TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALGİNAT+JELATİN JEL KARIŞIMLARINDA LİPAZ İMMOBİLİZASYONU ve İMMOBİLİZE ENZİMİN BAZI BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Nazife ULUĞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Hülya YAĞAR

EDİRNE-2011

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALGİNAT+JELATİN JEL KARIŞIMLARINDA LİPAZ İMMOBİLİZASYONU ve İMMOBİLİZE ENZİMİN BAZI BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Nazife ULUĞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez 04 / 03 / 2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN **Yrd. Doç. Dr. Filiz SANAL**

Doç. Dr. Hülya YAĞAR
Danışman

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……..... 7

2.2.2. Lipazın Üç Boyutlu Yapısı…… 9

2.2.3. Ara Yüzey Aktivasyonu…… 11

2.3. Lipaz İmmobilizasyonu…….... **12**

2.3.1. Taşıyıcı Bir Materyal Üzerine Fiziksel Adsorpsiyon……... 13

2.3.2. Mikroenkapsülasyon ve Tutuklama…….. 16

2.3.2.1. Kalsiyum Alginat Jelde Tutuklama**…….....** 19

2.3.2.2. Jelatin Jelde Tutuklama…….. 20

2.3.3. Kovalent Bağlama ile İmmobilizasyon…… 21

***3.MATERYAL VE METOD*……...** **23**

3.1.Materyal…… **23**

3.1.1. Kimyasal Maddeler…… 23

3.1.2. Kullanılan Cihazlar…… 24

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler…….. 24

3.2. Metod ……... 26
3.2.1. Bradford Yöntemi ile Kantitatif Protein Tayini…….. 26
3.2.2. Alginat+Jelatin Jelde Tutuklama…….. 27
3.2.3. Titrimetik Yöntemle Lipaz Enzimi Aktivite Tayini…… 27
3.2.4. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu……..... 28
3.2.4.1. Jelatin Konsantrasyonu Optimizasyonu…….…… 28
3.2.4.2. Alginat Konsantrasyonu Optimizasyonu…… 28
3.2.4.3. Kalsiyum Klorür Konsantrasyonu Optimizasyonu……..... 29
3.2.4.4. Enzim Miktarı Optimizasyonu……... 29
3.2.4.5. Boncuk Boyutu Optimizasyonu……. 30
3.2.4.6. Boncuk Miktarı Optimizasyonu…….…… 30
3.2.5. *Candida rugosa* Lipazının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi…..…… 30
3.2.5.1. Serbest ve İmmobilize Lipazının Optimum pH'ının Belirlenmesi…...…… 31
3.2.5.2 Serbest ve İmmobilize Lipazının Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi...….. 31
3.2.5.3. Serbest ve İmmobilize Lipazının Termal Kararlılığının Belirlenmesi 31
3.2.5.4. Serbest ve İmmobilize Lipazının K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi…. 31
3.2.5.5.Serbest ve İmmobilize Lipazının İmmobilize Enzimin tekrar Kullanılabilirliği 32
3.2.5.6. İmmobilize Lipazının Depo Kararlılığı.…… 32
3.2.5.7. Farklı Yağ Türleri İle Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi…… 32

4. DENEYLER VE BULGULAR……..…….. 33
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri…… 33
4.2. *Candida rugosa* Lipazının Alginat Jelatin Jellerde Tutuklanması……. 34
4.3.*Candida rugosa* lipazının Alginat+Jelatin Jel Karışımlarında İmmobilizasyonun Optimizasyonu…… 34
4.3.1. Jelatin Konsantrasyonunun Optimizasyonu……... 34
4.3.2. Alginat Konsantrasyonunun Optimizasyonu……. 35
4.3.3. Kalsiyum Klorür Konsantrasyonu Optimizasyonu…… 36
4.3.4. Enzim Miktarı Optimizasyonu……...… 37
4.3.5. Boncuk Boyutu Optimizasyonu…….. 38
4.3.6. Boncuk Miktarı Optimizasyonu ……..... 39

4.4. Alginat ve Jelatin Jel Karışımlarında İmmobilize *Candida rugosa* lipazının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi……..…….. **41**

4.4.1. Optimum pH…….. 41

4.4.2. Optimum Sıcaklık Tayini……... 42

4.4.3. Termal Kararlılık Çalışması……... 42

4.4.4. *Candida rugosa* Lipazının K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi…….. 43

4.4.5. İmmobilize Enzimlerin Tekrar Kullanılabilirliği…… 44

4.4.6. İmmobilize Enzimin Depo Kararlılığı……..... 45

4.4.7. Substrat Spesifitesi..... . 46

***5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA*……...** 48

***6. KAYNAKLAR*……** 55

***7.TEŞEKKÜR*……** 62

***8. ÖZGEÇMİŞ*……..** 63

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa No
Şekil 2.1	Sulu ve susuz çözeltilerde lipazın katalizlediği farklı tepkimeler	6
Şekil 4.1	Bradford yöntemi ile oluşturulan protein standart grafiği	32
Şekil 4.2	*Candida rugosa* lipazının alginat+jelatin jel karışımlarında tutuklanması ile elde edilen boncuklar	33
Şekil 4.3.	*Candida rugosa* lipazının alginat+jelatin jel karışımlarına immobilizasyonuna jelatin konsantrasyonun etkisi	34
Şekil 4.4	*Candida rugosa* lipazının alginat+jelatin jel karışımlarına immobilizasyonuna alginat konsantrasyonun etkisi	35
Şekil 4.5	*Candida rugosa* lipazının alginat+jelatin jel karışımlarına immobilizasyonuna $CaCl_2$ konsantrasyonun etkisi	36
Şekil 4.6	*Candida rugosa* lipazının alginat+jelatin jel karışımlarına immobilizasyonuna enzim konsantrasyonun etkisi	37
Şekil 4.7	*Candida rugosa* lipazının alginat+jelatin jel karışımlarına immobilizasyonuna boncuk boyutunun etkisi.	38
Şekil 4.8	Alginat+jelatin jel karışımlarına immobilize *Candida rugosa* lipazının aktivitesine boncuk miktarının etkisi.	39
Şekil 4.9	Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının pH'a bağlı aktivitelerinin değişimi	40
Şekil 4.10	Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının sıcaklığa bağlı aktivitelerinin değişimi	41
Şekil 4.11	Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının termal kararlılık grafiği	42
Şekil 4.12	Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının Linewear-Burk grafiği	43
Şekil 4.13	İmmobilize *Candida rugosa* lipazının kesikli prosesle yeniden kullanılabilirliği	44
Şekil 4.14	Serbest ve alginat+jelatin boncuklara immobilize *Candida rugosa* lipazının depo kararlılığı grafiği	45

TABLOLAR DİZİNİ

		Sayfa No
Tablo 2.1.	Mikrobiyal lipazların sanayide önemli kullanım alanları	9
Tablo 4.1.	*Candida rugosa* lipazının Alginat ve Jelatin jel karışımlarında tutuklanmasının optimizasyon sonuçları	39
Tablo 4.2.	Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının kinetik değerleri	43
Tablo 4.3.	Serbest ve immobilize enzimlerin farklı substratlara karşı verdikleri farklı spesifik aktivite değerleri	46

ÖZET

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

Ticari bir mikrobiyal lipaz olan *Candida rugosa* lipazı alginat+jelatin jellerde tutuklandı. Damlatma çözeltisi olarak $CaCl_2$ kullanıldı. Protein tayinleri Bradford yöntemi uygulanarak gerçekleştirildi. İmmobilizasyon yüzdesi % 60, Serbest enzimin spesifik hidrolitik aktivitesi 22 U/ml protein, immobilize enzimin spesifik hidrolitik aktivitesi ise 36 U/mg protein olarak belirlendi. Hidrolitik enzim aktivitesi titrimetrik yöntemle, substrat olarak zeytinyağı kullanılarak belirlendi. Alginat+jelatin boncuklarda *Candida rugosa* lipazının immobilizasyon koşullarının optimizasyonunda; optimum alginat konsantrasyonu % 2, optimum jelatin konsantrasyonu % 15, $CaCl_2$ konsantrasyonu % 7.7, optimum yüklenen enzim konsantrasyonu 20 mg/mL, optimum boncuk boyutu 2.9 mm ve optimum boncuk miktarı 1 gr olarak belirlendi.

Alginat+jelatin jellerde tutuklanan *Candida rugosa* lipazı ve serbest lipaz için optimum pH 9.0 olarak belirlendi. Optimum sıcaklık serbest enzim için 45°C, immobilize enzim için 50 °C olarak belirlendi. İmmobilize *Candida rugosa* lipazının termal kararlığını tutuklama sonrasında da nispeten koruduğu gözlendi. Serbest lipazın ve alginat+jelatin jel boncuklarda tutuklanan lipazın K_m ve V_{max} kinetik sabitleri sırasıyla, 0.29 g ile 30.3 U/mLdak, 2.5 g ile 83.33U/g boncuk dak olarak bulundu. Yeniden kullanılabilirlik çalışmasında; boncukların 5. döngüde aktivitesinin yaklaşık yarısını koruduğu gözlendi. Substrat spesifitesi için gliseriltributirat, trikaprilin, gliseriltristerat, aspir yağı, soya yağı, defne yağı, rafine fındık yağı ham kanola yağı, ham ayçiçeği yağı, ham zeytinyağı ve ham mısır yağı substrat olarak denendi. Depolama kararlılığı çalışmasında serbest ve immobilize enzimin her ikisinin de aktivitesini 18 gün boyunca koruduğu gözlendi.

Anahtar Kelimeler: Lipaz, immobilizasyon, alginate, jelatin, *Candida rugosa*

SUMMARY

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

Candida rugosa lipase which is the commercial microbial lipase was entrapped in alginate+gelatine gels. $CaCl_2$ was used as dropping solution. Protein determinations were done by using Bradford method. The immobilization percentage was determined to be 60 %. The specific hydrolytic activity of immobilized enzyme was found to be 36 U/g bead min. By using olive oil as swostrate the optimization of immobilization conditions of *Candida rugosa* lipase was done, and optimum alginate and gelatine concentrations were found to be 2 % and 15 % (w/v), respectively. Optimum $CaCl_2$ concentration is % 7.7. Optimum bead diameter is 2.9 mm. Optimum bead' amount was determined to be 1 g. The loading enzyme concentration was determined to be 20 mg/mL.

The optimum pHs of both free and lipase entrapped in alginate+gelatine gels were determined to be 9.0. Optimum temperatures of free and immobilized lipase in alginate+gelatine gels were found to be 45 °C and 50 °C, respectively. It was observed that immobilized lipase preserved relatively its thermal stability. K_m and V_{max} values were determined to be 0.29 g and 30.3 U/mL min for free enzyme, respectively. These values were 2.5 g and 83,33 U/g beads min for immobilized enzyme in alginate+gelatine beads, respectively. In the reusing study, beads saved about one-half of their activities during 5 cycles. Substrate specifities of both enzymes were carried out by using glyceryl tributyrate, tricaprylin, glyceryl tristearate, safflower oil, soybean oil, laurel oil, refined hazelnut oil, crude canola oil, crude sunflower oil, crude olive oil, crude corn oil, as substrates. It was observed that storage stability study, both enzymes saved their activities during 18 days.

Key words: Lipase, immobilization, alginate, gelatine, *Candida rugosa*

1. GİRİŞ

Enzimler başta gıda, eczacılık, deterjan, tekstil ve kozmetik olmak üzere pek çok sanayi alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu enzimlerin en az % 75'lik kısmını hidrolazlar oluşturmaktadır ve bunların % 90'ı mikroorganizmalardan fermantasyon yolu ile üretilmektedir. Mikrobiyal kaynaklı lipazlar da biyokatalitik potansiyellerinin anlaşılması ile birlikte sanayide yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Jaeger vd., 1997)

Lipazlar (triaçilgliserol 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 serin hidrolazları sınıfı içinde yer alır ve bu nedenle hiçbir kofaktöre ihtiyaç duymazlar**.** Geniş substrat spektrumları, yüksek sıcaklık, pH ve organik çözücülere karşı kararlılık gösterebilme yetenekleri gibi nedenlerle lipazlar günümüzde en önemli biyokatalizörler arasında yer almaktadır. Lipazlar; hem sulu hem de susuz ortamda gerçekleştirilmesi güç reaksiyonların başarılmasını sağlayabilen biyokatalizörlerdir.

Lipazlar, bitkisel hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan izole edilebilirler. Bu kaynaklar arasında en geniş uygulama alanı bulan lipazlar doğal veya genetik olarak iyileştirilmiş mikrobiyal lipazlardır. Bunun sebebi; mikroorganizmaların kolay yetiştirilebilmeleri, üretim ve genetiklerine kolaylıkla müdahale edilebilmeleridir. Mikrobiyal lipazlar; hidrolitik ve esterleşme, transesterleşme, interesterleşme gibi sentetik birçok reaksiyonu katalizleyebilmeleridir.

Lipaz 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 ve de ürün ve substratlara karşı aktiviteleri çok yüksektir ve bu aktivite özelliklede substrat (yağ)-su ara yüzeyinde en yüksek seviyeye çıkmaktadır.

Lipazların doğal substratları olan triaçilgliseroller, suda çok düşük çözünürlüğe sahiptir. Doğal şartlar altında lipazlar, çözünmeyen bir substratlı faz ile enzimin çözündüğü sıvı faz arasındaki arabirimde bulunan ester bağlarının hidrolizini katalizler. Bazı deneysel şartlar altında, örneğin su yokluğunda, reaksiyonu tersine çevirebilmektedirler. Ters çevirme reaksiyonları, esterifikasyon ve yağ asitleri ile gliserolden trigliseridlerin oluşmasına yol açar.

Lipazlar, potansiyel biyokatalizör olarak kullanıldıkları daha birçok yeni alanda başarıyla görev almaktadırlar. Lipazların doğal enantiyoseçicilik ve regioseçiciliklerinden; çiral ilaçların ayrıştırılması, yağ modifikasyonu, bitkisel yağ yerine kullanılan maddelerin sentezi, biyolojik yakıtların sentezi, kişisel bakım ürünlerinin sentezi ve aroma arttırıcıların sentezi gibi çok çeşitli alanlarda yararlanılmaktadır. Bu nedenle lipazlar, günümüzde, organik kimyacıların, eczacıların, biyokimya ve proses mühendislerinin, biyoteknologların, mikrobiyolog ve biyokimyacıların üzerinde yoğun çalıştıkları enzimlerdendir.

Lipazın katalitik aktivitesi gıda ve endüstriyel kullanımlar için, çok miktardaki katı yağı 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).

Lipaz araştırmalarına artan ilgi üç temel sebebe dayanır. İlki enzimin moleküler yapısı ve katalitik işlevi ile ilgilidir. İkinci neden enzimin medikal alakasıdır özellikle ateroskleroz ve hiper lipidemi ile olan bağlantısıdır (Farooqui vd., 1987). Ayrıca metabolizmada lipoliz ürünleri olan yağ asitlerinin, diaçilgliserollerin düzenlenmesinde çok kritik bir role sahiptir. Özellikle hücre aktivasyonu ve sinyal iletiminde modülatörler olarak çalışırlar (Shinomura vd., 1991). Son olarak lipazların sadece hidroliz değil, aynı zamanda esterifikasyon, transesterifikasyon ve aminoliz gibi çeşitli tersinir reaksiyonları organik çözücülerde katalizleyebilen çok güçlü bir araç olduğunun keşfedilmesidir.

Ancak büyük ölçekli endüstriyel lipaz teknolojileri üzerine daha hızlı bir genişlemeyi engelleyen temel sebep, bu enzimlerde bazen karşılaşılan, düşük aktivite, düşük kararlılık ya da seçicilik ve doğal enzimin maliyetleri olmuştur. Dolayısıyla bu dezavantajdan kurtulmak için, lipazların çesitli desteklere fiziksel ve kimyasal immobilizasyonları gerçekleştirilmiştir (Villeneuve vd., 2000).

Bu çalışmada ticari olarak satılan *Candida rugosa* lipazının daha önceden alginat ve jelatin jel karışımlarında immobilizasyonu gerçekleştirilmiş, bu immobilize formların hidroliz ve esterleşme reaksiyonlarındaki aktiviteleri denenerek elde edilen başarılı immobilize formların bazı biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir.

Bu amaçla; *Candida rugosa* lipazı'nın alginat+jelatin jel karışımlarında immobilizayonu ile elde edilen immobilize boncuklar için optimum alginat konsantrasyonu, jelatin konsantrasyonu, $CaCl_2$ yüzdesi, enzim miktarı, boncuk boyutu, boncuk miktarı gibi koşullar optimize edilerek immobilize *Candida rugosa* lipazı'nın optimum pH, optimum sıcaklık, termal kararlılık, kinetik, tekrar kullanılabilirlik, depo kararlılığı, substrat spesifitesi gibi bazı biyokimyasal özellikleri araştırılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Enzimler

Enzimler canlı organizmalarda meydana gelen tüm reaksiyonların, ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bu reaksiyonları koordine eden protein yapıdaki spesifik biyolojik katalizörlerdir. Bir biyolojik sisteme ait genetik bilgi, protein zincirinde yer alacak aminoasitlerin diziliş sırasını belirleyen formdadır. Bu genetik bilgi tarafından kodlanan proteinlerin çoğu biyokimyasal reaksiyonları katalizleyebilme yeteneğine sahiptirler (Telefoncu, 1997). Enzimler düşük aktivasyon enerjisi gerektirdiklerinden canlı metabolizmalarda yer alan pek çok reaksiyon vücut sıcaklık ve basıncında yürütülebilmektedir. Her biyokimyasal tepkime genel olarak farklı bir enzim tarafından katalizlenir. Enzimler katalizledikleri reaksiyonlarda 'substrat' ile sıkı bir ilişkide olmasına karşın, tepkime sonunda değişmeksizin kalırlar (Çelebi, 1980).

Hemen hemen tüm 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 güvenirliklerinin 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 çoğu ancak belli özelliklere sahip bileşiklere karşı etkinlik gösterirler. Aynı bileşiğin çok ufak bir yapısal değişikliğe uğraması bile bu etkinliği yok edebilir. Bir enzimin ancak belli bir özellikteki substratı etkilemesine 'enzimin

seçiciliği' denir. Bu özellik enzimleri daha az seçici olan kimyasal katalizleyicilerden kesinlikle ayırır. Enzimler belirli tepkene, bağa veya gruba karşı seçicilik gösterebilirler.

2.2. Lipaz Enzimi

Lipazlar (triaçilgliserol açilhidrolaz; EC. 3.1.1.3) hayvansal ve bitkisel yağları normal koşullar altında 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 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. Bunun sebebi; mikroorganizmaların kolay yetiştirilebilmeleri, üretim ve genetiklerine kolaylıkla müdahale edilebilmeleridir. Bu enzim lipidlerin biyolojik dönüşümünde anahtar role sahiptir. Lipazlar lipidlerin biyolojik membranda bulunmalarından dolayı hücre içi metabolizmada da görev alırlar (Schmidt ve Verger, 1998).

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 yağın yapısından ayrılır ve serbest hale geçerler (Öztürk, 2006).

Lipit karakterli substrat suda çözünmemesine rağmen lipaz suda çözünür. Kataliz reaksiyonu lipid-su ara yüzeyinde gerçekleşir. Bu yetenek lipazın eşsiz yapısal karakterinden kaynaklanır. Lipazların aktif merkezinin giriş kapağında içerdiği sarmal oligopeptid birim onların lipid-su arayüzeyinde etkili olmasını sağlar. Sözü edilen kapak

sadece lipid damlacıklarının hidrofobik aktif merkeze erişimini sağlar (Albergina ve Lotti, 1998).

Enzimleri kimyasal reaksiyonlardan ayıran en önemli özellikleri seçicilikleridir. Lipazın seçicilik özelliği ise 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).

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. Ayrıca lipazlar organik çözücülerde bile katalitik aktivitelerini korumaktadırlar (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. Bol miktarda ve genetik özellikleri gelişmiş lipazların üretimi rekombinant DNA teknolojisi ve protein mühendisliği gibi biyolojik araçların

kullanılmasıyla sağlanabilir, buna ek olarak enzim maliyeti de azaltılabilir. Kimyasal metod, özellikle lipaz ve modifiye edici arasındaki kovalent bağların oluşumuyla, fiziksel metod ise enzim ile destek materyali arasındaki zayıf etkileşimlerin oluşumu ya da lipazın destek içinde mekanik olarak tutuklanması olarak ifade edilebilir. Ayrıca genetik mühendisliğinin lipaz enzimini kodlayan gen üzerinde modifikasyon çalışmaları da mevcuttur.

Bir immobilizasyon stratejisi, seçilen modifikasyon prosedürüne dayanır. Bir biyokataliz prosesinin özelliği, toplam enzimatik aktivite, kullanılan lipaz miktarının etkisi, deaktivasyon, karakteristik dönüşümler, immobilizasyon prosedürünün maliyeti, immobilizasyon reaktiflerinin toksikliği, immobilize lipaza ait istenen nihai özelliklere ulaşılması gibi parametreler çok önemlidir (Villeneuve vd. 2000).

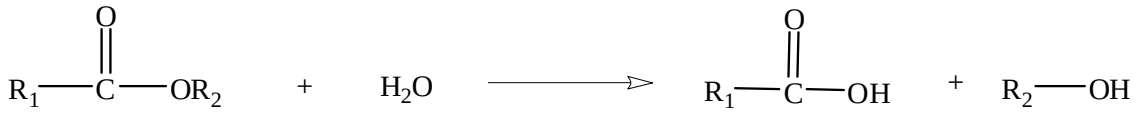
2.2.1. Lipaz Reaksiyonları

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

Diğer hidrofobik enzimlerde olmamasına rağmen farklı kaynaklardan elde edilen lipazlar polar olmayan organik çözücüler içinde 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. Kiral spesifitesi ile susuz organik çözücüler (Klibanov, 1989), iki fazlı sistemler (Brink vd., 1988) ve misel çözeltilerde (Nagao ve Kito, 1990) kataliz yeteneğine sahiptirler.

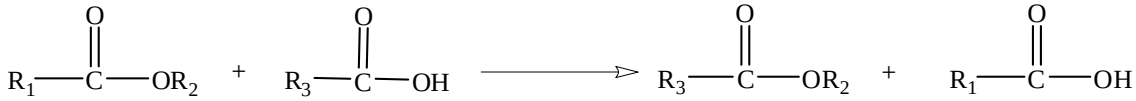
Lipaz enziminin su kullanılarak triaçilgliserolün ester bağlarını bölmesi olayına hidroliz denir. Esterifikasyon hidroliz olayının tersidir ve düşük su aktiviteli sistemlerde

gerçekleşir. Transesterifikasyon ise açil radikallerinin bir ester ve bir asit (asidoliz), bir ester ve diğer bir ester ve bir alkol arasında değişimi olarak tanımlanabilir.

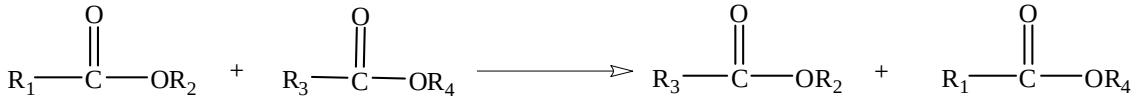


Hidroliz

Ester sentezi



Asidoliz



Transesterifikasyon

Alkoliz

Aminoliz

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

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

içyapısı incelendiğinde paralel β kıvrımlı bantların heliks şeklindeki yapıları ile ayrıldığı ve süper helikal olarak gömmüş 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).

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 asitlertinin küçük yan zincir gruplar içermesi mecburidir.

Katalitik serin aminoasidine 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 aminoasitler 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).

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 belirlendiği üzere lipazın aktif merkezi Asp-His-Ser aminoasitlerini içermektedir. Çözelti içindeyken, helikal bir kısım lipazın aktif merkezini çevreler fakat lipit veya organik çözgen varlığında kapağın açılması ile yapısal bir değişim olur ve aktif merkezi içeren hidrofobik merkez ortamla temas eder. Bu sebeple, ara yüzeye olan gereksinim aktivite için temeldir. Kapağın dış yüzeyi nispeten hidrofilik iken aktif merkeze dönük olan kısım hidrofobiktir. Ara yüzeyle olan etkileşim artar ve substrat aktif merkezi içeren hidrofobik tünele girer, kapak genellikle hidrofobik ve hidrojen bağları ile yerinde tutulur. Kapağın yapısı yüzeydeki yerleşim ve sayı olarak değişmektedir.

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

Lipazın ara yüzeylerdeki davranışları göz önüne alındığında, adorbsiyonun geri dönebilirliği, aktivite kaybı olasılığı ara yüzeyin kalitesi gibi bazı faktörler incelenmelidir. Genel olarak, artan yüzey basıncının desorbsiyona 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. 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. Bilindiği gibi enzimler suda çözünen, spesifik katalizörlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olanak dışıdır. Serbest enzim reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılamadığından reaksiyonun kontrolü güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması düşünülebilir. Ancak bununla da serbest enzimin yanında yeni bir kirlilik unsuru oluşacaktır. Ürünlerin kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok artırmaktadır. (Telefoncu, 1997)

Ayrıca serbest enzimin aktivitesini yitirmeden ortamdan alabilmek olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılabilmesi de söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizörler olmalarına neden olmakta, endüstriyel üretimde de maliyeti yükselten en önemli etken olarak yerini almaktadır. Serbest enzimlerin sürekli üretim sistemlere uygulanamaması da bunlara eklendiğinde enzim immobilizasyonu üzerine araştırmalar yoğunlaşmıştır.

Tüm bu sorunları olumlu yönde çözümleyebilmek, enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek için özellikle son kırk yılda 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)

Lipazlar sulu ve susuz çözücülerde, daha ekonomik ve daha elverişli kullanılabilmek üzere çeşitli yöntemlerle modifiye edilmiştir. Bu gibi modifiye edilmiş lipazların kullanımı çok avantajlıdır, operasyonel kararlılık ve sıcaklık kararlılığı sağlar, ayrıca reaksiyon bitiminde kolayca geri kazanılabilir ve sürekli geri dönüşümlüdür (Kilara ve Shahani, 1977). Bu yöntemler sayesinde enzim aktivitesini seçiciliğini ve organik çözücülerde çözünürlüğünü artırmak mümkündür. Enzim immobilizasyon yöntemleri çok çeşitlidir. Bunları üç grupta toplayabiliriz: Taşıyıcı materyal üzerine adsorpsiyon, tutuklama ve enkapsülasyon ve aktive edilmiş bir membran üzerine kovalent bağlama.

2.3.1. Taşıyıcı Bir Materyal Üzerine Fiziksel Adsorpsiyon

Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir Yöntem; yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan Van der Waals kuvvetleridir.

Bir enzimin suda çözünmeyen taşıyıcıda adsorpsiyonu pH, çözgen, iyon şiddeti, enzim-adsorban oranı ve sıcaklık gibi faktörlere çok bağımlıdır. Bu etmenlerin araştırılması, adsorpsiyon ve aktivitenin önemli ölçüde geri kazanılması için optimal koşulların saptanması çok önemlidir.

Adsorpsiyon yönteminin yararları; enzim immobilizasyon işleminin basit oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi ve bir yandan immobilizasyon gerçekleştirilirken diğer yandan enzim saflaştırılmasına olanak sağlamasıdır, işlem çok kolay olduğu gibi çok yumuşak koşullarda, gerçekleşmekte ve önemli ölçüde enzim inaktivasyonuna da neden olmaktadır.

Yöntemin sakıncalarını ise şu şekilde sıralayabiliriz: Her ne kadar immobilizasyon işlemi kolaysa da optimal koşulların saptanması çok güçtür. Eğer enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa bu durumda desorpsiyon sonucu enzim serbest halde reaksiyon, ortamına geçmekte ve ürünlerin kirlenmesine neden olmaktadır. Enzim desorpsiyonu özellikle substrat konsantrasyonunun yüksek olduğu durumlarda hiç istenmeyen bir durumdur.

Bu yöntemde çok çeşitli taşıyıcılar materyal olarak kullanılabilir. Materyal seçimi endüstriyel uygulamalar için önemli olan özelliklere bağlıdır. Bu özellikler mekanik dayanıklılık, kimyasal ve fiziksel kararlılık, hidrofobik/hidrofilik karakter, enzim yükleme kapasitesi ve fiyatıdır. Lipaz immobilizasyonu için destek malzemesi olarak ilk önce poröz cam boncuklar (Marlot vd., 1985), (Omar vd., 1988), fosiller (Macrae vd., 1985), silika (Wisdom vd., 1985) (Brady vd., 1988) ve alümina (Brady vd., 1986) gibi mineral destekler kullanıldı. Kullanılan diğer destekler; iyon değiştirici reçine, celite (Kimura vd., 1983),(Svensson vd., 1990) ve biyopolimerlerdir (Gitlesen vd., 1997), (Garcia vd., 1990). Bunların dışında, Poliüretan köpüklere (Cabral vd., 2010), Florlu yüzey aktif non iyonik yüzeylere (Michaux vd., 2010), Polistren nanopartüküllere (Miletic vd., 2010), Karbon nanotüp-silika kompozit içine (Lee vd., 2010), Manyetik fe 304-kitosan nanoparçacıklara (Wu vd., 2009), Modifiye Zirkonya nanopartiküllere (Zhao vd., 2009) immobilize edilmiştir.

Katı bir destek üzerine enzimin fiziksel adsorpsiyonunun başarısı ve elverişliliği birçok parametreye bağlıdır. Bunlar, adsorplanacak olan proteinin boyutu taşıyıcının spesifik alanı yüzeyin doğası (porözlüğü, por boyutu)'dır. Tipik olarak, porlu bir desteğin kullanılması, enzim materyalin dış yüzeyinde ve de porların içinde adsorplanacağı için daha avantajlıdır. Elverişli immobilizasyon aynı zamanda enzim konsantrasyonuna, desteğin yüzde miktarına, adsorplanan enzim miktarına, taşıyıcının doygunluk noktasına ulaşan enzim konsantrasyonuna bağlıdır. Bu işlem genellikle sabit sıcaklıkta gerçekleştirilir ve adsorbsiyonun izotermleri Langmuir veya Freundlich eşitliklerinden elde edilir (Monsan, 1982). Adsorbsiyonun gerçekleştiği pH önemlidir çünkü; immobilizasyon gibi durumlarda iyonik etkileşimler önemlidir, Genellikle maksimum adsorbsiyon enzimin izoelektrik noktasına yakın pH'larda gözlenir. Sonuç olarak, immobilizasyon prosesi süresince su benzeri çözücülerin eklenmesi sulu faz içinde enzimin çözünürlüğünü artırarak adsorbsiyona yardım eder.

İmmobilize biyokatalizörlerin rejenarasyonu mümkündür. Enzim bir kere başlangıç aktivitesinin önemli bir miktarını kaybederse, enzimin desorpsiyonu yeni aktif enzimin bağlanmasını izleyen pH modifikasyonu ile bazen mümkün olabilir. Bununla birlikte, desorpsiyon katalizlenmiş reaksiyon süresince meydana gelirse, istekli desorpsiyon bu immobilizasyon tekniğinin majör bir dezavantajı olur (Wahlgren ve Arnebrant, 1991). Maalesef, adsorpsiyonun dayanıklılığının ön belirlemesi için hiçbir deneysel kural yoktur. Diğer durumlarda sert şartlar altında desorpsiyon gerçekleşmezken, bazı durumlarda basit substrat eklenmesi bile önemli ölçüde desorpsiyonu indüklemek için başarılı olmaktadır. (Montero vd., 1993)

Enzim immobilizasyonunda esas sorun, enzimin serbest formu ile karşılaştırıldığında immobilizasyon prosesi süresince biyokatalizörün kararlılığının ve aktivitesinin olumsuz etkilenmesidir. İdeal olan, immobilize enzimin düzgün katalitik performans sergilemesidir. İmmobilizasyonda enzimin elde edilen aktivitesinin ve kararlılığının tahmin edilmesi için hiçbir kural yoktur. İmmobilizasyon enzim aktivitesini inhibe veya aktive eder. Çoğu immobilize lipaz, serbest halindekinden daha yüksek optimum sıcaklık sergiler. Bunun nedeni, immobilize enzimin immobilizasyondan sonra yapısının daha kararlı olmasından dolayı termal

deaktivasyona daha az hasas olmasından kaynaklanmaktadır.

Genellikle, hidrofobik materyaller enzim immobilizasyonu için en iyi desteklerdir. Bu gibi destekler üzerine adsorblanan enzimin miktarı genellikle daha yüksek ve daha geniş enzim aktivitesi gösterir. Hidrofobik destekler reaksiyonda elde edilebilen su için enzimle yarışmaya eğilimlidir. (balcao vd. 1996).

Örneğin montero ve arkadaşları (1993) candida rugoza lipazının çözeltideki serbest enzimle ticari olarak elde edilebilen mikroporlu polipropilen üzerine immobilize edildiğindeki termal kararlılığını karşılaştırdı.

Bosley (1997), Lipazın fiziksel adsorpsiyonu için ideal fiziksel ve yüzey şartlarını saptamıştır.

Al-Duri ve arkadaşları (1995), Candida rugoza lipazı immobilizasyonuna Desteğin içyapısının etkisini araştırmışlardır.

Ruckenstein ve Wan mikroporöz poli destek üzerine *C. Cylindracea* lipazının adsorpsiyonu ile immobilizasyon çalışması gerçekleştirmişlerdir.

2.3.2. Mikroenkapsülasyon ve Tutuklama

Prensip olarak tutuklama enzim molekülünü belirli bir mekanda durmaya zorlamaktır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır. 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 ve hareketine izin verecek kadar sıkı bir yapı oluşturarak kontrol edilir.

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

Tutuklamanın çeşitli metodları vardır:

-Çok değerlikli katyonlarla makromoleküllerin iyonotropik değişmesi (örneğin alginat jel.)
-Sıcaklık etkisiyle jelleşme (agaroz, jelatin jel gibi)
-Kimyasal / fotokimyasal reaksiyon yöntemiyle organik polimerleşme (poliakrilamid jel)
-Karışmaz bir çözücüden çöktürme (polistren)

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

Sıcaklık değişimi; agaroz veya jelatinin % 1-4'lük çözeltisi kullanılarak faz geçişi ile jelleşmenin basit bir metodudur. Bununla birlikte oluşan jeller yumuşak ve kararsızdır (Bickerstaff, 1997).

Alternatif olarak kimyasal monomerlerle enzimin karıştırılması da mümkündür. Çapraz bağlı bir polimerik ağ oluşturan polimerleşme sırasında polimerin boşluklarında enzim tutuklu kalmaktadır. Bu metod oldukça yaygın olarak kullanılır. Çok sayıda akrilik monomerler hidrofilik kopolimerler oluşturmak üzere polimerize edilir. Polimer zincirleri arasında çapraz bağları 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 oluşturulacak 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 metodun kullanımı yüksek derecede kararlı/önceden stabilize edilmiş enzimler veya canlı olmayan hücrelerle sınırlıdır (Telefoncu, 1997)

Lipaz monomerik fazda polimerizasyon üzerinde tutuklanarak immobilize edilir. Poliakrilamid jeller en yaygın kullanılan matrikslerdir. Sodyum alginat Jeller veya karragenan jel ile sırasıyla kalsiyum veya potasyum klorür üzerine teması ile elde edilir (Hertzberg vd., 1992). Matriks olarak üretan prepolimerler ve fotokros bağlanabilen reçineler de kullanılabilmektedir. Prepolimerler içinde fotosensörlerin başlangıç reaksiyonu ve UV radyasyonu ile polimerizasyon başlar ve immobilizasyon meydana gelir.

Tutuklama yöntemindeki enzim ve ortam şartları ile arasında büyük benzerlik olmasına rağmen mikroenkapsülasyon muhtemelen en az gelişmiş immobilizasyon tekniğidir. Mikroenkapsülasyon yapay hücrelerin bir membran ile ayrılmasıyla da oluşturulabilir. Enzimler gibi büyük moleküllerin sentetik membrandan geçişi mümkün değildir, fakat substrat ve ürünler gibi küçük moleküller membrandan kolayca geçebilir.

Böyle bir immobilizasyon tekniğinin avantajı; enzim ile polimer arasında kimyasal bir etkileşim olmadığından enzim denatürasyonu genellikle önlenmiş olur. Ancak membran etrafında kütle transfer olayları sorun oluşturur. Substrat ve ürünlerin membrandan geçiş oranı genellikle sınırlayıcı parametrelerdir. Kullanılacak yüksek substrat konsantrasyonu bu sınırlayıcı etkiyi ortadan kaldırır. Sonuçta daha iyi bir enzim tutuklaması, büyük substratların membrandan geçişinin ve enzimin aktif merkezine

ulaşmasının zor olmasından dolayı daha küçük substratlar kullanılarak sağlanabilir.

Tutuklama yönteminde Lipazlar farklı desteklere tutklanmıştır. kitosan boncuklara (Yiv d., 2009), (Monier vd., 2010), Ca-Alginat boncuklara (Won vd., 2005), Ca-Alginat/k-karregenan boncuklara da (Chi vd., 2008) tutuklanabilir.

2.3.2.1. Kalsiyum Alginat Jelde Tutuklama

Enzimlerin ve/veya hücrelerin alginatta tutuklanması immobilizasyonun en basit metodlarından biridir. Alginatlar, suda çözünür sodyum alginatlar olarak ticari formda mevcuttur. Gıda ve farmosötik endüstrilerinde kıvamlaştırıcı, emülsiye 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, toksik olmayan, pahalı olmayan ve çok yönlü bir metottur.

Alginik asit; deniz yosunlarından elde edilen bir poliüronikasittir. 1-4 bağlı β-D-mannuronik (M) ve α-L-guluronik asidin (G) farklı miktarlarından oluşur. G, M miktarları kaynağa göre değişir. Heteropolimerik (MM blokları ve GG blokları) 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. 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 etkileşir.

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. Bunu başlangıç alginat konsantrasyonu, boncukların mekaniksel uygulaması, eğer bölünen hücreler immobilize edilmişse, hücre üretimi etkiler. Fiziksel çalkalama kolonda paketlenmiş boncuklardan daha fazla kaçışa neden

olur. % 2'lik kalsiyum alginat boncukların elektron mikroskopileri 5-200 nm çapında değişen gözenekler göstermiştir. Ca iyonlarını uzaklaştıran şelatlama ajanları ve Ca iyonları ile yer değiştirebilen başka iki değerli katyonlar kalsiyum alginatın kararlılığının bozulmasına neden olur. Fosfat, sitrat, EDTA ve Mg^{2+}'dan kaçınılmalıdır.

Cu^{2+} ve Pb^{2+} gibi diğer divalent katyonlar alginat için yüksek affiniteye sahiptirler ve daha stabil jeller üretirler. Bununla birlikte bu iyonları hücre immobilizasyonu için sık kullanılırken, toksisite nedeniyle enzim immobilizasyonu için kullanımı sınırlıdır. Ba^{2+} katyonu maya hücrelerinin immobilizasyonu için, Cu^{2+} ise polifenoloksidaz immobilizasyonu için kullanılmaktadır. Kalsiyum alginatın stabilizasyonu şelatlayıcı/iyon değiştiricilerden etkilenmeyen kimyasal maddelerle ilave çapraz bağlayıcılar yapılarak arttırılabilir. Özellikle iyileştirilmiş sızıntı özelliklerine sahip daha kararlı ve düşük poroziteli kompleksler üretmek üzere alginat; çitosan, poliakrilamid, polivinilalkol, protein ve polietilen imin ile çapraz bağlanabilir. (Fraser ve Bickerstaff, 1997).

Lipaz enzimi Ca-Alginat boncuklara immobilize edilmiştir (Won vd., 2005), *Candida rugosa* ve pankreatik Lipaz kalsiyum alginat jele tutuklanmıştır (Özyılmaz ve Gezer, 2009), (Mammarella ve Rubiola, 2005), *Candida rugosa* lipazı calsiyum alginat jellere çapraz bağlanmıştır (Wu vd., 2006). Lipaz enzimi ayrıca Ca-Alginat/k-karregenan jel karışımlarına da immobilize edilmiştir (Chi vd., 2008),

2.3.2.2. Jelatin Jelde Tutuklama

Jelatin, kollajenin hidroliziyle elde edilen bir proteindir ve karakteristik olarak yapısında yüksek oranda glisin, prolin ve hidroksiprolin aminoasitlerini içerir. Bu aminoasitler jelatinin üçlü heliks bir yapı oluşturmasında ve jelleşme özelliği kazanmasında oldukça etkilidir (Rose vd., 1987).

Ucuz ve kolay bulunur olması yanında immobilizasyon materyali olarak kullanılan diğer polisakkaritlerin aksine jel oluşumu için herhangi bir moleküle, iyona

ya da tuza pH ayarlanmasına gerek duymaması, jelatinin enzim, hücre ve doku immobilizasyonunda sıklıkla tercih edilmesini sağlamaktadır.

Termal ve mekanik kararlılığının arttırılması amacıyla immobilizasyonda çoğunlukla çapraz bağlayıcı ajan, bir reaktif olan glutaraldehit ile birlikte kullanılır (Scardi, 1987; Esposito vd., 1995).

Lipaz enzimi Jelatin jellere Jelatin bazlı hidrojeller kullanılarak immobilize edilmiştir, (Hedström vd., 1998).

Fadnavis ve arkadaşları tarafından Alginat+jelatin jel karışımlarına lipaz enzimi immobilize edilmiştir, (2003).

2.3.2. Kovalent Bağlama ile İmmobilizasyon

Enzimlerin reaktif taşıyıcılara kovalent bağlanması protein kimyasında bilinen yöntemler ile ve genelde sulu ortamda gerçekleştirilir, taşıyıcı yüzeyindeki fonksiyonel gruplarla enzim yüzeyindeki aminoasit artıklarına ait fonksiyonel gruplar arasında kovalent bir bağ oluşur. Kullanılacak taşıyıcılar reaktif değillerse yardımcı bir reaktif ile aktivite edilmelidirler. 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 (Telefoncu, 1997).

Kullanılan kimyasal modifikasyonlarda spesifik amino asitlerle etkileşen çeşitli türde değiştiriciler kullanılır. Bunun iki ana hedefi vardır; ilki proteinin aktif merkezinin yapısını açıklamaktır (Kamial ve Saroja, 1989). İkincisi lipazın, doğal özelliklerini geliştirmek ve daha kullanışlı fonksiyonlar kazandırarak onları değiştirmektir. Aminoasitlerin kimyasal modifikasyonları iki prosedür içerir: Enzimin suda çözünmeyen bir materyale kovalent olarak bağlanması yada çeşitli bi-fonksiyonel reaktifler kullanılarak oluşturulan materyale lipazın çapraz olarak kovalent bağlanmasıdır.

Bu tez kapsamında *Candida rugosa* lipazı'nın alginat+jelatin jel karışımlarında tutuklama yöntemi kullanılarak immobilizayonu gerçekleştirilmiş, elde edilen immobilize boncuklar için optimum alginat konsantrasyonu, jelatin konsantrasyonu, $CaCl_2$ yüzdesi, enzim miktarı, boncuk boyutu, boncuk miktarı gibi immobilizasyon koşulları optimize edilmiştir. Ayrıca immobilize *Candida rugosa* lipazı'nın optimum pH, optimum sıcaklık, termal kararlılık, kinetik, tekrar kullanılabilirlik, depo kararlılığı, substrat spesifitesi gibi bazı biyokimyasal özellikleri araştırılması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Sigma, Merck, Aldrich ve Riedel de Haen firmalarından satın alınmıştır.

Candida rugosa lipazı (Sigma)
Gum arabic (Merk)
Deoksikolat (sigma)
Aseton (riedel-de Haen)
Etanol (riedel-de Haen)
Sodyum alginat (Sigma)
Jelatin (Sigma)
Commassie brillant blue (Sigma)
Fosforik asit %85- 88 (Tekkim)
Kalsiyum klorür (Tekkim)
Sığır serum albümini-BSA (Sigma)
Sodyum hidroksit (Tekkim)
Sodyum karbonat anhidrat (Tekkim)
Sodyum bikarbonat (Sigma)
Hidroklorik asit (Sigma)
Asetik asit (Tekkim)
Tris (Sigma)
Maleik anhidrit % 95 (Sigma)

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Analitik terazi (Gec Avery)
Çalkalamalı su banyosu (Clifton termostatlı 100-400 rpm)
Su banyosu (Clifton)
Titratör (Metrohm)
İnkübatör (EnoLab MB-80)
Vortex (Fisons)
Spektrofotometre (Shimadzu UV-1601)
pH metre (WTW pH 330i)
Isıtıcı ve manyetik karıştırıcı (Chiltern HS31)
Dağıtıcı ve mikro pipetler (Eppendorf) kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler

Enzim çözeltisi: 0.1 g *Candida rugosa* lipazı tartıldı. 0.05 M'lık Tris tamponunda (pH:7.2) çözüldü ve tamponla balon jojede 10 mL'ye tamamlandı.

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

% 1.6'lık Deoksikolat çözeltisi: 1.6 g deoksikolikasit tartılıp destile suda çözüldü ve destile su ile balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

0.2 M Tris-HCl tamponu (pH:7.2): 24.23 g Tris (hidroksimetil aminometan) tartılıp balon jojede 1 litreye tamamlandı. 0.1 N HCl çözeltisi hazırlandı. Tris çözeltisinden 25 mL alındı üzerine 44.7 mL HCl çözeltisi eklendi, karışım balon jojede 100 mL'ye tamamlandı. pH:7.2 olacak şekilde ayarlandı. Ayrıca optimum pH çalışması için pH 7-8-9 için Tris-HCl tamponları hazırlandı.

%7.7'lik $CaCl_2$ çözeltisi: 38.5 g $CaCl_2$ tartılıp destile suda çözüldü ve balon jojede 500 mL'ye tamamlandı.

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

Sığır serum albumin çözeltisi: 10 mg sığır serum albumini tartıldı, destile suda çözüldü ve balon jojede 10 mL'ye tamamlandı.

Tris-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 ulaşıncaya kadar 0.2 M NaOH eklendi. Balon jojede 100 mL'ye tamamlandı.

Sodyum bikarbonat 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. METOD

3.2.1. Bradford Yöntemi ile Kantitatif Protein Tayini

Yöntem organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek renk oluşturmasını esas alır. Boya-bağlama temelli yöntemlerin en yaygını, bradford tarafından geliştirilen ve coomassie Brillant Blue G-250 boyasının kullanıldığı metoddur. Yöntem oldukça duyarlıdır daha da artırılabilir (5-100 µg protein/mL). Renk oluşumunda proteinin aminoasit bileşiminin (özellikle arginin gibi bazik amino asitler ile aromatik amino asitler) reaksiyon üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bradford yönteminde 595 nm'de absorbans veren mavi rengin ölçümü esnasında cam ve polistiren küvetler kullanılabilir olmakla beraber cam küvetlerde rengin absorbsiyonu bir kullanımlık polistiren küvetlerin tercih edilmesine yol açar. Cam küvetlerin kullanılması durumunda 0.1 M HCl'de bekletme işleminin ardından su ve asetonla yıkama gerekmektedir (Bradford, 1976).

Enzim çözeltisinin protein içeriği Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla öncelikle standart protein çözeltileri hazırlandı. Şahit numune olarak 200 µL destile su kullanıldı. Stok protein çözeltisi kullanılarak mL'de 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.15, 0.20 mg protein (sığır serum albumini) içeren çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan standart protein çözeltilerine ve 10 mg/mL'lik *Candida rugosa* lipazı çözeltisinden alınan 200 µL'lik örneğin ve şahit çözeltilerin herbirinin üzerine 4'er mL Bradford reaktifi eklendi. Vorteksle iyice çalkalandı. 10 dakika ışıksız ortamda bekletildikten sonra 595 nm'de şahit numuneye karşı absorbans değerleri okundu. Standart protein çözeltilerinin absorbans değerleri ile konsantrasyonları arasında grafik çizildi. Bu standart grafik yardımıyla, protein konsantrasyonu bilinmeyen enzim çözeltisi ve yıkama sularının absorbans değerlerinden protein miktarları belirlendi.

3.2.2. Alginat +Jelatin Jelde Tutuklama

Candida rugosa lipazının jelatin ve alginat jel karışımında immobilizasyonu Norouzian'ın metoduna göre yapıldı (Norouzian vd., 2002). Bu amaçla, 0.5 g jelatin tartıldı, 10 mL destile suda 40°C'de 30 dakika boyunca karıştırılarak iyice çözünmesi sağlandı, üzerine 0.2 g sodyum alginat eklendi ve karıştırıldı. Jel karışımının üzerine 2 mL *Candida rugosa* lipaz çözeltisi (10 mg/1mL) yavaş yavaş karıştırılarak eklendi. Enjektör yardımıyla, buz içerisine oturtulmuş % 7.7'lik $CaCl_2$ çözeltisine damlatılarak jel boncuklar elde edildi. Boncuklar 1.5 saat boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak bekletildi ve sonra süzülerek destile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları atılmayıp protein tayini için saklandı. *Candida rugosa* lipazının immobilize edildiği boncuklar üzerini örtecek kadar 0.05 M Tris-HCl tamponunda (pH: 7.2) kullanılıncaya kadar buzdolabında saklandı.

3.3.3. Titrimetrik Yöntemle Lipaz Enzimi Aktivite Tayini

Candida rugosa lipazının aktivitesi titrimetrik yöntemle tayin edildi (Hoppe ve Theimer 1996). Yağ, buz ve %10'luk gum arabik çözeltisinden oluşan karışım manyetik karıştırıcıda 15 dakika karıştırıldı. Karışımın üzerine, 0.2 M Tris-HCl tamponu (pH: 8.0) ve sodyum deoksikolat çözeltileri eklenerek substrat emülsiyon çözeltisi hazırlandı. 100 mL'lik şilifli erlenlere bu karışımdan 17 mL alınarak serbest enzim için 1 mL *Candida rugosa* lipazı (10 mg/mL), immobilize lipaz için 1 g boncuk ve şahit için 1mL destile su eklendi. Her deneme çift çalışıldı. Örnek ve şahitler 37°C'de 200 rpm'de çalkalayıcı su banyosunda 15 dakika çalkalandı. 1:1'lik aseton-etanol karışımının 5 mL'si örnek ve şahitlerin üzerine eklenerek reaksiyon durduruldu. 0.05 M NaOH ile pH 10 oluncaya kadar otomatik titratörde titre edildi. Sarfiyat kaydedildi.

Bir lipaz Ünitesi optimum koşullarda, substrat olarak zeytin yağı kullanıldığında bir dakikada bir µmol yağ asidini serbest bırkmak üzere gerekli olan enzim miktarıdır.

Enzim aktivitesi için hacimsel aktivite ve spesifik aktivite değerleri aşağıdaki formülle belirlendi.

Hacimsel Aktivite (U/mL veya g boncuk) = Ünite /enzim hacmi (1mL veya g boncuk)

Spesifik Aktivite (U/mg protein) = Hacimsel Aktivite/mL x mg protein miktarı

3.2.4. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

3.2.4.1. Jelatin Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Candida rugosa lipazı immobilizasyonunda kullanılacak optimum jelatin miktarını belirlemek üzere; % 2.5, 5, 10, 15, 20 (w/v) olacak şekilde 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 g jelatin tartıldı ve 10 mL destile suda çözüldü. 0.2 g sodyum alginat eklendi ve bagetle karıştırarak homojen hale getirildi. Bu karışımın üzerine 2 mL *Candida rugosa* lipaz enzim çözeltisi (10 mg/mL) eklenerek yavaşca karıştırıldı. Bir enjektör yardımıyla, manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan buz banyosu içindeki % 7.7'lik $CaCl_2$ çözeltisine damlatıldı ve boncuklar elde edildi. Boncuklar 1.5 saat boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak bekletildi ve süzülerek destile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları atılmayıp protein tayini için saklandı. Ayrıca boncukların ve yıkama sularının lipaz aktiviteleri titrimetrik yöntemle belirlendi.

3.2.4.2. Alginat Konsantrasyonu Optimizasyonu

Candida rugosa lipazı immobilizasyonunda kullanılacak optimum sodyum alginat miktarını belirlemek üzere; % 1.5, % 2, % 2.5 (w/v) olacak şekilde 0.15, 0.2, 0.25 g sodyum alginat tartıldı ve belirlenmiş olan optimum jelatin miktarı olan 1.5 g jelatin tartılarak hazırlanan 10 mL destile sudaki çözeltisi üzerine eklendi. Bu karışımın üzerine 2 mL *Candida rugosa* lipaz enzim çözeltisi (10 mg/mL) eklenerek yavaşca karıştırıldı. Bir enjektör yardımıyla, manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan buz banyosu içindeki % 7.7'lik $CaCl_2$ çözeltisine damlatıldı ve boncuklar elde edildi. Boncuklar 1.5 saat boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak bekletildi ve süzülerek destile

suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları atılmayıp protein tayini için saklandı. Ayrıca boncukların ve yıkama sularının lipaz aktiviteleri titrimetrik yöntemle belirlendi.

3.2.4.3. Kalsiyum Klorür Konsantrasyonu Optimizasyonu

Candida rugosa lipazı immobilizasyonunda kullanılacak damlatma çözeltisi olan kalsiyum klorür çözeltisinin optimum konsantrasyonunu belirlemek üzere; % 5, % 7,5, % 10 (w/v) konsantrasyonlarda $CaCl_2$ çözeltileri hazırlandı. Optimum jelatin ve sodyum alginat konsantrasyonları olarak belirlenen % 15 jelatin ve % 2 sodyum alginat jel karışımında immobilize edilmiş 2 mL *Candida rugosa* lipaz enzim çözeltisi (10 mg/mL) eklenerek hazırlanan jel karışımı bir enjektör yardımıyla, manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan buz banyosu içindeki 3 farklı konsantrasyondaki $CaCl_2$ çözeltilerine damlatıldı ve boncuklar elde edildi. Boncuklar 1.5 saat boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak bekletildi ve süzülerek destile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları atılmayıp protein tayini için saklandı. Ayrıca boncukların ve yıkama sularının lipaz aktiviteleri titrimetrik yöntemle belirlendi.

3.2.4.4. Enzim Miktarı Optimizasyonu

Candida rugosa lipazı immobilizasyonunda kullanılacak *Candida rugosa* lipazı miktarını belirlemek üzere; 10 mg/mL olacak şekilde 0.05 M Tris-HCl tamponunda (pH:7.2) çözülmüş enzim çözeltisinden 1, 2 ve 3'er mL alınarak her biri için ayrı ayrı % 15 jelatin ve % 2 sodyum alginat olacak şekilde hazırlanan alginat-jelatin karışımlarına eklendi. İmmobilize edilen enzimler bir enjektör yardımıyla, manyetik karıştırıcı üzerinde, buz banyosu içinde bulunan optimum kalsiyum klorür konsantrasyonu olarak belirlenen % 7.7' lik $CaCl_2$ çözeltisine damlatıldı. 1.5 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra süzülerek destile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları atılmayıp protein tayini için saklandı. Boncukların ise lipaz aktivitelerine bakıldı.

3.2.4.5. Boncuk Boyutu Optimizasyonu

Candida rugosa lipazını immobilizasyonunda elde edilecek boncukların boyutunu optimize etmek için; farklı iğne çaplarına sahip enjektör uçları kullanıldı. Bu amaçla siyahenjektör, yeşil enjektör ve pasteur pipeti kullanıldı. % 15 jelatin ve % 2 sodyum alginattan oluşan jel karışımlarına eklenen 2 mL enzim çözeltisiyle elde edilmiş olan immobilize enzim öncelikle siyah uçlu enjektör yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde, buz banyosu içinde bulunan % 7.7' lik $CaCl_2$ çözeltisine damlatıldı. 1.5 saat oda sıcaklığında bekletildi. Son olarak süzülerek destile suyla yıkandı. Aynı işlemler yeşil uçlu enjektör ve pastör pipeti ile de tekrarlandı. Elde edilen boncukların çapları bir kumpas yardımıyla ölçüldü.

3.2.4.6. Boncuk Miktarı Optimizasyonu

Lipaz aktivite tayini yapılırken kullanılacak olan optimum boncuk miktarını belirlemek için; % 15 jelatin ve % 2 sodyum alginattan oluşan jel karışımlarına 2 mL enzim çözeltisi eklendi, elde edilen immobilize enzim yeşil uçlu enjektör yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde, buz banyosu içinde bulunan % 7.7' lik $CaCl_2$ çözeltisine damlatıldı. 1.5 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra süzülerek destile suyla yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları atılmayıp protein tayini için saklandı. Aktivite tayinleri 0.5, 1.0 ve 1.5 g boncuk kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.5. *Candida rugosa* Lipazının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

Serbest ve alginat-jelatin karışımında immobilize *Candida rugosa* lipazının optimum pH, sıcaklık, termal kararlılık, substrat spesifitesi, depo kararlılığı, K_m ve V_{max} kinetik sabitleri gibi bazı biyokimyasal özellikleri belirlendi, ayrıca immobilize enzimin yeniden kullanılabilirliği araştırıldı.

3.2.5.1. Serbest ve İmmobilize Lipazın Optimum pH'ının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının maksimum aktivite gösterdiği optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla farklı pH tamponları kullanıldı. pH 6-7 için Tris-maleat tamponu; pH. 7-8-9 için Tris-HCl tamponu; pH 9-10 için Sodyum karbonat-bikarbonat tamponu kullanıldı. Bu tamponlar kullanılarak hazırlanan substrat emülsiyonları çözeltisi kullanılarak serbest ve alginat-jelatin karışımına immobilize *Candida rugosa* lipazının aktiviteleri Bölüm 3.2.3'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

3.2.5.2. Serbest ve İmmobilize Lipazın Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının maksimum aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değerlerini belirlemek için 30, 40, 45, 50, 55 ve 60 °C sıcaklıklarda lipaz aktivite tayinleri Bölüm 3.2.3'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

3.2.5.3. Serbest ve İmmobilize Lipazın Termal Kararlılığının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının termal kararlılığını belirlemek için; serbest ve alginat-jelatin karışımına immobilize *Candida rugosa* lipazı ayrı ayrı 40, 50, 60 ve 70 °C sıcaklıklarda bekletilerek 30'ar dakika aralıklarla 0., 30., 60. ve 90. dakikalarda 0.2 M Tris-HCl tamponunda (pH 7.2) hazırlanan substrat çözeltisi kullanılarak Bölüm 3.2.3'de anlatıldığı gibi lipaz aktiviteleri belirlendi.

3.2.5.4. Serbest ve İmmobilize Lipazın K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla, 0.25, 0.5 1.0, 2.0 ve 3.5 g zeytin yağı ve 0.2 M Tris-HCl tamponu (pH:7.2) kullanılarak hazırlanan farklı konsantrasyondaki substrat çözeltileri yardımıyla serbest ve alginat-jelatin jel karışımında immobilize lipazının aktivite

tayinleri yapıldı. Elde edilen aktivitelerden Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla K_m ve V_{max} kinetik sabitleri belirlendi.

3.2.5.5. İmmobilize Lipazın Tekrar Kullanılabilirliği

Alginat+jelatin jel karışımında immobilize *Candida rugosa* lipazının yeniden kullanılabilirliğini belirlemek için; 2 g boncuk tartıldı. 0.2 M Tris-HCl tamponunda (pH:7.2) hazırlanan substrat çözeltisi yardımıyla reaksiyon aseton:etanol karışımıyla durdurulmaksızın immobilize enzim reaksiyon ortamından süzülerek aktivite tayini yapıldı. Boncukların lipaz aktivitesi kaybolunca kadar aktivite tayinleri tekrarlandı.

3.2.5.6. Serbest ve İmmobilize Lipazın Depo Kararlılığı

Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının depo kararlılığını belirlemek amacıyla; serbest ve immobilize enzimin aktivite tayinleri iki gün aralıklarla gerçekleştirildi.

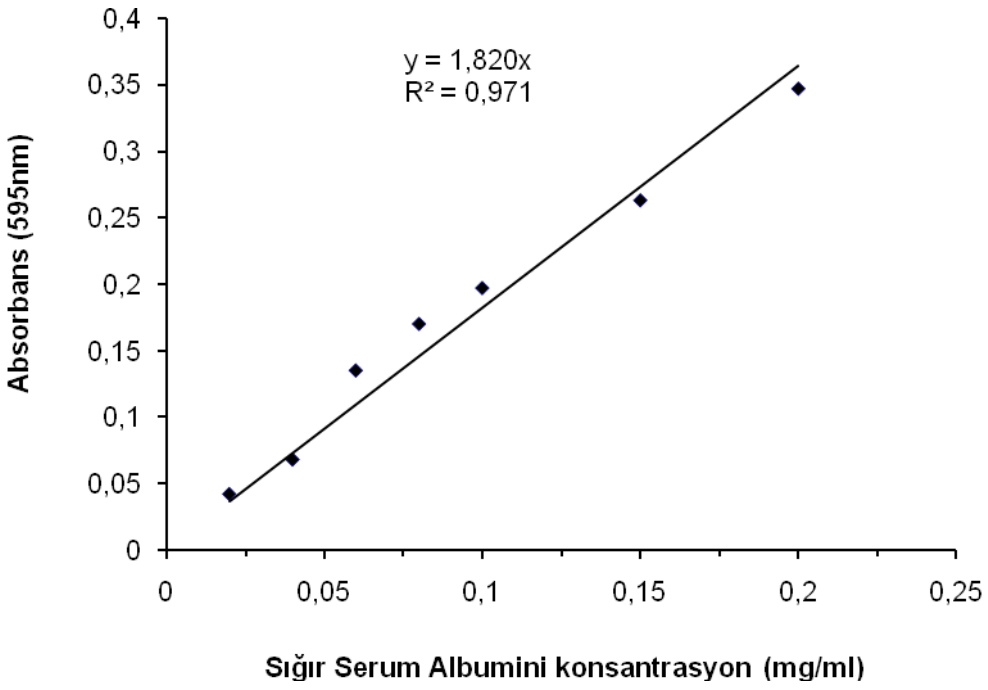
3.2.5.7. Serbest ve İmmobilize Lipazın Farklı Yağlarla Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının substrat spesifitesinin belirlenmesi amacıyla; substrat olarak zeytinyağı yerine gliseril tributirat, trikaprilin, gliseril tristearat, aspir yağı, soya yağı, defne yağı, ham kanola yağı, ham ayçiçek yağı, ham mısır yağı, ham zeytinyağı ve rafine fındık yağı kullanılarak aktivite tayinleri 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). İmmobilize enzimin damlatıldığı $CaCl_2$ çözeltilerinde ve yıkama sularında ve *Candida rugosa* lipaz çözeltisinin protein miktarları aşağıdaki standart grafiğin doğru denklemi yardımıyla belirlendi



Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile oluşturulan Protein Standart grafiği

4.2. *Candida rugosa* Lipazının Alginat+Jelatin Jel Boncuklarda Tutuklanması

Candida rugosa lipazının alginat+jelatin jellerde tutuklanması Bölüm 3.2.2'de belirtildiği gibi yapılmıştır. Şekil 4.2'de *Candida rugosa* lipazının alginat+jelatin jel karışımlarında tutuklanması ile elde edilen boncuklar görülmektedir.

Şekil 4.2. *Candida rugosa* lipazının alginat+jelatin jel karışımlarında tutuklanması ile elde edilen boncuklar.

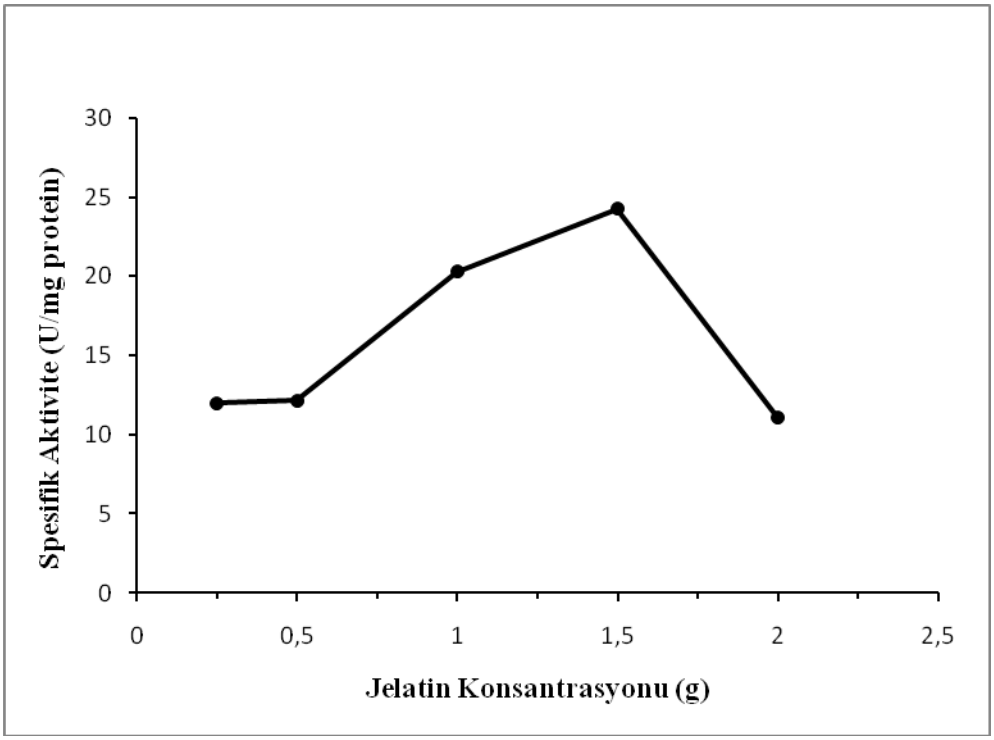
4.3. *Candida rugosa* lipazının Alginat+Jelatin Jel Karışımlarında İmmobilizasyonun Optimizasyonu

4.3.1. Jelatin Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Candida rugosa lipazının alginat+jelatin jel karışımlarında immobilizasyonunda optimum jelatin konsantrasyonun belirlenmesi için % 2.5, 5, 10, 15, 20 (w/v) konsantrasyonlarda hazırlanan jelatin jellerde immobilizasyonlar gerçekleştirildi. Elde

edilen sonuçlar Şekil 4.3'de verilmiştir.

Yapılan protein tayini ve immobilize lipazın aktivite sonuçları değerlendirildiğinde; en yüksek enzim aktivitesi % 15'lik jelatin konsantrasyonunda gözlendi. Bundan sonraki immobilizasyonlarda jelatin konsantrasyonunun % 15 olarak çalışılmasına karar verildi.



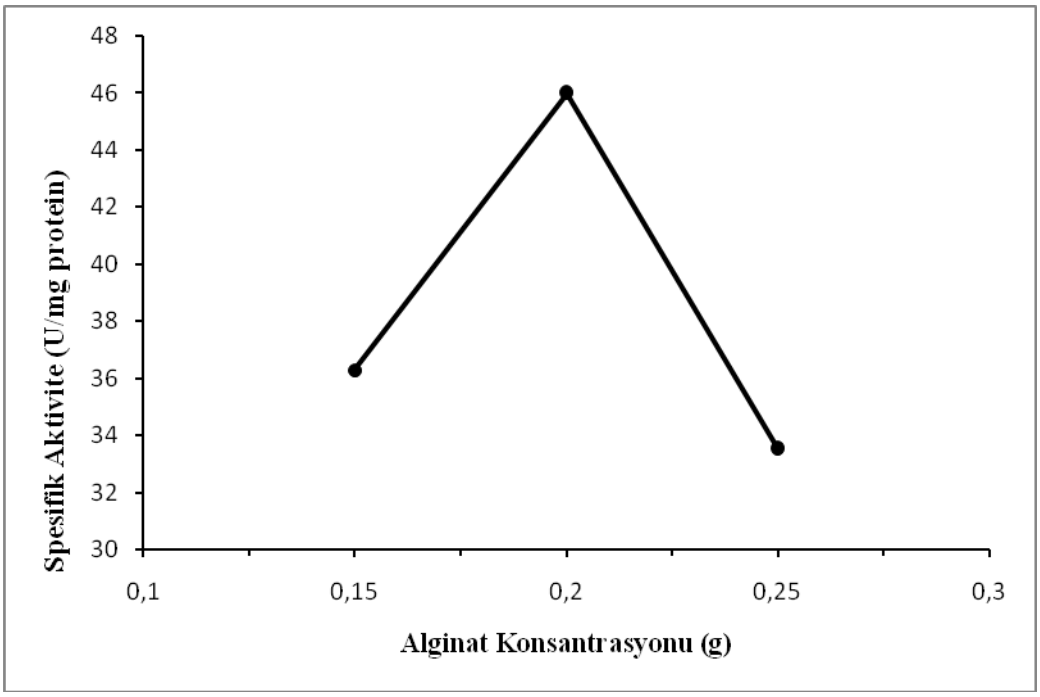
Şekil 4.3. *Candida rugosa* lipazının alginat+jelatin jel karışımlarına immobilizasyonuna jelatin konsantrasyonun etkisi

4.3.2. Alginat Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Candida rugosa lipazının alginat+jelatin jel karışımlarında immobilizasyonunda optimum alginat konsantrasyonun belirlenmesi için % 1.5, % 2 ve % 2.5 konsantrasyonlarda hazırlanan alginat jellerde immobilizasyonlar gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.4'de verilmiştir.

Yapılan protein tayini ve immobilize lipazın aktivite sonuçları

değerlendirildiğinde; en yüksek enzim aktivitesi % 2'lik alginat konsantrasyonunda gözlendi. Bundan sonraki immobilizasyonlarda alginat konsantrasyonunun % 2 olarak çalışılmasına karar verildi.

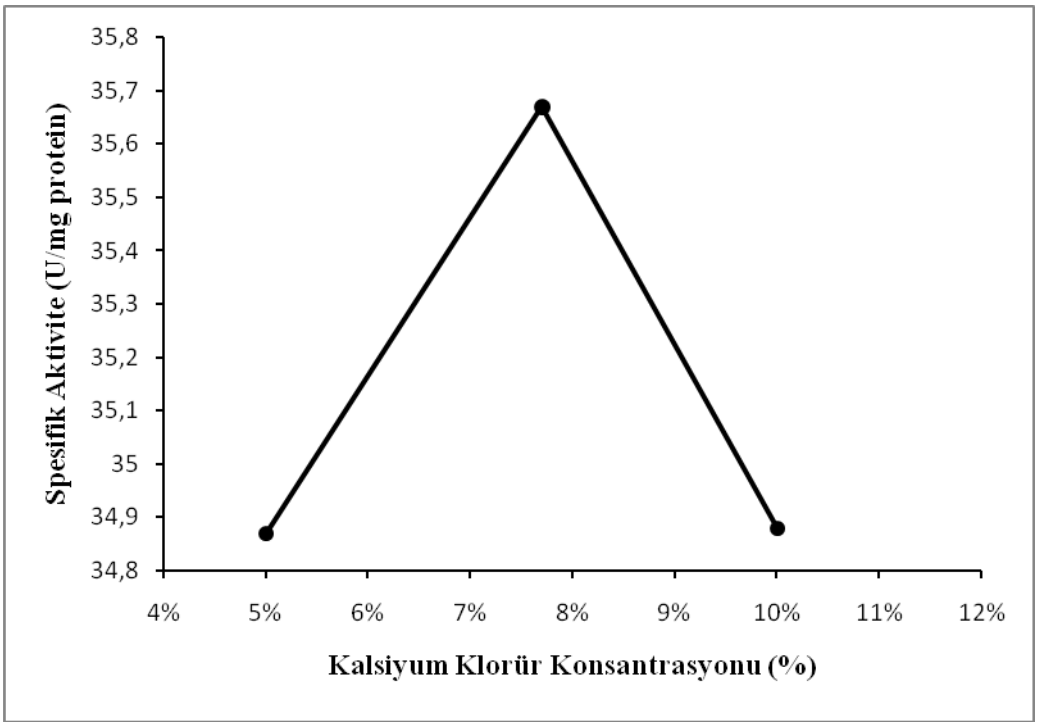


Şekil 4.4. *Candida rugosa* lipazının alginat+jelatin jel karışımlarına immobilizasyonuna alginat konsantrasyonun etkisi

4.3.3. Kalsiyum Klorür Konsantrasyonu Optimizasyonu

Candida rugosa lipazının alginat+jelatin jel karışımlarında immobilizasyonunda optimum Kalsiyum klorür konsantrasyonun belirlenmesi için % 5, % 7.7 ve % 10 konsantrasyonlarda hazırlanan alginat jellerde immobilizasyonlar gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.5'de verilmiştir.

Yapılan protein tayini ve immobilize lipazın aktivite sonuçları değerlendirildiğinde; en yüksek enzim aktivitesi % 7.7'lik kalsiyum klorür konsantrasyonunda gözlendi. Bundan sonraki immobilizasyonlarda kalsiyum klorür konsantrasyonunun % 7.7 olarak çalışılmasına karar verildi.

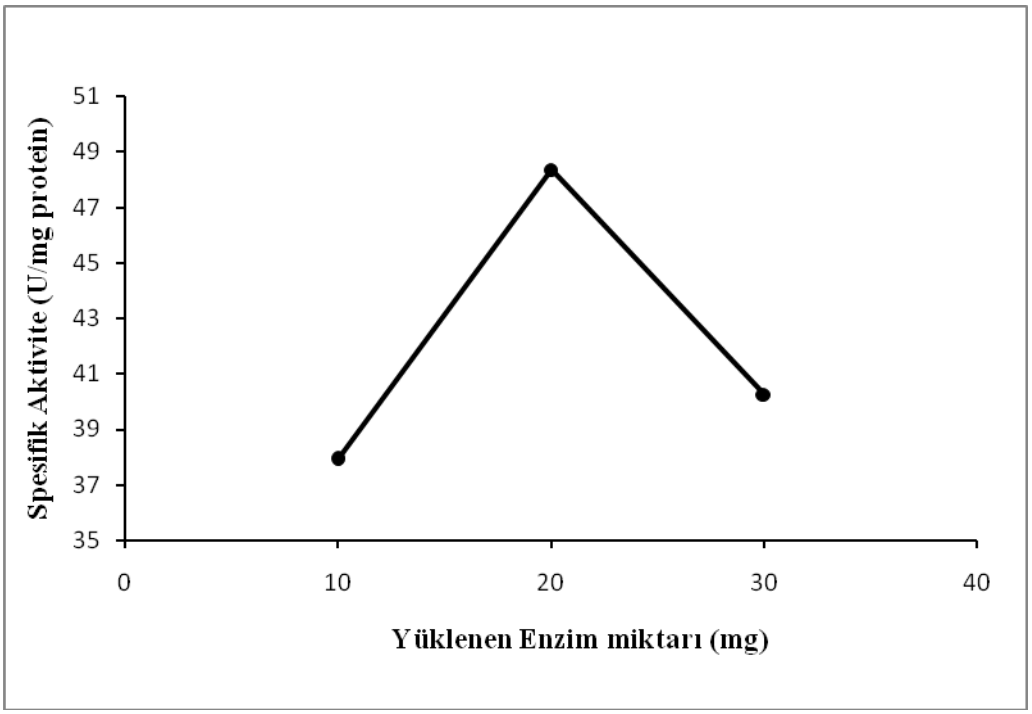


Şekil 4.5. *Candida rugosa* lipazının alginat+jelatin jel karışımlarına immobilizasyonuna $CaCl_2$ konsantrasyonun etkisi

4.3.4. Enzim Miktarı Optimizasyonu

Candida rugosa lipazının alginat+jelatin jel karışımlarında immobilizasyonunda optimum optimum enzim konsantrasyonun belirlenmesi için 10 mg/mL olacak şekilde hazırlanan enzim çözeltisinden 1, 2 ve 3'er ml alınarak immobilizasyonlar Bölüm 3.2.4.4'de belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.6'da verilmiştir.

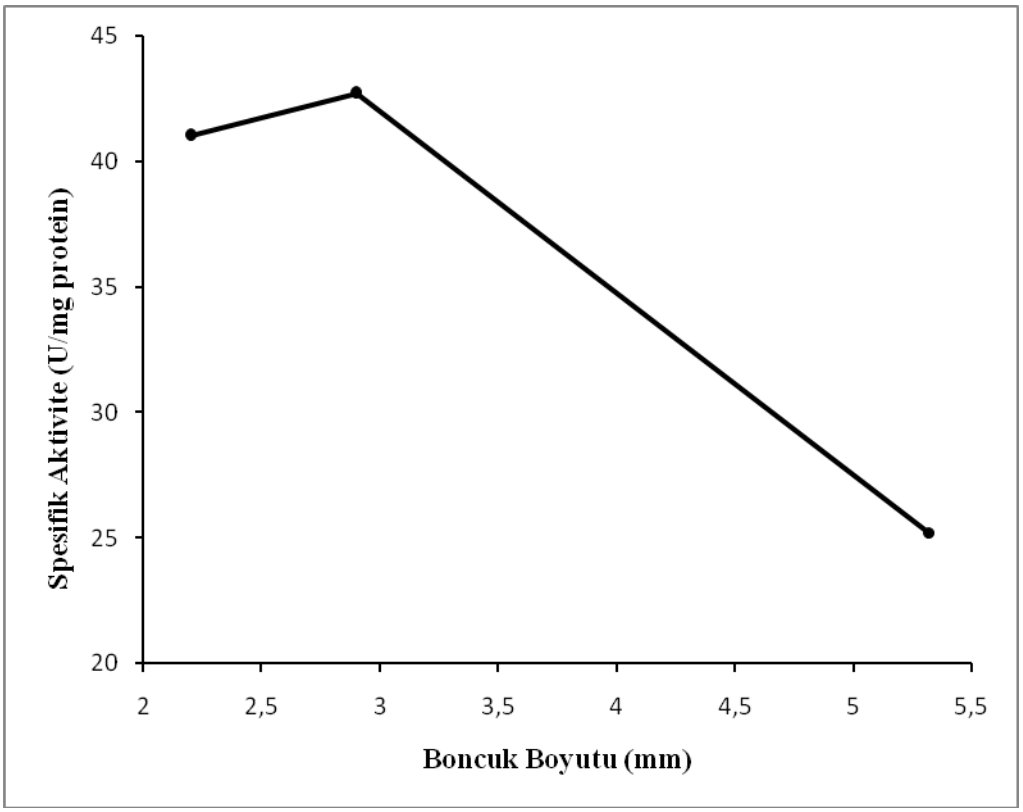
Elde edilen boncukların aktivitelerini gösteren grafikler çizildiğinde en yüksek aktivite 2 ml enzim kullanılarak yapılan immobilizasyonda gözlendi. Bundan sonraki çalışmalarda 20 mg/mL konsantrasyonda enzim çözeltisinin kullanılmasına karar verildi.



Şekil 4.6. *Candida rugosa* lipazının alginat+jelatin jel karışımlarına immobilizasyonuna enzim konsantrasyonun etkisi

4.3.5. Boncuk Boyutu Optimizasyonu

Boncuk boyutu optimizasyonu için; siyah enjektör ucu, yeşil enjektör ucu ve pastör pipeti kullanıldı. Kumpasla yapılan ölçümlerde boncukların çapları sırasıyla 2.2 mm, 2.9 mm, 5.32 mm olarak berilendi. En yüksek enzim aktiviteleri yeşil uçlu enjektör kullanılarak elde edilen 2.9 mm çapında boncuklarla elde edildi (Şekil 4.5).

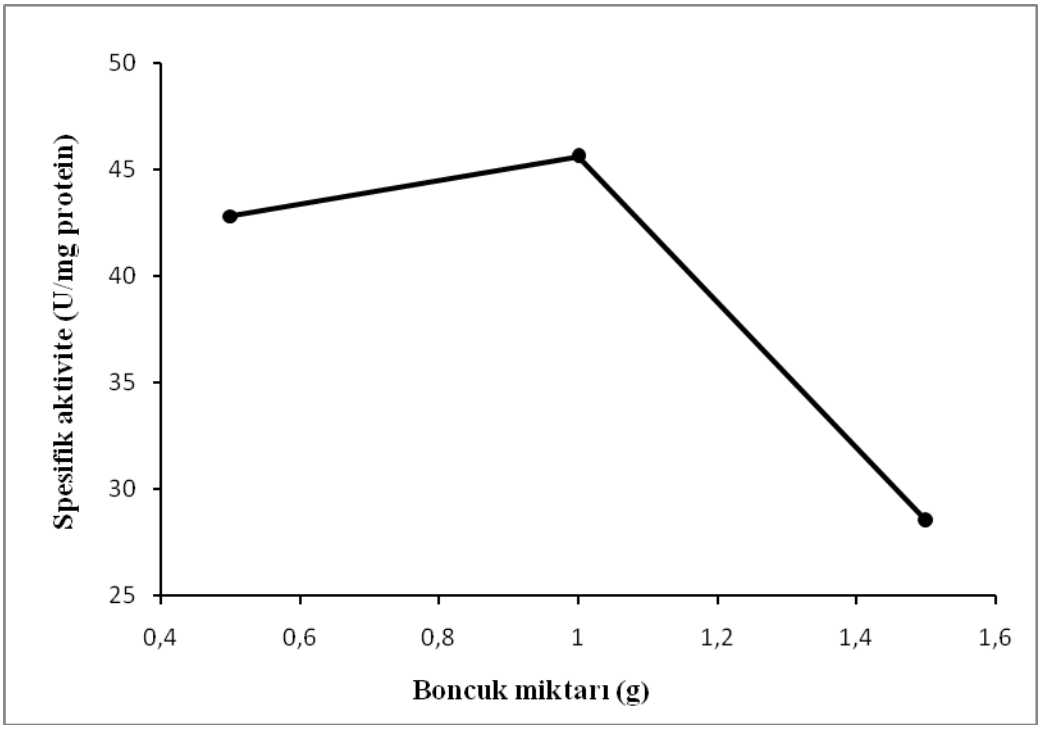


Şekil 4.7. *Candida rugosa* lipazının alginat+jelatin jel karışımlarına immobilizasyonuna boncuk boyutunun etkisi.

4.3.6. Boncuk Miktarı Optimizasyonu

% 15 jelatin ve % 2 sodyum alginattan oluşan jel karışımlarına eklenen 2 mL enzim çözeltisiyle elde edilmiş olan immobilize enzim yeşil uçlu enjektör yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde, buz banyosu içinde bulunan % 7.7' lik $CaCl_2$ çözeltisine damlatılarak boncuklar elde edildi. Optimum boncuk miktarının belirlenmesi için; 0.5, 1 ve 1.5 g boncuk kullanıldı.

Elde edilen sonuçlar şekil 4.6'da verilmiştir. Optimum boncuk miktarı 1 g olarak belirlendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.8. Alginat+jelatin jel karışımlarına immobilize *Candida rugosa* lipazının aktivitesine boncuk miktarının etkisi.

Candida rugosa lipazının alginat+Jelatin jel karışımlarında tutuklanma koşulları Tablo 4.1'de görüldüğü gibi optimize edilmiştir.

Tablo 4.1. *Candida rugosa* lipazının Alginat ve Jelatin jel karışımlarında tutuklanmasının optimizasyon sonuçları

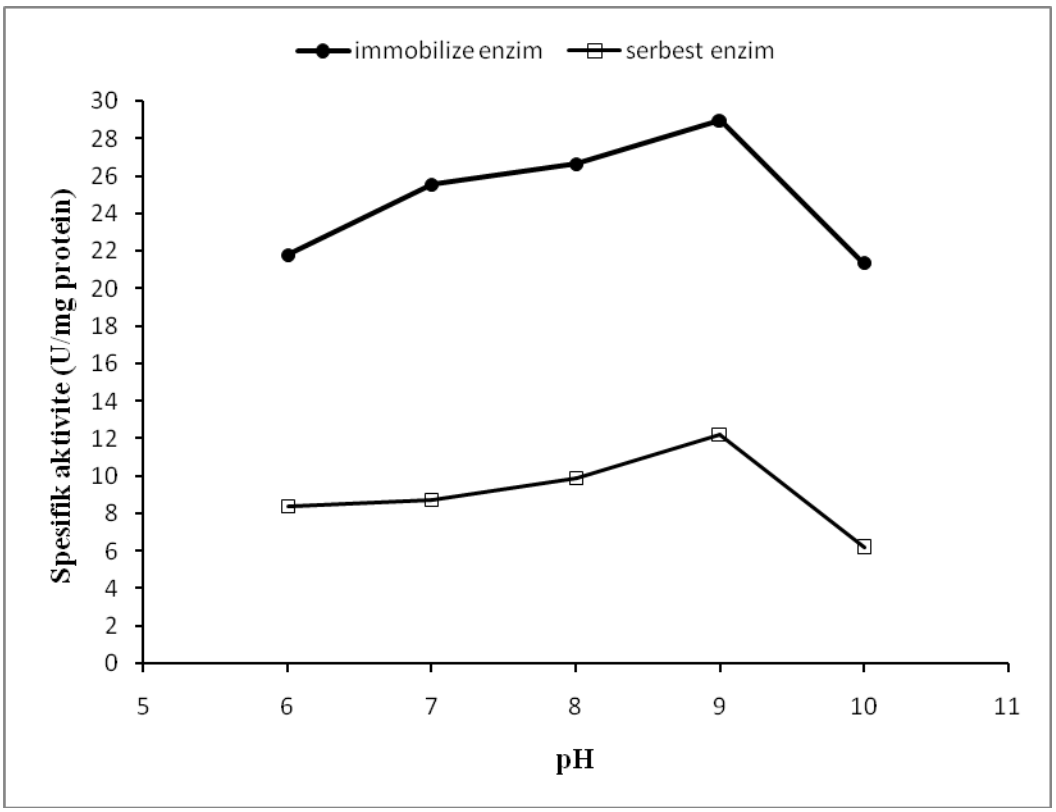
Optimize Edilen İmmobilizasyon Koşulu	**Optimum Sonuç**
Jelatin Konsantrasyonu	%15
Alginat Konsantrasyonu	%2
$CaCl_2$ Konsantrasyonu	% 7.7
Enzim Miktarı	20 mg
Boncuk Boyutu	2.9 mm
Boncuk Miktarı	1 g

Çalışmanın devamında bu optimum koşularda elde edilen elde edilen 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 ve Jelatin Jel Karışımlarında İmmobilize *Candida rugosa* lipazının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

4.4.1. Optimum pH

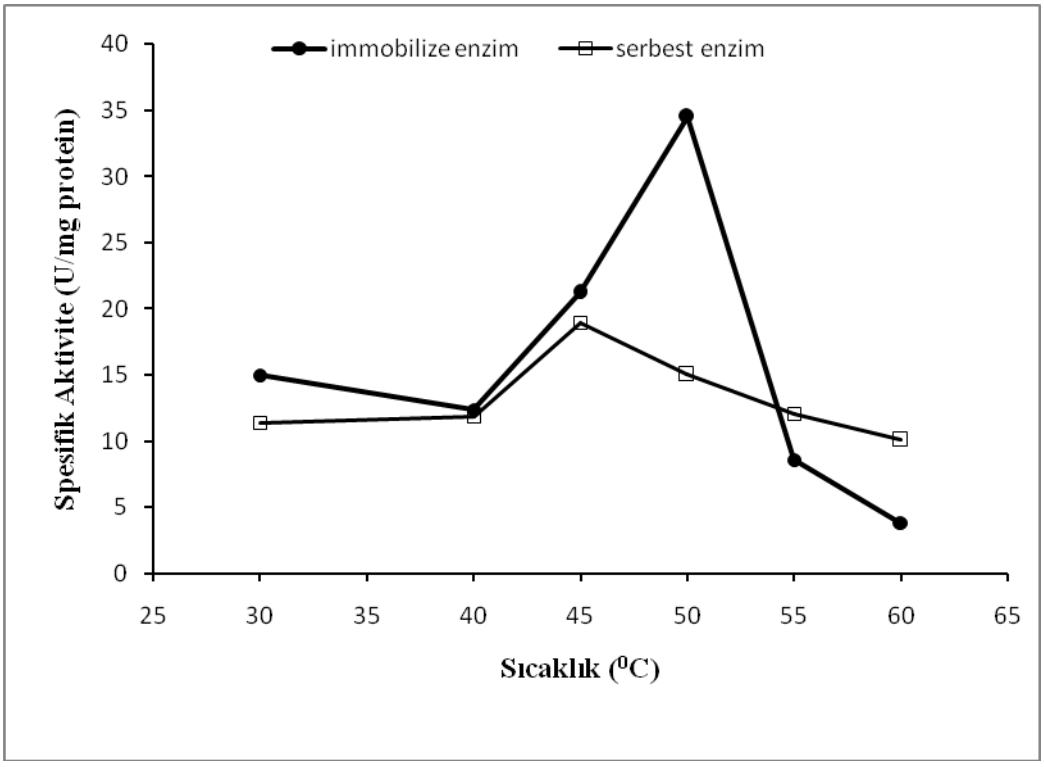
Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının maksimum aktivite gösterdiği optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla pH 6-7 için Tris HCl-maleat tamponu; pH. 7-8-9 için Tris-HCl tamponu; pH 9-10 için Sodyum karbonat tamponu kullanıldı. Farklı tamponlarla hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılarak, serbest ve immobilize enzimin aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlar ile aktivite-pH grafikleri oluşturuldu (Şekil 4.7). Serbest ve immobilize lipazların her ikisi içinde optimum pH 9.0 olarak belirlendi.



Şekil 4.9. Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının pH'a bağlı aktivitelerinin değişimi

4.4.2. Optimum Sıcaklık Tayini

Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının maksimum aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değerlerini belirlemek için 30, 40, 45, 50, 55 ve 60 °C sıcaklıklarda lipaz aktiviteleri belirlendi ve aktivite- sıcaklık grafikleri çizildi (Şekil 4.10). Serbest enzim için optimum sıcaklık değeri 45 ºC olarak belirlendi. Alginat+jelatin jel karışımında tutuklanmış enzim için ise optimum sıcaklık 50 ºC olarak belirlendi.



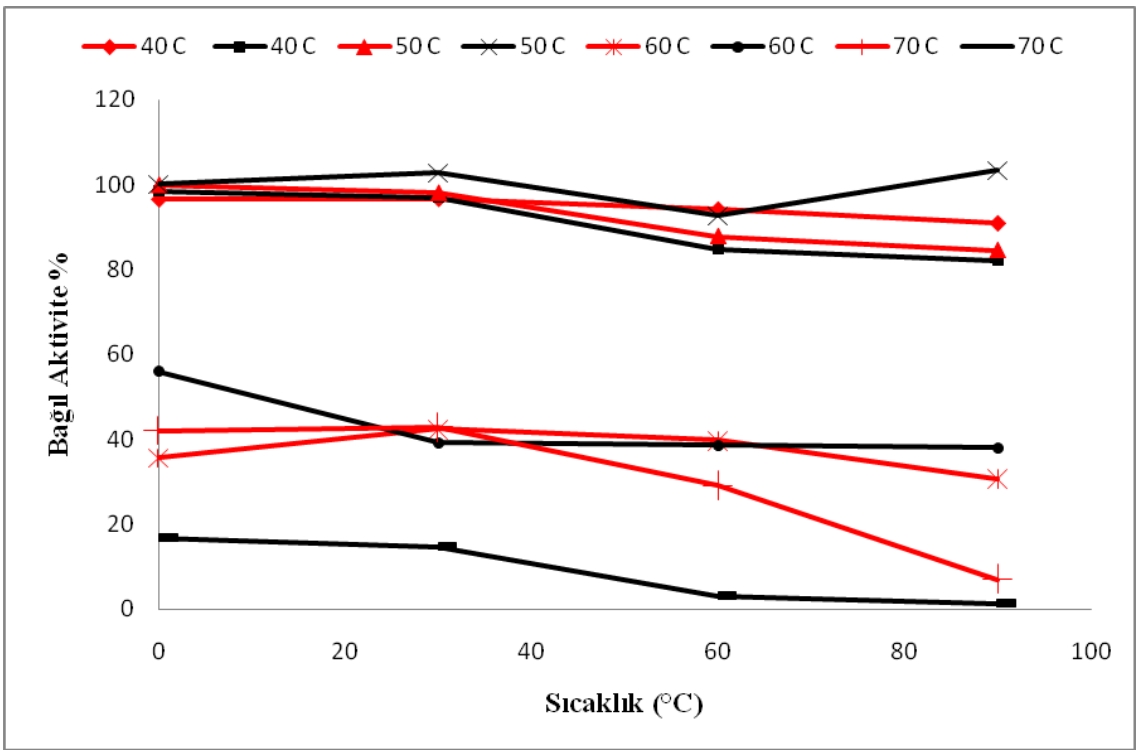
Şekil 4.10. Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının sıcaklığa bağlı aktivitelerinin değişimi

4.4.3. Termal Kararlılık Çalışması

Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının termal kararlılığını belirlemek için; serbest ve alginat-jelatin karışımına immobilize *Candida rugosa* lipazı ayrı ayrı 40, 50, 60 ve 70 °C sıcaklıklarda bekletilerek 30'ar dakika aralıklarla 0., 30., 60. ve 90.

dakikalarda 0.2 M Tris-HCl tamponunda (pH 7.2) hazırlanan substrat çözeltisi kullanılarak Bölüm 3.2.3'de anlatıldığı gibi lipaz aktiviteleri belirlendi.

İmmobilize enzimin 50, 60 ve 70 °C'lerde aktivitesini koruduğu en yüksek aktiviteyi 50 °C'de gösterdiği gözlendi. Serbest enzimin ise 60 °C'de aktivitenin azaldığı 70 °C'de ise aktivitesini tamamen kaybettiği gözlendi (Şekil 4.9).

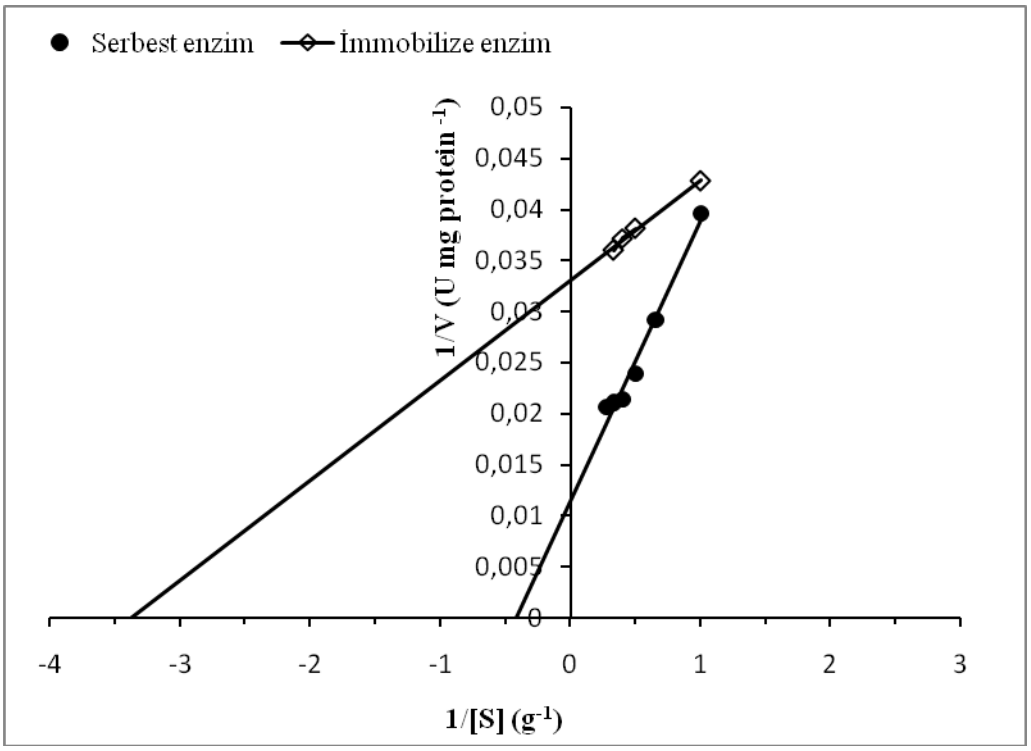


Şekil 4.11. Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının termal kararlılık grafiği (siyah; serbest enzim, kırmızı; immobilize enzim)

4.4.4. *Candida rugosa* Lipazının K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla, 0.25, 0.5 1.0, 2.0 ve 3.5 g zeytin yağı ve 0.2 M Tris-HCl tamponu (pH:7.2) kullanılarak hazırlanan farklı konsantrasyondaki substrat çözeltileri

yardımıyla serbest ve alginat-jelatin jel karışımında immobilize lipazının aktivite tayinleri yapıldı. Spesifik aktivite değerleri kullanılarak Linewear-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.10). K_m ve V_{max} değerleri grafikten yararlanılarak hesaplandı.



Şekil 4.12. Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının Linewear-Burk grafiği

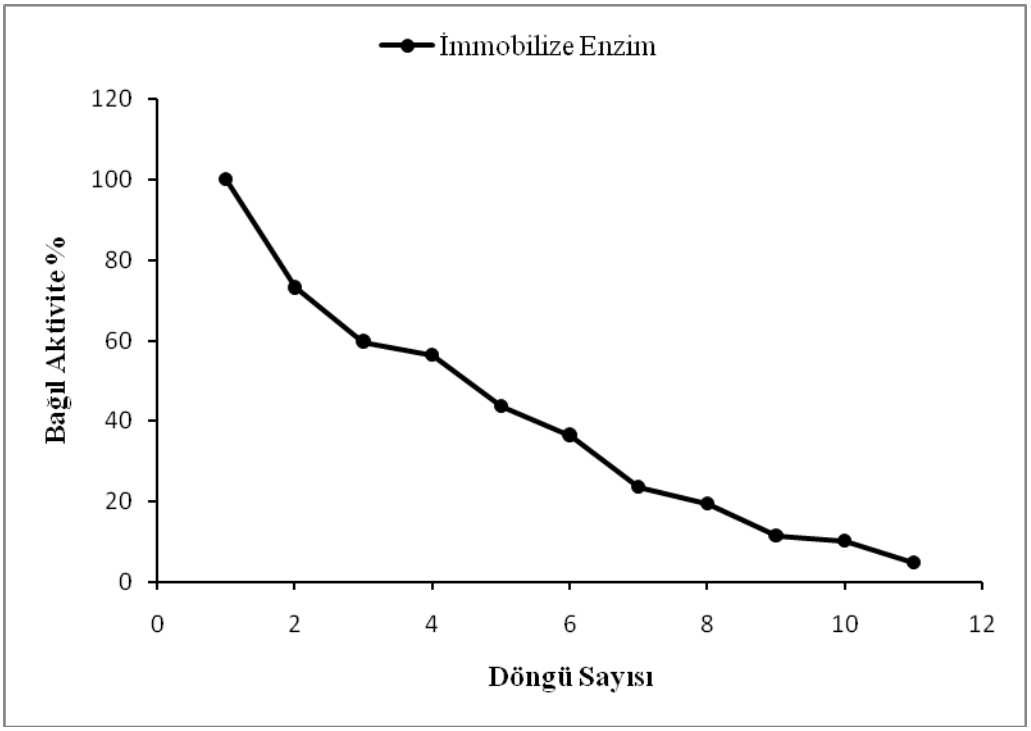
Tablo 4.2. Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının kinetik değerleri

	K_m (mM)	**V_{max}**	**V_{max} / K_m**
Serbest Lipaz	0.29	30.3	104.5
İmmobilize Lipaz	2.5	83.33	33.33

4.4.5. İmmobilize Enzimlerin Tekrar Kullanılabilirliği

Alginat-jelatin jel karışımında immobilize *Candida rugosa* lipazının yeniden kullanılabilirliğini belirlemek için; 2 g boncuk kullanılarak boncukların lipaz aktivitesi

kaybolunca ya aynı boncuklarla 11 döngü olarak gerçekleştirildi. 5. Döngüde aktivitenin % 40'ının korunduğu sonra aktivitenin azaldığı görüldü. Alginat+jelatin boncuklara immobilize lipazın yeniden kullanılabilirlik çalışmasında immobilize enzimin hidrolitik aktivitesini 3 döngü süresince % 60'sını, koruduğu, 5. döngüde başlangıçtakinin yaklaşık % 44'ünü koruduğu görülmüş, 10. döngüde ise aktivitesinin tamamına yakınını (% 95.2 'sini) kaybettiği belirlenmiştir (Şekil 4.12).

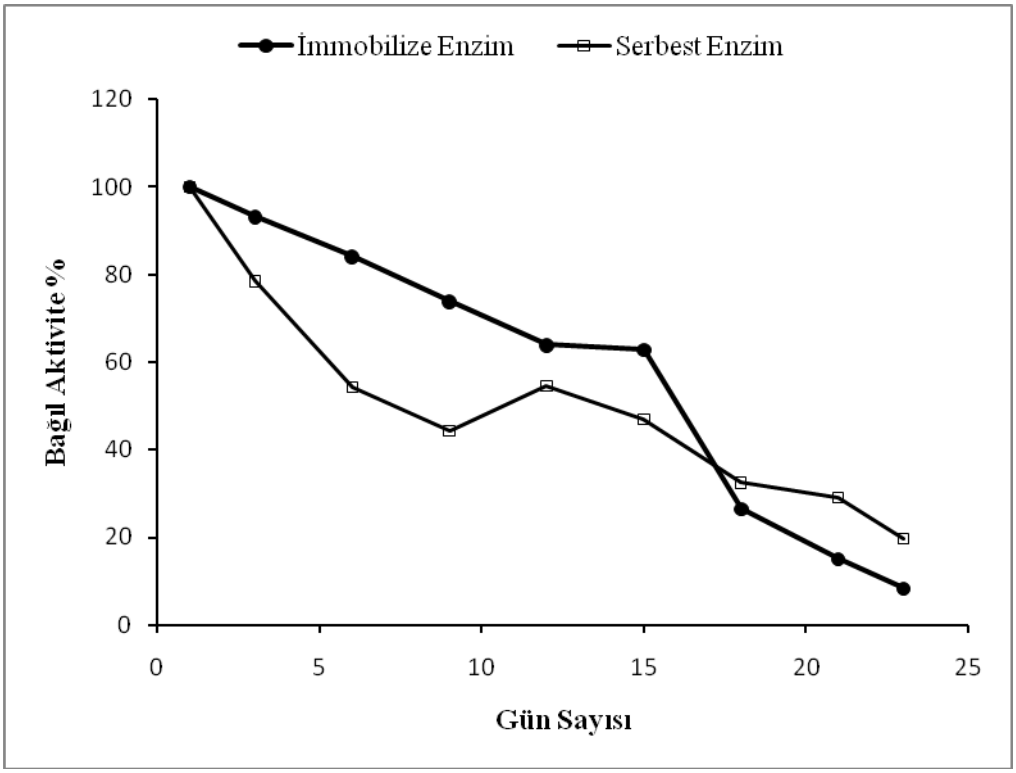


Şekil 4.13. İmmobilize *Candida rugosa* lipazının kesikli prosesle yeniden kullanılabilirliği

4.4.6. İmmobilize Enzimin Depo Kararlılığı

Serbest ve alginat+jelatin boncuklara immobilize *Candida rugosa* lipazının depo kararlılığını belirlemek amacıyla; serbest ve immobilize enzimin aktivite tayinleri 3 gün aralıklarla gerçekleştirildi.

Hem serbest hem immnobilize lipazın 18. günün sonunda aktivitesini %20 koruduğu belirlendi.



Şekil 4.14. Serbest ve alginat+jelatin boncuklara immobilize *Candida rugosa* lipazının depo kararlılığı grafiği

4.4.7. Substrat Spesifitesi

Serbest ve immobilize *Candida rugosa* lipazının substrat spesifitesinin belirlenmesi amacıyla; substrat olarak zeytinyağı yerine gliseril tributirat, trikaprilin, gliseril tristearat, aspir yağı, soya yağı, defne yağı, ham kanola yağı, ham ayçiçek yağı, ham mısır yağı, ham zeytinyağı ve rafine fındık yağı kullanılarak aktiviteleri belirlenmiştir.

Tablo.4.3. Serbest ve immobilize enzimlerin farklı substratlara karşı verdikleri farklı spesifik aktivite değerleri

Substrat	**İmmobilize enzim (Bağıl aktivite %)**	**Serbest enzim (Bağıl aktivite %)**
1-Ham mısır yağı	**162.3**	**67.04**
2-Ham kanola yağı	**160**	**84,58**
3-Ham zeytin yağı	**100**	**100**
4- Defne yağı	**87,23**	**56,81**
5-Ham ayçiçeği yağı	**57.42**	**71.62**
6-Aspir yağı	**43.25**	**74.40**
7-Rafine fındık yağı	**24,30**	**32.27**
8-Soya yağı	**23,18**	**69.44**
9- Trikaprilin	**111.75**	**126.3**
10- Gliseriltributirat	**90.53**	**503.1**
11- Gliseriltristearat	**62.93**	**20.97**

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

İmmobilizasyon tekniklerinden biri olan tutuklama tekniği, bir boşluğa veya ağ içine enzimin fiziksel olarak hapsedilmesi olarak tanımlanabilir. Multivalent karşıt iyonların eklenmesiyle polianyonik veya polikatyonik polimerlerin jelleşmesi şeklinde uygulanan enzim tutuklaması enzim immobilizasyonunda kullanılan basit ve yaygın bir metottur (Mammeralla ve Rubiolo, 2005). Prensip olarak tutuklama enzim molekülünü belirli bir mekanda durmaya zorlamaktır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Çalışma kapsamında, *Candida rugosa* lipazının immobilizasyonu amaçlanmış olup, immobilizasyon alginat+jelatin jellerde gerçekleştirilmiş ve serbest ve immobilize lipazın optimum pH ve sıcaklık, K_m ve V_{max} kinetik sabitleri, termal kararlılık, yeniden kullanılabilirlik ve depo kararlılığı gibi bazı biyokimyasal özellikleri incelenmiştir.

Lipazlar (EC.3.1.1.3, triaçilgliserol açil hidrolaz) hayvansal ve bitkisel yağların normal koşullar altında tersinir hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Bunun dışında esterifikasyon, transesterifikasyon gibi reaksiyonları da katalizlemektedir. Bu çalışmada ticari bir mikrobiyal lipaz olan *Candida rugosa* lipazı enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Candida rugosa lipazı alginat+jelatin jel karışımında tutuklanmış ve bazı biyokimyasal özellikleri serbest enzimle karşılaştırılmıştır. 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. Jelatin jeller ise ılımlı immobilizasyon koşulları sağlar. Her iki polimer maddenin karışımı kullanılarak ideal bir tutuklama materyali oluşturulmaya çalışılmıştır.

Bu tez kapsamında protein tayinleri Bradford metodu ile yapılmıştır. Bradford yönteminde standart protein olarak % 0.001'lik sığır serum albümini kullanılmış,

standart grafik çizilmiştir (Şekil 4.1). Çalışmada lipaz çözeltisinin ve immobilize enzimin damlatıldığı $CaCl_2$ çözeltilerinin ve yıkama sularının protein miktarları bu standart grafiklerden yararlanılarak belirlenmiştir. Bulunan protein miktarlarından, tutunmayan protein ve tutunan protein miktarları hesaplanarak immobilizasyon yüzdesi tayin edilmiştir.

Substrat olarak zeytin yağı kullanılarak yapılan çalışmada, immobilizasyon verimi % 60 olarak belirlenmiştir. İmmobilize enzimin spesifik hidrolitik aktivitesi 36 U/mg protein olarak belirlenmiştir. Serbest enzimin ise 20U/mg proteindir.

Tutuklama materyali olarak kullanılan polimerin yani jelin konsantrasyonu ve tutuklama çözeltisinin konsantrasyonu enzimin tutuklamasında önemli parametrelerdir. Bu nedenle öncelikle lipazın hidrolitik aktivitesi üzerine alginat ve jelatin konsantrasyonunun etkisi, $CaCl_2$ konsantrasyonu ayrıca enzim miktarı, boncuk boyutu ve boncuk miktarının etkileri de araştırılmış ve optimum değerleri belirlenmiştir

Sırasıyla; % 2.5, 5, 10, 15, 20 (w/v) olacak şekilde jelatin jellere immobilize enzimin spesifik hidrolitik aktivitesi tayinleri yapılarak, jelatin konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Her iki aktivite tayini sonucunda optimum jelatin konsantrasyonu % 15 olarak bulunmuştur (Şekil 4.3). % 1.5, % 2, % 2.5 (w/v) olacak (w/v) alginat konsantrasyonlarında immobilizasyonlar gerçekleştirilmiş ve hidrolitik aktivite tayinleri yapılarak, alginat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Optimum alginat konsantrasyonu % 2 olarak bulunmuştur (Şekil 4.4). Sodyum alginat ile gerçekleştirilen tutuklamalarında jel indükleyici sistem olarak $CaCl_2$ katyonik çözeltisi kullanılmaktadır. Çalışmada literatürde belirtildiği gibi alginat+jelatin jeller için $CaCl_2$ kullanılmaktadır. Optimum kalsiyum klorür % 7.7 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5).

Ca-alginat jel boncuklara tutuklu lipaz enzimi immobilizasyonu çalışmasında, alginat konsantrasyonu arttıkça immobilizasyon veriminin arttığı fakat $CaCl_2$ konsantrasyonu arttıkça immobilizasyon veriminin değişmediği görülmüştür (Won vd., 2005).

Alginat+jelatin boncuklara yüklenen enzim miktarının katalitik aktivite üzerine etkisi üç farklı enzim konsantrasyonu çalışılarak incelenmiştir. Enzim miktarıyla orantılı olarak aktivitenin de arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.6). Boncuklara yüklenecek enzim miktarının optimizasyon çalışmasında 20 mg/mL enzim konsantrasyonun optimum enzim miktarı olduğu gözlenmiştir.

Vaidya ve arkadaşları (2008) yüklenen enzim miktarı arttıkça, lipaz aktivitesinin arttığını gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada ise belli bir orandan sonra yüklenen enzim miktarı arttıkça lipaz aktivitesinin azaldığı gözlemlenmiştir.

Boncuk boyutunun aktivite üzerine etkisi çalışıldığında; en yüksek aktivite yeşil uçlu enjektörle hazırladığımız boncuklarda belirlenmiştir (Şekil 4.7). Yeşil uçlu enjektör kullanılarak elde edilen 2.9 mm'lik boncukların çapı optimum boncuk boyutu olarak belirlenmiştir.

Ca-alginat jel boncuklara tutuklu lipaz enzimi immobilizasyonu çalışmasında, boncuk boyutu arttıkça spesifik aktivitenin azaldığı görülmüştür (Won vd., 2005). Bu çalışmada ise yeşil uçlu enjektör kullanıldığında maksimum aktivite gözlemlenmiştir.

Kullanılacak optimum boncuk miktarını belirlemek için gerçekleştirilen çalışmada 0.5, 1.0 ve 1.5 g olmak üzere üç farklı boncuk miktarı ile çalışılmış; 1 gr boncuk miktarının en yüksek enzimatik aktiviteyi gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.8).

Bu optimizasyon çalışmasının tüm sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tezin ikinci kısmında; alginat + jelatinlerde tutuklanan *Candida rugosa* lipazına ait optimum pH ve sıcaklık, K_m ve V_{max} kinetik sabitleri, termal ve operasyonel kararlılık, yeniden kullanılabilirlik, depo kararlılığı ve substrat spesifitesi gibi bazı biyokimyasal özellikleri araştırılmıştır ve bunlara ait veriler raporlanmıştır.

İmmobilizasyon işlemi enzimin çalışma koşullarını daha ılımlı hale getiren bir metottur ve enzimin pH çalışma aralığını değiştirebilir veya genişletebilir. Serbest ve immobilize lipaz için optimum pH çalışması pH 6.0-10.0 aralığında yapılmıştır. Serbest

Candida rugosa lipazı ve alginat+jelatin jellerde tutuklanan lipazının her ikisi için de optimum pH değeri 9.0 olarak bulunmuştur (Şekil 4.9). Bu durum gerçekleştirilen immobilizasyon uygulamasının lipaz'ın optimum pH'ı üzerinde olumlu veya olumsuz bir değişiklik yapmadığını göstermektedir.

Hidroksil grupları aktivasyonuyla kitosan üzerine *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 (Chiou 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. İmmobilizasyon çalışmalarında optimum pH'ın değişimi enzimin yüküne veya kullanılan matrikse bağlıdır. Bu değişim, enzimin yapı-fonksiyon ilişkisinin anlaşılmasında yardımcı olur.

Alginat+jelatin jellere tutuklanmış *Candida rugosa* lipazı immobilizasyonu üzerine sıcaklığın etkisi belirlemek amacıyla; 30, 40, 45, 50, 55, 60 ve 70 °C 'de sıcaklıklarda çalışılmıştır. Serbest enzimin optimum sıcaklığı 45 °C, tutuklanmış enzimin optimum sıcaklığı 50 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10).

İmmobilize *Candida rugosa* lipazı termal kararlılık çalışması 40, 50, 60 ve 70^{o}C sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.11). Hidrolitik lipaz aktivitesi sonuçları incelendiğinde serbest enzimin 1 saatin sonunda 40 °C de aktivitesinin tamamını koruduğu, 50 °C de aktivitesinin arttığı, 60 ve 70 °C 'lerde ise aktivitesinin ancak yaklaşık % 20 sini koruyabildiği gözlendi. Alginat+jelatin jellere immobilize edilmiş *Candida rugosa* lipazı tüm sıcaklıklarda aktivitesini koruduğu ve hatta 40^{o}C 'de aktivitesini % 60 arttırdığı gözlenmiştir. İmmobilize enzimin serbest enzime göre aktivitelerini korumada nispeten daha kararlı olduğu gözlenmiştir.

Vaidya ve arkadaşları (2008), optimum sıcaklığı belirlemek için 20 ile 70°C arasında çalışmışlar; 50°C'de serbest enzimin aktivitesinin sadece % 62.11'ini koruduğunu immobilize enzimin ise % 94.76'sını koruyabildiğini, 70°C'de serbest enzimin aktivitesinin % 9.33'ünü koruyabildiğini, immobilize enzimin ise aynı sıcaklıkta % 39.10'unu koruyabildiğini saptamışlardır.

Chiou ve Wu (2004), hidroksil grupları aktivasyonuyla kitosan üzerine *Candida rugosa* enzimi immobilizasyonu yaptıkları çalışmalarında termal kararlılık için 25°C'den 60°C'ye değişen sıcaklıklarda 1 saat boyunca çalışmışlardır. 30°C'den sonra serbest enzimin aktivitesini kaybetmeye başladığını görmüşlerdir. 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 kararlığı olduğu görülmektedir. Genel olarak optimum sıcaklık aralıklarının dışında serbest enzim üç boyutlu yapısının denatüre olması nedeniyle aktivitesini kaybedebileceği düşünülür. İmmobilizasyon ise enzim uygulamalarında onlara termal stabilite kazandıran bir uygulamadır. Bu çalışmada da 60- 70°C gibi yüksek sıcaklıklarda immobilize formlar incelendiğinde, genel olarak aktivitelerini serbest enzimden daha iyi korudukları gözlenmiştir.

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 bulunmuştur. 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 dissosiye olur. V_{max} sabiti ise enzimin aktifliğinin bir ölçüsüdür. Enzim ne kadar aktif ise V_{max} o derece yüksektir. Serbest enzim ve alginat+jelatin boncuklarda tutuklanan enzimin hidrolitik aktivitesine ait K_m ve V_{max} kinetik sabitleri sırasıyla 0.29 g ile 30.3

U/mg protein ve 2.5 g ile 83.3 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. Tüm sonuçlar Tablo 4.2' de verilmiştir.

Chiou ve Wu (2004), hidroksil grupları aktivasyonuyla kitosan 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+jelatin boncuklara immobilize lipazın yeniden kullanılabilirlik çalışmasında immobilize enzimin hidrolitik aktivitesini 3 döngü süresince % 60'sını, koruduğu, 5. döngüde başlangıçtakinin yaklaşık % 44'ünü koruduğu görülmüş, 10. döngüde ise aktivitesinin tamamına yakınını (% 95.2 'sini) kaybettiği belirlenmiştir (Şekil 4.12).

Chiou ve Wu (2004), hidroksil grupları aktivasyonuyla kitosan 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. kullanımda aktivitesinin % 72'sini koruduğunu gözlemlemişlerdir.

Serbest enzim çözeltisi depolama sırasında genelde kararlı değildir ve aktivitesi yüksek oranda azalır. İmmobilizasyon, 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+jelatin jelde tutuklanan immobilize enzimin yaklaşık 20 gün boyunca aktivitesini de kaybetmeden uzun süre kullanılabileceği gözlenmiştir (Şekil 4.13). 4 °C 'de depolanan serbest enzim çözeltisi için 20 gün boyunca aktivite ölçümleri yapılmış, onun da aktivitesini koruduğu

gözlenmiştir. Bu sürelerin sonunda her iki aktivite için enzim çözeltisinde mikrobiyal üreme olabileceği düşünülerek aktivite tayini sona erdirilmiştir.

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 aktivasyonuyla kitosan 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; gliseril tributirat, trikaprilin, gliseril tristearat, aspir yağı, soya yağı, defne yağı, ham kanola yağı, ham ayçiçek yağı, ham mısır yağı, ham zeytinyağı ve rafine fındık yağı kullanılarak aktivite tayinleri gerçekleştirilmiş, kullanılan tüm substratlar için değişen aktivite sonuçları alınmıştır. Sonuçlar Tablo 4.3'de verilmiştir. Substrat spesifitesi incelendiğinde immobilize formdaki karşılaştırma; Ham mısır yağı>Ham kanola yağı>Trikaprilin>Ham zeytin yağı>Gliseril tributirat>Defne yağı>gliseril tristearat> Ham ayçiçek yağı> Aspir yağı> Rafine fındık yağı> Soya yağı şeklindedir

Sonuç olarak; bu tez kapsamında; ticari *Candida rugosa* lipazı tutuklama yöntemiyle alginat+jelatin jellere başarıyla immobilize edilmiş, optimum çalışma koşulları belirlenmiştir. Ayrıca 9 adet yağ çeşidi ve 3 adet trigliserid ile hem serbest hem de immobilize *Candida rugosa* lipazının substrat seçiciliği belirlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. 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.
2. Alberghina L., Lotti M., (1998). "Lipases and lipids: structure, specificity and applications in biocatalysis", *Chem. Phys. Lipids.* 93.
3. Al-Duri B., Robinson E., MacNerlan S., Bailie P., (1995), "Hydrolysis of edible oils by lipases immobilized on hydrophobic supports : effect of internal support structure, *J. Am. Oil Chem. Soc*. 72, 1351.
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. Bosley J.,(1997), " Turning lipases into industrial biocatalysts", *Biochem. Soc. Trans.* 2, 174.
7. Bradford,M. M., (1976) "A rapid and Sensitive nethod for the quantit;tion of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" *Anal.Bichem.*,72, 248-252
8. Brady C., Metcalfe L., Slaboszewski D., Frank D., (1986). "Hydrolysis of liq. fats using lipase adsorbed on porous substrate of untreated microporous polyolefin, from aq. medium, using fixed bed or stirred reactors" *US Patent* No. 4, 629, 742.
9. Brady C., Metcalfe L., Slaboszewski D., Frank D., (1988) "Enzymatic interesterification of fats: factors influencing the choice of support for immobilized lipase" *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 917.
10. Brady C., Metcalfe, L., Slaboszewski D., Frank D., (1987), "Di- aphragm for hydrolysis of fats. Comprisinf layer of hy- drophobic filter cloth layer of lipase immobilised on micro- porous polymer fibres and retaining screen" *US Patent* .4,678,580.
11. Brink L.E.S., Luyben T.J., Cham K., Van't Riet K., (1988). " Bio-catalysis in organic media", *Enzyme Microb. Technol.* 10, 736.

12. Cabral P., Fonseca M., Ferreira-Dias S., (2010), "Esterification activity and operational stability of *candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams in the production of ethyl butyrate" *Biochemical Engineering Journal.* 48, 246-252

13. Çelebi, S., (1980)." Trigliseridlerin serbest ve tutuklanmış Candida Lipaz Hidrolizinin Kinetiği". *Hacettepe Ün. Doktora Tezi*. 111s, Ankara.

14. Chi M., Lyu R., Lin L., Huang H., (2008), "Characterization of *Bacillus kaustophilus* leucine aminopeptidase immobilized in Ca-Alginate/k-carrageenan beads" *Biochemical Engineering Journal,* 39, 376-382.

15. Chiou S.-H., Wu W.-T., (2004). "Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups" *Biomaterials*, 25, 197-204.

16. Esposito E., Cortesi R., Nastrazzi C., (1995), "Gelatin Microspheres: Influence of Preparation Parameters and Thermal Treatment on Chemico-Physical and Biopharmaceutal Properties", *Biomaterials*, 20, 2009-2020.

17. Fadnavis N. W., Sheelu G., Kumar B. M., Mahendra U., Bhalerao Ashlesha A., Deshpande , (2003), "Gelatin blends with alginate: Gels for lipase immobilization and purification" *Biotecnology progress*, 19, 557-564.

18. Farooqui A. A., Taylor W. A., Horrocks L. A., (1987). "Phospholi-pases, lysophospholipases and lipases and their involvement in various diseases", *Neurochem. Pathol*. 7, 99.

19. Fraser, J. E., Bickerstaff, G. F., (1997) "Entrapment in Calcium Alginate", Methods in enzymology, Humana Press, *New Jersey*, 61-65.

20. Garcia H.S., Malcata F.X., Hill C.G., Amundson C.H., (1992) "Use of *Candida a rugosa* lipase immobilized in a spiral wound membrane reactor for the hydrolysis of milkfat" *Enzyme Microb. Technol*. 14, 535.

21. Gitlesen T., Bauer M., Adlercreutz P., (1997). "Adsorption of lipase on polypropylene powder", *Biochem. Biophys. Acta*, 1345, 188.

22. Hedstrom G., Backlund S., Eriksson F., Karlsson S., (1997), "Lipase-catalysed stereoselective esterifications using gelatin-based Hydrogels" *Department of Physical Chemistry,* 10, 379-384.

23. Hertzberg, L. Kvittingen, T. Anthosen, G., (1992). “Skjak-Brack, Alginate as immobilization matrix and stabilizing agent in two phases liquid system: application in lipasecatalyzed reaction”, *Enzyme Microb. Technol*. 14, 42.

24. Hoppe A., Theimer R. R., (1996). “Titrimetric test for lipase activity using stabilized triolein emulsions”. *Phytochemstry*, 42, 973-978

25. Jaeger, (1997). “Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by in vitro evolution”, *Angew Chem. Int. Ed. Engl*. 36, 2830.

26. 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.

27. Kaimal T.N.B., Saroja M, (1989). “Enhancement of catalytic activity of porcine pancreatic lipase by reductive alkylation”, *Biotechnol. Lett.* 11, 31.

28. Kaimal T.N.B., Saroja M., (1989). “The active site composition of porcine pancreatic lipase: possible involvement of lysine, Biochim”. *Biophys. Acta* 999, 331.

29. Kilara A., Shahani C.R.C., (1977). “The use of immobilized enzymes in the food industry”, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 12, 161.

30. Kilara A., Shahani K.M., Wagner K.W., (1977). “Preparation and properties of immobilized papain and lipase”, *Biotechnol. Bioeng*. 19, 1703.

31. Kimura Y., Tanaka A., Sonomoto K., Nihira T, Fukui S., (1983). “Application of immobilized lipase to hydrolysis of triacyl- glyceride”, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17, 107.

32. Klibanov A.M., (1989). “Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents”. *TIBS* 14,141.

33. Lee S., Doan T., Won K., Ha S., Koo Y., (2010), “Immobilization of lipase within carbon nanotube–silica composites for non-aqueous reaction systems” *Journal Molecular Catalysis*, 62, 169-172.

34. Macrae A.R., in: Tramper J., van der Plaas H.C., Linko P., Eds., (1985). “Biocatalysts in Organic Syntheses” Elsevier, *Amsterdam,* 195.

35. Mammarella E. J., Rubiola C. A., (2005), “Study of the deactivation of *β*-galoctosidase entrapped in alginate-carrageenan gels, *Journal of Molecular Catalysis*, 34, 7-13.
36. Mammeralla, 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.
37. Marlot C., Langrand G., Triantaphylides C., Baratti J., (1985). “Ester synthesis in organic solvent catalyzed by lipases immobilized on hydrophilic supports”, *Biotechnol. Lett*. 7, 647.
38. Michaux F., Zoumpanioti M., Papamentzelopoulou M., Jose M., Blin J. L., Xenakis A., (2010), “Immobilization and activity of Rhizomucor miehei lipase. Effect of the matrix properties prepared from nonionic fluorinated surfactants” *Process Biochemistry*, 45, 39-46.
39. Miletic N., Abetz V., Ebert K., Loos K., (2010), ” Immobilization of Candida antarctica lipase B on Polystyrene Nanoparticles” *Macromoleculer Journals*, 31, 71-74.
40. Monier M., Wei Y., Sarhan A., (2010) “Evaluation of the potential of polymeric carrier based on photo-crosslinkable chitosan in the formulation of lipase from of Candida rugosa immobilization” *Journal Molecular Catalysis*, 63,93-101.
41. Monsan P., (1982). “Les enzymes, production et utilisations industrielles”, *Gauthier-Villars Ed*. 91.
42. Montero S., Blanco A., Virto M., Landeta L., Agud I., Solozabal R., Lascaray J.M., Renobales M, Llama M.J., Serra J.L., (1993) “ Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme” *Enzyme Microb. Technol.* 15, 239.
43. Nagao A., Kito M., (1990). “Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid esters useful in the food industry: e.g. triglyceride preparation using lipase in reversed micelles: a review”, *Biocatalysis* 3, 295.
44. Norouzian D., Javadpour S., Moazami N., Akbarzadeh A., (2002). “Immobilization of whole cell penicilin G acylase in open pore gelatin matrix”. *Enzyme and Microbial Technology* 30, 26-29.

45. Öztürk B., (2006). "Lipaz enzimi: yapısal özellikleri ve uygulama alanları". *Gıda mühendisliği dergisi,* 20-23
46. Ozyılmaz G., Gezer E., (2009), "Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel, *Journal of Molecular Catalysis,* xxx-xxx
47. Paiva, A.L., Balcao, V.M., Malcata F.X., (2000). "Kinetics andmechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases". *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 187.
48. 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.
49. Pişkin, E., (1986) "Biyosensörler. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji". *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir*. 205-223
50. Rose P. J., Mark H.F., Bikales N.M., Overberg C.G., Menges G., Kroschwitz J.I., (1987), "Encyclopedia of Polymer Science and Engineering", *2nd. Ed., Wiley Interscience, New York,* 7, 89.
51. Ruckenstein E, Wang X., (1993), "A novel support for the immobi- lization of lipase and the effects of the details of its preparation on the hydrolysis of triacylglycerides", *Biotech- nol. Tech*. 7, 117.
52. Scardi (V., 1987), **"**Immobilization of Enzymes and Microbial Cells in Gelatin, Methods in Enzymology", 135, 293-294.
53. Schmidt R.D., Verger R., (1998). "Lipases: interfacial enzymes with attractive applications", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 37, 1608.
54. Shinomura T., Asaoka Y., Oka M., Yoshida K., Nishizuka Y., (1991). "Synergistic action of diacylglycerol and unsatu- rated fatty acid for protein kinase C activation: its possible implications". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88**,** 5149.
55. Svensson P., Adlercreutz B., Mattiasson B., (1990) "Interesterifica- tion of phosphatidylcholine with lipases in organic media, Appl" *Microbiol. Biotechnol*. 33**,** 255.

56. Telefoncu, A., 1997, "İmmobilize enzimler" Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu Kuşadası-AYDIN,193-247.
57. 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.
58. Vardar-Sukan F. (1986). "Dynamics of oxygen mass transfer in bioreactors part II: design Variables". *Process Biochem* 21, 40-44.
59. Villeneuve P., Muderhwa J., Graille J., Haas M. J., (2000), "Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches" *Journal of Molecular Catalysis*, 9, 113-148.
60. Wahlgren M., Arnebrant T., (1991). "Protein adsorption to solid surfaces", *TIBTECH*. 9 201.
61. Won K., Kim S., Kim K., Park H., Moon S., (2005) "Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads", *Process Biochemistry*, 40, 2149-2154.
62. Won K., Kim S., Kim K.-J., Park H. W., Moon S.-J., (2005). "Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads". *Process Biochemstry*. 40, 2149-2154.
63. Wu J. C., Selwam v., Teo H. H., Chow Y., Talukder M. M. R., Choi W. J., (2006), "İmmobilization of *Candida rugosa* lipase by cross-linking with glutaraldehyde followed by entrapment in alginate beads" *Biocatalysis and biotransformation*, 24, 352-357.
64. Wu Y., Wang Y., Luo G., Dai Y., (2009), "In situ preparation of magnetic Fe3O4-chitosan nanoparticles for lipase immobilization by cross-linking and oxidation in aqueous solution" *Bioresource Technology*, 100, 3459-3464.
65. Yi S., Noh J., Lee Y., (2009) "Amino acid modifieds chitosan beads: Improved polymer supportsfor immobilization of lipase from *candida rugosa" Journal Molecular Catalysis.* 57, 123-129.

66. Yıldız, H. B., Toppare, L., Hepuzer Gursel, Y. Yagci, Y. (2006), "Immobilization of polyphenol oxidase in conducting graft copolymers and determination of phenolic amound in red wines with enzyme electrodes" *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 945-948.
67. Zhao Y., Ching C., Xu R., (2009), "Lipase immobilization on modified zirconia nanoparticles: Studies on the effectsb of modifiers" *Process Biochemistry*, 44, 1245-1251.

7. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca; bilgisini ve tecrübesini benimle paylaşan, her konuda hoşgörülü ve sabırlı davranan, öğretme kabiliyetine hayran olduğum, sevgili danışman hocam sayın Doç. Dr. Hülya YAĞAR'a

Bölümümdeki tüm hocalarıma,

Laboratuvar çalışmam boyunca yanımda olan biyokimya ve diğer anabilimdallarında yüksek lisans yapan sevgili arkadaşlarıma,

Tezimin yazım aşamasında yardımını esirgemeyen Harun'a

Attığım her adımda beni sonsuz bir istekle destekleyen aileme

Sonsuz teşekkürler…

Nazife ULUĞ

8. ÖZGEÇMİŞ

12 Aralık 1983 yılında Kars'ta doğdum. İlköğrenimimi İstanbul Tevfik Bey İlköğretim Okulu'nda 1997 yılında tamamladım. Lise öğrenimimi Süleyman Nazif Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2001 yılında Trakya Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü öğrencisi oldum.

2006 yılında lisans eğitimimi tamamladım. 2008 yılından bu yana Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Dalı'nda yüksek lisans yapmaktayım.

Nazife ULUĞ