanılarak (23°C, 115 rpm) farklı sürelerde (2-24h) inkübe edilerek immobilizasyon gerçekleştirildi. İmmobilize enzim, Ca(Ac)₂ tampon çözeltisi (30 mL, 25 mM, pH 5.0) ve NaCl çözeltisi (20 ml, 1M) ile yıkandı. İmmobilize enzim, vakum altında süzüldü. Süzüntüde bulunan protein miktarı ve enzim aktivitesi belirlendi.

3.2.5.5. İmmobilizasyon Matrisinde Bulunan Serbest Epoxy Gruplarının Uzaklaştırılması

İmmobilizasyon, serbest enzim (0.25 ml) ve immovead (200 mg) içeren erlen içerisinde kalsiyum asetat tampon çözeltisi (10 mL, 25 mM, pH 5.0) ile su banyosunda (23 °C, 115 rpm), 8 saat inkübe edilmesi ile gerçekleştirildi. İmmobilizasyon ortamına farklı konsantrasyonlarda (0.1-3.0 M) glisin ilave edilerek, işleme 24 saat devam edildi.

3.2.5.6. Optimum Şartlarda Enzim İmmobilizasyonu

Thermomyces Lanuginosa Lipaz (0.25 ml) ve İmmobead (200 mg) kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (10 mL, 25 mM, pH 5.0) su banyosu (23°C, 110 rpm) kullanılarak 8 saat inkübe edildi ve glisin (0,35mg) eklenerek karıştırmaya 24 saat devam edildi. İmmobilize enzim, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (30ml, 25mM, pH 5.0) ve sodyum klorür çözeltisi (20ml,1M) ile vakum altında yıkandı. İmmobilize enzim, buzdolabında (4°C) tutuldu.

3.2.6. İmmobilize Enzimin Hidroliz Reaksiyonu Optimizasyonu

İmmobilize enzimin optimum hidroliz şartlarının belirlenmesinde, tampon çözelti pH'ı (4-9), tampon çözelti konsantrasyonu (15-250 mM) , tampon çözelti miktarı (1-30 ml), sıcaklık (30-70°C), tuz etkisi (CaCl₂, MgCl₂, NaCl) ve organik çözücü [heptan, hekzan, izooktan, sikloheksan, DMSO, t- bütanol, t- amil alkol (% 1-10 v/v)] etkileri çalışıldı.

3.2.6.1. pH

İmmobilize enzim (200 mg), farklı pH'larda [(4.0-6.0) Ca(Ac)₂, (6.0-9.0) NaH₂PO₄] tampon çözeltilerinde (25 mM, 5 ml) ayçiçek yağı (30 g) ile su banyosu (140 rpm, 55°C) kullanılarak 30 dakika inkübe edildi ve oluşan yağ asidi miktarı asit sayısı tayini metodu ile tayin edildi.

3.2.6.2. Tampon Çözelti Konsantrasyonu

İmmobilize enzim (200 mg) farklı konsantrasyonlarda (15-250 mM) tampon çözeltilerde [5 ml, sodyum fosfat tampon çözeltisi pH 7.0)] ayçiçek yağı (30 g) ile su banyosu (140 rpm, 55°C) kullanılarak 30 dakika inkübe edildi ve oluşan yağ asidi miktarı asit sayısı tayini metodu ile tayin edildi.

3.2.6.3. Tampon Çözelti Miktarı

İmmobilize enzim (0.200 mg) farklı miktarlarda (1-30 ml) tampon çözeltilerde (100 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.0) ayçiçek yağı (30 g) ile su banyosu (140

rpm, 55°C) kullanılarak 30 dakika inkübe edildi ve oluşan yağ asidi miktarı asit sayısı tayini metodu ile tayin edildi.

3.2.6.4. Sıcaklık

İmmobilize enzim (0.200 mg), 5ml tampon çözeltide (100 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.0) ayçiçeği yağı (30 g) ile su banyosu (140 rpm) kullanılarak farklı sıcaklıklarda (30-70°C) 30 dakika inkübe edildi ve oluşan yağ asidi miktarı asit sayısı tayini metodu ile tayin edildi.

3.2.6.5. Organik Çözücü ve Tuzların Hidrolitik Aktiviteye Etkisi

İmmobilize enzimin (0.200 mg) optimum şartları belirlendikten sonra 5ml tampon çözelti (100 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.0) bulunan erlen içinde 30g ayçiçek yağı ile su banyosunda (140 rpm, 55°C) ortama farklı miktarlarda organik çözücüler [heptan, hekzan, izooktan, siklohekzan, DMSO, t- bütanol, t- amil alkol (% 1-10 v/v)] ve tuzlar (NaCl, MgCl₂, CaCl₂ (5-250 mM) eklenerek 30 dakika inkübe edildi ve oluşan yağ asidi miktarı asit sayısı tayini metodu ile tayin edildi.

3.2.7. İmmobilize enzimin Yağ Hidroliz Reaksiyonuna Sürenin Etkisi

İmmobilize enzim (0.2 g), sodyum fosfat tampon çözeltisinde (5 ml, pH: 7.0, 100 mM) ayçiçeği yağı (30 g), ile su banyosunda (140 rpm, 55°C) değişik sürelerde (10-50 dakika) reaksiyona sokuldu ve oluşan yağ asidi miktarları tayin edildi.

3.2.8. Ayçiçek, Soya ve Kanola Yağlarının Hidrolizi

Serbest enzim (0.25 ml) ve immobilize enzim (0.200 mg) ayçiçek, kanola ve soya yağları (30 g) ile tampon çözelti içinde su banyosunda 140 rpm'de 30 dakika reaksiyona sokuldu. Reaksiyon serbest enzim için kalsiyum asetat çözeltisinde (25 mM, pH 6.0) 50°C, immobilize enzim için sodyum fosfat tampon çözeltisi (100 mM, pH 7.0) 55°C'de gerçekleştirildi. Reaksiyon süresi sonunda oluşan yağ asidi miktarları asit sayısı tayini metodu ile belirlendi.

3.2.9. Sıcaklık ve pH Kararlılığının Tayini

Serbet(0.25 ml) veya immobilize (0.200 mg) enzimin kararlılığının tayini için farklı pH (4-12) ve sıcaklıklar (30-70°C) kullanılarak aktiviteler belirlendi. Enzim farklı pH ve sıcaklıklarda su banyosunda (150 rpm) 60 dakika tutuldu. . İnkübe edilen her bir enzim [(serbest enzim 25 mM pH 6.0 CaAc₂ tamponu,50°C) (immobilize enzim 100 mM pH 7.0 Na-fosfat tamponu, 55°C)] optimum hidroliz şartları içerisinde yağ ile 30 dakika reaksiyona sokuldu. Reaksiyon sonunda enzim aktiviteleri aktivite tayin metodu kullanılarak tespit edildi. Bu çalışmalar sırasında, pH 4.0-6.0 arası kalsiyum asetat, pH 6.0-9.0 arası sodyum fosfat, pH 9.0-10.5 arasında Glisin-NaOH, pH 10.9-12.0 arasında ise Na₂HPO₄.NaOH tampon çözeltileri kullanıldı.

3.2.10. Sürekli Kullanım ve Depolama Kararlılığı

İmmobilize enzimin sürekli kullanım kararlılığı, enzimin 30 kez kullanımı sonucunda her bir kullanımdan sonra aktivitesinin ölçülmesiyle belirlendi. Kullanılan immobilize enzim gerçekleştirilen her reaksiyon sonucunda Ca(Ac)₂ tampon çözeltisiyle (30 ml, 25 mM, pH 6.0) yıkandı. Depolama kararlılığı çalışması enzim aktivitesinin 60 gün süresince her gün ölçülmesiyle gerçekleştirildi. Çalışma süresinde immobilize enzim buzdolabında (4°C) muhafaza edildi.

3.2.11. TLC Analiz Metodu

Enzimatik hidroliz reaksiyonu ile farklı tipteki yağların hidrolizi sonucu elde edilen monoaçilgliserol, 1,2-diaçilgliserol, 1,3-diaçilgliserol, yağ asidi ve triaçilgliserol ince tabaka kromatografisi (thin layer chromatography; TLC) ile belirlendi. Ürünler silika jel ile kaplanmış plakalar (Merck 555) üzerine 0.002 ml damlatılarak hekzan, dietil eter, asetik asit (80:20:0.2, v/v/v) bulunan solvent sisteminde yürütüldü. Reaksiyon ürünlerinin görünür hale getirilebilmesi için, yürütülen plaka % 95 etil alkol, % 5 sülfirik asit ve % 0.5 α -naftol içeren renklendirme çözeltisine daldırılarak hotplate üzerinde 150°C'de 10 dakika yakıldı.

3.2.12. GC-MS Analiz Metodu

Analizler, Shimadzu GC-MS-QP2010 Ultra cihazı kullanılarak Rxi®-5ms Crosbond® % 5 diphenyl/ % 95 dimethyl polysiloxane 30 meter, 0.25 mmID 0.25 µm df (max prog. Temp 350°C) MS kolonunda gerçekleştirilmiştir. Kolon fırın sıcaklığı 90 °C, enjeksiyon sıcaklığı 250 °C enjeksiyon modu split ve split oranı 100 olarak ayarlanmıştır. Kullanılan GC programı; 90°C'de 5 dk ile başlamakta ve sonrasında 10°C/dk hızla 280°C'ye çıkmakta ve bu sıcaklıkta 5 dakika süreyle durulması şeklindedir. MS programında iyon kaynağı sıcaklığı 200°C ve arayüz (interface) sıcaklığı 210°C olarak ayarlanmıştır. MS dedektörü 3-29 dk ve 50-550 m/z aralığında scan mod ile data toplaması için ayarlanmıştır.

4. DENEYSEL SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında *Thermomyces lanuginosa* lipaz immobead 150-A matriksi üzerine kovalent olarak başarılı bir şekilde immobilize edilerek ayçiçek, kanola ve soya yağlarının hidrolizinde kullanılabilirliği gösterilmiştir. Bir Hollanda firması tarafından üretilen immobead 150-A matriksinin bu enzim için oldukça uygun olduğu bulundu. İmmobilizasyon, enzimin optimum pH ve sıcaklıklarını değiştirdi. Ayçiçek, soya ve kanola yağlarıyla yapılan hidroliz deneylerinde, sonuçların birbirine yakın olması sebebiyle optimizasyon deneylerinde sadece ayçiçek yağı kullanıldı. Başarıyla gerçekleştirilen immobilizasyon optimizasyonu sonucunda, aktivite ve immobilizasyon verimleri % 100 olarak elde edildi. İmmobilizasyon ve aktivite verimi tanımları aşağıda denklemlerle verilmiştir. Deneyler üçer kez tekrar edilerek gerçekleştirilmiştir.

$$\text{İmmobilizasyon Verimi} = \frac{(A - B)}{A} \times 100 \quad (4.1)$$

$$\text{Aktivite Verimi} = \frac{D}{E} \times 100 \quad (4.2)$$

- A: İmmobilizasyonda kullanılan protein miktarı
- B: Süzüntüdeki protein miktarı
- D: İmmobilize enzim aktivitesi
- E: İmmobilizasyonda bağlanan serbest enzim aktivitesi

İmmobilizasyonda 1 gr immobead 150-A matriksi üzerine 27.5 mg protein immobilize edilebilmektedir. Hidrolitik aktivitesi, tekrarlı kullanım ve depolama kararlılığı elde edilen immobilize enzimin yağ hidroliz reaksiyonlarında kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca, bu tez çalışmasında magnetik alanda aktifleştirilen tampon çözeltide gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonlarında % 8.2 oranında artış elde edilmiştir.

4.1. Yağ Nötralizasyonu

Yağ nötralizasyonunda sodyum hidroksit çözeltisi kullanıldı. İşlemden çok az su kullanımı emülsiyon oluşumunu önlemektedir. Nötralizasyon esnasında meydana gelen yağ asidi sodyum tuzlarının oda sıcaklığında yağda çözünmemesinden dolayı nötral yağ filtrasyonla elde edilebilmiştir. Soya ve kanola yağlarındaki nötralizasyon kayıpları sırasıyla % 4.7 ve % 7.4 olmuştur.

4.2. Ayçiçek, Kanola ve Soya Yağlarının Serbest Lipazla Hidrolizi

Nötral yağların (kanola, soya ve ayçiçek) serbest lipazla gerçekleştirilen hidroliz sonuçları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Ayçiçek, Kanola ve Soya yağlarının serbest lipazla hidrolizi.

Yağ	Asit Sayısı
Ayçiçek	51,4±0.8
Kanola	50,4±0.5
Soya	50,5±1.1

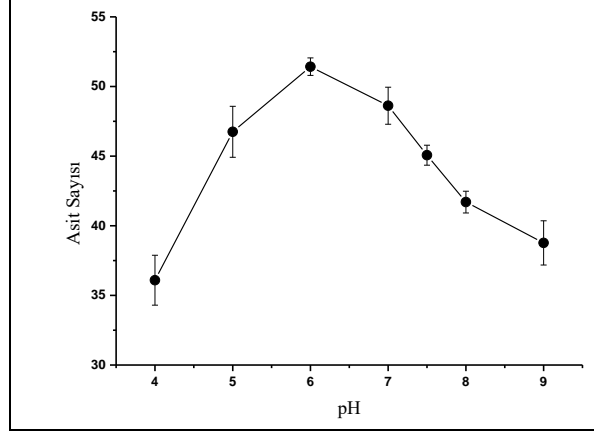
Ayçiçek, soya ve kanola yağlarıyla elde edilen asit sayıları farklılık göstermemektedir. Optimizasyon çalışmalarında yalnızca ayçiçek yağının kullanılmasının nedeni kolay temin edilebilirliği ve yüksek miktarda omega-6 yağ asidi ihtiva etmesidir.

4.3. Serbest Enzimin Ayçiçek Yağı Hidroliz Reaksiyonu Optimizasyonu

Serbest lipaz ile gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu optimizasyonu için pH, tampon çözelti konsantrasyonu, tampon çözelti miktarı, sıcaklık, organik çözücü ve tuz etkileri çalışıldı.

4.3.1. pH

Hidroliz reaksiyonu serbest enzim ile farklı pH'lardaki tampon çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1: Serbest enzimin hidrolitik aktivitesine pH'ın etkisi.

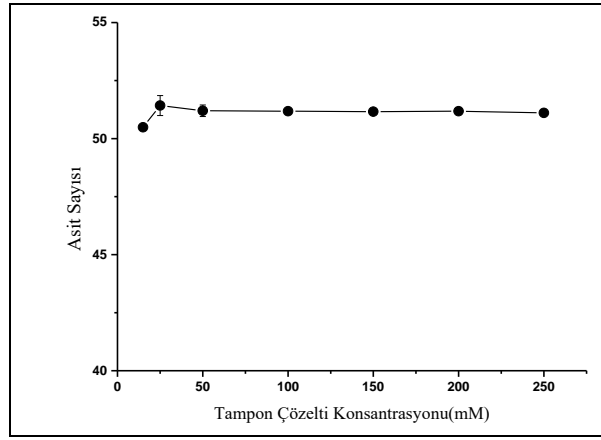
- [Serbest enzim (0.25 ml), farklı pH'larda [(-6.0) Ca(Ac)₂, (6.0-9.0) NaH₂PO₄] tampon çözeltisinde (25 mM, 5 ml) ayçiçek yağı (30 g) ile su banyosu (50°C, 140 rpm) kullanılarak 30 dakika inkübe edildi]

Grafikten görüldüğü gibi en yüksek aktivite pH 6.0'da elde edilmiştir.

4.3.2. Tampon Çözelti Konsantrasyonu

Hidroliz reaksiyonu serbest enzim ile farklı tampon çözelti konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.2'de verilmiştir

Sonuçlara göre, hidroliz için 25mM ve daha yüksek konsantrasyonlardaki $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltileri kullanılabilir

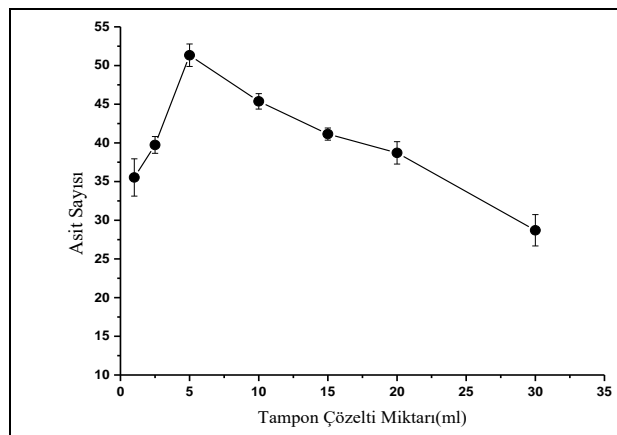


Şekil 4.2: Konsantrasyonunun serbest enzimin hidrolitik aktivitesine etkisi.

- [Serbest enzim (0.25 ml), farklı konsantrasyonlarda (15-250 mM) $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltilerinde (5 ml, pH 6.0) ayçiçek yağı (30 g) ile su banyosu (50°C, 140 rpm) kullanılarak 30 dakika inkübe edildi]

4.3.3. Tampon Çözelti Miktarı

Hidroliz reaksiyonu serbest enzim ile farklı tampon çözelti miktarları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.3’de verilmiştir.

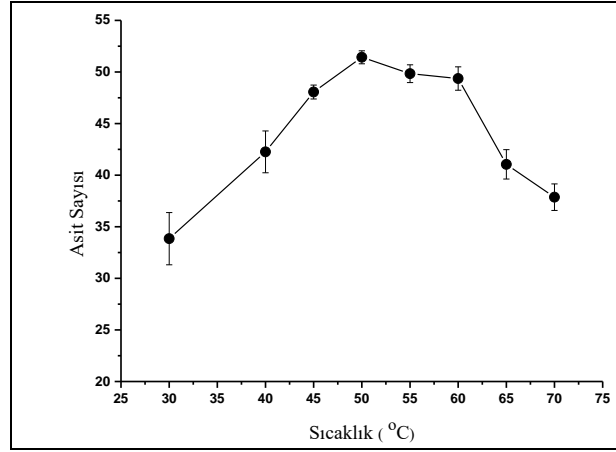


Şekil 4.3: Tampon çözelti miktarının serbest enzimin hidrolitik aktivitesine etkisi.

- [Serbest enzim (0.25 ml), farklı miktarlardaki (1-30 ml) tampon çözeltilerinde (25 mM Ca(Ac)₂ tamponu pH 6.0) ayçiçek yağı (30 g) ile su banyosu (50°C,140 rpm) kullanılarak 30 dakika inkübe edildi]

4.3.4. Sıcaklık

Hidroliz reaksiyonu serbest enzim ile farklı sıcaklıklar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4.4: Sıcaklığın serbest enzimin hidrolitik aktivitesine etkisi.

- [Serbest enzim (0.25 ml), 5ml tampon çözeltisinde (25 mM Ca(Ac)₂ tamponu pH 6.0) ayçiçek yağı (30 g) ile su banyosu (140 rpm) kullanılarak farklı sıcaklıklarda (30-70°C) 30 dakika inkübe edildi]

Bu sonuçlara göre serbest enzim en iyi aktiviteyi 50°C’de göstermektedir.

4.3.5. Hidroliz Reaksiyonuna Organik Çözücü Etkisi

Serbest enzimin optimum hidroliz şartlarında ortama farklı çözücüler ilave edilerek hidrolitik aktiviteye etkileri çalışıldı. Sonuçlar Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2: Değişik organik çözücülerin serbest enzim aktivitesine etkisi.

Çözücü	Asit Sayısı (İlavesiz:51.5±0.4)				
	1%(v/v)	2.5%(v/v)	5%(v/v)	7.5%(v/v)	10%(v/v)
İzooktan	51.3±0.7	52.4±0.3	49.7±0.6	41.2±0.3	33.3±0.3
Hekzan	51.1±0.2	52.5±0.3	48.2±0.6	38.0±0.6	32.7±0.3
Heptan	51.1±0.6	49.1±0.3	50.3±0.3	39.1±0.9	25.4±0.3
Siklohekzan	51.2±0.9	51.5±0.4	52.5±0.3	47.3±0.9	38.7±0.6
DMSO	50.7±0.3	50.3±0.5	47.4±0.3	33.7±0.6	1.7±0.0
T-bütanol	51.2±0.6	51.4±0.4	52.4±0.9	55.1±0.2	50.1±0.6
T-amil alkol	51.8±0.2	53.7±0.3	55.6±0.2	54.8±0.3	48.1±0.3

En iyi sonuç, % 5.0 oranında t-amil alkol ilavesiyle elde edilmiştir. Bu durumda hidroliz reaksiyonunda % 8.0 oranında bir artış gözlenmiştir.

4.3.6. Hidroliz Reaksiyonuna Tuz Etkisi

Değişik tuzların (NaCl, CaCl₂ ve MgCl₂) serbest lipazın hidrolitik aktivitesine olan etkileri Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3: Değişik tuzların serbest enzim aktivitesine etkisi.

[Tuz] (mM)	Asit Sayısı (İlavesiz 51.5±0.3)						
	5	10	25	50	100	150	250
NaCl	51.4± 0.3	51.6± 0.3	52.2± 0.6	51.8± 0.3	51.0± 0.4	50.8± 0.3	50.8± 0.3
CaCl ₂	50.9± 0.4	51.1± 0.3	51.3± 0.8	51.5± 0.4	50.0±0. 7	50.4± 1.1	50.0± 1.2
MgCl ₂	51.4± 0.7	51.5± 0.3	51.5± 0.4	51.4± 1.2	50.2± 0.5	50.7± 0.9	50.4± 0.6

Reaksiyon sonucunda serbest enzimin hidrolitik aktivitesini yalnızca NaCl'ün (25 mM) % 1,4 oranında arttırdığı görülmüştür. Sonuçlara göre tuz ilavesinin hidroliz aktivitesi üzerine olumlu veya olumsuz etkileri olmamıştır.

4.3.7. Yüksek Miktarda Enzim Kullanılarak Hidroliz Reaksiyonu

Hidroliz reaksiyonuna yüksek aktiviteye sahip serbest enzimin hidroliz reaksiyonuna etkisi Tablo 4.4'de incelenmiştir.

Tablo 4.4: Yüksek oranda kullanılan enzimin hidroliz reaksiyonuna sürenin etkisi.

Süre (saat)	Asit Sayısı
½	61.7±0.5
6	112.4±0.7
30	147.9±0.2
48	131.8±0.9

Reaksiyon sonucunda yüksek aktivitede enzim ile gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonun yaklaşık % 74 hidroliz verimi ile gerçekleştiği görülmektedir.

4.3.8. Magnetize Tampon Çözeltinin Hidroliz Reaksiyonuna Etkisi

Serbest enzim ile gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonlarında magnetik alanın etkisinin sonuçları Tablo 4.5' de gösterilmiştir. Tampon çözelti (20 ml) (+4.1 kG) ve (-4.1 kG) luk magnetik alana 30 dakika maruz bırakıldığında lipaz hidroliz aktivitesinde sırayla % 6.6 ve % 1.1'lik artışlar olmuştur

Tablo 4.5: Magnetik alanın enzim aktivitesine etkisi.

Magnetik Alan	Asit Sayısı
Kuzey (-)	29.3±0.6
Güney (+)	27.8±0.7
Muamelesiz	27.5±0.3

Yapılan bu ön denemelerde, mıknatısın kuzey kısmıyla muamele edilen tampon çözeltiyle daha iyi sonuçlar alındığından denemelere kuzey yönüyle devam edilmiştir.

Magnetik alanın (-) tampon çözeltiye etkisi süreye bağlı olarak çalışıldı. Tablo 4.6'da görüldüğü gibi en fazla aktivite artışı (% 8.2) 10. dakikada elde edilmiştir. Daha uzun süreli muamelelerde aktivite artışı hemen hemen sabitlenmiştir.

Tablo 4.6: Magnetik alan (-) muamele süresinin enzim aktivitesine etkisi.

Süre (dk)	0	1	5	10	15	20	25	30	60
Asit Sayısı	27.5 ±0.1	27.5 ±0.7	28.0 ±1.3	29.7 ±0.3	29.5 ±0.5	29.4 ±0.5	29.3 ±0.3	29.3 ±0.4	29.3 ±0.2

Magnetik alanda (-) 10 dakika tutulan tampon çözeltinin kararlılığının ölçülebilmesi için tampon çözelti oda sıcaklığında (22°C) değişik sürelerde tutuldu ve bu çözelti kullanılarak hidroliz aktiviteleri belirlendi. Tablo 4.7'de görüldüğü gibi magnetize olan tampon çözelti özelliğini 48 saat süresince korumaktadır. 72 saat içinde bu özellik kaybolmaktadır.

Tablo 4.7: Magnetik alan ile muamele edilen tampon çözeltinin kararlılığı.

Depolama süresi (Saat)	Asit sayısı
8	29.3±0.5
16	29.4±0.8
24	29.3±0.3
48	29.2±0.5
72	27.2±0.9

Manyetize olan tampon çözelti üzerine sıcaklığın etkisini çalışmak için bu çözeltiler değişik sıcaklıklarda 1saat su banyosunda tutuldu ve sıcaklık 30°C'ye getirilerek aktivite deneyleri Tablo 4.8'deki gibi gerçekleştirildi

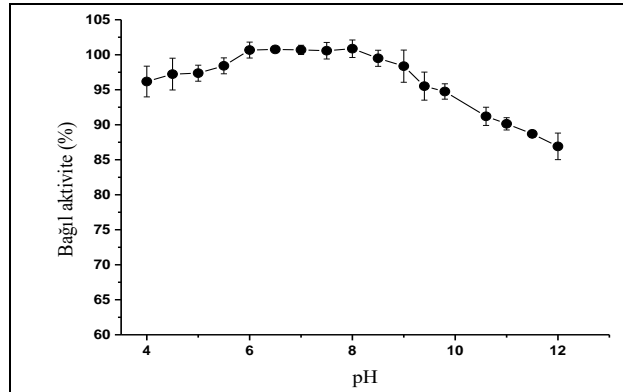
Tablo 4.8: Manyetize tampon çözeltilerine sıcaklığın etkisi.

Sıcaklık (°C)	Asit Sayısı
30	29.3±1.1
40	29.0±0.8
50	27.2±0.9
60	26.4±0.5
70	26.1±0.3
80	24.9±1.0

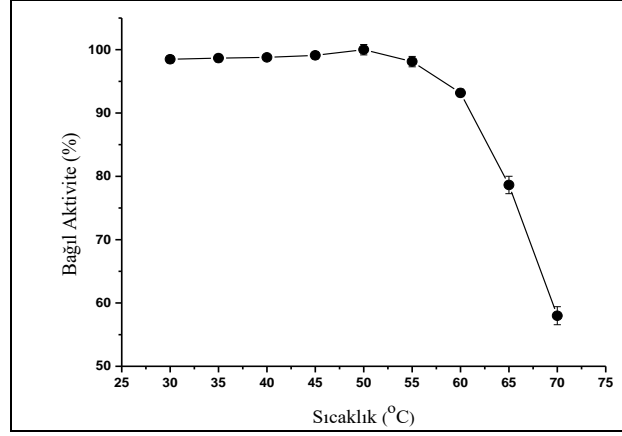
Manyetize tampon çözeltinin özellikleri 50°C ve üzerinde 1 saat içinde kaybolmaktadır. Sonuç olarak, manyetik alana (-) 10 dakika maruz bırakılan tampon çözelti hidroliz reaksiyonlarında kullanıldığında aktivitede % 8 civarında artış olmaktadır. Tampon çözeltinin manyetize edilme işleminde çözeltinin karıştırılmasının herhangi bir etkisi olmamaktadır.

4.4. Serbest Enzimin Sıcaklık ve pH Kararlılığı

Serbest enzimin pH ve sıcaklık kararlılığını gösteren sonuçlar Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.5: Serbest Enzim kararlılığına pH'nın etkisi



Şekil 4.6: Serbest enzim kararlılığına sıcaklık etkisi.

Serbest enzim için pH 6.0-8.0 arasında kararlı iken sıcaklık kararlılığı 50°C'ye kadar kararlı olarak bulundu.

4.5. TLL'nin İmmobead 150-A Üzerine İmmobilizasyon Optimizasyonu

4.5.1. Matriks miktarı

İmmobilizasyon, kalsiyum asetat tampon çözeltisi içerisinde farklı matriks miktarları ile gerçekleştirildi. Tablo 4.9'da görüldüğü gibi elde edilen sonuçlara göre 200 mg matriksin immobilizasyon için en uygun matriks miktarı olduğu tespit edildi.

Tablo 4.9: Matriks miktarının enzim immobilizasyonuna etkisi.

Matriks (mg)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzim aktivitesi (IU)	Süzüntüdeki protein (mg)
50	100.0	35,0	372,3	0.0
100	100.0	40,0	426,1	0.0
150	100.0	52,0	554,4	0.0
200	100.0	54,6	581,3	0.0
250	100.0	54,7	582,3	0.0

4.5.2. pH

İmmobilizasyon, kalsiyum asetat (4.5-6.0) ve sodyum fosfat (6.0-9.0) tampon çözeltilerinde gerçekleştirildi Tablo 4.10'da görüldüğü gibi çalışma sonunda pH 5.0'ın immobilizasyon için en uygun pH miktarı olduğu tespit edildi.

Tablo 4.10: pH'in enzim immobilizasyonuna etkisi.

pH	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzim aktivitesi (IU)	Süzüntüdeki protein (mg)
4.5	100.0	50,9	542,0	0.0
5.0	100.0	57,3	610,2	0.0
6.0	100.0	51,7	550,2	0.0
7.0	100.0	38,8	413,7	0.0
8.0	100.0	39,8	424,1	0.0
9.0	100.0	36,7	391,0	0.0

4.5.3. Konsantrasyon

İmmobilizasyon, farklı konsantrasyonlardaki kalsiyum asetat tampon çözeltisinde gerçekleştirildi. Tablo 4.11'de görüldüğü gibi çalışma sonunda 25mM tampon çözelti konsantrasyonunun immobilizasyon için en uygun miktar olduğu tespit edildi.

Tablo 4.11: Tampon çözelti konsantrasyonunun enzim immobilizasyonuna etkisi.

[Tampon çözelti] mM	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzim aktivitesi (IU)	Süzüntüdeki protein (mg)
25	100.0	55,1	587,5	0.0
250	100.0	50,3	535,8	0.0
500	100.0	49,5	527,5	0.0
1000	100.0	48,3	515,1	0.0
1500	100.0	48,0	510,9	0.0

4.5.4. Süre

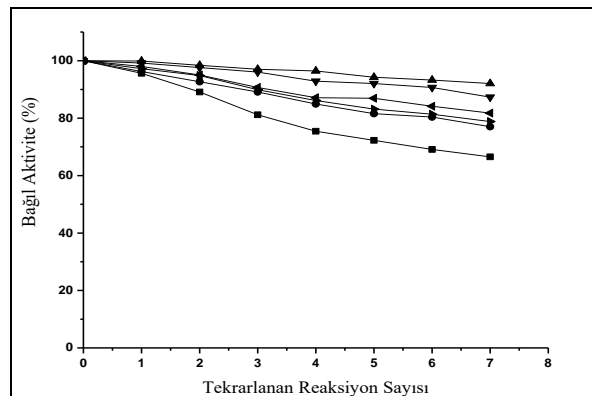
İmmobilizasyon, farklı sürelerde kalsiyum asetat tampon çözeltisinde gerçekleştirildi. Tablo 4.12’de görüldüğü gibi çalışma sonucunda elde edilen verilere göre 8 saatlik immobilizasyon süresi serbest enzimin aktivitesinin en yüksek olduğu süre olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.12: Sürenin enzim immobilizasyonuna etkisi.

Süre(saat)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzim aktivitesi (IU)	Süzüntüdeki protein (mg)
2	100.0	48,0	510,9	0.0
4	100.0	50,6	538,9	0.0
6	100.0	55,6	592,0	0.0
8	100.0	56,9	606,1	0.0
24	100.0	46,4	494,4	0.0

4.5.5. İmmobilize Enzim Aktivitesinin Glisin Kullanılarak Arttırılması

Optimum şartlar belirlendikten sonra reaksiyon ortamına 8. saat sonunda glisin ilave edilerek 24 saat immobilizasyon işlemine devam edildi. Çalışma sonucunda tekrarlı kullanımlar için 0.5 M, (0,35mg) glisinle muamele edilen immobilize enzimin en iyi olduğu bulundu.



Şekil 4.7: Glisinle muamelenin immobilize enzim aktivitesine etkisi.

• [—■—0.1 M Glisin, —●— 0.25 M Glisin, —▲— 0.5M Glisin , —▼— 1M Glisin, —◀— 2M Glisin, —▶—3M Glisin]

Tablo 4.13: Glisinle muamelenin immobilize enzim üzerine etkisi.

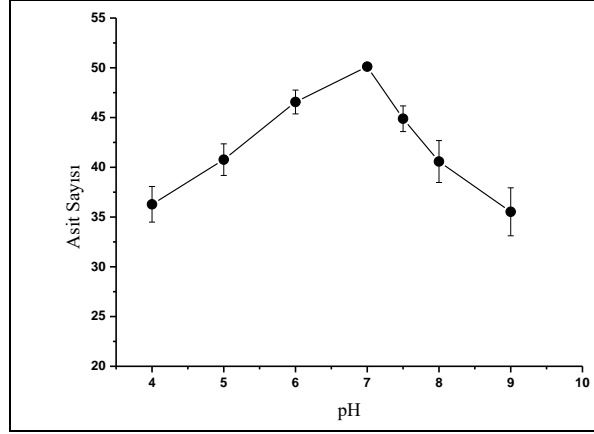
Batch	Asit Sayısı						
	İlavesiz	0.1MGly	0.25MGly	0.5MGly	1MGly	2MGly	3MGly
1	50.1	49.9	50.0	50.3	50.1	49.9	50.0
2	44.6	45.0	46.8	49.7	49.3	48.0	47.9
3	40.8	41.0	45.0	49.0	48.5	45.8	45.4
4	-	38.1	42.9	48.7	46.9	44.0	43.5
5	-	36.5	41.2	47.6	46.5	43.9	42.0
6	-	34.9	40.6	47.1	45.8	42.5	41.1

4.6. İmmobilize Enzimin Ayçiçek Yağı Hidroliz Reaksiyonu Optimizasyonu

İmmobilize enzim ile gerçekleştirilen hidroliz optimizasyon reaksiyonlarında pH, tampon çözelti konsantrasyonu, tampon çözelti miktarı, sıcaklık, organik çözücü ve tuz etkileri çalışıldı.

4.6.1. pH

Hidroliz reaksiyonu immobilize enzim ile farklı pH'lardaki tampon çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.8'de verilmiştir. Grafikten görüldüğü gibi en yüksek aktivite pH 7.0'da elde edilmiştir.



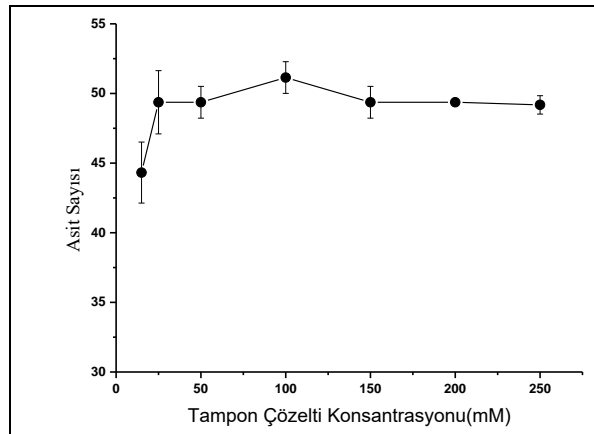
Şekil 4.8: İmmobilize enzimin hidrolitik aktivitesie pH'ın etkisi.

- [İmmobilize enzim (200 mg), farklı pH'larda [(4.0-6.0) $\text{Ca}(\text{Ac})_2$, (6.0-9.0) NaH_2PO_4] tampon çözeltilerinde (25 mM, 5 ml) ayçiçek yağı (30 g) ile su banyosu (140 rpm, 55°C) kullanılarak 30 dakika inkübe edildi.]

4.6.2. Tampon Çözelti Konsantrasyonu

Hidroliz reaksiyonu immobilize enzim ile farklı tampon çözelti konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.9'da verilmiştir.

Bu sonuçlara göre, hidroliz için 100 mM sodyum fosfat tampon çözeltisinin kullanılması gerekmektedir

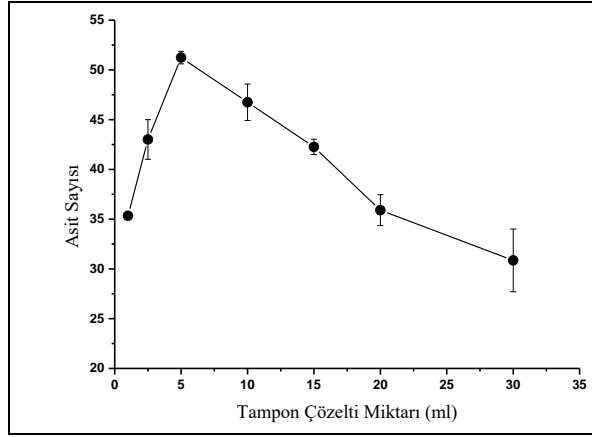


Şekil 4.9:Konsantrasyonun immobilize enzimin hidrolitik aktivitesine etkisi.

- [immobilize enzim (200 mg) farklı konsantrasyonlarda (15-250 mM) tampon çözeltilerde [5 ml, sodyum fosfat tampon çözeltisi pH 7.0] ayçiçek yağı (30 g) ile su banyosu (140 rpm, 55°C) kullanılarak 30 dakika inkübe edildi.]

4.6.3. Tampon Çözelti Miktarı

Hidroliz reaksiyonu immobilize enzim ile farklı tampon çözelti miktarları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



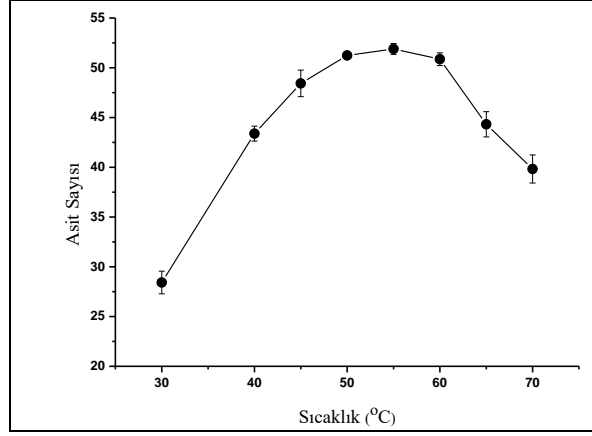
Şekil 4.10: Çözelti miktarının immobilize enzimin hidrolitik aktivitesine etkisi.

- [İmmobilize enzim (0.200 mg) farklı miktarlarda (1-30 ml) tampon çözeltilerde (100 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.0) ayçiçek yağı (30 g) ile su banyosu (140 rpm, 55°C) kullanılarak 30 dakika inkübe edildi.]

En iyi hidroliz reaksiyonu 5ml tampon çözelti kullanılan deneyde elde edilmiştir.

4.6.4. Sıcaklık

Hidroliz reaksiyonu immobilize enzim ile farklı sıcaklıklar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11: Sıcaklığın immobilize enzimin hidrolitik aktivitesine etkisi.

- [İmmobilize enzim (0.200 mg), 5ml tampon çözeltide (100 mM sodyum fosfat tamponu pH 7.0) ayçiçeği yağı (30 g) ile su banyosu (140 rpm) kullanılarak farklı sıcaklıklarda (30-70°C) 30 dakika inkübe edildi.]

Bu sonuçlara göre serbest enzim en iyi aktiviteyi 55°C'de göstermektedir

4.6.5. Hidroliz Reaksiyonuna Organik Çözücü Etkisi

İmmobilize enzimin optimum hidroliz şartlarında ortama farklı çözücüler ilave edilerek hidrolitik aktiviteye etkileri çalışıldı. Sonuçlar Tablo 4.14'de verilmiştir

Tablo 4.14: Organik çözücülerin immobilize enzim aktivitesine etkisi.

Çözücü	Asit Sayısı (ilavesiz: 51.9)				
	1%(v/v)	2.5%(v/v)	5%(v/v)	7.5%(v/v)	10%(v/v)
İzooktan	49.7±0.3	44.9±0.6	44.7±0.3	43.0±0.9	33.3±0.6
Hekzan	49.6±0.3	48.1±0.6	48.8±0.9	39.5±0.3	33.1±0.6
Heptan	48.1±0.6	46.7±0.4	43.4±0.6	39.1±0.9	32.9±0.9
Sikloheksan	51.2±0.2	51.3±0.3	50.8±0.5	46.8±0.3	31.8±0.6
DMSO	45.1±0.3	43.2±0.6	42.1±0.6	23.0±0.6	12.9±0.4
t-bütanol	48.6±0.4	44.5±0.9	43.2±0.1	30.5±0.3	21.7±0.3
t-amil alkol	51.9±0.4	54.0±0.3	55.3±0.3	53.1±0.3	43.9±0.4

En iyi sonuç, % 5.0 (v/v) oranında t-amil alkol ilavesiyle elde edilmiştir. Bu durumda hidroliz reaksiyonunda % 6.5 oranında bir artış gözlenmiştir.

4.6.6. Hidroliz Reaksiyonuna Tuz Etkisi

Değişik tuzların (NaCl, CaCl₂ ve MgCl₂) immobilize lipazın hidrolitik aktivitesine olan etkileri Tablo 4.15’de verilmiştir

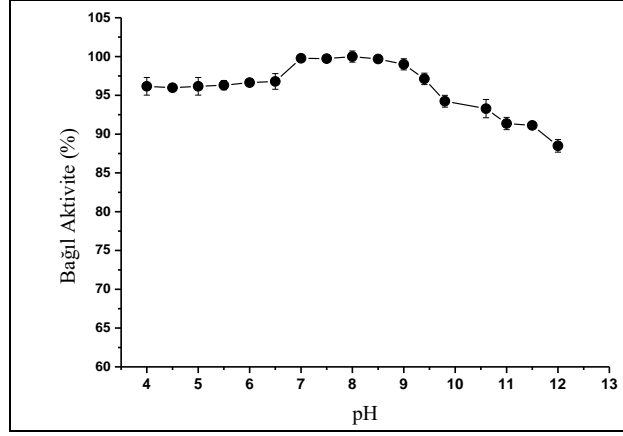
Tablo 4.15: Değişik tuzların immobilize enzimin aktivitesine etkisi.

Tuz konsantrasyonu (mM)	Asit Sayısı (ilavesiz:51.9)		
	NaCl	CaCl ₂	MgCl ₂
5	51.2±0.3	50.9±0.3	50.2±0.3
10	51.2±0.3	51.9±0.3	50.8±0.3
25	51.8±0.6	51.4±0.8	51.1±0.4
50	52.6±0.3	50.6±0.4	50.2±1.2
100	50.2±0.4	50.5±0.7	50.1±0.5
150	50.1±0.7	50.6±1.1	50.6±0.9
250	50.4±0.5	51.0±1.2	50.2±0.6

Reaksiyon sonucunda serbest enzimin hidrolitik aktivitesini yalnızca NaCl’ün (25 mM) % 1,4 oranında arttırdığı görülmüştür. Sonuçlara göre tuz ilavesinin hidroliz aktivitesi üzerine olumlu veya olumsuz etkileri olmamıştır.

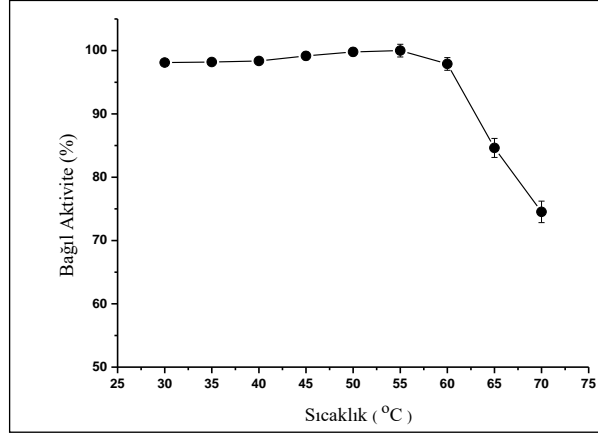
4.7. İmmobilize Enzimin pH ve sıcaklık kararlılığı

İmmobilize enzimin pH ve sıcaklık kararlılığını gösteren sonuçlar Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’de gösterilmiştir.



Şekil 4.12: İmmobilize enzim kararlılığına pH etkisi.

Görüldüğü gibi immobilize enzim pH 7.0-9.0 aralığında kararlıdır.



Şekil 4.13: İmmobilize enzim kararlılığına sıcaklık etkisi.

İmmobilize enzim 55°C'ye kadar kararlıdır. Bu sıcaklıktan sonra aktivitede azalmalar olmaktadır. 70°C'de başlangıç aktivitesinin % 25'ini kaybetmektedir.

4.8. Hidroliz Reaksiyonuna Sürenin Etkisi

Ayçiçek yağının immobilize enzim ve serbest enzim ile belirli sürelerde hidroliz aktivitesine bakıldı. Sonuçlar enzimin her iki formunda 120. dakikadan sonra aktivitede belirgin bir artış olmadığı Tablo 4.16'da da görülmektedir. Aktivitenin artış göstermemesinin nedeni ortamda oluşan yağ asidi ve gliserolün enzime etki ederek inhibe etmesinden kaynaklı olabilir. İmmobilize enzimin zamana karşı hidroliz aktivitesine bakıldığında aktivitenin serbest enzime göre daha iyi

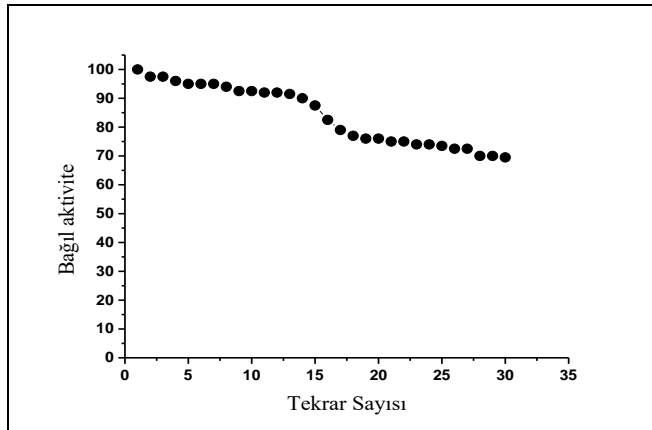
olmasının nedenlerinden biri matriksin yüzeyindeki apolar grupların yağ ile daha iyi etkileşime girerek reaksiyonu hızlandırmasından kaynaklı olabilir.

Tablo 4.16: Sürenin serbest ve immobilize enzimin aktivitesine etkisi.

Süre (dakika)	Asit sayısı (Serbest enzim)	Asit sayısı (İmmobilize enzim)
10	35.9±0.5	36.7±0.9
20	42.0±0.7	42.5±0.3
30	51.3±0.3	51.9±0.3
40	56.5±0.5	56.8±0.8
60	58.2±1.1	59.9±0.4
120	60.1±0.2	63.8±0.5
180	61.8±0.5	65.7±0.7
240	61.4±0.1	66.9±0.5

4.9. Tekrar Kullanım Deneyleri

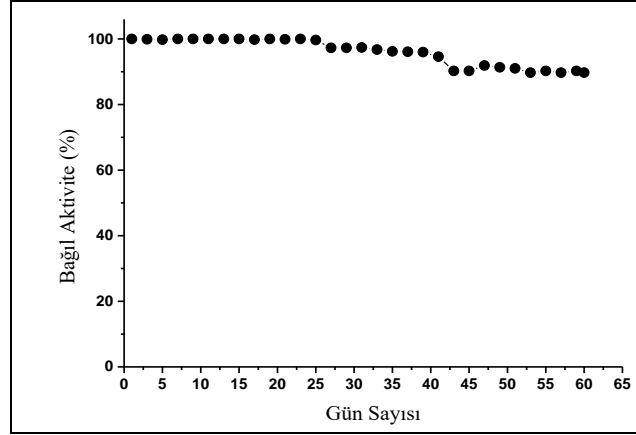
Optimum hidroliz reaksiyon şartları belirlenen immobilize enzimin tekrar kullanım deneyleri 30 kez gerçekleştirildi. Deneyler sonunda enzim aktivitesinin % 30,5 oranında düştüğü gözlemlendi. Sonuçlar Şekil 4.14’de gösterilmiştir. Bu düşüşün nedeni, enzim yapısında olabilecek değişikliklere ilave olarak immobilize enzimin her kullanımdan sonra gerçekleştirilen yıkama işlemlerinde yaşanan kayıplardır.



Şekil 4.14: İmmobilize enzimin tekrarlı kullanımları.

4.10. İmmobilize Enzimin Raf Ömrünün Belirlenmesi

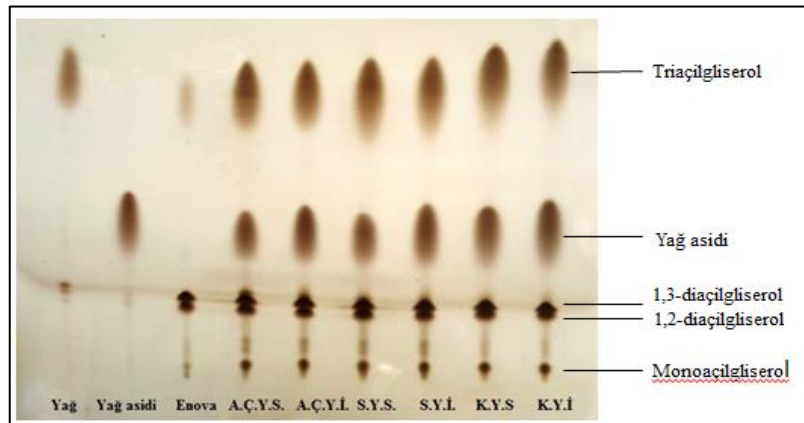
İmmobilize enzimin raf ömrünün belirlenmesi için her gün olmak üzere toplamda 60 gün hidrolitik aktivite tayini gerçekleştirildi. Bu süre sonunda enzim aktivitesinin % 10,3 oranında düştüğü gözlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.15’de gösterilmiştir. Enzim kullanım süresi boyunca buzdolabında (+4°C) saklandı.



Şekil 4.15: İmmobilize lipazın depolama kararlılığı.

4.11. TLC Analizi

Deney çalışmalarında kullanılan değişik yağların hidroliz ürünleri TLC yöntemiyle Şekil 4.16’daki gibi gerçekleştirilmiştir.



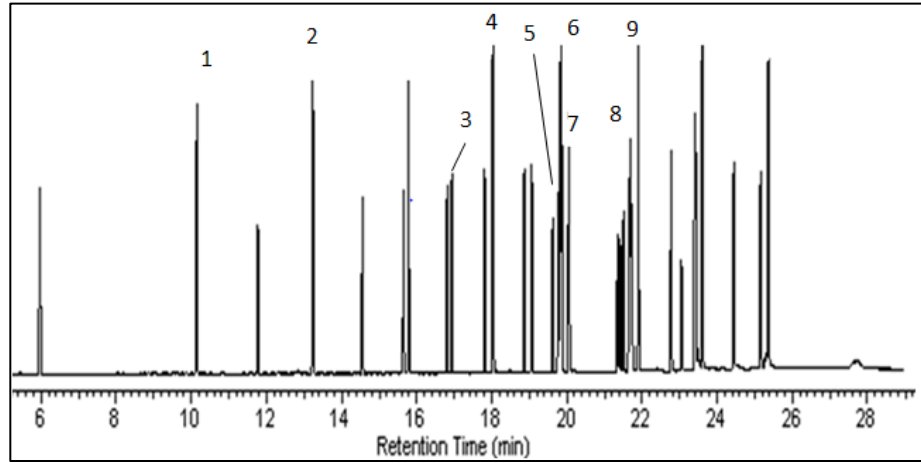
Şekil 4.16: Ayçiçek, Soya ve Kanola yağlarının hidroliz ürünlerinin TLC analizi.

- [A.Ç.Y.S: Ayçiçek yağı serbest lipaz, A.Ç.Y.İ: Ayçiçek yağı immobilize lipaz, S.Y.S: Soyayağı serbest lipaz, SYİ: Soyayağı immobilize lipaz, K.Y.S: Kanolayağı serbest lipaz, K.Y.İ: Kanolayağı immobilize lipaz]

4.12. GC-MS Analizi

Serbest ve immobilize enzim ile gerçekleştirilen ayçiçek yağının hidroliz reaksiyonu sonucunda elde edilen yağ asitleri GC-MS kromatografi metodu ile belirlenmiştir.

- Yağ asidi karışımı için GC-MS analizi; örnekleri değerlendirebilmek amacıyla yağ asidi karışımı standard olarak kullanılmıştır.

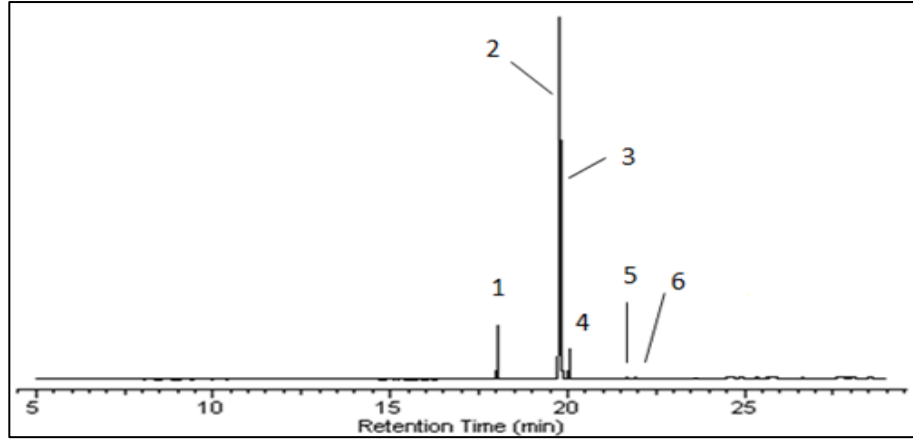


Şekil 4.17: Yağ asidi karışımı için GC analizi sonucu.

- 1 numaralı pikin(Ma:186) W9N11 ve NIST11 kütüphanelerine göre % 98 kaprik aside ait olabileceği düşünülmektedir.
- 2 numaralı pikin(Ma:214) W9N11 ve NIST11 kütüphanelerine göre % 98 laurik aside ait olabileceği düşünülmektedir.
- 3 numaralı pikin(Ma:270) W9N11 ve NIST11 kütüphanelerine göre % 97 palmitik aside ait olabileceği düşünülmektedir
- 4 numaralı pikin(Ma:294) W9N11 ve NIST11 kütüphanelerine göre % 96 linoleik aside ait olabileceği düşünülmektedir
- 5 numaralı pikin(Ma:296) W9N11 ve NIST11 kütüphanelerine göre % 97 oleik aside ait olabileceği düşünülmektedir.

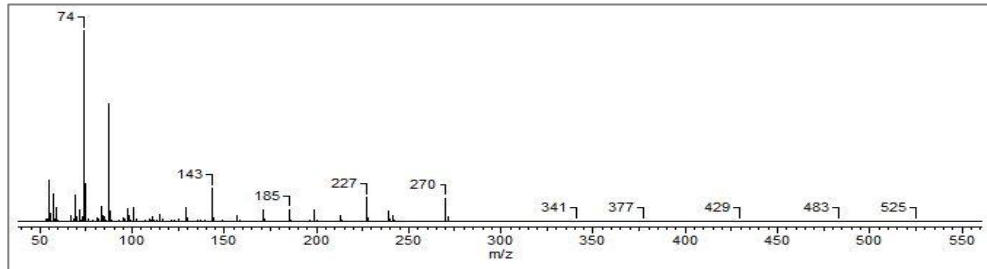
- 6 numaralı pikin(Ma:298) W9N11 ve NIST11 kütüphanelerine göre % 96 stearik aside ait olabileceği düşünülmektedir
- 7 numaralı pikin(Ma:324) W9N11 ve NIST11 kütüphanelerine göre % 95 gondoik aside ait olabileceği düşünülmektedir.
- 8 numaralı pikin(Ma:326) W9N11 ve NIST11 kütüphanelerine göre % 97 araşidik aside ait olabileceği düşünülmektedir.
- 9 numaralı pikin(Ma:324) W9N11 ve NIST11 kütüphanelerine göre % 95 behenik aside ait olabileceği düşünülmektedir.

• Ayçiçek yağının GC-MS analizi; deneylerde kullanılan ayçiçek yağının ihtiva ettiği yağ asitleri belirlenebilmesi için analiz edilmiştir.



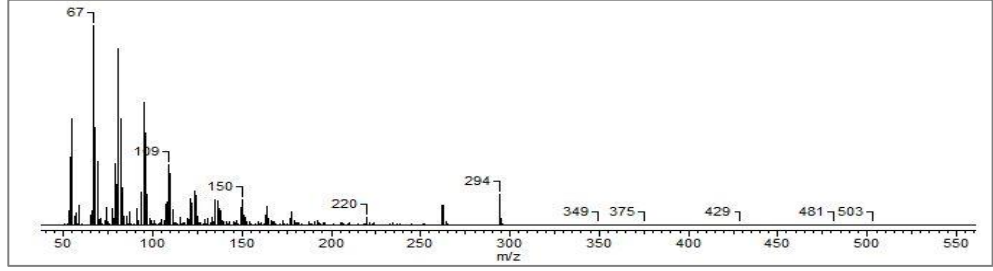
Şekil 4.18: Ayçiçek yağı için GC analizi sonucu.

- 1. pikin(Mw:270) W9N11 ve NIST11 kütüphaneleri ve standardla karşılaştırıldığında palmitik aside ait olabileceği düşünülmektedir.



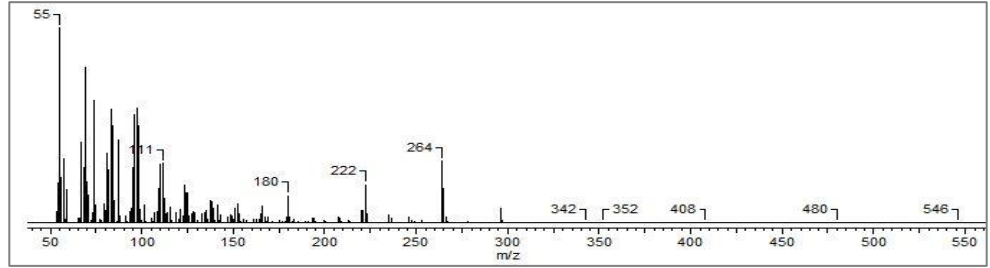
Şekil 4.19: Ayçiçek yağına ait 1 numaralı pikin kütle spektrumu.

- 2. pikin(Ma:294) W9N11 ve NIST11 kütüphaneleri ve standardla karşılaştırıldığında linoleik aside ait olduğu düşünülmektedir.



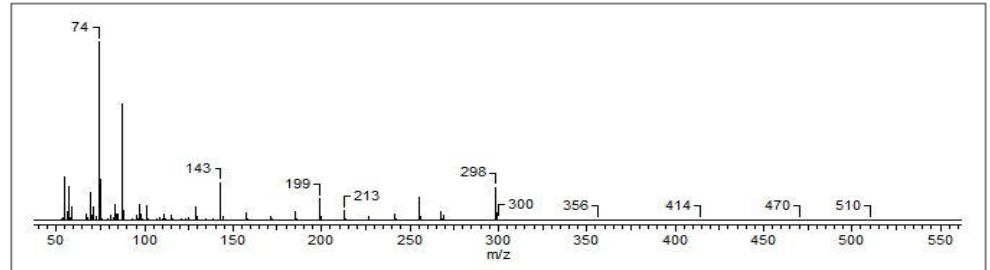
Şekil 4.20: Ayçiçek yağına ait 2 numaralı pikin kütle spektrumu.

- 3. pikin(Ma:296) W9N11 ve NIST11 kütüphaneleri ve standardla karşılaştırıldığında oleik aside ait olduğu düşünülmektedir.



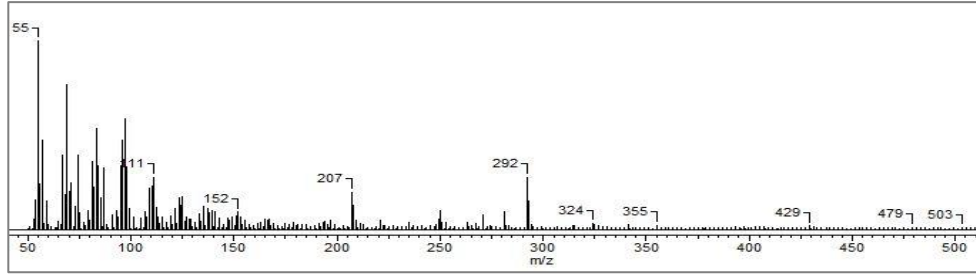
Şekil 4.21: Ayçiçek yağına ait 3 numaralı pikin kütle spektrumu.

- 4. pikin(Ma:298) W9N11 ve NIST11 kütüphaneleri ve standardla karşılaştırıldığında stearik aside ait olduğu düşünülmektedir.



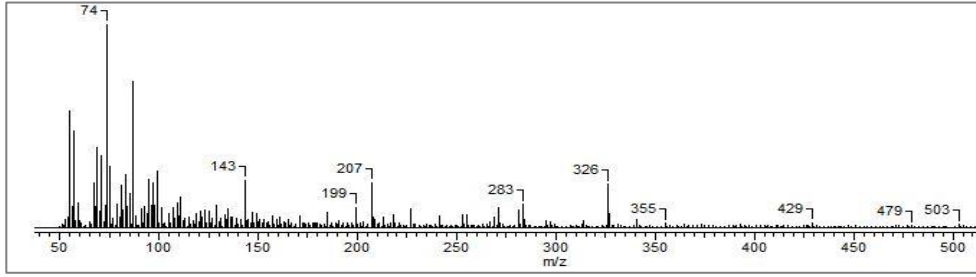
Şekil 4.22: Ayçiçek yağına ait 4 numaralı pikin kütle spektrumu.

- 5. pikin(Ma:324) W9N11 ve NIST11 kütüphaneleri ve standardla karşılaştırıldığında gondoik aside ait olduğu düşünülmektedir.



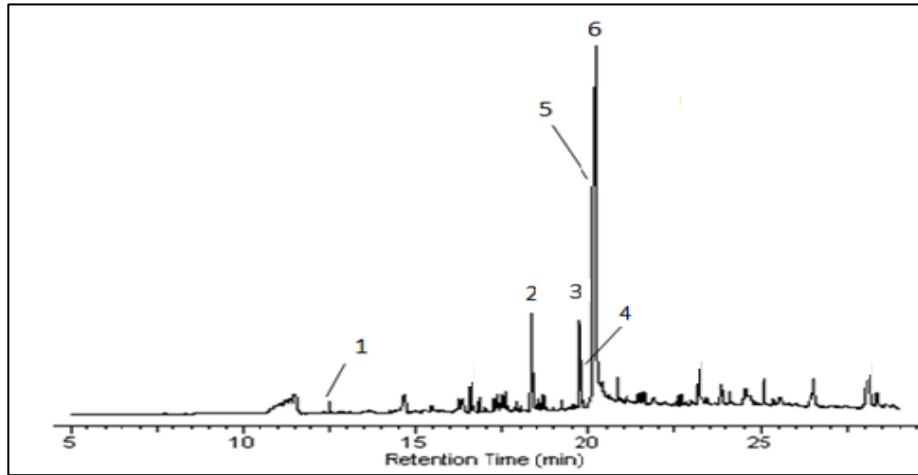
Şekil 4.23: Ayçiçek yağına ait 5 numaralı pikin kütle spektrumu.

- 6. pikin(Ma:326) W9N11 ve NIST11 kütüphaneleri ve standartla karşılaştırıldığında araşidik aside ait olduğu düşünülmektedir.



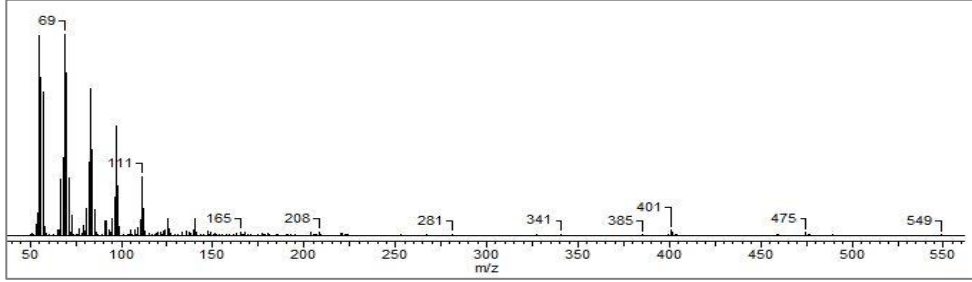
Şekil 4.24: Ayçiçek yağına ait 6 numaralı pikin kütle spektrumu.

• Serbest enzim için GC-MS analizi: Serbest enzim kullanılarak gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu sonucunda elde edilen yağ asitlerinin belirlenebilmesi için analiz gerçekleştirilmiştir.



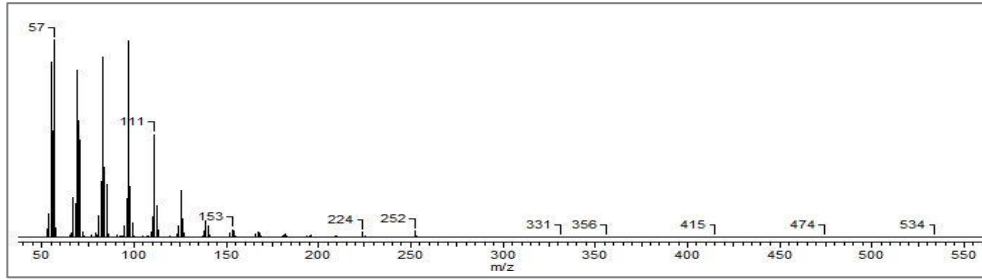
Şekil 4.25: Serbest enzim için GC analizi sonucu.

- 1. pikin(Ma:186) W9N11 ve NIST11 kütüphaneleri ve standardla karşılaştırıldığında kaprik aside ait olduğu düşünülmektedir.



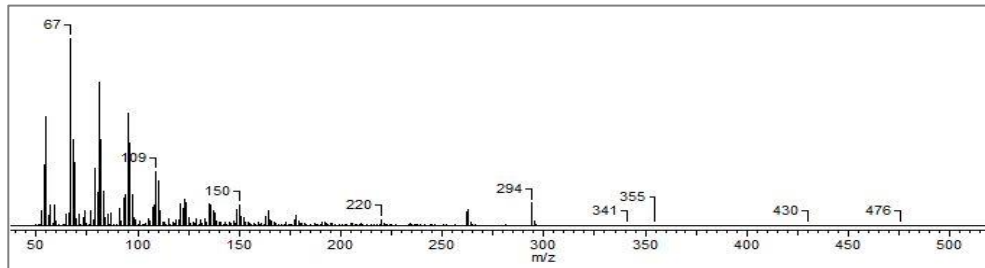
Şekil 4.26: Serbest enzime ait 1 numaralı pikin kütle spektrumu.

- 2. pikin(Ma:256) W9N11 ve NIST11 kütüphaneleri ve standardla karşılaştırıldığında palmitik aside ait olduğu düşünülmektedir.



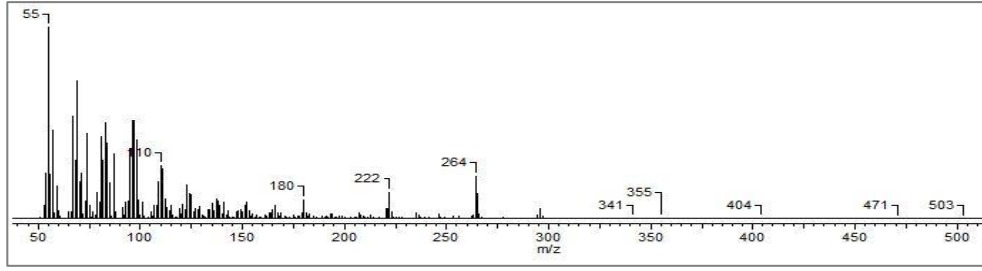
Şekil 4.27: Serbest enzime ait 2 numaralı pikin kütle spektrumu.

- 3. pikin(Ma:294) W9N11 ve NIST11 kütüphaneleri ve standardla karşılaştırıldığında pikin linoleik asit metil esterine ait olduğu düşünülmektedir.



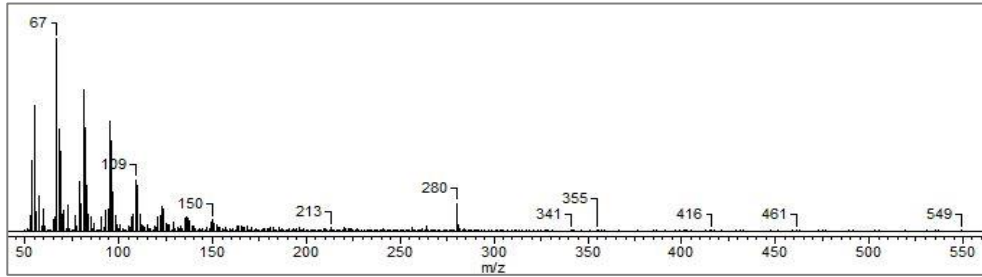
Şekil 4.28: Serbest enzime ait 3 numaralı pikin kütle spektrumu.

- 4. pikin(Ma:296) W9N11 ve NIST11 kütüphaneleri ve standardla karşılaştırıldığında oleik asit metil esterine ait olduğu düşünülmektedir.



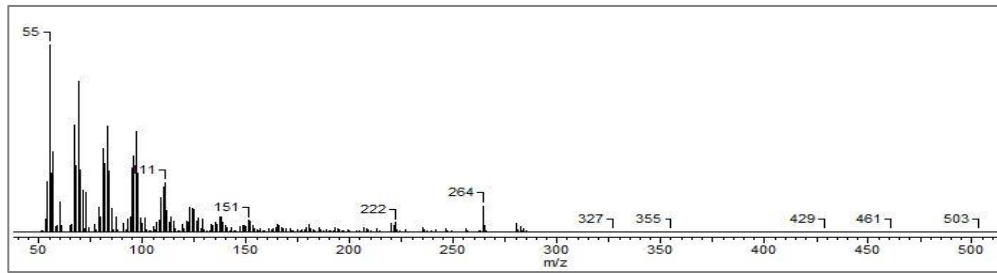
Şekil 4.29: Serbest enzime ait 4 numaralı pikin kütle spektrumu.

- 5. pikin(Ma:280) W9N11 ve NIST11 kütüphaneleri ve standardla karşılaştırıldığında linoleik aside ait olduğu düşünülmektedir.



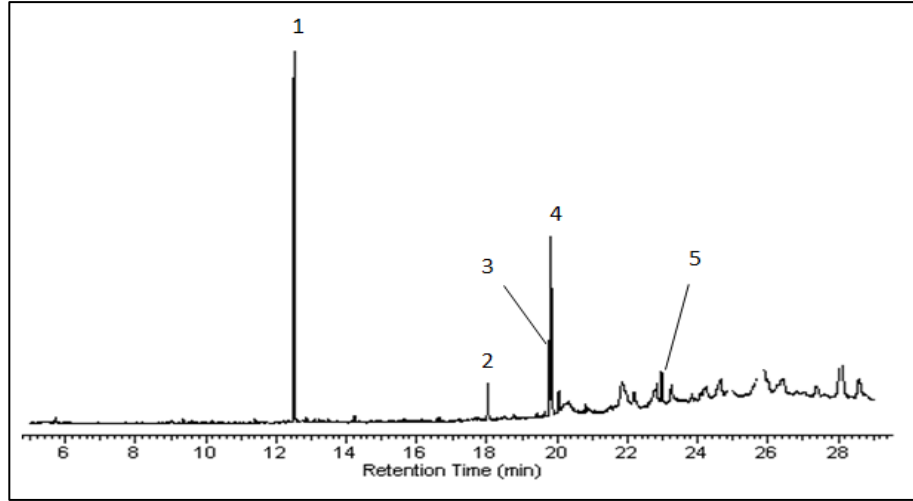
Şekil 4.30: Serbest enzime ait 5 numaralı pikin kütle spektrumu.

- 6. pikin(Ma:282) W9N11 ve NIST11 kütüphaneleri ve standardla karşılaştırıldığında oleik aside ait olduğu düşünülmektedir.



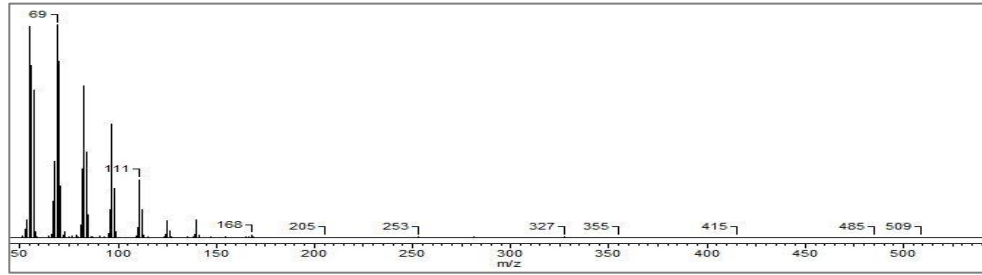
Şekil 4.31: Serbest enzime ait 6 numaralı pikin kütle spektrumu.

• İmmobilize enzim için GC-MS sonucu: İmmobilize enzim kullanılarak gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu sonucunda elde edilen yağ asitlerinin belirlenebilmesi için analiz gerçekleştirilmiştir.



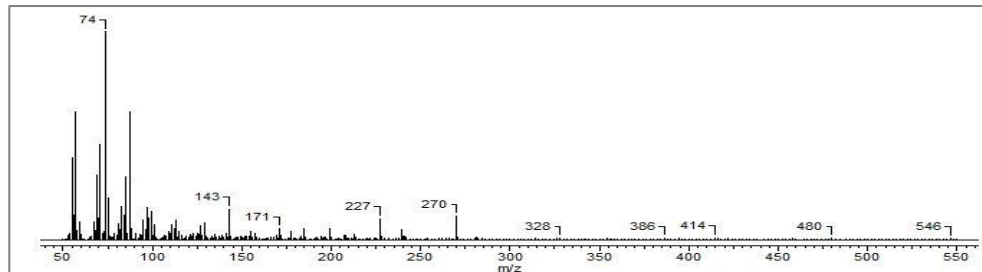
Şekil 4.32: İmmobilize enzim için GC analizi sonucu.

- 1. pikin(Ma:186) W9N11 ve NIST11 kütüphaneleri ve standartla karşılaştırıldığında kaprik aside ait olduğu düşünülmektedir.



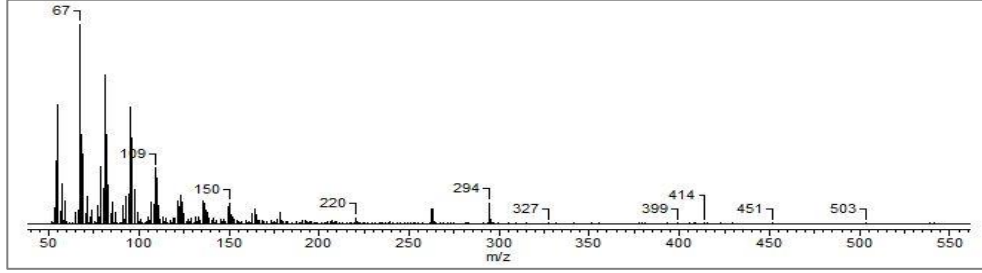
Şekil 4.33: İmmobilize enzime ait 1 numaralı pikin kütle spektrumu.

- 2. pikin(Ma:270) W9N11 ve NIST11 kütüphaneleri ve standartla karşılaştırıldığında palmitik aside ait olduğu düşünülmektedir.



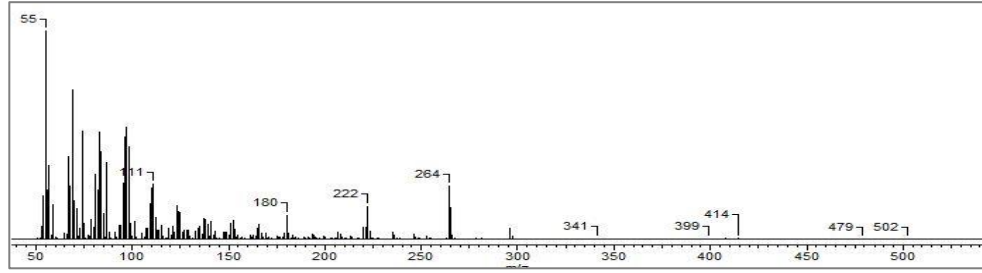
Şekil 4.34: İmmobilize enzime ait 2 numaralı pikin kütle spektrumu.

- 3. pikin(Ma:294) W9N11 ve NIST11 kütüphaneleri ve standartla karşılaştırıldığında pikin linoleik aside ait olduğu düşünülmektedir.



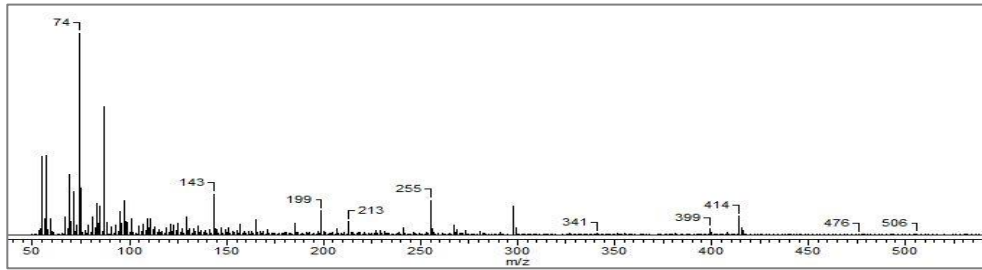
Şekil 4.35: İmmobilize enzime ait 3 numaralı pikin kütle spektrumu.

- 4. pikin(Ma:296) W9N11 ve NIST11 kütüphaneleri ve standartla karşılaştırıldığında pikin oleik aside ait olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.36: İmmobilize enzime ait 4 numaralı pikin kütle spektrumu.

- 5. pikin(Ma:296) W9N11 ve NIST11 kütüphaneleri ve standartla karşılaştırıldığında pikin stearik aside ait olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.37: İmmobilize enzime ait 5 numaralı pikin kütle spektrumu.

Uygulanan metoda göre GC-MS analizi sonucunda ayçiçek yağı içerisinde bulunan yağ asitleri palmitik asit, stearik asit, linoleik asit, arđidik, gondoik, oleik asit olduğu düşünülmektedir. Serbest ve immobilize enzim ile gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonları sonucunda gerçekleştirilen GC-MS analiz sonuçlarına göre elde edilen yağ asitleri kaprik asit, palmitik asit, linoleik asit, oleik asit ve stearik asit olduğu öngörülmektedir.

5. SONUÇLAR ve YORUMLAR

Bu tez çalışmasında *Thermomyces lanuginosa* lipaz immobead 150-A matriksi üzerine kovalent olarak başarılı bir şekilde immobilize edildi. Optimizasyon çalışmaları sonucunda, aktivite ve immobilizasyon verimleri % 100 olarak elde edildi. 1 gr immobead 150-A matriksi üzerine 27.5 mg protein kovalent olarak bağlanabilmektedir. Literatürde bu tez çalışmasında kullanılan enzim ve matriksin (Immobead 150 A) kullanıldığı çok az çalışma bulunmaktadır. İmmobilizasyon, enzimin optimum pH ve sıcaklıklarını değiştirmiştir. Serbest enzim pH 6.0-8.0 arasında kararlı iken sıcaklık kararlılığı 50°C olarak bulundu. İmmobilize enzim pH (7.0-9.0) aralığında ve 55°C ye kadar kararlıdır. Akköse tarafından yapılan tez çalışmasında *TLL* lipaz % 100 immobilizasyon ve % 86.5 aktivite verimi ile 16.5 mg protein/g-matriks olacak şekilde STY-DVB-PGA kopolimerine kovalent olarak immobilize edilmiş ve ayçiçek yağının hidrolizinde kullanılmıştır [51]. Nayeli ve arkadaşları perlit üzerine kovalent olarak immobilize edilen *Thermomyces lanuginosa* lipaz'ın (TL-IM) termal kararlılığını 50-80°C, pH kararlılığını ise 7-10 arasında bulmuşlardır [52]. Dizge ve arkadaşları, *TLL*'yi STY-DVB ve STY-DVB-PGA kopolimerine immobilize etmişlerdir. Çalışmalarında STY-DVB kopolimerine adsorpsiyon yöntemiyle (% 63.3 immobilizasyon verimi) gram matriks başına 9.5 mg protein bağlarken, STY-DVB-PGA kopolimerine kovalent olarak (% 76.0 immobilizasyon verimi) gram matriks başına 11.4 mg protein bağlamışlardır [53]. Carla Roberta ve arkadaşları *Thermomyces Lanuginosa lipazı* immobead 150-A üzerine değişik metodlarla (kovalent, çapraz bağlama ve adsorpsiyon) yüksek immobilizasyon (% 97-100) ve aktivite verimleriyle (% 90-100) 1 g matriks başına 5 mg proteini immobilize etmişlerdir [54]. Bu sonuçlardan görüldüğü gibi g-matriks başına protein bağlanması açısından bulduğumuz sonuç (27.5 mg protein/g-matriks) en iyisidir.

Bu çalışmada hidroliz optimizasyonu serbest ve immobilize lipaz için ayrı ayrı çalışıldı. Optimizasyon çalışmalarında, tampon çözelti pH'ı (4-9), tampon çözelti konsantrasyonu (15-250 mM), tampon çözelti miktarı (1-30 ml), sıcaklık (30-70°C), tuz (CaCl₂, MgCl₂ ve NaCl) ve organik çözücü [heptan, hekzan, izooktan, siklohekzan, DMSO, t- bütanol ve t- amil alkol (% 1-10 v/v)] etkileri çalışıldı. Ayçiçek, soya ve kanola yağlarının serbest lipaz ile yapılan hidroliz deneylerinde, sonuçların birbirine yakın olması, diğer yağlara göre kolay bulunabilirliğinden dolayı

optimizasyon deneylerinde sadece ayçiçek yağı kullanıldı. Ayçiçek yağı ile gerçekleştirilen hidroliz optimizasyonu sonucunda serbest enzimin optimum pH sı 6.0 ve sıcaklığı 50°C iken immobilize enzimin pH ve sıcaklığı sırası ile 7.0 ve 55°C olarak bulunmuştur. Hidroliz reaksiyonu serbest enzim için kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, 5ml) ile gerçekleştirilirken immobilize enzim için sodyum fosfat tampon çözeltisi (100 mM, 5ml) ile gerçekleştirilmiştir. Akköse ayçiçek yağı ile gerçekleştirdiği hidroliz optimizasyonu sonucunda serbest enzimin optimum pH ve sıcaklığı 6.0 ve 50°C iken immobilize edildikten sonra enzimin optimum pH sı aynı kalmış ancak sıcaklık 60°C olarak belirlemiştir. Hidroliz reaksiyonunda serbest ve immobilize lipaz için kalsiyum asetat (25mM, 5ml) tampon çözeltisini kullanmıştır [51].

Lipazla gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonlarında ortama ilave edilen organik çözücü ve tuzlar hidroliz reaksiyonunu etkilemektedir. Raspe ve arkadaşları *Lipozyme RMIM* ile macuba kerneil yağı ile yaptıkları hidroliz çalışmasında tampon ortamına 1:1 oranında n-hekzan, n-heptan, izopropanol ve t-bütanol ilave ederek etkilerini incelemişler, n-hekzan(% 7) ve n-heptanın (% 5) aktiviteyi arttırdığını gözlemlemişlerdir [55]. S.R.Kulkarni ve A. B. Pandit *Aspergillus oryzae lipaz* ile kastor yağının hidrolizinde tampon ortamına 1:4 (solvent:tampon) olacak şekilde izooktan, hekzan, heptan ve dietil eteri ekleyerek etkisini incelemişler ve her bir solventin ilavesi ile aktivitenin % 16 dan % 42 ye çıktığını belirlemişlerdir [3].

Bu tez çalışmasında serbest ve immobilize enzim ile gerçekleştirilen hidroliz ortamına organik çözücü [heptan, hekzan, izooktan, siklohekzan, DMSO, t- bütanol ve t- amil alkol (% 1-10 v/v)] ilave edilerek aktiviteye etkisi incelenmiştir. % 5 (v/v) t-amil alkol ilavesiyle yapılan hidroliz reaksiyonlarında serbest enzim için % 8, immobilize enzim için ise % 6.5 oranında bir artış gözlenmiştir. Tekrarlı kullanımlarda t-amil alkol, immovead 150 A yapısında bozulmalara sebep olmakta ve immobilize enzimin aktivitesi düşürmektedir. Bu nedenle hidroliz deneylerinde bu alkol kullanılmamıştır.

Hidroliz reaksiyonlarında tuz etkileri çalışılmıştır. D.T.Raspe *Lipozyme RMIM* ile macauba çekirdeği yağının (palm yağı türevi) hidrolizinde tampon çözeltisine son konsantrasyon 100 mM olacak şekilde CaCl₂, NaCl, MgCl₂ ilave etmişler ve ilave edilmeyen ortamla kıyasladıklarında sadece NaCl'nin aktiviteyi çok az miktarda(% 0.01) arttırdığını gözlemlemişlerdir [55]. L.Freitas ve arkadaşları *Candida rugosa* ile soya yağının % 70 verim ile gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonunda ortama 20mM

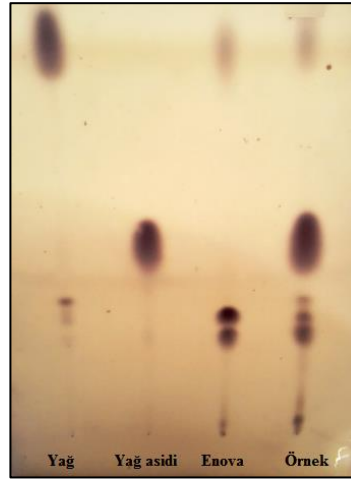
NaCl, NH₄Cl, KCl, AgCl, CaCl₂, PbCl₂, AlCl₃ ilave ederek etkisini incelemişler ve en iyi sonucu aktiviteyi % 23 den % 35'e çıkararak NaCl ile elde etmişlerdir [37]. Akköse polisitirendivinilbenzen-poligluteralehit polimeri üzerine immobilize edilen *TLL* kullanarak ayçiçek yağı ile gerçekleştirdiği hidroliz reaksiyonunda 5mM NaCl ilavesinin aktiviteyi % 2 arttırdığını gözlemlemiştir [51]. Çalışmamızda serbest ve immobilize enzim ile gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonlarına tuz etkisi incelendiğinde her iki enzim formu için yalnızca NaCl'ün (25 mM) hidroliz reaksiyonunu % 1,4 oranında arttırdığı görülmüştür. Düşük konsantrasyonlarda bu tuzun hidroliz reaksiyonuna Akkösenin elde ettiği gibi bir etkisi olmamıştır. Bu sonuç immobilizasyon matriks yapısının farklılığından kaynaklanabilir. Deneylerde kullanılan diğer tuzların (CaCl₂, MgCl₂) hidroliz aktivitesi üzerine olumlu veya olumsuz etkileri olmamıştır.

Rooney ve Weatherley hidroliz reaksiyonlarında zamanla oluşan gliserolden dolayı reaksiyonunun yavaşlayıp sabitlendiğini, gliserolü ortamdan uzaklaştırdıklarında reaksiyonun devam ettiğini gözlemlemiştir [56]. Çalışmamızda hidroliz reaksiyonlarında 40. dakikadan sonra % 25 civarında yağ hidrolizi gerçekleşmekte ve aktivitede belirgin bir artış olmamaktadır. Bunun nedeni ortamda oluşan yağ asidi ve gliserolün enzime etki ederek inhibe etmesinden dolayı olabilir. Çünkü aktivitesi immobilize enzimin aktivitesinin 24 katı olan serbest enzimle (25567,2 IU) yapılan reaksiyonunda % 74 civarında bir yağ hidrolizi gerçekleştirilmiştir. Tekrarlı kullanımlarda matriks üzerinde kalan epoksi gruplarından dolayı aktivite kayıpları gözlemlendi. İlk üç kullanımda % 10 luk aktivite kaybı gerçekleşti. Başlangıç reaksiyonlarında görülen bu aktivite kayıpları enzimin desorbe olması veya matriks üzerinde reaksiyona girmeden kalan reaktif gruplar sebebiyle olabilir. Parlak, dekstransükrazın immobilizasyonunda serbest epoksi gruplarını uzaklaştırmak için ortama BSA (750 ng) ilave etmiş ve enzimin aktivitesinin azalmasını önlediğini görmüştür. BSA kullanılmadığında 5 tekrar sonunda enzimin aktivitesinde yaklaşık % 28 kayıp gözlemlemiştir [57]. Çalışmamızda matriks üzerinde reaksiyona girmeden kalan epoksi gruplarının giderilebilmesi için immobilize enzim glisinle (0.5 M) muamele edildi. Fazla miktarda glisin (2.0 M) kullanıldığında enzim % 5 oranında bir aktivite kaybına uğramaktadır. Immobilize enzimin 30 kez olan tekrarlı kullanım deneyleri sonunda % 30.5 oranında enzim aktivitesinde kayıp gözlenmiştir. Aktivitede meydana gelen düşüşün nedenleri enzimin üç boyutlu yapısında meydana gelen değişiklikler,

yıkama sonrasında yaşanan matriks yapısındaki değişim ve süzme kayıplarıdır. Eğer süzme sırasında kayıp yaşanmamış olsaydı aktivite kaybı % 4.0 olacaktı. Depolama kararlılığı 60 gün hidrolitik aktivite tayini ile gerçekleştirildi. Bu süre sonunda enzim aktivitesinde % 10,3 oranında düşüş meydana gelmiştir. Depolama esnasında oluşan aktivite kayıpları immobilize enzimin serbest enzimle birlikte depolanmasıyla büyük ölçüde önlenebilir. Japonyada yapılan bir çalışmada chitosan üzerine immobilize edilen xanthine oxidase, serbest enzimle birlikte depolandığında 5 ay sonra bile aktivitesinin % 70 ini korumaktadır. Bu immobilize enzim tampon çözelti içinde depolandığında ise bir ayda aktivitesini tamamen kaybetmektedir (JP0500084, 1993). Akköse TLL ile ayçiçek yağının hidrolizinde 20 kez gerçekleştirilen tekrar kullanım deneyleri sonucunda immobilize enzim aktivitesinin % 38' ini, 30 günlük saklama süresi sonunda ise aktivitesinin % 8'ini kaybettiğini belirtmiştir [51]. Rodrigues ve Ayub Lewatit VP OC 1600 üzerine kovalent olarak immobilize edilen *Thermomyces Lanuginosa* Lipaz ile yapılan soya yağının hidrolizinde immobilize enzimi kullanım aralarında hekzan ile yıkadıklarında 10 kullanım sonrasında enzimin aktivitesinin yaklaşık % 98'ini koruduğunu gözlemlemişlerdir [58]. Ting ve arkadaşları tarafından *Candida rugosa* lipazla yapılan soya yağının hidroliz deneylerinde immobilize enzimin 10 kere yapılan tekrarlı kullanımında enzim aktivitesinde büyük kayıplar(% 40) olmuştur [59]. Lee ve arkadaşları lipazı silika jel üzerine çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edilen *Rhizopus oryzae* lipazı 20 kez gerçekleştirilen zeytin yağının hidrolizinde tekrar deneylerinde enzim aktivitesinde % 20'lik bir azalma olmuştur [60]. Yiğitoğlu ve Temoçin PET-g-Aam üzerine immobilize ettikleri *Candida rugosa* lipazı ile 10 kere gerçekleştirilen tekrarlı hidroliz reaksiyon deneylerinde aktivitede % 74lük bir azalma olmuştur. Bu immobilize enzim 60 günlük bekleme sonunda ise aktivitesinin % 10'unu kaybetmektedir [61].

Bu tez çalışmasında *Thermomyces Lanuginosa* lipazı kullanarak gerçekleştirilen yağ hidroliz reaksiyonu sonucu yağın % 25 i hidroliz olmaktadır. Akköse tarafından aynı enzimle yapılan çalışmada da benzer sonuç elde edilmiştir [51]. Literatürde bu enzim ile gerçekleştirilen bir çalışmada R.C Rodrigues ve M.A.Z. Ayub *Thermomyces Lanuginosa* lipaz ve *Rhizomucor miehei* lipazların immobilize formlarının [(TLL, Lipolase 100L, Lewatit VP OC 1600 üzerine immobilize edilmiş),(RML, Lipozyme RM-IM, rezinler üzerine immobilize edilmiş)]ayrı ayrı ve karışımını(% 65 TLL + % 35 RML) kullanarak soya yağı ile hidroliz reaksiyonuna etkisini karşılaştırmışlardır. Hidroliz reaksiyonunda, yalnızca

TLL kullanıldığında % 76, yalnızca RML kullanıldığında yaklaşık % 36, İki enzimin karışımı ile gerçekleştiren hidroliz reaksiyonunda ise % 95 verim elde etmişlerdir [58]. D.T.Raspe ve arkadaşları *Lipozyme RMIM*, *Lipozyme TLIM* ve *Lipozyme 435* ile Macauba çekirdeği yağının (palm yağı türevi) hidrolizini karşılaştırmış en iyi verim (% 58) *Lipozyme RMIM* ile elde edilmiştir. *Lipozyme RMIM* ile yaptıkları hidroliz çalışmasında % 80 yağ asidi oluşumu gözlemlemişlerdir [55]. S.R.Kulkarni ve A. B. Pandit *Aspergillus oryzae* lipaz ile kastor yağının hidrolizinde izooktan, hekzan, heptan ve dietil eter ilavesiyle % 90'ın üzerinde hidroliz verimi elde etmişlerdir [3]. Yağ hidroliz deneylerinde elde edilen bu yüksek verimlerin sebebi yüksek aktivitesi olan immobilize lipazların kullanılmasıdır. Bizim çalışmamızda aktivitesi 1065,3 IU olan immobilize enzimle % 25'lik hidroliz verimi elde edilirken yüksek aktivitesi (25567,2 IU) olan serbest enzimle % 74'lük hidroliz verimi elde edildi. TLC analizi sonucu Şekil 5.1'de gösterilmiştir.



Şekil 5.1: Uzun süreli hidroliz reaksiyonu.

Bu tez çalışmasında magnetik alanda (-) aktifleştirilen tampon çözeltide serbest enzim ile gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonlarında % 8 civarında artış elde edilmiştir. Süreye bağlı olarak aktivite artışları olmuş ve 10 dakika süren magnetik alan muamelesiyle en yüksek hidroliz aktivitesi elde edilmiştir. 10 dakikalık South Pole muamelesinde ise % 2.4 lik artış elde edilmiştir. Magnetik alanda oda sıcaklığında aktif hale getirilen tampon çözeltinin bu özelliğini oda sıcaklığında 2 gün koruduğu bulundu. Bu özelliğin yüksek sıcaklıklarda (50°C ve üzeri) kaybolduğu belirlendi. Magnetize edilen su tıp, inşaat, veterinerlik ve ziraat gibi

değişik alanlarda başarıyla kullanılmaktadır [62], [63]. Bu konuda değişik firmalar tarafından üretilen ürünler bulunmaktadır. Değişik bitki ve sebzelerin sulanmasında magnetik su kullanıldığında verim artışları olmaktadır. Lin ve Yotvat (1990) içme suyunu magnetik alana tabii tutmuş ve bunu hayvanlara içirmişlerdir. Çalışma sonunda kaz ve hindilerin daha iyi yumurtladığı, koyunun sütü, yünü ve etinde artış meydana geldiğini rapor etmişlerdir [64]. JIA Saoyi ve arkadaşları magnetik alanın α -amilaz üzerine etilerini araştırmışlardır. Serbest haldeki α -amilaz enzimi 0.15T, 0.30T, 0.45T statik magnetik alana tabii tutmuşlar enzim aktivitesi kontrole göre % 27, % 34.1, % 37.8 artış göstermiştir. Bunun yanı sıra Km ve Vmax değerleride artış göstermiş ve enzimin sekonder yapısında değişimler gözlemlemişlerdir [65]. W. Xie ve N. Ma TLL'yi magnetik nanopartiküller (magnetik Fe_3O_4 nanopartikül) üzerine immobilize ederek soya yağının enzimatik transesterifikasyonunu % 95 verim ile gerçekleştirmişlerdir [66]. Hidroliz deneylerinde artış sağlayan magnetik su kullanarak Biyokimya Laboratuvarında soğan büyümesi gözlemlendi. Bu amaçla kontrol, magnetize edilen su [kuzey (10 ve 20 dakika) ve güney (10 dakika)] ile 3 hafta süresince soğanların sulanmasında kullanıldı. Kuzey ve güney yönleriyle gerçekleştirilen sulama işlemleri sonucunda magnetik alanın her iki bölgesinin kontrol grubuna göre daha iyi olduğunu görülmüştür. Ancak kuzey yönü ile 10 dakika boyunca magnetize edilen su ile gerçekleştirilen büyütme işlemlerinde soğanların gelişmesinin daha iyi olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 5.2'de gösterilmiştir.



Şekil 5.2: Magnetize edilen su ile gerçekleştirilen soğan büyütme denemeleri.

Tez çalışmamızda elde edilen immobilize enzimin, hidrolitik aktivitesi, tekrarlı kullanım ve depolama kararlılığı yağ hidroliz reaksiyonlarında başarılı şekilde kullanımının olabileceğini göstermektedir. Deneilerde kullanılan farklı tipteki yağların hidrolizi sonucu monoaçilgliserol, 1,2-diaçilgliserol, 1,3-diaçilgliserol, yağ asidi ve triaçilgliserol elde edilmiştir. Elde edilen mono-di-tri açilgliseroller gıda endüstrisinde besinlerin hazırlanmasında ve kozmetikte yaygın kullanıma sahiptir. Yüksek oranda zeytinyağından elde edilen 1,2 diaçilgliserol ihtiva eden Signaline™ s ekstraktı vücut, yüz ve renkli kozmetik ürünlerinde kullanılırken, monoaçilgliseroller krem ve losyonlarda kullanılır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında *Thermomyces Lanuginosa* lipaz yeni bir matriks olan immobead 150-A üzerine gram matriks başına 27.5 mg olacak şekilde % 100 immobilizasyon ve % 100 aktivite verimleri ile kovalent olarak başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon optimizasyonu için matriks miktarı, pH, tampon çözelti konsantrasyonu ve miktarı çalışıldı. Serbest ve immobilize lipaz ile gerçekleştirilen hidroliz optimizasyonunda ayçiçek, soya ve kanola yağları kullanıldı. Kolay bulunabilirliği ve yüksek oranda omega-6 içermesinden dolayı hidroliz reaksiyonlarında yalnızca Ayçiçek yağı ile çalışmalar gerçekleştirildi. Hidroliz optimizasyonu için pH, tampon çözelti konsantrasyonu, sıcaklık, tuz ve organik çözücü etkileri çalışıldı. Hidroliz ortamına tuz (25mM NaCl) ilave edildiğinde serbest ve immobilize lipazın aktivitesinde % 1.4, ortama çözücü(t-amil alkol) ilave edildiğinde serbest lipaz aktivitesi % 8, immobilize lipaz aktivitesi % 6.5 artış göstermektedir. Enzimin 30 kez gerçekleştirilen tekrarlı kullanımı sonunda aktivitesinde meydana gelen kayıp % 3 0.5 iken, 60 günlük depolama sonunda % 10.3'lük bir kayıp belirlenmiştir. Bu çalışmada magnetize edilen tampon çözeltilerle gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonunda % 8'lik artış gözlenmiştir. Hidroliz aktivite testleri kullanılarak magnetize suyun tesbitinin kolaylıkla yapılabilirliği gösterildi. Elde edilen sonuçlar, geliştirilen yöntemin yağ hidrolizinde kullanılabilme potansiyeli olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Fernandes M., Krieger N., Baron A., Zamora P., Ramos L., Mitchell D., (2004), "Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 30 (1), 43-49.
- [2] Chew Y. H., Chua L. S., Cheng K. K., Sarmidi M. R., Aziz R. A., Lee C. T., (2008), "Kinetic study on the hydrolysis of palm olein using immobilized lipase", Biochemical Engineering Journal, 39 (3), 516-520.
- [3] Kulkarni S. R., Pandit A. B., (2005), "Enzymatic hydrolysis of castor oil: An approach for rate enhancement and enzyme economy", Indian Journal of Biotechnology, 4 (2), 241-245.
- [4] Mateo C., Palomo J. M., Fernandez L. G., Guisan J. M., Fernandez L. R., (2007), "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques", Enzyme and Microbial Technology, 40 (6), 1451-1463.
- [5] Otera J., (1993), "Transesterification", Chemical Reviews, 93 (4), 1449-1470.
- [6] Schuchardt U., Sercheli R., Vargas R. M., (1998), "Transesterification of vegetable oils: a review", Journal of the Brazilian Chemical Society, 9 (3), 199-210.
- [7] Freedman B., Butterfield R. O., Pryde E. H., (1986), "Transesterification kinetics of soybean oil 1", Journal of the American Oil Chemists' Society, 63 (10), 1375-1380.
- [8] Canakci M., Van G. J., (2003), "A pilot plant to produce biodiesel from high free fatty acid feedstocks", Transactions of the Asae, 46 (4), 945-954.
- [9] Ramadhas A. S., Jayaraj S., Muraleedharan C., (2005), "Biodiesel production from high FFA rubber seed oil", Fuel, 84 (4), 335-340.
- [10] Wu H., Zong M. H., Luo Q., Wu H. C., (2003), "Enzymatic conversion of waste oil to biodiesel in a solvent-free system", American Chemical Society, Division of Fuel Chemistry, 48 (2), 533.
- [11] Shimada Y., Watanabe Y., Samukawa T., Sugihara A., Noda H., Fukuda H., Tominaga Y., (1999), "Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase", Journal of the American Oil Chemists' Society, 76 (7), 789-793.
- [12] Quesada J., Olivares P., (2010), "Supercritical biodiesel production from raw soybean oil", Journal of Biofuels, 1 (1), 115-122.

- [13] Fukuda H., Kondo A., Noda H., (2001), "Biodiesel fuel production by transesterification of oils", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92 (5), 405-416.
- [14] Brady C., Metcalfe L., Slaboszewski D., Frank D., (1988), "Enzymatic interesterification of fats: factors influencing the choice of support for immobilized lipase", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65 (3), 917.
- [15] Sreenivasan B., (1978), "Interesterification of fats", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55 (11), 796-805.
- [16] Macrae A., (1984), "Microbial lipases as catalysts for the interesterification of oils and fats", *Biotechnology for the Oils and Fats Industry*, 45 (1), 189-198.
- [17] Amir R. M., Shabbir M. A., Khan M. R., Hussain S., (2012), "Interesterification of fats and oils-A Review", *Pakistan Journal of Food Sciences*, 22 (3), 143-153.
- [18] Alptekin E., (2007), "Atık ağartma toprağı yağının enzimatik hidrolizi", Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi.
- [19] Gandhi N. N., (1997), "Applications of lipase", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74 (6), 621-634.
- [20] Tsai S. W., Chiang C. L., (1991), "Kinetics, mechanism, and time course analysis of lipase-catalyzed hydrolysis of high concentration olive oil in AOT–isooctane reversed micelles", *Biotechnology and Bioengineering*, 38 (2), 206-211.
- [21] Cai R., Yang H., He J., Zhu W., (2009), "The effects of magnetic fields on water molecular hydrogen bonds", *Journal of Molecular Structure*, 938 (1), 15-19.
- [22] Kirk O., Borchert T. V., Fuglsang C. C., (2002), "Industrial enzyme applications", *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (4), 345-351.
- [23] Illanes A., (2008), "Enzyme biocatalysis: principles and applications", 1th Edition, Springer-Verlag New York Inc.
- [24] Petersen S., Drabløs F., Woolley P., Petersen S., (1994), "Lipases: Their Biochemistry, Structure, and Application", Cambridge University Press, Cambridge, England, 22 (4), 23-48.
- [25] Paiva A. L., Balcao V. M., Malcata F. X., (2000), "Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases", *Enzyme and Microbial Technology*, 27 (3), 187-204.
- [26] Balcao V. M., Malcata F. X., (1998), "Lipase catalyzed modification of milkfat", *Biotechnology Advances*, 16 (2), 309-341.

- [27] Jha B., Svensson M., Kronberg B., Holmberg K., (1999), "Titration Microcalorimetry Studies of the Interaction between *Humicola lanuginosa* Lipase and Ionic Surfactants", *Journal of Colloid and Interface Science*, 213 (1), 262-264.
- [28] Derewenda U., Swenson L., Green R., Wei Y., Yamaguchi S., Joerger R., Haas M., Derewenda Z., (1994), "Current progress, in crystallographic studies of new Upases from filamentous fungi", *Protein Engineering*, 7 (4), 551-557.
- [29] Holmquist M., Clausen I. G., Patkar S., Svendsen A., Hult K., (1995), "Probing a functional role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase through transesterification reactions in organic solvent", *Journal of Protein Chemistry*, 14 (4), 217-224.
- [30] Söderlund T., Zhu K., Jutila A., Kinnunen P. K., (2002), "Effects of betaine on the structural dynamics of *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 26 (1), 75-83.
- [31] Jutila A., Zhu K., Patkar S. A., Vind J., Svendsen A., Kinnunen P. K., (2000), "Detergent-induced conformational changes of *Humicola lanuginosa* lipase studied by fluorescence spectroscopy", *Biophysical journal*, 78 (3), 1634-1642.
- [32] Mogensen J. E., Sehgal P., Otzen D. E., (2005), "Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents", *Biochemistry*, 44 (5), 1719-1730.
- [33] De M. P. D., Fernandez A. E., Ten K. A., Bargeman G, (2009), "Role of apparent pK_a of carboxylic acids in lipase-catalyzed esterifications in biphasic systems", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59 (1), 220-224.
- [34] Tangkam K., Weber N., Wiege B., (2008), "Solvent-free lipase-catalyzed preparation of diglycerides from co-products of vegetable oil refining", *Grasas y Aceites*, 59 (3), 245-253.
- [35] Zhou Z., Piepenbreier F., Marthala V. R., Karbacher K., Hartmann M., (2015), "Immobilization of lipase in cage-type mesoporous organosilicas via covalent bonding and crosslinking", *Catalysis Today*, 243 (1), 173-183.
- [36] Jurado E., Camacho F., Luzón G., Fernández S. M., García R. M., (2008), "Kinetics of the enzymatic hydrolysis of triglycerides in o/w emulsions: study of the initial rates and the reaction time course", *Biochemical Engineering Journal*, 40 (3), 473-484.
- [37] Freitas L., Bueno T., Perez V. H., Santos J. C., De C. H. F., (2007), "Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23 (12), 1725-1731.

- [38] Lyberg A. M., Adlercreutz P., (2008), "Lipase specificity towards eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid depends on substrate structure", *Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics*, 1784 (2), 343-350.
- [39] Katchalski K. E., (1993), "Immobilized enzymes—learning from past successes and failures", *Trends in Biotechnology*, 11 (11), 471-478.
- [40] Taylor R., (1991), "Immobilized antibody-and receptor-based biosensors", *Bioprocess Technology*, 14 (1), 263.
- [41] Kierek P. K., Karatan E., (2005), "Biofilm development in bacteria", *Advances in applied Microbiology*, 57 (1), 79-111.
- [42] Abdelmajeed N. A., Khelil O. A., Danial E. N., (2012), "Immobilization technology for enhancing bio-products industry", *African Journal of Biotechnology*, 11 (71), 13528-13539.
- [43] Monsan P., Combes D., (1987), "Enzyme stabilization by immobilization", *Methods in Enzymology*, 137 (1), 584-598.
- [44] Ó'fágáin C., (2003), "Enzyme stabilization—recent experimental progress", *Enzyme and Microbial Technology*, 33 (2), 137-149.
- [45] Norouzian D., (2003), "Enzyme immobilization: the state of art in biotechnology", *Iranian Journal of Biotechnology*, 1 (4), 197-206.
- [46] Sankaran K., Godbole S., D'souza S., (1989), "Preparation of spray-dried, sugar-free egg powder using glucose oxidase and catalase coimmobilized on cotton cloth", *Enzyme and Microbial Technology*, 11 (9), 617-619.
- [47] Norouzian D., Akbarzadeh A., Inanlou D. N., Farahmand B., Saleh M., Sheikh U. E. F., Vaez J., (2003), "Biotransformation of alcohols to aldehydes by immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* PTCC5080", *Enzyme and Microbial Technology*, 33 (2), 150-153.
- [48] Hanefeld U., Gardossi L., Magner E., (2009), "Understanding enzyme immobilisation", *Chemical Society Reviews*, 38 (2), 453-468.
- [49] Goldstein L., Levin Y., Katchalski E., (1964), "A Water-insoluble Polyanionic Derivative of Trypsin. II. Effect of the Polyelectrolyte Carrier on the Kinetic Behavior of the Bound Trypsin*", *Biochemistry*, 3 (12), 1913-1919.
- [50] Lauwers A., Heinen W., Gorris L., Van D. D. C., (1989), "Variation of parameters affecting the start-up of methanogenic fluidized bed reactors", *Biotechnology Letters*, 11 (12), 907-912.
- [51] Akköse S., (2013), "İmmobilize Lipaz Kullanarak Değişik Bitkisel Yağlardan Yağ Asidi Üretimi", *Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü*.

- [52] Ávila C. N., Velasco L. S., Huerta O. S., Córdova L. J., Gimeno M., Favela T. E., (2014), “Production of Thermostable Lipase by *Thermomyces lanuginosus* on Solid-State Fermentation: Selective Hydrolysis of Sardine Oil”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174 (5), 1859-1872.
- [53] Dizge N., Keskinler B., Tanriseven A. (2009), “Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene–divinylbenzene copolymer”, *Biochemical Engineering Journal*, 44 (2), 220-225.
- [54] Matte C. R., Bussamara R., Dupont J., Rodrigues R. C., Hertz P. F., Ayub M. A. Z., (2014), “Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* Lipase by Different Techniques on Immobead 150 Support: Characterization and Applications”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172 (5), 2507-2520.
- [55] Raspe D. T., Cardozo F. L., Da S. C., (2013), “Effect of additives and process variables on enzymatic hydrolysis of macauba kernel oil (*Acrocomia aculeata*)”, *International Journal of Chemical Engineering*, 2013 (1), 1-8.
- [56] Rooney D., Weatherley L., (2001), “The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid–liquid reactor”, *Process Biochemistry*, 36 (10), 947-953.
- [57] Parlak M., Ustek D., Tanriseven A., (2013), “A novel method for covalent immobilization of dextransucrase”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 89 (1), 52-60.
- [58] Rodrigues R. C., Ayub M. Z., (2011), “Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil”, *Process Biochemistry*, 46 (3), 682-688.
- [59] Ting W. J., Tung K. Y., Giridhar R., Wu W. T., (2006), “Application of binary immobilized *Candida rugosa* lipase for hydrolysis of soybean oil”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 42 (1), 32-38.
- [60] Lee D. H., Park C. H., Yeo J. M., Kim S. W., (2006), “Lipase immobilization on silica gel using a cross-linking method”, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry -Seoul-*, 12 (5), 777.
- [61] Yiğitoğlu M., Temoçin Z., (2010), “Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glutaraldehyde-activated polyester fiber and its application for hydrolysis of some vegetable oils”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66 (1), 130-135.
- [62] Amaya J., Carbonell M., Martinez E., Raya A., (1996), “Effects of stationary magnetic fields on germination and growth of seeds”, *Horticultural. Abstracts*, 68 (1), 1363.

- [63] Kordas L., (2002), "The effect of magnetic field on growth, development and the yield of spring wheat", Polish Journal of Environmental Studies, 11 (5), 527-530.
- [64] Lin I., Yotvat J., (1990), "Exposure of irrigation and drinking water to a magnetic field with controlled power and direction", Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 83 (1), 525-526.
- [65] Jia S., Liu Y., Wu S., Wang Z., (2009), "Effect of static magnetic field on α -amylase activity and enzymatic reaction", Transactions of Tianjin University, 15 (1), 272-275.
- [66] Xie W., Ma N., (2010), "Enzymatic transesterification of soybean oil by using immobilized lipase on magnetic nano-particles", Biomass and Bioenergy, 34 (6), 890-896.

ÖZGEÇMİŞ

Arzu GÜRBÜZ, 01.01.1986 tarihinde İstanbul'da doğdum. İlk ve ortaöğrenimini, İsmet İnönü Ortaokulu ve Maltepe (Y.D.A) Lisesinde tamamladım. 2009 yılında, Balıkesir Üniversitesi Fen ve Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldum. 2009-2011 yılları arasında özel sektörde kimyager olarak çalıştım. 2011 yılında Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitime başladım. 2014 yılında Sanayii Bakanlığı'nın özgün fikirlere sahip girişimcilere sağlamış olduğu Teknogirişim Sermayesi Desteğini almaya hak kazandım ve proje üzerine çalışmalarına devam etmekteyim.