

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALGINAT VE KARAGENAN JELLERDE
Candida rugosa LİPAZI ve DEFNE LİPAZININ
İMMOBİLİZASYONU**

**SİNEM TUNA
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Danışman:
Doç. Dr. Hülya YAĞAR
Edirne-2011**

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALGINAT+KARAGENAN JELLERDE
Candida Rugosa LİPAZI ve DEFNE LİPAZININ
İMMOBİLİZASYONU**

Sinem TUNA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

Danışman

Doç. Dr. Hülya YAĞAR

EDİRNE-2011

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALGİNAT+KARAGENAN JELLERDE
Candida rugosa LİPAZI ve DEFNE LİPAZININ
İMMOBİLİZASYONU

Sinem TUNA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez 03 / 06 / 2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU



Doç. Dr. Figen ERTAN



Doç. Dr. Hülya YAĞAR
Danışman

ÖZET

Bu çalışmada; mikrobiyal kaynaklı *Candida rugosa* lipazı ve bitkisel kaynaklı defne lipazı alginat+karagenan jellere immobilize edildi. Elde edilen immobilize enzimlerin optimum pH ve sıcaklık, K_m ve V_{max} kinetik sabitleri, termal kararlılık, yeniden kullanılabilirlik ve depo kararlılığı gibi bazı biyokimyasal özellikleri belirlendi ve serbest enziminkiyle karşılaştırıldı.

Ticari bir mikrobiyal lipaz olan *Candida rugosa* lipazı ve bitkisel kaynaklı defne lipazı alginat+karagenan jellerde tutuklanırken damlatma çözeltisi olarak % 4'lük (w/v) $CaCl_2$ kullanıldı. Protein tayinleri Bradford yöntemi uygulanarak gerçekleştirildi. *Candida rugosa* için immobilizasyon yüzdesi % 65 ve defne lipazı için % 77 olarak belirlendi. Immobilize enzimin spesifik hidrolitik aktivitesi *Candida rugosa* için 54 U/mg protein ve defne lipazı için de 33 U/mg protein olarak belirlendi. *Candida rugosa* lipazının alginat+karagenan boncuklarda immobilizasyon koşullarının optimizasyonunda; optimum karagenan konsantrasyonu % 0.6, $CaCl_2$ konsantrasyonu % 4, optimum yüklenen enzim konsantrasyonu 62.5 mg/mL, optimum boncuk boyutu 0.2 mm ve optimum boncuk miktarı 0.25 gr olarak belirlendi.

Alginat+karagenan jellerde tutuklanan *Candida rugosa* lipazının optimum pH'ı serbest enzim için pH 6.0 ve immobilize enzim için pH 6.5, defne lipazının optimum pH'ı serbest enzim için pH 7.0 ve immobilize enzim için pH 8.0 olarak belirlendi. Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazı için optimum sıcaklık 40 °C olarak bulundu. Serbest defne lipazı için optimum sıcaklık 40°C, immobilize enzim için ise 50 °C olarak bulundu. Immobilize *Candida rugosa* lipazı ve defne lipazının termal kararlılıklarını tutuklama sonrasında da nispeten korudukları gözlemlendi.

Serbest enzim ve alginat+karagenan jel boncuklarda tutuklanan *Candida rugosa* lipazının K_m ve V_{max} kinetik sabitleri sırasıyla, 0.111 g ile 71.43 U/ mg protein, 0.222 g ile 19.6 U/mg protein olarak bulundu. Serbest enzim ve alginat+karagenan jel boncuklarda tutuklanan defne lipazının K_m ve V_{max} kinetik sabitleri sırasıyla, 0.203 g ile 16.1 U/ mg

protein, 0147 g ile 22.72 U/ mg protein olarak bulundu. Yeniden kullanılabilirlik çalışmasında alginat+karagenan boncuklara immobilize *Candida rugosa* lipazında ilk 5 döngü süresince boncukların aktivitesinin yaklaşık % 85 kadarını, g alginat+karagenan boncuklara immobilize defne lipazında % 60 kadarını koruyabildiği belirlendi. Substrat spesifitesi için gliseriltristearat, trikapriline, aspir yağı, soya yağı, fındık yağı, kanola yağı, ayçiçeği yağı, zeytinyağı ve ham mısır yağı substrat olarak denendi. Depolama kararlılığı çalışmasında serbest ve immobilize *Candida rugosa* ve defne lipazının serbest ve immobilize enzimlerinin her ikisi de aktivitesini 20 gün boyunca koruduğu gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Lipaz, immobilizasyon, alginat, karagenan, *Candida rugosa*, defne

SUMMARY

In this study, *Candida rugosa* lipase which is microbial lipase and laurel lipase which is plant lipase were immobilized in alginate+carrageenan gels. Some properties of obtained immobilized enzymes such as optimum pH and temperature, kinetic parameters (K_m and V_{max}), thermal stability, reuse and storage stability were determined and compared to these of free enzyme.

When *Candida rugosa* lipase which is the commercial microbial lipase and laurel lipase were entrapped in alginate+carrageenan gels, $CaCl_2$ (% 4 w/v) was used as dropping solution. Protein determinations were done by using Bradford method. The immobilization percentage for *Candida rugosa* lipase and laurel lipase were determined to be 65 % and 77 %, respectively. The specific hydrolytic activities of *Candida rugosa* lipase and laurel lipase were found to be 54 U/mg and 33 U/mg, respectively. The optimization of immobilization conditions of *Candida rugosa* lipase was done, optimum carrageenan concentration was determined as 0.06 % (w/v). Optimum $CaCl_2$ concentration is 4 % (w/v). Optimum bead diameter is 0.2 mm. Optimum bead amount was determined to be of 0.25 g. The loading enzyme concentration was determined to be 62.5 mg/mL.

The optimum pHs of both free and immobilized *Candida rugosa* lipase in alginate+carrageenan gels were determined as 6.0 and 6.5, respectively. The optimum pHs of both free and immobilized laurel lipase in alginate+carrageenan gels were determined as 7.0 and 8.0, respectively. Optimum temperatures of both free and immobilized *Candida rugosa* lipase in alginate+carrageenan gels were found to be 40 °C, while optimum temperatures of free and immobilized laurel lipase in alginate+carrageenan gels were determined to be 40 °C and 50 °C, respectively.

It was observed that immobilized *Candida rugosa* lipase and laurel lipase relatively preserved their thermal stabilities. K_m and V_{max} values of both free and immobilized *Candida rugosa* lipase were determined to be 0.111 g -71.43 U/mg protein and 0.222 g -19.6 U/mg protein, respectively. These values were 0.203 g - 16.1 U/mg and 0.147 g -22.72 U/mg

protein for free and immobilized *laurel* lipase, respectively. In the reusing study, immobilized *Candida rugosa* lipase and laurel lipase saved about 85% and 60 % of their activities during 5 cycles, respectively. Substrate specificities of both enzymes were carried out by using glyceryl tristearate, tricaprylin, safflower oil, soybeans oil, hazelnut oil, canola oil, sunflower oil, olive oil, corn oil as substrates. It was observed in storage stability study free and immobilized forms of both enzymes saved its activity during 20 days.

Key words: Lipase, immobilization, alginate, carrageenan, *Candida rugosa*, laurel

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	i
SUMMARY	ii
İÇİNDEKİLER	iii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Enzimler	4
2.2. Lipaz Enzimi	5
2.2.1. Lipaz Reaksiyonları.....	8
2.2.2. Lipazın Üç Boyutlu Yapısı.....	10
2.2.3. Ara Yüzey Aktivasyonu.....	14
2.3. Enzim İmmobilizasyonu	15
2.3.1. Adsorpsiyon ile İmmobilizasyon.....	17
2.3.2. Kovalent Bağlanma ile Adsorpsiyon.....	18
2.3.3. İyonik Bağlanma ile İmmobilizasyon.....	18
2.3.4. Tutuklama Yöntemiyle İmmobilizasyon.....	18
2.3.4.1. Kalsiyum Alginat Jelde Tutuklama.....	20
2.3.4.2. Karragenan Jelde Tutuklama	22
2.4. Lipaz İmmobilizasyonu	24
2.5. Candida rugosa ve Defne Lipazıyla Gerçekleştirilen İmmobilizasyon Çalışmaları	25
3. MATERYAL VE METOD	27
3.1. Materyal	27
3.1.1. Kimyasal Maddeler.....	27
3.1.2. Kullanılan Aletler.....	28
3.1.3. Hazırlanan Çözeltiler.....	28
3.2. Metodlar	30

3.2.1. Protein Tayini.....	30
3.2.1.1. Bradford Yöntemi ile Kantitatif Protein Tayini.....	30
3.2.2. Enzimatik Aktivite Tayini.....	31
3.2.3. Defne Tohumundan Lipaz Enziminin İzolasyonu.....	32
3.2.3.1. Defne Aseton Tozunun Eldesi.....	32
3.2.3.2. Defne Lipazı Ekstraksiyonu.....	32
3.2.4. Alginat+Karagenan Jelde Tutuklama.....	32
3.2.5. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu.....	33
3.2.5.1. Karragenan Miktarı İmmobilizasyonu.....	33
3.2.5.2. Kalsiyum Klorür Konsantrasyonu Optimizasyonu.....	33
3.2.5.3. Enzim Miktarı Optimizasyonu.....	34
3.2.5.4. Boncuk Boyutu Optimizasyonu.....	34
3.2.5.5. Boncuk Miktarı Optimizasyonu.....	35
3.2.6. <i>Candida rugosa</i> ve Defne Lipazının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi.....	35
3.2.6.1. Serbest ve İmmobilize Enzimin Optimum pH'ının Belirlenmesi.....	35
3.2.6.2. Serbest ve İmmobilize Enzimin Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi.....	35
3.2.6.3. Serbest ve İmmobilize Enzimin Termal Kararlılığının Belirlenmesi	36
3.2.6.4. Serbest ve İmmobilize Enzimin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi.....	36
3.2.6.5. Farklı Yağ Türleri İle Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi.....	37
3.2.6.6. Serbest ve İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği.....	37
3.2.6.7. İmmobilize Enzimin Depo Kararlılığı.....	37
4. DENEYLER VE BULGULAR.....	38
4.1. Protein Tayini.....	38
4.2. <i>Candida rugosa</i> Lipazı ve Defne Lipazının Alginat+Karragenan Jellerde Tutuklanması.....	39
4.3. <i>Candida rugosa</i> lipazının Alginat+Karragenan Jel Karışımlarında İmmobilizasyonun Optimizasyonu.....	40
4.3.1. Karragenan Miktarı Optimizasyonu.....	40
4.3.2. Kalsiyum Klorür Konsantrasyonu Optimizasyonu.....	41
4.3.3. Enzim Miktarı Optimizasyonu.....	42
4.3.4. Boncuk Boyutu Optimizasyonu.....	43

4.3.5. Boncuk Miktarı Optimizasyonu	44
4.4. Alginat+Karragenan Jel Karışımlarında İmmobilize <i>Candida rugosa</i> Lipazı ve Defne Lipazının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi.....	45
4.4.1. Optimum pH.....	45
4.4.2. Optimum Sıcaklık Tayini.....	47
4.4.3. Termal Kararlılık Çalışması.....	49
4.4.4. K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması.....	52
4.4.5. Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi.....	54
4.4.6. Tekrar Kullanılabilirliği.....	55
4.4.7. Depo Kararlılığı.....	57
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	59
6. KAYNAKLAR.....	67
7. TEŞEKKÜR.....	70
8. ÖZGEÇMİŞ.....	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1	Sulu ve susuz çözeltilerde lipazın katalizlediği farklı tepkimeler..... 9
Şekil 2.2	At pankreatik lipazının moleküler yapısı..... 11
Şekil 2.3	Lipazların hidroliz aktivitesi mekanizması..... 13
Şekil 2.4	Lipazların ester sentezi aktivitesi mekanizması..... 14
Şekil 2.5	Alginat monomerleri ve Alginat zinciri..... 21
Şekil 2.6	Alginatın kalsiyum iyonlarıyla bağlanma bölgeleri..... 21
Şekil 2.7	Karragenan çeşitleri..... 23
Şekil 4.1	Bradford yöntemine göre protein standart grafiği..... 38
Şekil 4.2	<i>Candida rugosa</i> lipazının alginat + karragenan jelde tutuklanması ile elde edilen boncuklar..... 39
Şekil 4.3	Defne lipazının alginat + karragenan jelde tutuklanması ile elde edilen boncuklar..... 39
Şekil 4.4	<i>Candida rugosa</i> aktivitesine karagenan miktarının etkisi..... 40
Şekil 4.5	<i>Candida rugosa</i> aktivitesine CaCl ₂ konsantrasyonunun etkisi..... 41
Şekil 4.6	<i>Candida rugosa</i> aktivitesine yüklenen enzim miktarının etkisi..... 42
Şekil 4.7	<i>Candida rugosa</i> aktivitesine boncuk boyutunun etkisi..... 43
Şekil 4.8	<i>Candida rugosa</i> aktivitesine boncuk miktarının etkisi..... 44
Şekil 4.9	İmmobilize ve serbest <i>Candida rugosa</i> lipazının pH'a bağlı aktivitelerinin değişimleri..... 46
Şekil 4.10	İmmobilize ve serbest defne lipazının pH'a bağlı aktivitelerinin değişimleri..... 47
Şekil 4.11	İmmobilize ve serbest <i>Candida rugosa</i> lipazının sıcaklığa bağlı aktivitelerinin değişimi..... 48
Şekil 4.12	İmmobilize ve serbest defne lipazının sıcaklığa bağlı aktivitelerinin değişimi..... 49
Şekil.4.13	Serbest ve alginat+karagenan boncuklara immobilize <i>Candida rugosa</i> lipazının aktivitesine ait termal kararlılık grafiği..... 50
Şekil 4.14	Serbest ve alginat+karagenan boncuklara immobilize defne lipazının aktivitesine ait termal kararlılık grafiği..... 51
Şekil 4.15	Alginat+karragenan boncuklara immobilize ve serbest <i>Candida rugosa</i> lipazının aktivitesi için Lineweaver-Burk Grafiği..... 52

Şekil 4.16	Alginat+karragenan boncuklara immobilize ve serbest defne lipazının aktivitesi için Lineweaver-Burk Grafiği.....	53
Şekil 4.17	Alginat + Karragenan boncuklara immobilize <i>Candida rugosa</i> lipazının kesikli proseste yeniden kullanılabiliirliği.....	56
Şekil 4.18	Alginat + Karragenan boncuklara immobilize defne lipazının kesikli proseste yeniden kullanılabiliirliği.....	56
Şekil 4.19	Alginat + karragenan boncuklarda immobilize ve serbest <i>Candida rugosa</i> lipazının için aktivitesi için depo kararlığı.....	57
Şekil 4.20	Alginat + karragenan boncuklarda immobilize ve serbest defne lipazının için aktivitesi için depo kararlığı.....	58

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 2.1. Mikrobiyal lipazların sanayide önemli kullanım alanları.....	10
Tablo 4.1. <i>Candida rugosa</i> lipazının alginat + karragenan jelde tutuklanmasının optimizasyon sonuçları.....	45
Tablo 4.2. Serbest ve immobilize <i>Candida rugosa</i> lipazının aktivitesi için kinetik değerleri.....	53
Tablo 4.3. Serbest ve immobilize defne lipazının aktivitesi için kinetik değerleri	53
Tablo.4.4. Serbest ve immobilize <i>Candida rugosa</i> lipazının substrat spesifitesi değerleri.....	54
Tablo 4.5. Serbest ve immobilize defne lipazının aktivitesi için substrat spesifitesi değerleri.....	55

1.GİRİŞ

Günümüzde lipazlar hem sulu hem de susuz ortamda yapılması güç reaksiyonları başaran en önemli biyokatalizörler arasında yer almaktadır. Lipazlar geniş substrat spektrumuna sahip olup yüksek sıcaklıkta, bazik pH'ta çalışabilme ve organik çözücülere karşı kararlılık gösterebilme yetenekleri sayesinde pek çok endüstri dalında kullanılabilme potansiyeliner taşırlar.

Lipazlar, gıda ve süt ürünleri (peynir olgunlaştırma, aroma geliştirme), deterjan, ilaç endüstrisinde, tarımla ilgili kimyasal madde (insektisit, pestisit), ve oleokimyasal (katı-sıvı yağ hidrolizleri, biyolojik yüzey aktif madde sentezleri) endüstrileri gibi çeşitli biyoteknolojik alanlarda kullanılmaktadır.

Son yıllarda lipazlar, özellikle organik sentez alanında, proteazlar ve amilazlar üzerinden kesinlikle büyük bir önem kazanmıştır. Lipazların doğal enantiyomer seçiciliği ve bölge seçiciliği özelliklerinden kiral ilaçların resolüsyonu, yağ modifikasyonu, bitkisel yağ yerine kullanılan maddelerin sentezi, biyolojik yakıtların sentezi, kişisel bakım ürünlerinin sentezi ve aroma arttırıcıların sentezi için yararlanılmaktadır. Bu nedenle lipazlar, günümüzde, organik kimyacıların, eczacıların, biyofizikçilerin, biyokimya ve proses mühendislerinin, biyoteknologların, mikrobiyolog ve biyokimyacıların ilgilendiği en önemli enzimlerdendir.

Bitki, hayvan ve mikrobiyal lipazların arasında çok geniş uygulama alanı bulan lipazlar, mikrobiyal lipazlar özellikle bakteriyel ve fungal lipazlardır. Bunun sebebi, mikroorganizmaların kolay yetiştirilebilmeleri, üretim ve genetiklerine kolaylıkla müdahale edilebilmeleri ve mikrobiyal lipazlarının çeşitli hidrolitik ve sentetik birçok reaksiyonu katalizleyebilmeleri, ayrıca mikrobiyal lipazların optimum pH ve sıcaklıklarının ortalamanın üzerinde olmasından kaynaklanmaktadır. Mikrobiyal

lipazlar; hidroliz ve esterleşme, transesterleşme, interesterleşme gibi sentetik birçok reaksiyonu katalizleyebilmeleridir.

Lipazlar (trیاçilgliserol açilhidrolaz; EC. 3.1.1.3) hayvansal ve bitkisel yağların normal koşullar altında tersinir hidrolizlerini katalizleyen enzimlerdir. Bunun dışında bu hidrolitik reaksiyon tersinirdir ve azalan su miktarı varlığında, sıklıkla esterifikasyon, transesterifikasyon gibi reaksiyonları da katalizlemektedir (Paiva vd., 2000).

Lipazlar tarafından katalizlenmiş reaksiyonlar doğal metabolik reaksiyonlara benzemesinden dolayı kimyasal reaksiyonlara oranla da çevre dostu olarak tanımlanırlar. Düşük aktivasyon enerjileri sebebiyle lipazın katalizlediği reaksiyonlar daha düşük sıcaklık ve nötral pH gerektirir. Enerji gereksinimi düşüktür, ürün ve substratlara karşı aktiviteleri çok yüksektir. Bu aktivite özellikle de substrat (yağ)-su ara yüzeyinde en yüksek seviyeye çıkmaktadır.

Lipazların katalitik aktivitesi gıda ve endüstriyel kullanımlar için, çok miktardaki katı yağ ürün olarak daha kıymetli yağlara dönüştürme potansiyelini belirlemek için incelenmiştir. Gıda sanayinde lipazlar tereyağına aroma kazandırmada, çikolata endüstrisinde, kremalarda, karamellerde kullanım alanına sahiptir. Margarinler, fırın ürünleri ve bitkisel ürünlerde lipazla modifiye edilmiş tereyağı ürünleri aroma geliştirici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca biyomedikal uygulamalarda, biyosensörler ve pestisitlerin yapımında, deterjan ve deri sanayinde, kozmetik ve parfüm sanayinde, çevre yönetiminde uygulama alanları bulmaktadır. Lipazların uygulama alanlarına; ilaç ve yeni yüzey aktif maddelerin sentezi, katı ve sıvı yağların biyo dönüşümü, rasemik karışımların çözünürlüğü gibi başka örneklerde verilebilir (Villeneuve vd., 2000).

Ancak büyük ölçekli endüstriyel lipaz teknolojileri üzerine daha hızlı bir genişlemeyi engelleyen en temel sebep, bu enzimlerde bazen karşılaşılan, düşük aktivite, düşük kararlılık ya da seçicilik ve doğal enzimin maliyeti olmuştur. Dolayısıyla bu dezavantajından kurtulmak için, lipazların çeşitli desteklere fiziksel ve kimyasal immobilizasyonları gerçekleştirilmiştir (Villeneuve vd., 2000). Enzimlerin immobilizasyonu biyoteknolojinin önemli olanaklarından biridir. Enzimler endüstriden

tıbbi kadar geniş bir yelpazede ve kimyasal proseslerde katalizör olarak önemli potansiyele sahiptirler.

Bu çalışmada ticari olarak satılan *Candida rugosa* lipazı ve defne lipazının alginat+karagenan jel karışımlarında immobilizasyonu gerçekleştirildi, bu immobilize formların hidroliz reaksiyonlarındaki aktiviteleri denenerek elde edilen başarılı immobilize formların bazı biyokimyasal özellikleri belirlendi.

Bu çalışmanın amacı yeni bir lipaz immobilizasyon desteği olarak alginat +karagenan mix jeller hazırlanarak, bu jellerde farklı kaynaklardan izole edilmiş lipazları immobilize etmektir. Bu amaçla lipaz araştırmalarında sıklıkla kullanılan mikrobiyal lipaz olan *Candida rugosa* lipazı ve ayrıca daha önce immobilizasyonu hiç gerçekleştirilmeyen bitkisel kaynaklardan defne lipazı kullanıldı. *Candida rugosa* lipazı daha önce alginat jellere immobilize edilmiş ama alginat +karagenan jel karışımında immobilizasyonu ilk kez bu çalışmayla denenmiştir. defne lipazı ise defne tohumunda izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiş olup (şebnem hanımın litareteri) immobilizasyonu hiç çalışılmamıştır.

Bu amaçla; mikrobiyal lipazlardan *Candida rugosa* lipazı ve bitkisel lipazlardan defne lipazı alginat+karagenan jel karışımlarında immobilize edilmiş ve bazı biyokimyasal özellikleri araştırıldı. *Candida rugosa* lipazının alginat+karagenan jel karışımlarında immobilizasyonu ile elde edilen immobilize boncuklar için karagenan konsantrasyonu, CaCl_2 yüzdesi, enzim miktarı, boncuk boyutu, boncuk miktarı gibi koşulları optimize edildi. Immobilize *Candida rugosa* lipazı ve defne lipazının optimum pH, optimum sıcaklık, termal kararlılık, kinetik, tekrar kullanılabilirlik, depo kararlılığı, substrat spesifitesi gibi bazı biyokimyasal özellikleri araştırıldı.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Enzimler

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Enzimler; besleyici moleküllerin yıkıldığı, kimyasal enerjinin depolandığı ve şeklinin değiştirildiği, basit öncüllerden biyolojik makromoleküllerin yapıldığı metabolik yollarda yüzlerce reaksiyon basamağını katalize ederler. Enzimlerle katalize edilen tepkimeye katılan kimyasal moleküllere “substrat” adı verilir. Enzimler, spesifik kimyasal reaksiyonları hızlandırır; substratları için yüksek derecede spesifiteye sahiptirler; sulu çözeltilerde çok ılımlı sıcaklık ve pH durumları altında fonksiyon gösterirler.

Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir. Yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pekçok alanda yararlanabilme imkanını ortaya çıkarmaktadır. (Telefoncu, 1997).

Enzimler, bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal hücrelerin oluşturduğu canlı kaynaklardan elde edilirler. Hayvansal kaynaklardan üretim pahalıdır ve pazar faktörlerine dayanır. Buna karşılık bitkisel kaynaklı birçok enzim nispeten daha kolay elde edilir. Mikrobiyal enzimler ise, büyük miktarda enzim üretimine imkan sağlar. Ancak gıda ve ilaç sanayiinde kullanılacak enzimlerin üretiminde mikroorganizma kullanılırken bu mikroorganizmaların güvenirliliklerinin kanıtlanmış olması gereklidir. Bu nedenle enzim ayırma ve saflaştırma işlemlerindeki basamaklara ve yöntemlere karar verirken, enzim üretim koşulları göz önüne alınırken, üretilen enzimin nerede ve nasıl kullanılacağı da dikkate alınarak karara varılması uygun olur (Vardar Sukan, 1986).

Günümüzde gıda, tekstil, biracılık, deri, peynircilik, kozmetik, tıp, invert şeker eldesi, klinik ve endüstriyel analiz, su arıtımı gibi birçok alanda enzimlerin uygulamaları vardır.

Enzimlerin endüstride ve biyoteknolojide çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanması, bilim adamlarını bu katalizörleri daha geniş ve daha kullanışlı hale getirme olanaklarını araştırmaya yöneltmiştir. Serbest enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kullanımlarına ilişkin ortaya çıkan pekçok sorunu olumlu yönde çözümlenebilmek ve enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek için enzim immobilizasyonlarına olan ilgi son yarım yüzyıldır çok artmıştır (Telefoncu, 1997).

Enzimlerin immobilizasyonu biyoteknolojinin önemli olanaklarından biridir. Enzimler endüstriden tıba kadar geniş bir yelpazede ve kimyasal proseslerde katalizör olarak önemli potansiyele sahiptirler. Spesifiteleri, düşük sıcaklıkta yüksek katalitik etkinlikleri, biyobozunur olmaları nedeniyle önemli avantajlar sunarlar. Reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılabilmesi ve böylece birçok kez ve sürekli olarak kullanılabilmesi nedeniyle immobilize enzimlerin kullanımı üretim maliyetlerini düşürür (Munjel ve Sawhney, 2002).

2.2. Lipaz Enzimi

Lipazlar (triacilgliserol açilhidrolaz; (EC. 3.1.1.3) hayvansal ve bitkisel yağları normal koşullar altında bir yağ-su fazında serbest yağ asitlerine, diaçilgliserollere, monoaçilgliserollere ve gliserole hidrolizleyen enzimlerdir. Ayrıca bu hidrolitik reaksiyon tersinirdir ve azalan su miktarı ve organik çözücüler varlığında lipazlar çeşitli esterifikasyon, interesterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonları için de etkili katalizörlerdir. Lipazlar serin hidrolazlar sınıfı içinde yer alır ve bu nedenle hiçbir kofaktöre ihtiyaç duymazlar.

Lipaz enzimi bitkisel, hayvansal ya da mikrobiyal kaynaklı olabilir. Bu kaynaklar arasında en geniş uygulama alanı bulan lipazlar; mikrobiyal lipazlardır. Mikrobiyal

lipazlar; birçok mantar, küf ve bakteriden elde edilebilmektedir. Bunun sebebi; mikroorganizmaların kolay yetiştirilebilmeleri, üretim ve genetiklerine kolaylıkla müdahale edilebilmeleridir. Lipazlar lipidlerin biyolojik dönüşümünde anahtar role sahiptir. Lipazlar lipidlerin biyolojik membranda bulunmalarından dolayı hücre içi metabolizmada da görev alırlar (Schmidt ve Verger, 1998).

Lipaz enzimlerinin substratları genellikle bitkisel ve hayvansal yağlardır. Zeytinyağı, tereyağı ve sentetik gliseridler literatürde belirtilen substratlar arasında yer almaktadır. Bir katı veya sıvı yağın hidrolizlenme hızı kullanılan lipaz ile doğrudan ilişkilidir. Lipazın enzim aktivitesi gösterebilmesi için substrat olan yağın su içinde dağılmış olması gerekmektedir. (Al-Taweel ve Sungur, 1995).

Lipazlar katalitik aktivitelerini substrat emülsiyonunun yağ-su geçiş fazında gerçekleştirir ve enzimatik reaksiyonun hızı, oluşan yüzey alanına bağlıdır. Lipazlar; yağ asitlerinin zincir uzunluğu, doymuşluk derecesi, yağ asidinin pozisyonu ve substratın fiziksel durumuna uygun spesifite gösterirler. 4-10 karbonlu yağ asitleri daha uzun karbonlu yağ asitlerine göre daha hızlı bir şekilde hidroliz olarak yağ yapısından ayrılır ve serbest hale geçerler (Abbas vd., 2002).

Lipazların seçicilik özelliği; enzimin moleküler özellikleri, substratın yapısı ve enzimin substrata bağlanmasını etkileyen faktörler tarafından kontrol edilir. Lipaz spesifikliği üç temel grupta toplanır; pozisyon, substrat ve stero seçicilik.

Bazı lipazlar yağ asitleri ve gliserid arasındaki bağları rastgele parçalar; gliserid molekülünün yerleşimi önemli değildir. *Candida rugosa*, *Chromobacterium* spp. ve *Staphylococcus aureus* gibi mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar bunlara örnek verilebilir.

Pozisyon seçiciliği olan lipazlar ise sadece *sn*-1,3 pozisyonundaki yani dıştaki ester bağlarını parçalar. Bu gruba örnek olarak ise *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus* ve *Rhizopus delemar* gibi organizmalardan elde edilen lipazlar verilebilir.

Bazı lipazlar ise yağ asidinin zincir uzunluğuna göre seçicidir, yani bazıları uzun zincirli yağ asitlerini parçalarken bazıları kısa zincirli yağ asitlerini parçalar. *Penicillium cyclopium* lipazı uzun zincirli yağ asitlerini parçalarken *Aspergillus niger* ve *Aspergillus delemar* lipazları ise kısa zincirli yağ asitlerine seçicilik gösterir.

Son grup lipazlar ise yağ asidi seçici lipazlardır, bunlar ise *cis*-9 pozisyonuna duyarlıdır. *Geotrichum candidum* lipazı *cis*-9 pozisyonunda çift bağ içeren uzun yağ asitlerine seçicidir (Öztürk, 2006).

Lipazlarla kataliz reaksiyonu lipit-su ara yüzeyinde gerçekleşir. Lipit karakterli substrat suda çözünmemesine rağmen lipaz suda çözünür. Bu yetenek lipazın eşsiz yapısal karakterinden kaynaklanır. Lipazların aktif merkezinin giriş kapağında içerdiği sarmal oligopeptid birim onların lipit-su ara yüzeyinde etkili olmasını sağlar. Sözü edilen kapak sadece lipit damlacıklarının hidrofobik aktif merkeze erişimini sağlar (Albercina ve Lotti, 1998).

Enzimlerin endüstride kullanımının yaygınlaşmasını engelleyen en önemli nedenler; düşük dayanıklılık, aktivite ve seçicilikleridir. Ayrıca enzimin maliyeti de sınırlayıcı olmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi ve protein mühendisliği gibi biyolojik araçların kullanılmasıyla bol miktarda ve genetik özellikleri gelişmiş lipazların üretimi sağlanabilir, enzim maliyeti azaltılabilir. Kimyasal metot kullanılarak, özellikle lipaz ve modifiye edici arasındaki kovalent bağların oluşumu sağlanarak, fiziksel metot kullanılarak ise enzim ile destek materyali arasındaki zayıf etkileşimlerin oluşumu ya da lipazın destek içinde mekanik olarak tutuklanması sağlanarak lipazlar immobilize edilebilirler. Ayrıca genetik mühendisliğinin lipaz enzimini kodlayan gen üzerinde modifikasyon çalışmaları da mevcuttur (Villeneuve vd. 2000).

Lipaz enzimi immobilize edilirken; seçilen modifikasyon prosedürüne uygun bir immobilizasyon stratejisi oluşturulmalıdır. Biyokataliz prosesinin özelliği, toplam enzim aktivitesi, kullanılan lipaz miktarının etkisi, deaktivasyon, karakteristik dönüşümler, immobilizasyon prosedürünün maliyeti, immobilizasyon reaktiflerinin

toksikliği, immobilize lipaza ait istenen nihai özelliklere ulaşılması gibi parametreler bu stratejide çok önemlidir (Villeneuve vd. 2000).

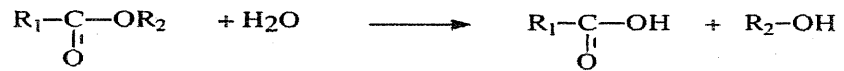
2.2.1. Lipaz Reaksiyonları

Lipazların biyolojik fonksiyonları özellikle uzun zincirli triaçilgliseroller gibi esterlerin, serbest yağ asitlerine, gliserole, di- ve mono-açilgliserollere hidrolizini katalizleyen enzimlerdir.

Diğer hidrofilik enzimlerde olmamasına rağmen farklı kaynaklardan elde edilen lipazlar polar olmayan organik çözücüler içinde de dayanıklıdır ve farklı boyutta ve özellikteki oldukça fazla substratı kabul edebilir. Bunların esnek protein yapıları onlara hidroliz, esterifikasyon, transesterifikasyon, (asidoliz, interesterifikasyon, alkoliz) aminoliz, oksimoliz ve tiyotransesterifikasyon gibi pek çok reaksiyonu katalizleme olanağı verir. İleri (hidroliz) ve tersinir (sentez) reaksiyonlar karışımın su aktivitesi ile kontrol edilir (Öztürk, 2006).

Lipaz enziminin su kullanılarak triaçilgliserolün ester bağlarını bölmesi olayına hidroliz denir. Esterifikasyon hidroliz olayının tersidir ve düşük su aktiviteli sistemlerde gerçekleşir. Transesterifikasyon ise açıl radikallerinin bir ester ve bir asit (asidoliz), bir ester ve diğer bir ester ve bir alkol arasında değişimi olarak tanımlanabilir.

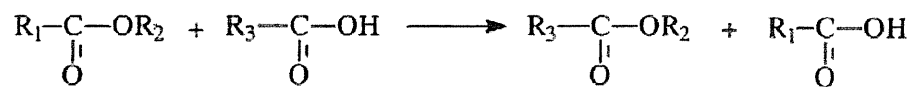
Hidroliz:



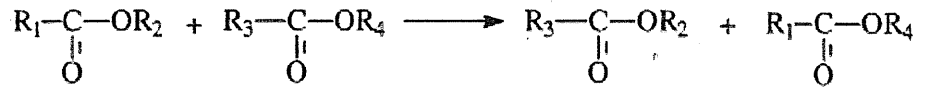
Ester sentezi:



Asidoliz:



Transesterifikasyon:



Alkoliz:



Aminoliz:



Şekil 2. 1. Sulu ve susuz çözeltilerde lipazın katalizlediği farklı tepkimeler.

Lipaz enzimi gıda sanayi de dahil olmak üzere pek çok sektörde kullanıma sahiptir. Lipazlar gıda endüstrisinde, biyomedikal uygulamalarda, biyosensörler ve pestisitlerin yapımında, deterjan ve deri endüstrisinde, çevre yönetiminde, kozmetik ve parfüm endüstrisinde uygulama alanları bulmaktadır. Lipolitik enzimlerin aktivitesi süt endüstrisinde önemlidir. Yüksek hidroliz çeşitli peynirlerin üretiminde zorunlu olmaktadır. Peynir yapımında kullanılan renninin kütesinde proteolitik enzimler gibi lipazlar da mevcuttur. Lipazlar tereyağına aroma kazandırmada, çikolata endüstrisinde, kremalarda, karamellerde kullanım alanına sahiptir (Eren Kıran vd., 2006).

Lipazların kullanım alanları Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Mikrobiyal lipazların sanayide önemli kullanım alanları (Öztürk, 2006).

Sanayi dalı	Etki	Ürün
Unlu mamüller	Lezzet artırıcı, raf ömrü uzatıcı	Unlu mamüller
İçecek	Aroma geliştirici	İçecekler
Kimya	Enantiyo seçicilik	Kiral kimyasallar
Temizleme	Sentez, hidroliz	Kimyasallar, surfaktanlar gibi temizleme ajanlarının uzaklaştırılması
Kozmetik	Sentez	Emilsüfiye ediciler, nemlendirme ajanları
Süt ve süt mamülleri	Süt yağının hidrolizi, peynirin olgunlaştırılması, tereyağının modifiye edilmesi	Lezzet ajanları, peynir, tereyağı
Katı ve sıvı yağlar	Transesterifikasyon, hidroliz	Kakao yağı, margarin Yağ asitleri, gliserol, mono ve di-gliseridler
Soslar	Kalite geliştirilmesi	Mayonez, krema
Sağlıklı gıdalar	Transesterifikasyon	Sağlıklı gıdalar
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri
Et ve balık	Lezzet geliştirilmesi ve yağın uzaklaştırılması	Et ve balık ürünleri
Kağıt	Hidroliz	Kağıt ürünleri
Eczacılık	Transesterifikasyon	Özellikle lipitler sindirim destekçileri

2.2.2. Lipazın Üç Boyutlu Yapısı

Lipazların; boyut, sıralama benzerliği, substratlar ve aktivatörler dışında çoğunluğunun benzer yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Tüm lipazların karakteristik

olarak katalitik grupları içeren merkezi bir β -bandı ile α/β hidrolaz yapıdaki proteinlerin iç yapısı incelendiğinde paralel β kıvrımlı bantların heliks şeklindeki α yapıları ile ayrıldığı ve süper helikal olarak gömülmüş bir şerit şeklini aldığı görülmüştür. Heliks yapısındaki peptit kısımları ise bu şeridin dış kısımlarında yer almıştır.

Lipazlar genel olarak C ve N olmak üzere iki kısma ayrılmış bir polipeptit zincirinden oluşmaktadır. Bunlardan N kısmı katalitik serinden yüzeye kadar uzanan ve uzun bir yağ asidi zinciri taşıyan bir hidrofobik tünel ile aktif merkezi kapsamaktadır (Akoh ve Min, 1998).



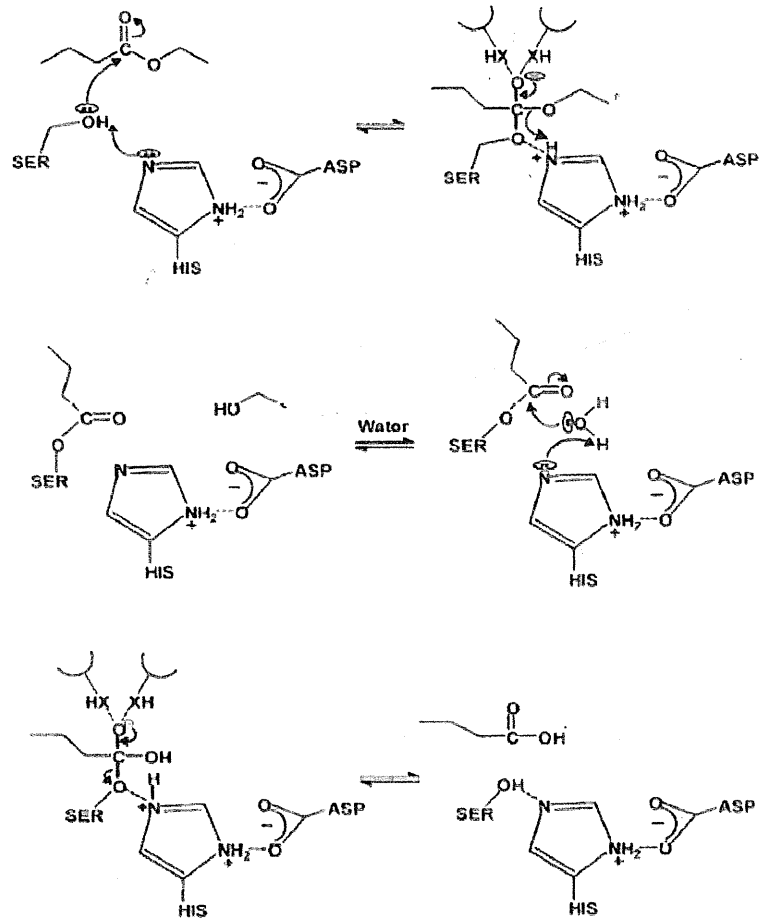
Şekil 2.2. At pankreatik lipazı (Bourne et al, JMB, 1994). N terminalde tipik α/β -hidrolaz katlanması mevcuttur, katalitik triad Ser152, Asp 176, ve His263'den oluşmaktadır. Kapak turuncu renkle gösterilmiştir. C terminal domaini kolipaz bağlanmasından sorumludur ve β -tabaka topolojisi göstermektedir (<http://strubi.uni-graz.at>).

Bu gruptaki enzimlerin farklı seviyelerdeki benzerliklerinin dışında, penta peptit Gly-X-Ser-X-Gly sıralaması istisnai olarak sıkça gözlenmiştir. Serin amino asidinin yapıda korunması ve bunun değişime uğraması veya yer değiştirmesi ile katalitik aktivitenin yitirilmesi bu amino asidin kataliz için çok önemli ve gerekli olduğunu

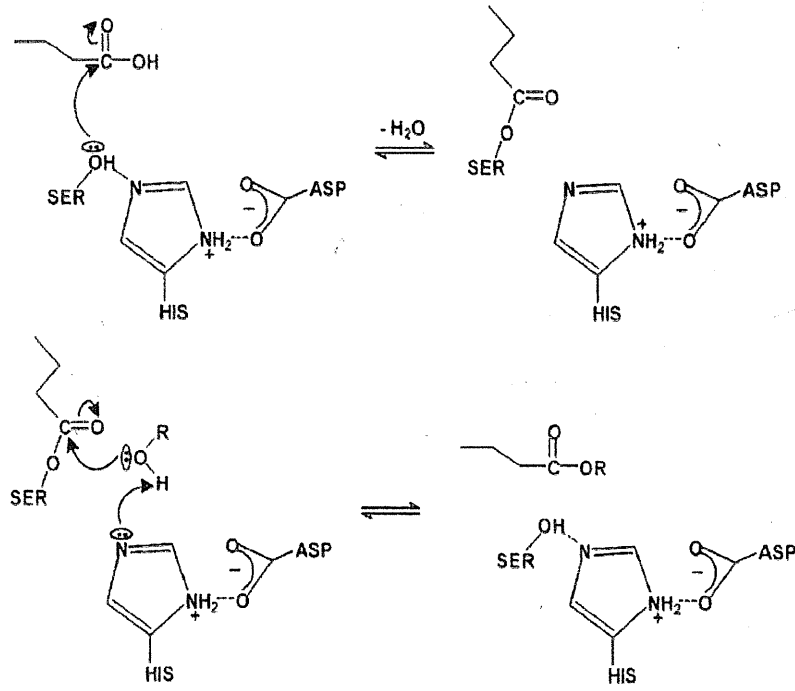
göstermiştir. Bunun topografik yerleşimi de korunmuş ve belirgindir; protein zincirinin gergin bir bölümünün en üstünde bulunmaktadır. Fakat bu gergin bölümün serin aminoasidine yakın -2 ve +2 pozisyonlarındaki amino asitlerinin küçük yan zincir gruplar içermesi mecburidir.

Katalitik serin amino asidine ilave olarak çoğu lipazın aktif merkezi histidin ve başka bir amino asit (Asp veya Glu) daha içerir. Nükleofilik serin bir β -bandı ile α -heliksinin arasında yer alırken histidin, aspartik asit ve glutamik asit ise serinin diğer yanlarında yer alır. Katalitik bölgeyi içeren amino asitler çoğu lipaz yapısında korunur.

Lipazlar için tahmin edilen katalitik mekanizma aktif merkezde bulunan serin amino asidi üzerinde yoğunlaşmıştır. Serinin nükleofilik oksijeni trigliserid ile tetrahedral hemiasetal bir ortam oluşturur. Hemiasetalin ester bağı hidroliz olur ve diaçilgliserid serbest kalır. Aktif merkezdeki serin açil esterinin bir su molekülü ile tepkimeye girdiği, daha sonra açil enzimin bölündüğü ve yağ asidinin ayrıldığı tahmin edilmektedir. Katalitik prosesin bu aşamasında ürünün aktif merkezden ayrılması özellikle önem taşımaktadır (Petersen vd., 2001).



Şekil 2.3. Lipazların hidroliz aktivitesi mekanizması



Şekil 2.4. Lipazların ester sentezi aktivitesi mekanizması

2.2.3. Ara Yüzey Aktivasyonu

Lipaz enzimi tam katalitik performans gösterebilmek için ara yüzey aktivasyonuna ihtiyaç duymaktadır (Balcao vd., 1996).

Lipaz enziminin üç boyutlu yapısının ilk kez tanımlanmasından sonra ara yüzey aktivasyonu olayının, çözelti içindeki enzimin aktif merkezini bir kapak gibi çevreleyen amfifilik peptidik yapıdaki bir halkadan kaynaklandığı düşünülmüştür. Ara yüzeyin olmaması durumunda lipaz ikincil yapı elemanlarına sahiptir ve bu yapı enzimin substrata ulaşmasını engeller. Fakat, hidrofobik bir ara yüzey ile karşılaşması durumunda lipaz “açık yapı” durumuna geçer ve aktif hale gelir. Bu şekilde lipazlar katalitik merkezi çevreleyen hidrofobik alanlar aracılığı ile hidrofobik yüzeylere güçlü bir şekilde adsorbe olur. Bu mekanizma kapak yapısıyla açıklanabilir. Daha önce de belirtildiği üzere lipazın aktif merkezi Asp-His-Ser aminoasitlerini içermektedir. Çözelti içindeyken, helikal bir kısım lipazın aktif merkezini çevreler fakat lipit veya

organik çözügen varlığında kapağın açılması ile yapısal bir değişim olur ve aktif merkezi içeren hidrofobik merkez ortamlarla temas eder. Bu sebeple, ara yüzeye olan gereksinim aktivite için temeldir. Kapağın dış yüzeyi nispeten hidrofilik iken aktif merkeze dönük olan kısım hidrofobiktir. Ara yüzeye olan etkileşim artar ve substrat aktif merkezi içeren hidrofobik tünel girer, kapak genellikle hidrofobik ve hidrojen bağları ile yerinde tutulur. Kapağın yapısı yüzeydeki yerleşim ve sayısı olarak değişmektedir.

Bu şekilde ara yüzey aktivasyonun lipaz yapısında bazı değişikliklere sebep olduğu varsayılmaktadır. Bu değişiklikler ile katalitik özellikler ve özellikle seçicilik gelişir.

Lipazın ara yüzeylerdeki davranışları göz önüne alındığında, adsorpsiyonun geri dönüştürülebilirliği, aktivite kaybı olasılığı ara yüzeyin kalitesi gibi bazı faktörler incelenmelidir. Genel olarak, artan yüzey basıncının desorpsiyona sebep olduğunun bilinmesinden dolayı, lipazların ara yüzeylere geri dönüşümlü olarak adsorbe olduğu düşünülür. Ara yüzeyin kalitesi lipazın aktivitesini etkileyebilir. Enzimin ara yüzeye olan eğilimi ve moleküllerin yerleşimi de aktivite üzerinde etkilidir (Öztürk, 2006).

2.3. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimlerin klasik katalizörlere göre önemli avantajları vardır. Spesifik oluşları, regio ve enantiyo seçicilikleri, düşük sıcaklık ve basınç altında katalizledikleri reaksiyonlarda yan ürünlerin az oluşu sayesinde atık arıtma maliyetini düşürmeleri gibi özellikler bunlardan bazılarıdır. Enzimler suda çözünen spesifik katalizörlerdir. Genellikle sulu ortamda gerçekleştirilen endüstriyel uygulamalarda katalizör olarak kullanılan serbest enzim kullanıldığında enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olanaksızdır. Serbest enzim reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılmadığından reaksiyon kontrolü çok zordur. İnhibitör kullanılarak reaksiyonun durdurulması ise reaksiyon ürünlerine yeni bir kirlilik unsurunun eklenmesine neden olur. Bilindiği gibi endüstriyel uygulamalarda ürünlerin saflaştırılması maliyeti çok arttırmaktadır. Serbest enzim reaksiyon ortamından geri

kazanılmadığı için yeniden kullanılabilmesi de söz konusu değildir. Bu yüzden çok spesifik ama pahalı katalizörler olan enzimlerin endüstriyel üretimde kullanılması; üretim maliyetlerini yükseltmektedir. Ayrıca serbest enzimler sürekli üretim sistemlerinde de kullanılamazlar.

Tüm bu sorunları olumlu yönde çözümleyebilmek ve enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek için enzim immobilizasyonlarına olan ilgi son yarım yüzyıldır çok artmıştır.

Ayrıca enzim üretiminde hammadde problemi mikrobiyal kaynaklar sayesinde büyük ölçüde çözülmüş olmasına rağmen enzimlerin bu kaynaklardan izolasyonu ve saflaştırılması oldukça masraflı bir iştir. Bu nedenle enzim kaynağı ister bitkisel, ister hayvansal isterse mikrobiyal olsun bu biyokatalizatörlerin potansiyellerinden olabildiğince yararlanmak gerekir.

Tüm bu sorunları olumlu yönde çözümleyebilmek, enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek için enzim immobilizasyonu üzerine araştırmalar yoğunlaşmış olup bu alanda yapılan yayınların sayısı yıldan yıla logaritmik olarak artmıştır. Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler.

İmmobilize enzimin serbest enzime üstünlükleri söz konusudur:

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir süzme, santrifüjleme ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vs) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.

- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalaması (otoliziz, self-digestion) olasılığı azalır.
- Mekanistik çalışmalar için uygundur. (Telefoncu, (1997)

Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Taşıyıcı suda çözünmeyen katı bir madde veya polimer olabilir.

Enzim immobilizasyonunda kullanılan birkaç farklı metot vardır:

1. Suda çözünmeyen taşıyıcıya adsorbsiyon ve kimyasal bağlanma
2. Polimer jellerde tutuklama
3. Membranda enkapsülasyon
4. Bifonksiyonel veya multifonksiyonel reaktiflere çapraz bağlanma (Bickerstaff, 1997).

2.3.1. Adsorbsiyon ile İmmobilizasyon

Adsorbsiyon ile immobilizasyon en basit metottur ve enzim ile taşıyıcı arasında tersinir yüzey etkileşimleri ile olur. Adsorbsiyon ile immobilizasyonda hidrofobik etkileşimler de söz konusu olsa da en çok Van der Waals etkileşimleri gibi elektrostatik güçler etkindir. Yöntem suda çözünmeyen, adsorbsiyon özelliklerine sahip bir yüzey aktif taşıyıcı ile enzim çözeltisinin uygun koşullarda (pH, iyonik güç, vb.) bir süre inkübasyonu ve sonrasında tutunmamış enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması şeklinde uygulanır.

İmmobilizasyon işleminin basit, hızlı ve ucuz oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi yöntemin avantajlarıdır. Yöntemin sakıncaları ise; optimum koşulları saptamak zordur, enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa enzim serbest halde reaksiyon ortamına geçerek ürünleri kirletebilir.

2.3.2. Kovalent Bağlama ile İmmobilizasyon

Bu immobilizasyon yöntemi enzim ile taşıyıcı arasında kovalent bir bağ oluşumuna dayanır. Taşıyıcı yüzeyindeki fonksiyonel gruplarla enzim yüzeyindeki amino asit artıklarına ait fonksiyonel gruplar arasında oluşur. Genellikle sulu ortamda gerçekleşir. Kullanılacak taşıyıcılar reaktif değilse yardımcı bir reaktif ile aktive edilmeleri gerekmektedir.

İmmobilizasyon çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir. Yöntemin gerçekleştirilmesi zordur. Ancak enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlanma yüksek olduğundan bazen enzimatik aktivitenin arttığı da görülmektedir.

2.3.3. İyonik Bağlama ile İmmobilizasyon

Bu yöntem iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. Bazı durumlarda iyonik bağlama yanında fiziksel adsorbsiyon da etkili olmaktadır.

İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçıışı söz konusudur.

2.3.4. Tutuklama Yöntemi ile İmmobilizasyon

Prensip olarak tutuklama enzim molekülünü belirli bir mekanda durmaya zorlamaktır. Tutuklama polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Yöntemde enzim molekülü fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamaktadır. Bu metotta enzim molekülleri çözeltide serbest olup jelin kafes

yapısı tarafından sadece hareketi kısıtlanmıştır. Jel kafesin geçirgenliği enzim veya hücrelerin kaçışını önleyecek, ancak aynı zamanda substrat ve ürünün serbest hareketine izin verecek kadar sıkı bir yapı oluşturularak kontrol edilir.

Polimerizasyon ve çapraz bağlanmanın olduğu ortamda enzim de bulunduğu takdirde enzim çapraz bağlama sonucu oluşan odacıklarda (kafes) tutuklanmaktadır. Kolay uygulanması, gerçek bir fiziksel yöntem oluşu ve çok az enzimle gerçekleştirilmesi yöntemin avantajlarıdır. İmmobilizasyon işlemi sırasında inaktivasyonun deney koşullarına çok bağlı oluşu yöntemin sakıncalarıdır.

Tutuklamanın birkaç temel metodu vardır:

1. Çok değerlikli katyonlarla makro moleküllerin iyonotropik değişmesi (örneğin, alginat jel).
2. Sıcaklıkla indüklenmiş jelleşme (örneğin, jelatin, agaroz jel)
3. Kimyasal/fotokimyasal reaksiyon ile organik polimerleşme (örneğin, poliakrilamid jel)
4. Karışmayan bir çözücüden çöktürme (örneğin, polistren)

Tutuklama poliiyonik polimer materyali ile enzimin karıştırılmasına ve sonra enzim veya hücreleri tutuklayan kafes dokuyu oluşturmak üzere iyon değiştirici bir reaksiyonda multivalent katyonlarla polimerin çapraz bağlanmasıyla gerçekleştirilir (iyonotropik jelleşme).

Sıcaklık değişimi agaroz veya jelatinin % 1-4 'lük çözeltileri kullanılarak faz geçişi ile jelleşmenin basit bir metotudur. Bununla birlikte oluşan jeller yumuşak ve kararsızdır. Bu alandaki önemli bir gelişme iyonotropik jelleşme ve sıcaklıkla indüklenmiş faz geçişi ile jeller oluşturabilen κ -karagenan polimerleri ile tanışılmasıdır. Böylece immobilizasyon için jel sistemlerde yüksek derecede esneklik söz konusu olmuştur.

Alternatif olarak çapraz bağlı polimerik bir ağ oluşturmak üzere polimerize olabilen kimyasal monomerlerle enzimi karıştırmak da mümkündür. Enzim örgünün iç

boşluklarında tutuklanır. Bu metot oldukça yaygın olarak kullanılır. Çok sayıda akrilik monomerler hidrofilik kopolimerler oluşturmak için mevcuttur. Örneğin, akrilamid monomeri polikrilamid oluşturmak üzere polimerize edilir, metilakrilamid ise polimetakrilat oluşturmak üzere polimerize edilir. Polimer zincirleri arasında çapraz bağlar oluşturmak için; polimerizasyon sırasında monomere bir çapraz bağlama ajanı katılır. Bu madde üç boyutlu ağ yapının oluşturulmasına yardımcı olur. Jelin gözenek boyutu ve mekaniksel özellikleri monomer ve çapraz bağlama ajanının relatif miktarları ile belirlenir. Bunların konsantrasyonları değiştirilerek kafesin yapısı düzenlenebilir. Oluşturulan polimerler istenilen boyutta parçalara ayrılır veya polimerizasyon istenilen boyutta boncuklar oluşturacak şekilde düzenlenebilir.

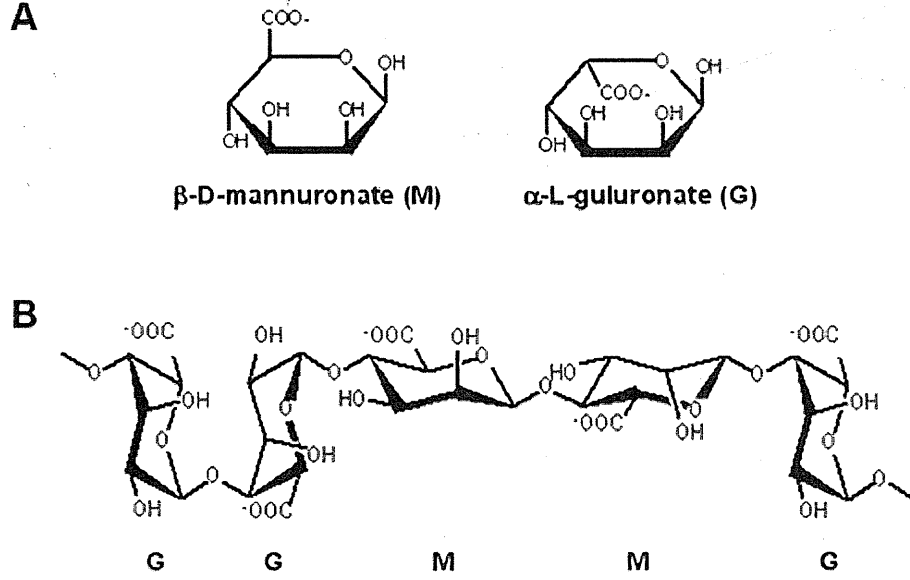
Çöktürme kimyasal reaksiyondan ziyade faz ayrılması ile oluşur ama su ile karışabilir bir organik çözücü ile temastaki hücre/enzimlerle yürütülür. Çoğu hücre/enzim böyle çözücülere toleranslı değildir bu nedenle bu metotun kullanımı yüksek derecede kararlı/ya da önceden stabilize edilmiş enzimler veya canlı olmayan hücrelerle sınırlıdır (Bickerstaff, 1997).

2.3.4.1. Kalsiyum Alginat Jelde Tutuklama

Enzimlerin ve/veya hücrelerin alginata tutuklanması immobilizasyonun en basit metotlarından biridir. Alginatlar, suda çözünür sodyum alginatlar olarak ticari formda mevcuttur. Gıda ve farmosötik endüstrilerinde kıvamlaştırıcı, emülsiyeye edici, film oluşturucu ve jelleşme ajanı olarak altmış beş yıldan daha uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Çözünmeyen kalsiyum alginat jelde tutuklama enzimlerin ve hücrelerin immobilizasyonu için hızlı, pahalı ve toksik olmayan ve çok yönlü bir metottur.

Alginik asit; deniz yosunlarından elde edilen bir poliüronik asittir. 1 - 4 bağlı β -D- mannuronik (M) ve α -L- guluronik asidin (G) farklı miktarlarından oluşur. G, M miktarları kaynağa göre değişir. Heteropolimerik bölgelerin (MG blokları) değişen bölgelerinin aralarına katılmış homopolimerik (MM blokları ve GG bloklar)

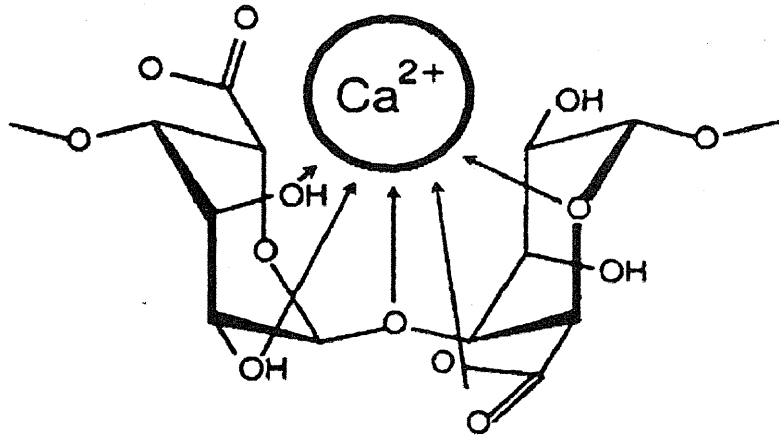
bölgelerinden oluşmuş blok kalıplarında düzenlenir. İki değerli katyonların bağlanması ve jel oluşumu artık blokların kompozisyonlarına ve düzenlenmelerine bağlıdır. Özellikle jel dayanıklılığı G içeriği ile ilgilidir. Deniz yosunu kaynağına göre (G formu) % 20 - 75 arasında değişir.



Şekil. 2.5. A. Alginat monomerleri B. Alginat zinciri

(<http://www.aapspharmscitech.org>)

GG blokları arasında Ca^{2+} gibi divalent katyonlar için seçimli bağlanma bölgeleri vardır ve bağlanmış iyonlar jel oluşumuna neden olan bağlanmaları oluşturmak üzere diğer GG blokları ile etkileşir.



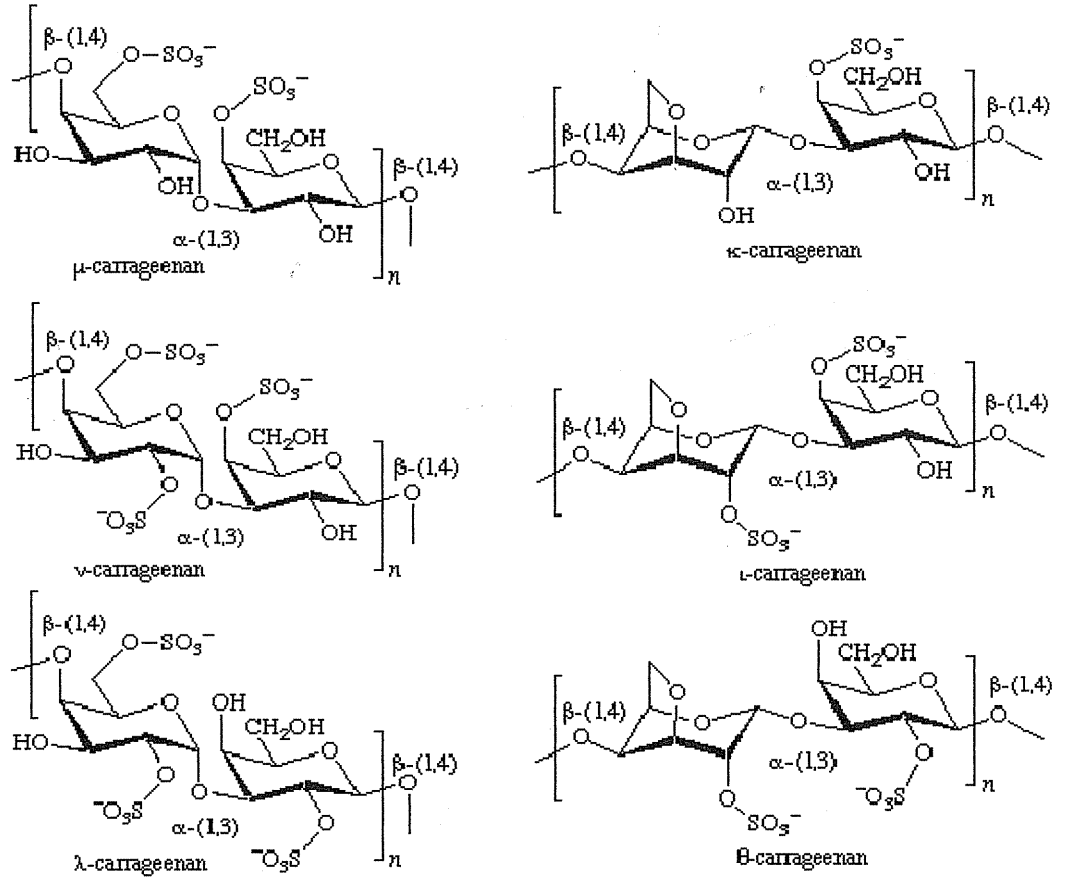
Şekil. 2.6. Alginatın kalsiyum iyonlarıyla bağlanma bölgeleri

(<http://www.aapspharmscitech.org>)

Elde edilen jel biyokimyasal olarak inerttir ve hücre immobilizasyonu için uygun olan küçük ve dar boşluklar ile mekaniksel olarak kararlıdır. Jel boncuklardan sızıntı meydana gelebilir (Fraser ve Bickerstaff, 1997).

2.3.4.2. Karagenan Jelde Tutuklama

κ -Karagenan deniz yosunlarından izole edilen ve doğal olarak meydana gelen bir polisakkarittir. β -D-galaktoz sülfat ve 3,6-anhidro- α -D-galaktoz birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşmuş yüksek molekül ağırlıklı, toksik olmayan kolay elde edilebilir bir polimerdir. κ -Karagenan metal iyonları, aminler, amino asit türevleri ve suda çözünür organik çözücüler varlığında kolayca jele dönüşebilir (Dessai vd., 2004).



Şekil. 2.7. Karagenan çeşitleri (<http://www.chem.qmul.ac.uk>)

Jel tutuklama metotlarından biri olan karagenanda immobilizasyon; genellikle hücre immobilizasyonu için; ucuz, basit ve ılımlı koşullarda tekrarlanabilir olması nedeniyle yaygın olarak kullanılan metotlardan biridir. Yüksek hücre yoğunluğu, ılımlı immobilizasyon koşulları, destekten hücrelerin sızıntısının düşük riski tutuklama metotunun en önemli avantajlarıdır. Karagenana immobilizasyon alginat immobilizasyonuna benzerdir. Jel tutuklamasının prensibi biyokatalizörün prejel çözeltisi ile karıştırılması ve jelleşme sonrasında biyokatalizörün jel materyalinin çevresinin sarılmasıdır. Sağlam jeller oluşturmak için konsantrasyon yeterli olmak zorundadır. Karagenan konsantrasyonu kullanılan karagenanın tipine bağlıdır.

Biyokatalizör ve karagenan çözeltisinin karışımı bir vana yardımıyla (çekme metodu) veya bir şırınga vasıtasıyla (damlatma metodu) ile çekilir veya sıvıda ya da

havada yayılır (dispersiyon metodu). İmmobilize edilmiş biyokatalizörün değişik şekilleri (küp, boncuk veya membran) özel uygulamalar için şekillendirilir. Örneğin küresel boncuklar yatak reaktörlerinde iyi akış özelliği gösterir. Karagenanın jelleşmesi; K^+ gibi genellikle katyon karakterli jel indüklemeye ajanlarının varlığında çözelti uygun jelleşme sıcaklığına soğutulduğunda gerçekleşir. İmmobilize hücrelerin enzim aktiviteleri ve verimleri genellikle nispeten yüksektir. Jel oluşumu termal olarak tersinirdir, yüksek sıcaklıklarda jeller yumuşayabilirler veya parçalanabilirler. Örneğin termofilik mikroorganizmaların iş yaptığı yüksek sıcaklık reaksiyonlarını içeren uygulamalarda yeterince uygun değildir. Karagenan jelin diğer bir dezavantajı reaksiyon karışımında jel indüklemeye maddesi olmadığında jel çözülmesi meydana gelir ve biyokatalizör serbest kalır, ayrıca jel indüklemeye maddesi istenen enzim aktivitesini inhibe edebilir (Iborra vd., 1997).

İmmobilizasyonun damlatma metodu laboratuvar uygulamalarında boncuk oluşumu için en basit prosedürdür. Hücre immobilizasyonu için rutin olarak kullanılmaktadır. Sulu jel çözeltisi bir şırıngayla düşük akış hızında basılır, iğnenin ucunda damlalar oluşur. Daha uniform boyutlu damlalar iğnenin çevresine hava akımı uygulandığında elde edilebilir. Bu prosedürde büyük miktarda hücre homojen olarak karagenan jelle immobilize edilir. Hücreler büyüme, dinlenme veya otolizlenmiş durumda olabilir. Jel matriksin gözenek boyutu jel kafesten enzimlerin kaçışını önleyecek kadar küçük, ama substrat ve ürünlerin jel duvarını kolaylıkla geçmelerine izin verecek boyutta olmalıdır (Iborra vd., 1997).

2.4. Lipaz İmmobilizasyonu

Enzim üretiminde hammadde sorunu mikrobiyal kaynaklarca büyük ölçüde çözülmüş görünmektedir. Bununla birlikte enzimlerin mikrobiyal kaynaklardan izolasyonu ve saflaştırılması oldukça masraflı bir iştir. Dolayısıyla bu biyokatalizörlerin potansiyellerinden olabildiğince yararlanmak gerekir. Enzim immobilizasyonu üzerine araştırmalar bu probleme bir çözüm olarak görülmektedir.

Lipazlar endüstride yaygın kullanım potansiyeli olan enzimlerdendir. Hidroliz aktivitesi nedeniyle gıda endüstrisi ve birçok endüstriyel üretiminde halen kullanılmaktadır (Tablo 2.1). Ayrıca lipazların organik çözücülerde bile katalitik aktivitelerini koruyabiliyor olmaları onları organik sentez reaksiyonları için de cazip hale getirmektedir (Klibanov, 1989). Katalitik özelliklerini geliştirmek için lipazlar kimyasal ve fiziksel olarak farklı desteklerde immobilize edilmişler ve susuz ve su içeren çözücülerde hidroliz ve sentez reaksiyonları denenmiştir.

2.5 *Candida rugosa* ve Defne Lipazıyla Gerçekleştirilen İmmobilizasyon Çalışmaları

Matsumoto ve Ohoshi (2003) yılında yaptıkları çalışmada, lipazın kalsiyum silikat inorganik mikrokapsüller içinde, kalsiyum aljinat jel immobilize ve makrogözenekli akrilik boncuk üzerinde immobilize etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada 60 °C' de aktivitesini kaybetmediklerini bulmuşlardır.

Wu JC, vd (2006) çalışmalarında, *Candida rugosa* lipazının alginat jele glutaraldehitile çapraz bağlayarak immobilize etmişlerdir. Çapraz bağlama esnasında 2 propanolun varlığının belirgin şekilde, enzim aktivitesini geliştirdiğini gözlemlemişlerdir.

Fadnavis NW, vd (2003) çalışmalarında, alginat ve jelatin jellere glutaraldehitile çapraz bağlama yaparak lipazı immobilize etmişlerdir. Lipaz olarak da hayvansal kaynaklı domuz pankreası lipazı, mikrobiyal kaynaklı *Candida rugosa* ve *Pseudomonas cepacia* lipazı kullanmışlardır. Yapılan çalışmalarda immobilize enzimlerin daha kararlı bir yapıya sahip olduklarını gözlemişlerdir.

Bhushan I, vd (2008) çalışmalarında, *Arthrobacter sp.* (ABL) tarafından elde edilen lipazı alginat jellere immobilize etmişlerdir. Alginat boncukların lipazın tekrar kullanılabilirliğini ve enzim kararlılığını arttırdığı bulmuşlardır.

Minovska V, vd (2005) çalışmalarında, *Candida rugosa* lipazını Amberlite IRC 50 ve Al₂O₃ karışımında tutuklamışlardır. Bu karışımı 16 farklı çeşit destekten

seçmişlerdir. Desteklerin uygunluğu ve immobilizasyon için teknikler, enzim faaliyetleri, immobilizasyon verimliliği ve enzimin tekrar kullanılabilirliğini tahmin edilmesi açısından önemli bir çalışmadır.

Won K, vd (2005) çalışmalarında, *Candida rugosa* lipazı ile çalışmışlardır. Alginat konsantrasyonu, kalsiyum klorür konsantrasyonu, immobilizasyon verimi, boncuk boyutu ve boncuk miktarı şartlarını optimize etmişlerdir. Alginat konsantrasyonunu artması immobilizasyon verimini azalttığını çalışmaları sonucunda bulmuşlardır. Boncuk boyutunun artmasıyla immobilizasyon veriminin arttığını gözlemişlerdir. Alginat boncuklardan sızıntı olmasını önlemek amacıyla boncukları çitosan ve silikatla kaplamışlardır. Kaplanmış boncuklarla kaplanmamış boncuklar karşılaştırıldığında çitosan ve silikatla kaplı boncukların yüksek oranda yeniden kullanılabilirlik gösterdiklerini bulmuşlardır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmada aşağıdaki kimyasal maddeler kullanıldı. Kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır.

Canida rugosa lipazı (Sigma)

Etanol (Riedel-de Haen)

Comassie Brilliant Mavi G-250 (Sigma)

Orto Fosforik Asit (Merck)

Sodyum Hidroksit (Merck)

Kalsiyum Klorür (Merck)

Gum Arabik(Merck)

Tris (Sigma)

Hidroklorik Asit (Sigma)

Sodyum Deoksikolat (Sigma)

Maleik Anhidrit (Merck)

Şodyum Karbonat (Merck)

Sodyum Bikarbonat (Sigma)

Aseton (Riedel-de Haen)

Trikaprilin (Sigma)

Gliseriltristearat (Sigma)

Tribütirin (Sigma)

Sığır Serum Albümini (BSA)

3.1.2. Kullanılan Aletler

pH-metre; Jenway 3010

UV Spektrofotometre; Shimadzu UV-160 A

Otomatik titratör; Methrom

Etüv; Elektromag marka (100 °C termostatlı)

Vortex; Fisons Whirli Mixer

Çalkalayıcı; Clifton marka (100-400 rpm; 0-100 °C termostatlı)

Su banyosu; Clifton

Terazi; Gec Avery

Isıtıcı ve manyetik karıştırıcı; Chiltern ve Kermanlar (0-100 °C aralığında ısıtıcı ve manyetik karıştırıcı)

Buzdolabı (ev tipi); (Arçelik)

Bulaşık Makinası (ev tipi); (Vestel)

Dağıtıcı ve mikro pipetler; Eppendorf

Rondo (ev tipi); (Tefal)

3.1.3. Hazırlanan Çözeltiler

Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere aşağıdaki çözeltiler hazırlandı. Çözeltilerin hazırlanması destile su ve çalışma tamponları ile yapıldı.

Enzim çözeltisi: 0.1 g *Candida rugosa* lipazı tartıldı. 0.05 M'lık Tris tamponunda (pH:8.0) çözüldü ve tamponla balon jodede 10 mL'ye tamamlandı.

% 10'luk Gum arabic çözeltisi: 10 g gum arabic tartılıp destile suda çözüldü ve destile su ile balon jodede 100 ml'ye tamamlandı, süzüldü.

% 1.6'lik Deoksikolat çözeltisi: 1.6 g deoksikolikasit tartılıp destile suda çözüldü ve destile su ile balon jodede 100 ml'ye tamamlandı.

0.2 M Tris-HCl tampon: 24.23 g Tris (hidroksimetil aminometan) tartılıp balon jodede 1 litreye tamamlandı. 0.1 N HCl çözeltisi hazırlandı. Tris çözeltisinden 25 mL alındı üzerine 44.7 mL HCl çözeltisi eklendi, karışım balon jodede 100 mL'ye tamamlandı. pH:8.0 olacak şekilde ayarlandı. Ayrıca optimum pH çalışması için pH 7-8-9 için Tris-HCl tamponları hazırlandı.

% 4'lük CaCl₂ çözeltisi: 20 g CaCl₂ tartılıp destile suda çözüldü ve balon jodede 500 ml'ye tamamlandı.

Bradford reaktifi: 25 mL etanol içine 0.025 g Commassie brilliant blue çözüldü. Üzerine 27.5 mL % 85-88'lik fosforik asit ilave edildi, saf suyla balon jodede 500 mL'ye tamamlandı. Süzgeç kağıdından süzüldü.

Tris HCl-maleat tamponu: 2.423 g Tris (hidroksimetil aminometan) ve 1.961 g maleikanhidrit tartıldı. Destile suda çözüldü, balonojede 100 mL'ye tamamlandı. Optimum pH çalışmasında kullanılmak üzere pH: 6-7 tamponları hazırlamak için istenilen pH'a ulaşınca kadar 0.2 M NaOH eklendi. Balon jodede 100 mL'ye tamamlandı.

Sodyum karbonat tamponu: 1.060 g susuz sodyum karbonat ve 0.8401 g sodyum bikarbonat tartıldı, ayrı ayrı 100 mL'ye tamamlandı. Optimum pH çalışmasında kullanılmak üzere pH: 9-10 tamponları bu iki çözeltinin belli oranlarda karıştırılmasıyla hazırlandı.

3.2. METOT

3.2.1. Protein Tayini

Çalışmada defne lipazının izolasyonun tüm basamakları ve ayrıca defne ve *Candida rugosa* lipazının tutuklanması sırasında immobilize enzimin damlatıldığı CaCl_2 çözeltilerinde ve yıkama sularında protein tayinleri Bradford yöntemiyle yapıldı.

3.2.1.1. Bradford Yöntemi ile Kantitatif Protein Tayini

Protein tayininde kullanılan yaygın yöntemlerden biri de Bradford yöntemidir. Bu yöntem bir çözeltideki protein içeriğinin saptanması için boya temelli hızlı ve güvenilir bir ölçümdür. Yöntem, organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek renk oluşturmasını esas alır. Boya-bağlama temelli yöntemlerin en yaygını, Bradford tarafından geliştirilen ve Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanıldığı metottur (Telefoncu, A., 1997). Yöntem oldukça duyarlıdır, daha da artırılabilir ($5-100 \mu\text{g protein.mL}^{-1}$). Renk oluşumunda proteini aminoasit bileşiminin (özellikle arginin gibi bazik amino asitler ile aromatik amino asitler) reaksiyon üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Bradford, 1976).

Candida rugosa lipazı (25 mg/mL) ve defne lipazından hazırlanan enzim çözeltilerinin damlatma çözeltileri ve yıkama sularının protein içerikleri Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla öncelikle standart protein çözeltileri hazırlandı. Şahit numune olarak 0.2 mL destile su kullanıldı. Stok protein çözeltisi kullanılarak 1 mL'de 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.15 ve 0.2 mg protein (sığır serum albümini) içeren çözeltiler hazırlandı.

Hazırlanan standart protein çözeltiler, protein tayini yapılacak tüm çözeltilerden 0.2 mL alınıp üzerine 4 mL Bradford Reaktifi ilave edilip çalkalandı ve 15 dakika bekletildi. 15 dakika sonra 595 nm de şahit numuneye karşı absorbansları

okundu. Standart protein çözeltilerinin absorbans değerleri ile konsantrasyonları arasında grafik hazırlandı. Bu standart grafik yardımıyla, protein örneklerinin absorbans değerlerinden protein miktarları (mg/mL) belirlendi.

3.2.2. Enzimatik Aktivite Tayinleri

Candida rugosa lipazı ve defne lipazının hidroliz aktiviteleri titrimetrik yöntemle tayin edildi (Hoppe ve Theimer 1996). Bu yöntemde ilk önce 3.5 gr zeytinyağı, 2.5 mL destile su (buz halde) ve 30 mL Gum Arabik çözeltisi (%10'luk) 15 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Üzerine 14 mL Tris-HCl tamponu (pH 8.0) ve 7 mL Sodyum deoksikolat çözeltisi (% 1.6'lık) ilave edilerek substrat emülsiyonu hazırlandı. Daha sonra 1 mL'sinde 1 mg enzim olacak şekilde hazırlanan enzim çözeltisinden 1'er mL alınıp 50 mL'lik beherlere konuldu ve üzerlerine 17 mL substrat emülsiyonu ilave edildi, 37 °C'deki çalkalayıcıda 15 dakika karıştırıldı ve 5 mL aseton-etanol (1:1) karışıma dökülerek reaksiyon durduruldu. pH 10.0 oluncaya kadar 0.05 N NaOH ilave edildi ve sarfiyat kaydedildi.

Lipaz hidrolaz aktivitesi için ünite, hacimsel aktivite ve spesifik aktivite değerleri aşağıdaki tanımlandığı şekilde belirlendi:

Lipaz Ünitesi; substrat olarak zeytin yağı kullanıldığında optimum koşullarda bir dakikada bir μ mol yağ asidini serbest bırakmak üzere gerekli olan enzim miktarıdır.

$$\text{Hacimsel aktivite (U/mL)} = \text{Ünite} / \text{Enzim Hacmi (mL) veya g boncuk}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mg)} = \text{Hacimsel Aktivite/mL deki veya g boncuktaki mg protein}$$

3.2.3. Defne Tohumundan Lipaz Enziminin İzolasyonu

3.2.3.1. Defne Aseton Tozunun Eldesi

Defne tohumlarının kabukları soyulduktan sonra ev tipi rondada öğütüldü. Yağsızlaştırmak için 50 gr öğütülmüş tohum üzerine 250 mL soğuk aseton ilave edildi ve karıştırıcıda 40 dakika karıştırıldı.. Her karıştırma periyodunun sonunda çözücü fazı süzüldü ve tohumlara taze çözücü eklendi. Bu ekstraksiyon prosedürü üç kez tekrar edildi. Tüm çözelti fazları bir araya getirildi ve oda koşullarında evaporatörde çözücüsü uçuruldu. Aseton tozu olarak adlandırılan çökelti bakiyesi bundan sonraki çalışmalarda enzim kaynağı olarak kullanıldı ve deneylerde kullanılmaya kadar -20°C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.2.3.2. Defne Lipazı Ekstraksiyonu

10 g defne aseton tozu alındı. Üzerine 70 mL Tris/HCl tamponu (pH 7.0) ilave edildi. 1 saat süre ile manyetik karıştırıcıda oda koşullarında karıştırıldı. Tülbent ve cam pamuğundan süzüldü. Elde edilen bu çözelti ham ekstrakt olarak adlandırıldı ve defne lipazı immobilizasyonu deneylerinde kullanıldı.

3.2.4. Alginat + Karagenan Jelde Tutuklama

Candida rugosa lipazı ve defne lipazının alginat ve karagenan jel karışımında immobilizasyonu Şahin metotuna göre yapıldı (Şahin, 2005). Bu amaçla; 0.1 g alginat + 0.03 g karagenan tartıldı ve beherde karıştırıldı. Bu karışımlara 2.5 mL enzim çözeltisi ve 2.5 mL su yavaş yavaş ilave edilerek hassas bir şekilde cam baget ile karıştırıldı ve 30 dakika buzdolabında saklandı. Enjektör yardımıyla buz içine oturtulmuş 50 mL %

4'lük CaCl_2 çözeltisine damlatıldı. Bir saat buzdolabında tutuldu ve süzülerek destile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları atılmayıp protein tayini için saklandı. İmmobilize enzimler CaCl_2 çözeltisinde buzdolabında saklandı.

3.2.5 İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

3.2.5.1. Karagenan Miktarı Optimizasyonu

0.1 gr alginat üzerine 0.015 g, 0.03 g ve 0.05 g karagenan tartıldı ve bu karışımlara 2.5 mL *Candida rugosa* lipazı çözeltisi (25 mg/mL) ve 2.5 mL su yavaş yavaş ilave edilerek hassas bir şekilde cam baget ile karıştırıldı, kabarcıklarının giderilmesi için 30 dakika kadar buzdolabında bekletildi. Bir enjektör yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan buza oturtulmuş olan bir beher içerisindeki 50 mL % 4'lük CaCl_2 çözeltisine damlatıldı. Çözelti içindeki immobilize boncuklar buzdolabında bir saat bekletildikten sonra süzülerek destile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları protein tayini için saklandı. Elde edilen boncukların lipaz aktiviteleri titrimetrik yöntemle belirlendi.

3.2.5.2. Kalsiyum Klorür Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Damlatma çözeltisi olarak sırasıyla % 1, 2, 3, 4 ve 5 (w/v) konsantrasyonlarda olmak üzere CaCl_2 çözeltileri hazırlandı. 2.5 mL *Candida rugosa* lipazı (25 mg/mL) çözeltisi ve 2.5 mL suda çözülen 0.1 gr alginat ve 0.03 gr karagenan jelde 30 dakika bekletildikten sonra bir enjektör yardımıyla, manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan buz banyosu içindeki 50 mL % 1'lik CaCl_2 içine damlatıldı. Aynı işlem diğer % 2, 3, 4 ve 5'lik (w/v) CaCl_2 çözeltileri için de tekrarlandı. Farklı konsantrasyondaki CaCl_2 çözeltisine damlatılmış immobilize boncuklar bir saat buzdolabında bekletildikten sonra süzülerek destile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları protein tayini için saklandı. Elde edilen boncukların lipaz aktiviteleri belirlendi.

3.2.5.3 Enzim Miktarı Optimizasyonu

Candida rugosa lipazı çözeltisinden 25 mg/mL olmak üzere enzim çözeltisi hazırlandı. 25 mg/mL olan enzim çözeltisinden 2.5 mL, 5 mL, 7.5 mL ve 10 mL alındı. Böylelikle sırasıyla 62.5 mg, 125 mg, 187.5 mg ve 250 mg enzim içeren bu enzim çözeltileri 0.1 gr alginat ve 0.03 g karagenan jelde çözülerek 30 dakika buzdolabında bekletildi. Tutuklanan enzim bir enjektör yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan buz banyosu içindeki 50 mL % 4'lik CaCl_2 içine damlatıldı. Farklı konsantrasyonlardaki enzim çözeltileri içinde aynı işlem tekrarlandı. İmmobilize boncuklar bir saat buzdolabında bekletildikten sonra süzülerek destile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları protein tayini için saklandı. Elde edilen boncukların lipaz aktiviteleri belirlendi.

3.2.5.4. Boncuk Boyutu Optimizasyonu

Boncuk boyutu optimizasyonu için; boncukların hazırlanması için yeşil enjektör ucu ve pastör pipeti kullanıldı. 0.1g alginat ve 0.03 g karagenan 2.5 mL *Candida rugosa* lipazı (25 mg/mL) çözeltisi ve 2.5 mL Tris-HCl tamponunda (pH 8.0) çözüldü. 30 dakika buzdolabında bekletildikten sonra tutuklanan enzim siyah uçlu enjektör yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan buz banyosu içindeki % 4'lük CaCl_2 çözeltisine damlatıldı. Aynı işlem yeşil uçlu enjektör ve pastör pipeti ile de tekrarlandı. Farklı çaplardaki immobilize boncuklar bir saat buzdolabında bekletildikten sonra süzülerek destile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları protein tayini için saklandı. Elde edilen boncukların çapları bir kumpasla ölçüldü. Boncuklarda aktivite tayini yapıldı.

3.2.5.5. Boncuk Miktarı Optimizasyonu

0.1 g alginat ve 0.03 g karagenan 2.5 mL *Candida rugosa* lipazı (25 mg/mL) çözeltisi ve 2.5 mL Tris-HCl tamponunda (pH 8.0) çözüldü. 30 dakika buzdolabında bekletildikten sonra tutuklanan enzim siyah uçlu enjektör yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan buz banyosu içindeki % 4'lük CaCl₂ çözeltisine damlatıldı. İmmobilize boncuklar bir saat buzdolabında bekletildikten sonra süzülerek destile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları protein tayini için saklandı. Aktivite tayinleri için 0.25, 0.5, 0.75 ve 1 g boncuk kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.6 *Candida rugosa* ve Defne Lipazının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.6.1. Optimum pH Tayini

Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazı ve defne lipazının maksimum aktivite gösterdiği optimum pH değerlerini belirlemek amacı ile farklı pH tamponları kullanıldı. *Candida rugosa* lipazı için pH 6.0 ve 7.0 için Tris-maleat tamponu; pH 7.0, 8.0 ve için Tris-HCl tamponu; pH 9.0, 10.0 için karbonat tamponu kullanıldı. Defne lipazında da pH 6.0 için Tris-maleat tamponu; pH 7.0, 8.0 için Tris-HCl tamponu pH 9.0 karbonat tamponu kullanıldı. Substrat emülsiyonları bu tamponlar kullanılarak hazırlandı. Elde edilen değerlerden yararlanılarak aktiviteler; Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi belirlendi.

3.2.6.2. Optimum Sıcaklık Tayini

Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazı ve defne lipazının maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek için; substrat olarak yağ emülsiyonu kullanılarak

30, 40, 50 ve 60 °C'de çalışıldı. Elde edilen değerlerden yararlanarak aktiviteler; Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi belirlendi.

3.2.6.3. Termal Kararlılık Tayini

Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazı ve defne lipazının termal kararlılığını belirlemek için; serbest enzim çözeltisi ve immobilize enzim ayrı ayrı 30, 40, 50, 60 ve 70 °C sıcaklıklarda ısıtılarak 30'ar dakika aralıklarla 0., 30., 60., ve 90., dakikalarda *Candida rugosa* lipazı için Tris-maleat tamponu (pH 6.5) ve defne lipazı için Tris-HCl tamponunda (pH 7.0) hazırlanan substrat emülsiyonları kullanılarak enzim aktiviteleri belirlendi. Elde edilen değerlerden yararlanarak aktiviteler; Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi belirlendi.

3.2.6.4. K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

Candida rugosa lipazı ve defne lipazı için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla, substrat emülsiyonu *Candida rugosa* lipazı için Tris-maleat tamponu (pH 6.5) ve defne lipazı için Tris-HCl tamponunda (pH 7.0) 0.5, 0.1, 1.5, 2.0 ve 2.5 g yağ olmak üzere beş farklı substrat konsantrasyonunda hazırlanarak enzim aktiviteleri belirlendi. Elde edilen spesifik aktivite değerlerinden Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla K_m ve V_{max} sabitleri belirlendi.

3.2.6.5. Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi

Candida rugosa lipazının substrat spesifitesinin belirlenebilmesi için; soya yağı, aspir yağı, ham ayçiçeği yağı, mısır yağı, kanola yağı, fındık yağı, zeytin yağı, tribütirin, trikaprilin, gliseriltristearat olmak üzere 10 farklı substratla hazırlanan substrat emülsiyonlarıyla enzim aktiviteleri belirlendi. Elde edilen değerlerden yararlanarak aktiviteler Bölüm 3.2.2’de belirtildiği gibi belirlendi.

3.2.6.6. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği

Elde edilen immobilize *Candida rugosa* lipazı ve defne lipazının yeniden kullanılabilirliğini belirlemek için; 1 g boncuk tartıldı. Enzim aktivitelerini belirlemek için, 3.5 g zeytin yağı kullanarak substrat emülsiyonu hazırlandı. Aktivite tayini yapıldı ve elde edilen değerlerden yararlanarak aktiviteler; Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı gibi belirlendi.

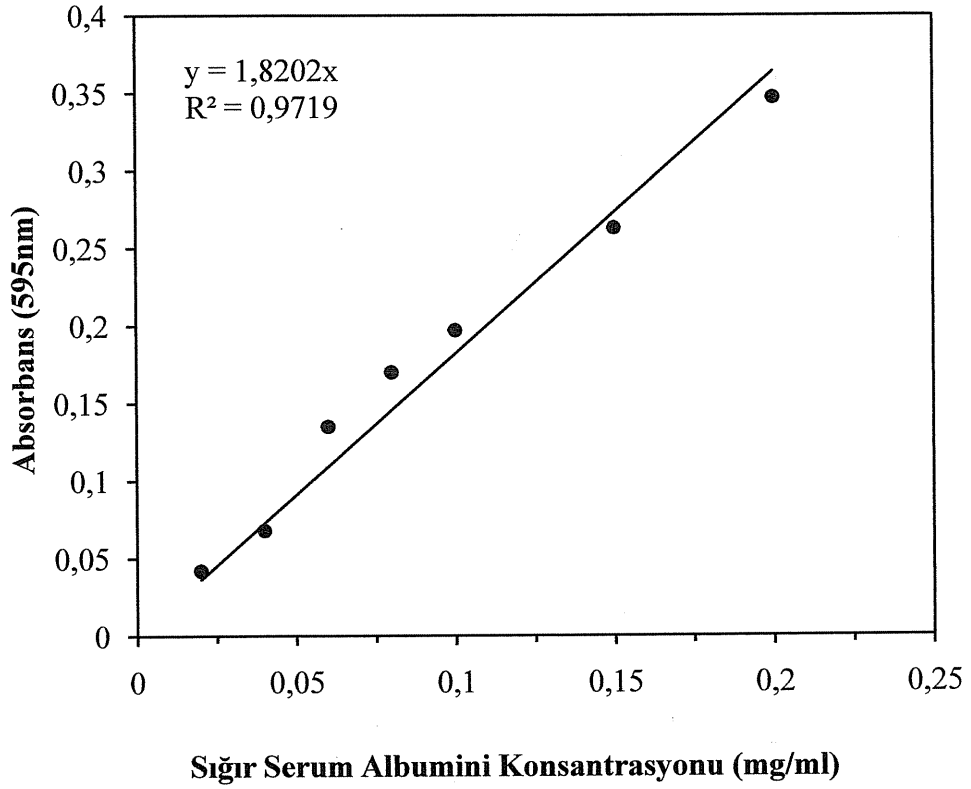
3.2.6.7. İmmobilize Enzimin Depo Kararlılığı

Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazı ve defne lipazının depo kararlılığını belirlemek amacıyla, 3 gün aralıklarla serbest ve immobilize enzimin aktiviteleri ölçüldü. Serbest enzim için 1 mL, immobilize boncuklar için 0.25 g alınarak aktivite tayinleri optimum koşullarda gerçekleştirildi.

4. DENEYLER VE BULGULAR

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

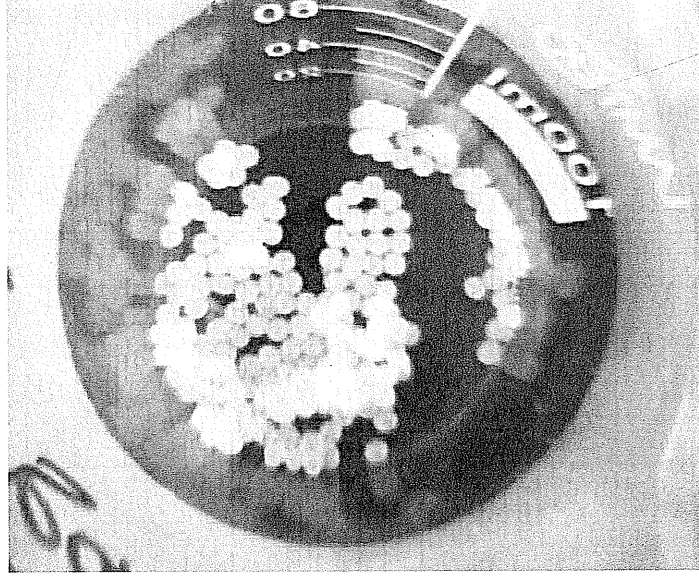
Kantitatif protein tayini için Bradford Yöntemi kullanıldı. Protein standart grafiği Bölüm 3.2.1.1'de açıklandığı gibi hazırlandı (Şekil 4.1). Bölüm 3.2.1.1'de anlatıldığı şekilde serbest enzim ve yıkama sularının protein miktarları bu standart grafikten belirlendi.



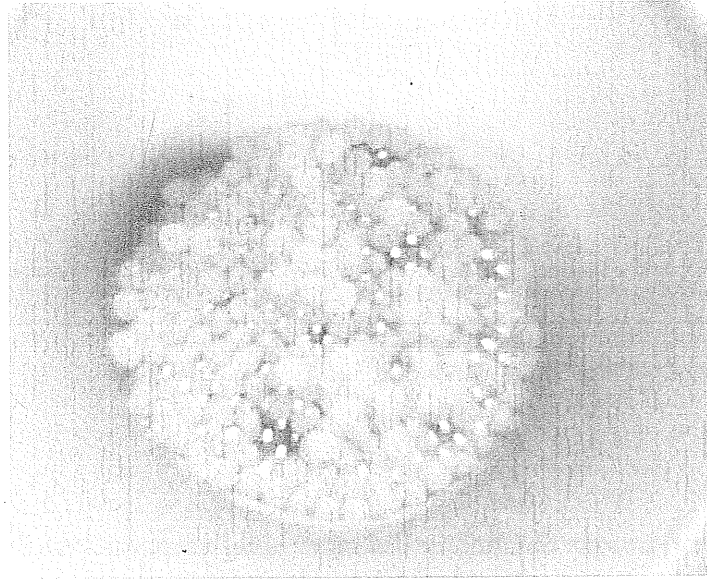
Şekil 4.1. Bradford yöntemine göre protein standart grafiği

4.2. *Candida rugosa* Lipazı ve Defne Lipazının Alginat + Karagenan Jelde Tutuklanması

Candida rugosa lipazı ve defne lipazının alginat + karagenan jellerde tutuklanması Şahin metotuna göre Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi yapılmıştır.



Şekil 4.2. *Candida rugosa* lipazının alginat + karagenan jelde tutuklanması ile elde edilen boncuklar (Damlatma çözeltisi % 4 'lük CaCl_2)

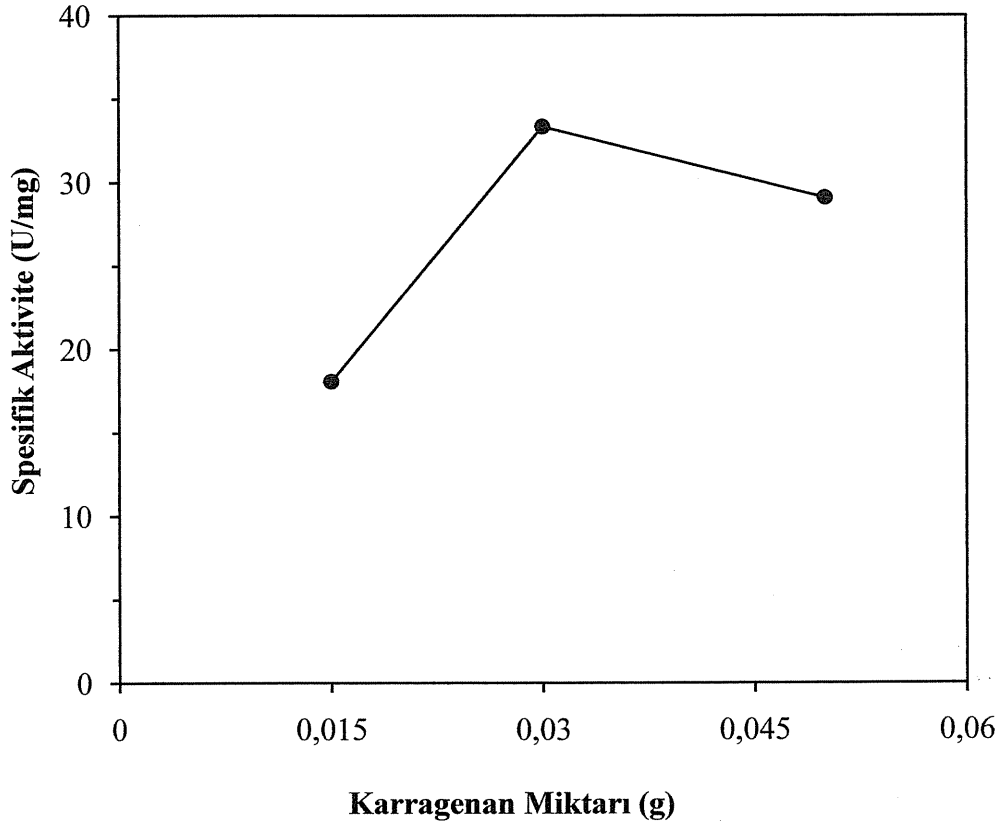


Şekil 4.3. Defne lipazının alginat + karagenan jelde tutuklanması ile elde edilen boncuklar (Damlatma çözeltisi % 4 'lük CaCl_2)

4.3. *Candida rugosa* Lipazının Alginat+Karagenan Jelde İmmobilizasyonunun Optimizasyonu

4.3.1. Karagenan Miktarı Optimizasyonu

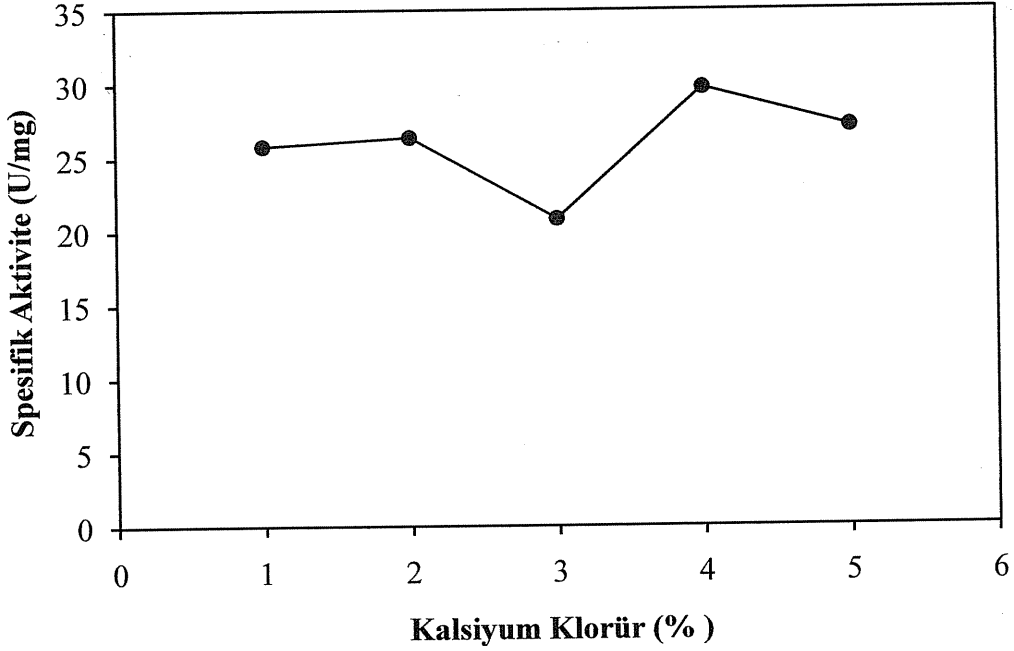
Candida rugosa lipazının alginat+karagenan jelde immobilizasyonunda karagenan miktarını belirlemek için 0.1 g alginat üzerine farklı miktarlarda karagenan ilave edilerek hazırlanan jellerde karagenan miktarı optimizasyonu Bölüm 3.2.5.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. 0.5 g immobilize enzim içeren boncuklarla gerçekleştirilen aktivite tayinlerinden elde edilen sonuçlar Şekil 4.4’te verildi.



Şekil 4.4. Alginat+karagenan jelde immobilize *Candida rugosa* lipazının aktivitesine karagenan miktarının etkisi

4.3.2. Kalsiyum Klorür Konsantrasyonunu Optimizasyonu

Candida rugosa lipazının alginat + karagenan jelde immobilizasyonunda CaCl_2 konsantrasyonunun belirlenmesi için % 1, 2, 3, 4 ve 5'lik CaCl_2 çözeltileri damlatma çözeltisi olarak kullanıldı. Tutuklama işlemi Bölüm 3.2.5.2'de belirtildiği gibi yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.5'de verilmiştir.

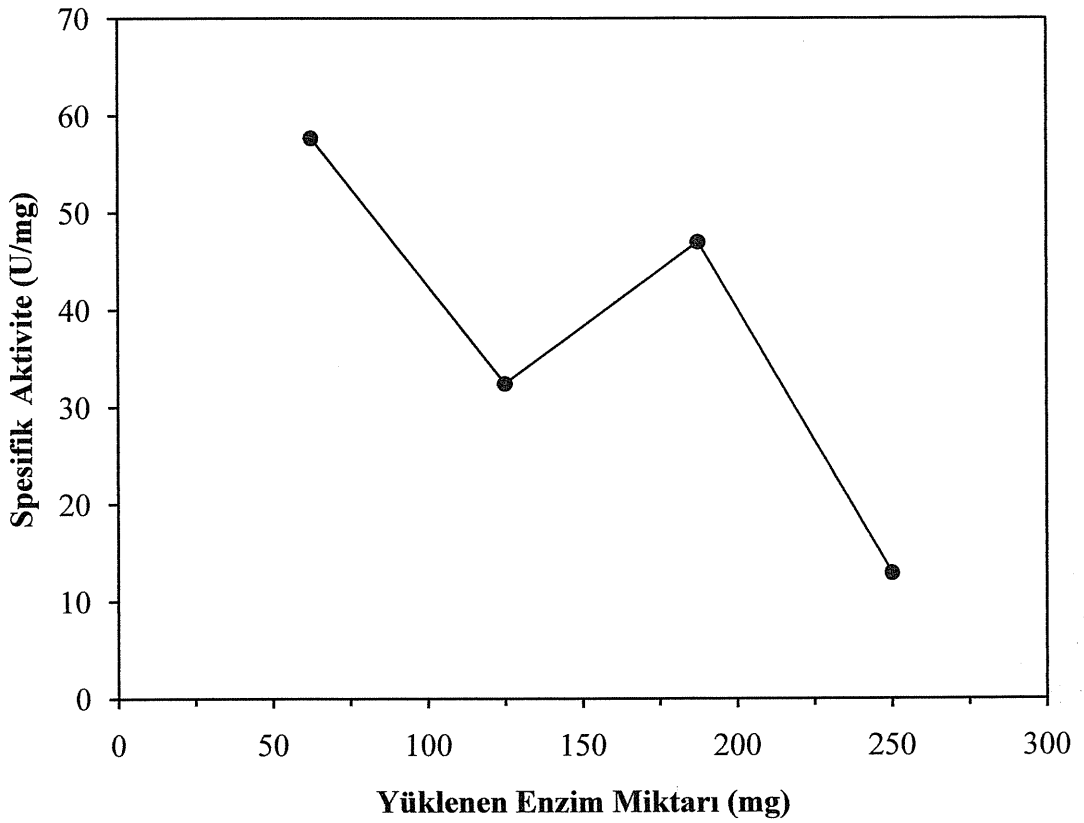


Şekil 4.5. Alginat+karagenan jelde immobilize *Candida rugosa* lipazının aktivitesine CaCl_2 konsantrasyonunun etkisi

İmmobilize *Candida rugosa* lipazının aktivite tayinlerinin sonuçları değerlendirildiğinde; en yüksek enzim aktiviteleri damlatma çözeltisi olarak % 4'lük CaCl_2 konsantrasyonu kullanıldığında elde edildi (Şekil 4.4). Bundan sonraki immobilizasyonlarda CaCl_2 konsantrasyonu % 4 olarak çalışıldı.

4.3.3. Enzim Miktarı Optimizasyonu

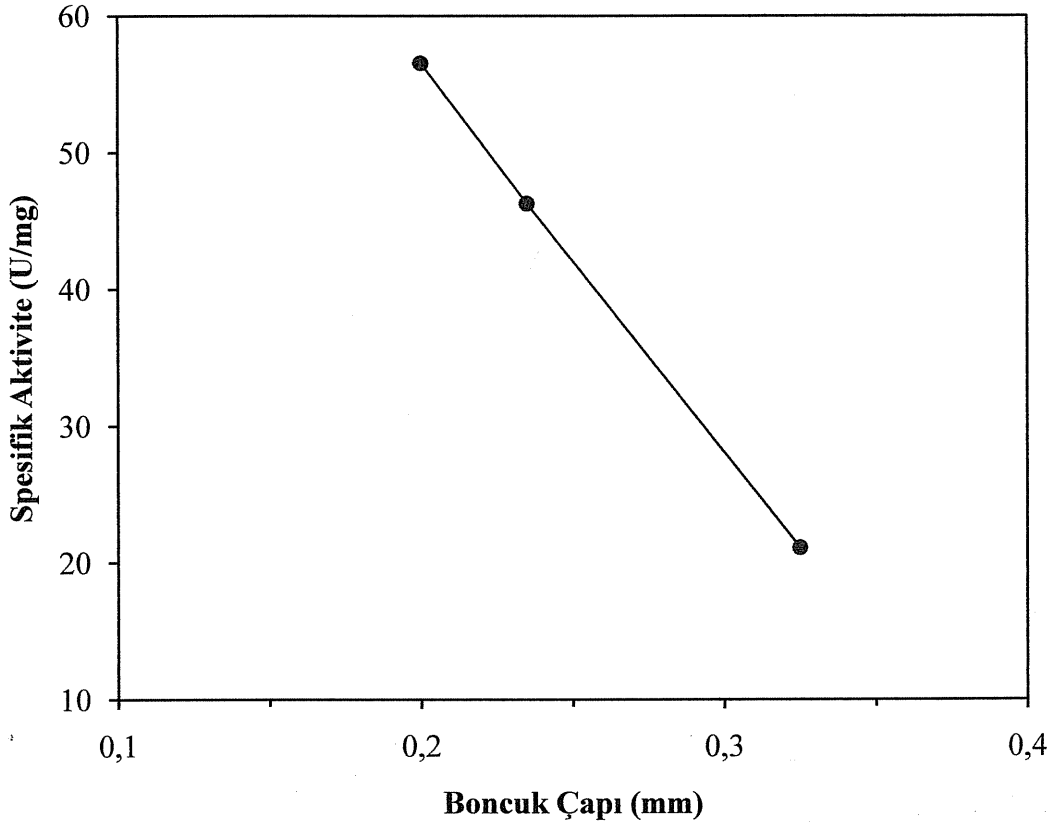
25 mg/mL olan enzim çözeltisinden 2.5 mL ve 5 mL, 7.5 ve 10 mL alındı. Böylelikle sırasıyla 62.5 mg, 125 mg, 187.5 mg ve 250 mg enzim içeren enzim çözeltileri kullanılarak immobilizasyonlar gerçekleştirildi. Elde edilen boncukların aktiviteleri belirlenerek oluşturulan grafiklerde en uygun enzim miktarının 62.5 mg enzim içeren çözelti olduğu belirlendi (Şekil 4.6). Bundan sonraki çalışmalarda 62.5 mg (25 mg/mL) enzim içeren boncuklarla devam edildi.



Şekil 4.6. Alginat+karagenan jelde immobilize *Candida rugosa* lipazının aktivitesine yüklenen enzim miktarının etkisi

4.3.4. Boncuk Boyutu Optimizasyonu

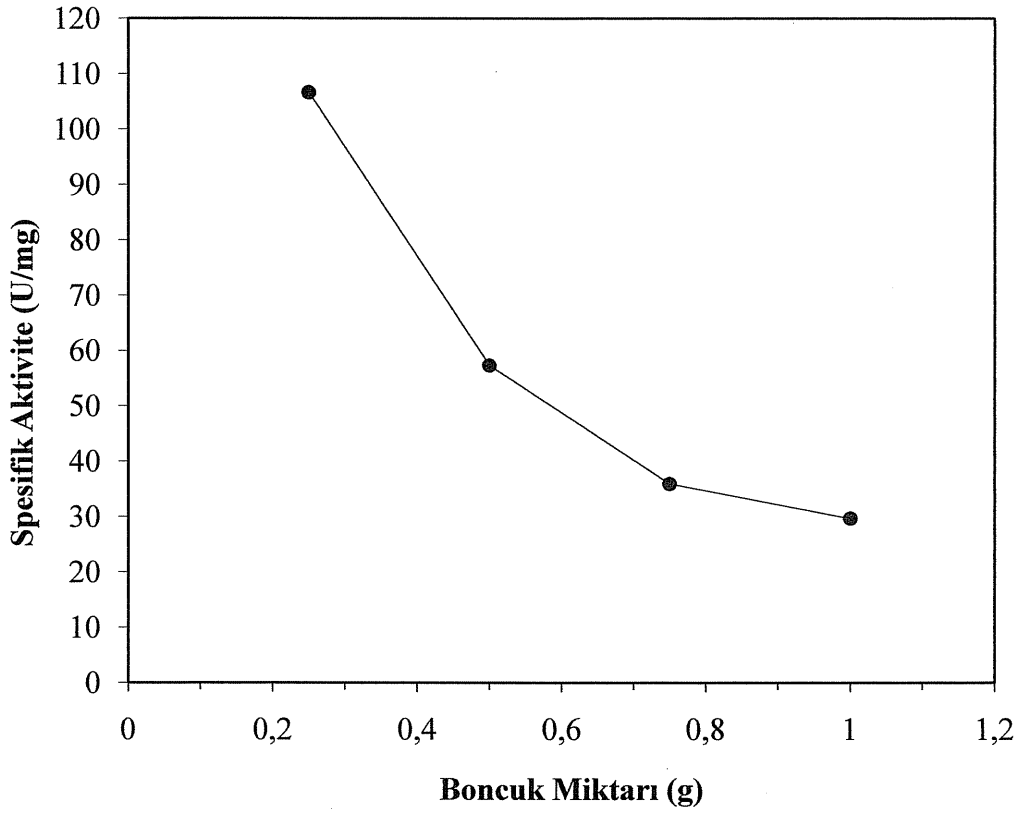
Boncuk boyutu optimizasyonu için; siyah enjektör, yeşil enjektör ve pastör pipeti ile elde edilen boncuklar kullanıldı. Kumpasla yapılan ölçümlerde boncukların çapları sırasıyla 0.2 mm, 0.235 mm ve 0.325 mm olarak belirlendi. En yüksek enzim aktiviteleri siyah enjektör uçla elde edilen boncuklar (çapı 0.2 mm) kullanıldığında belirlendi (Şekil 4.7). Bundan sonraki çalışmalarda boncuklar siyah enjektör kullanılarak hazırlandı.



Şekil 4.7. Alginat+karagenan jelde immobilize *Candida rugosa* lipazının aktivitesine boncuk boyutunun etkisi

4.3.5. Boncuk Miktarı Optimizasyonu

Aktivite tayinlerinde kullanılacak optimum boncuk miktarının belirlenmesi için; 0.1g alginat ve 0.03 g karegenandan oluşan jelde 62.5 mg *Candida rugosa* lipazı tutuklanarak %4'lük CaCl₂ damlatma çözeltisine siyah uçlu enjektörle damlatılarak elde edilen boncuklardan 0.25, 0.5, 0.75 ve 1 gr boncuk kullanılarak aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.7'de verildi. Optimum boncuk miktarı 0.25 gr olarak belirlendi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Alginat+karagenan jelde immobilize *Candida rugosa* lipazının aktivitesine boncuk miktarının etkisi

Tablo 4.1. *Candida rugosa* lipazının alginat + karagenan jelde tutuklanmasının optimizasyon sonuçları

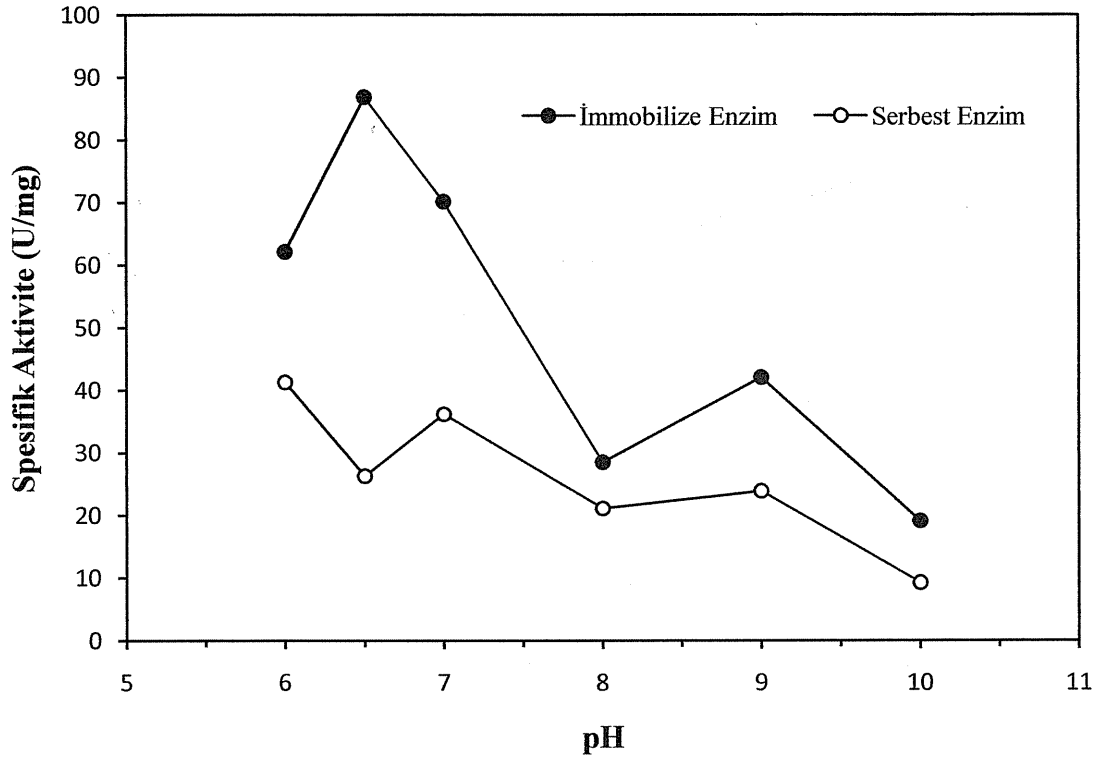
Karagenan Miktarı	0.03 g
CaCl₂ Konsantrasyonu (w/v)	% 4
Enzim Miktarı	62.5 mg
Boncuk Boyutu	0.2 mm
Boncuk Miktarı	0.25 g

Tablo 4.3'de görüldüğü gibi *Candida rugosa* lipazının alginat + karagenan jelde tutuklanma koşulları optimize edildi. Alginat + karagenan jelde *Candida rugosa* lipazı immobilize edilirken de boncuklar yukarıdaki optimizasyon koşullarında hazırlandı. Çalışmanın devamında *Candida rugosa* ve defne lipazı için alginat + karagenan jelde hazırlanan immobilize boncukların optimum pH, optimum sıcaklık, termal ve depo kararlılığı, yeniden kullanılabilirlik gibi bazı biyokimyasal özellikleri çalışıldı ve serbest enziminki ile karşılaştırıldı.

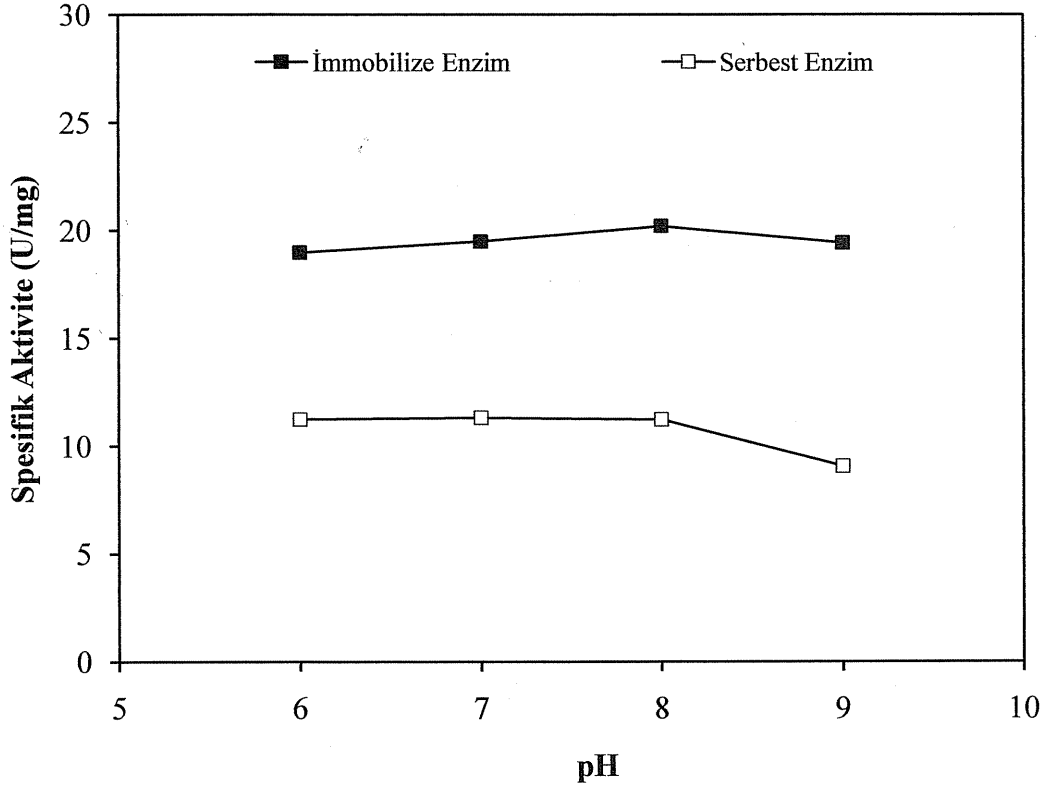
4.4. Alginat + Karagenan Jelde Tutuklu *Candida rugosa* Lipazı ve Defne Lipazını Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

4.4.1. Optimum pH

Candida rugosa lipazı ve defne lipazının optimum pH 'larını belirlemek üzere farklı pH değerlerinde (6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0) farklı tamponları hazırlandı. Elde edilen aktivite sonuçları doğrultusunda immobilize ve serbest enzim için aktivite-pH grafikleri oluşturuldu (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). *Candida rugosa* lipazının immobilize enzim için optimum pH 6.5, serbest enzim için optimum pH 6.0 olarak belirlendi. Defne lipazının immobilize enzim için pH 8.0, serbest enzim için optimum pH 7.0 olarak belirlendi.



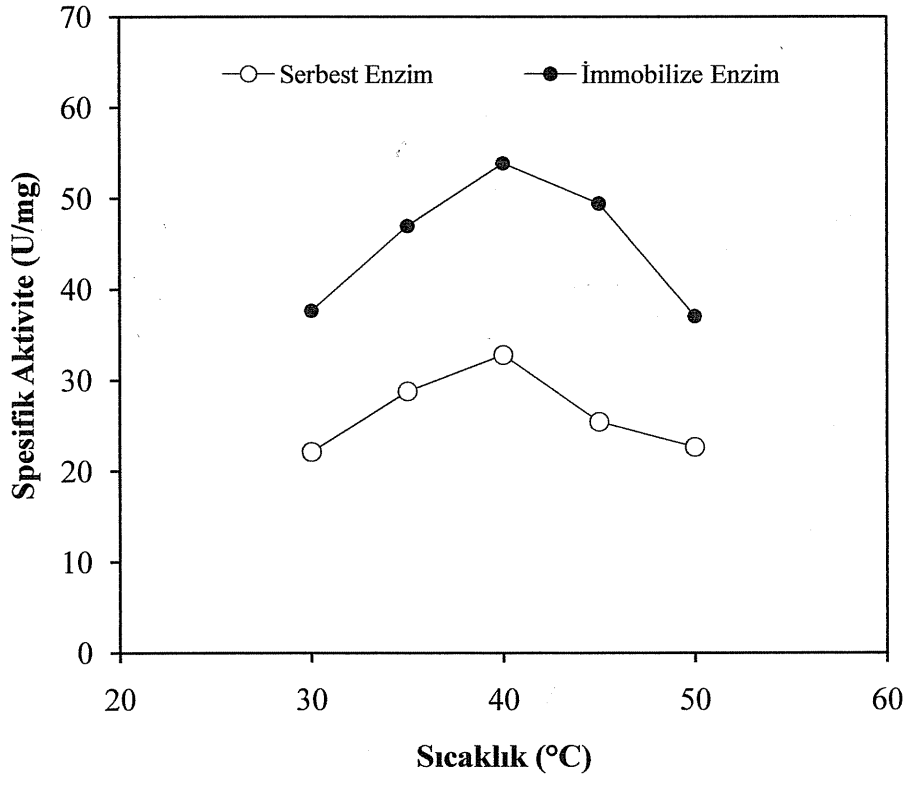
Şekil 4.9. İmmobilize ve serbest *Candida rugosa* lipazının pH'a bağlı aktivitelerinin değişimleri



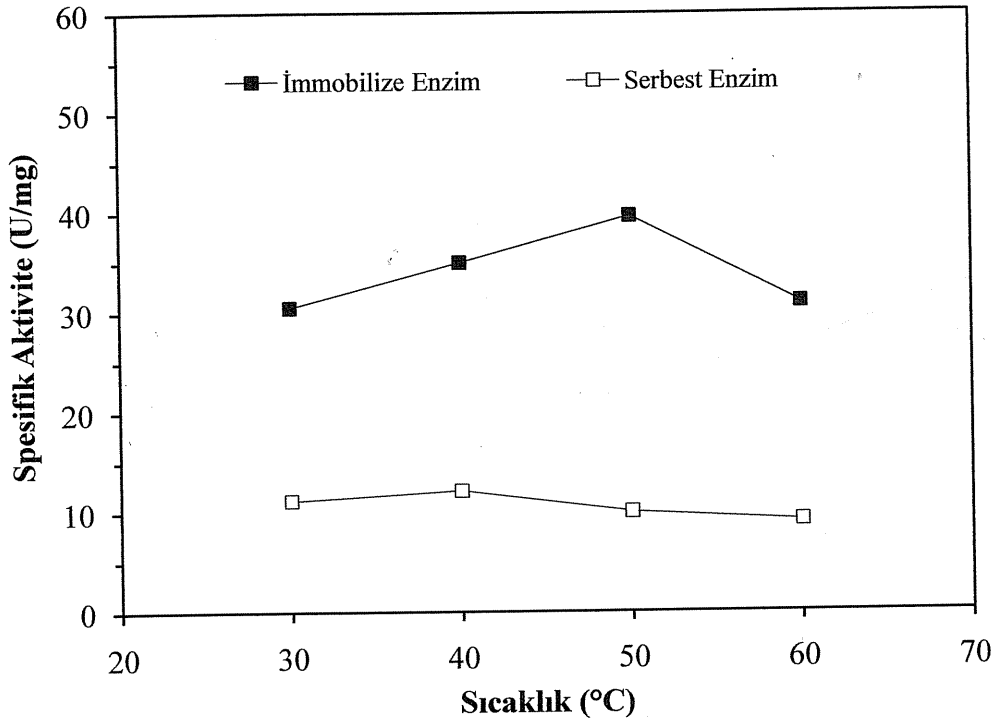
Şekil 4.10. İmmobilize ve serbest defne lipazının pH'a bağlı aktivitelerinin değişimleri

4.4.2. Optimum Sıcaklık Tayini

Serbest ve immobilize *Candida rugosa* ve defne lipazının maksimum aktivitesi gösterdiği sıcaklığı belirlemek için substrat olarak yağ emülsiyonları kullanılarak 30, 40, 50 ve 60 °C'de çalışıldı. Bu sıcaklıklarda enzimatik aktiviteler belirlendi ve aktivite-sıcaklık grafikleri çizildi (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12). *Candida rugosa* lipazının aktivitesi için, alginat + karagenanda tutuklanmış immobilize ve serbest enzimin optimum sıcaklığı 40 °C olarak belirlendi. Alginat + karagenanda tutuklanmış defne lipazının optimum sıcaklığı 50 °C, serbest enzim için ise 40 °C olarak belirlendi.



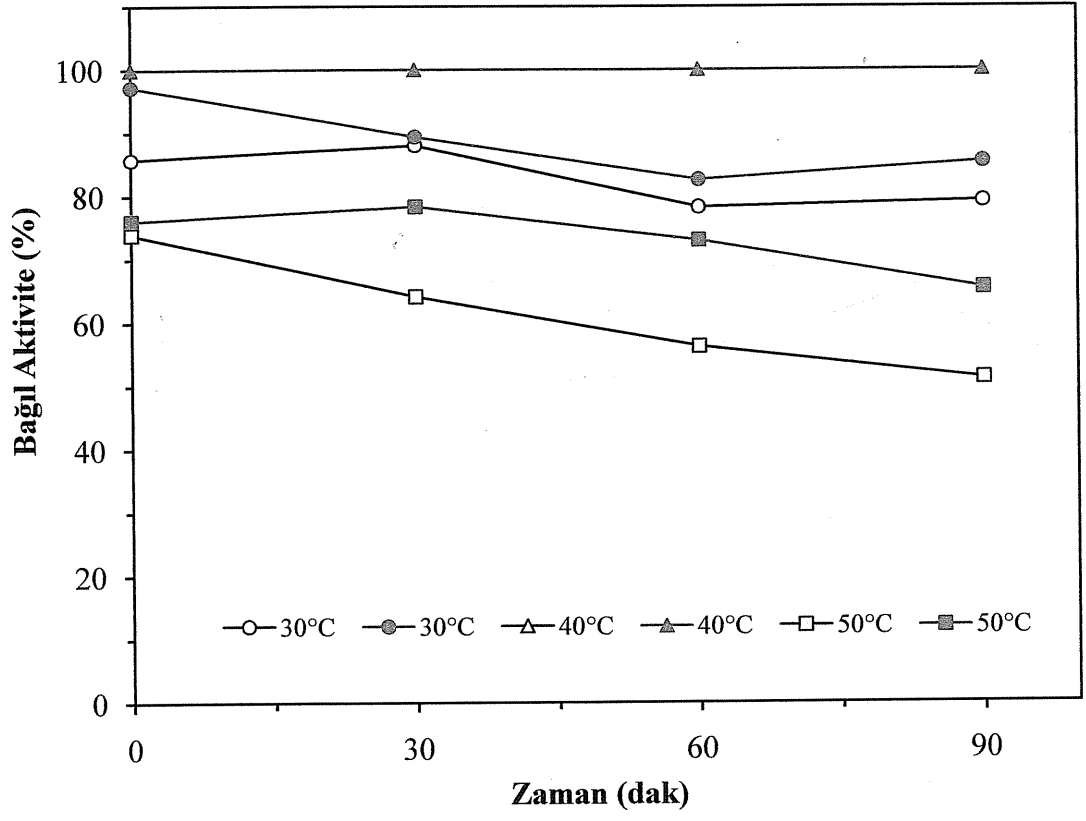
Şekil 4.11. İmmobilize ve serbest *C.rugosa* lipazının sıcaklığa bağlı aktivite değişimi



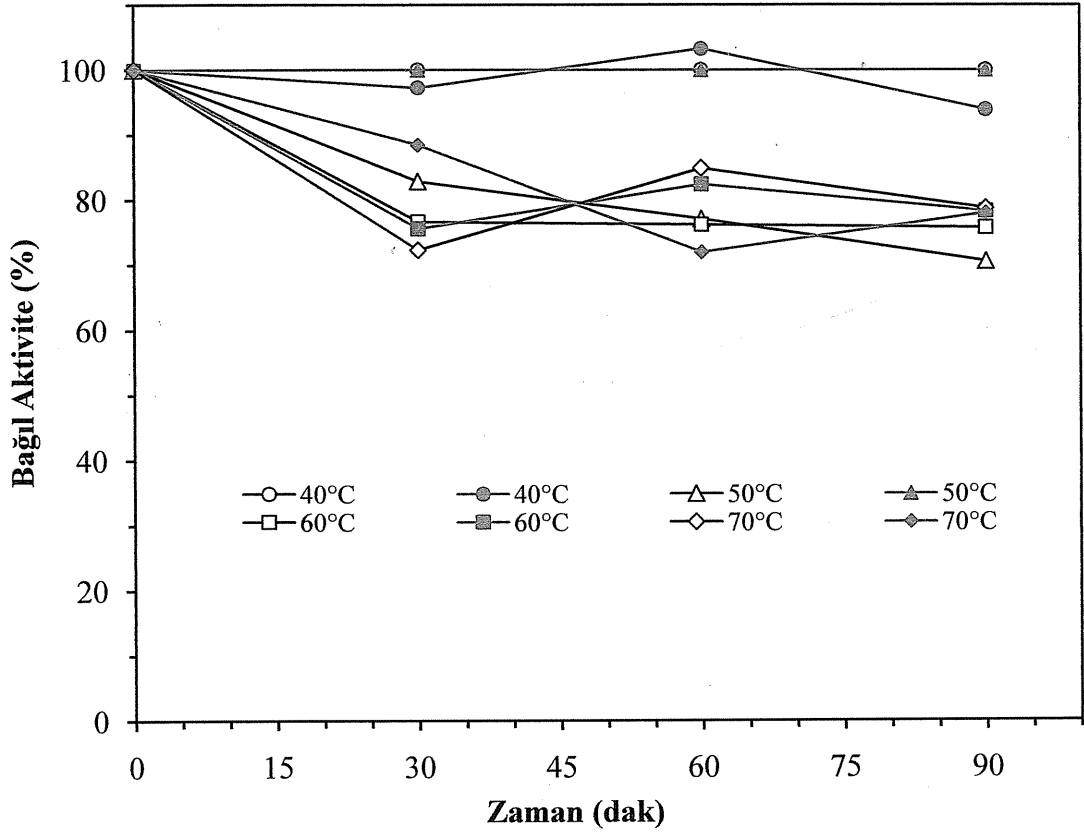
Şekil 4.12. İmmobilize ve serbest defne lipazının sıcaklığa bağlı aktivite değişimi

4.4.3. Termal Kararlılık Çalışması

Candida rugosa lipazı ve defne lipazının sıcaklığa karşı dayanıklılık özelliklerinin araştırılması için öncelikle optimum şartlarda yağ substrat emülsiyonuna karşı aktivite tayinleri yapıldı. *Candida rugosa* lipazı enzim çözeltisi 1,5 saat süre ile 30, 40, 50, °C 'lerde defne lipazı enzim çözeltisi de 40, 50, 60 ve 70 °C'lerde inkübe edildi. İnkübe edilen çözeltiler 0., 30., 60. ve 90. dakikalarda olmak üzere her 30 dakika sonunda buz banyosuna alındı ve hidrolitik aktivite tayini yapıldı. İmmobilize ve serbest enzimler için optimum sıcaklıklarında ölçülen aktivite değerleri % 100 olarak alındı. Elde edilen aktivite değerleri % aktiviteye dönüştürülerek % aktivite-zaman grafikleri çizildi (Şekil 4.13 ve 4.14).



Şekil 4.13. Serbest ve alginat + karagenan boncuklara immobilize *Candida rugosa* lipazının aktivitesine ait termal kararlılık grafiği



Şekil 4.14. Serbest ve alginat + karagenan boncuklara immobilize defne lipazının aktivitesine ait termal kararlılık grafiği

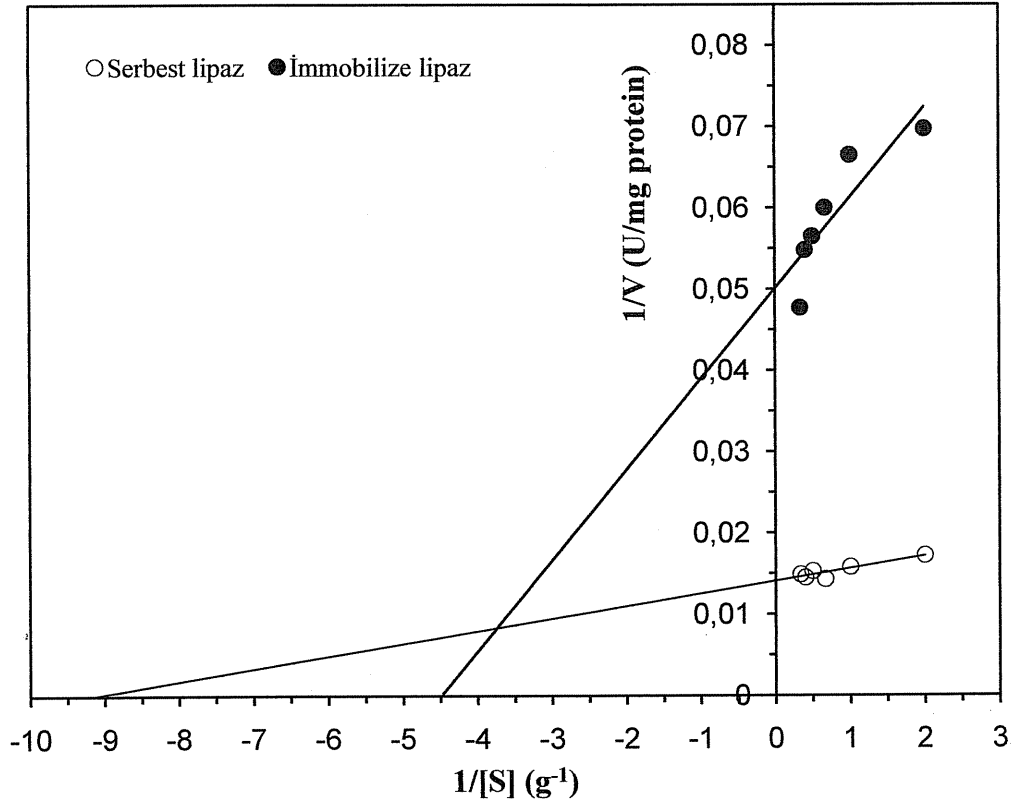
Alginat + karagenan jelde tutuklanmış *Candida rugosa* lipazının 90 dakika sonunda 40°C'de aktivitesini tamamen ve 50 °C' de % 65 kadarını koruduğu gözlemlendi. Serbest *Candida rugosa* lipazı ise 50 °C' de aktivitesinin % 51 kadarını koruduğu gözlemlendi.

Alginat + karagenan jelde tutuklanmış defne lipazının 50 °C'de aktivitesini tamamen, 60 °C'de % 75'ini ve 70 °C'de % 72 kadarını koruduğu gözlemlendi. Serbest defne lipazının ise, 50 °C' de aktivitesinin % 70'ini, 60 °C'de % 75'ini ve 70 °C'de % 72 kadarını koruduğu gözlemlendi.

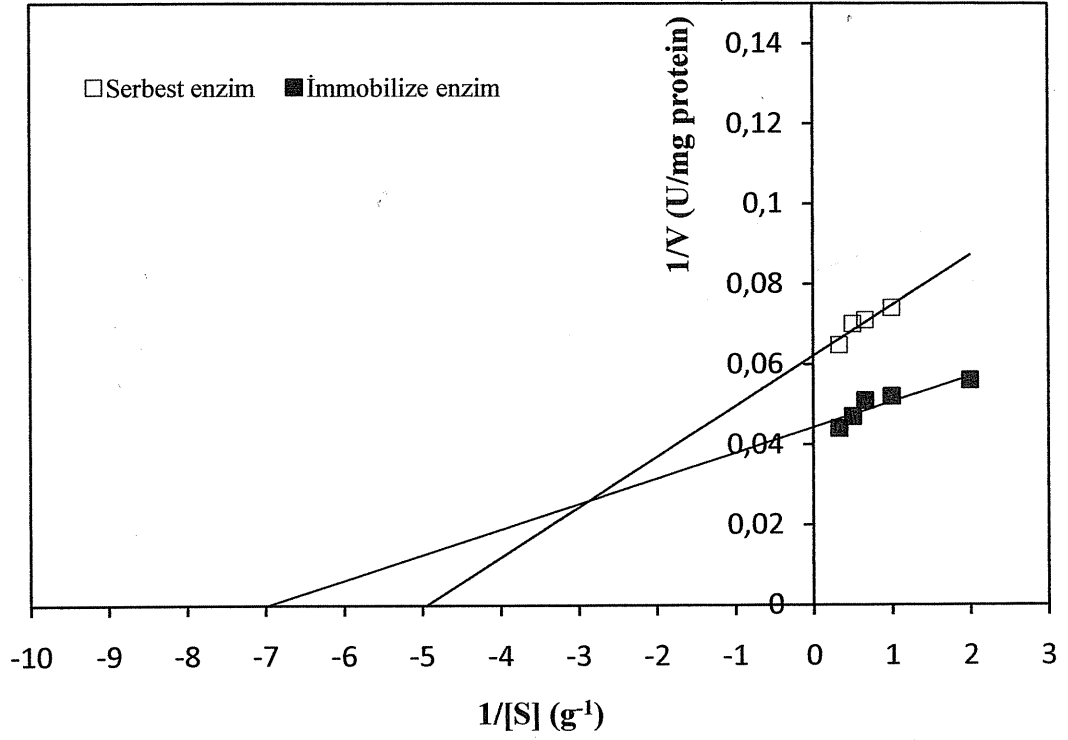
4.4.4. *Candida rugosa* Lipazı ve Defne Lipazı için K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

Candida rugosa lipazı ve defne lipazı için K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla, substrat emülsiyonu 0.5, 0.1, 1.5, 2.0 ve 2.5 g yağ olmak üzere beş farklı konsantrasyonda hazırlandı ve serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazı ve defne lipazı için aktiviteleri ölçüldü.

Aktivite değerleri spesifik aktivite (U/mg protein) cinsinden ifade edildi. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanarak her bir substrat için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 4.17 ve 4.18). K_m ve V_{max} değerleri, bu grafiklerden yararlanarak hesaplandı.



Şekil 4.15. Alginat + karagenan boncuklara immobilize ve serbest *Candida rugosa* lipazının aktivitesi için Lineweaver-Burk Grafiği



Şekil 4.16. Alginat + karagenan boncuklara immobilize ve serbest defne lipazının aktivitesi için Lineweaver-Burk Grafiği

Tablo 4.2. Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının aktivitesi için kinetik değerleri

	K_m (g)	V_{MAX} (U/mg protein)	V_{MAX} / K_m
Serbest Enzim	0.111	71.43	643.5
Alginat+Karagenan boncuk	0.222	19.6	88.3

Tablo 4.3. Serbest ve immobilize defne lipazının aktivitesi için kinetik değerleri

	K_m (g)	V_{MAX} (U/mg protein)	V_{MAX} / K_m
Serbest Enzim	0.203	16.1	79.31
Alginat + Karagenan boncuk	0.147	22.72	154.55

4.4.5. Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi

Candida rugosa lipazı ve defne lipazının substrat spesifitesinin belirlenebilmesi için; soya yağı, aspir yağı, ham ayçiçeği yağı, mısır yağı, kanola yağı, fındık yağı, zeytin yağı, tribütirin, trikapriline, gliseriltristearat olmak üzere 10 farklı substratla hazırlanan substrat emülsiyonlarına karşı enzim aktiviteleri belirlendi. Aktiviteler aşağıdaki Tablo 4.4 ve Tablo 4.5’de gösterildi.

Tablo 4.4. Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının substrat spesifitesi değerleri.

Substrat	İmmobilize Enzim Aktivite*	İmmobilize Enzim Bağlı Aktivite (%)	Serbest Enzim Aktivite*	Serbest Enzim Bağlı Aktivite (%)
Zeytin Yağı	103,49	100	258,48	100
Soya Yağı	91,51	88,42	122,39	47,43
Aspir Yağı	83,76	80,93	37	14,34
Ham Ayçiçeği Yağı	84,24	81,39	33,6	13,02
Mısır Yağı	91,11	88,03	41,18	15,96
Kanola Yağı	81,77	79	36,83	14,19
Fındık Yağı	90,76	87,69	36,62	14,19
Trikapriline	94,26	91,08	47,13	18,26
Gliseriltristearat	94,35	91,16	44,81	17,36
Tribütirin	92,35	89,23	41,84	16,18

* Spesifik Aktivite U/mg protein

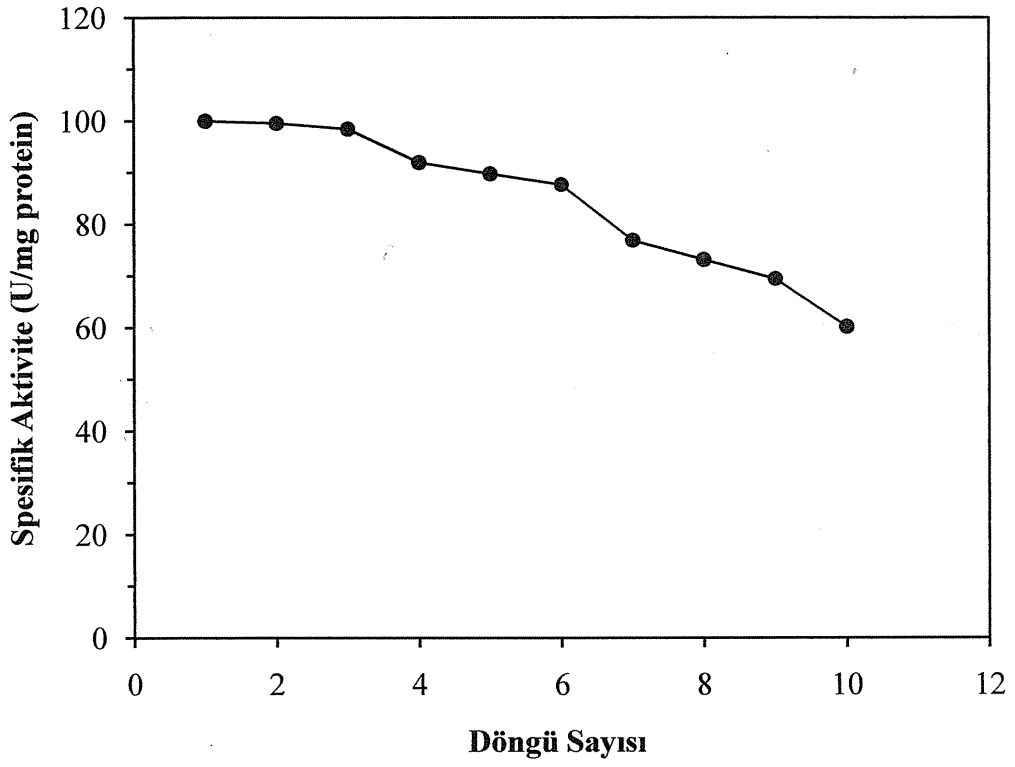
Tablo 4.5. Serbest ve immobilize defne lipazının aktivitesi için substrat spesifitesi değerleri.

Substrat	İmmobilize Enzim Aktivite*	İmmobilize Enzim Bağlı Aktivite (%)	Serbest Enzim Aktivite*	Serbest Enzim Bağlı Aktivite (%)
Zeytin Yağı	32,30	100	16,33	100
Aspir Yağı	29,65	91,79	7,32	44,82
Ham Ayçiçeği Yağı	20,64	63,9	8,54	52,39
Mısır Yağı	26,61	82,38	10,86	66,5
Kanola Yağı	24,54	75,79	9,40	59,93
Fındık Yağı	28,45	88,08	9,28	56,93
Tribütirin	20,77	64,3	9,85	59,33
Trikaprilin	24,93	77,18	9,65	59,20
Gliseriltristearat	25,39	78,6	9,55	58,48

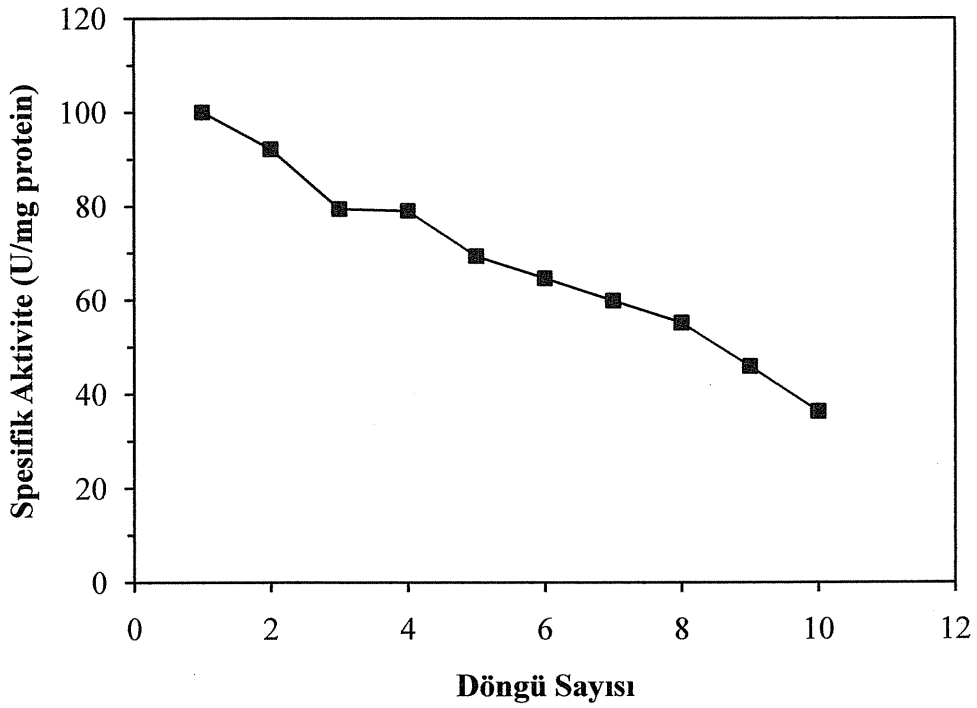
* Spesifik Aktivite U/mg protein

4.4.6. İmmobilize *Candida rugosa* Lipazı ve Defne Lipazının Tekrar Kullanılabilirliği

Candida rugosa lipazı ve defne lipazının immobilize edildiği boncukların aktiviteleri aynı boncuklar kullanılarak 10 döngü için tekrarlandı. *Candida rugosa* lipazında ilk 2 döngü süresince boncukların aktivitesini tamamen koruduğu, sonraki döngülerde yaklaşık % 70 kadar aktif olduğu, defne lipazında da aktivitenin ilk iki döngü süresince tamamen koruduğu ve sonraki döngülerde % 15'i kadarının korunabildiği belirlendi(Şekil 4.19 ve 4.20).



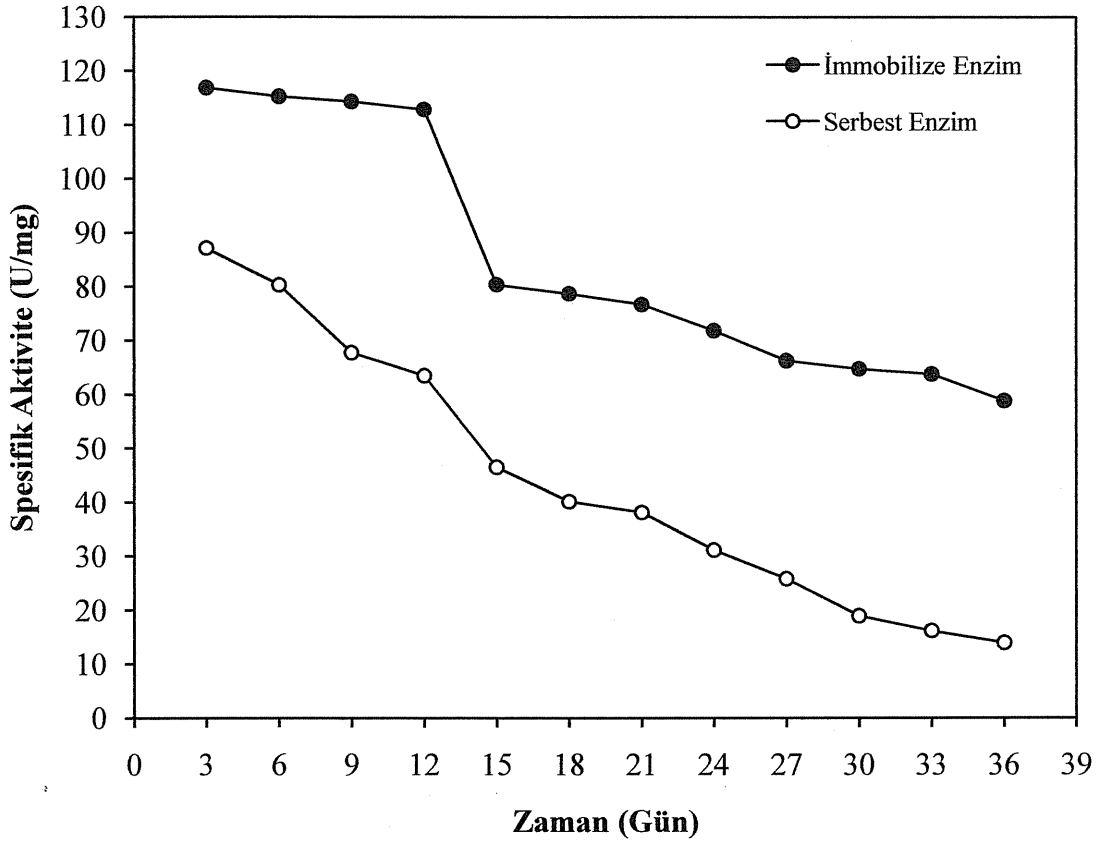
Şekil 4.17. İmmobilize *C. rugosa* lipazının kesikli proseste yeniden kullanılabirliği



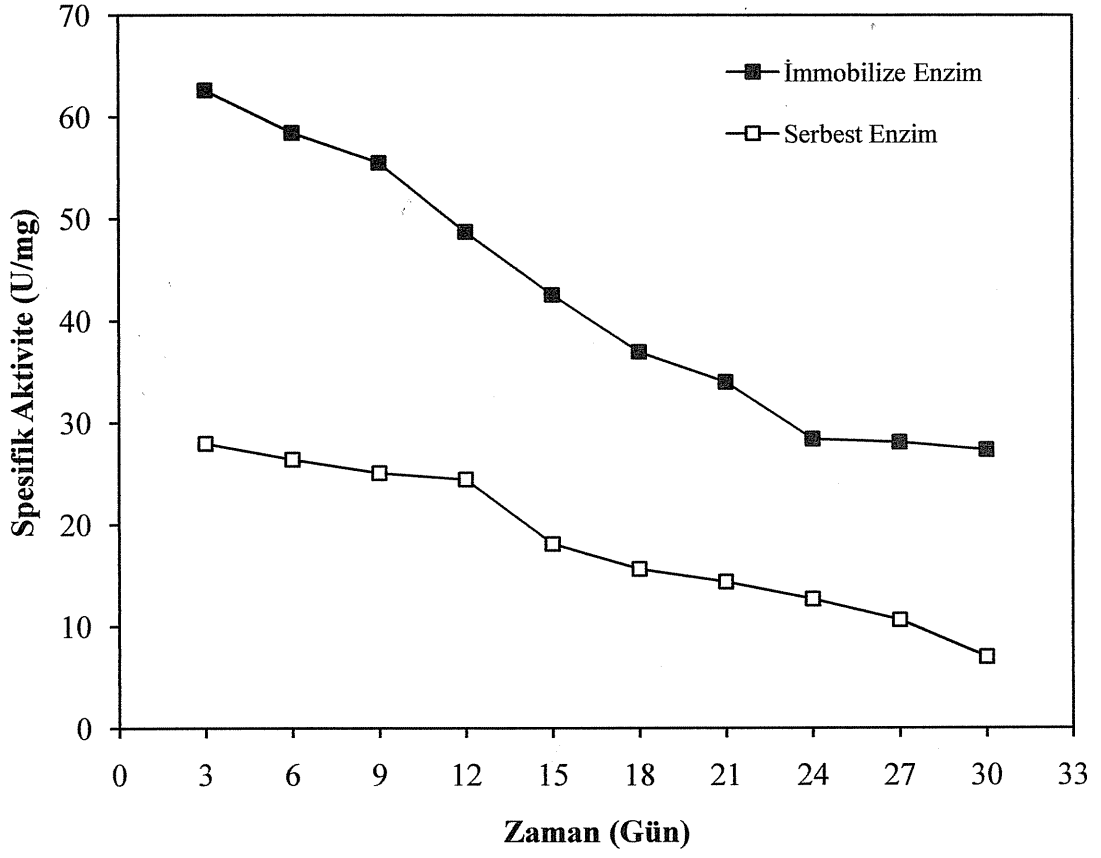
Şekil 4.20. İmmobilize defne lipazının kesikli proseste yeniden kullanılabirliği

4.5. İmmobilize ve serbest *Candida rugosa* Lipazı ve Defne Lipazının Depo Kararlılığı

Alginat + karagenan boncuklara immobilize edilmiş *Candida rugosa* ve defne lipazının ve serbest enzimlerin depo kararlılığını belirlemek amacıyla, serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesi 5 gün aralıklarla ölçüldü (Şekil 4.21 ve 4.22).



Şekil 4.19. Alginat + karagenan boncuklarda immobilize ve serbest *Candida rugosa* lipazının aktivitesi için depo kararlılık grafiği



Şekil 4.20. Alginat + karagenan boncuklarda immobilize ve serbest defne lipazının aktivitesi için depo kararlılık grafiği

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

İmmobilizasyon tekniklerinden biri olan tutuklama tekniği, bir boşluğa veya ağ içine enzimin fiziksel olarak hapsedilmesi olarak tanımlanabilir. Multivalent karşı iyonların eklenmesiyle polianyonik veya polikasyonik polimerlerin jelleşmesi şeklinde uygulanan enzim tutuklaması enzim immobilizasyonunda kullanılan basit ve yaygın bir metottur (Mammeralla ve Rubiolo, 2005). Bu çalışmada ticari bir mikrobiyal lipaz olan *Candida rugosa* lipazı ve bitkisel kaynaklı defne lipazı enzim kaynakları olarak kullanılmıştır. Çalışma kapsamında, tutuklama yöntemi olarak alginat+karagenan jel karışımlarında lipaz immobilizasyonu amaçlandı.

Candida rugosa lipazı ve defne lipazı alginat+karagenan jel karışımında tutuklanmış ve serbest ve immobilize lipazların optimum pH ve sıcaklıkları, K_m ve V_{max} değerleri, termal kararlılık, yeniden kullanılabilirlik ve depo kararlılığı gibi bazı biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Sodyum alginat jelde immobilizasyon, hızlı ve kolay uygulanabilir bir metot olması nedeniyle immobilizasyon çalışmalarında büyük kolaylık sağlamaktadır. Alginat jel enzim kaçışını önleyecek fakat substratın enzime erişimini engellemeyecek gözenek yapısına sahiptir. Karagenan jelde immobilizasyon da; genellikle hücre immobilizasyonu için; ucuz, basit ve ılımlı koşullarda tekrarlanabilir olması nedeniyle yaygın olarak kullanılan metotlardan biridir. Yüksek enzim yoğunluğu, ılımlı immobilizasyon koşulları, destekten enzimlerin sızıntısının düşük riski tutuklama metotunun en önemli avantajlarından. Bu çalışmada; bu iki doğal polisakkaritin jel karışımları kullanılarak daha etkin immobilizasyon destekleri elde edilmeye çalışıldı.

Bu tez kapsamında protein tayinleri Bradford metodu ile yapıldı. Bradford yönteminde standart protein olarak % 0.001'lik sığır serum albümini kullanıldı, standart grafik çizildi (Şekil 4.1). Çalışmada lipaz çözeltilerinin ve immobilize enzimin damlatıldığı $CaCl_2$ çözeltilerinin ve yıkama sularının protein miktarları bu standart grafikten yararlanılarak belirlendi. Bulunan protein miktarlarından, tutunmayan protein ve tutunan protein miktarları hesaplanarak immobilizasyon yüzdesi tayin edildi.

İmmobilizasyon yüzdesi *Candida rugosa* lipazı için % 65 ve defne lipazı için %77 olarak belirlendi. *Candida rugosa* immobilize enzimin spesifik hidrolitik aktivitesi 54 U/mg protein, *Candida rugosa* serbest enzimin ise spesifik hidrolitik aktivitesi 33 U/mg proteindir. Defne lipazı immobilize enzimin spesifik aktivitesi 39 U/mg protein, defne lipazı serbest enzimin ise spesifik aktivitesi 12 U/mg olarak belirlendi.

Tutuklama materyali olarak kullanılan polimerin yani jelin konsantrasyonu ve tutuklama çözeltisinin konsantrasyonu enzimin tutuklamasında önemli parametrelerdir. Bu nedenle öncelikle *Candida rugosa* lipazının hidrolitik aktivitesi üzerine alginat ve karagenan konsantrasyonunun etkisi, CaCl₂ konsantrasyonu ayrıca enzim miktarı, boncuk boyutu ve boncuk miktarının etkileri de araştırıldı ve optimum değerleri belirlendi.

Sırasıyla; % 0.3, % 0.6 ve % 1 (w/v) olacak şekilde karagenan jellere immobilize enzimin spesifik hidrolitik aktivitesi tayinleri yapılarak, karagenan konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Her iki aktivite tayini sonucunda optimum karagenan konsantrasyonu 0.03 g karagenan alınarak hazırlanan % 0.6'lık karagenan konsantrasyonu olarak belirlendi (Şekil 4.4). Ca-alginat jel boncuklara tutuklu lipaz enzimi immobilizasyonu çalışmasında, artan karagenan konsantrasyonu immobilizasyon verimi bir miktar artmış, % 1 karagenan konsantrasyonu (w/v) ve daha yüksek konsantrasyonlarda boncuk yapımının zorlaştığı gözlemlendi, bu nedenle de düşük konsantrasyonda karagenan kullanılmasına karar verildi.

Sodyum alginat ile gerçekleştirilen tutuklamalarında jel indükleyici sistem olarak CaCl₂ katyonik çözeltisi kullanılmaktadır. Çalışmada literatürde belirtildiği gibi alginat+karagenan jeller için de CaCl₂ kullanılmaktadır (Şahin vd, 2005). Optimum kalsiyum klorür % 4 olarak belirlendi. CaCl₂ konsantrasyonu arttıkça immobilizasyon veriminin de arttığı gözlemlendi (Şekil 4.5).

Alginat+karagenan boncuklara yüklenen *Candida rugosa* lipazının miktarının katalitik aktivite üzerine etkisi dört farklı enzim konsantrasyonu çalışılarak incelenmiştir. Enzim miktarıyla orantılı olarak aktivitenin bir miktar azaldığı

gözlemlendi (Şekil 4.6). Ayrıca boncuklara yüklenecek enzim miktarının optimizasyon çalışmasında en düzgün boncuklar elde etmek adına 62,5 mg/mL enzim konsantrasyonu kullanıldığında elde edildiği için, aktivitenin de en yüksek oranda olarak belirlendiği bu konsantrasyon optimum enzim miktarı olarak belirlendi.

Vaidya ve arkadaşları (2008) yüklenen enzim miktarı arttıkça, lipaz aktivitesinin azaldığını gözlemlemişlerdir.

Candida rugosa lipazında boncuk boyutunun aktivite üzerine etkisi araştırıldığında; en yüksek lipaz aktivitesi siyah uçlu enjektör kullanılarak hazırlanan boncuklarda belirlenmişti (Şekil 4.7) Siyah uçlu enjektör kullanılarak elde edilen boncukların boncuk çapı kumpasla ölçüldüğünde 0.2 mm olarak belirlendi ve optimum boncuk çapı olarak belirlendi.

Ca-alginat jel boncuklara tutuklu lipaz enzimi immobilizasyonu çalışmasında, optik mikroskopla ölçülen optimum boncuk boyutunu 1,2-2,1 olarak bildirmişlerdir ve boncuk boyutu arttıkça spesifik aktivitenin azaldığı görmüşlerdir (Won vd., 2005).

Kullanılacak optimum boncuk miktarını belirlemek için gerçekleştirilen çalışmada 0.25, 0.5 ve 0.75 g var olmak üzere üç farklı boncuk miktarı ile çalışıldı; 0,25 gr boncuk miktarının en yüksek enzimatik aktiviteyi gösterdiği görüldü (Şekil 4.8).

Bu optimizasyon çalışmasının tüm sonuçları Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tezin ikinci kısmında; alginat + karagenan jellere tutuklanan *Candida rugosa* lipazı ve defne lipazına ait optimum pH ve sıcaklık, K_m ve V_{max} değerleri, termal ve operasyonel kararlılık, yeniden kullanılabilirlik, depo kararlılığı ve substrat spesifitesi gibi bazı biyokimyasal özellikleri araştırıldı ve bunlara ait veriler raporlandı.

Lipaz enziminin optimum pH değeri enzim kaynağına, substrata bağlı olarak geniş bir aralıkta değişir. Genellikle pH 6.0 ve 10.0 arasındadır. Immobilizasyon işlemi enzimin çalışma koşullarını daha ılımlı hale getiren bir metottur ve enzimin pH çalışma

aralığını değiştirebilir veya genişletebilir. Bu alışma kapsamında serbest ve immobilize lipazlar için optimum pH çalışması pH 6.0-10.0 aralığında yapıldı. Serbest *Candida rugosa* lipazının optimum pH değeri 6.0 ve alginat+karagenan jellerde immobilize *Candida rugosa* lipazının optimum pH değeri 6.5 olarak bulundu (şekil 4.9). Serbest defne lipazının optimum pH değeri 7.0 ve alginat+karagenan jellerde tutuklanan defne lipazının optimum pH değeri 8.0 olarak bulundu (şekil 4.10). Bu durum gerçekleştirilen immobilizasyon uygulamalarının her iki lipazın da optimum pH'ı üzerinde önemli bir etki yapmadığını gösterdi.

Polimakroporz polimer partiküller zerine *Candida rugosa* lipazı immobilizasyonu çalışmasında optimum pH'ı belirlemek için 4-12 pH aralığında çalışılmış pH 9 ve pH 10'da serbest enzim aktivitesinin sırasıyla % 47.96 ve % 13.28'ini koruduğu aynı pH'larda immobilize enzimin ise sırasıyla % 86.19'unu ve % 42.64'n koruduğunu gözlemlemişlerdir (Vaidya vd., 2008).

Hidroksil grupları aktivasyonuyla çitosan zerine *Candida rugosa* enzimi immobilizasyonu çalışmasında, optimum pH'ı belirlemek için pH 3 ile 11 arasında çalışmışlar ve serbest enzim için de, immobilize enzim için de optimum pH'ı 7 olarak belirlemişlerdir (Chiu ve Wu , 2004).

Ortam pH'ının, enzimlerin iyonlaşabilen grupları üzerinde önemli bir etkisi olduğu için enzim aktivitesindeki rolü büyüktür. Aktif merkezin konformasyonunu koruyup işlevini yerine getirebilmesi için bu grupların iyonik formda olması gerekir. pH substrattaki iyonlaşabilen grupları etkileyebilmektedir. Immobilizasyon çalışmalarında optimum pH'ın değişimi enzimin yüküne veya kullanılan matrikse de bağlıdır.

Alginat+karagenan jellere tutuklanmış *Candida rugosa* lipazı immobilizasyonu üzerine sıcaklığın etkisi belirlemek amacıyla; 30, 35, 40, 45, 50, C 'deki sıcaklıklarda çalışıldı. Serbest enzim ve tutuklanmış enzimin optimum sıcaklığı 40 C olarak belirlendi (şekil 4.11). Alginat+karagenan jellere tutuklanmış defne lipazı immobilizasyonu üzerine sıcaklığın etkisi belirlemek amacıyla ise; 30, 40, 50, 60 C

'deki sıcaklıklarda çalışıldı. Serbest enzimin optimum sıcaklığı 40 °C ve tutuklanmış enzimin optimum sıcaklığı 50 °C olarak belirlendi (Şekil 4.12).

Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazı termal kararlılık çalışması 30, 40, 50°C sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.13 ve 4.14). Hidrolitik lipaz aktivitesi sonuçları incelendiğinde serbest enzimin 1,5 saatin sonunda 50 °C' de % 51 kadarını korurken. alginat+karagenan jellere immobilize edilmiş *Candida rugosa* lipazının 50 °C' de % 65 kadarını koruduğu gözlemlendi. Serbest ve immobilize defne lipazı termal kararlılık çalışması 40, 50, 60, 70 °C sıcaklıklarda gerçekleştirildi (Şekil 4.15 ve 4.16). Hidrolitik lipaz aktivitesi sonuçları incelendiğinde serbest enzimin 1,5 saatin sonunda immobilize enzimin 50 °C aktivitesini tamamen, 60 °C' de % 75 korurken, serbest defne lipazının aktivitesi incelendiğinde ise 40 °C' de aktivitesini tamamen, 60 °C' de %67 kadarını koruduğu gözlemlendi.

Vaidya ve arkadaşları (2008), *Candida rugosa* lipazının termal kararlılık çalışmasında 20 ile 70°C arasında çalışmışlar; 50°C'de serbest enzimin aktivitesinin % 62.11'ini koruduğunu immobilize enzimin ise % 94.76'sını koruyabildiğini, saptamışlardır.

Chiou ve Wu (2004), hidroksil grupları aktive edilmiş çitosan üzerine *Candida rugosa* enzimi immobilizasyonu yaptıkları çalışmalarında termal kararlılık için 25°C'den 60°C'ye değişen sıcaklıklarda 1 saat boyunca çalışmışlardır. 60°C'de ise immobilize enzimin aktivitesinin % 60'ını, serbest enzimin ise sadece % 20'sini koruyabildiğini belirlemişlerdir.

Serbest enzimin ilgili aktivitelerde optimum ve/veya optimuma en yakın olan sıcaklık değerinde termal stabilitesinin de daha kararlılığı olduğu görülmektedir. Genel olarak optimum sıcaklık aralıklarının dışında serbest enzim üç boyutlu yapısının denatüre olması nedeniyle aktivitesini kaybedebileceği düşünülür. Immobilizasyon ise enzim uygulamalarında onlara termal stabilite kazandıran bir uygulamadır. Bu çalışmada da immobilize formlar incelendiğinde, genel olarak aktivitelerini korudukları hatta nispeten arttığı dahi gözlemlenmiştir.

Termal stabilite immobilize enzim uygulamalarında en karakteristik bilgilerinden biridir. Genelde immobilize enzimin aktivitesi, özellikle kovalent bağlı bir sistem ise, sıcaklığa ve denatürasyon ajanlarına karşı serbest enzimden daha dirençlidir.

V_{max} reaksiyon hızı ve K_m Michaelis-Menten sabiti Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak bulundu. K_m enzimin substrata olan ilgisiyle ters orantılı bir parametredir (Yıldız vd., 2006). K_m kinetik sabiti enzim ile substrat arasındaki ES kompleksinin sağlamlık ölçüsüdür. Bu değer küçüldükçe enzim ve substrat o kadar zor dissosiyeye olur. V_{max} sabiti ise enzimin aktifliğinin bir ölçüsüdür. Enzim ne kadar aktif ise V_{max} o derece yüksektir. Serbest enzim ve alginat+karagenan boncuklarda tutuklanan *Candida rugosa* enziminin hidrolitik aktivitesine ait K_m ve V_{max} kinetik sabitleri sırasıyla 0.111 g, 71.43 U/mL dak ve 0.222 g ile 19.6 U/g boncuk dak olarak hesaplandı. Serbest enzim ve alginat+karagenan boncuklarda tutuklana defne lipazının hidrolitik aktivitesine ait K_m ve V_{max} kinetik sabitleri sırasıyla 0.203 g, 16.1 U/mL dak ve 0.147 g ile 22.72 U/g boncuk dak olarak hesaplandı. Tüm sonuçlar Tablo 4.4 ve 4.5' de verildi.

Chiou ve Wu (2004), hidroksil grupları aktivasyonu ile çitosan üzerine *Candida rugosa* enzimi immobilizasyonu yaptıkları çalışmalarında reaksiyon hızı ve Michaelis-Menten sabiti değerlerini serbest enzim ve immobilize enzim için sırasıyla V_{max} 3.98-117.23 U/mg protein, K_m 0.013-1.669 g olarak hesaplanmıştır.

Biyokatalizör serbest enzim formunda kullanıldığında biyokatalizörün yeniden kullanılabilirliğinden söz edilemez. Bu nedenle endüstriyel açıdan önemli enzimler için immobilizasyon formları tasarlanmakta ve bu formlar ile üretim çalışmaları planlanmaktadır. Alginat+karagenan boncuklara immobilize *Candida rugosa* lipazında ilk 2 döngü süresince boncukların aktivitesini tamamen koruduğu, sonraki döngülerde yaklaşık % 60 kadar aktif olduğu, alginat+karagenan boncuklara immobilize defne lipazında da aktivitenin ilk iki döngü süresince tamamen koruduğu ve sonraki döngülerde % 36'ı kadarının korunabildiği belirlendi.(Şekil 4.19 ve 4.20)

Chiou ve Wu (2004), hidroksil grupları aktivasyonu ile çitosan üzerine *Candida rugosa* enzimi immobilizasyonu yaptıkları çalışmalarında, 6. kullanım sonunda immobilize enzimin aktivitesinin tamamını koruduğu gözlenmiştir. Won ve arkadaşları (2005), Ca-alginat jel boncuklara tutukladıkları lipaz enzimi immobilizasyonu çalışmalarında, alginat boncukların 3. kullanımında aktivitesinin % 72'sini koruduğunu gözlemlemişlerdir.

Serbest enzim çözeltisi depolama sırasında genelde kararlı değildir ve aktivitesi yüksek oranda azalır. Immobilizasyon, tutuklanan enzimi (aktivite kaybında kabul edilebilir bir fark olmadan) serbest enzime oranla daha uzun bir süre depolanmasına imkan kılar. Periyodik aralıklarla yapılan ölçümler sonucunda alginat+karagenan jelde tutuklanan immobilize *Candida rugosa* lipazı ve defne lipazının 20 gün boyunca aktivitesini de kaybetmeden uzun süre kullanılabilirliği gözlemlendi (Şekil 4.21 ve 4.22). 4 °C 'de depolanan serbest enzim çözeltileri için de 20 gün boyunca aktivite ölçümleri yapıldı, onun da aktivitesini koruduğu gözlemlendi. Bu sürelerin sonunda her iki aktivite için ölçüm alınmaya devam edilmiştir ama aktivitenin çok hızlı olarak düştüğü gözlemlendi. Enzim çözeltisinde mikrobiyal üreme olabileceği sonucuna varıldı.

Vaidya ve arkadaşları (2008), poli makroporöz polimer partiküllerde *Candida rugosa* lipazı immobilizasyonu çalışmalarında, immobilize enzimin 10. günün sonunda depo kararlılığı aktivitesinin % 94.25'ini koruduğu fakat serbest enzimin aynı günün sonunda ancak % 14.24'ünü koruyabildiği gözlemlenmiştir. Janta ve arkadaşları (1997), *Chromobacterium viscosum* bakterisi lipazını mikroemülsiyon bazlı organo jel olan jelatin içeren Aeresol-OT'ye immobilize ederek yaptıkları depo kararlılığı çalışmasında, immobilize enzimin 30 günün sonunda aktivitesinin % 85'ini koruduğunu gözlemlemişlerdir. Chiou ve Wu (2004), hidroksil grupları aktivasyonu ile çitosan üzerine *Candida rugosa* lipazı immobilizasyonu çalışmalarında, immobilize enzimin 30. günün sonunda depo kararlılığı aktivitesinin kaybolmadığını, serbest enzimin ise 5. günün sonunda aktivitesinin % 70'ini kaybettiğini belirlemişlerdir.

Substrat spesifitesi çalışmasında; soya, aspir, ayçiçek, mısır, kanola, fındık, zeytin, tribütirin, trikapriline, gliseriltristearat yağları kullanılarak aktivite tayinleri gerçekleştirildi, kullanılan tüm substratlar için değişen aktivite sonuçları alındı. Sonuçlar Tablo 4.6 ve 4.7’de verildi.

Sonuç olarak; bu tez kapsamında; ticari *Candida rugosa* lipazı ve defne lipazının tutuklama yöntemiyle alginat+karagenan jellere başarıyla immobilize edildi, optimum çalışma koşulları belirlendi.

6. KAYNAKLAR

1. Abbas, H., Hiol, A., Deyris, V., Comeau, L., (2002) "Isolation and Characterization of an Extracellular Lipase from *Mucor* sp Strain from Palm Fruit" *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 968-975. Al-Taweel, R., Sungur, S. (1995), "Lipaz Enzimleri ile Yağların Modifikasyon Biyoteknolojisi", *Gıda*, 20(5), 299-304.
2. Akoh, C.C., Min, D.B., (1998). "Microbial Lipases ve Enzymatic Interesterification." *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology Marcel Deccer, Inc, New York*, 641-698.
3. Alberghina L., Lotti M., (1998). "Lipases and lipits: structure, specificity and applications in biocatalysis", *Chem. Phys. Lipits*. 93.
4. Balcao V.M., Paiva A.L., Malcata F.X., (1996). "Bioreactors with immobilized lipases: state of the art" *Enzyme Microb. Tech- nol.* 18, 392.
5. Bickerstaff, G.F., 1997 "Immobilization of enzymes and cells", *Methods in enzymology*, Humana Press, New Jersey, 1-11.
6. Bradford, M.M., (1976) "A rapid and Sensitive nethod for the quantiti;tion of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" *Anal. Bichem.*, 72, 248-252
7. Chiou S.-H., Wu W.-T., (2004). "Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups" *Biomaterials*, 25, 197-204.
8. Dessai, P. D., Dave, A. M, Devi, S., (2004), "Entrapment of lipase into κ-carrageenan beads and its use in hydrolysis of olive oil in biphasic system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* V 31, 143-150.
9. Eren Kıran, Ö., Çömlekçiöğlü, U., Dostbil, N. (2006) "Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım alanları" *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9 (1), 12-19
10. Fraser, J.E., Bickerstaff, G.F., (1997) "Entrapment in Calcium Alginate", *Methods in enzymology*, Humana Press, *New Jersey*, 61-65.

11. Gilabert, M. P., & Carmona, F. G. (2000). Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 48, 695-700.
12. Hoppe A., Theimer R. R., (1996). "Titrimetric test for lipase activity using stabilized triolein emulsions". *Phytochemistry*, 42, 973-978.
13. Hoppe A., Theimer R.R., (1996). "Titrimetric test for lipase activity using stabilized triolein emulsions". *Phytochemistry*, 42, 973-978
14. <http://strubi.uni-graz.at>
15. <http://www.aapspharmscitech.org>
16. <http://www.chem.qmul.ac.uk>
17. Iborra, J.L., Manjon, A., Canovas, M., 1997 "Immobilization in Carrageenans", *Methods in enzymology*, Humana Press, New Jersey, 53-60.
18. Janta T.R.J., Batts G., Rees G.D., Robinson B.H., (1997). "Biocatalysis using gelatin microemulsion-based organogels containing immobilized *Chromobacterium iscosum* lipase". *Biotechnol. Bioeng.* 53,121.
19. Klibanov A.M., (1989). "Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents". *TIBS* 14,141.
20. Mhammeralla, E.J., Rubiolo, A.M., (2005), "Study of the deactivation of β -galactosidase entrapped in alginate-carrageenan gels", *Journal of Molecular Catalysis: Enzymatic*, 34, 7-13.
21. Munjal, N., Sawhney, S.K., 2002, Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamid, and gelatin gels, *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 613-619.
22. Öztürk B., (2006). "Lipaz enzimi: yapısal özellikleri ve uygulama alanları". *Gıda mühendisliği dergisi*, 20-23
23. Paiva, A.L., Balcao, V.M., Malcata F.X., (2000). "Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases". *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 187.

24. Petersen M.T.N., Fojan P., Petersen S.B., (2001). "How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution". *Journal of biotechnology*, 85(2), 119.
25. Pialis, P., Jimenez Hamann, M.C., Saville, B.A., 1996, L-DOPA production from Tyrosinase immobilized on Nylon 6,6, *Biotechnology and Bioengineering*, 51, 141-147.
26. Sarkar, J. M., Leonowicz, A., Bollog, J. M., (1989), "Immobilization of enzymes on clays and soils", *Soil Biol. Biochem.*, **21 (2)**, 223-230.
27. Scardi (V., 1987), "Immobilization of Enzymes and Microbial Cells in Gelatin, *Methods in Enzymology*", 135, 293-294.
28. Schmidt R.D., Verger R., (1998). "Lipases: interfacial enzymes with attractive applications", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 37, 1608.
29. Şahin, F., Demiral, G., Tümtürk, H., 2005, A novel matrix for the immobilization of acetylcholinesterase, *International Journal of Biological Macromolecules*, 37, 148-153.
30. Telefoncu, A., 1997, "İmmobilize enzimler" *Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu Kuşadası-AYDIN*,193-247.
31. Vaidya B.K., Ingavle G.C., Ponrathnam S., Kulkarni B.D., Nene S. N., (2008). "İmmobilization of *Candida rugosa* lipase on poly macroporous polymer particles". *Bioresource Technology*. 99, 3623-3629.
32. Vardar-Sukan F. (1986). "Dynamics of oxygen mass transfer in bioreactors part II: design Variables". *Process Biochem* 21, 40-44.
33. Won K., Kim S., Kim K.-J., Park h. W., Moon S.-J., (2005). "Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads". *Process Biochemistry*. 40, 2149-2154.

7. TEŞEKKÜR

Lisans eğitimi dönemimde tanıdığım saygı duyduğum, yüksek lisans tezimde ise azmine, hırsına, öğretmenliğine, yardımseverliğine hayran kaldığım ve imrendiğim danışman hocam Hülya YAĞAR'a,

Benden bir hoca olarak destek ve yardımlarını hiç esirgemeyen Şebnem Selen İşbilir'e,

Her an her dakika bir adım daha ileri gitmem için yanımda olan eşim Onur'a,

Laboratuvarda geçirdiğim zamanlarda birbirimize destek olduğumuz Esra Akyüz Daloğlu ve yardımlarını esirgemeyen eşi Tuncer Daloğlu'na,

Maddi manevi yanımda olan ve benim yüksek lisans yapmamı canı gönülden isteyen Aileme,

Tezdeki koşuşturmalarımdaya yanımda olan kardeşim Funda Kırıcı'ya

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

8. ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Kocaeli’nde doğdum. İlköğrenimimi Kocaeli, orta öğrenimimi Kırklareli’nde tamamladım. 2003 yılında Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümün’de lisans eğitimime başladım. 2007 yılında mezun oldum. Aynı yıl MEB’e Lüleburgaz Uğur Dershanesi’nde öğretmenliğe başladım ve iki buçuk sene orda görev yaptım. 2008 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilimdalı Biyokimya alanında yüksek lisans eğitimime başladım. Birbuçuk seneden beri Kırklareli Final Dershanesi’nde çalışmaya devam etmekteyim.

Sinem Tuna....