



**LIPAZ ENZİMİNİN *Lactobacillus brevis*
BAKTERISİNDEN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZE
EDİLMESİ, MAGNETİK FLOROSİL NANOPARTİKÜLLER
YÜZEYİNE İMMOBİLİZE EDİLMESİ VE DETERJAN
KATKI MADDESİ OLARAK KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

Seyedeh Sara SOLEIMANI

**Yüksek Lisans Tezi
Nanobilim ve Nano Mühendislik Anabilim Dalı
Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU
2017
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LİPAZ ENZİMİNİN *Lactobacillus brevis* BAKTERİSİNDEN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZE EDİLMESİ, MAGNETİK
FLOROSİL NANOPARTİKÜLLER YÜZEYİNE İMMOBİLİZE
EDİLMESİ VE DETERJAN KATKI MADDESİ OLARAK
KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

Seyedeh Sara SOLEIMANI

NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2017

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**LİPAZ ENZİMİNİN *Lactobacillus brevis* BAKTERİSİNDE SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZE EDİLMESİ, MAGNETİK FLOROSİL NANOPARTİKÜLLER
YÜZEYİNE İMMOBİLİZE EDİLMESİ VE DETERJAN KATKI MADDESİ OLARAK
KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU danışmanlığında, Seydeh Sara SOLEIMANI tarafından hazırlanan bu çalışma 13 /01 /2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Nanobilim ve Nano Mühendislik Anabilim Dalı – Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr.Hayrunnisa NADAROĞLU

İmza :

Üye : Doç. Dr. Azize Alaylı Güngör

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Emre İLHAN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 26/01/2017 tarih ve 04/.../31 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LİPAZ ENZİMİNİN *Lactobacillus brevis* BAKTERİSİNDE SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZE EDİLMESİ, MAGNETİK FLOROSİL NANOPARTİKÜLLER YÜZEYİNE İMMOBİLİZE EDİLMESİ VE DETERJAN KATKI MADDESİ OLARAK KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

Seyedeh Sara SOLEIMANI

Atatürk Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı

Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

Lipaz enzimi (EC.3.1.1.3) mono, di-, triaçilgliserol yapısında bulunan hayvan bitki ve mikrobiyal yağların ana bileşen yapısının ester bağlarını hidroliz edilmesini katalizleyen enzimdir ve reaksiyon sonucunda karboksilik asitler ve alkoller oluşmaktadır.

Yaptığımız çalışmada lipaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sefadeks iyon değişim kromatografisi ve Sephacril S 200 jel filtrasyon kromatografisi teknikleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminin ilk basamağında %0-20 aralıklarda amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak DEAE-Sefadeks iyon değişim kromatografisine enzim kaynağı tatbik edilmiş ve son adımda Sephacril S 200 jel filtrasyon kolonundan elde edilen lipaz enzimi *L.brevis* bakterisinden %37.85 verimle 135.2 kat saflaştırılmıştır. Saf lipaz enzimi florasil destek materyali, γ -Fe₃O₄ NP'leri ile magnetik hale getirildikten sonra, L-glutaraldehit ara kolu kullanılarak kovalent olarak immobilize edilmiştir. Lipaz enziminin magnetik florasil NP'lere immobilizasyonundan önce ve sonra SEM, XRD ve FTIR analizleri yapılarak immobilizasyonun karakterizasyonu yapılmıştır. Daha sonra, serbest ve immobilize lipaz enzim kinetikleri araştırılmıştır. Serbest ve immobilize lipaz enzimlerinin optimum pH değerleri 9.0, optimum sıcaklık değerleri 60°C olarak belirlenmiştir. Hem serbest hemde immobilize lipaz enziminin 50-70°C aralığında daha stabil olduğu tespit edilmiştir. SDS-PAGE jel elektroforez analizi sonucunda lipaz enziminin tek alt birimden oluştuğu ve jel filtrasyon kromatografisi sonucunda molekül ağırlığının 57 kDa olduğu belirlenmiştir. Serbest ve bağlı enzimin substrat spesifikliğini belirlemek amacıyla p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil palmitat, p-nitrofenil laurat, metil heptanoat ve metil propionat substratları ile ayrı ayrı aktivite ölçümleri yapılmış ve Lineweaver burk grafikleri çizilerek V_{max} ve K_M değerleri belirlenmiştir. Enzim en yüksek V_{max} değerini p-nitro fenil asetat substratına karşı göstermiştir. Serbest ve immobilize lipaz enzimlerinin V_{max} değerleri sırasıyla 11.75 μ mol/L.dak ve 16.28 μ mol/L.dak olarak bulunmuştur. K_M değerleri ise sırasıyla 0.375 mg/mL ve 0.25 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Serbest ve bağlı *L. brevis* lipaz enziminin aktivitesi üzerine CuCl₂, HgCl₂, FeCl₂, MgCl₂, ZnCl₂, CaCl₂ gibi metal iyonlarının etkisi araştırılmış ve bağlı enzimin serbest enzime göre metal iyonlarına karşı daha yüksek aktivite kararlılığına sahip olduğu belirlenmiştir. Serbest ve immobilize enzimin deterjan katkı maddesi olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi için, enzimin optimum pH ve optimum sıcaklığında zeytin yağı adsorbe edilmiş pamuklu bezler serbest lipaz, immobilize lipaz ve bir ticari deterjana (katkı maddesi olarak %0.1 (w/v) oranında) ilave edilmiş ve 60 dakika süreyle, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Elde edilen bulgulardan *L.brevis* saflaştırılan ve immobilize edilen lipaz enziminin 45 dak sonunda sırasıyla %65 ve %75 oranlarında pamuklu bezlerden yağ giderimini sağladığı görülmüştür.

2017, 85 sayfa

Anahtar Kelimeler: Lipaz, *L.brevis*, Kovalent immobilizasyon, Magnetik Florasil Nanopartikül

ABSTRACT

Master Thesis

THE INVESTIGATION OF PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LIPASE ENZYME FROM *Lactobacillus brevis* BACTERIA, ITS IMMOBILIZATION TO THE SURFACE OF MAGNETIC FLORISIL NANOPARTICLES AND ITS USABILITY AS DETERGENT ADDITIVE

Seyedeh Sara SOLEIMANI

Atatürk University
Natural Sciences Institute
Nanoscience and Nanoengineering Department
Department of Nanobiotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

Lipase (EC.3.1.1.3) is enzyme that catalyze the hydrolysis s of carboxyl and ester bonds of mono, di-, tri-, and mono acyl glycerol, the main constituent of animal and plant and microbial oils and the carboxylic acids and alcohols are obtained as products from the reaction. In our work, the lipase enzyme was purified using ammonium sulphate precipitation, DEAE-Sephadex ion exchange chromatography and Sephacryl S 200 gel filtration chromatography techniques. In the first step of the purification process, ammonium sulfate precipitation was carried out at 0-20% saturation. Then, obtained product was applied to DEAE-Sephadex ion exchange chromatography and in the last step, the lipase enzyme obtained from the Sephacryl S 200 gel filtration column. Thus, lipase enzyme was purified 135.2 times and a yield of 37.85% from the *L.brevis* bacteria. Pure lipase enzyme was immobilized as covalently via *L*-glutaraldehyde arm to florisol which was magnetized using γ -Fe₃O₄ (NPs). Characterization of immobilization was performed by analyzing SEM, XRD and FTIR before and after immobilization of lipase enzyme to magnetic fluorisol NPs. Then, free and immobilized lipase enzyme kinetics were investigated. The optimum pH values were determined as 9.0, and the optimum temperature values were determined as 60°C for free and immobilized lipase enzymes, respectively. Both free and immobilized lipase enzymes were found to be more stable at 50-70°C. As a result of SDS-PAGE gel electrophoresis analysis, it was obtained that lipase enzyme was formed from the single subunit. It was determined that the molecular weight was 57 kDa using gel filtration chromatography. The bound enzyme has higher activity stability to metal ions than the free enzyme. In order to determine substrate specificity of free and immobilized enzyme, lipase activity measurements were measured using p-nitrophenyl acetate, p-nitrophenyl palmitate, p-nitrophenyl laurate, methyl heptanoate and methyl propionate, separately. Lineweaver burk graphics were drawn and V_{max} and K_M values were determined using these graphics. The enzyme showed the highest V_{max} value against the substrate of p-nitro phenyl acetate. The V_{max} values of the free and immobilized lipase enzymes were found to be 11.75 $\mu\text{mol} / \text{L}\cdot\text{min}$ and 16.28 $\mu\text{mol}/\text{L}\cdot\text{min}$., respectively. K_M values were calculated as 0.375 mg/mL and 0.25 mg/mL, respectively. The effects of some metal ions such as CuCl₂, HgCl₂, FeCl₂, MgCl₂, ZnCl₂ and CaCl₂ were determined on the activity of free and bound *L. brevis* lipase. It was observed that the bound enzyme had a higher activity stability against metal ions than the free enzyme. To determine the usability of free and immobilized lipase enzyme as a detergent additive at the optimum pH and the optimum temperature of them. The olive oil adsorbed cotton cloths were treated free lipase and immobilized lipase with a commercial detergent (as an additive material at the 0.1% (w/v) rate) at room temperature during 60 minutes. From the results, free lipase and immobilized lipase enzyme were removed cotton cloth oil at rate of 65% and 75%, respectively after 45 min.

2017, 85 pages

Keywords: Lipase, *L.brevis*, Covalent immobilization, Magnetic Fluorisol Nanoparticle

TEŞEKKÜR

Yaptığım tez çalışmasının tümünde kıymetli bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, araştırmalarım süresince bana ayırdığı değerli zaman ve sağladığı destek için minnettar olduğum saygıdeğer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nanobilim ve Nanomühendislik Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL'a teşekkür ederim.

Çalışmamın deney aşamasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Azize ALAYLI GÜNGÖR'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım ve tez yazım aşamalarında bana yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Hicran ÖNEM, Aynur BABAGİL ve Zeynep SÖNMEZ'e teşekkür ederim.

Her zaman ve her konuda güvenini her an hissettiğim, hayatımın her aşamasında beni yalnız bırakmayan ve desteklerini esirgemeyen saygı değer aileme şükranlarımı sunarım.

Seyedeh Sara SOLEIMANI

Ocak, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Nanoteknoloji	1
1.2. Nanoteknolojinin Tarihçesi	2
1.3. Nanopartiküller.....	3
1.4. Enzimler ve Tarihçesi.....	4
1.5. Enzim Özellikleri	5
1.6. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması.....	6
1.7. Enzim Reaksiyonunun Hızında Etkili Faktörler	8
1.7.1. Sıcaklık.....	8
1.7.2. Zaman.....	8
1.7.3. pH.....	9
1.7.4. Enzim konsantrasyonu	9
1.7.5. Substrat konsantrasyonu.....	10
1.8. Enzim İnhibitörleri	11
1.8.1. Yarışmalı inhibitörler	11
1.8.2. Yarışmasız inhibisyon	12
1.8.3. Yarı yarışmalı inhibisyon	13
1.9. Enzim İmmobilizasyonu.....	14
1.10. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	17
1.10.1. Çözünmez immobilizasyon yöntemleri.....	17
1.10.1.a. Bağlama	18
1.10.1.b. Tutuklama yöntemleri	21
1.10.2. Çözünür formda immobilizasyon.....	23

1.11. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması	23
1.12. Lipaz Enzimleri	24
1.12.1. Lipaz enziminin fonksiyonları.....	26
2. KAYNAK ÖZETLERİ	28
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	33
3.1. Kullanılan kimyasallar	33
3.1.1. Araştırmada kullanılan cihazlar.....	33
3.1.2. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	34
3.1.2.a. Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltinin hazırlanması.....	34
3.1.2.b. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin çözüldüğü tampon çözelti	34
3.1.2.c. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponunun hazırlanışı ...	34
3.1.2.d. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tampon	34
3.1.2.e. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi	34
3.1.2.f. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi	35
3.1.3. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları	35
3.1.4. Metal iyonlarının, kimyasallarla saflaştırılmış lipaz enzimi üzerine etkisi.....	36
3.1.5. Optimum pH tayini için kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanışları	36
3.1.5.a. Sodyum asetat tamponu.....	36
3.1.5.b. Sodyum fosfat tamponu.....	36
3.1.5.c. Tris-HCl tamponu	37
3.1.5.d. Borat tamponu	37
3.1.5.e. Karbonat tamponu	37
3.1.6. Aktivite ölçümünde kullanılan çözelti	37
3.1.7. Amonyum sülfat çöktürmesi	38
3.2. Bakteri Üretimi ve Kültürü.....	38
3.2.1. Saflaştırma basamakları	39
3.3. Lipaz Enzim Aktivite Tayini.....	40
3.4. V_{max} ve K_M Değerlerinin Belirlenmesi.....	40
3.5. Magnetik Florisil Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Lipaz İmmobilizasyonu .	41
3.5.1. Magnetite-FL- Nanopartikülleri ile saflaştırılmış lipaz enziminin optimum immobilizasyon koşullarının belirlenmesi	44

3.6. Protein Derişiminin Belirlenmesi.....	45
3.7. Optimum pH ve stabil pH Değerlerinin Belirlenmesi.....	45
3.8. Optimum Sıcaklık ve Stabil Sıcaklık Değerleri Belirlenmesi.....	46
3.9. Bazı Etkili Faktörlerin Serbest ve İmmobilize Lipaz Üzerinde Etkisi.....	46
3.10. İmmobilize Lipazın Tekrar Kullanılabilme Kabiliyeti.....	46
3.11. Serbest ve İmmobilize Magnetik Florisil Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	46
3.12. Deterjan Katkı Materyali Olarak Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi	47
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	49
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri.....	49
4.2. <i>L.brevis</i> Bakterisinin Üretilmesi.....	49
4.3. <i>L.brevis</i> 'dan Üretilip Saflaştırılan Lipaz Enzimlerinin DEAE-sefadeks İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma Sonuçları	50
4.4. Lipaz Enziminin <i>L.brevis</i> 'dan DEAE-sefadeks İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma Sonuçları	50
4.5. DEAE-Sefadeks İyon Değişim Kromatografi ile Saflaştırılması.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.6. Lipaz Enziminin Sefakril S200 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Saflaştırılması.....	51
4.7. <i>L.brevis</i> Bakteriden Saflaştırılan Serbest ve İmmobilize Lipaz Enziminin SDS- poliakrilamid Jel Elektroforez Sonucu	53
4.8. <i>L.brevis</i> Bakterisinden Alınan Lipazının, Florisile Glutaraldehit Ara Kol Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu İçin Optimum İmmobilizasyon Koşulları	54
4.8.1. pH'nın etkisi	54
4.8.2. Sıcaklığın etkisi	55
4.8.3. Zamanın etkisi	56
4.8.4. Lipaz enzim miktarının etkisi.....	57
4.8.5. Optimum pH belirlemesi	58
4.8.6. Stabil pH.....	59
4.8.7. Optimum sıcaklık	60
4.8.8. Stabil sıcaklık	61

4.8.9. Metal iyonları etkisi.....	62
4.9. <i>L.brevis</i> 'dan Saflaştırılan Lipaz Enziminin V_{max} ve K_M Sonuçları.....	64
4.10. FT-IR Analizi Sonuçları.....	67
4.11. SEM Analizi Görüntüleri	68
4.12. X-Ray Difraksiyon (XRD) Analizi Sonuçları	69
4.13. Serbest ve İmmobilize Lipaz Enzimlerinin Zeytin Yağı Giderme Üzerinde Etkisi	70
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	72
5.1. Tartışma.....	72
5.2. Sonuç	77
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	86

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
°C	Santigrat derece
A.	Aspergillus
Å	Angström
Bis	N,N'-metilen-bis-akrilamid
CBB	Coomassie Brilliant Blue
Da	Dalton
EC	Enzim Komisyonu
EDTA	Etilendiaminotetra-asetik asit
ES	Enzim – substrat
Ins	İnositol
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
IUPAC-IUBMB	The International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry and Molecular Biology
Kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
K _M	Michaelis sabiti
L	Litre
L	Lactobacillus
mM	Milimolar
MRS	Man, Ragosa and Sharpe
mU/ml	Mililitredeki mili ünite
nm	Nanometre
nmol/s	Nanomol/saniye
NP	Nanopartikül
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
rpm	Dakikada devir sayısı
s	saat

SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TCA	Trikloroasetik asit
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamin
Tris	2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
U/mg	Unite/miligram
U/mL	Mililitredeki ünite
UV	Ultraviyole
v/v	Hacim/Hacim (volume/volume)
V _{max}	Maksimum hız
w/v	Ağırlık/Hacim (weight/volume)
α	Alfa
β	Beta
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Sıcaklığın enzim reaksiyon hızına etkisi	8
Şekil 1.2. pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi	9
Şekil 1.3. Enzim konsantrasyonunun enzim reaksiyon hızına etkisi	9
Şekil 1.4. Substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi	10
Şekil 1.5. Enzim aktivitelerini etkileyen inhibitör türleri	11
Şekil 1.6. Yarışmalı Linewear burk inhibisyon grafiği	12
Şekil 1.7. Yarışmasız Linewear burk inhibisyon grafiği	13
Şekil 1.8. Yarı Yarışmalı Linewear burk inhibisyon grafiği	14
Şekil 1.9. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	17
Şekil 1.10. Lipazlarda hidroliz reaksiyonunun şematik görüntüsü.....	25
Şekil 3.1. Florisil destek materyalinin 3-APTES ile aktivite edilmesi	42
Şekil 3.2. Aktifleştirilmiş florisil destek materyalinin L-glutaraldehit ile reaksiyonu.....	42
Şekil 3.3. Aktifleştirilmiş florisil destek materyalinin γ -Fe ₃ O ₄ NP'ler ile reaksiyonu ...	43
Şekil 3.4. <i>L. brevis</i> lipazın 3-APTES ile aktifleştirilmiş ve L-glutaraldehit ara kolu bağlanmış destek materyaline kovalent immobilizasyonu	44
Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik	49
Şekil 4.2. DEAE-sefadeks iyon değişim kromatografi kolonu kullanılarak Lipaz enziminin <i>L.brevis</i> bakteriden saflaştırılan lipaz enziminin 10 mM (pH 9.0) borat tamponu içinde 0-1 M NaCl ile gradient elüsyonu	51
Şekil 4.3. <i>L.brevis</i> bakteriden lipaz enziminin Sephakril S200 jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmasından elde edilen elüsyon grafiği...	52
Şekil 4.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (PAGE) fotoğrafı	54
Şekil 4.4. pH'nın <i>L.brevis</i> bakteriden saflaştırılan lipaz enziminin glutaraldehit ara kolu üzerinden magnetik florosil NP'lere kovalent immobilizasyonu üzerine etkisi.....	55
Şekil 4.5. Sıcaklığın <i>L.brevis</i> bakteriden saflaştırılan lipaz enziminin glutaraldehit ara kolu üzerinden magnetik florisil NP'lere kovalent immobilizasyonu üzerine etkisi.....	56

Şekil 4.6. Zamanın <i>L.brevis</i> bakteriden saflaştırılan lipaz enziminin glutaraldehit ara kolu üzerinden magnetik florisil NP'lere kovalent immobilizasyonu üzerine etkisi.....	57
Şekil 4.7. <i>L. brevis</i> lipazının glutaraldehit ara kol vasıtasıyla florisil malzemesine kovalent bağlanmasının farklı derişimlerde aktivitesi.....	58
Şekil 4.8. <i>L.brevis</i> 'den saflaştırılan serbest ve immobilize lipaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	59
Şekil 4.9. Serbest ve immobilize <i>L.brevis</i> lipaz enziminin stabil pH sonuçları	60
Şekil 4.10. Serbest ve immobilize <i>L.brevis</i> lipaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	61
Şekil 4.11. <i>L.brevis</i> 'dan saflaştırılan serbest ve immobilize lipaz enziminin stabil sıcaklık sonuçları	62
Şekil 4.12. <i>L.brevis</i> 'dan saflaştırılan serbest ve immobilize lipaz enzim için p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil palmitat, p-nitrofenil laurat, metil heptanoat ve metil propionat substratları için Lineweaver burk grafikleri	66
Şekil 4.13. FT-IR analiz spektrumu.....	68
Şekil 4.14. SEM görüntüleri	69
Şekil 4.15. Magnetik florisil nanopartikülleri ve magnetik florisil nanopartiküllerle immobilize edilmiş lipaz enziminin XRD görüntüleri.....	69
Şekil 4.16. Serbest ve immobilize lipaz enzimi kullanılarak yağ giderme veriminin analizi.	70
Şekil 4.17. Serbest ve immobilize lipaz enziminin deterjan katkı maddesi olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzimler için kofaktör olarak görev yapan bazı inorganik elementler ve enzimler	6
Çizelge 1.2. Enzim grupları, fonksiyonları ve katalizledikleri tepkimeler	7
Çizelge 1.3. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması	24
Çizelge 1.4. Lipazların endüstriyel kullanım alanları	27
Çizelge 3.1. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışım miktarları ve oranları	35
Çizelge 3.2. Kullanılan substratların kimyasal yapıları	41
Çizelge 4.1. <i>L.brevis</i> lipazına ait saflaştırma ve verim profili	53
Çizelge 4.2. Metal iyonlarının serbest ve immobilize lipaz enzim aktivitesi üzerine etki sonuçları	63
Çizelge 4.3. <i>L.brevis</i> 'dan saflaştırılan serbest ve immobilize lipaz enzim için p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil palmitat, p-nitrofenil laurat, metil heptanoat ve metil propionat substratları için V_{max} ve K_M değerleri	67

1. GİRİŞ

1.1. Nanoteknoloji

“Nanoteknoloji” bilim dalı son yılların en önemli konularından biri olarak görülmektedir. Nanoteknoloji tam olarak biyoloji, kimya, fizik, gıda, tıp, elektronik, uzay, ilaç, vb bilim dallarından yararlanmaktadır. Yaşayan her canlı doku genel yaşam ortamında kesintisiz olarak nanopartiküllerle karşı karşıya kalmaktadır. Hücrelerin tükettiği gıda, aldığı nefes ve her türlü etrafındaki kimyasal iletişimler nano parçacıklarla yapılmaktadır. Böylece her canlı hayatı boyunca, nano boyutlu partiküllerin etkisinde kalmaktadır. Söz konusu olan nanoteknoloji terimi nano ve teknoloji kelimelerinin birleşiminden oluşmuştur. Nano Yunanca “cüce, bodur” anlamına gelir ve bir metre ölçümünün milyarda bir kısmını ifade etmektedir. Nanoteknoloji kelimesi nano boyutta olan sistemlerin tasarım ve sentezidir. Bu sistemler mikro ve üzerinde yapılan sistemlerle kıyasta yeni ve özel fiziko-kimyasal, elektriksel ve mekanik veya kombinasyon davranışlar göstermektedir (Pearce 2012).

Nanobilim nanoteknolojinin esas tabanı olarak, makromoleküler, moleküler veya atomik boyutta yani 1 ile 100 nm aralığında farklı fonksiyonel özelliklere sahip malzemelerin yapımı için temel bilgilerin araştırılmasıdır (Royal Society 2008).

Nanobiyoteknoloji ise, biyoteknoloji ve nanoteknoloji branşlarının birleşimi ve ortak kombine bir fonksiyon gösteriminin neticesinde meydana gelmektedir. Nanobiyoteknolojinin uygulamaları nanosensörler ve ‘lab on a chip’ sistemleri, nano boyutlu hassas ve duyarlı biyosensörler üretimini içermektedir (Gazit 2007).

Nanobiyoteknoloji uygulama alanlarından bazıları aşağıda sıralanan gruplarda yer almaktadır ki bu alanlar; kemoterapide radyasyon tedavileri uygulama, ilaç taşınım ve üretim sistemleri, hücresel fizyoloji incelemeleri, viral hastalıkların teşhisi ve tedavisi, moleküler motivasyon araştırmaları, beyinde hasar gören sinir sistemi fonksiyonlarının

aygıtlarla simülasyonu ve vücuda uygulanması, biyomühendislik ve biyomedikal araştırmaları, tıbbi görüntüleme cihazlarına dayanan araştırmalardır (Niemeyer 2004).

1.2. Nanoteknolojinin Tarihçesi

Yıllardır birçok alanı kapsayan nanoteknoloji bilim alanının başlangıç noktası Amerikan bilim adamı Richard Feynman'ın 1959 yılında CALTEC Üniversitesindeki “ *There is Plenty of Room at the Bottom*” başlıklı konuşmasından ibarettir. Bu konuşmada tek tek olarak atom ve moleküllerin uygun bir cihazla dizilmesiyle yerçekiminin etkisiz hale gelerek önemsiz olacağını ve arkasından yüzeysel gerilim ve Van der waals güçlerinin çok daha etkin olacağını öne sürmüştür (Feynman 1960).

Bu konuşmadan yaklaşık 14 yıl sonra 1974 yılında Tokyo Science Üniversitesi'ndeki Prof. Norio Toniguchi adlı bilim adamı ilk kez “Nanoteknoloji” terimini kullanarak kuantum dot ve kuantum mekanik etkilerini gündeme getirmiştir ve arkasından 1980 yılında Dr. K. Eric Drexler, konuşmaları ve yazdığı kitapları sayesinde nanoteknoloji terimi daha önemli bir şekilde ilim gündeminde yer almıştır. Bu olaylardan sonra her geçen yıl nanoteknoloji alanında büyük gelişmeler sağlanmıştır. 1981 yılında Gerd Binnig ve Heine Rohrer, atom tünelleme etkisini kullanarak, taramalı tünelleme mikroskobu üretip iletken yüzeylerde atom dizilimi icat etmeyi başarmışlardır.

1986 yılında Atomik Güç Mikroskobu (AFM) yapıldı ve arkasından 1991 yılında Sumio Iijima tarafından karbon nanotüpler keşfedildi. Yeni nesil araştırmalar, 1993 yılında Mounji Bawendi tarafından tasarlanan yeni metotla beraber nanokristallerin sentezini kontrollü bir şekilde geliştirmiştir. Araştırmalar sırasında 1998 yılında Beyaz Saray Ulusal Bilim ve Teknoloji Konseyi nanoteknoloji üzerine kurumlar arası çalışma konseyi oluşturmuştur. Arkasından, nanoteknoloji araştırmalarını organize hale getirmek amacıyla 2000 yılında Amerika'da Bill Clinton, Federal Ar-Ge çalışmalarını nanoteknoloji üzerine koordine ederek ABD Ulusal Nanoteknoloji Girişimi (NNI) projesini başlatmıştır. 2006 yılında ise Rice Üniversitesi'nde James Tur ve arkadaşları küresel C60 fulleren (buckyball) tekerlekler ile bir nano araba inşa etmişler ve 2009

yılında New York Üniversitesinde Nadrian Seeman ve grubu DNA şeklinde olan nano robot üretimini gerçekleştirmişlerdir. Nanoteknolojinin yeni sanatı olan mavi LED teknolojisi Akasaki ve arkadaş grubu tarafından 2014 yılında keşfedilmiş ve bu keşif onlara nobel fizik ödülü kazandırmıştır. Betzig ve arkadaşları 2014 yılında yüksek çözünürlüklü floresan mikroskopu geliştirerek Kimya Nobel Ödülü kazanmışlardır (Erkoç 2007).

1.3. Nanopartiküller

1 mikro metreden daha küçük boyuta sahip olan parçacıklara nanopartikül denilir. Nano parçacıkların yüzey alanları mikro boyuta göre oldukça büyüktür (Kawaguchi, 2005). Nanopartiküller biyoaktif molekülerin enkapsulasyonu ve yüzey alanları vasıtasıyla immobilizasyonunu gerçekleştirmektedir (Orive 2003).

Nanopartiküller enzim immobilizasyonu konusunda çeşitli özellikler sağlamaktadır ki bu özellikler özet olarak:

Kararlılık: Nanopartiküller taşıdıkları biyoaktif moleküllerin kararlı bir şekilde gelmesini sağlar.

Yüzey alanı: Mikropartiküllerle kıyasla çok daha geniş bir yüzey alanına sahipler.

Boyut: Boyutlarından dolayı hücre tarafında fagositoz olabilir ve uzun süre kan dolaşımında kalabilmekteler.

Modifikasyon: Çeşitli boyutlar ve çeşitli polimerik kaplama kabiliyetlerine sahip bir durumdadırlar.

Taşıma: Taşıyıcı sisteme gerek duyulmadan hedef bölgeye direk enjeksiyon yapılır (Kahraman 2008).

1.4. Enzimler ve Tarihçesi

Enzimler, protein yapılı biyokatalizör olarak canlı sistemlerinde gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonlarda önemli rol almaktadırlar. Bu biyokatalizörler proses içerisinde enerji gereksinimini düşürerek kimyasal katalizörlerin aksine, düşük sıcaklıklarda genel olarak 20 ile 40°C ve atmosfer basıncında, sulu çözeltiler normal koşullar altında reaksiyonlara katılarak, reaksiyonları katalize etme kabiliyetine sahiptirler. Enzimlerin çalışma ortamındaki optimum pH değer aralıkları genellikle 5.0-9.0 olarak bilinmektedir. Enzimler tarafından gerçekleştirilen reaksiyonlarda kimyasal katalizörler ile gerçekleşen reaksiyonlar arasında sık sık karşılaşılan bozulmalar, izomerizasyon ve yeniden düzenlenme gibi yan tepkimeler ile karşılaşmamaktadır. Biyokatalizörler ile meydana gelen reaksiyonlar kimyasal katalizörle göre 10^8 - 10^{10} kat daha hızlı kataliz ederler. Kimyasal katalizörler genel olarak, normal koşullarda %0,1-10 derişim aralığında kullanılırlar fakat biyokatalizörler aynı katalitik tepkimeleri 10^{-3} ile 10^{-4} derişimin de gösterebilmektedirler (Tiryaki 1993; Kennedy 1995; Faber 2000; Bakkal 2006).

Enzimlerin çalışması genel olarak *in vivo* ve *in vitro* koşullarında farklılık göstermemektedir. İki ortamında sağlandığı şartlar altında aynı aktiviteyi göstermektedirler ve cansız dokularda çalışma imkanı sağlamaktadırlar.

Bu sırada enzimlerin birçok endüstriyel ve biyolojik alanda kullanımı yaygın hale gelmiştir ve hücre yapısında önemli metabolik görevleri de vardır. Çizelge 1.1'de tıp, eczacılık, tarım, hayvancılık, çevre, gıda, kağıt, tekstil, deterjan vb. birçok alanda kullanıma uygunluk göstermektedir (Gezer 2009).

Özet olarak enzimlerin başlıca özellikleri şu şekilde sıralanabilir:

- Enzimler genellikle protein yapısındadır.
- Enzimler hem canlı hemde cansız ortamda faaliyet gösterirler.
- Enzimler reaksiyonları defalarca katalizleme kabiliyetine sahiptirler.

- Katalizlenme reaksiyonu sırasında aktivasyon enerjisi düşmektedir.

1.5. Enzim Özellikleri

Enzimler genel olarak protein yapısındadır. Enzimlerdeki katalitik aktivasyon sayesinde doğal protein konformasyonu meydana gelmektedir. Enzimlerin alt gruplara ayrışması ve her türlü yapısal bozulmaları aktivite gücünün kaybı anlamındadır. Bu ayrışmalar aminoasit şekline dönüşüm anlamındadır. Bu yüzden enzimlerin yapısı birincil, ikincil ve üçüncül boyutlu sisteme geçebilecek şekildedir. Bu yapılar sırasıyla primer, sekonder katlanmaya maruz kaldığı zaman tersiyer ve daha kompleks durumlarda kuarterner şekle dönüşerek aktivasyon enerjisi göstermektedirler (Lehninger 2005).

Enzimlerin bazıları yalnız protein yapısında olmasına rağmen çoğu enzimler yapı ve işlev bakımından iki farklı gruba ayrılmaktadır. Bu iki farklı gruptan biri protein yapısı diğeri ise kofaktördür. Kofaktör genelde Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} ve Cu^{2+} gibi bir metal iyonu veya koenzim yani ikinci enzim olarak adlandırılan organik veya metaloorganik kompleks bir moleküldür.

Katalitik olarak aktif olan metal iyonları veya koenzim ile enzim kompleksine holoenzim ve holoenzimin protein kısmına apoenzim denir. Apoenzim kendinden aktif değildir. Kovalant bağlarla enzime bağlanan (kofaktörler) prostetik grubu olarak adlandırılır ve aynı reaksiyonu katalizleyen enzimlere izoenzim ismi verilmektedir. Kofaktör görevi yapan metal iyonları substrat ve enzim arasında köprü görevi üstlenerek enzim ve substrat arasında bağ oluşturmaktadır (Lehninger 2005). Enzim reaksiyona girmek için kendi aktif bölgesi ile substrat denen moleküle bağlanır.

Çizelge 1.1. Enzimler için kofaktör olarak görev yapan bazı inorganik elementler ve enzimler

Kofaktör	Bulunduğu Enzim/Enzimler
Cu^{2+}	Sitokrom oksidaz
Fe^{2+} ve Fe^{3+}	Sitokrom oksidaz, Katalaz, Peroksidaz
K^+	Piruvat kinaz
Mg^{2+}	Heksokinaz, Glukoz-6-fosfataz, Piruvat kinaz
Mn^{2+}	Arjinaz, Ribonükleotit redüktaz
Mo	Dinitrogenaz
Ni^{2+}	Üreaz
Se	Glutasyon peroksidaz
Zn^{2+}	Karbonik anhidraz, Alkol dehidrogenaz, Karboksipeptidaz A ve B

1.6. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) organizasyonu tarafından bir adlandırma sistemi belirlenmiştir. Sistematik adlandırmada enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması için enzimleri 6 ana ayırmaktadır.

Enzimlerin geleneksel adlandırılması aktif veya inaktif olmasına göre yapılmıştır. Adlandırmak için inaktif olması koşuluyla substrat arkasından “-jen” veya önüne “pro-“ eki getirilerek gerçekleşir. Örnek olarak pepsinojen, prokarboksipeptidaz vs. gibi adlandırmalar yapılmıştır. Enzim aktif durumda ise etki ettikleri substratın isminin tanım olarak son kısmına (-az) eki ve etki gösterdiği reaksiyon türüne bağlı olarak adlandırılmıştır.

Ayrıca bu isimlendirmeler substrattan da etkilenmektedir yani enzimler reaksiyona girdikleri substratın isminin sonuna –litik eki eklenerek de isimlendirilmektedir. Mesela,

proteinleri hidroliz eden enzimlere “proteazlar” denilebildiği gibi “Proteolitik Enzimler” de denilir. Enzimlerin adlandırılması IUPAC tarafından yapıldığında ise etki ettikleri reaksiyonlara göre de sınıflandırmaktır. Her enzim için 4 rakamlı Enzim Kod Numarası (E.C.) verilmektedir. Örneğin lipazlar için (E.C.3.1.1.3) kod numarası uygulanmaktadır. Mesela E.C: 3.6.1.3 “ATP Fosfohidrolaz” enziminde ilk olan 3 numara sınıf adı göstergesi, 6 olan numara alt sınıf, 1 olan numara grup numarası, dördüncü konutta olan 3 numara enzimin kendine özgül sıra numarası göstermektedir (Nelson 2005; Doğan 2008; Sümengen 2011).

Çizelge 1.2. Enzim grupları, fonksiyonları ve katalizledikleri tepkimeler

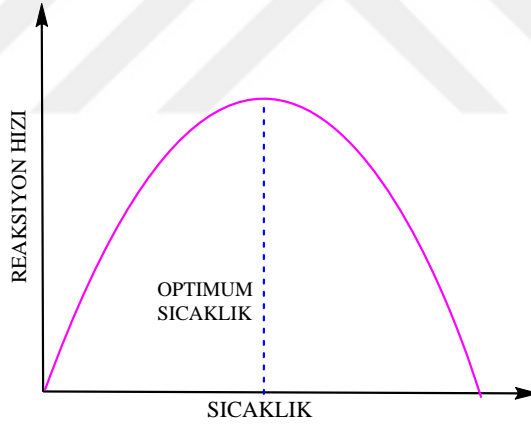
Enzim grubu	Fonksiyon	Tepkime
Oksidoredüktazlar	Yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzimler	Dehidrogenazlar Oksidazlar $S_{ind} + S'_{yük} \rightleftharpoons S_{yük} + S'_{ind}$
Transferazlar	Haricindeki grupların transferini katalizleyen enzimler	$S-G + S' \rightleftharpoons S + S'-G$
Hidrolazlar	Ortama su katılmasıyla hidroliz reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir	Lipaz, esteraz, fosfataz, glikozidaz, nükleaz vs.
Liyazlar	Çift bağların oluşturulduğu tepkimeleri katalizleyen enzimlerdir	Oksidasyon veya hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan bazı grupların uzaklaştırılması
İzomerazlar	Optik ve geometrik izomerleri birbirine dönüştürme reaksiyonunu katalizleyen enzimdir	İzomeri faz değişimi
Ligazlar	İki molekülün bağlanma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir	Enerjice zengin bir bağın kopması ile ortaya çıkan enerji kullanarak

1.7. Enzim Reaksiyonunun Hızında Etkili Faktörler

Enzimler üzerine bazı dış koşullar etkilidir. Bu etkin faktörler özet olarak:

1.7.1. Sıcaklık

Sıcaklık etkisi her reaksiyonda olduğu gibi atomlar arasındaki kinetik enerjinin artması ile gerçekleşir. Yani sıcaklığın artmasıyla moleküller arasındaki çarpışmanın artışına bağlı olarak tepkimenin hızı da artmaktadır. Reaksiyon maksimum hıza ulaşıldığında sıcaklığın artması sistemdeki aktivitenin azalmasına neden olur ve bu nedenle en yüksek çarpışma oranı optimum sıcaklığı göstermektedir. Bu nedenle enzim stabilitesi sıcaklıktan etkilenmektedir.



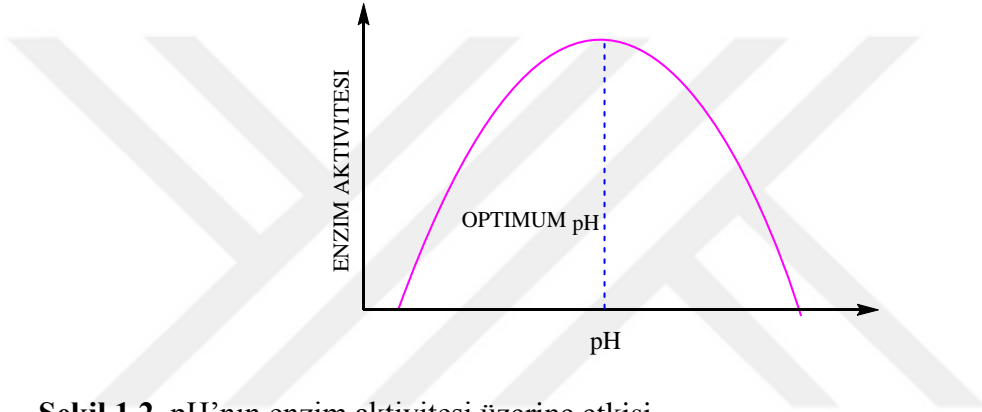
Şekil 1.1. Sıcaklığın enzim reaksiyon hızına etkisi

1.7.2. Zaman

Enzim içeren bir reaksiyonda zamanla reaksiyon hızı artmaktadır, reaksiyondaki ürünler zamanla tüketilir ve substrat miktarı azalır.

1.7.3. pH

Reaksiyonlarda çok etkili olan faktörlerden biri ortamdaki hidrojen iyon miktarıdır ve her enzimin aktivitesi ortamdaki H^+ iyonlarına göre değişmektedir. Her enzimin maksimum bir aktiviteye sahip olduğu bir pH değeri vardır. Bu değere enzimin optimum pH değeri denilmektedir. Enzimin üç boyutlu yapısını koruduğu pH enzimin stabil pH sı olarak adlandırılır.



Şekil 1.2. pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi

1.7.4. Enzim konsantrasyonu

Enzim konsantrasyonunun enzim hızına etkisi, ortamda yeterince substrat olduğunda, enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artar.

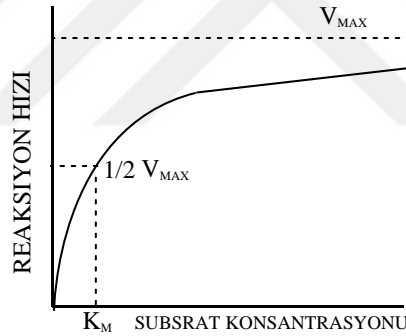


Şekil 1.3. Enzim konsantrasyonunun enzim reaksiyon hızına etkisi

1.7.5. Substrat konsantrasyonu

Substrat miktarı enzim konsantrasyonu ile orantılı olarak değiştiğinde ise tüm substrat bittiğinde tepkime hızı maksimumda sabit kalır.

Enzim katalitik aktivite gücü Enzim-substrat kompleksi (ES) oluşunca meydana gelir. Enzim konsantrasyonu sabit tutulduğu zaman hız kontrolü substrat konsantrasyonuna bağlı kalır ve bu koşulda ulaşılan maksimum hız oranı V_{max} olarak adlandırılır. Enzim aktivasyon hızı, reaksiyon hızının sabitlenmesinde ölçülür. Reaksiyon hızı sabitlenmesi ve substrat konsantrasyonunun maksimum olması ilk hızın sabit kalmasına neden olmaktadır. Reaksiyon hızının $V_{max}/2$ değerine ulaştığı andaki substrat değerine Michaelis Konstantı denilir ve K_M ile gösterilir.



şekil 1.4. Substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi

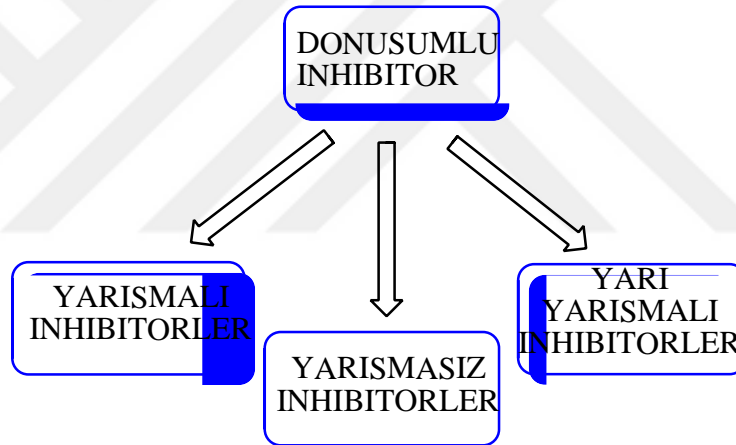
K_M değerinin önemi;

- K_M değeri enzimlerin önemli karakteristiklerindedir.
- Substrat için kullanılan K_M değeri aslında enzimin afinite göstergesidir. Ama bu değer afinite ile ters orantılıdır. Düşük K_M değerinde substrat için yüksek afinite miktarına sahiptir. Çünkü düşük substrat konsantrasyonunda maksimum hıza ulaşmaktadır.
- Metabolizmalarda düşük K_M değerine sahip enzimler çok önemlidir.

➤ K_M değeri enzimler üzerine etki sağlayan inhibitörler hakkında da bilgi vermektedir. Enzim üzerine bir inhibitör etki ediyorsa K_M değeri inhibitörün etki tarzı hakkında bilgi verir. K_M değeri; enzimin aktif olan bölgesinin yarısının dolu olduğu substrat konsantrasyonunu göstermektedir.

1.8. Enzim İnhibitörleri

Enzimatik tepkimeleri yavaşlatıp veya durdurabilen maddeler enzim inhibitörleri olarak adlandırılır. Bu tür inhibitörler 3 genel gruba ayrılmaktadır. Bu gruplar dönüşümlü, dönüşümsüz ve allosterik inhibitörler olarak adlandırılır.



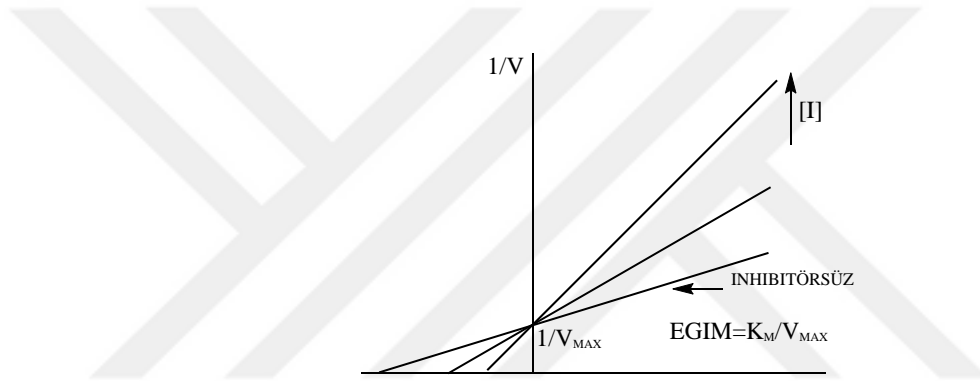
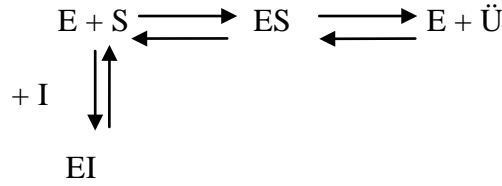
Şekil 1.5. Enzim aktivitesini etkileyen inhibitör türleri

İnhibitörler grubunda dönüşümlü inhibitörler de 3 alt gruba ayrılır. Bu gruplar yarışmalı, yarışmasız ve yarı yarışmalı inhibitörlerdir.

1.8.1. Yarışmalı inhibitörler

Bu tür inhibitörler enzime bağlanmak için substratla yarışır. Bu inhibitörlerin yapısı substratla aynı olduğu için enzimin aktif bölgesine bağlanarak substrat bağlanmasını engeller. İnhibitöre bağlanmış enzim, oluşan enzim inhibitör (EI) kompleksi sayesinde

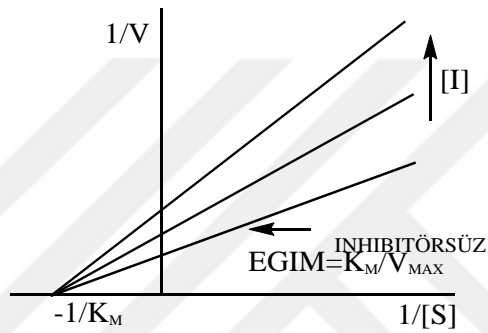
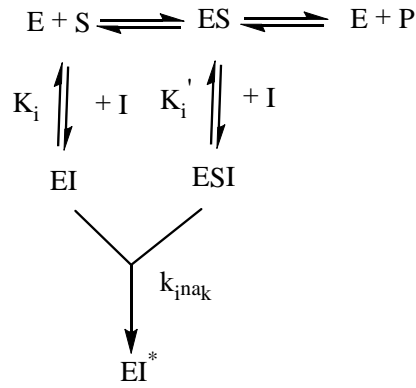
ürün oluşmaz ve sadece substrata bağlanmış olan enzim oranında ürün oluşturmaktadır. Substrat konsantrasyonu artırılması ile inhibisyon etkisi azalır. Böylece V_{max} değeri sabit kalır. İnhibitör bulunduğu ortamda enzimin substrata olan duyarlılığı azalır ve K_M değeri düşer.



Şekil 1.6. Yarışmalı Linewear burk inhibisyon grafiği

1.8.2. Yarışmasız inhibisyon

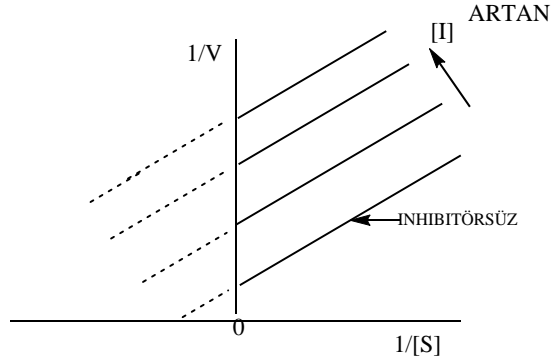
Yarışmasız inhibitörler, yarışmalı inhibitörlere göre enzim aktif bölgesi dışında bir bölgeye bağlanmayı tercih etmektedir. Onun için enzimin aynı anda hem substrat hemde inhibitöre bağlanma şansı vardır. Bu işleme yarışmasız inhibisyon adı verilir. Bu süreçte substrat konsantrasyonunun artırılması inhibisyonu ortadan kaldırmaz sadece V_{max} değeri azalır ve K_M sabit kalır (Nelson 2005).



Şekil 1.7. Yarışmasız Lineweaver burk inhibisyon grafiği

1.8.3. Yarı yarışmalı inhibisyon

Bu inhibisyon türünde ise inhibitör tipinde inhibitör serbest enzime değil, sadece ES kompleksine bağlanabilir. Bu yarışma türünde inhibisyon varlığında substrat konsantrasyonunun artmasıyla inhibisyon artar. İnhibitör varlığında ortamdan sürekli ES kompleksi uzaklaştığı için K_M azalır. Aynı zamanda ortamda ESI kompleksi sürekli var olacağından V_{max} değeri de düşer.



Şekil 1.8. Yarı yarışmalı Lineweaver burk inhibisyon grafiği

1.9. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, hücre içinde gerçekleşen reaksiyonları, sentezlenen canlı organizmaların oluşumunu gerçekleştiren ve oluşum prosedüründe protein yapısı vasıtasıyla uyumlu bir koordinasyon sağlayan özel katalizör olarak görev yapar (Kotwal 2009).

Enzimler genelde suda çözünebilir materyallerdir ve aynı zamanda sıvı ortamda oluşan çözeltilerde katalizör görevi yapmaktadır. Kullanılmış olan enzim reaksiyon sonunda geri kazanımı mümkün değildir ve inhibe olmadan geri kazanılamazlar. Reaksiyonun hızını kontrol altına alabilmek için ortama inhibitör ilave edilebilir. Öte yandan serbest enzim reaksiyon ortamında kirlilik olarak algılanabilir ve her türlü inhibitör eklendiğinde bu kirlilik çoğalmaktadır. Başka bir açıdan serbest enzimler sürekli olarak sistemde kullanılamaz ve bu sıkıntılardan dolayı enzimler pahalı katalizörler haline gelmiştir (Govardhan 1999; Palmer 2007; Aydar 2012).

Teknolojinin ilerlemesi enzimlerin bahsedilen sorunlarını çözmek amacı ile enzim immobilizasyon yöntemlerini ortaya koymuştur (Aksoy 2003).

Enzimler su ortamında çözülmez olan bir taşıyıcıya fiziksel, kimyasal veya başka yöntemlerle bağlandıktan sonra sulu ortamda çözünmez hale gelir ve bu reaksiyon bir kopolimerizasyon reaksiyonudur ki enzim bir monomer olarak görev üstlenir. Suda

çözünmez bir matris ya da mikro kapsül şeklinde tutuklanarak immobilize olur (Zaborsky 1973).

Enzimler genelde sanayi çapında kullanılırsa birçok avantaj sağlamaktadır ama üretim sürecinde çıkan sorunlardan dolayı proses pahalı bir şekilde gerçekleşir ve bu sorunlar immobilizasyon yöntemiyle ortadan kaldırılarak ürün maliyeti daha düşük olmaktadır. Biyokatalizörlerin kullanım sürecinde biyoproseslerin ekonomik olması gerekmektedir. Bu konuda en etkin katalizör seçilmesi ve bu katalizörün sürekli sistemlerde defalarca kullanım kabiliyetine sahip olması şarttır. İmmobilize enzimler sürekli reaktörlerdeki proseslerde uzun süre ve kesikli reaktörlerde defalarca kullanılabilir. Bu süreçte enzim yapısının kararlılık oranları yükselerek reaksiyon ortamından uzaklaştırılması ve ayrıştırılması daha kolaylaştırmakta ve üretim maliyetini düşürmekte ve böylece substrat verimliliği artmaktadır (Aktsiptrov 2002; Bakkal 2006; Dennler *et al.* 2008; Cui *et al.* 2010).

Özet olarak immobilizasyon işlemi, enzime tekrardan kullanılabilirlik kabiliyeti sağlayarak enzimin işlevsel alanını geliştirmek ve enzimlerin aktivitesini kararlı bir hale getirmek için önemli bir parametre sayılmaktadır (Chang *et al.* 2008).

Lipazın immobilizasyonu enzimin çözünmez olmasına neden olur ve böylece reaksiyon sonrası ayrışması çok daha kolaylaşmaktadır (Tischer and Wedekind 1999; Kim *et al.* 2000; Oh *et al.* 2007).

İmmobilize olmuş çözünmez olan enzimler, serbest enzimlere göre farklı özelliklere sahiptirler. Bu özellikler;

1. Reaksiyondan sonra ortamı kirletmeden sistemden çıkarılabilmesi ve ürünlere hiç bir yan etki yapmazlar.
2. Çeşitli reaksiyon ortamlarında dayanıklıdır.
3. Defalarca kullanım imkanına sahiptirler.
4. Kesintisiz reaksiyon kabiliyetine sahiptirler.

6. Serbest halde olan enzimlere göre daha kararlılar.
7. Kontrollü bir üretim mümkündür.
8. Ardışık çok aşamalı reaksiyonlar gerçekleştirebilirler.
9. Bazı reaksiyonlarda gösterdikleri aktivasyon serbest enzimlerden çok daha fazladır.
10. Enzimin otoliz yani parçalanma ihtimali düşüktür.
11. Mekanistik çalışmalar için uygundur.

İmmobilizasyon yöntemi gıda teknolojisi, biyoteknoloji, farmakoloji, analitik kimya, fermantasyon endüstrisi gibi çeşitli işlemlerde enzimleri yeniden kullanılmak üzere işlevsel duruma getirmiştir (Govardhan 1999; Palmer 2007; Aydar 2012).

Enzim immobilizasyonundaki amaç, enzimi tepkimeden uzaklaştırmak ve aynı zamanda immobilizasyon sonucunda enzimin aktivitesini kaybetmemesidir.

İmmobilize enzimler çeşitli çevre koşullarında daha dayanıklıdır ve reaksiyon sonunda ortamdaki kolayca uzaklaştırılması ürünün enzimle kontamine olmasını engeller, çünkü enzim yapının matriksinde yer alır. Bu özellik pahalı enzimler için büyük bir avantaj sayılır.

Enzimler tekrardan kullanılabilir, ayrıca ürün oluşumu kontrollü bir şekilde gerçekleşir.

Aynı anda birden fazla enzimin immobilize olması mümkün olduğundan dolayı birden fazla reaksiyon gerçekleşebilir. Serbest immobilize enzimin kararlılığının artması sonucunda enzimin kendi kendini parçalama olasılığı düşer (Zaborsky 1973).

İmmobilize enzimlerde bazı dezavantajlarda görülmektedir:

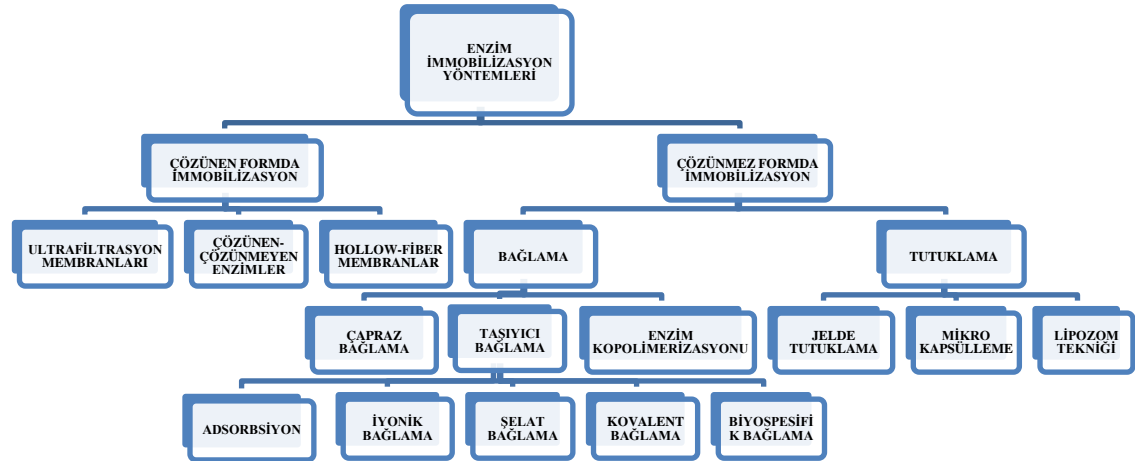
- İmmobilizasyon işlemi boyunca enzim aktivitesini kaybedebilir.
- Taşıyıcı materyallerin kullanımı, işlem toplam maliyetini artırır.
- Çok basamaklı immobilizasyonlarda enzim kararlılığı sınırlıdır.

Enzim immobilizasyonu destek materyal kullanılmadan zordur ve kullanılacak destek materyalinin sahip olması gereken özellikler ise;

- Fiziksel, kimyasal ve biyolojik kararlılığa sahip olmalıdır.
- Toksik olmayan ve büyük yüzeyel alanları olmalıdır.
- Gereken fonksiyonel grupları içermelidir.
- Hidrofobik karakter, çözünmez olmalı ve yüksek tutuculuğa sahip olmalıdır.
- İyon değiştirebilme kabiliyeti yüksek seviyede olması.
- Şişme kabiliyetinin düşük olması, mekanik dayanıklılık kabiliyeti yüksek olmalıdır (Doğan 2008).

1.10. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

İmmobilizasyon için enzime uygun bir taşıyıcı ve immobilizasyon yöntemi seçilmesi gereklidir. Enzimlerin immobilizasyonları çeşitli şekillerde sınıflandırılmaktadır.



Şekil 1.9. Enzim immobilizasyon yöntemleri

1.10.1. Çözünmez immobilizasyon yöntemleri

Bu yöntemin bağlama ve tutuklama adı altında 2 çeşidi vardır.

1.10.1.a. Bağlama

Bağlama eşitleri; çapraz bağlama, taşıyıcı bağlama ve enzim kopolimerizasyonu olmak üzere 3 gruba ayrılır.

i. Çapraz bağlama

Çapraz bağlama immobilizasyon yönteminde küçük moleküllu bi- ya da multi- işlevsel reaktiflerin enzimlerle bağlanarak sulu ortamda çözünmeyen bir kompleks haline gelir ve artık kararlı bir yapıya geçer (Govardhan 1999). Çapraz bağlama immobilizasyon prosesinde bir dereceye sahiptir ki bu derece protein ve reaktif değişimi, immobilize olacak enzime ve pH değerine bağlıdır.

Karbonildiimidazol, *L*-glutaraldehit, kloroformat ve bioksiranlar reaktifleri ile ara kol vasıtasıyla enzim matrikse bağlanır. Enzim molekülleri arasında oluşan bağlar bu reaktifler sayesinde gerçekleşir. Çapraz bağlanmalar genel olarak diaminler karboksil gruplarında ve glutaraldehit enzim molekülleri ile amino grupları arasında gerçekleştirilmektedir.

Çapraz bağlama yöntemleri;

- (CLE) Direkt apraz tutunma
- (CLEA) apraz bağlı enzim agreatları
- (CLEC) Kristallenmiş apraz bağlar
- (CSDE) apraz bağlı püskürtülerek kurutulmuş enzimlerdir.

ii. Taşıyıcıya bağlama yöntemleri

Taşıyıcıya bağlamada enzim molekülünün yapısında mevcut olan fonksiyonel, iyonik ve hidrofobik gruplar tarafından gerçekleştirilir. Taşıyıcıya bağlama yöntemleri;

adsorbsiyon, iyonik, şelat, kovalent ve biyospesifik bağlama olmak üzere 5 gruba ayrılmaktadır.

iii.Adsorbsiyon

Adsorbsiyon yöntemi ile immobilizasyon en çok kullanılan, en basit ve en kolay immobilizasyon yöntemidir. Fiziksel adsorbsiyonda enzim destek materyaline hidrojen bağları, Van der waals ve hidrofobik etkileşimler gibi zayıf bağlarla bağlanmaktadır. Adsorbsiyon yöntemi ile immobilizasyonda suda çözünmeyen bir absorban, enzim çözeltisi ile karıştırılır ve bağlanmayan enzim yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır. Bu süreçte destek materyalinin aktifleştirilmesi veya pasif kalması söz konusu değildir (Alptekin 2009).

Enzimlerin immobilizasyonunda en çok kullanılan destek materyalleri diatome toprak, aktif gözenekli yapılı cam, karbon grupları, kalsiyum karbit, silika jeller, kalsiyum fosfat, bentonit tozu, nişasta, gluten, kül ve kolodyum olarak bilinmektedir. Bir enzimin suda çözünmeyen taşıyıcıya bağlanma oranı, pH, çözücü kabiliyeti, iyon şiddeti, enzim-çözücü oranı ve sıcaklık gibi parametrelere bağlıdır. Ancak destek materyali ile enzim molekülü arasındaki bağlar protein kaçışını engelleyecek kadar kuvvetli olmalıdır.

iv. İyonik Bağlama

Bu yöntemde biyokatalizörlerin yüklü grupları destek materyalin karışık yükleriyle elektrostatik etkileşimlerle bağlanmasıyla gerçekleşmektedir. İyon değiştirme yeteneğine sahip olan enzim, suda çözünmez taşıyıcıya iyonik olarak bağlanabilir (Chibata *et al.* 1972).

İyonik bağlamada da diğer yöntemler gibi gerçekleşen immobilizasyon, enzimin destek materyaline bağlanması için kullanılan tampon malzemesi, iyonik şiddet, pH ve sistemin sıcaklığına bağlıdır. Immobilizasyon normal koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonu ve aktivite merkezinde bir değişiklik meydana gelmez ama çok

kuvvetli bağlarla bağlanmadığı için enzim kaçıışı gerçekleşebilir. İyonik bağın oluşumu için enzim çözeltisinin taşıyıcı materyal bir süre karıştırılır. Genellikle kullanılan iyon değiştiriciler DEAE-selüloz ve DEAE-sefades' dir.

Şelat Bağlama

Şelat bağlama bazı geçiş metallere sahip olmasından dolayı enzimlerin organik ve inorganik taşıyıcı maddelere bağlanmasını mümkün kılmaktadır. Bu yöntemde asıl rol oynayan enzim destek materyalleri titan (III-IV), zirkonyum (IV) gibi geçiş elementleridir (Alptekin 2009).

Kovalent Bağlama Yöntemi

Bu tür bağlanma biyokatalizör ve suda çözünmeyen destek materyali arasındaki bağın kararlı olması ve enzimin destek materyalden daha kolay ayrılabilmesi özelliklerine sahiptir. Kovalent bağlarda atomlar ve elektron çiftleri ortaklaşa görev yapmaktadır. Destek materyali ile biyokatalizör arasındaki bağ bağlayıcı ajanların kullanılmasıyla gerçekleşmektedir. Kovalent bağlı immobilizasyonda, enzimin destek materyalin aktif bölgesine bağlanmaması ve bağ reaksiyonunun sterik engellemeler ile enzimatik aktiviteyi düşürmeyecek şekilde olmalıdır.

Kovalent bağla immobilizasyon yöntemi iki aşamada oluşur;

1. Destek materyalinin aktifleştirilmesi,
2. Enzimin kovalent bağ oluşturmasıdır.

Bu süreçte destek materyal suda çözünmemeli ve çok fazla suyu itmemelidir. Ayrıca ıslanabilmeli ve dış etkenlere karşı pasif olmalıdır. Seçilen destek malzemesi fiziksel ve kimyasal özellikleri immobilize olmuş enzimin aktivite oranını doğrudan etkilemektedir. Kovalent bağlama yönteminde enzim taşıyıcıdan sızmaz, destek

materyaline tutunduğu için taban malzeme ile kolaylıkla tepkime verebilir ve enzim kararlılığı yükselir (Doğan 2008).

v. Biyospesifik Bağlama

Biyospesifik bağlama yönteminde, çoğunlukla afinite ayırması prosedürlerinde kullanılan koenzimler, efektörler, inhibitörler, antikorlar ve lektinler gibi bileşikler ile biyokatalizörler arasındaki biyospesifik etkileşim esas işlemlerdendir. Etkileşim kuvvetli ise enzim ve bileşiklerden biri arasında konjugat oluşturarak destek materyaline bağlanmaktadır.

3. Enzim Kopolimerizasyonu

Bu süreçte biyokatalizörler, suda çözünmeyen bir destek materyal ile her türlü bağ kurarak, monomerlere benzer bir davranışla, matrikste yer alır. Bu yöntemde enzimin polimer matrikste tutuklanmasına benzemesiyle, enzim kaçışını önlemesi gibi bir avantaj sağlar (Yıldırım 2010).

1.10.1.b. Tutuklama yöntemleri

Tutuklama yönteminde enzimler taban malzeme ile reaksiyon ürünleri gibi başka moleküllerin geçişine engel olmaz, ancak enzim molekülü belli bir alan içerisine kapanır ve tutulduğu alandan dışarı hareket etmez. Bu yöntemde başka bir taşıyıcıya bağlanma özelliği diğer immobilizasyon yöntemlerine göre özgüdür. Ama bahisi geçen tutuklama yöntemi genel olarak üç gruba ayrılır. Bu gruplar; lipozom tekniği, mikro kapsülleme ve polimer matriksle tutuklanmadır.

Lipozom Tekniği

Bu yöntem ilk olarak 1968 yılında kullanılmıştır ve sıvı-yüzey yapıcı membranlar esasını temel almaktadır (Regen *et al.* 1984). Çapı 1-100 µm arasında değişen enzim çözeltileri damlacık içeren hidrokarbon çözücünün içerisinde yer alır ve ona çeşitli katkı maddeleri ve yüzey yapıcılar eklenir. Oluşan enzim çözeltisi damlacıkları çevresinde oluşturduğu sudaki çözünmeyen faza sıvı yüzey yapıcı membranlar denir. Bu membranların oluşumundan sonra tek adımda birden fazla enzimin immobilizasyonu gerçekleşir ve oldukça geniş bir temas yüzeyi oluşturur. Ama bu yöntemin dezavantajları da vardır ve taban malzeme ve ürünün membrandan geçişinin çözünürlük kabiliyetine bağlıdır. Ayrıca sıvı olan membrandan enzimin kaçma imkânı vardır.

Mikro Kapsülleme Yöntemi

Büyüküğü 1-100 µm olan enzimlerin yarı geçirgen membranlar içinde yer alması mikrokapsülleme olarak adlandırılır. Mikrokapsülleme yönteminde taban malzeme moleküllerinin boyutuyla immobilize enzimin verimlilik oranı tamamen ters orantılıdır. Bu yöntemde mikrokapsül malzemesi olarak en yaygın naylon ve selüloz nitrat kullanılmaktadır (Alptekin 2009). Mikrokapsülleme işleminde küçük gözeneklerin boyutu ve kapalı olmasından dolayı immobilize enzimin aktivitesinin serbest enzim aktivitesinden daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Polimer Matrikste Tutuklama

Polimerizasyon ve çapraz bağlama oluşturduğu ortamın enzim çapraz bağlanma sonucunda enzim polimer matrikse tutuklanır ve enzim molekülleri polimerleşme sonucunda çapraz bağlar arasında tutuklanır ve enzim kaçışı engellenir.

1.10.2. Çözünür formda immobilizasyon

Bu yöntemde enzim etrafında sıvı geçişi imkânı sağlarken enzim geçişini engelleyen bir tabakayla sarılır ve enzim hareketi sağlanır. Bu yöntemde çözünür formda immobilizasyon tekniği denir (Weethall 1976).

İmmobilizasyon yönteminin örneklerinden ultrafiltrasyon membranları ve yarı geçirgen oyuk yapıya sahip olan elyaf membranları çözünür formda kullanılmaktadır. Enzim, destek materyaline herhangi bir bölgeden bağlanırsa esnekliğinden dolayı katalitik aktivite sabit kalmış, ama bu yöntemde bazen substratın membrandan geçip enzime ulaşamaması durumunda yöntemin etkinliği düşmektedir. Substrat boyutu, bu substrat molekülünün membrandan geçiş kolaylığı ve enzim etkinliği arasında ters bir orantı belirlenmiştir.

1.11. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması

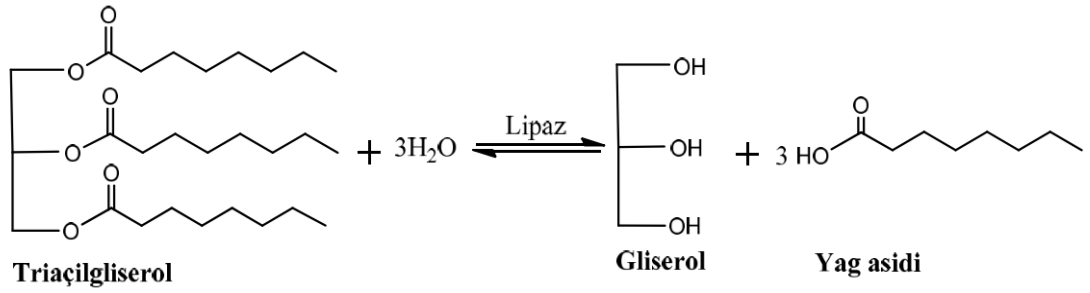
Enzimler için birçok sayıda immobilizasyon yöntemi bulunmasına rağmen, enzimleri meydana getiren bileşenlerin ve bu enzimlerin reaksiyon kabiliyetleri çok farklı oldukları için bütün enzimler için aynı yöntemi kullanmak uygun değildir. İmmobilizasyon işlemi sırasında ve sonrasında kullanılan enzimin aktif merkez yapısının bozulmaması için kullanışlı bir yöntem seçilmelidir. Seçilen bu immobilizasyon yönteminden yüksek aktivite elde etmek için kullanılan enzimin yapısının tanımlanmış ve uygun olması gerekmektedir.

Çizelge 1.3. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması

Özellik	Bağlanma Türü			
	Kovalent	İyonik	Adsorbsiyon	Çapraz
Bağ kurma türü	Kovalent	İyonik	Adsorbsiyon	Çapraz
Ön hazırlama	Sıkıntılı	Kolay	Kolay	Sıkıntılı
Enzim aktivite oranı	Çok	Çok	Az	Orta
Bağ kuvveti ve dayanıklılığı	Yüksek	Orta	Düşük	Yüksek
Serbestlik derecesi	Değişken	Sabit	Sabit	Değişken
Yenilenebilirlik Olasılığı	Yok	Var	Var	Yok
Uygulanabilirlik imkânı	Orta	Orta	Az	Çok
İmmobilizasyon masrafları	Çok	Az	Az	Az
Enzimin Mikrobiyal Etkilenmemesi	İmkânsız	İmkânsız	İmkânsız	Mümkün
Kararlılık oranı	Çok	Orta	Az	Çok

1.12. Lipaz Enzimleri

Lipaz 3 bileşim şeklinde mono, di-, tri- ve açıl gliserol hayvan, bitki ve mikrobiyal yağların ana bileşen yapısının, karboksil ve ester bağları hidroliz ayrılımı reaksiyonunun katalizlenmesini sağlayan enzimdir ve reaksiyon sonucunda ortaya çıkan ürünler karboksilik asitler ve alkollerdir (Bakkal 2006).



Şekil 1.10. Lipazlarda hidroliz reaksiyonunun şematik görüntüsü

Literatürlerdeki verilere göre biyoteknoloji alanlarında kullanılan enzimlerin ortalama %25'i lipaz enzimidir (Mutlu 2006).

Lipazlar genelde hidrolazlar sınıfında yer alır ve triaçil gliserol ve ester hidrolazları adını alır (Bakkal 2006).

Lipaz enzimi çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Mikroorganizmaların ürettiği lipazlar molekül ağırlıkları farklıdır ve 20-25 kDa ağırlığından 60-65 kDa kadar değişmektedir (Cygler and Schrag 1999).

Literatürlerden elde edilen sonuçlara göre; lipaz enzimlerinin α/β -hidrolaz reaksiyonuna katıldığı anlaşılmıştır. Katılım merkezleri çift taraftan da α -heliks ile katlanmış olan hidrofobik olan β -düzlem ve Ser-HisAsp/Glu adlı katalitik üçlüden olan aktif konum, ayrıca tek oksianyon aralıklı olan taban malzeme, karbonil gruplar üzerinde olan oksianyon büyümesini dengeli bir hale getirmektedir (Jaeger and Reetz 1998).

Lipazlar doğal şekilde bakteri, mantar ve kültür ortamlarından saflaştırılırlar. Lipazlar uzun zincirli şekilde büyüyen açilgliserol bileşimi sentezini de hızlandırır. Biyoteknoloji alanında lipazlar gıda katkı maddelerinde ve deterjanların üretiminde kullanılır. Bu yüzden lipazlar organokimyada önemli bir biyokatalizör olarak sayılmaktadır (Jaeger and Reetz 1998).

1.12.1. Lipaz enziminin fonksiyonları;

1. Düşük sıcaklıkta esterleşme,
2. Hidroliz ve trans esterleşme reaksiyonlarını katalizleme,
3. Sıvı kullanmadan aktifleşme, kofaktörsüz yüksek katalitik kabiliyetleri,
4. Geniş alan ve ucuz substrat seçim imkanı,
5. Yan ürün oluşturmamasıdır.

Endüstriyel ortamlarda kullanılan lipazlar serbest olarak üretilir ve reaksiyonlarda kullanıldıktan sonra etkisiz hale gelirler. Enzimlerin tekrar tekrar kullanılması üretimin maliyetini düşürmektedir. Enzimin kararlı bir yapıda olabilmesi için enzimatik ve immobilizasyon yöntemleri hizmete alınmaktadır (Paiva *et al.* 2000; Kamori *et al.* 2002; Bakkal 2006;). Lipazların kullanım alanları ve ilgili endüstriler Çizelge 1.4'de verilmiştir.

Çizelge 1.4. Lipazların endüstriyel kullanım alanları

Sanayi	İşlem	Yapım ve Uygulama
Deterjanlar	Yağların hidrolizi	Malzemeler yüzeyindeki yağları temizleme
Gıda sanayisi	Süt peynir ve tereyağı yağlarının hidroliz ve modifikasyonu	Ürün üretim ajanlarının etkinleştirilmesi
Ekmek pişirme	Un üretimi	Beyazlatma süresini uzatma
Bira ve meşrubat	Geliştirilmiş aromalar	Alkollü içecekler
Yemek paketleme	Kalite artırımı	Mayonez gibi sosların paketlemesi
Et ve balık	Tadını iyileştirme	Et ve balık sanayisinde yağ oranını düşürme
Yağlar	Esterleştirme ve hidroliz	Kakao tereyağları, margarin ve yağlı asitler
Kimyasallar	Sentezleme ve yönlendirme	Kimyasallar üretiminde izomerleşme
İlaç üretimi	Esterleşme, hidroliz	Sıvı ürünlerde sindirim güçlendirmesi
Kozmetikler	Sentezleme	Nemlendirici kremler
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri
Kâğıt	Hidroliz	Kâğıt kalitesi artırımı
Temizlik	Hidroliz	Yağ çözücü

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Lipazlar (E.C.3.1.1.3; trigliserol açilhidrolaz) bitkisel ve hayvansal yağların belirli koşullar altında tersinir hidrolizinin katalizini sağlayan enzimlerdir. Ayrıca transesterifikasyon ve esterifikasyon gibi reaksiyonları da katalizlemektedirler (Balcao and Malcata 1998; Paiva *et al.* 2000; Jaeger and Eggert 2002). Lipazlar endüstriyel alanda hidrolitik amaçlarda kullanımda olan enzimlerin ortalama %75'ini içermektedir. Lipazların en büyük ticari uygulaması çamaşır deterjanlarında kullanımınıdır. Deterjan enzimleri içerisinde lipaz piyasanın %32'sine sahiptir. Yılda üretilmiş olan 13 milyar tonluk deterjan içinde, yaklaşık 1000 ton lipaz bulunmaktadır (Sharma *et al.* 2001).

Lipazların endüstriyel ölçekte üretim maliyeti yüksektir. Lipaz enzimlerinin ilgili sanayilerde kullanımını sınırlayan en önemli etkenler düşük dayanım, aktivite kaybı ve reaksiyon seçicilikleridir. Dolayısıyla son yıllarda, lipazların hidroliz ve sentez reaksiyonlarındaki katalitik özelliklerinin geliştirilmesi amacı ile bazı kimyasal ve fiziksel işlemlere maruz tutulması gündeme gelmiştir. Buna ilave olarak moleküler biyoloji yöntemi ile enzimin farklı mikroorganizmalara klonlanması ile üretilerek maliyeti de düşürülebilmektedir. Böylece genetik özellikleri geliştirilmiş olan lipazların endüstriyel ölçekte üretimi sağlanabilmektedir (Villeneuve *et al.* 2000). Lipazlar bitkisel, hayvansal ve doğal veya genetik olarak iyileştirilmiş mikroorganizma kaynaklı olabilmektedirler. Düşük aktivasyon enerjileri nedeniyle lipazın katalizlediği reaksiyonlar daha düşük sıcaklıklarda ve nötral pH'larda gerçekleşebilir, enerji gereksinimi düşüktür. Enzimin ürün ve substratlara karşı aktiviteleri çok yüksektir ve bu aktivite özellikle substrat (yağ)-su ara yüzeyinde en yüksek dereceye çıkmaktadır (Villeneuve *et al.* 2000).

Günümüzde enzimlerin farklı alanlarında kullanılmaları yaygınlaşmıştır. Bu sebepten dolayı farklı birçok alanda lipazların önemi giderek artmaktadır. Lipaz enzimlerinin endüstriyel pazardaki payının büyümesinde, bu enzimlerin geniş substrat özgüllüğü gibi özellikleri etkili olmuştur. Lipazların en genel fonksiyonu yağları ve yağlardaki asidin esterlerini hidroliz etmektir. Enzimin, emülsiyon işlemini yağ-su geçiş fazından, oluşan

yüzeý alanına bağımlı bir şekilde katalizleyerek gerçekleştirir ve reaksiyon hızı enzim reaksiyon hızına bağılıdır. Lipazlar yağlı asitlerin doyma derecesi, zincir boyutu ve uzunluğu, yağ asidinin konumu ve durumu ve substrat fiziksel şekline uygun özellik gösterirler.

Lipazlar; bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilebildikleri yapılan araştırmalarda belirlenmiştir. Ancak endüstriyel ölçekte lipaz enziminin üretilmesinde daha çok mikrobiyal kökenli lipazlar tercih edilmektedir. Bunun sebebi ise; enzimin mikrobiyal kaynaklardan ekstraselüler olarak büyük miktarda üretimin mümkün olması ve diğer kaynaklara göre daha ucuza mal edilmesi, mikrobiyal kaynakların tercih edilmesinde önemli bir etkidir.

Lipazlar; genelde bakteri, maya ve küfleri içeren mikrobiyal flora vasıtasıyla bol miktarda üretilir. Lipazlar gıda endüstrisi, biyosensörlerin pestisit ve biyomedikal uygulamalarının yapımı, çevre yönetimi, deterjan ve deri sanayi, kozmetik ve parfüm sanayi gibi uygulama alanlarında kullanılır.

Günümüzde lipazların endüstriyel kullanımı yaygın hale gelmiştir ve biyoteknoloji alanında lipaz kullanımı çok hızla artmaktadır. Lipazlar endüstriyel ortamda mikroorganizmalar tarafından üretilir ve bunlardan en yaygın kullanılanlar *Candida sp.*, *Pseudomonas sp.* ve *Rhizopus sp.* olarak belirlenmiştir (Kıran vd 2006).

Lipazlar, ilk kez Clause Bernard tarafından 1856'da keşfedilmiştir. 1943 yılında bildirilen kan plazmasındaki lipoprotein lipazlar "Temizleyici Faktör" olarak tanımlanmıştır. Bir süre sonra Anfinsen temizleyici faktörü lipolitik enzimlerine bağılı olarak yorumlanmıştır. Ayrıca bakterinin birçoğunun lipaz üretim kabiliyetine sahip olması yaklaşık 100 yıl önce, C. Eijkmann tarafından tespit edilmiştir (Huang 2002).

Endüstriyel lipazlar, genellikle ekstraselüler olarak lipaz üreten mikroorganizma türlerinden sağlanmaktadır. Ancak mikroorganizmalardan kaynaklanan enzimlerin bitkisel ya da hayvansal olan enzimlerle kıyaslandığında, katalitik aktiviteleri daha

yüksek olması, beklenmeyen yan ürünler üretilmemesi, stabil yapılı ve ucuz maliyeti, çok daha fazla üretim imkanı gibi nedenlerle daha yaygındır (Wiseman 1987).

Serbest halde enzimin aktivitesini kaybetmeden kullanılan endüstriyel alanlarda tekrar kullanılması zorluk teşkil etmektedir. Serbest enzimle yapılan çalışmalarda enzimin istenildiği anda ortamdan uzaklaştırılması ve enzimin tekrar kullanımının sağlanması oldukça zordur. Saf halde bulunan enzimin tekrar kullanılması için yeniden izolasyonu gerekmektedir. Bu ve benzeri sorunları ortadan kaldırmak için enzim immobilizasyonu teknikleri geliştirilmiştir. Özellikle enzimin magnetik destek materyallerine immobilize edilmesi enzimin reaksiyon ortamından istendiğinde kolaylıkla uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (Cui *et al.* 2010).

Lipolitik enzimlerin aktivitesindeki düzey süt i ve süt yan ürünlerinin üretilmesinde önemli faktörlerden birisidir. Özellikle peynir üretiminde yüksek lipolizis oranı gereklidir. Peynir yapımında kullanılan rennin enziminin kütlesi, proteolitik lipaz enziminin oluşmuştur. 4 ila 10 karbon atomu içeren yağlı asitler, daha uzun bir karbon zincirine sahip olan yağ asitleri ile kıyaslandığında daha hızlı bir şekilde hidrolizlenip yağın serbest yapısına dönüşmektedir (Abbas vd 2002).

Ayrıca, lipazlar gıda sanayisinde en fazla aromalı tereyağlı çikolata üretimi, kremalar, karameller ve başka gıdalarda kullanılmaktadır. Lipaz enzimi; margarinler, fırın ve bitkisel ürünler, lipaz enzimi ile geliştirilmiş tereyağlarda aroma geliştiricisi rolü oynamaktadır.

Deterjan sanayisi üzerinde araştırma yapılan ve en yaygın çalışılan alanlardan birisidir. Elbiselere bulaşan kirlilikler genelde proteinler, yağlar ve karbonhidrat yapılarına sahiptir. Bu lekeler ancak yüksek sıcaklıklarda kimyasal deterjanlar tarafından temizlenir. Enzimlerin kullanılmasıyla düşük sıcaklık ve daha az mekanik müdahale ile aynı temizleme etkisini sağlamaktadır. Ayrıca çimen, kan, süt ve ter lekelerini çıkarmasında biyolojik olmayan deterjanlara kıyasla çok daha etkilidir.

Deterjanlarda kullanılacak olan kirlerin temizlenmesine yardımcı olacak olan enzimlerin bazı özellikleri taşıması şarttır. Ayrıca her türlü kirlenme unsuruyla karşılaştığında enzimin aktivasyonu ile etkisizleştirilirler. Mesela proteazlar, kan gibi lekelerin proteinlerini parçalar ve yapısını etkisiz hale getirerek çıkarır. Lipazlar ise; lipolitik aktivitelerinden dolayı yağ bazlı lekelerin çıkmasına etkindir (Hiol *et al.* 2000).

Yağların oldukça farklı kompozisyonlarını hidroliz edebilmeleri, pH 10- 11 ve 30- 60°C gibi yıkama şartları altında dayanıklı olmaları ve deterjanların kompozisyonunda bulunan proteazlar gibi enzimlere ve lineer alkil benzen sülfonat gibi yüzey aktif maddelere karşı dayanıklılıkları lipazların deterjan endüstrisinde kullanılmalarını sağlamıştır. 1988 yılında NOVO/Nordisk firmasının Lipolase TM ürününü pazara çıkması lipazların deterjan sanayisinde uygulamasında çığır açmıştır (Gül 2013).

Lipazlar dericilik sanayisinde de kullanılmaktadır. Lipaz enzimi, deri yüzeyinde ve içindeki yağları temizleyerek, tabakalaşma veya boyama gibi işlemleri kolaylaştırmaktadır. Bu süreçte bazı proteinler parçalanıp, deriden ayrılır. Derinin son kullanım yerine bağlı olarak esneklik oranı lipaz enzimi aktivite miktarıyla ayarlanmaktadır.

Un ve un mamüllerinde bulunan lipid (yağ) yapılarında %1-2 civarında lipaz enzimi bulunmaktadır. Bu enzimlerin kullanım miktarı çok önemlidir ve yüksek miktarlarda kullanılması hamur kalitesini bozmaktadır. Ancak bu tür işlemlerde uygun lipaz tipi seçimi göz önüne alınması gerekmektedir. Türkiye’de yapılan ekmeklerin yapısında kullanılan lipaz enziminin etkinliği sağlanmazsa ekmek üretimi üzerine önemli bir etkisi olmamaktadır. Un ve unlu mamüllere lipaz enziminin eklenmesi ile hamur stabilitesi artmakta, hamurun işlenmesi kolaylaşmakta, ekmek içi yumuşaklığı artmakta, ekmek hacminde artış meydana gelmektedir.

Yaptığımız bu çalışmada; *L. brevis* bakterisinden ekstraselüler olarak lipaz enzimi üretilmiş, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-sefadeks iyon değişim kromatografisi ve Sefakril S200 jel filtrasyon kromatografisi teknikleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Ayrıca

saflaştırılmış lipaz enzimi γ -Fe₃O₄ NP'ler ile magnetik hale getirilmiş florisil destek materyaline L-glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilmesi, serbest ve immobilize lipaz enziminin deterjan katkı maddesi olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Ayrıca yağ adsorbe edilmiş olan pamuklu bezlerden zeytinyağının gideriminde deterjan katkı maddesi olarak yıkama etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan kimyasallar

Sığır serum albümin (SSA), p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil palmitat, p-nitrofenil laurat, metil heptanoat, metil propiyonat, ditiyoeritritol, etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), β -merkaptoetanol ve SDS-PAGE için kullanılan kimyasallar Sigma'dan (ABD) satın alınmıştır. Etanol (C_2H_5OH), sodyum asetat (CH_3COONa), DEAE-sefadeks ve Sefakril S-200, amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$), sodyum klorür ($NaCl$) ve sodyum hidrojen fosfat monohidrat ($Na_2HPO_4 \times H_2O$), glutaraldehit Merck (Darmstadt, Almanya)'dan satın alındı. Tüm kimyasallar analitik saflıkta kullanılmıştır.

3.1.1. Araştırmada kullanılan cihazlar

Otoklav	(P Selecta)
Soğutmalı santrifüj	(Beckman coulter) ve (J.P. Selecta Centrifriger-BL)
Hassas Terazi	(KERN ABS)
Elektroforez	(BioRad)
Vorteks	(Heidolp)
Steril Kabin	(ESCO)
pH Metre	(WTW Series pH 720) ve (Mettler Toledo)
Etüv	(P Selecta Cod:2001248)
Su Banyosu	(P Selecta)
Buzdolabı	(Bosch KAN62V70NE-Ever Med Medical refrigeration)
UV-VIS Spektrofotometre	(PG Instrument T80 UV/VIS Spectrometer)
Peristaltik Pompa	(Labor –Schlauchpumpe- PLP 33)
Manyetik karıştırıcı	(Wise Stir MSH-20D, Stuart SB162-Are)
Distile su cihazı	(GFL 2004)
Nanodrop	(Epoch)
UV VIS Spektrofotometre	(T80)

3.1.2. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

3.1.2.a. Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltinin hazırlanması

100 mg Coomassie brilliant blue G-250 alınarak, 100 mL %95'lik fosforik asitte çözüldükten sonra 50 mL %95'lik etanole ilave edilerek boyanın tam olarak çözünmesi sağlanmış ve çözeltinin son hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

3.1.2.b. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin çözüldüğü tampon çözelti

0,1M Tris-HCl tamponu (pH 8.0); 1.211 g (0.01 mol) Tris, 95 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8.0'a getirilmiş ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

3.1.2.c. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponunun hazırlanışı

pH'sı 6,8 olan 1 M 0,65 mL Tris HCl, 3 mL %1'lik SDS, 1 mL %100 gliserin, 1 mL %0,1'lik brom timol çözeltisi hazırlanmış ve 1 mL numune tamponuna 50 µL β-merkaptotanol eklenerek hazırlanmıştır.

3.1.2.d. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tampon

1,5 g Tris, 7,2 g glisin ve 5 mL %10'luk SDS çözüldükten sonra distile su ile 500 mL ye tamamlanmıştır. Buzdolabında 4°C'de saklanmıştır (Temizkan ve Arda 2008).

3.1.2.e. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi

0,1 g Coomassie brilliant blue R-250, 50 mL metanolde çözülerek çözeltiliye 10 mL asetik asit ve 40 mL distile su ilave edilerek hazırlanmıştır.

3.1.2.f. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi

Hacimce %10 asetik asit, %30 metanol ve %60 distile su içerecek şekilde hazırlamak için 100 mL asetik asit ve 300 mL metanol, 600 mL saf su ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.1.3. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları

Çizelge 3.1. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışım miktarları ve oranları

ELEMENT AÇIKLAMASI	AYIRMA JELİ	YIĞMA JELİ
Jel yüzde miktarı	%10	%3
%30 Akrilamid-%0.8 Bis-akrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid 0.4 g bisakrilamid alınarak saf su ile çözüldükten sonra son hacim 50 mL'ye tamamlanır.	19.8 mL	2 mL
1.5 mL 0.5 M Tris-HCL (pH 8.8) çözeltisi: 11.82 g Tris alınarak saf suda çözülür, pH 8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlanır.	22.5 mL	-
Saf su	14.1 mL	15.6 mL
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) çözeltisi: 3.94 g Tris alınarak saf suda çözülür, pH 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlanır.	-	2.48 mL
%10'luk SDS çözeltisi: 1g SDS alınarak saf suda çözülür ve son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanır.	0.9 mL	0.1 mL
%10'luk Amonyum persülfat çözeltisi: 1g amonyum persülfat alınarak saf suda çözülür ve son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanır.	800 µL	400 µL
TEMED	130 µL	30 µL

3.1.4. Metal iyonlarının, kimyasallarla saflaştırılmış lipaz enzimi üzerine etkisi

Stok çözeltiler (5 mM)

HgCl₂ (MA: 271,52 g/mol); 0,068 g

CuCl₂ (MA: 134,45 g/mol); 0,034 g

MgCl₂ (MA: 203,3 g/mol); 0,051 g

FeCl₂ (MA: 198,83 g/mol); 0,05 g

ZnCl₂ (MA: 236,3 g/mol); 0,059 g

CaCl₂ (MA: 111,1 g/mol); 0,028 g numuneler alınıp 50 mL saf suda çözülerek 5 mM stok çözeltiler hazırlanmıştır.

1 mM için bu çözeltiler 5 kat seyreltilmiştir.

3.1.5. Optimum pH tayini için kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanışları

Lipaz enziminin optimum ve stabil pH; 2.0-6.0 aralığındaki aktivitelerini belirlemek amacıyla farklı tamponlar kullanılmıştır.

3.1.5.a. Sodyum asetat tamponu

0,1 M asetat tamponu için 0,82 g sodyum asetat 80 mL saf su ile çözüldükten ve pH'sı ayarlandıktan sonra son hacmi 100 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır. pH:4-5 değerlerini ayarlamak için 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl çözeltisi kullanılmıştır.

3.1.5.b. Sodyum fosfat tamponu

0,1 M sodyum fosfat tamponu için 7,3 g sodyum fosfat alınarak 80 mL saf su ile çözüldükten ve pH'sı ayarlandıktan sonra son hacmi 100 mL'ye distile su ile

tamamlanmıştır. pH:6-7 değerlerini ayarlamak için 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl çözeltisi kullanılmıştır.

3.1.5.c. Tris-HCl tamponu

Tris-HCl tamponu pH: 7.0-8.0 Aralığındaki lipaz enzim aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır. 10 mM Tris-HCl tamponu için 0,121 g Tris 80 mL saf su ile çözüldükten ve pH'sı ayarlandıktan sonra son hacmi 100 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır. pH değerlerini ayarlamak üzere 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl çözeltisi kullanılmıştır.

3.1.5.d. Borat tamponu

0,1 M borat tamponu için 6.18 g borat alınarak 80 mL saf su ile çözüldükten ve pH'sı ayarlandıktan sonra son hacmi 100 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır. pH:8-9 değerlerini ayarlamak için 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl çözeltisi kullanılmıştır.

3.1.5.e. Karbonat tamponu

Lipaz enziminin pH:10.0-11.0 aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla 10 mM karbonat tamponu için 10,6 g sodyum karbonat 80 mL saf su ile çözüldükten ve pH'sı ayarlandıktan sonra son hacmi 100 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır. Uygun pH değerlerini ayarlamak üzere 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl çözeltisi kullanılmıştır.

3.1.6. Aktivite ölçümünde kullanılan çözelti

Substrat çözeltisinin hazırlaması:

Katkı 0,027 gramlık p-nitrofenil asetatı 1 mL asetonda çözüp ve 49 mL saf suyla tamamlanarak hazırlanmıştır.

3.1.7. Amonyum sülfat çöktürmesi

Proteinlerin su içerisindeki çözünürlüklerini artırmak için ortama düşük konsantrasyonlarda tuz (NaCl) eklendiğinde proteinleri yüzeyi ve iç kısmında olan hidrofobik grupların etkinlikleri yükselmektedir. Böylece proteinlerin çözünürlük oranları artmış olmaktadır (Adiguzel *et al.* 2015; Onem *et al.* 2016).

Çöktürme işleminde en çok kullanılan iki değerlikli tuz olan amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄)'dır. Amonyum sülfat proteolizis, denatürasyon ve bakteriyel kontaminasyon gibi olumsuz faktörlere karşı stabilitesini korumaktadır (0-30°C) ve çok ekonomiktir (Metin 2007).

Nötral tuzların ilavesiyle proteinlerin çöktürülerek fraksiyonlara ayrılması yönteminde kullanılan amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlamaktadır. Bu işlem için kullanılacak uygun amonyum sülfat konsantrasyonu aşağıda verilen formüle göre hesaplanmaktadır:

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1.77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V: Bakteri süpernatant hacmi

S1: 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S2: 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

3.2. Bakteri Üretimi ve Kültürü

Lipaz enzimi endüstriyel üretimlerde bile canlı mikroorganizmalardan kullanılmaktadır. Özellikle de bu çalışmada *Lactobacillus brevis* (*L. brevis*) bakterisi kullanılmıştır. Bu bakteri türü genel olarak laboratuvar ortamlarında üretilir. Bu çalışmada kullanılan *L.brevis* bakteri yapısı sıcaklık değişimlerine uyum gösterebilen ve alkaline ortamında yaşayan bir bakteridir.

L.brevis bakterisinin üretimi 2 aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşama katı ve ikinci aşama sıvı kültür ortamından oluşmaktadır. Bu kültür ortamları sırayla;

1- Bakteri üretimi için 500 mL saf su, 14 gram *Nutrient Agar* ve 15 mL zeytinyağı karışımı erlen içine alınıp ve iyice karıştırıldıktan sonra, otoklav içerisinde 121°C'da 15 dakika inkübe edilerek sterilize edilmiştir. Süreç bittikten sonra cihazdan çıkartılmış ve sıcaklığı 45°C'da kadar soğutulduktan sonra 12,5'er mL olarak her petri kabı içine uygulanır. Uygulanan agar oda sıcaklığına getirildiğine katlaşmaktadır. İşlem sonuçlandığında alınmış sıvı ortamdaki bakteri, 50 µL kaplar içine eklenir ve 37°C ortamında, 48 saatlik bir sürede etüvde inkübe edilmiştir.

2- Birinci aşamanın sonucunda petri kapları içinde sarı bakteri kolonileri oluşmaktadır. Bu koloniler önceden hazırlanmış olan ikinci kültür ortamına taşınmıştır. İkinci kültür ortamının hazırlaması için 500 mL saf su ve 26 Gram *MRS broth* karıştırılarak 118°C'ta, 15 dakikalık bir süre ile otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarılan erlen sıcaklığı 40°C civarına düşene kadar bekletilmiş ve birinci aşamada üretilmiş olan bakteriler direk bu sıvı ortama taşınır ve izole bir şekilde çalkalamalı su banyosuna yerleştirilmiş ve 120 saat süre ile bakteri üretilmiştir. İki aşama sonucunda *L. brevis* bakterisi koloni şeklinde üretilmiştir.

3.2.1. Saflaştırma basamakları

Santrifüj edilen kültürün süpernatant kısmı kullanılarak lipaz enzimi 3 basamakta saflaştırılmıştır.

1. İlk basamakta süpernatant, (%0-20, %20-40, %40-60, %60-80) amonyum sülfat doygunluğunda çöktürülmüş ve lipaz enziminin %0-20 amonyum sülfat doygunluğunda çöktüğü belirlenmiştir. Bu çökelek 0.05 M Tris-HCl (pH:8.0) tampon kullanılarak çözülmüş ve 5°C'da aynı tampon ile diyaliz edilmiştir (Kumar *et al.* 2012).

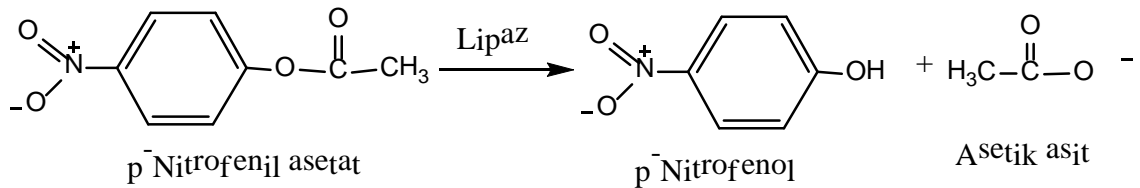
2. Saflaştırmanın ikinci basamağında; önceden 0.05 M Tris-HCl tampon ile (pH:8.0) diyalizlenen protein çözeltisi tampon ile dengelenmiş DEAE-sefadeks iyon değişimi kolonuna tatbik edilmiştir. Kolona tutunan proteinler 1M NaCl gradienti uygulanarak

5'er mL'lik fraksiyonlar halinde kolondan 3 mL/dk hızıyla elüe edilmiştir. Fraksiyonlardaki protein miktarı spektrofotometrik olarak 280 nm'de ölçülmüştür (Nadaroglu *et al.* 2015). Fraksiyonların lipaz aktivitesi PNFA kullanılarak belirlenmiştir.

3. Saflaştırmanın son basamağında ise; iyon değişim kromatografisinden elde edilen aktif fraksiyonlar 10 kDa-Amicon membran konsantratörü kullanılarak konsantre edilmiş ve sonra Tris-HCl (pH:8.0) tampon ile dengelenmiş olan Sefakril S-200 (20 cm × 1.2 cm) jel filtrasyon kolonuna uygulanmıştır. Daha sonra 0.1 M NaCl içeren aynı tamponu kullanılarak, enzim kolondan alınan 5'er mL'lik fraksiyonlar 2 mL/dk hızıyla elüe edilmiştir (Adiguzel *et al.* 2016).

3.3. Lipaz Enzim Aktivite Tayini

Lipolitik aktivite, p-nitrofenil asetatın (PNFA) substratının hidrolizi ile yapılan spektrofotometrik ölçümü ile belirlenmiştir. Lipaz aktivitesi oda sıcaklığı ve 3 dakika süre sonunda oluşan ürünün 348 nm'de absorbans ölçümü ile belirlenmiştir. Absorbans miktarlarındaki değişimler, PNFA'nın enzimatik hidrolizi sonucunda ve p-nitrofenol oluşumu esasına dayanır. Aktivite 1 dakika süresinde ve 1 µmol p-nitrofenol enzim miktar olarak tanımlanır (Huang *et al.* 2007).

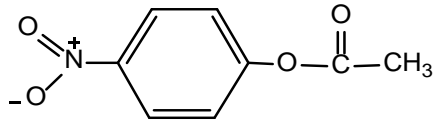
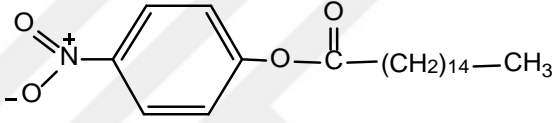
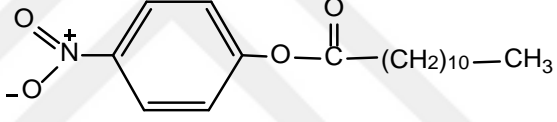
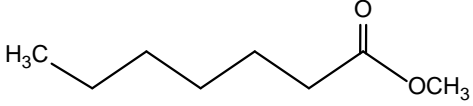
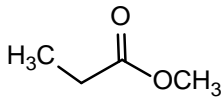


3.4. V_{max} ve K_M Değerlerinin Belirlenmesi

Hem serbest hem de immobilize lipaz enzimi için *p-nitrofenil asetat*, *p-nitrofenil palmitat*, *p-nitrofenil laurat*, *metil heptanoat* ve *metil propiyonat* substratları kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmıştır ve *Lineweaver* burk grafikleri çizilerek, V_{max}

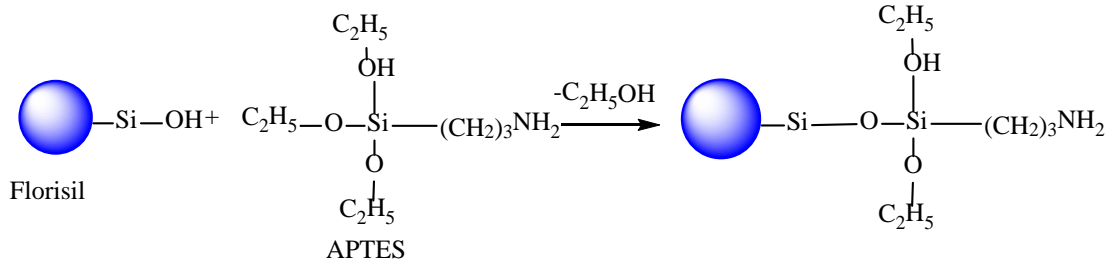
ve K_M değerleri hesaplanmıştır. Kullanılan tüm substrat yapıları izelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan substratların kimyasal yapıları

Substratın Adı	Substratın Kimyasal Yapısı
p-Nitrofenil asetat	
p-Nitrofenil palmitat	
p-Nitrofenil laurat	
Metil heptanoat	
Metil propiyonat	

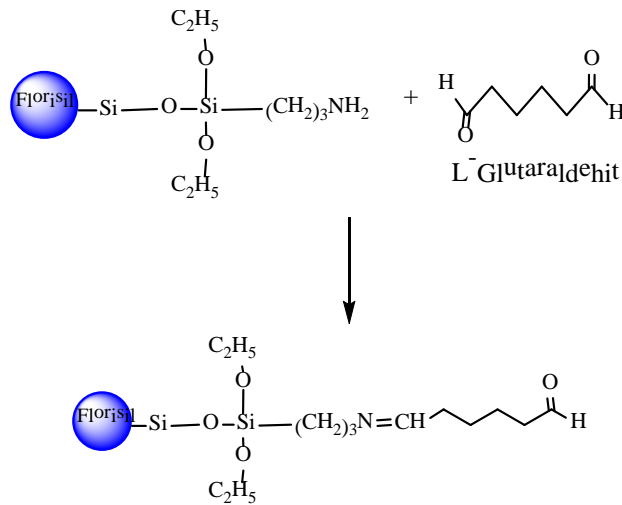
3.5. Magnetik Florisil Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Lipaz İmmobilizasyonu

Florisil destek materyalinin önce 3-APTES ile aktifleştirilme işlemi Weethall (1976) tarafından verilen yöntem esaslı yapılmıştır. Kısaca, 1 gramı %4'lk (v/v) 3-APTES'in aseton içerisinde hazırlanmış aseton zltisine eklenerek 45°C'de 24 saat süreyle uygulanmıştır (şekil 3.1). Daha sonra aktifleştirilen destek saf su ile yıkanarak etüvde 115°C'de 1 gece kurutulmuştur.



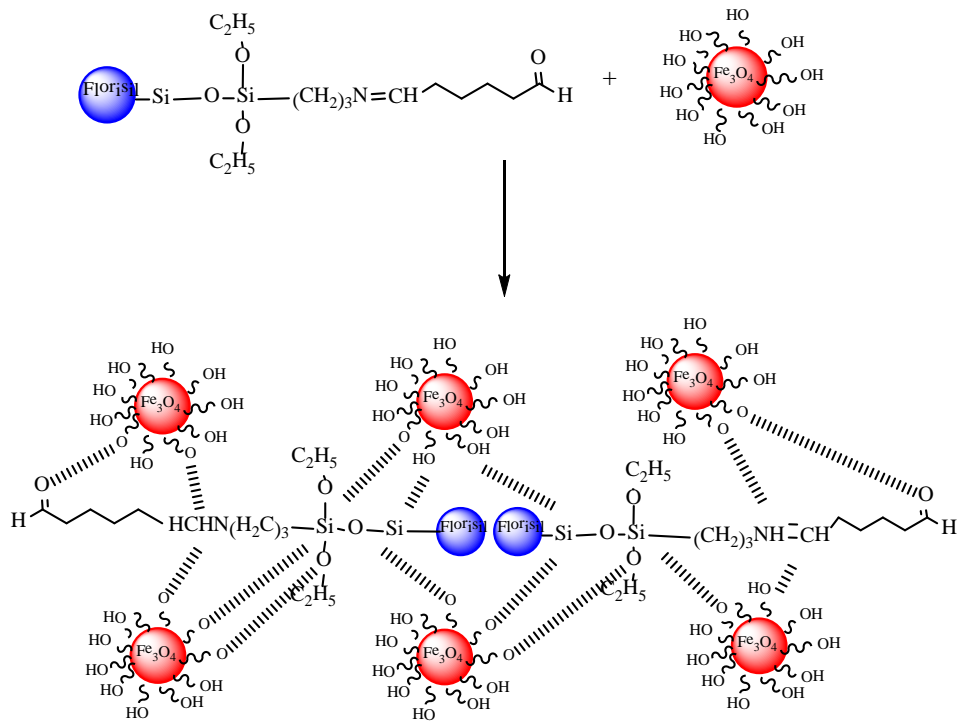
Şekil 3.1. Florisil destek materyalinin 3-APTES ile aktivite edilmesi

Sonraki aşamada aktifleştirilmiş florisile L-glutaraldehit ara kolu Cho ve Rhee (1993) tarafından önerilen yöntemle yapılmıştır. Bu amaçla 1 g aktifleştirilmiş florisil materyali alınarak üzerine 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,0) %2,5 (w/v) olacak şekilde hazırlanmış glutaraldehit çözeltisinin 25 mL'si eklenerek oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Destek materyali saf su ile süzültüde glutaraldehit gözlenmeyinceye kadar iyice yıkanmış ve 50 °C'de 1 gece kurutulmuştur. Ardından Onem *et al.*, önerdiği metoda göre aktifleştirilmiş ve glutaraldehit ara kolu bağlanan üzerinden florisil destek materyali γ -Fe₃O₄ nanopartiküller ile manyetik hale getirilmiş ve saflaştırılan *L. brevis* lipaz enzimi Schiff bazı oluşturarak immobilize edilmiştir (Onem and Nadaroglu 2014; Onem *et al.* 2015). Oluşan bağlanma reaksiyonu Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de verilmiştir.



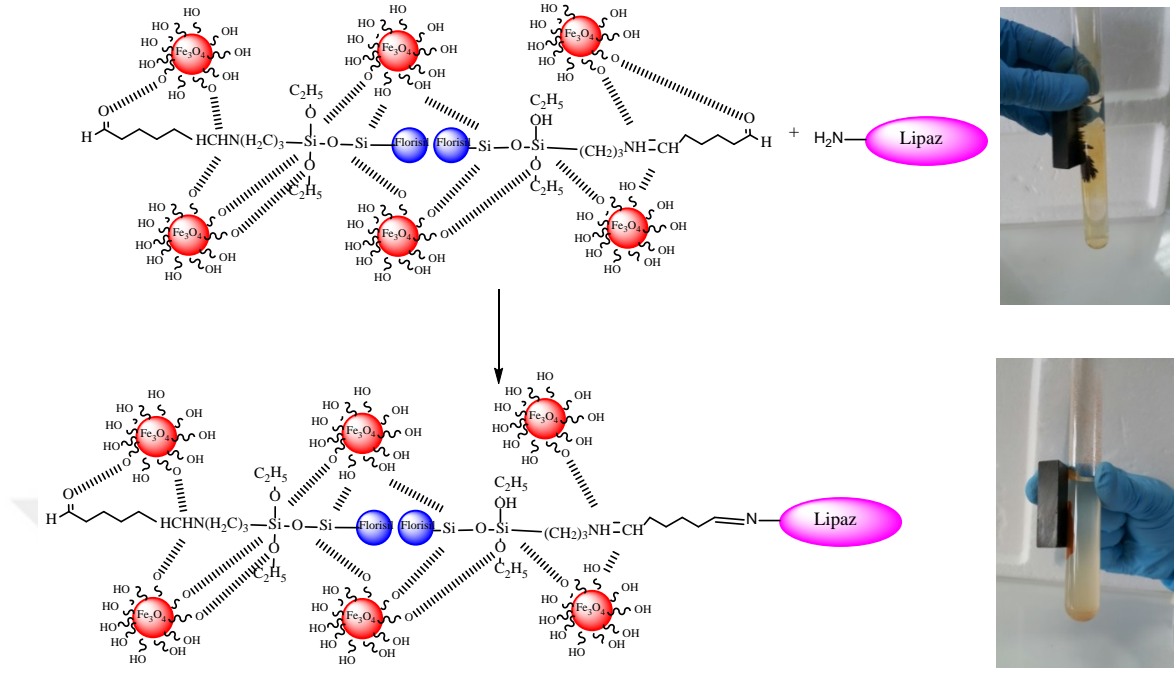
Şekil 3.2. Aktifleştirilmiş florisil destek materyalinin L-glutaraldehit ile reaksiyonu

İmmobilizasyon reaksiyonu sonunda immobilize olan lipaz tampon etkisinde yıkandıktan sonra desteğe bağlanamayan ve serbest olan lipaz enzimlerinin uzaklaşması sağlanmıştır. Süzüntülerde proteinlerin miktarının tayini için Bradford (1956) yöntemine göre yapılmıştır. Bu yöntem başlangıçta ortama eklenen protein miktarını, bağlanmayan protein miktarından eksilterek desteğe bağlanmış protein değeri hesaplanmaktadır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Aktifleştirilmiş florasil destek materyalinin $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ NP'ler ile reaksiyonu

Şekil 3.4'de görülen resimlerde magnetik hale getirilmiş olan florasil nanopartiküllerin mıknatis tarafından toplanabilir olduğu immobilize edilmeden önce ve sonra gösterilmiştir.



Şekil 3.4. *L. brevis* lipazın 3-APTES ile aktifleştirilmiş ve L-glutaraldehit ara kolu bağlanmış destek materyaline kovalent immobilizasyonu

3.5.1. Magnetite-FL- Nanopartikülleri ile saflaştırılmış lipaz enziminin optimum immobilizasyon koşullarının belirlenmesi

Lipaz enziminin magnetik florisisil NP'lere en uygun immobilizasyon şartların belirlenmesi amacıyla farklı pH, sıcaklık ve enzim miktarında denemeler yapılarak optimum koşullar belirlenmiştir. İmmobilizasyon işlemi 5.0 - 9.0 pH değerleri arasında (aşağıdaki 3.10 bölümünde belirtilen uygun tampon çözeltileri kullanılarak) ve 10 - 30°C reaksiyon sıcaklığı koşullarında ayrı ayrı immobilizasyon yapılarak bağlanma yüzdesi belirlendi. Lipazın bağlanma miktarı aşağıdaki formülden hesaplanmıştır.

Lipaz enziminin bağlanma verimliliği (E) aşağıdaki gibi tanımlanır:

$$E = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100$$

C_0 : Lipaz enziminin immobilizasyondan sonraki miktarı

C_1 : Lipaz enziminin başlangıç miktarı

İmmobilize lipaz enzim aktivitesi aşağıdaki gibi hesaplanmıştır

$$\text{İmmobilize lipaz} = \frac{A}{A_1 - A_0} \times 100$$

A:İmmobilize lipaz enzim aktivitesi

A_1 :Serbest enzimin immobilizasyondan sonra aktivitesi

A_0 :Serbest enzimin immobilizasyondan önceki aktivitesi

3.6. Protein Derişiminin Belirlenmesi

Proteinler miktarı tayini için Bradford metodu kullanılmıştır ve absorbanslar 595 nm'deki değişimler belirlenerek bulunmaktadır. Derişim miktarları, sığır serum albümin (SSA) vesilesiyle hazırlanmış kalibrasyon doğrusu kullanılarak belirlenmiştir (Bradford 1976).

3.7. Optimum pH ve Stabil pH Değerlerinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize lipaz enzim aktivitelerinin optimum pH miktarı 3.0 ile 9.0 arasındaki pH'lar da ölçülmüştür. Bu işlem için asetat tamponu (pH 3.0 – 5.0), Na-sitrat (6.0), Tris-HCl (7.0 – 8.0) ve borat (9.0) kullanılmıştır ve substrat olarak p-NFA kullanılmıştır.

pH stabilitesini belirlemek amacıyla serbest ve immobilize enzim için pH miktarı 3.0-9.0 aralığında 7 gün süreyle lipaz enzim aktivite ölçümleri alınmıştır. Enzimin optimum pH değerinde depo edilmesi için, serbest ve immobilize lipaz enzimi farklı pH miktarlarına sahip olan tamponlarıyla 7 gün boyunca +4°C'de inkübe edildi ve her gün aktivite tayini yapılmıştır.

3.8. Optimum sıcaklık ve Stabil sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

Bu amaçla serbest ve immobilize lipaz enzimleri 10°C'den 90°C'a kadar değişen farklı sıcaklıklarda enzim aktivitesi üzerine 2 saat inkübe edilip sistemleri için aktivite ölçümleri yapılmıştır.

3.9. Bazı Metal İyonlarının Serbest ve İmmobilize Lipaz Üzerinde Etkisi

Serbest ve immobilize olan lipaz enzim aktivitesi üzerine (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Hg^{2+}) kontrole göre metal iyonlarının etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarındaki metal iyonlarının varlığında lipaz enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır. Aktivite miktarı, enzimin aktivite oranının yüzdesi belirlenmiştir. Bu oran, kontrol koşullarında ve etkenler etkisinde kalan enzimin serbest ve immobilize enzime göre aktivite oranı ölçülmüştür.

3.10. İmmobilize Lipazın Tekrar Kullanılabilme Kabiliyeti

$\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ NP'leri ile modifiye edilen florisil üzerine immobilize edilmiş olan lipaz enziminin yeniden kullanımını test etmek için p-NFA'nın hidroliz reaksiyonu tekrar tekrar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla lipaz enzimi immobilize edilmiş olan florisil nanopartiküller her denemeden sonra ayrılmış, saf su ile yıkanmış ve reaksiyon ortamına yeniden ilave edilmiştir.

3.11. Serbest ve İmmobilize Magnetik Florisil Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Serbest ve magnetik florisil nanopartikülleri üzerine immobilize olmuş lipaz enzimin karakterizasyonu, taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve XRD ve FT-IR spektral analizleri ile yapılmıştır. Araştırma için kullanılan SEM cihazı özellikleri (SEM; Metek, Apollo prime, Active area 10 mm², Microscope inspect S50, SE detector R580)'dır ve bu cihaz doğal çözelti ve karşılıklı olarak metal iyonlarının analizini 5000 kez

büyütülerek kullanılmıştır. SEM analizinden önce numune yüzeyi 20 nm kalınlığında olan bir altın katmanıyla kaplanır ve böylece yüzeye elektrik iletkenliği sağlanarak, elektrostatik yüklemelerde önlenmiştir.

Ayrıca doğal florisil, magnetik florisil ve lipaz ile immobilize olmuş magnetik florisil nanopartiküllerinin moleküler yapısı ve fonksiyonel grupları analizi Fourier dönüşümü infrared spektroskopisi (FTIR) cihazıyla yapılmıştır. FTIR spektrumu bir Mattson 1000 FTIR spektrofotometre kullanılarak alınmıştır. Bu çözelti spektrumu $4.000-400\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında alınmıştır.

Çözeltiden alınan XRD analizleri (Rigaku D-Max 2000) cihazı ve $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0.154\text{ nm}$) dalga boyu ve $20,5^\circ-100^\circ$ açı aralığı 0.1 adımıyla alınmıştır.

3.12. Serbest ve İmmobilize Lipazın Deterjan Katkı Materyali Olarak Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize enzimin deterjan katkı maddesi olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi için enzimin optimum pH ve optimum sıcaklığında zeytin yağıyla kirletilmiş olan pamuk bezler, serbest (FL), immobilize lipaz (IML) ve bir ticari deterjana (katkı maddesi olarak %0.1 (w/v) oranında) ilave edilmiş ve 60 dakika süreyle, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

Yalnızca saf su ile muamele edilen yağlı bez kör numunesi olarak tanımlanmıştır. Daha sonra tüm bezlerde yer alan zeytinyağı, petrol eteri ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon tamamlandıktan sonra petrol eteri buharlaştırılmış ve zeytinyağının ağırlığı belirlenmiştir (Chauhan *et al.* 2012).

Sistemden çıkarılan yağın yüzdesi aşağıdaki formülden elde edilir.

$$\% \text{ Giderme} = \frac{W_o - W_1}{W_o} \times 100$$

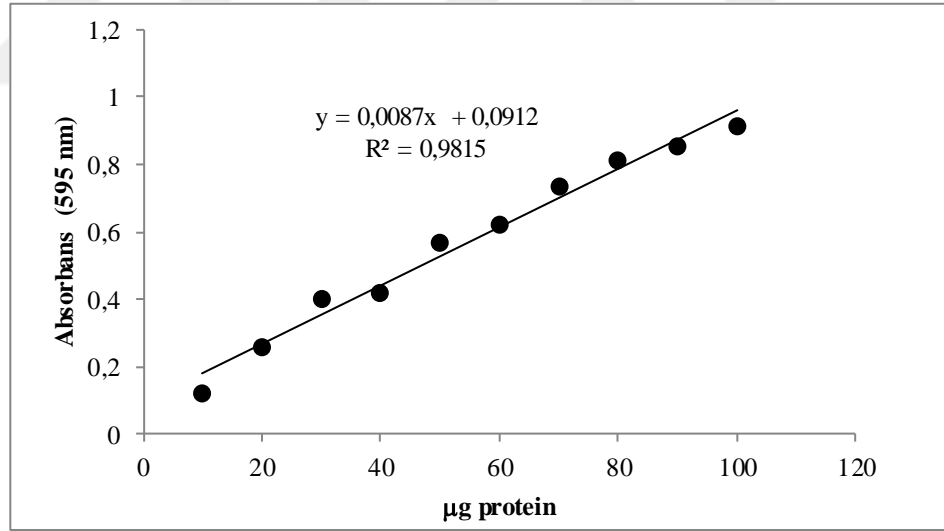
W_0 yıkanmadan önce toplam yağ ağırlığı (mg) ve W_1 yıkanmadan sonra toplam yağ ağırlığını (mg) ifade etmektedir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

L. brevis bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin tüm enzim saflaştırma aşamalarındaki numunelerdeki protein miktarı kantitatif olarak Bradford yöntemi kullanılarak belirlendi. Coomassie blue yöntemi için miktarı bilinen sığır serum albümin (SSA) çözeltisi kullanılarak standart eğri hazırlandı. *L. brevis*'un ekstraselüler olarak yetiştirme ortamından elde edilen ekstraktlarda ve saflaştırılan lipaz enzim çözeltilerinde bulunan protein miktarı standart grafikten elde edilen denklem kullanılarak belirlendi. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik

4.2. *L.brevis* Bakterisinin Üretilmesi

L. brevis kültürü 6,25 g NB 250 mL saf suda çözülerek oluşturulan besi yerine ekilerek üretildi. Besi yerine 10.000 xg'de (5°C, 30 dak) santrifüjlenerek süpernatant ve çökelek (mikroorganizma) ayrıldı. Süpernatanta lipaz aktivitesi tespit edilerek *L.brevis*'un lipaz

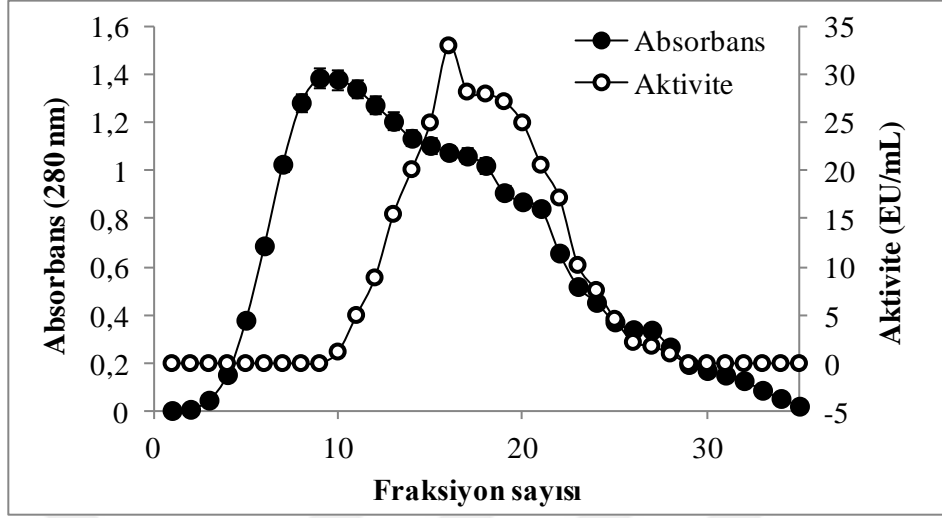
enzimini ürettiği belirlendi. *L.brevis*'un bir gram Nutrient brot'dan 79 EU lipaz enzimini ürettiği hesaplandı.

4.3. *L. brevis*'ten Üretilip Saflaştırılan Lipaz Enzimlerinin DEAE-sefadeks İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma Sonuçları

L. brevis'ten ekstraselüler olarak üretilen lipaz enzimi DEAE sefadeks iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. DEAE sefadeks iyon değişim jeli hazırlandı, kolona paketleni ve *L. brevis*'den ekstraselüler olarak üretilen lipazın ekstraselüler ortamında hazırlanan homojenatlar santrifüjlendikten sonra kolona yüklendi. Daha sonra 10 mM Borat tamponu (pH 9.0) içinde 0'dan 1 M NaCl ile konsantrasyon gradienti oluşturularak enzimler 3'er mililitrelik fraksiyonlar halinde DEAE sefadeks iyon değişim kolonundan elüe edildi. Her tüpteki numune için 280 nm'de kalitatif protein tayini yapıldı. Absorpsiyon gösteren fraksiyonların lipaz enzim aktivite ölçümleri yapıldı ve aktivite gösteren fraksiyonlar kinetik çalışmalarda ve yağ giderimi denemelerinde kullanılmak üzere birleştirilerek enzim havuz oluşturuldu.

4.4. Lipaz Enziminin *L.brevis*'ten DEAE-sefadeks İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma Sonuçları

L. brevis'dan üretilip saflaştırılan lipaz enziminin DEAE-sefadeks iyon değişim kromatografisi ile elde edilen sonuçlar Şekil 4.2'de verilmiştir.



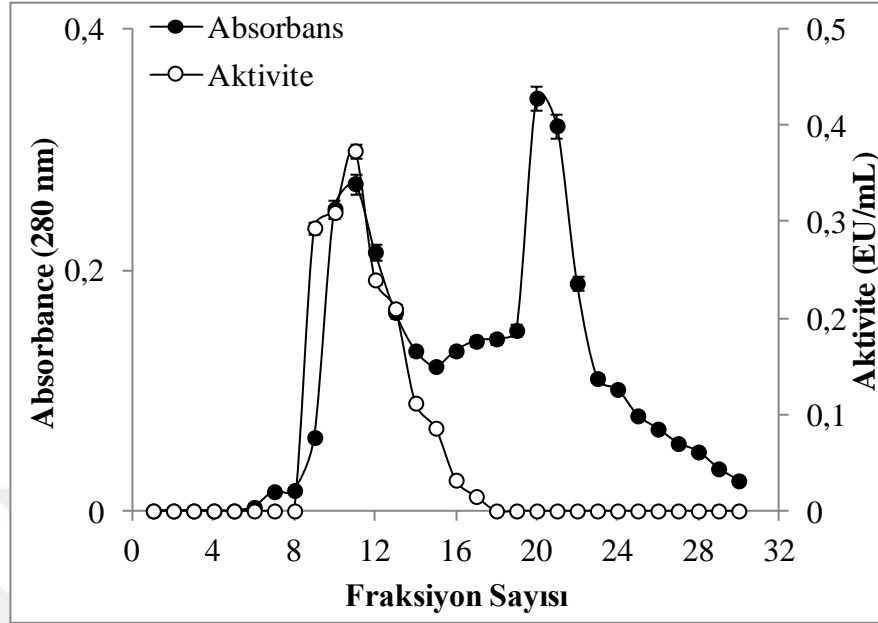
Şekil 4.2. DEAE-sefadeks iyon değişim kromatografisi kullanılarak lipaz enziminin *L. brevis* bakteriden saflaştırılan lipaz enziminin 10 mM (pH 9.0) borat tamponu içinde 0-1 M NaCl ile gradient elüsyonu

(—●—): 280 nm'de absorbansı, (—○—): aktivite, kolon 3 x 30 cm, jel yüksekliği 20 cm, elüsyon hızı 80 mL/saat ve fraksiyon hacmi 5 mL

4.5. Lipaz Enziminin Sefakril S200 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Saflaştırılması

Jel filtrasyon kromatografisi yönteminde Sefakril S200 kolonu kullanılmaktadır. DEAE-sefadeks iyon değişim kolonundan elde edilen fraksiyonlardan lipaz aktivitesi tespit edilmiş olan fraksiyonlar birleştirilip, konsantre edilerek borat tampon çözeltisi ile dengelenmiş Sefakril S200 kolonuna tatbik edilmiştir.

Lipaz enzimi aynı tampon uygulanarak Sefakril S200 kolonundan elüe edilmiştir. Elde edilen fraksiyonlarda p-nitrofenil asetat substratı kullanılarak lipaz aktivitesi ve protein miktarı tayini yapılmıştır.



Şekil 4.3. *L. brevis* bakteriden lipaz enziminin Sephacril S200 jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmasından elde edilen elüsyon grafiği (—●—): 280 nm’de absorbansı, (—○—): aktivite, kolon 3 x 30 cm, jel yüksekliği 20 cm, elüsyon hızı 80 ml/saat ve fraksiyon hacmi 3 mL

Amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE sefadeks iyon değişim kromatografisi ve Sefacril S200 jel filtrasyon kromatografisi yöntemleriyle saflaştırılan lipaz enziminin saflaştırılma aşamalarında hem aktivite tayini, hem de protein tayini yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen veriler ile aktivite, toplam aktivite, spesifik aktivite, saflaştırma katsayısı, % verim gibi parametreler hesaplanmıştır. Çizelge 4.1’de saflaştırılmış olan lipaz enzimine ait hesaplanmış parametreler verilmiştir.

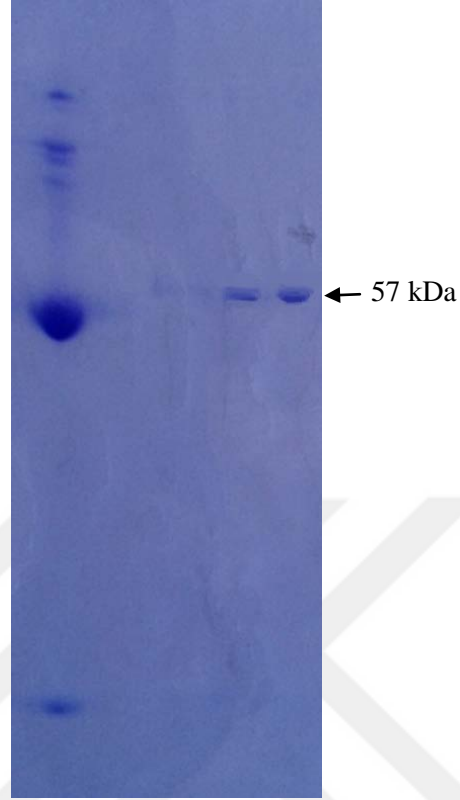
Çizelge 4.1. *L. brevis* lipazına ait saflaştırma ve verim profili

Saflaştırma basamakları	Hacim (mL)	Aktivite (EU / mL)	Toplam aktivite		Protein miktarı (mg protein/mL)	Spesifik aktivite EU/mg protein	Saflaştırma katı
			EU	%			
Hemojenat	50	79.0 ±0.11	3.95 x 10 ³	100	283.6 ± 0.66	0.28	-
(NH ₄) ₂ SO ₄ (0-20%)	30	54.8 ±0.11	1.64 x 10 ³	41.6	24.7 ± 0.08	2.22	7.92
DEAE-Sefadeks iyon değişim kolonu	30	35.5 ± 1.3	1.07 x 10 ³	26.96	6.2 ± 0.33	5.72	20.44
Sefakryl-S-200 jel filtrasyon kolonu	20	24.6± 15	4.92 x 10 ²	12.45	0.65 ± 2.4	37.85	135.2

Elde edilen fraksiyonlarda lipaz enzimi DEAE Sefadeks iyon değişim kromatografisinden %26.96 verimle, Sefakryl S200 jel filtrasyon kolonundan ise %12.5 verimle lipaz enzimin elde edildiği belirlenmiştir. Elde edilen lipaz enziminin 135.2 kat *L.brevis*'den saflaştırıldığı belirlenmiştir.

4.7. *L. brevis* Bakterisinden Saflaştırılan Serbest ve İmmobilize Lipaz Enziminin SDS-poliakrilamid Jel Elektroforez Sonucu

L. brevis bakterisinden saflaştırılan lipaz enzim örneğinin alt birim sayısını belirlemek için SDS-poliakrilamid jel elektroforez yöntemi kullanılarak elde edilen protein bantları Şekil 4.3'te gösterilmiştir. SDS-PAGE elektroforez analizi sonucunda *L. brevis* bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin molekül ağırlığı 57 kDA olan protein bandı gözlemlenmiştir. Protein bandının saptanmasında düşük molekül ağırlıklı standart protein karışımı kullanılmıştır.



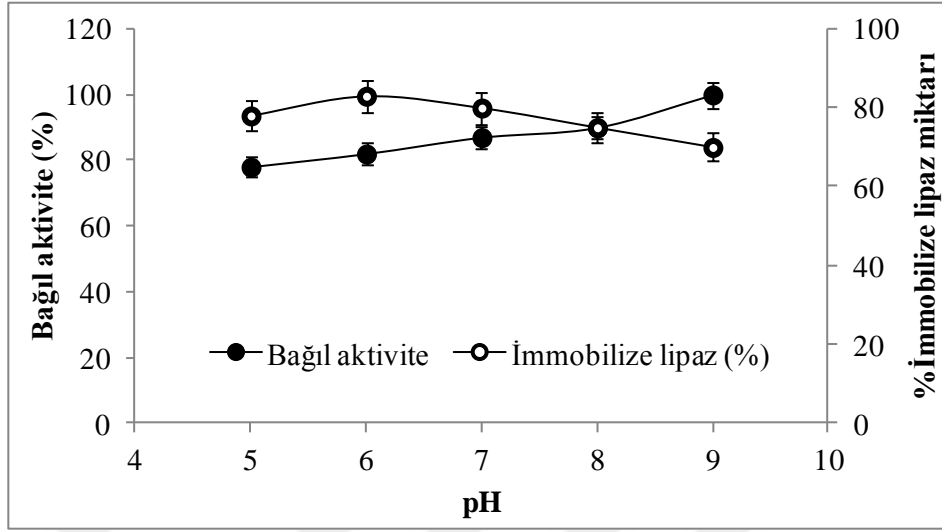
Şekil 4.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroföresi (PAGE) fotoğrafı

[Bant (I); Protein markırı (Sigma), (205 kDa) miyosin, (116 kDa) β -galaktozidaz, (97 kDa) fosforilaz β ; (66 kDa) sığır serum albumini; (55 kDa) glutamik dehidrogenaz, (45 kDa) ovalbumin; (36 kDa) gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz; (29 kDa) karbonik anhidraz) bant (II); *L. brevis* bakterisinden saflaştırılan lipaz enzimi]

4.8. *L. brevis* Bakterisinden Alınan Lipazının, Florisile Glutaraldehit Ara Kol Üzerinden Kovalent İmmobilizasyonu İçin Optimum İmmobilizasyon Koşulları

4.8.1. pH'nın etkisi

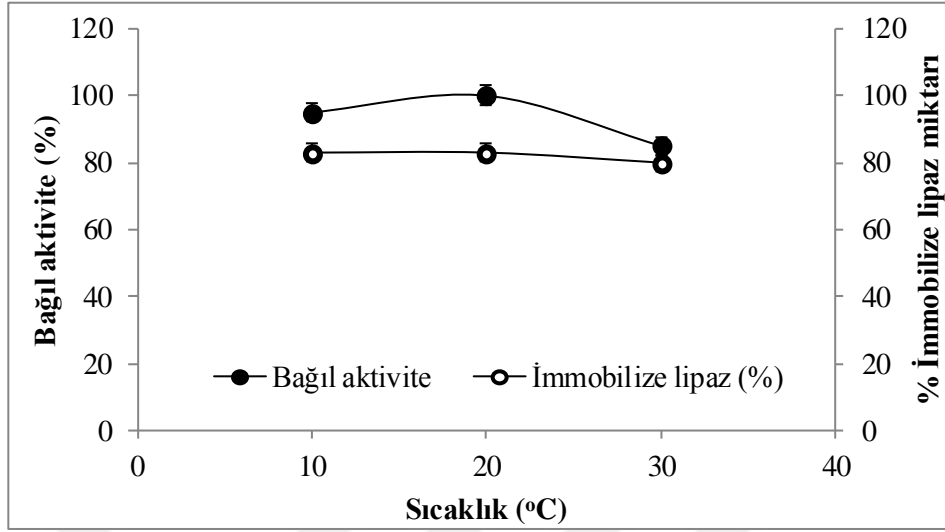
Saflaştırılan lipaz enziminin *L*-glutaraldehit ara kolu üzerinden, florisil destek materyaline kovalent bağlanması üzerine pH'nın etkisi belirlenmiştir. Bu amaçla, immobilizasyon işlemi pH 5.0-9.0 aralığında gerçekleştirilmiştir. Farklı pH değerlerinde immobilize olmuş *L. brevis* lipaz enziminin aktivite oranı tayin edilmiştir. Şekil 4.4'e göre *L. brevis* lipaz enzimi pH 6.0'da (Na-sitrat tamponu) en yüksek aktivite göstermektedir ve sabit materyale en yüksek oranda bağlanmıştır.



Şekil 4.4. pH'nın *L.brevis* bakteriden saflaştırılan lipaz enziminin glutaraldehit ara kolu üzerinden magnetik florosil NP'lere kovalent immobilizasyonu üzerine etkisi (bağlı aktivite (●-●) ve (○-○) bağlanan lipaz derişimi)

4.8.2. Sıcaklığın etkisi

L. brevis bakterisinden elde edilen lipaz enziminin demir florosil destek materyale kovalant olarak immobilizasyonu için optimum sıcaklık belirlenmiştir. Bu amaçla 10-30 °C aralığında *L. brevis* lipaz enziminin magnetik florosil nanopartiküllere immobilizasyon işlemleri yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.5'de verilmiştir.

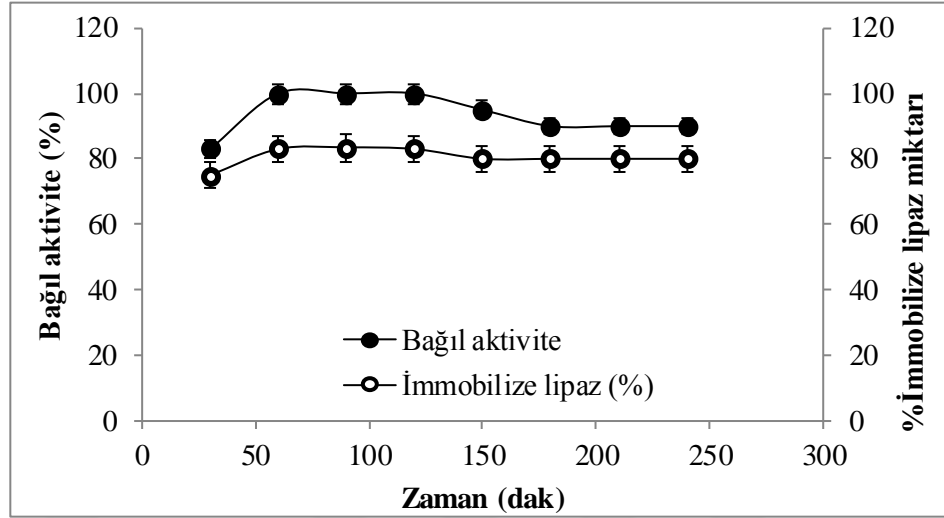


Şekil 4.5. Sıcaklığın *L. brevis* bakteriden saflaştırılan lipaz enziminin glutaraldehit ara kolu üzerinden magnetik florisit NP'lere kovalent immobilizasyonu üzerine etkisi (bağlı aktivite (-●-) ve (—○—) bağlanan lipaz derişimi)

Elde edilen bulgulara göre immobilizasyon işleminde sıcaklığın lipaz enziminin immobilizasyonu üzerine çok etkili olmadığı ve *L. brevis* lipaz enzimi en yüksek aktiviteyi 20 °C'de gösterdiği belirlenmiştir.

4.8.3. Zamanın etkisi

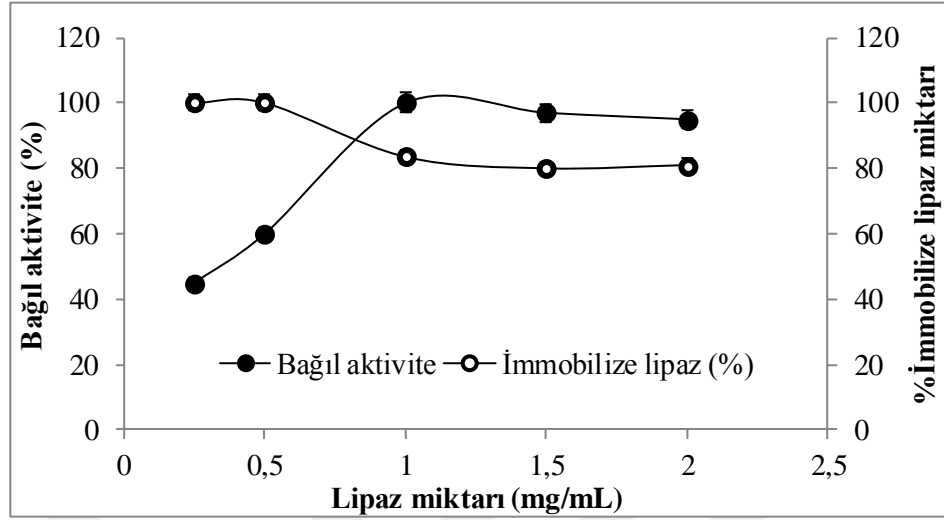
L. brevis elde edilen lipaz enziminin γ -Fe₃O₄ NP'ler ile modifiye edilen florisit destek materyale kovalent olarak immobilizasyonu için en uygun süreyi belirlemek amacıyla, saf *L. brevis* lipaz enzimi magnetik florisit NP'ler ile pH'sı 6.0 olan Na-sitrat tamponu içerisinde ve 20 °C'de 2 saatlik bir süre ile ultrasonik banyo kullanılarak immobilize edilmiştir. Bulgular Şekil 4.6'da verilmiştir. Enzimin magnetik florisit NP'lere immobilizasyon işleminden 1 saat sonra maksimum bağlanma miktarı % 83.1 oranında bağlandığı ve süre arttıkça immobilizasyonun sabit kaldığı gözlenmiştir. Ancak süre daha fazla uzadıkça lipaz enziminin aktivite miktarında azalma meydana geldiği belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Zamanın *L. brevis* bakteriden saflaştırılan lipaz enziminin *L*-glutaraldehit ara kolu üzerinden magnetik florasil NP'lere kovalent immobilizasyonu üzerine etkisi (bağlı aktivite (-●-) ve (—○—) bağlanan lipaz derişimi)

4.8.4. Lipaz enzim miktarının etkisi

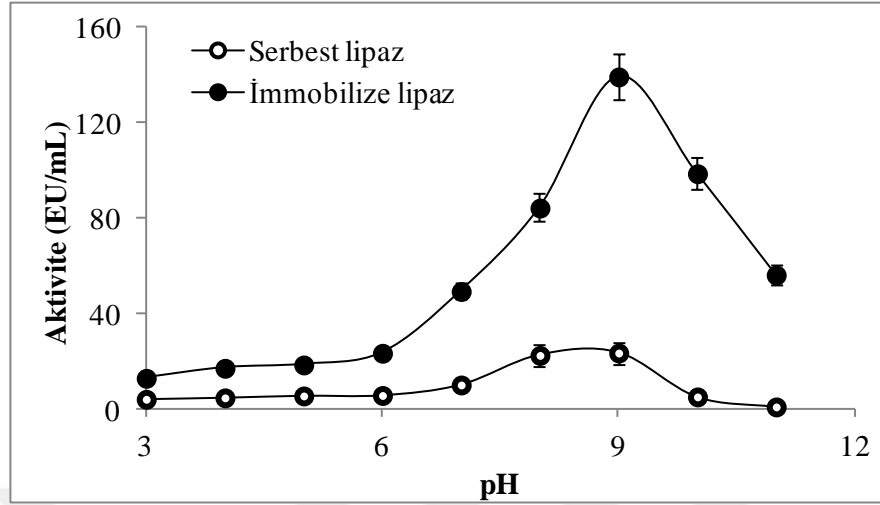
L. brevis lipaz enzimi glutaraldehit ara kol aracılığıyla, magnetik florasil NP destek materyaline bağlanması esnasında optimum enzim konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla farklı saf lipaz enzim miktarları kullanılarak immobilizasyon yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Bu miktarlar 1 g destek materyaline bağlanmış olan protein miktarları üzerinden hesaplanmıştır. Şekil 4.7'ye göre lipaz enziminin en yüksek aktivite ve bağlanmayı 1 mg/mL lipaz derişiminde verdiği görülmüştür.



Şekil 4.7. *L. brevis* lipazının glutaraldehit ara kol vasıtasıyla florisil malzemesine kovalent bağlanmasının farklı derişimlerde aktivitesi (-●-) ve bağlanmanın yüzde miktarı (-○-) değişimleri

4.8.5. Optimum pH belirlemesi

Serbest ve magnetik florisil nanopartikülleri immobilize edilmiş *L. brevis* lipaz enzimin optimum pH değerinin belirlenmesi amacıyla farklı pH'larda lipaz enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır. pH değerleri 3.0 ile 11.0 aralığında değişmekte olan 10 mM konsantrasyona sahip kullanılan farklı tampon çözeltiler kullanılmıştır: 3.0- 5.0 Na-asetat; 6.0 Na-sitrat, 7.0 – 8.0 Tris-HCl, 8.0–9.0 borat tamponu, 9.0 karbonat tamponu ve 10-11 fosfat tamponu. Bu tamponlardan elde edilen aktivite değerleri Şekil 4.8'de verilmiştir.

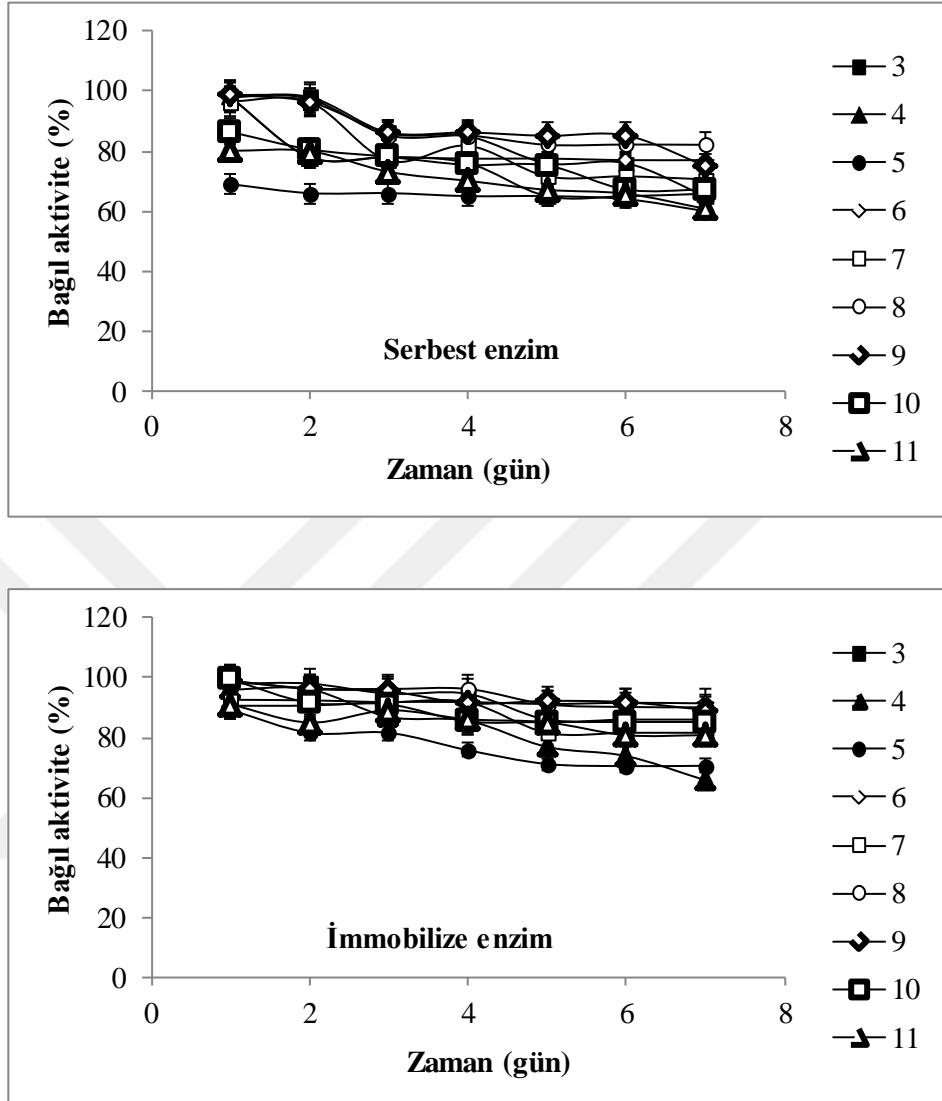


Şekil 4.8. *L.brevis*'den saflaştırılan serbest ve immobilize lipaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Serbest ve immobilize lipaz enzimi pH değeri 6.0'nın altına düştüğü ve 10.00'un üzerine çıktığı zaman keskin bir aktivite göstermemiştir. Ancak serbest ve bağlı lipaz enzimi maksimum aktiviteyi pH 9.0'da verdiği grafikten görülmektedir.

4.8.6. Stabil pH

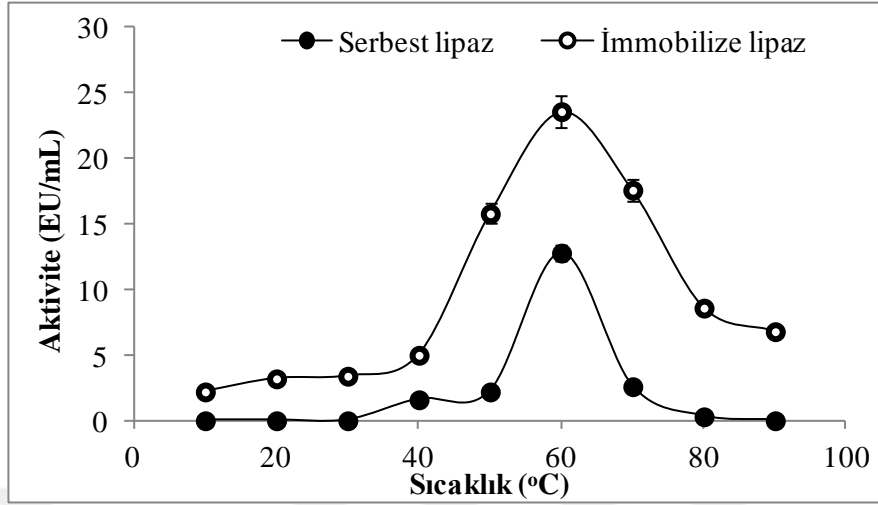
Serbest ve immobilize *L. brevis* lipaz enzimin aktivitesi 3.00-11.00 pH aralığında 7 gün süreyle ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.9'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlardan hem serbest hem de immobilize *L. brevis* lipaz enziminin tüm pH'larda stabil olduğu ancak immobilize lipaz enziminin serbest lipaz enzimine göre pH 9.0'da, 7 gün boyunca aktivite miktarı % 89.2'de sabit kalarak daha yüksek stabilite gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Serbest ve immobilize *L. brevis* lipaz enziminin stabil pH sonuçları

4.8.7. Optimum sıcaklık

Serbest ve immobilize lipaz enzimi üzerine sıcaklığın etkisi de araştırılmıştır. Bu amaçla; 10 ile 90 °C aralıklarında ve pH değeri 9.0 (Borat tamponu)'da aktivite ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre hem serbest hem de immobilize lipaz enziminin optimum sıcaklığı 60 °C olarak bulunmuştur (Şekil 4.10).

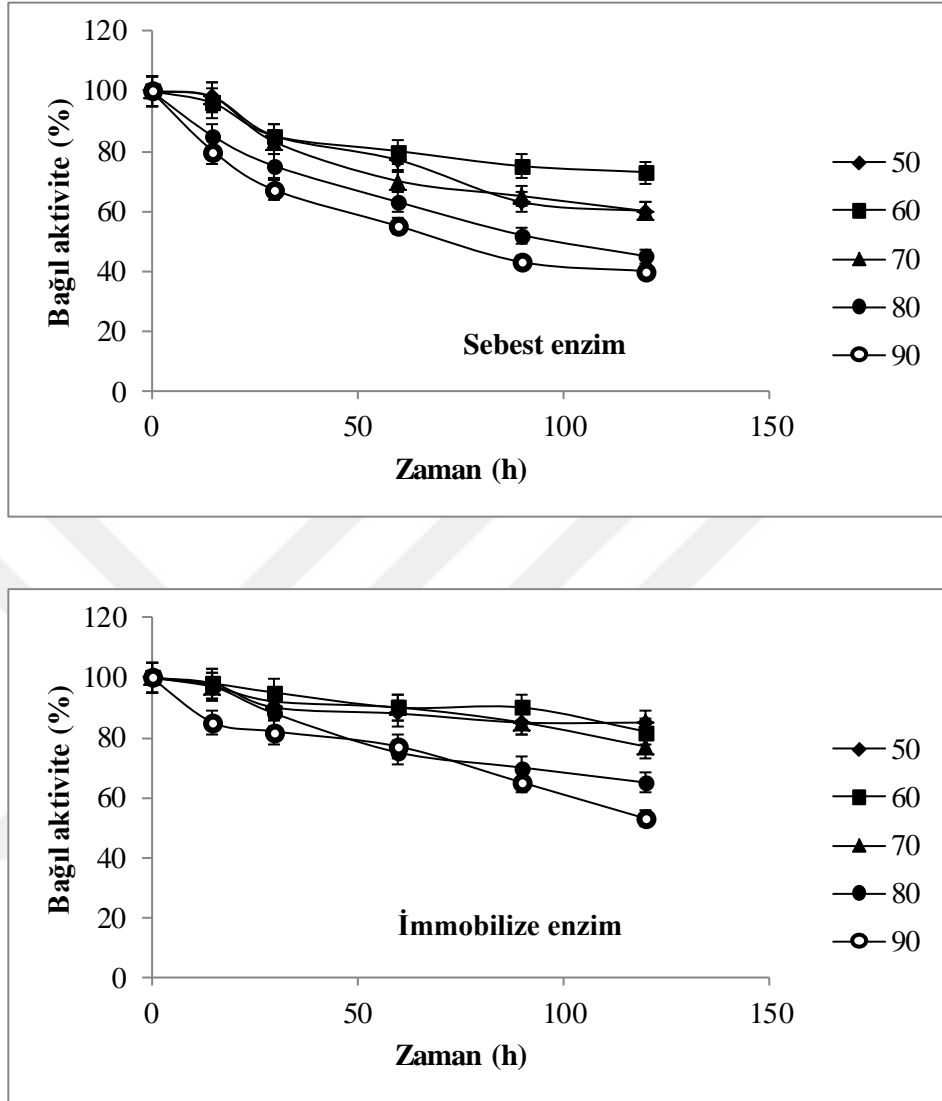


Şekil 4.10. Serbest ve immobilize *L. brevis* lipaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

4.8.8. Stabil sıcaklık

Serbest ve immobilize *L. brevis* lipaz enziminin aktivitesi 10-90 °C aralığında 2 saatlik süre ile izlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.11’de verilmiştir. Bu bulgular immobilize lipaz enziminin geniş sıcaklık aralığında daha stabil olduğunu göstermektedir ve serbest enzimin 2 saatlik bir sürede ve 60 °C’de aktivitesinin %82’sini koruduğu belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada; *Pseudomonas aeruginosa* LST-03 elde edilen lipaz enziminin 30 dakikalık sürede 60 °C’de inkübe edilmesinin ardından hiç aktivite göstermediği, ancak *Bacillus sphaericus* 205y lipaz enzimi % 28 kadar aktivitesini koruduğu belirlenmiştir (Sheng *et al.* 2007).



Şekil 4.11. *L. brevis*'dan saflaştırılan serbest ve immobilize lipaz enzimin stabil sıcaklık sonuçları

4.8.9. Metal iyonları etkisi

L. brevis bakterisinden saflaştırılan serbest ve magnetik florisit NP'ler üzerine immobilize edilen lipaz enziminin aktivitesi üzerine CaCl_2 , CuCl_2 , FeCl_2 , ZnCl_2 , MgCl_2 ve HgCl_2 gibi bazı metal iyonlarına etkisi araştırılmıştır. Metal iyonlarının serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine gösterdikleri etkileri Çizelge 4.2'de verilmektedir. Çizelge 4.2'ye göre serbest ve immobilize lipaz enziminin aktivite ölçümlerinde

immobilize lipaz enziminin metal iyonlarına karşı aktivitesini koruduğu ve inhibisyon derecesinin daha düşük olduğu bulunmuştur. Buna göre immobilize lipaz enziminin stabilitesinin yüksek olmasından kaynaklı inhibe olmadığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.2. Metal iyonlarının serbest ve immobilize lipaz enzim aktivitesi üzerine etki sonuçları

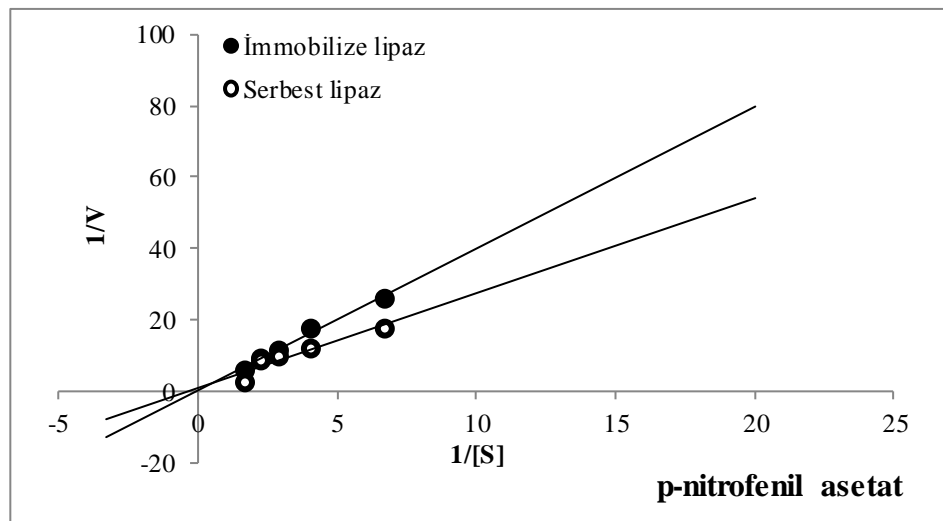
Serbest lipaz enzimi				
Metal iyonları	Konsantrasyon (mM)	%Aktivite	Konsantrasyon (mM)	%Aktivite
Kontrol	-	100 ± 0.005	-	100 ± 0.005
Cu²⁺	1	125.47 ± 0.87	5	147.17 ± 2.2
Zn²⁺	1	124.5 ± 0.53	5	171.69 ± 4.8
Mg²⁺	1	128.3 ± 0.89	5	143.39 ± 4.01
Fe²⁺	1	40.57 ± 0.6	5	10.38 ± 3.3
Ca²⁺	1	116.04 ± 0.35	5	127.36 ± 0.43
Hg²⁺	1	40.57 ± 0.14	5	4.25 ± 2.54
Immobilize lipaz enzimi				
Metal iyonları	Konsantrasyon (mM)	%Aktivite	Konsantrasyon (mM)	%Aktivite
Kontrol	-	100 ± 0.0	-	100 ± 0.0
Cu²⁺	1	134.9 ± 4.56	5	180.2 ± 6.31
Zn²⁺	1	167.92 ± 0.2	5	187.02 ± 2.6
Mg²⁺	1	151.89 ± 0.14	5	183.02 ± 2.33
Fe²⁺	1	64.15 ± 2.05	5	11.13 ± 0.13
Ca²⁺	1	122.64 ± 0.22	5	131.13 ± 0.96
Hg²⁺	1	69.81 ± 0.23	5	12.26 ± 0.18

Çizelge 4.2'den elde edilen verilere göre, *L. brevis* lipaz enzimini Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} ve Ca^{2+} iyonları aktive ederken Hg^{2+} ve Fe^{2+} iyonları enzimi kısmen inhibe etmiştir. İmmobilize lipaz enzim aktivitesi Zn^{2+} , Mg^{2+} ve Cu^{2+} iyonlarına karşı sırasıyla %87, %83 ve %80 oranında aktive olmuştur. Serbest lipaz enzimi ise 5 mM konsantrasyonundaki Zn^{2+} iyonu tarafından %71.69 oranında aktive olmuştur. Fe^{2+} ve Hg^{2+} metal iyonları serbest enzimleri büyük oranda inhibe ederken, 1 mM konsantrasyondaki Fe^{2+} ve Hg^{2+} immobilize enzimi sırasıyla %64.15 ve %69.81 oranında aktivitesini korumuştur.

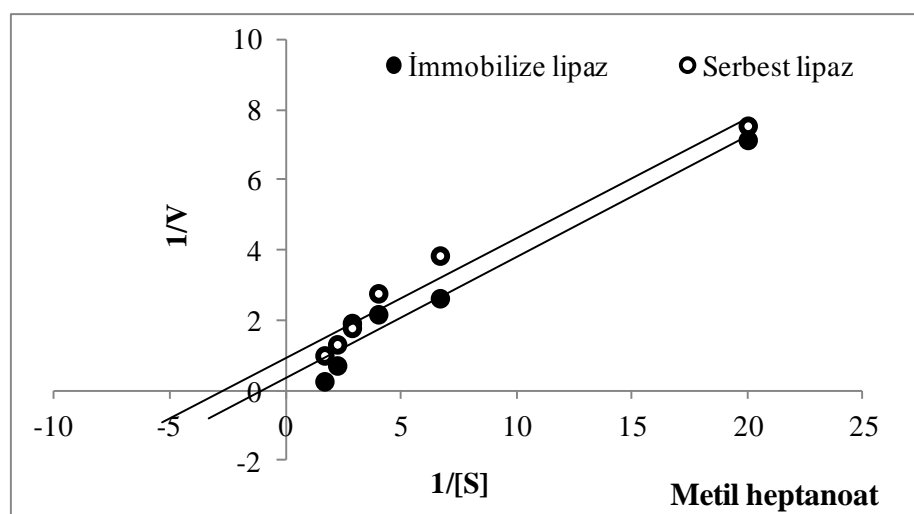
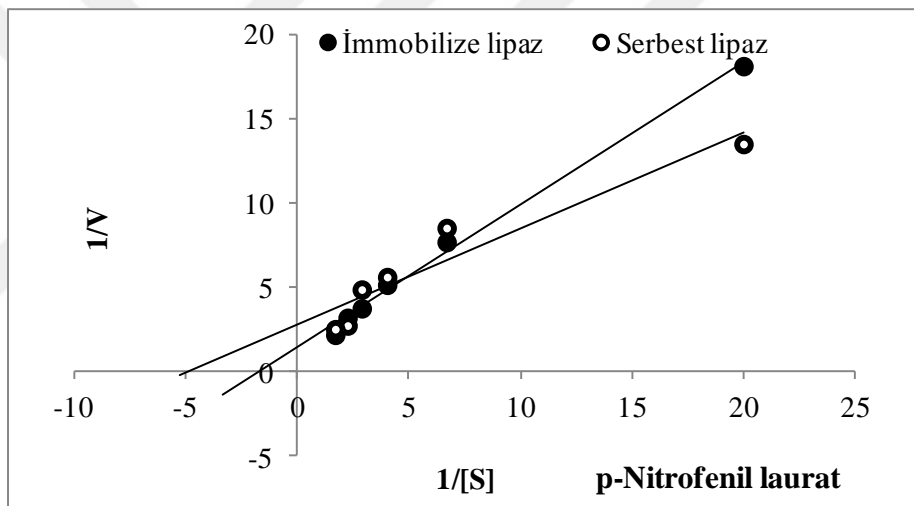
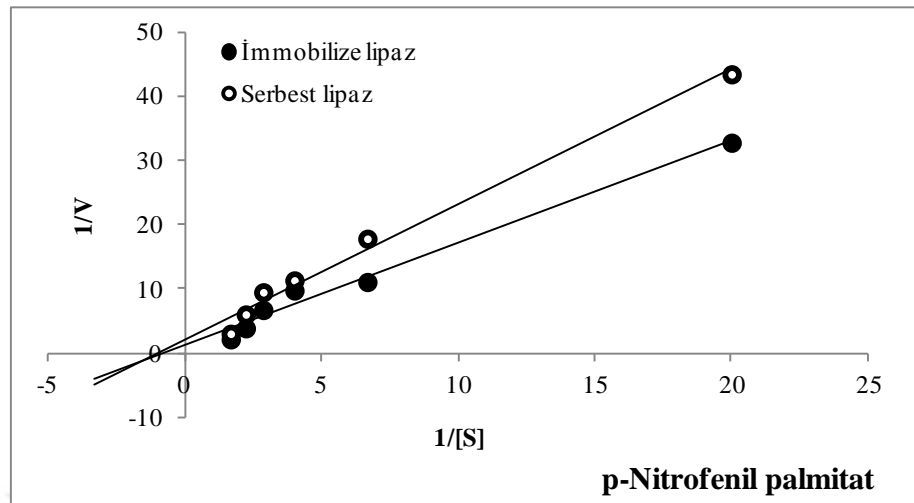
Yapılan çalışmalarda *Aspergillus carneus* ve *Acinetobacter* sp. RAG-1'den elde edilen lipaz enzimlerinin Hg^{2+} tarafından kuvvetli şekilde inhibe olurken, Zn^{2+} , Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonları tarafından aktive olduğu bildirilmiştir (Onem *et al.* 2015)

4.9. *L.brevis*'den Saflaştırılan Lipaz Enziminin V_{\max} ve K_M Sonuçları

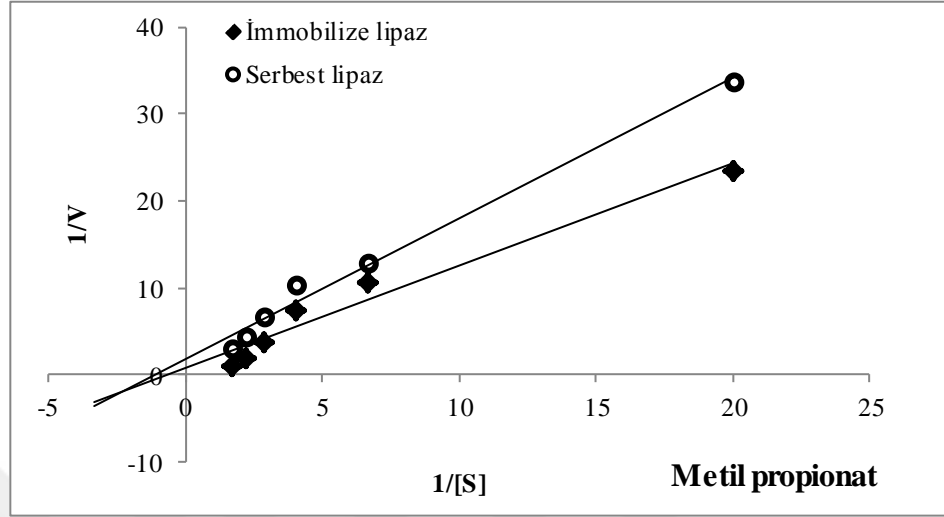
Hem serbest hem de immobilize lipaz enzimi için p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil palmitat, p-nitrofenil laurat, metil heptanoat ve metil propiyonat substratları için Lineweaver burk grafikleri çizilmiş ve Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12. (devam)



Şekil 4.12. (devam)



Şekil 4.12. *L. brevis*'den saflaştırılan serbest ve immobilize lipaz enzim için p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil palmitat, p-nitrofenil laurat, metil heptanoat ve metil propionat substratları için Lineweaver burk grafikleri

L. brevis'den saflaştırılan serbest ve immobilize lipaz enzimleri için p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil palmitat, p-nitrofenil laurat, metil heptanoat ve metil propionat substratları için Lineweaver burk grafikleri yardımıyla V_{max} ve K_M değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.3'de verilmiştir. İmmobilize lipaz enziminin tüm substratlara karşı daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. İmmobilize lipaz enziminin p-nitrofenil asetat substratı için V_{Max} ve K_M değerleri sırasıyla 6.28 mmol/L.dak ve 0.25 mM ile diğer substratlara göre daha güçlü ilgi ve yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. En düşük hidroliz aktivitesini ise p-nitrofenil palmitat substratına karşı gösterdiği Çizelge 4.3.'de görülmektedir. *L. brevis* lipaz enziminin geniş bir substrat spesifikliğı gösterdiği belirlenmiştir.

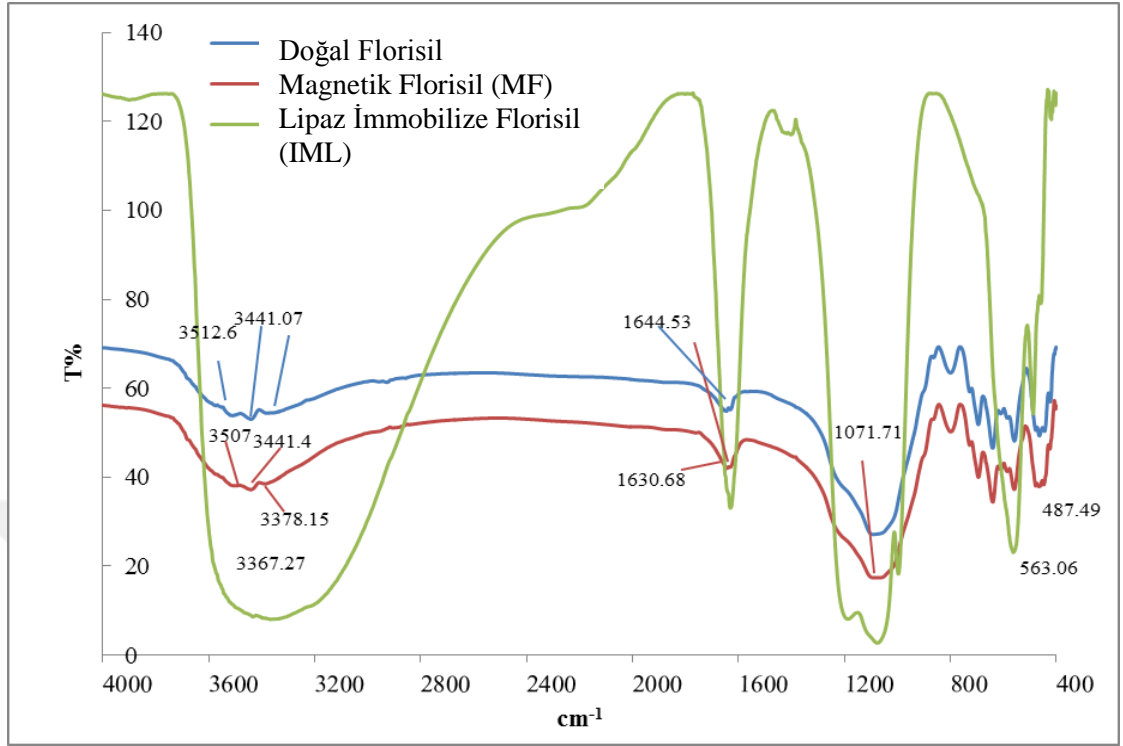
Yapılan bir çalışmada *Streptomyces rimosus* (Abramić *et al.* 1999) ve *Pseudomonas fluorescens* JCM5963 (Zhang *et al.* 2009) lipazlarının da en yüksek aktivitesini orta zincirli yağ asitlerine karşı gösterdiği bildirilmiştir.

Çizelge 4.3. *L.brevis*'dan saflaştırılan serbest ve immobilize lipaz enzim için p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil palmitat, p-nitrofenil laurat, metil heptanoat ve metil propionat substratları için V_{max} ve K_M değerleri

Substratlar	Serbest lipaz		İmmobilize lipaz	
	V_{max} ($\mu\text{mol/L.dak}$)	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/L.dak}$)	K_M (mM)
p-nitrofenil laurat	7.085	1.18	12.61	0.36
p-nitrofenil	4.76	0.47	6.3	0.84
p-nitrofenil asetat	11.75	0.376	16.28	0.25
Metil propyonat	5.58	0.62	13.9	0.85
Metil heptanoat	2.91	1.108	3.15	2.89

4.10. FT-IR Analizi Sonuçları

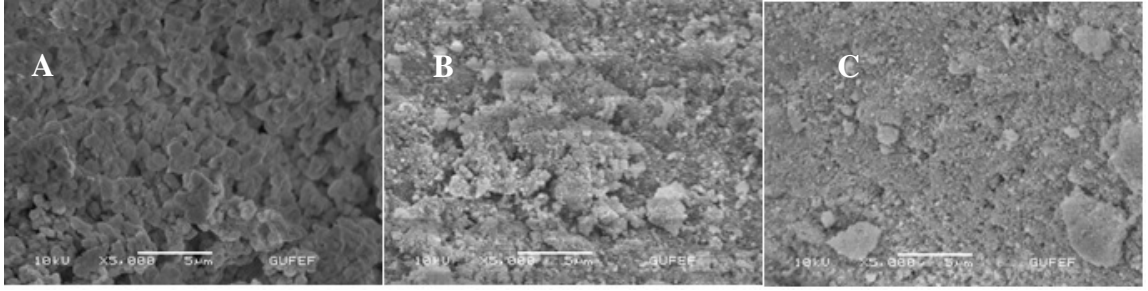
Magnetik florisil NP'ler yüzeyine lipaz enziminin glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilize edilmesi Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile de karakterize edilmiştir. Doğal florisil, Magnetik florisil NP'ler ve lipaz enzimi immobilize edilmiş magnetik florisil NP'lerine ait FTIR spektrumları Şekil 4.13'de verilmiştir ve spektrum literatürde verilenlerle uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Spektrumda yer alan 1000 ile 1214 cm^{-1} arasındaki bantlar Si-O-Si arasında yer alan antisimetrik ve simetrik bağlara aittir (Onem *et al.* 2015). Şekil 4.11'de 1640 cm^{-1} civarında yer alan titreşim bantları $-\text{CH}_2$, $-\text{C}=\text{O}$ ve ikincil amid $-\text{N}-\text{H}$ bağlarının titreşimlerine aittir. Ayrıca şifibazı oluşturduğunu da göstermektedir. 3400 cm^{-1} civarında yer alan geniş ve yüksek pikler florisilde yer alan $-\text{OH}$ bağına ve $-\text{NH}$ serbest amino gruplarının gerilme titreşimlerine aittir. Lipaz enziminin immobilizasyonundan sonra lipaz enziminin magnetik florisil NP'lerin fonksiyonel gruplarında önemli değişiklik olmamıştır. FTIR spektrumunun sonuçları lipaz enziminin magnetik florisil NP'ler yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize edildiğini göstermektedir (Onem *et al.* 2015).



Şekil 4.13. FT-IR analiz spektrumu(doğal florisit, Magnetik florisit, Enzim immobilize magnetik florisit)

4.11. SEM Analizi Görüntüleri

Florisil, magnetik florisit NP'ler ve lipaz enzim immobilize edildikten sonra magnetik florisit NP'lerin yüzey morfolojileri SEM görüntüleri ile incelenmiştir. Florisilin yapısı γ -Fe₃O₄ NP'leri ile modifiye edildiğinde bir miktar agrega olmaktadır. Ancak aynı zamanda yüzeyin pürüzlü yapısını arttırmaktadır. Enzim immobilize edilmesinin ardından magnetik florisit NP'leri arasında aglomerasyonların artmasına sebep olduğu Şekil 4.14-B'den görülmektedir. Benzer olarak magnetik yapıların yapısal değişime uğradıkları literatürde yapılan çalışmalarda elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir.

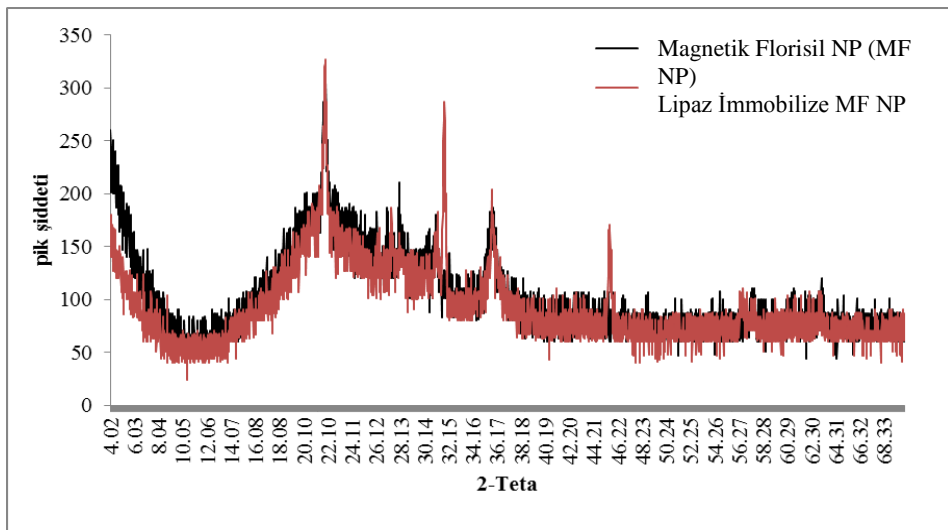


Şekil 4.14. SEM görüntüleri

A: Doğal florissil; B: Magnetik Florissil nanopartikülleri; C: Magnetic florissil ile immobilize olmuş saf lipaz enzimi

4.12. X-Ray Difraksiyon (XRD) Analizi Sonuçları

Magnetik florissil nanopartikülleri ve magnetik florissil nanopartiküllerle immobilize edilmiş lipaz enziminin XRD görüntüleri Şekil 4.15’de verilmiştir. Bu grafiklere göre, florissile ait olan pik $2\theta=9,5^\circ$ ve $27,95^\circ$ görülmektedir ve bu pikler florissilin kristal yapısını ifade etmektedirler. Ayrıca $2\theta=35,7^\circ$, $45,45^\circ$, $56,34^\circ$, $60,34^\circ$ ve $63,13^\circ$ görünen pikler Fe_3O_4 nanopartiküllerine aittir (Cao *et al.* 2014). Dolayısıyla yapılan XRD analizi ile lipaz enziminin florissil destek materyaline başarılı bir şekilde bağlanması doğrulanmaktadır.

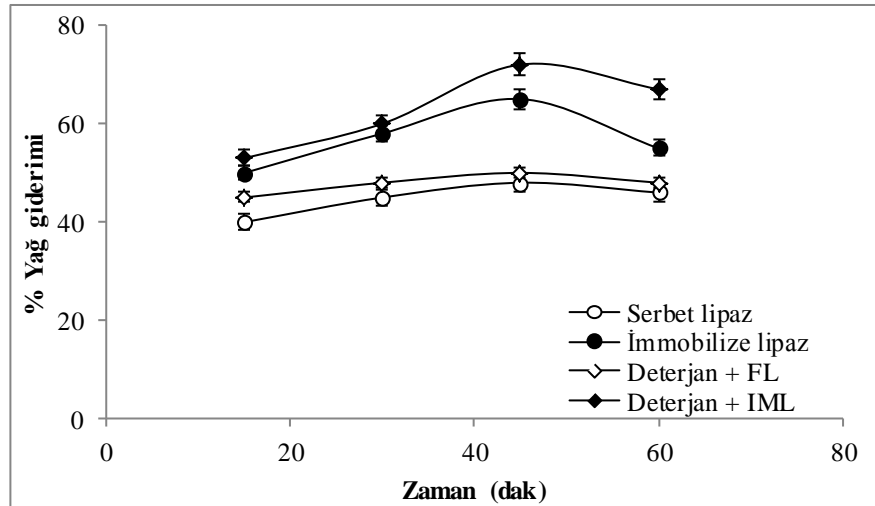


Şekil 4.15. Magnetik florissil nanopartikülleri ve magnetik florissil nanopartiküllerle immobilize edilmiş lipaz enziminin XRD görüntüleri

4.13. Serbest ve İmmobilize Lipaz Enzimlerinin Zeytin Yağı Giderme Üzerinde Etkisi

Serbest ve magnetik florosil NP'lere immobilize lipaz enzimin deterjan katkı maddesi olarak etkisi incelenmiş ve sonuçları Şekil 4.16'de verilmiştir. 40 EU aktiviteye sahip olan serbest lipaz (SL) ve immobilize lipaz (IML) enzimleri eşit şekilde zeytin yağı ile muamele edilmiş pamuklu bezler ile hem tek hem de ticari bir deterjan (% 0.1 (w/v)) ile beraber muamele edilmiştir. 1 saat süreyle izlenmiş ve süre sonunda pamuklu bezler eşit hacimde hekzan ile muamele edildikten sonra evaporatörde çözücü uzaklaştırılmış sonuçlar Şekil 4.16'da verilmiştir. Lipaz enziminin zeytinyağı giderimi karşılaştırıldığında deterjan içeren serbest lipaz enziminin 45 dakika sonra % 65 oranında, immobilize lipaz enzimin ise % 72 oranında en fazla yağ giderimi sağladığı belirlenmiştir. Yapılan deneylerden elde edilen fotoğraf Şekil 4.17'de verilmiştir.

Elde ettiğimiz bulguları destekler nitelikte *Staphylococcus arlettae* JPBW-1, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudozyma* sp. NII 08165 lipaz enzimlerinin de zamanla yağ gideriminde daha fazla etkili oldukları belirlenmiştir (Chauhan *et al.* 2012).



Şekil 4.16. Serbest ve immobilize lipaz enzimi kullanılarak yağ giderme veriminin analizi.

(Deterjan yoğunluğu %0.5; lipaz miktarı 40 U; yıkama sıcaklığı 40°C).



Şekil 4.17. Serbest ve immobilize lipaz enziminin deterjan katkı maddesi olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi

(1. Kontrol 2. immobilize enzim 3. deterjan 4.deterjan+immobilize enzim 5. serbest enzim)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Tartışma

Bu çalışmada, *L.brevis* bakterisinden ekstraselüler olarak üretilen lipaz enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Saflaştırılan lipaz enzimi $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ nanopartikülleri ile modifiye edilen florisil destek materyali üzerine *L*-glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent olarak immobilize edilmiştir. Özellikle immobilize edilmiş olan *L.brevis* lipaz enzimi yüksek sıcaklık ve pH'larda yüksek aktivite ve stabilite göstermiştir. Ayrıca deterjan katkı maddesi olarak son derece etkili olduğu ve özellikle immobilize *L.brevis* lipaz enziminin deterjan endüstrisinde kullanımının büyük potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

L.brevis bakterisinden elde edilen lipaz enzimi $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ çöktürmesi, DEAE-Sefadeks iyon değişim kromatografisi ve Sefakril S200 jel filtrasyon kromatografi teknikleri kullanılarak % 37.85 verimle yaklaşık olarak 135.2 kat saflaştırma gerçekleştirilmiştir. *L.brevis* bakterisinden elde edilen lipaz enziminin immobilizasyonu için öncelikle florisil destek materyali $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ nanopartiküller kullanılarak magnetik hale getirilmiş ve daha sonra magnetik florisil nanopartiküllerine *L*-glutaraldehit ara kolu üzerinden lipaz enzimi kovalent olarak immobilize edilmiştir. Enzimin magnetik florisil nanopartiküllerine immobilizasyonu için en uygun pH :7.0, sıcaklık değerleri 20 °C ve 60 dak süre optimum koşul olarak belirlenmiştir.

L.brevis bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi kullanılarak alt birim sayıları belirlenmiştir. Protein bantlarının molekül ağırlığının saptanmasında kullanılan standart protein (Page Ruler™ Broad Range Unstained Protein Ladder) kullanılmıştır. Standart proteinle karşılaştırıldığında *L.brevis* bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin molekül ağırlığı 57 kDa olan tek bir protein bandı gözlemlenmiştir. Saf lipaz enziminin molekül ağırlığı belirlenmesi amacıyla jel filtrasyon kromatografisinde standart proteine karşı yürütüldüğünde de 57

kDa molekül ağırlığına sahip olduğu belirlenmiştir. Enzimin tek alt biriminin olduğu ve 57 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

L. brevis bakterisinden saflaştırılan serbest lipaz enzimi ve magnetik florosil NP'lere immobilize edilen lipaz enzimleri genel olarak alkali pH'larda maksimum aktivite göstermektedirler. Yapmış olduğumuz çalışmada da serbest ve immobilize lipaz enzimi için pH değeri 6.00'nın altına düştüğü ve 10.00'un üzerine çıktığı zaman keskin bir aktivite kaybı göstermiştir, enzim maksimum aktiviteyi pH 9.00'da göstermiştir. Lipaz enzimi ile yapılmış olan diğer çalışmalarda verilmiş stabil pH değerleri için; *Candida Cylindracea* saflaştırılmış serbest ve immobilize enzim için optimum pH değeri 8.0 (Gupta *et al.* 2002), *Candida rugosa* mikroorganizmasından saflaştırılmış iki farklı çalışma da optimum pH değerleri serbest ve immobilize lipaz enzim için 7.0 olarak belirlenmiştir (Li *et al.* 2007; Huang *et al.* 2007) *Bacillus coagulans* BTS-3 suşundan izole lipaz enziminin optimum 7.5 pH'da çalıştığı (Pahujani *et al.* 2008), *Pseudomonas* sp.'den elde edilen ve alkali-tolerant termostabil olduğu bildirilen lipaz enziminin optimum pH'sı 9.60 (Kulkarni and Gadre 1999); *Bacillus subtilis* 168'den elde edilen lipaz enziminin optimum pH'sı 10.00 (Lesuisse *et al.* 1993). *Bacillus* sp. J 33 lipazının optimum pH değeri 8.00-8.50 arasında (Nawani *et al.* 1998), *Acinetobacter* sp. RAG-1 lipazının optimum pH 9.00'da (Snellman *et al.*, 2002) *Aspergillus carneus*'dan elde edilen alkali termostabil lipazın optimum pH 9.00'da (Saxena *et al.* 2003b), *Bacillus thermoleovorans* CCR11'in termoalkalofilik lipazının optimum pH 9.00-10.00 arasında (Castro-Ochoa *et al.* 2005) olduğu bildirilmiştir. Yapılmış olan bu çalışmalar elde ettiğimiz bulguları destekler niteliktedir.

Hem serbest hem de immobilize *L. brevis* lipaz enziminin pH 5.00-11.00 aralığında oldukça stabil olduğu belirlenmiştir. Immobilize lipaz enziminin serbest lipaz enzime göre 7 gün ardından daha stabil olduğu ve pH 9.00'da aktivitesinin %89.2'sini koruduğu belirlenmiştir. Immobilize lipaz enzimin geniş pH aralığında uzun süre stabil olması ve özellikle alkali pH'larda stabilitesini koruması deterjan endüstrisi için önemli bir uygulamaları potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir. Lipaz enzimi ile yapılmış olan diğer çalışmalarda verilmiş stabil pH değerleri için; *Candida cylindracea*

suşundan izole edilmiş lipaz enziminin pH 6.0-9.0 aralığında aktivite gösterdiği (Gupta *et al.* 2002), *Candida rugosa* bakterisinden saflaştırılmış ve immobilizasyonu yapılmış lipaz enziminin optimum pH aralığı 7.7-7.5 olarak belirlenmiş (Huang *et al.* 2007), *Bacillus coagulans* BTS-3 suşundan izole enzimin alkali ortamda aktivite gösterdiği ve stabil pH'sının 8.0–10.5 olduğu (Pahujani *et al.* 2008) ve genel olarak lipaz enziminin alkali pH'larda daha yüksek aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmadan elde edilen bulgulara göre magnetik florasil NP'lere immobilize *L. brevis* lipaz enzimi birçok lipaz enziminden daha geniş pH aralığında ve daha uzun süre stabilitesini koruduğu belirlenmiştir. *Arthrobacter sp.* suşundan izole edilmiş lipaz enziminin pH 6.0–8.0 aralığında 48 saat aktivite ölçümü sonrasında % 85–95 aktivitesini koruduğu, çözünebilir polimerlerde pH 8–9 aralığında enzim aktivitesinin % 60–70 oranında koruduğu belirlenmiştir (Ghulam *et al.* 2009). pH 5:00-9:00 aralığında yapılan pH stabilitesi ölçümlerinde *Pseudomonas sp.* lipazı 2 saat sonunda aktivitesinin %70'ini korurken (Kulkarni and Gadre 1999), *Pseudomonas fluorescens* JCM5963 lipazı ise 20 saat sonunda aktivitesinin % 20'sini korumuş olduğu belirlenmiştir (Zhang *et al.* 2009). Yine *Pseudomonas sp.* S5 lipazının pH 7.00-9.00 aralığında ancak 30 dakika (Rahman *et al.* 2005) stabilitesini koruyabildiği belirlenmiştir.

Serbest ve immobilize lipaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla 10 ile 90 °C aralığındaki sıcaklıklarda pH 9.0 olarak hazırlanan borat tamponu kullanılarak aktivite ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre hem serbest hem de immobilize lipaz enziminin de optimum sıcaklığı 60 °C olarak bulunmuştur. Elde edilen bulgulara göre immobilize lipaz enziminin endüstriyel uygulamalarda rahatlıkla 60 °C'de kullanılabilceği sonucuna varılmıştır. Benzer olarak *Bacillus sp.*'den elde edilen lipaz enziminin 60°C'de maksimum aktivite gösterdiği (Nawani and Kaur 2007), *Bacillus coagulans* BTS-3 suşundan izole edilip immobilizasyonu yapılmış lipaz enziminin maksimum 55 °C sıcaklıkta (Pahujani *et al.* 2008) aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Optimum sıcaklık değerlerinin belirlendiği farklı çalışmalarda *Candida cylindracea* mikroorganizmasından izole edilmiş serbest lipaz enziminin optimum 30 °C'de en yüksek aktiviteye sahip olduğu serbest enzimin ise 37 °C sıcaklıkta aktivite gösterdiği (Gupta *et al.* 2002), *Candida rugosa* lipaz enziminin saflaştırılıp kitosan

nanopartiküllerine immobilizasyonunun yapılmış olduğu çalışmada serbest ve immobilize lipaz enzimi için optimum sıcaklık değeri sırasıyla 30 °C ve 35 °C, olarak ölçülmüş (Li *et al.* 2007), *Bacillus coagulans* BTS-3 suşundan izole edilmiş immobilize lipaz enziminin maksimum 55 °C sıcaklıkta (Pahujani *et al.* 2008) aktivite gösterdiği ve *Candida rugosa* mikroorganizmasından saflaştırılmış olan lipaz enziminin serbest ve immobilize halde optimum 37 °C sıcaklıkta aktivite göstermiş olduğu belirtilmiştir (Dave *et al.* 2008).

Serbest ve immobilize *L.brevis* lipaz enziminin aktivitesi 10-90 °C aralığında 2 saatlik süre ile izlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre immobilize lipaz enziminin geniş sıcaklık aralığında daha stabil olduğu ve serbest enzimin 2 saatlik bir sürede ve 60°C'da aktivitesinin %82'sini koruduğu belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada; *Pseudomonas aeruginosa* LST-03 elde edilen lipaz enziminin 30 dakikalık sürede 60 °C'de inkübe edilmesinin ardından hiç aktivite göstermediği (Ogino *et al.* 2000), ancak *Bacillus sphaericus* 205y lipaz enziminin %28 kadar aktivitesini koruduğu belirlenmiştir (Sulong *et al.* 2006). *Candida rugosa* mikroorganizmasından izole edilmiş olan lipaz enziminin stabil sıcaklık aralığı 25–55 °C olarak belirlenmiştir (Huang *et al.* 2007), *Bacillus coagulans* BTS-3 suşundan izole edilmiş ve daha sonra immobilize edilmiş olan lipaz enziminin stabil sıcaklık aralığının 55-70 °C arasında değiştiği ve 70 °C sıcaklıkta enzim aktivitesini % 60 oranında koruduğu belirtilmiştir (Pahujani *et al.* 2008). *Arthrobacter sp.* suşundan izole edilmiş lipaz enziminin ise 70 °C sıcaklıkta % 85-95 oranında aktivitesini koruduğu, çözünebilir polimerlerde 50 °C'de 48 saat sonra enzim aktivitesinin % 60–70 oranında koruduğu belirlenmiştir (Chaubey *et al.* 2009).

Hem serbest hem de immobilize *L. brevis* lipaz enzimi için p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil palmitat, p-nitrofenil laurat, metil heptanoat ve metil propionat substratları için Lineweaver burk grafiği yardımıyla V_{max} ve K_M değerleri hesaplanmıştır. Immobilize lipaz enziminin tüm substratlara karşı daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Immobilize enzimin p-nitrofenil asetat substratı için V_{max} ve K_M değerleri

sırasıyla 6.28 $\mu\text{mol/L.dak}$ ve 0.25 mM değerleri ile diğer substratlara göre daha guclu ilgi ve yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. En duşuk hidroliz aktivitesini ise p-nitrofenil palmitat substratına karşı gösterdiği görülmektedir.

Yapılmış olan farklı çalışmalarda *Candida cylindracea* mikroorganizmasından saflaştırılmış ve asimetrik olarak polisulfon (PS) ve polieter sulfon (PES) membrana immobilizasyonu yapılmış olduğu lipaz enziminin V_{max} (U/mg) ve K_M (mM) değerleri serbest enzim için 2.1-40.2, PS immobilize enzimde 1.78-62.5, PES membran immobilize enzim için 1.44-71.4 olarak llmuřtur (Gupta *et al.* 2002). *Candida rugosa* mikroorganizmasından saflaştırılmış lipaz enziminin Poliakrilonitril (PAN) nanofiberlere immobilizasyonun yapılmış olduğu çalışmada ise enzimin kinetik parametreleri V_{max} (U/mg) ve K_M (mM) değerleri immobilize ve serbest enzim için sırasıyla 31.2/39.7; 0.548/0.456 olarak belirlenmiştir (Li *et al.* 2007). *Candida rugosa* mikroorganizmasından saflaştırılmış olan lipaz enziminin nanofibroz kitosan/poly(vinyl alcohol) (PVA) membranına immobilizasyonu yapılmış olduğu çalışmadaki V_{max} değeri ise; serbest enzim için 44.6 U/mg değeri bulunurken, nanofibroz membran (23.1 U/mg) ve kitosan bağlı PAN-CMA nanofibroz membranında (22.1 U/mg) llen değerden daha yüksek olduğu, K_M değerlerinin ise serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 0.44 mM ve 0.97 mM olarak llduęu belirtilmiştir (Huang *et al.* 2007). Ekstraselüler alkalik lipaz enziminin termo tolerant *Bacillus coagulans* BTS-3 suşundan izole edilip Nylon-6 matriksinin *L*-glutaraldehid koluna kovalent olarak bağlanarak immobilizasyonu yapılmış olan diğer bir çalışmada ise; K_M ve V_{max} değerleri sırası ile 4 mM ve 10 $\mu\text{mol/L.dak}$. olarak tespit edilmiştir (Pahujani *et al.* 2008). *Streptomyces rimosus* (Abramić *et al.* 1999) ve *Pseudomonas fluorescens* JCM5963 (Zhang *et al.* 2009) lipazlarının da en yüksek aktivitesini orta zincirli yaę asitlerine karşı gösterdiği bildirilmiştir. Boylice farklı kaynaklardan izole edilmiş lipaz enzimlerinin bizim çalışmamızda saflaştırdığımız *L. brevis* lipaz enziminde olduğu gibi geniş bir substrat spesifikliği gösterdiği tespit edilmiştir.

XRD, SEM ve FT-IR analizleri sonucunda elde edilen bulgulara göre *L. brevis* bakterisinden elde edilen lipaz enzimi başarılı ve yüksek oranında manyetik florisil NP

destek materyaline immobilize edilmiş olduğu ve zeytinyağı giderilmesinde büyük kapasite gösterdiği belirlenmiştir. Serbest ve immobilize *L. brevis* lipaz enzimin deterjan katkı maddesi olarak etkisi incelenmiştir. 40 EU aktiviteye sahip olan FL ve IML ayarlanmış ve zeytin yağı ile muamele edilmiş pamuk bezler ile hem tek hem de ticari bir deterjan (%0.1 (w/v)) ile beraber muamele edilmiştir. 1 saat süreyle izlenen lipaz enziminin zeytinyağı giderimi karşılaştırıldığında deterjan içeren serbest lipaz 45 dakika sonra % 65 oranında yağ giderimi sağlarken, immobilize lipaz enzimi ise % 72'den en fazla yağ giderimi sağladığı belirlenmiştir.

Elde ettiğimiz bulguları destekler nitelikte *Staphylococcus arlettae* JPBW-1, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudozyma* sp. NII 08165 lipase enzimlerinin de zamanla yağ gideriminde etkili oldukları belirlenmiştir (Gupta *et al.* 2005; Grbavci *et al.* 2011; Sajna *et al.* 2013; Chauhan *et al.* 2012).

5.2. Sonuç

L. brevis bakterisinin laboratuvar ortamında üretimini iki aşamalı olarak gerçekleştirdik. İlk aşamasında katı agar besiyeri ortamında ekimi yapıldıktan sonra ikinci aşamasında katı besiyerlerinden alınmış bakteri numunesinin sıvı kültür ortamında 120 saat sürelik inkübasyondan sonra bakteri üretim işlemi tamamlanmıştır. *L. brevis* bakterisinden Lipaz enziminin saflaştırma işleminde amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sefadeks iyon değişim kromatografisi ve Sephakril S200 jel filtrasyon kromatografisi teknikleri kullanılmıştır. Son adımda Sephakril S 200 jel filtrasyon kromatografi kolonundan lipaz enzimi %37.85 verimle 135.2 kat saflaştırarak lipaz enziminin izolasyon işlemi tamamlanmıştır. Lipaz enzim proteinin molekül ağırlığını belirlemek amacıyla kullanmış olduğumuz SDS-PAGE jel elektroforez analizi sonucu saflaştırmış olduğumuz enzimin tek alt birimden oluştuğu ve jel filtrasyon kromatografisi sonucunda molekül ağırlığının 57 kDa olduğu belirlenmiştir.

Florosil destek materyalinin önce 3-APTES ile aktifleştirilme işlemi Weethall (1976) tarafından verilen yönteme dayanarak yapılmıştır. Sonraki aşamada aktifleştirilmiş

florisile *L*-glutaraldehit ara kolu Cho and Rhee (1993) tarafından önerilen yöntemle göre 1 g aktifleştirilmiş florisil materyali alınarak üzerine 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,0) % 2,5 (w/v) olacak şekilde hazırlanmış *L*-glutaraldehit çözeltisinin 25 mL'si eklenerek oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırılmıştır ve destek saf su ile süzültüde glutaraldehit gözlenmeyinceye kadar iyice yıkanmış ve 50 °C'de 1 gece kurutulmuştur. Daha sonra glutaraldehit ara kolu üzerinden kovalent bağlanan florisil destek materyali γ -Fe₃O₄ nanopartiküller ile manyetik hale getirilmiş ve saflaştırılan *L. brevis* lipaz enzimi *Schiff* bazı oluşturarak immobilize edilmiştir. Süzültülerde proteinlerin miktarının tayini için Bradford yöntemine göre yapılmıştır.

Serbest ve immobilize enzimin karakterizasyonu tamamlanmıştır. Serbest ve magnetik florisil nanopartikülleri immobilize edilmiş *L. brevis* lipaz enzimin optimum pH değerinin belirlenmesi amacıyla pH değerleri 3.0 ile 11.0 aralığında değişmekte olan 10 mM konsantrasyona sahip farklı tampon çözeltiler kullanılarak lipaz enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler sonucu serbest ve bağlı lipaz enzimi maksimum pH 9.0'da aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Serbest ve immobilize lipaz'ın optimum sıcaklık değeri 60 °C, stabil sıcaklık aralıkları 50-70 °C olarak tespit edilmiştir. Serbest ve bağlı enzimin substrat spesifikliğini belirlemek amacıyla p-nitrofenil asetat, p-nitrofenil palmitat, p-nitrofenil laurat, metil heptanoat ve metil propionat substratları ile ayrı ayrı aktivite ölçümleri yapılmış ve Lineweaver burk grafikleri çizilerek V_{Max} ve K_M değerleri belirlenmiştir. Enzim en yüksek V_{max} değerini p-nitro fenil asetat substratına karşı göstermiştir. Enzim en yüksek V_{Max} değerini çalışmada substrat olarak kullanılan locust bean gum substratında göstermiş ve serbest-immobilize lipaz enzimlerinin V_{max} değerleri sırasıyla 11.75 µmol/L.dak ve 16.28 µmol/L.dak olarak bulunmuştur. K_M değerleri ise sırasıyla 0.375 mM ve 0.25 mM olarak hesaplanmıştır. Serbest ve bağlı enzimin 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarından hazırlanan CuCl₂, HgCl₂, FeCl₂, MgCl₂, ZnCl₂ ve CaCl₂ gibi metal iyonlarının etkisi araştırılmış ve bağlı enzimin serbest enzime göre metal iyonlarına karşı daha yüksek bir aktivite kararlılığına sahip olduğu belirlenmiştir.

Serbest ve immobilize enzimin deterjan katkı maddesi olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi için enzimin optimum pH ve optimum sıcaklığında zeytinyağı adsorbe edilmiş pamuklu bezler serbest lipaz, immobilize lipaz ve bir ticari deterjana (katkı maddesi olarak % 0.1 (w/v) oranında) ilave edilmiş ve 60 dakika süreyle, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Elde edilen bulgulardan *L.brevis* saflaştırılan ve immobilize edilen lipaz enziminin 45 dak sonunda sırasıyla % 65 ve % 75 oranlarında pamuklu bezlerden yağ giderimini sağladığı görülmüştür.

Bu çalışmada; toksik olmayan, ucuz ve kolayca üretimi sağlanabilinen *L.brevis* bakterisinden ekstraselüler olarak yeni ve biyogüvenli olarak izole edilen lipaz enziminin karakterizasyonunun belirlenmesi ve magnetik florisil NP'lerine immobilizasyonu sonucu yüksek oranda katalitik aktivitesini koruması, metal iyonlarına karşı dirençli olması, yüksek sıcaklıkta ve farklı pH'larda enzim stabilitesini koruması nedenlerinden dolayı özellikle deterjan katkı maddesi olarak kullanımının yanı sıra gıda, yem ve gübre endüstrilerinde daha uzun süre ve dayanıklı olarak kullanımı için oldukça gelecek vaat ettiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbas, H. Hiol A. Deyris V. Comeau L., 2002. Isolation and characterization of an extracellular lipase from mucor sp strain isolated from palm fruit. *Enzyme Microb Tech*, 7(2): 968–975.
- Abramić, M. Lešić I. Korica T. Vitale L. Saenger W. Pigac J., 1999. Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme Microb Tech* 25(6): 522-529.
- Adiguzel, G. Sonmez Z. Adiguzel A. Nadaroglu. H., 2016. Purification and characterization of a thermostable endo-beta-1,4-mannanase from *Weissella viridescens* LB37 and its application in fruit juice clarification. *European Food Research and Technology*. Euro Food Res Technol, 242:769–776.
- Aksoy, C., 2003. Lipaz ve üreaz enzimlerinin çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1-68.
- Aktsipetrov, O. A., 2002. Nonlinear magneto-optics in magnetic nanoparticles, *Colloids And Surfaces A: Physicochemical And Engineering Aspects*. (202): 165–173.
- Alptekin, Ö., Tükel S.S. Yıldırım D. Alagoz D., 2009. Characterization and properties of catalase immobilized onto controlled pore glass and its application in batch and plug-flow type reactors, *Journal of Molecular Catalysis. Enzymatic*. 58 (1):124-131.
- Altun S., Cakiroglu B. Ozacar M., 2015. A facile and effective immobilization of glucose oxidase on tannic acid modified CoFe₂O₄ magnetic nanoparticles *Coll Surf B: Biointerfaces*. 136:963-970.
- Aydar, S., 2012. Tiyofen ve 3,4- etilendioksitiyofen donör gruplarının benzotiyadiazol akseptör grubuyla yaptığı dad tipi iletken polimerlerde enzim immobilizasyonu, Karabük Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. 1-77.
- Bakkal, M., 2006. Tutuklanmış *Candida rugosa* Lipazı İle Rasemik Naproksen Metil Esterden S-Naproksen Üretiminde Proses Parametrelerinin İncelenmesi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. 1-124.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*. 72: 248–254.
- Cao, C., Xiao L. Chen C. Shi X. Cao Q. Gao L., 2014. In situ preparation of magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles via a novel reduction-precipitation method and their application in adsorption of reactive azo dye. *Powder Technology*. 260: 90-97.
- Carolan, N., Forster R.J. O'Fagain C., 2007. Covalent attachment of ferrocene to soybean peroxidase glycans: Electron transfer mediation to redox enzymes *Bioconjugate Chemistry*. 18 (2): 524-529.
- Castro-Ochoa, L.D., Rodriguez-Gomez C. Valerio-Alfaro G., and Ros R., 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme Microb Technol*. 37:648-654.

- Chang, S.W., Shaw J.F. Yang K.H. Chang S.F. Shieh C.J., 2008. Studies of optimum conditions for covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(γ -glutamic acid) by RSM. *Bioresour Technol.* 99(8): 2800-5.
- Chauhan, P.S., Puri N. Sharma P. Gupta N., 2012. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* (93) 1817–1830.
- Chibata I., Tosa T. Sato T. Mori T. and Mauto Y., 1972. Preparation and Industrial Application of Immobilized Aminoacylases. In: Proc. Ivth Int. Ferment. Symp. Fermentation Technology Today. Society for Fermentation Technology. 21:1697–1709.
- Cui, Y., Li Y. Yang Y. Liu X. Lei L. Zhou L. Pan F., 2010. Facile synthesis of amino-silane modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles and application for lipase immobilization. *Journal of Biotechnology.* 150:171-174.
- Cygler, M., Schrag J.D., 1999. Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1441:205-214.
- Dennler, S., Fromen M.C. Casanove M.J., 2008. Towards atomic-scale design: a theoretical investigation of magnetic nanoparticles and ultrathin films. *Microelectronics Journal.* 39:184–189.
- Doğan, G., 2008. Yeni nesil polimerik nanoyapıların hazırlanması ve enzim immobilizasyonunda kullanılması. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- Eren Ö., Çömekçioğlu KU. Dostbil N., 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları, KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(1) :12-19
- Faber, K., 2000. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4th Edition, Springer-Verlag, Berlin, 1-436.
- Feynman R.P.. 1960. There's Plenty of Room at the Bottom. Caltech Engineering&Science. Retrieved, Feb.14, 2014.
From: <http://calteches.library.caltech.edu/1976/1/1960Bottom.pdf>
- Gazit E., 2007. Plenty of Room for Biology at the Bottom. Imperial college press. From <http://www.worldscibooks.com/lifesci/p465.html> 1-189.
- Gezer, E., 2009. Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu Ve Aromatik Esterlerin Sentezinde Kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antakya/Hatay, 1-67.
- Govardhan, C.P., 1999. Crosslinking of Enzymes for Improved Stability and Performance. *Current Opinion in Biotechnology*, 10:331-335
- Grbavci, S., Bezbradica D. Izrael-Zivkovi L., 2011. Production of lipase and protease from an indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strain and their evaluation as detergent additives: compatibility study with detergent ingredients and washing performance. *Biores Tech* 102(24):11226-11233
- Gupta, R., Gupta N. Rathi P., 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biotechnological properties. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64:763–781.
- Gupta, A.K., Gupta M., 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.*;26(18):3995-4021.
- Gül, UG., 2013. Fungal Lipases and Use in Industrial Areas, Afyon Kocatepe University Journal of Science and Engineering. 13 (1-8).

- Hiol, A., Jonzo M.D. Rugani N. Druet D. Sadra L. Comeau L.C., 2000. Purification and Characterization of an Extracellular Lipase from Thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from Palm Fruit. *Enzyme and Microbial Technology* (26): 421-430.
- Huang, X., Ge D. Xu Z., 2007. European Polymer Journal 43 Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization). *European Polymer Journal*.43(9):3710-3718
- Huang, Y., 2002. Lipase Production in Fungi, Doktora Tezi, Auburn University,
- Jaeger, KE., Eggert T., 2002. Lipases for biotechnology, *Curr Opin Biotechnol*. 13: 390-397
- Jaeger, K.E., Reetz M.T., 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, *Trends in Biotechnology*. (16):396-403.
- Kahraman, A.S., 2008. Non-Manyetik ve Manyetik Lateks Partiküllerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Doku Mühendisliği Uygulamaları, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 1-97.e Üniversitesi, Ankara, 1-97.
- Kamori, M., Yamashita Y. Naoshima Y., 2002. Enzyme immobilization utilizing a porous ceramics support for chiral synthesis, *Chirality*, (14):558-561.
- Kawaguchi, S., Ito K., 2005. Dispersion Polymerization, *Advanced Polymer Science*, Springer, Heidelberg, (175):299–328.
- Kıran, H., 2006. Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosae of rat, chicken, calf, and man. *Biochemica Biophysica Acta*, (268): 442-452.
- Kim, D.J., Shin D.H. Hur B.K. Kim E.K., 2000. Beef Tallow Hydrolysis by Immobilized Lipase, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10, 836.
- Kotwal, SM., Shankar V., 2009. “Immobilized invertase”, *Biotechnology Advances*, (27): 311-322.
- Kulkarni, N., Gadre RV., 2002. Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *J Ind Food Microbiol* 28:344-348
- Kumar, V., Sinha AK. Makkar HPS. Becker K., 2012. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition. *Food Chemistry* (120):945–959.
- Lehninger, M., Nelson DL. Cox M., 2005. Principles of Biochemistry, Chapter 6, W.H Freeman, Fourth Ed. Published by W.H. Freeman. ISBN 10: 1-42923-414-8
- Lesuisse, E., Schanck K. Colson C., 1993. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis*168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur J Biochem* (216):155-160.
- Li, S., Ping J. Wu B., 2007. Electrospun polyacrylonitrile nanofibrous membranes for lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (47): 117–124.
- Li SF., Chen JP. Wen-Teng Wu., 2007. 47 Electrospun polyacrylonitrile nanofibrous membranes for lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 117–124.
- Li, Y., Yang P. Meng K. Wang Y. Luo H. Wu N. Fan Y. Yao B., 2007. Gene, cloning, expression and characterization of a novel β -mannanase from *Bacillus circulans* CGMCC 1416. *J Microbiol Biotechnol* (18):160–166.
- Lupa, L., Negrea A. Ciopec M. Negrea P., 2013. Removal from aqueous solutions through adsorption onto florisol impregnated with Trihexyl (tetradecyl) phosphonium chloride *Molecules* (18):12845-12856.

- Metin, H., 2007. Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Materials. *Methods of Enzymology* (44): 134-148.
- Marija, A., Ivana L. Tamara K. Ljubinka V. Wolfram S ., 1999. Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*.(25): 522–529
- Mutlu, D., 2006. Rasemik Naproksen Esterden Enantiyoseçimli Hidroliz İle Snaproksen Üretiminde Reaksiyon Parametrelerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-101.
- Nadaroglu, H., Adiguzel A. Adiguzel G., 2015. Purification and characterization of β -mannanase from *Lactobacillus plantarum* (M24) and its applications in some fruit juices *International J Food Sci Technol*. 50 (5):1158-1165.
- Nadaroglu, H., Adiguzel, A. Adiguzel G., 2015. Purification and characterisation of β -mannanase from *Lactobacillus plantarum* (M24) and its applications in some fruit juices. *International Journal of Food Science and Technology*. (50):1158–1165.
- Nawani, N, Kaur J., 2000. Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus sp* J33. *Mol Cell Biochem* 206:91-96.
- Nelson D.L., Cox M.M., 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Chapter 6, W.H Freeman, Fourth Edition, 159-200.
- Niemeyer, CM., Mirkin C.A., 2004. *Nanobiotechnology* ISBN: 978-3-527-30658-9 1-491.
February 2004
- Ogino, H., Nakagawa S. Shinya K. Muto T. Fujimura N. Yasuda M. Ishikawa H., 2000. Purification and characterization of organic solvent-stable lipase from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *J Biosci Bioeng* 89(5):451-7
- Oh, J.M., Lee D.H. Song Y.S. Lee S.G. Kim S.W., 2007. Stability of Immobilized Lipase on Poly(vinyl alcohol) Microspheres, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 13(3):429-433.
- Onem, H., Cicek S. Nadaroglu H., 2016. Immobilization of A Thermostable Phytase From Pinar Melkior (*Lactarius piperatus*) Onto Magnetic Fe_3O_4 -Chitosan Nanoparticles. *CYTA - Journal of Food*, 50(5):1158-1165.
- Onem, H., Nadaroglu H., 2014. Preparation and Properties of Purified Phytase from Oakbug Milkcap (*Lactarius Quietus*) Immobilised on Coated Chitosan with Iron Nano Particles and Investigation of Its Usability in Food Industry. *Journal of Food and Nutrition Research*, Vol. 2, No. (12):938-945.
- Orive, G., Hernandez R.M., 2003. Survival of different cell lines in alginate–agarose microcapsules, *European Journal of Pharmaceutical Science*. (18):23–30.
- Öznülüer, T., Demir U., 2002. Formation of Bi_2S_3 thin films on Au(111) by electrochemical atomic layer epitaxy: kinetics of structural changes in the initial monolayers. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 529 (1): 34-42.
- Ozyilmaz, G. Tukul S., 2007. Simultaneous and sequential co-immobilization of glucose oxidase and catalase onto florasil. *Journal of Microbiology and Biotechnology* .17(6): 960-967.
- Pahujani, S., Shamsheer S. Ghanshyam Ch. Gupta R., 2008. Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability *Technology* (99): 2566 –2570.

- Paiva, A.L., Balcao V.M. Maltaca F.X., 2000. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases, *Enzyme and Microbial Technology*. (27):187-204.
- Palmer, T., 2007. "Enzymes", Horwood Publishing, England, 361-370.
- Pearce, J.M., 2012. Make nanotechnology research open-source. *Nature* (491): 519-521.
- Rahman, R., Baharum SN. Basri M. Salleh AB., 2005. High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas* sp strain S5. *Anal Biochem* 341(2):267-274
- Regen, S.L., Singh M. Sameul N.K., 1984. Functionalized Polymeric Liposomes, Efficient Immobilisation of α -Chymotrypsin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (119) : 646-651.
- Sajna, KV., Sukumaran RK. Jayamurthy H., 2013. Studies on biosurfactants from *Pseudozyma* sp NII, 08165 and their potential application as laundry detergent additives, *Biochem Eng J*. (78):85-92
- Saxena, RK., Sheoran A. Giri B. Davidson WS., 2003. Purification strategies for microbial lipases. *J Microbiol Methods*. (52):1-18.
- Sharma, R., Chisti Y. Banerjee UC., 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv*. (19):627-662.
- Sheng-Feng, Li., Jyh-Ping Chen b. Wen-Teng Wu., 2007. Enzymatic 47 snElectrospun polyacrylonitrile nanofibrous membranes for lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis*. 11(1):143-9.
- Snellman, EA., Sullivan ER. Colwell RR., 2002 Purification and properties of the extracellular lipase, Lip A, of *Acinetobacter* sp RAG-1. *Eur J Biochem*. (269):5771-5779.
- Sulong, MR., Rahman R. Salleh AB. Basri M., 2006. A novel organic solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* 205y: extracellular expression of a novel OST-lipase gene Protein Expr Purif. 49(2):190-5.
- Sümengen, M., 2011. Laktik Asit Bakterilerinden Fitaz Üretimi Ve Endüstriyel Kullanım Alanları, biyoloji anabilim dalı. adana.1-104
- Temizkan, G., Arda N., 2008. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi, 1-345.
- Tiryaki, Ö. İ., 1993. Endüstriyel Proseslerde Biyokatalizör Pelletlerin Kullanımı, Yüksek Lisans Semineri, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Tischer, W., Wedekind F., 1999. Immobilized enzymes: methods and applications, *Topics in Current Chemistry* (200):95-126.
- Villeneuve, D., Nagarajan R. Hatton T.A., 2000. Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation and Functionalization. Oxford University Pres., Washington, DC. ACS Symposium Series, Vol. 996. ISBN13: 9780841269699
- Weethall, HH., 1976. Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Materials. *Methods of Enzymology*. (44):134-148.
- Wilson, L., Betancor L. Fernandez-Lorente G. Fuentes M. Hidalgo A. Guisan J.M. Pessela B.C.C. Fernandez-Lafuente R., 2004. Cross-linked aggregates of multimeric enzymes: A simple and efficient methodology to stabilize their quaternary structure, *Biomacromolecules*. 5(3) :814-817.

- Wiseman, A., 1995. Introduction to Principles. In: Handbook of Enzyme Biotechnology, 3rd Edn., Ellis Horwood Ltd., T.J. Press Ltd., Padstow, Cornwall, UK, Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Online ISSN: 1097-4660
- Zaborsky, O.R., 1973. Immobilized enzymes (CRC Press). Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic(2): 115-126
- Zhang, A., Gao R. Diao N. Xie G. Gao G. Cao S., 2009. Expression and characterization of an organic solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* JCM5963. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. (56):78–84



ÖZGEÇMİŞ

29.8.1988'da İran, Sanandaj'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Sanandaj'da tamamladı. 2011 yılında Azad Üniversitesi, Doğal ve uygulamalı Bilim Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2014 yılında Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı, Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı.

