

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PANKREATİK LİPAZ ENZİMİNİN KOMPOZİT TAŞIYICILARDA İMMOBİLİZASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİLEK GÜNAL

Anabilim Dalı : Kimya

Programı : Biyokimya

MANİSA 2014

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PANKREATİK LİPAZ ENZİMİNİN KOMPOZİT TAŞIYICILARDA İMMOBİLİZASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİLEK GÜNAL

Anabilim Dalı : Kimya

Programı : Biyokimya

MANİSA 2014

**PANKREATİK LİPAZ ENZİMİNİN KOMPOZİT TAŞIYICILARDA İMMOBİLİZASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİLEK GÜNAL

Celal Bayar üniversitesi Kimya Bölümünce Kabul Edilen
Yüksek Lisans Tezidir.

Tezin Teslim Tarihi : 27.02. 2014

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 03.02.2014

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ayşe Dinçer

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ayşe Dinçer

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Tülin Aydemir

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Figen Zihnioğlu

MANİSA 2014

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ.....	VII
ÇİZELGE LİSTESİ.....	IX
KISALTMALAR.....	X
TEŞEKKÜR.....	XI
ÖZET.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. GİRİŞ	1
1.1 İmmobilizasyon.....	1
1.1.1 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	2
1.1.1.1 Tutuklama.....	3
1.1.1.1.a Kafeste Tutuklama.....	3
1.1.1.1.b Mikrokapsülleme.....	4
1.1.1.2 Çapraz Bağlama.....	5
1.1.1.3 Taşıyıcıya Bağlama.....	6
1.1.1.3.a Kovalent Bağlama.....	7
1.1.1.3.b Adsorpsiyon.....	7
1.1.1.3.c İyonik Bağlama.....	8
1.1.2 İmmobilizasyon Metodunun Seçimi.....	9
1.1.3 İmmobilizasyonda Kullanılan Taşıyıcılar.....	10
1.1.3.1 İmmobilizasyonda Genel Olarak Kullanılan Taşıyıcıların Sınıflandırılması.....	11
1.1.3.2 İmmobilizasyonda Kullanılan Taşıyıcılardan Bazıları.....	11
1.1.3.2.a Kitin.....	11
1.1.3.2.b Kitosan.....	12
1.1.3.2.c Perlit.....	13
1.1.3.2.d Çok Duvarlı Karbon Nanotüp (MWCNTs).....	17
1.2 Lipazlar.....	18
1.2.1 Lipazların Üç Boyutlu Yapısı.....	20
1.2.2 Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar.....	21

1.2.2.1 Hidroliz	21
1.2.2.2 Esterleşme	21
1.2.2.3 Ester Değişimi	23
1.2.3 Lipaz Türleri.....	23
1.2.3.1 Mikrobiyal	23
1.2.3.2 Bakteriyal.....	23
1.2.3.3 Fungal	23
1.2.4 Lipaz İmmobilizasyonu	24
1.2.5 Lipazların Endüstriyel Uygulamaları	25
2. MATERYAL VE METOD	28
2.1 Materyal	28
2.2 Yöntem	28
2.2.1 Serbest ve İmmobilize Lipazın Aktivite Tayini	28
2.2.2 p-NP Standart Eğrisinin Oluşturulması	28
2.2.3 Protein Tayini	30
2.2.4 İmmobilizasyon Verimi ve Yükleme Etkinliğinin Oluşturulması.....	30
2.2.5 Kompozit Boncukların Hazırlanması	31
2.2.5.1 Perlitin Aktivasyonu	31
2.2.5.2 Kitosan-Perlit Kompozit Boncuklarının Hazırlanması	31
2.2.5.3 Çok Duvarlı Karbon Nanotüp (MWCNTs) Aktivasyonu	31
2.2.5.4 Kitosan-MWCNTs Kompozit Boncukların Hazırlanması	32
2.2.6 Kitosan-Perlit ve Kitosan-MWCNTs Kompozit Boncukların ECH ile muamelesi	33
2.2.6.1 ECH ile Çapraz Bağlama Süresinin Etkisi	33
2.2.7 İmmobilizasyon Süresinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	33
2.2.8 Lipaz Enzim Konsantrasyonunun Etkisi	33
2.2.9 Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyon	34
2.2.9.1 Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	34
2.2.9.2 Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine pH Etkisi	34
2.2.10 Kinetik Parametreler.....	34

2.2.11 Kararlılık Testleri	34
2.2.11.1 Termal Kararlılık	35
2.2.11.2 pH Kararlılığı	35
2.2.11.3 Depo Kararlılığı	35
2.2.11.4 Tekrar Kullanılabilirlik	35
3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	37
3.1 Aktivite ve Protein Standart Grafikleri	37
3.1.1 p-NP Standart Eğrisinin Oluşturulması	37
3.1.2 Protein Standart Grafiğinin Oluşturulması	38
3.2 İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu	39
3.2.1 ECH ile Çapraz Bağlama Süresinin İmmobilizasyon Üzerine Etkisi	39
3.2.2 İmmobilizasyon Süresinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	40
3.2.3 Lipaz Konsantrasyonunun Enzim İmmobilizasyonu Üzerine Etkisi	41
3.3 Taşıyıcı Üzerine Bağlanan Protein Miktarı ve İmmobilizasyon Verimi	42
3.4 Serbest ve İmmobilize Lipazın Optimum pH' larının Belirlenmesi	43
3.5 Serbest ve İmmobilize Lipazın Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi	44
3.6 Fiziksel Karakterizasyon	46
3.6.1 Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) Analizi	46
3.6.2 Termogravimetrik Analiz (TGA)	49
3.6.3 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	50
3.7 Stabilite Testleri	54
3.7.1 Lipazın pH Stabilesi	54
3.7.2 Lipazın Termal Stabilesi	55
3.7.3 Depolama Kararlılığı	57
3.8 Serbest ve immobilize Lipazın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi	58
3.9 Tekrar Kullanılabilirlik	60
3.10 Genel Değerlendirme	61
4. KAYNAKLAR	62

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1: Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.....	3
Şekil 1.2: Enzimin bir taşıyıcı içerisinde tutuklanması	3
Şekil 1.3: Yarı geçirgen zarda tutuklama	4
Şekil 1.4: Çapraz bağlama	5
Şekil 1.5: Kovalent Bağlama	7
Şekil 1.6: Fiziksel Adsorpsiyon.....	8
Şekil 1.7: İyonik Bağlanma	9
Şekil 1.8: Kitinin Yapısı.....	12
Şekil 1.9: Kitosanın Yapısı	12
Şekil 1.10: Kayaç haldeki perlit (A), ham perlit (B) ve genişletilmiş perlitin (C) görünümü.....	14
Şekil 1.11: Karbon nanotüp oluşumları	17
Şekil 1.12: Tek katmanlı ve çok katmanlı karbon nanotüp modeli.....	18
Şekil 1.13: Doğal α/β hidrolaz katlanması.....	20
Şekil 1.14: Gluteraldehitin kimyasal yapı formülü	25
Şekil 2.1: MWCNTs ün H_2SO_4 ve HNO_3 ile Aktivasyonu	32
Şekil 2.2: Kitosan-MWCNTs ECH ile çapraz bağlı kompozit boncuk hazırlanması.....	32
Şekil 2.3: ECHın kimyasal yapı formülü	33
Şekil 3.1: p-NP standart eğrisi.....	38
Şekil 3.2: Protein Standart Grafiği.....	39
Şekil 3.3: ECH ile çapraz bağlama süresinin belirlenmesi.....	40
Şekil 3.4: İmmobilizasyon süresinin enzim aktivitesi üzerine etkisi	41
Şekil 3.5: Enzim immobilizasyonu için optimum lipaz konsantrasyonunun belirlenmesi	42
Şekil 3.6: Serbest ve İmmobilize Lipazın Optimum pH larının Belirlenmesi	43
Şekil 3.7: Serbest ve İmmobilize Lipazın Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi	45
Şekil 3.8: Kitosan-perlit kompozit boncuk FTIR analizi	46
Şekil 3.9: ECH ile çapraz bağlı kitosan-perlit kompozit boncuk FTIR analizi.....	47
Şekil 3.10: Kitosan-MWCNTs kompozit boncuk FTIR analizi	48

Şekil 3.11: ECH ile çapraz bağlı kitosan-MWCNTs kompozit boncuk FTIR analizi.....	48
Şekil 3.12: a) Kitosan-perlit kompozit boncuk b) Kitosan-perlit ECH ile çapraz bağlanmış kompozit boncuk TGA sonuçları	49
Şekil 3.13: a) Kitosan-perlit kompozit boncuk b) Kitosan-MWCNTs ECH ile çapraz bağlanmış kompozit boncuk TGA sonuçları	50
Şekil 3.14: a) Kitosan-perlit kompozit boncuk 100 x büyüme b) Kitosan-perlit kompozit boncuk 511000 x büyüme c) Kitosan-perlite kompozit boncuk 10.000 büyüme	51
Şekil 3.15 a) ECH ile çapraz bağlı kitosan-perlit kompozit boncuk 100 x büyüme b) ECH ile çapraz bağlı kitosan-perlit kompozit boncuk 1000 x büyüme c) ECH ile çapraz bağlı kitosan-perlite kompozit boncuk 25.000 büyüme	51
Şekil 3.16: : a) Lipaz ile immobilize edilmiş kitosan-perlit kompozit boncuk 100 x büyüme b) Lipaz ile immobilize edilmiş kitosan-perlit kompozit boncuk 1000 x büyüme c) Lipaz ile immobilize edilmiş kitosan-perlite kompozit boncuk 25.000 büyüme	51
Şekil 3.17: a) Kitosan-MWCNTs kompozit boncuk 100 x büyüme b) Kitosan-MWCNTs kompozit boncuk 1000 x büyüme c) Kitosan-MWCNTs kompozit boncuk 25.000 büyüme	52
Şekil 3.18: a) ECH ile çapraz bağlı kitosan-MWCNTs kompozit boncuk 100 x büyüme b) ECH ile çapraz bağlı kitosan-MWCNTs kompozit boncuk 1000 x büyüme c) ECH ile çapraz bağlı kitosan-MWCNTs kompozit boncuk 25.000 büyüme	52
Şekil 3.19: a) Lipaz ile immobilize edilmiş kitosan-MWCNTs kompozit boncuk 100 x büyüme b) Lipaz ile immobilize edilmiş kitosan-MWCNTs kompozit boncuk 1000 x büyüme c) Lipaz ile immobilize edilmiş kitosan-MWCNTs kompozit boncuk 25.000 büyüme.....	52
Şekil 3.20: Kitosan-MWCNTs kompozit boncukları	53
Şekil 3.21: Kitosan-perlit kompozit boncukları	53
Şekil 3.22: Serbest ve İmmobilize lipazın pH Stabilitesi	54
Şekil 3.23: Serbest ve İmmobilize Lipazın Sıcaklık Stabilitesi	55
Şekil 3.24: Serbest ve İmmobilize lipazın +4 °C depolama kararlılığı.....	57
Şekil 3.25: Serbest ve İmmobilize lipazın oda sıcaklığında depolama kararlılığı	57
Şekil 3.26: Lipaz için Lineweaver-Burk grafiği	59
Şekil 3.27: İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği	60

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1.1: Yaygın olarak kullanılan taşıyıcılar	11
Çizelge 1.2: Ham perlitin fiziksel özellikleri	14
Çizelge 1.3: Genleştirilmiş perlitin fiziksel özellikleri	15
Çizelge 1.4: Perlitin kimyasal analizi (%)	15
Çizelge 1.5: Lipazların başlıca kullanım alanları ve kullanım amaçları	27
Çizelge 2.1: <i>p</i> -Nitro Fenol standart eğrisi.....	29
Çizelge 2.2: Lipaz Aktivite Tayin Yöntemi	29
Çizelge 3.1: Kitosan-perlit ve kitosan-MWCNTs kompozit boncuklar üzerine immobilize edilmiş lipazın % verim ve % yükleme etkinliği	42
Çizelge 3.2: Yaş boncukların boyutları.....	53

KISALTMALAR

Abs: Absorbans

BSA: Sığır serum albümin

CT: Kitosan

KM: Michealis-Menten Sabiti

MWCNTs: Çok duvarlı karbon nanotüp

p-NP: *para*-Nitrofenol

p-NPP: *para*-Nitro fenol palmitat

TPP: Tripolifosfat

V_{max}: Maksimum reaksiyon hızı

TEŞEKKÜR

Bu alıŐma, Celal Bayar Üniversitesi Fen - Edebiyat Fakóltesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Ayşe Dinçer danıŐmanlıđında tamamlanarak, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuŐtur.

Tez danıŐmanlıđımı üstlenen, bana bu konu üzerinde çalışma fırsatı sağlayan, çalıŐmamın her aşamasında yol gösterici ve destekleyici olan, emeğini hiçbir Şekilde esirgemeyen, sadece çalışmalarına değil hayatıma ıŐık tutan Celal Bayar Üniversitesi Fen - Edebiyat Fakóltesi Kimya Bölümü Öđretim Üyesi Deđerli Hocam Doç. DR. Ayşe Dinçer'e en içten teŐekkürlerimi sunarım.

Madden ve manen beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayarak, bana olan güven ve inançlarını sonsuz hissettiren, varlıklarıyla her zaman güç veren aileme en büyük teŐekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Lipazlar (triacilgliserol hidrolazlar, EC 3.1.1.3), yağların hidrolizini veya sentezlenmesini katalizleyen enzimlerdir. Biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin yanında endüstriyel uygulamaları nedeniyle de araştırma konusu olmaktadır. Lipazlar, katı ve sıvı yağları, serbest yağ asitleri, diaçilgliseroller, monoaçilgliseroller ve gliserollere hidroliz eden, oldukça yaygın olarak bulunan enzimlerdir. Bunun yanı sıra organik çözügenlerde esterifikasyon, transesterifikasyon, aminoliziz gibi çok çeşitli reaksiyonun katalizini de gerçekleştirirler. Katalizledikleri bu çok çeşitli reaksiyonlar nedeniyle rasemik karışımların ayrılması, yeni sürfaktanların ve farmasötiklerin sentezi, yağ dönüşümleri, deterjan üretimi gibi oldukça geniş endüstriyel kullanım alanına sahiptirler. Ekonomik açıdan düşünüldüğünde, lipazın endüstriyel ölçekte kullanımı immobilizasyonunu gerektirmektedir. İmmobilize enzimler birçok kez ve uzun süre kullanılabilmesi, sürekli işlemlere uygulanabilmesi, kararlı olması, çevre koşullarına(pH, sıcaklık, vs) dayanıklı olması gibi sebeplerden dolayı doğal enzimlere göre daha çok tercih edilirler.

Bu çalışmada porsin pankreatik lipaz enzimi doğada bol miktarda bulunan, ekonomik ve ucuz bir biyopolimer olan kitosan ile hazırlanan kompozit taşıyıcılar üzerine kovalent olarak immobilize edildi. Kitosan laboratuvar ölçekli çalışmalarda enzim immobilizasyonu için yaygın olarak kullanılmasına rağmen endüstriyel uygulamalarda bazı engeller vardır. Çapraz bağlı kitosan boncukları büyük mekanik dayanıklılığa sahiptir ancak yine de operasyonel uygulamalarda sorunlarla karşılaşmaktadır. Boncuk yoğunlukları suya çok yakındır ve dokusu çok yumuşaktır. Bu çalışmada kitosan, mekanik kararlılığı artırmak için karbon nanotüp (Multiwalled carbon nanotube, MWCN) ve perlit gibi materyaller ile karıştırıldı, hazırlanan süspansiyon tripolifosfat içerisine damlatılıp kompozit boncuklar oluşturuldu. Bu şekilde kitosan boncukların yoğunluk ve mekanik gücü artacak ve uygulama alanları genişleyecektir. Hazırlanan kompozit taşıyıcıların karakterizasyonu fourier transform infrared (FTIR) spektroskopisi, taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve termal gravimetrik analiz (TGA) ile yapıldı. İmmobilizasyon koşulları optimizasyonu amacıyla çapraz bağlama süresinin etkisi, enzim bağlama süresinin etkisi ve enzim konsantrasyonunun etkisi incelendi. ECH ile optimum çapraz bağlama süresi kitosan-perlit kompozit boncuklar için 4 saat, kitosan-MWCNTs kompozit boncuk için 17 saat bulundu. Lipaz enziminin optimum bağlanma süresi çapraz bağlı her iki kompozit boncuk içinde 24 saat ve optimum enzim konsantrasyonu 2 mg/ml bulundu. Bununla birlikte hem serbest hem de immobilize lipaz aktivitesi üzerine pH'ın etkisi ve sıcaklığın etkisi incelendi. Optimum pH değeri serbest enzim için pH 7,0, iki farklı taşıyıcıya immobilize edilmiş enzim için ise bir birim alkali bölgeye kayarak pH 8,0 bulundu. Serbest enzim için optimum sıcaklık düzeyi 40 °C olarak belirlenirken kitosan-perlit ve kitosan-MWCNTs için bu değer 50 °C olarak belirlendi. Serbest ve immobilize enzimin sıcaklık, pH ve depolama stabiliteleri karşılaştırılarak, immobilize lipaz enziminin tekrar kullanılabilirliği incelendi. Kompozit taşıyıcılar üzerine immobilize edilen lipaz enziminin yüksek sıcaklıklarda serbest enzime göre daha stabil olduğu görüldü. Geliştirilen yöntemle immobilize lipazın her pH düzeyinde stabilitesinin arttığı ve pH stabilite aralığının genişlediği görüldü. Serbest ve immobilize enzimlerin depolama stabiliteleri incelendiğinde, immobilize enzimlerin serbest enzime kıyasla daha yüksek stabilite gösterdiği gözlemlendi. 40 günün sonunda; +4 °C de kitosan-perlit kompozit boncuk üzerine immobilize edilen lipaz için % kalan aktivite değeri %59; kitosan-MWCNTs kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen lipaz için % kalan aktivite değeri %63 olarak hesaplanırken bu değer serbest enzimde %20 olarak ölçüldü. Oda sıcaklığında ise kitosan-perlit kompozit boncuk üzerine immobilize edilen lipaz için % kalan aktivite değeri %48; kitosan-MWCNTs kompozit boncuklar üzerine immobilize edilen lipaz için % kalan aktivite değeri %55 olarak belirlenirken bu değer serbest enzimde %5 olarak bulundu. Ayrıca immobilize lipazın tekrar kullanılabilirliği incelendiğinde; kitosan- perlit ve kitosan- MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen lipaz enziminin sırasıyla 15 kez ve 13 kez tekrar kullanım sonrasında % 50 aktivitesini koruduğu gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: Lipaz,kitosan,kompozit, immobilizasyon, perlit, MWCNTs

ABSTRACT

Lipases (triacylglycerol hydrolases, EC 3.1.1.3) are the enzymes which catalyze the hydrolysis or synthesis of fats and oils. In addition to biochemical and physiological properties of lipases, they become subject of research due to industrial applications. Lipases are commonly found enzymes which hydrolyze solid-liquid oils to free fatty acids, diacylglycerols, monoacylglycerol and glycerol. They also catalyze reactions like esterification, transesterification, aminolysis in the organic solvents. Because of a wide variety of reactions they can be use in the separation of racemic mixtures, synthesis of new surfactants and pharmaceuticals, oil transformations and detergent manufacturing. Given the economic point of view, the use of lipase in industrial scale, an immobilization is required. Immobilized enzymes are preferred to natural enzymes because they can be reused for many times, and for a long time, they can be applied to continuous operations, they are stabile and resistant to environmental conditions (pH, temperature, etc.).

In this study, porcine pancreatic lipase enzyme was immobilized on composite carries which was prepared by economical and inexpensive biopolymer such as chitosan. Chitosan is widely used in laboratory-scale studies for immobilization of enzymes although there are some obstacles for industrial applications. Cross-linked chitosan beads have greater mechanical strength, but they still have problems with operational applications. Density of the beads is very close to water and its texture is very soft. In this study, chitosan mixed with carbon nanotube (Multiwalled carbon nanotube, MWCNTs) and perlite for increasing the mechanical strength than the suspension dropped in tripolyphosphate solution. Characterization of composite beads was done by fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, scanning Electron microscopy (SEM) and the thermal gravimetric analysis (TGA). To optimize the immobilization conditions, effect of crosslinking time, enzyme immobilization time and effect of lipase concentration were examined. Optimum ECH crosslinking time was found as 4 hours and 17 hours for chitosan-perlite and chitosan-MWCNTs respectively. Optimum enzyme immobilization time was found as 24 hours for chitosan-perlite and chitosan-MWCNTS composite beads. Optimum enzyme concentration was determined as 2 mg/ml for both of them. In addition, effect of pH and temperature on the activity of free and immobilized lipase was examined. The optimum pH of the immobilized lipase was shifted slightly to the alkaline region relative to the free enzyme and it was found as pH 8.0 for both carriers. Optimum temperature of free lipase was reported as 40 °C and it was found as 50 °C for the enzyme immobilized on both chitosan-perlite and chitosan-MWCNTs. Also, thermal, pH and storage stability of free and immobilized enzyme was compared and the reusability of immobilized lipase was examined. The thermal stability of immobilized lipase was better than that of the free lipase. The immobilized enzyme was more stable than its free form in this pH range. For the developed method, immobilization lipase was showed greater storage stability than free enzyme. At the end of 40 days, while free lipase had 20% remaining activity, this value was calculated as 59 % and 63 % for lipase immobilized on chitosan-perlite and chitosan-MWCNTs composite beads respectively at +4 °C. At the end of same period of storage, free lipase had 5 % remaining activity and this value was calculated as 48 % and 55 % for lipase respectively at room temperature. When reusability of immobilized lipase was examined, it retained 50 % of its original activity after 15 and 13 reuses when lipase immobilized on chitosan-perlite and chitosan-MWCNTs composite beads respectively.

Key Words: : Lipase, chitosan, composite, immobilization, perlite, MWCNTs

1. GİRİŞ

Enzimler, canlı hücrede meydana gelen metabolizma reaksiyonlarının pek çoğunu hızlandıran veya düzenleyen protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Enzimler biyolojik hücre tarafından biyolojik koşullarda sentez edilmesine rağmen aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmalarına gerek yoktur. Bu özelliğinden dolayı enzimler birçok birçok alanda yarar göstermektedirler. Bu nedenle enzimlerin yer aldıkları dokuların veya hücre kısımlarının belirlenmesi, biyokimyasal reaksiyon işlevlerinin ortaya çıkarılması, etki mekanizmalarının ve kinetik özelliklerinin tüm ayrıntılarıyla incelenmesi ve enzimlerin saflaştırılarak elde edilmesi büyük önem taşımaktadır.

Sistematik adı triaçilgliserol açılhidrolaz olan lipazlar katı sıvı yağları, serbest yağ asitleri, diaçilgliseroller, monoaçilgliseroller ve gliserollere hidroliz eden, oldukça yaygın olarak bulunan enzimlerdir. Yağların hidrolizini veya sentezlenmesini katalizleyen enzimler olan Lipazlar (triaçilgliserinester hidrolazlar, EC 3.1.1.3), biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri yanında endüstriyel uygulamaları nedeniyle de araştırma konusu olmaktadır. Lipazlar, bunun yanı sıra organik çözügenlerde esterifikasyon, transesterifikasyon, aminoliziz gibi çok çeşitli reaksiyonun katalizini de gerçekleştirirler. Katalizledikleri bu çok çeşitli reaksiyonlar nedeniyle rasemik karışımların ayrılması, yeni sürfaktanların ve farmasötiklerin sentezi, yağ dönüşümleri, deterjan üretimi gibi oldukça geniş endüstriyel kullanım alanına sahiptirler. Ekonomik açıdan düşünüldüğünde, lipazın endüstriyel ölçekte kullanımı immobilizasyonunu gerektirmektedir.

İmmobilize enzimler birçok kez ve uzun süre kullanılabilmesi, sürekli işlemlere uygulanabilmesi, kararlı olması, çevre koşullarına(pH, sıcaklık, vs) dayanıklı olması gibi sebeplerden dolayı doğal enzimlere göre daha çok tercih edilirler.

1.1. İmmobilizasyon

Bilindiği gibi enzimler suda çözünen, spesifik katalizörlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olanak dışıdır. Serbest enzim, tepkime ortamından istenilen anda uzaklaştırılmadığından tepkimenin kontrolü çok güçtür hatta çoğu kez olanaksızdır. Tepkimenin istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması düşünülebilir. Ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan tepkime ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün ve ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırmaktır. Yukarıda sayılan teknik ve ekonomik problemler den dolayı serbest enzim yerine immobilize enzim kullanılmasının daha uygun olabileceği düşünülmüş ve bu amaçla immobilize enzimlerin hazırlanması ve teknolojide kullanımı son senelerde büyük önem kazanmıştır [Bickerstaff, 1997].

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 matris veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler [Telefoncu,1986; Manecke,1953 ; Braanderberger,1955]. İmmobilizasyon kelime anlamı olarak, “ tutuklanmış, hareketi sınırlandırılmış, çözünmez hale getirilmiş” demektir. Enzimlerin ya da mikroorganizmaların fiziksel ve/ veya kimyasal yöntemlerle katalitik aktifliğini koruyarak, tekrar, sürekli kullanımını sağlamak amacıyla organik veya inorganik taşıyıcılara (destek maddesi) tutturulmasıdır [Zaborsky,1977].

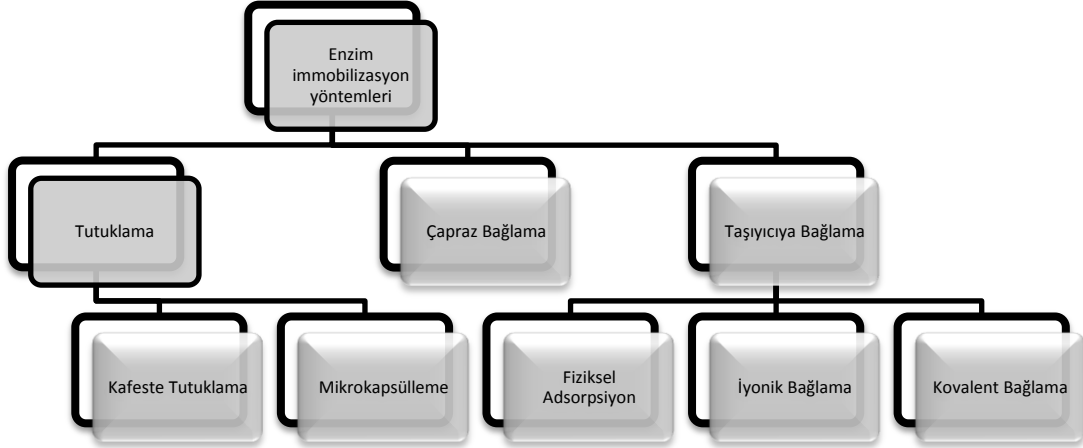
Tarihte ilk enzim immobilizasyonu 1916 yılında Nelson ve Griffitt tarafından adsorpsiyon yöntemiyle yapılmıştır. Nelson ve Griffitt sakkarozu hidroliz etmek için maya invertazını mangal kömürüne adsorbe etmişlerdir. İmmobilize enzimlerin pratik olarak ilk kullanımı ise Grobhofer ve Scheilth (1954) tarafından yapılmıştır. Araştırmalarında; karboksipeptidaz, diastaz, pepsin ve ribonükleaz enzimlerini poliaminostiren reçinesine kovalent bağlanma ile immobilize etmişler ve bu immobilize enzim türevlerinin kinetik parametrelerini incelemişlerdir. Daha sonra da immobilizasyon çalışmaları dünyanın her tarafında yaygınlaşmış ve çeşitli enzimler değişik amaçlarla immobilize edilmiştir [Aksoy, 2003].

İmmobilize Enzimin Doğal Enzime Göre Üstünlükleri;

- Tepkime sonunda ortamdaki kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme v.b.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- Defalarca kullanılabilen ve bu da üretim maliyetini düşürmektedir.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık, v.s.) karşı daha dayanıklıdır.
- İstenildiği anda ortamdaki uzaklaştırılması mümkün olduğundan reaksiyonların kontrollü yürütülmesi sağlanmaktadır Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Doğal enzime oranla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enziminin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır [Telefoncu,1986 ; Türk, 2008].

1.1.1 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Temel immobilizasyon yöntemleri tutuklama ve yüzey immobilizasyonu olarak iki ana gruba ayrılabilir. Bazı hallerde hapsetme ve yüzey immobilizasyonu birlikte kullanılır. En uygun immobilizasyon metodu ve destek materyalinin seçimi, enzime ve özel uygulamalara bağlı olarak değişir. Destek materyalin seçiminde en önemli kriter; destek materyalin bağlama kapasitesidir. Bu da onun yük yoğunluğuna, fonksiyonel grupların özelliğine, sudan etkilenmemesine bağlıdır [Atalan,2006].



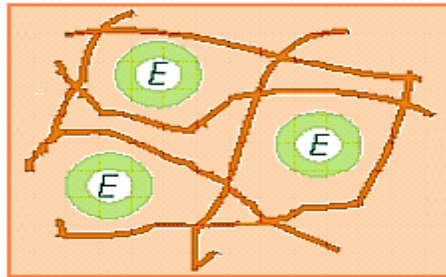
Şekil 1.1: Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması [Telefoncu,1986, Wiseman, 1975, Hartmeier, 1968]

1.1.1.1. Tutuklama

Tutuklama yönteminde, enzim molekülü belirli bir mekanda durmaya zorlanmaktadır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matris 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 [Telefoncu, 1986].

1.1.1.1.a. Kafeste Tutuklama

Yöntem çapraz bağlı polimerlerin boşlukları içinde enzimin tutulması esasına dayanır. Bu yöntemde enzim içeren monomer ya da polimer çözeltilerine uygun bir kimyasal başlatıcı, UV veya γ -ışınları uygulayarak yüksek oranda çapraz bağlı bir polimer ağı oluşturulur.



Şekil 1.2: Enzimin Bir Taşıyıcı İçerisinde Tutuklanması

Enzim molekülleri fiziksel olarak polimer kafes içerisinde tutulur ve jel matrisin dışına çıkamaz fakat substrat ve ürün sürekli kafes içine giriş-çıkış yapabilir. Enzim kimyasal değişime uğramaz ve enzimin intrinsik özelliklerinde herhangi bir değişim gözlenmez. Ayrıca bu yöntemde farklı fiziksel formlarda suda çözünmeyen enzim türevleri hazırlanabilir. Jelatinimsi yapıya sahip enzim türevleri, immobilize bir enzimin hem düzenli hem de düzensiz yüzeyler üzerinde kolayca depolamasını sağlar. Çapraz bağlı polimer oluşturarak enzim hapsedilmesinde en çok kullanılan polimer, N,N-metilen-bis-akrilamit ile çapraz bağlanarak oluşturulan poliakrilamittir [Karadağ, 2001].

Bu yöntemin avantajları şu şekilde sıralanabilir.

- Çapraz bağ oluşumunda kullanılan gama veya UV ışınları enzimin yapısını ve aktifliğini kimyasal metotlara göre daha az etkiler.
- Ortamdaki monomer ve çapraz bağlayıcı derişimini değiştirerek farklı büyüklükte gözenek boyutuna sahip polimerik kafesler elde edilebilir.
- Polimerleşme kolay ve hızlı bir şekilde gerçekleşebilmektedir.

Yöntemin dezavantajları ise,

- Çapraz bağlı polimer ağlarından enzimin sızması,
- Küçük hacimli substratlar için sınırlı olması
- Makromoleküler substrat için düşük aktiflik göstermesidir [Lante et al, 2000, Dodor et al, 2004, Dias et al, 2004, Zamora et al, 2003].

1.1.1.1.b. Mikrokapsülleme yöntemi

Enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanması esasına dayanır. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100 µ arasında değişmektedir. Yarıgeçirgen membranın gözenek çapları; substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek bir büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse bu yöntem ile immobilize edilmiş enzimin verimliliği o ölçüde yüksek olacaktır. Yöntemin temeli zarın geçirgenliğine dayanadığından gözenek çapından büyük olan moleküller zar dışına çıkamazlar. Bu yöntemden küçük molekül ağırlıklı ürün elde edilmesinde faydalanılır. Mikrokapsüller genellikle küreseldir.



Şekil1.3: Yarı geçirgen zarla tutuklama

Yöntemin avantajları;

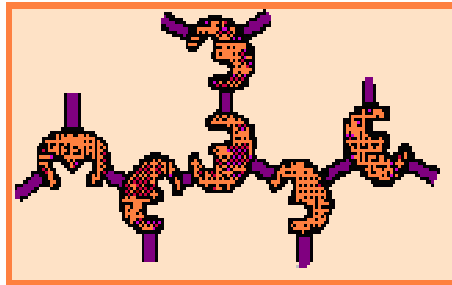
- Bu yöntemle immobilize edilmiş enzimler çift seçimlilik gösterebilirler. Seçimliliğin biri doğal olarak enzimin kendisinden gelirken ikinci seçimlilik çerçeveyi oluşturan yarı geçirgen membrandan gelebilir.
- Mikrokapsüllerin herhangi bir taşıyıcıya bağlı enzime kıyasla enzim-substrat kontakını daha kolaylaştıracak ölçüde büyük bir yüzeye sahip olmaları.
- Aynı anda birden fazla enzim immobilize edilebilir.

Yöntemin sakıncaları;

- Mikrokapsülleme işlemi sırasında enzim inaktive olmaktadır.
- İmmobilizasyonda derişik enzim çözeltisi kullanılmaktadır.
- Enzimin yarı geçirgen membranı iç yüzeyinden aşındırma olasılığı vardır.
- İmmobilize enzim ancak düşük molekül ağırlıklı substratlara karşı aktivite göstermektedir. Böylece enzimin katalizör olarak kullanılma alanları sınırlı olmaktadır.

1.1.1.2. Çapraz Bağlama

Küçük molekülü bir veya multi-fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlama derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH'ya ve immobilize edilecek enzime çok bağımlıdır. İnter moleküler bağlanmalar yanında intramoleküler bağlanmalar da söz konusudur. Enzimleri immobilize etmek için tek bir işlemde iki veya çok fonksiyonel maddelerin kullanılması bu yöntemde büyük bir avantaj kazandırmaktadır. Enzimin yapıdan sızması da oldukça güçtür. Yöntemin uygulanması esnasında oluşan kontrol zorluğu, enzim aktivitesinde ve aktif merkezinde meydana gelebilecek değişimler yöntemde dezavantaj olarak yansımaktadır. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, klorformat ve karbonildiimidazol, metal iyonları ve epiklorohidridir.



Şekil 1.4: Çapraz bağlanma

Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu dört farklı şekilde gerçekleştirilir;

- a) Enzimin yalnız bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- b) Enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- c) Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıda adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- d) Enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonu

En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, p-benzokinon, geçiş metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir.

Çapraz bağlama reaksiyonları çok yumuşak koşullarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur.

1.1.1.3. Taşıyıcıya Bağlama

Taşıyıcıya bağlamada bir protein olan enzim molekülünün yapısından yararlanır. Molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlamada rol alırlar [Teke,2008]. Enzime göre taşıyıcı seçimi çok önemlidir. Taşıyıcı seçiminde; partikül büyüklüğü, toplam yüzey alanı, hidrofilik grupların hidrofobik gruplara oranı ve taşıyıcının kimyasal bileşimi gibi ölçütler esas alınır [Öztürk,2006].

Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinin avantajları:

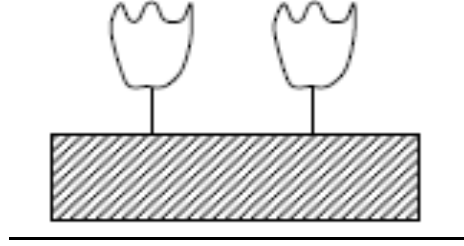
1. Reaktif taşıyıcıya enzim bağlanması kolaydır ve bağlı olmayan enzim yıkama ile uzaklaştırılabilir.
2. Katı taşıyıcıya bağlı katalizator kullanışıdır (süzme veya santrifüjleme ile ayrılırlar).
3. Reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılabilirler.
4. Ürünleri kirletmezler.
5. Taşıyıcının yapısına bağımlı olarak yeni spesifiklikler kazanabilir.
6. Değişik fiziksel formlarda (tabaka, partikül, fiber vb.) imal edilebilirler.

Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinin dezavantajları:

1. Enzim immobilizasyon koşullarından etkilenebilir.
2. Bağlanma aktivite için zorunlu aminoasit artıkları üzerinden gerçekleşebilir.
3. Enzimin taşıyıcıya bağlanması özel ve masraflı preparasyonları gerekli kılabilir.
4. Polimer taşıyıcının sebep olduğu sterik engelleme nedeniyle aktivite azalabilir.

1.1.1.3.a. Kovalent Bağlama

Enzim ile suda çözünmeyen aktifleştirilmiş destek arasında kovalent bağ oluşumu enzimlerin immobilizasyonu için sıkça kullanılan bir tekniktir. Bu teknik, enzim türevlerinin kararlı olmasını sağlar ve enzimin çözeltiye geçmesini engeller.

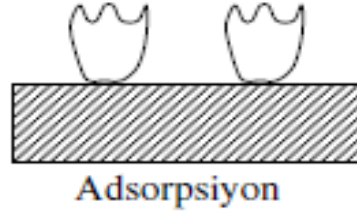


Şekil 1.5: Kovalent bağlanma

Kovalent bağlanma genelde enzimin yapısının ve fonksiyonel grupların bilindiği durumlarda kullanılır. İki basamakla gerçekleşen bu yöntemde, ilk olarak katı destek materyallerinin aktive edilmesi gerekmektedir. Bu doğrultuda, destek materyali amino, karboksil v.s. gibi fonksiyonel gruplar taşımalıdır. Bu fonksiyonel grupların yapısına bağlı olarak glutaraldehit, karbodiimid, epiklorhidrin v.s. gibi çeşitli aktifleyici ajanlar kullanılarak immobilizasyon işleminin birinci basamağını oluşturan yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiş olur. İkinci aşamada ise enzimin modifiye edilen destek materyaline kovalent bağlanması işlemi gerçekleştirilir. Kovalent bağlanma yoluyla enzim immobilizasyonunda çeşitli durumlarda, sıcaklık, denatürantlar ve organik çözücülere karşı yüksek direnç kazandırdığı gösterilmiştir. Bu gelişmelerin kapsamı, enzimin doğası, destek materyalinin tipi ve immobilizasyon koşullara bağlı olmaktadır. Bu yöntemin sunduğu en önemli avantaj, enzim ve destek arasında oluşan bağın güçlü olmasından dolayı enzimin yapıdan sızmasının güç oluşudur. Kovalent bağlanmada kullanılan yöntemlerin pahalı ve karmaşık olması, zor deney koşulları altında enzim yapısının bozulması ya da enzimin aktif bölgesinin maskelenmesi bu yöntemin kullanımını kısıtlamaktadır [Wiseman et al,1995, Arıca, 2000].

1.1.1.3.b. Adsorpsiyon

Enzim immobilizasyon teknikleri arasında yer alan adsorpsiyon yöntemi; işlemin basit ve ucuz olması, yüksek katalitik aktivite sağlaması ve en önemlisi tutuklu enzimin inaktivasyonundan sonra destek materyalinin tekrar tekrar kullanılabilmesine olanak sunması gibi nedenlerden dolayı diğer metotlardan daha yüksek bir ticari potansiyele sahiptir.



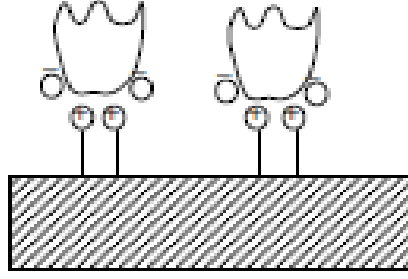
Şekil 1.6: Fiziksel Adsorpsiyon

Yöntem; yüzeyi aktif, suda çözünmeyen bir taşıyıcı destek materyalinin enzim çözeltisiyle karıştırılması ve enzim fazlasının yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzimin, taşıyıcıya bağlanmasında van der Waals, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları etkilidir. İmmobilizasyonda etkili olan bu bağlar, zayıf bağlar olmasından dolayı, immobilize enzim, işlemler esnasında destek materyallerinden uzaklaşabilir.

Bu durum, adsorpsiyon ile immobilizasyon yöntemine dezavantaj kazandırır. Prensipte bir proteinin aktif yüzeylerde adsorpsiyonu tersinir bir işlem olabilir. Bununla birlikte adsorpsiyon genellikle çok güçlü değildir ve adsorbe olan enzimlerin bir kısmı yıkama ve işlem sırasında desorbe olur. Bu sebepten dolayı adsorpsiyon yoluyla geri dönüşümlü enzim tutuklanması, enzim ve destek materyali arasında çok güçlü hidrofobik ya da iyonik etkileşim gerektirir [Edwards et al, 1999].

1.1.1.3.c. İyonik Bağlama

İyonik bağlanma, enzimlerin bir matrikse özel olarak bağlanmasını sağlar. Yöntem enzimin suda çözünmeyen ve iyon değiştirici kalıntıları içeren bir taşıyıcıya iyonik bağlanması esasına dayanmaktadır. Enzimlerin optimum aktiviteye sahip oldukları pH'da taşıdıkları net yüke bağlı olarak, negatif veya pozitif yük taşıyan iyon değiştirici reçineler iyonik adsorpsiyonda kullanılmaktadır. Basit, ucuz ve kısa bir yöntem olması, enzimde ve matrikste bir değişikliğin meydana gelmemesi, işlemin tersinir olması ve desorpsiyon sonucu matriksin geri kazanılabilmesi bu metodun avantajlarıdır. Dezavantajları ise, enzimin matrikse zayıf etkileşimlerle bağlanmasından dolayı enzimin sızıntı yaparak ürünü kirletmesidir.



Şekil 1.7: İyonik bağlanma

İyonik bağlanma metodunda kullanılan taşıyıcılar; organik (selüloz, dekstran) ve inorganik (silika) destek maddeler ile iyon değiştirici kalıntılarından türeyen iyon değiştiricilerdir. Genellikle taşıyıcı olarak iyon değiştirici merkezleri bulunan polisakkaritler ve sentetik polimerler kullanılmaktadır. Taşıyıcılar, iyon değiştirici kalıntılarına bağlı olarak anyonik veya katyonik değiştirici olarak isimlendirilirler. Fiziksel adsorpsiyonda olduğu gibi iyonik bağlanmada da immobilizasyon işlemi kolaylıkla gerçekleşmektedir. Enzim ile taşıyıcı arasındaki bağlanma kuvvetleri fiziksel adsorpsiyonda olduğundan daha kuvvetli ancak kovalent bağlanmada olduğundan daha zayıftır. Bu nedenle de enzimin taşıyıcıdan sızma olasılığı vardır. Bu durum genelde iyonik kuvvetin yüksek olduğu substrat çözeltilerine ya da pH değişimlerine neden olmaktadır. İyonik bağlanmada operasyon koşulları kovalent bağlanmadakine göre daha hafiftir, enzimin konformasyonunda ve aktif merkezindeki değişiklik azdır. Bu nedenle genellikle immobilize edilen enzimin aktivitesi yüksek olmaktadır [Aehle, 2004].

1.1.2. İmmobilizasyon metodunun seçimi

Başarılı bir immobilizasyon için aşağıdaki faktörler göz önünde bulundurulmalıdır.

- 1- Enzim reaksiyonun yürütüleceği koşullarda kararlı olmalıdır.
- 2- Çapraz bağlayıcı reaktifler, enzimin aktif uçları ile reaksiyona girmemelidir veya çapraz bağlayıcı reaktif enzimin aktif ucuna nüfuz etmesin diye olabildiğince büyük olmalıdır.
- 3- Mümkünse enzimin aktif ucu bir şekilde korunmalıdır. Örneğin sülfidril enzimleri sistein ile reaksiyona sokularak korunabilir ve daha sonra enzim tekrar aktiveleştirilebilir.
- 4-İmmobilizasyonda, bağlanmamış enzimi uzaklaştırmak için uygulanan yıkama işlemi enzimi etkilememelidir.
- 5- İmmobilize enzim, bazı kimyasal reaksiyonlarda devamlı katalizör olarak kullanılacak ise immobilizasyon metodunu seçmeden önce reaksiyonun doğası göz önünde bulundurulmalıdır.
- 6- Son olarak, destek materyalinin mekanik özellikleri, özellikle fiziksel formu ve mekanik kararlılığı göz önünde bulundurulmalıdır. [Kara,2006]

1.1.3. İmmobilizasyonda Kullanılan Taşıyıcılar

İmmobilize enzimlerin özellikleri hem enzimin hem de taşıyıcı maddenin özelliklerine bağlıdır. Enzim ile taşıyıcı arasındaki etkileşimler, immobilize edilmiş enzimin pratik uygulamaları için enzimin tespit edilmesi gereken fizikokimyasal ve kinetik özellikleri hakkında kesin yargılara varmak için katkıda bulunur [Worsfold,1995, Krajewska,2004]. Bağlanmış enzim miktarı ve enzimin immobilizasyon sonrasındaki aktivitesi desteğin yapısına bağlıdır. Genel olarak desteğin hidrofil karakteri ve yüzeyi arttıkça birim destek başına bağlı enzimin miktarı da artar. Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Destek membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Pek çok değişik doğal veya sentetik malzemeler enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmaktadır. Enzimlerin, katı destek materyallerine immobilizasyonu, sürekli işletim koşulları altında uzun süre kararlılığını koruması açısından önem ifade etmektedir..

Enzime göre destek seçimi çok önemlidir. Destek seçiminde partikül büyüklüğü, toplam yüzey, hidrofilik grupların hidrofobik gruplara oranı ve desteğin kimyasal bileşimi kriterleri esas alınır. Tüm enzimler ve enzim uygulamaları için genel bir taşıyıcı bulunmamasına rağmen, taşıyıcı olarak kullanılacak maddelerde aranılan bir çok özellik olmalıdır. Bunlar:

- Proteinlere karşı yüksek ilgi
- Kimyasal modifikasyonlar ve enzimle direkt olarak reaksiyona girebilmesi için gerekli fonksiyonel grupların varlığı
- Hidrofiliklik
- Seçilen biyotransformasyon için farklı geometrik şekillerde ve istenilen yüzey alanlarında hazırlanabilme kolaylığı
- Geniş yüzey alanı
- Kimyasal kararlılığının yüksek olması
- Uygun tanecik çapı / boyutu (0.2-1 mm / 30-60 nm)
- İyon deşistirebilme kapasitesinin yüksek olması
- Şişme kabiliyetinin düşük olması
- Mikrobiyel kararlılığının yüksek olması
- İnsan ve çevre sağlığına zarar vermemesi
- Elastikiyetinin yeterli olması
- Maliyetinin düşük olması
- Doğal ortamlara zarar vermeyecek maddelere indirgenebilmesi [Worsfold,1995, Krajewska, 2004],
- Gözenekli (poröz) yapı,
- Rejenere olabilme,

- Kovalent bağlanmada kullanılacak destekler ılıman koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşımalı.

1.1.3.1. İmmobilizasyonda genel olarak kullanılan taşıyıcıların sınıflandırılması

Enzim immobilizasyonunda yukarıdaki özelliklerin büyük bir kısmına sahip inorganik, doğal kaynaklardan elde edilen organik ve organik sentetik taşıyıcılar gibi çok çeşitli taşıyıcılar kullanılabilir [Worsfold,1995].

Çizelge 1.1: Yaygın olarak kullanılan taşıyıcılar

Anorganik	Doğal Polimerler	Sentetik Polimerler
Kil , cam	Selüloz	Polistiren türevleri
Silikajel	Nişasta	Poliakrilamidler
Bentonit	Dekstran	Naylonlar
Hidroksiapatit	Agar ve agaroz	Vinil ve alil polimerleri
Titandioksit	Karragenan	Oksiranlar
Zirkonyumdioksit	Kollojen	Metakrilat polimerleri
Nikeloksit	Kitin ve kitosan	İyon değiştirici reçineler
Pomza taşı	Jelatin	Maleik anhidrit polimerleri
Aktif karbon	Albümin	
Metaller	İpek	
Metal oksitler	Aljinat	

1.1.3.2. İmmobilizasyonda kullanılan taşıyıcılardan bazıları

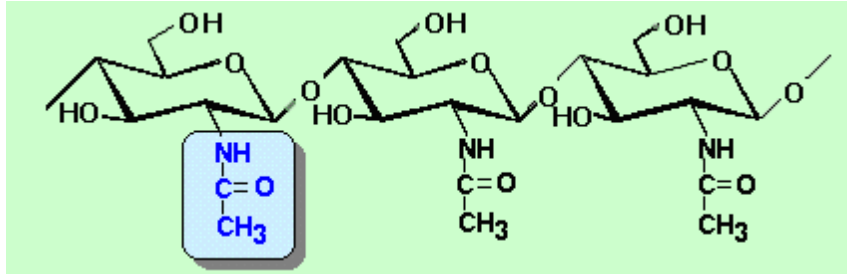
1.1.3.1.a. Kitin

Kitin, immobilizasyonda taşıyıcı olarak kullanılan kompleks bir moleküldür. Hayvan ve bitkilerde bol miktarlarda bulunur. En yoğun hayvansal kitin kaynakları, yengeç ve karides gibi deniz kabukluları, yumuşakçalar sınıfından bazı hayvanlar, kalamarın omurgası ve böceklerin kabuklarıdır. Bitkilerde ise deniz algleri, protozoa ve çok sayıda mantar türlerinin hücre duvarlarında kitine rastlanır.

Kitin, β -(1-4)-2-asetamido-2-deoksi-D-glukopiranoz, lineer bir polisakkarit olup N-asetilglukozamin yan zincirlerine sahiptir. Kitinin biyolojik uyumu, zararsız ürünlere ayrıştırılabilmesi, zehirsiz olması, fizyolojik inertliği gibi nadir bulunan biyolojik özellikleriyle birlikte, proteinlere karşı

olağanüstü affinitesi, hemostatik, fungistatik, antikoosteremik nitelikleri, çok geniş bir uygulama alanı bulmasını sağlar.

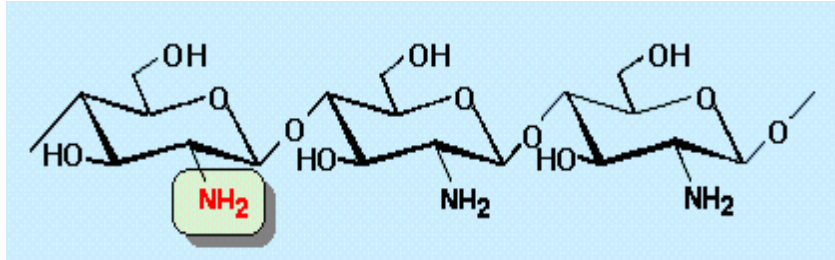
Kitin selülozdan sonra doğada en sık rastlanan polisakkarittir. Kitin, selülozun ikinci karbonundaki hidroksil grubunun asetamid grubuyla yer değiştirmiş seklidir. X-ışını analizlerinde selüloz ve kitin benzer yapılar göstermektedir. Kitin, immobilizasyon dışında atık suların arıtılmasında metal iyonlarının ayrıştırılması ve içme sularının saflaştırılmasında, kozmetik sanayinde saç ve cilt bakımında, gıda sanayinde antikoosterol ve yağ bağlayıcı olarak, tarımda böcek ilacı olarak, veterinerlik uygulamalarında ve medikal uygulamalarda kullanılmaktadır.



Şekil 1.8: Kitinin yapısı

1.1.3.1.b. Kitosan

Kitosan, çitinden türetilen modifiye bir polisakkarittir, kitinin deasetilizasyonu ile üretilmektedir. Kitosan, D-glukozamin ve N-asetil-D-glukozaminin deasetilasyonu ile β -(1-O-4) şeklinde bağlanmasıyla oluşan bir polisakkarittir.



Şekil 1.9: Kitosanın yapısı

Kitin yengeç, karides ve ıstakozda bulunan doğal bir kaynaktır. Kitosan diğer liflerden farklı olarak pozitif yüklü amino grupları içermektedir. Bu pozitif yük negatif yüklü lipitleri çektiğinden, kitosan bir yağ bağlayıcı olarak kullanılmaktadır. Bu sayede yağ ve kolesterol emilimini bloke eder, toplam kalori alınımını azaltır, yemekten sonraki insulin tepkimesini düzenler, kolesterol seviyelerini düşürür ve doyumluk hissini artırır. Yulaf gibi diğer liflerle beraber kullanıldığında etkisinin daha da arttığı görülmüştür.

Kitosan çok farklı kimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptir. Yüksek molekül ağırlıklı lineer poliglukozamin zincirinde, kimyasal modifikasyonlara uyumlu reaktif amino ve hidroksil grupları içerir. Buna ek olarak doğada çok az rastlanan bir şekilde içerdiği amino grupları kitosanı kationik polielektrolit ($pK_a \approx 6.5$) hale getirir. Bu esas da kitosana özgül bir nitelik sağlar: kitosan $pH < 6.5$ olan sulu asidik ortamlarda çözülebilir ve eriyik $-NH_3^+$ gruplarında yüksek pozitif yüke sahip olup negatif yüklü yüzeylere yapışır, poliyonik bileşiklerle birleşir ve ağır metal iyonlarını çelatlara. Hem asidik çözeltilerdeki çözünmesi hem de polianyonlarla agregasyonu kitosanın mükemmel bir jel oluşturma niteliğine sahip olmasına sebep olur.

Ucuz ve doğal bir polimer olması kullanım alanlarını arttırmıştır. Bitkileri zarar mikroorganizmalardan korumada, çeşitli filtrasyon işlemlerinde, protein ayırmada, hücre geri kazanımında ve kromatografik uygulamalarda kullanılabilir. Ayrıca, gıda sanayinde boya maddelerinin ayrılmasında, renk stabilizasyonunda ve hayvan yemi katkı olarak kullanılmaktadır. Atık su arıtmada metal iyonlarının ayrılmasını sağlamakta, tarımda gübrelemede kullanılmaktadır. Medikal uygulamalarda bandajlarda, kontak lenslerde, cilt yanıklarında, kanda kolesterol düzeyinin belirlenmesinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ek olarak, kozmetik sektöründe, nemlendiricilerde, el, yüz, vücut krem ve losyonlarında kitosandan yararlanılmaktadır.

Kitosan ile enzimlerin immobilizasyonunda; kitosan çözeltilisine enzim ilave edildikten sonra, bu çözelti %2'lik TPP(veya NaOH) çözeltilisine damla damla ilave edilir. Kitosan TPP ile temas ettiğinde suda çözünmeyen kürecikler meydana gelir. Zamanla enzim molekülleri bu jellerden dışarı sızarlar. Bu sızmayı önlemek için çapraz bağlayıcılar (glutaraldehit, ECH gibi) kullanılarak taneciklerin mekanik etkilere karşı dayanıklılığı arttırılmakta ve enzimin dışarı sızması önlenmektedir.

1.1.3.2.c. Perlit

Perlit asidik karakterli volkanik bir camdır. Perlit, ısıyla genleşme özelliği olan, genişletildiğinde çok hafif ve gözenekli hale geçen bir kayadır. Perlit kelimesi hem ham perlit ve hem de bunun genişletilmesiyle elde edilen ürün için kullanılmaktadır. Çeşitli perlit kayaları renk ve yapı itibarıyla birbirinden farklılık gösterebilmektedir. Ham perlitin rengi saydam açık griden parlak siyaha kadar değişebilmektedir. Genleştiğinde ham perlitin rengi tamamen beyazlaşmaktadır. Perlitte en önemli özellik, hidrasyona uğramış camsı silika yapısındaki %2-5 arasında bileşik halinde içerdiği sudur ve bu su perlitin kararlılığını sağlamaktadır.

Perlit başlıca, İnşaat sektöründe, tarım sektöründe ve sanayi sektöründe kullanılmaktadır. Dünyada perlitin %35 i sıva agregası olarak, %25 i beton agregası olarak, %23 ü filtre malzemesi yapımında, %8 i yalıtım malzemesi yapımında, %4 ü tarımda ve % 5i diğer alanlarda kullanılmaktadır.

Ham perlite öğütme ve boyutlandırma işlemlerinin uygulanmasının ardından, ham perlit 400 °C'ye kadar ön ısıtmaya tabi tutulmaktadır. Ön ısıtmanın ardından ham perlit 750-1200 °C arasında ani olarak ısıtıldığında bünyesinden çıkan buharın etkisiyle genişerek camsı tanelerden oluşan bir köpük agregasına dönüşmektedir. Ham perlit, ilk hacminin 20 katına kadar genişebilmektedir. Bu ürüne genişmiş perlit denilmektedir [www.pertas.net].



Şekil 1.10: Kayaç haldeki perlit (A), ham perlit (B) ve genişirilmiş perlitin (C) görünümü

Ham perlit ile genişirilmiş perlit farklı fiziksel özellikler göstermektedir. Ham perlit ve genişirilmiş perlitin fiziksel özellikleri çizelge 1.2 ve 1.3 de verilmektedir. Perlitin kimyasal analizi çizelge 1.4de verilmektedir. °C

Çizelge1.2 Ham perlitin fiziksel özellikleri [Devlet Planlama Teşkilatı, 2001, Çiçek,2002].

Renk	Siyah ve grinin tonları
Özgül ağırlık (kg/m ³)	2200-2400
Birim ağırlık (kg/m ³)	950-2700
Yumuşama noktası (C°)	871-1093
Erime noktası (C°)	1260-1343
Özgül ısı (kcal/kg C°)	0,20-0,23
Sertlik (Mohs)	5-6

Çizelge 1.3: Genleştirilmiş perlitin fiziksel özellikleri [Devlet Planlama Teşkilatı, 2001, Çiçek, 2002, Türk Standartları Enstitüsü, 1982].

Renk	Beyaz
Özgül ağırlık (kg/m ³)	55-300
Birim ağırlık (kg/m ³)	30-250
Erime noktası (C°)	1300
Isıl iletkenliği (W/mK)	0,04
Isıl genişleme (m/m K)	4*10 ⁻⁶ -11*10 ⁻⁶
Ateşe karşı dayanım	Yanmaz
Ses yutma	0,60

Çizelge1.4: Perlitin kimyasal analizi (%)

Bileşen	% Oran
SiO ₂	71,00-75,00
Al ₂ O ₃	12,5-18,0
Na ₂ O	2,90-4,00
K ₂ O	4,00-5,00
CaO	0,5-2,00
Fe ₂ O ₃	0,1-1,5
MgO	0,03-0,5
TiO ₂	0,03-0,2
MnO ₂	0,00-0,1
SO ₃	0,00-0,1
Cr	0,00-0,1
Ba	0,00-0,1
PbO	0,00-0,5
FeO	0,00-0,1

Bazı uygulama alanlarında, perlitin yalnız bir özelliği önem kazanmakla beraber uygulama alanlarının çoğunda birden fazla özelliğinin etkili olduğu bilinmektedir. Genleştirilmiş perlit, çeşitli uygulama alanlarından istenen şu özelliklere sahiptir;

Gözeneklilik

Gözeneklilik, perlite emicilik ve yüzeyde adsorpsiyon özelliği verir. Bu özellik perlit taneciklerindeki boşluk hacminin toplam tanecik hacmine oranının ortalaması olarak tanımlanır.

Hafiflik

Hafiflik gözenekliliğin bir sonucu olarak ortaya çıkmakta ve özellikle prefabrik yapı malzemesi ve dolgu malzemelerinde önem taşımaktadır.

Isı ve Ses Yalıtıcılık

Isı ve ses yalıtıcılık özelliği, hafiflik gibi gözenekli yapının sonucu olarak belirir ve kendi başına perlit kullanımını özendiren en önemli faktördür.

Kimyasal İnerlik

Perlit kararlı kimyasal yapısı ile kimyasal reaksiyonlara girmeyen ve suda çözünmeyen bir maddedir. Bu özelliğinden dolayı perlit çeşitli kimyasal maddelerle birlikte, onları etkilemeden kullanılabilmekte, ayrıca fiziksel özellikleriyle de katkıda bulunmaktadır.

Yanmazlık

Anorganik bir yapıya sahip olan perlit, özellikle hafiflik ve yalıtıcılıkta kendisine rekabet edebilecek organik kökenli yapay malzemelere oranla yanmazlık üstünlüğüne sahiptir. Yanmazlık özelliği yanında, yüksek sıcaklıklara uzun süre bozulmadan dayanabilme ve ısı yalıtıcılık özellikleri bulunduğundan, yangında zarar görmesi istenmeyen önemli yapı elemanlarının korunmasında kullanılır.

Çözünürlük Özellikleri

-Konsantre sıcak alkali ve hidroflorik asitte çözünür.

-Konsantre mineral asitlerinde az çözünür. (< %2)

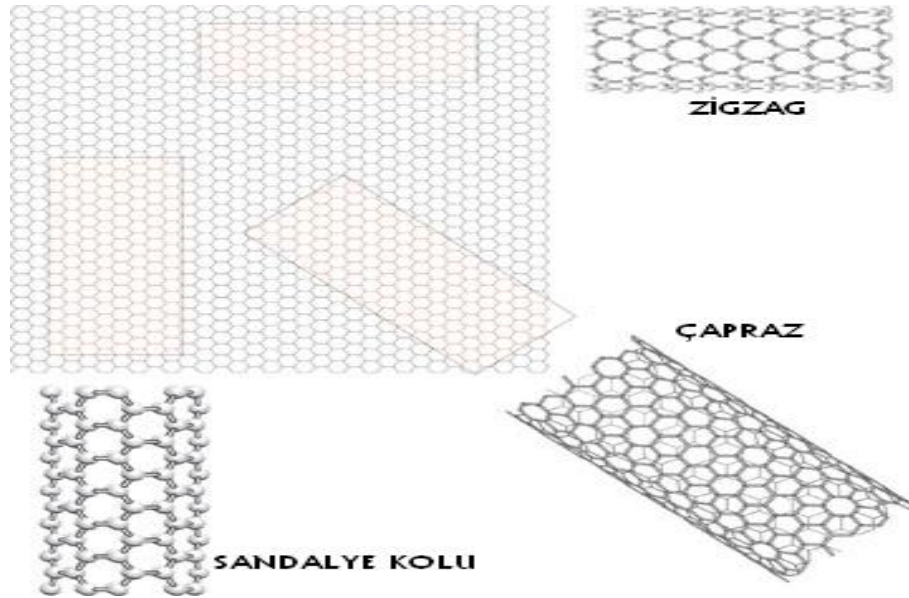
-Seyreltik mineral veya konsantre zayıf asitlerinde çok az çözünür (< %1) Yalgın,1983, Toydemir,1968].

1.1.3.2.d. Çok Duvarlı Karbon Nanotüp (MWCNTs)

İlk defa Japon bilim adamı Lijima 1991'de yaptığı çalışmalarda karbonun tüp şeklinde yapılar meydana getirdiğini gözlemledi. Karbon grafit'ten "arc-discharge" buharlaştırma yöntemiyle yapılan deneylerde, grafit plakasının kıvrılarak silindir şekline gelmesiyle içi boş boru halinde tüplerin oluştuğunu Lijima gözlemledi.

Karbon nanotüpler üç farklı yönde oluşurlar;

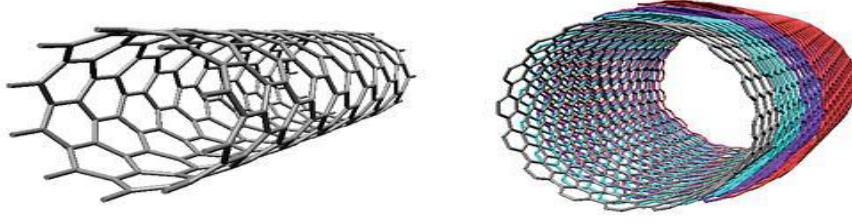
- 1- Zigzag geometri
- 2- Sandalye kolu geometri
- 3- Çapraz geometri



Şekil 1.11: Karbon nanotüp oluşumları

Karbon nanotüpler, geometrilerine bağlı olarak yarı-iletken ve metalik özellik gösterirler. Hiç bir katkı maddesi olmaksızın, nanotüpün, geometrik parametrelerinin değiştirilmesiyle, elektronik özellikleri de değiştirebilir. Tüplerin elektronik uygulamalarda, önemli bir yeri vardır. Çok esnek ve sağlamdırlar [www.nano.gov].

Genel olarak karbon nanotüpleri iç içe geçmiş tüp sayılarına göre tek duvarlı (SWCNT), çift duvarlı (DWCNT), çok duvarlı (MWCNT) vb. şekilde isimlendirilir. Uzunlukları ve çapları üretim yöntemlerine göre değişmekle birlikte çap uzunluk oranı 100 ile 1000 arasında değişmektedir



Şekil 1.12: Tek katmanlı ve çok katmanlı karbon nanotüp modeli

İletken ve elektrik alanına duyarlı oldukları için, elektronik malzeme olarak manyetik ve optik nanoaygıt yapımında; ayrıca hafıza elemanı, kapasitör, transistor, diyot, mantık devresi ve elektronik anahtar yapımı gibi geniş bir elektriksel uygulama alanı bulunmaktadır [<http://www.nanotube.msu.edu>]. Karbon nanofiberler, çok geniş yüzey alanına sahiptir. Nanofiberin kütlesiyle alanı arasındaki oran, normal malzemelere göre çok büyüktür. Örneğin kütlesi 1 gr. olan bir karbon nanotüp fiberin alanı, 300 m² yi bulabiliyor [Erkoç,2001]. Karbon nanotüp fiberlerin bu özelliği sayesinde, nanometre düzeyinde süper kapasitörler; dolayısıyla da yapay kas üretimi mümkün olabilecek. Hidrojen depolamaya da olanak sağlayan geniş yüzey alanı, Karbon nanotüp fiberleri, potansiyel enerji depolama malzemesi haline getiriyor [<http://www.nanotube.msu.edu>].

Yapılan enzim immobilizasyon çalışmalarında kitosan matriksinde tutulan karbon nanotüplerin, enzim yüklemesini, stabilizasyonu, mekanik-termal dayanıklılığı arttırdığı, yüzey alanını genişlettiği ve enzim kaçışını azalttığı rapor edilmiştir [Ma et al,2009, Tan et al, 2012]. Oksidasyonda CNT' ler yerine çok katlı CNT' ler kullanılarak elektrokatalitik özellikleri artırır. Bununla birlikte, MWCNT' leri asitleştirme işlemi ile fonksiyonlandırarak, elektroaktif bölgeleri genişletilebilir. Artan elektroaktif bölgeleri ile oksidasyon için daha yüksek katalitik aktivite sağlanır [Ge et al,2009].

1.2. Lipazlar (Gliserol Ester Hidrolaz E.C.3.1.1.3)

Günümüzde yaklaşık olarak 4000 enzim bilinmekte olup, bunlardan 200'ü ticari olarak kullanılmaktadır [Sharma et al,2001]. Bu ticari enzimler içerisinde % 3 pazar payına sahip olan [Telefoncu,1997] lipazlar, biyokatalizörler içerisinde önemli bir yer almakta ve biyoteknolojik uygulamalarda yüksek oranda kullanılmaktadırlar [Ghosh et al, 1996].

Lipazlar (triacilgliserol ester hidrolazlar, EC 3.1.1.3) gliserin ester bağlarının parçalanmasını sağlayan hidrolaz grubu enzimlerdir. Sulu ortamlarda yağları hidrolizleyerek monogliserid, digliserid, serbest yağ asitlerinin ve gliserol oluşumunu katalizlerken, su miktarının sınırlı olduğu hidrofobik organik çözügenlerde gliserol ve yağ asitlerinden açilgliserol oluşumunu katalizlemektedir [Gjellesvik et al, 1989].

Lipazlar, kompleks moleküllerin dönüşümlerinde kullanılan klasik organik tekniklere, sahip oldukları pek çok özellikle, mükemmel bir alternatif oluşturmaktadırlar.

Lipazlar hidroliz, interesterifikasyon, esterifikasyon, asidoliz ve aminoliz gibi çeşitli biyodönüşüm reaksiyonlarını gerçekleştiren çok amaçlı biyolojik katalizörlerdir. İlaç, pestisit, kozmetik, biyosensörler ve deterjan sanayi gibi birçok alanda da lipazlar karşımıza çıkmaktadır.

Lipazların göze çarpan en önemli özellikleri sulu ve susuz (organik) fazların ara yüzeyinde reaksiyon göstermeleridir ki bu özellikleriyle esterazlardan ayrılırlar. Lipaz ara yüzey aktivasyon düşüncesi, onların katalitik aktivitelerinin genellikle substratlarının agregasyon haline bağlı olması gerçeğinden doğar. Ancak lipazlar ve lipitlerin ara yüzeylerde birbirlerini nasıl etkiledikleri halen tam olarak açıklanamamıştır ve bu konu yoğun araştırmaların odağı haline gelmiştir [Sharma et al, 2001].

Lipaz aktivitesi genellikle uygun (kullanılabilir) yüzey alanına bağlıdır. Çeşitli lipazlar üzerinde yapılan son yapısal çalışmalar hidrolitik aktiviteleri, ara yüzey aktivasyonları ve stereo seçiciliklerini anlamamıza yardımcı olacak ipuçları sağlamıştır.

Başta hidroliz olmak üzere transesterifikasyon, asidoliz, esterifikasyon ve aminoliz gibi birçok reaksiyonu katalizleme özelliğine sahip lipazlar ılımlı reaksiyon koşulları altında çalışırlar. Organik çözücülerde kullanılabilirler ve spesifik reaksiyonlara seçicilik gösterirler.

Son zamanlarda lipolitik enzimleri 'gerçek' lipaz (E.C.3.1.1.3) olarak sınıflandırabilmek için iki ölçüt tanımlanmıştır:

- Birincisi; bu enzimlerin ara yüzeyde aktive olmaları ve emülsifiye haldeki trigliserit substratların varlığında, aktivitelerinin büyük ölçüde artmasıdır. Bu olgu yüzeyler arası aktivasyon olarak (interfacial activation) olarak isimlendirilir.

- İkinci ölçüt; yüzey lupunda yer alan, enzimin aktif bölgesini saran ve ara yüzeyle temas ettiğinde açılabilen bir kapağa (lid) sahip olmalarıdır.

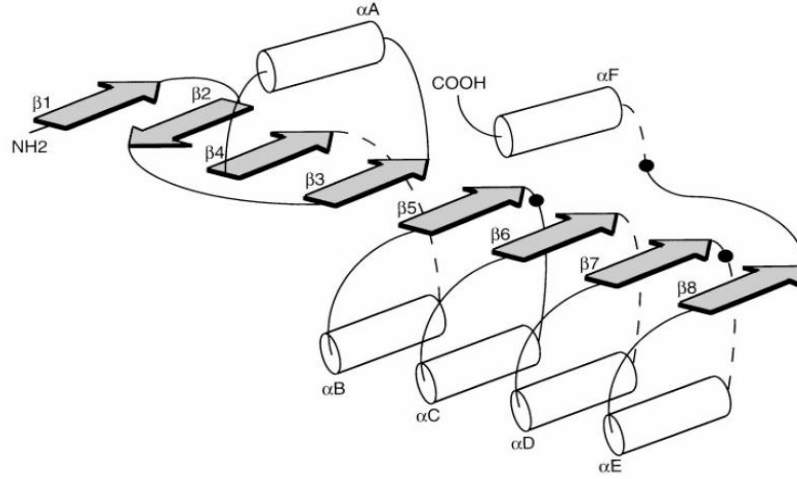
Ancak birkaç istisnai durum dışında enzimlerin genelde kapak yapısına sahip olmalarına karşın, yüzeyler arası aktivasyon göstermemeleri; öne sürülen bu ölçütlerin sınıflandırma için uygun olmayabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle lipazlar, uzun zincirli açilgliserollerin hidroliz ve sentezini katalize eden karboksilesterazlar olarak tanımlanmaktadır. 'Uzun zincir' için kesin bir tanım yapılmamakla birlikte, açil zincir uzunluğu on karbon atomundan uzun olan gliserol esterler, lipaz substratları olarak kabul edilmektedir. Ancak birçok lipazın, esteraz substratlarını hidroliz etme yeteneğine sahip olduğu da ayrıca vurgulanmalıdır [Jeager et al,1997].

Öte yandan yüzeylerarası aktivasyon ve kapak yapısı lipazları esterazlardan ayıran en belirgin özelliklerdir. Lipazların büyük bir çoğunluğu aktif bölgelerini örten bir helikal segmente (kapak/lid) sahiptir. Lipit kümelerinin varlığında bu kapak açılır ve yüzeylerarası aktivasyon gerçekleşir. Yüzeylerarası aktivasyon göstermeyen lipazlarda kapağın olmadığı ya da kapak- "domain"inde delesyon bulunduğu gözlemlenmiştir. Ancak *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida antarctica* B ve *Burkholderia glumae* lipazları kapak yapısına sahip olmalarına karşın,

yüzeylerarası aktivasyon göstermezler. Sulu ortamda lipazlar için baskın konformasyon kapalı formdur. Aktif bölge, kapak yapısını oluşturan bir ya da daha fazla "loop" tarafından çözücüden korunmuştur. Kapağın dış parçası hidrofilitir. Bu konformasyon elektrostatik etkileşimler aracılığıyla kararlı kılınmıştır. Bir su-yağ emülsiyonunda kapağın açılması, substratların aktif bölgeye girişine izin verir (açık konformasyon). Kapağın açılmasıyla, nükleofilik serin residüsü büyük hidrofobik yüzeyler ile etkileşir ve lipaz enziminin aktif forma geçmesi sağlanır [Verger,1997, Schmid et al].

1.2.1. Lipazın Üç Boyutlu Yapısı

Tüm kaynaklardan elde edilen lipazların üç boyutlu yapıları hemen hemen birbirine benzemektedir. 1990 ile 1995 yılları arasında 11 değişik lipaz türünün yüksek çözünürlükteki yapısı çözülmüştür. Burada boyut, sıralama benzerliği, substratlar ve aktivatörler dışında çoğunluğunun benzer yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda tüm lipazların karakteristik olarak katalitik grupları içeren merkezi bir β -bandı ile α/β hidrolaz yapıdaki proteinlerin iç yapısı incelendiğinde ise paralel β kıvrımlı bantların heliks şeklindeki α yapıları ile ayrıldığı ve süper heliksel olarak dönmüş bir şerit şeklini aldığı görülmüştür. Heliks yapısındaki peptid kısımları ise bu şeridin dış kısımlarında yer almıştır.



Şekil 1.13: Doğal α/β hidrolaz katlanması

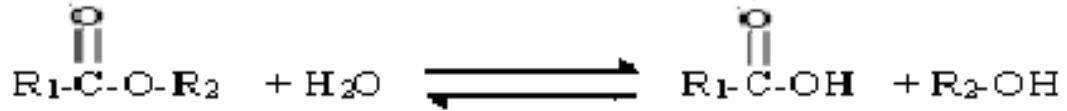
Lipazlar genel olarak C ve N olmak üzere iki kısma ayrılmış bir polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Bunlardan N- kısmı katalitik serinden yüzeye kadar uzanan ve uzun bir yağ asidi zinciri taşıyan bir hidrofobik tünel ile aktif merkezi kapsamaktadır [Akoh et al,1998]. Bu gruptaki enzimlerin farklı seviyelerdeki benzerliklerinin dışında bir sıralama istisnai olarak sıkça

gözlenmiştir; pentapeptit Gli-X-Ser-X-Gli. Bu serin amino asidinin yapıda korunması ve bunun değişime uğraması veya yer değiştirmesi ile katalitik aktivitenin yitilmesi 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 amino asidine yakın -2 ve +2 pozisyonlarındaki amino asitlerinin küçük yan zincir gruplar içermesi mecburidir. Katalitik serin amino asidine ilave olarak çoğu lipazın aktif merkezi histidin ve baksa bir amino asit (Asp veya Glu) daha içerir. Nükleofilik serin bir β bandı ile α heliksinin karşısında yer alırken histidin, aspatik asit ve glutamik asit ise serinin diğer yanlarında yer alır. Katalitik bölgeyi içeren amino asitler çoğu lipaz yapısında korunur. Lipazlar için tahmin edilen katalitik mekanizma aktif merkezde bulunan serin aminoasidi 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 [Petersan et al,2001].

1.2.2. Lipazların katalizlediği reaksiyonlar

1.2.2.1. Hidroliz

Ester bağlarının hidrolizi lipazlar tarafından katalize edilebilir.



1.2.2.2. Esterleşme

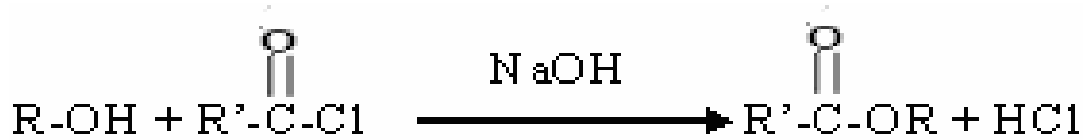
Esterleşme reaksiyonunda alkolle tepkimeye girecek maddeler; asit klorür, anhidrit ester, amit, nitril, asit tuzu gibi maddelerdir. Bu maddelerin etkinlikleri asit klorür> anhidrit> ester> amit, nitril> asit tuzu > asit sırasıyla azalır.

Karboksilli asitlerden



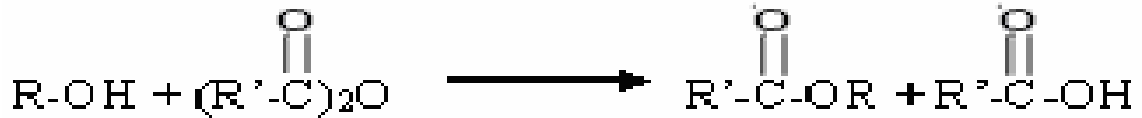
Asit ve alkolden ester oluşması bir denge reaksiyonudur. Dengeyi ester tarafına kaydırmak için çıkış maddelerinden biri ve çoğunlukla alkol aşırı miktarda alınır veya su ortamdan uzaklaştırılır. Ortamdan suyun uzaklaştırılması dengenin asit ve alkol tarafına kaymasını engeller.

Asit klorürlerinden



Bu sentez çok fazla uygulanır, çünkü reaksiyon tersinir değildir. Alkoller ve fenoller, en çok asit klorürleri ile esterleştirilir. Açığa çıkan HCl uçar veya dimetilalanilin, piridin veya NaOH gibi bir bazla tutulur.

Asit anhidritlerinden



Asit anhidritlerinin esterleşmeleri çok kullanılır, katalizör olarak H₂SO₄, ZnCl₂, sodyum asetat ve H₃BO₃ alınabilmektedir.

Nitrillerden

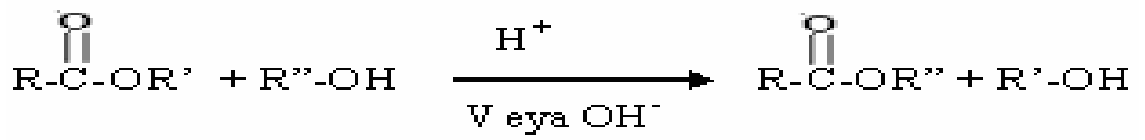


Nitriller bir asit katalizör beraberinde alkollerle ısıtılarak esterlere dönüştürülür, aside hidroliz ve alkolle esterleşme bir arada olur. Sentezden özellikle polifonksiyonlu bileşiklerin hazırlanmasında yararlanılır

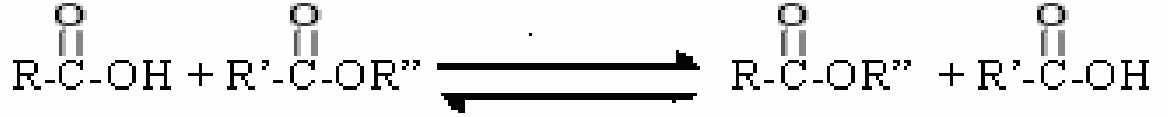
1.2.2.3. Ester Değişimi

Lipazla olan reaksiyonlar sonucu bir esterden ve yanında başka bir reaktif kullanarak yeni bir ester oluşumudur.

Lipazla olan reaksiyon sonucu farklı yapıda bir ester ve alkol eldesi;



Lipazla olan reaksiyon sonucu farklı yapıda bir ester ve asit eldesi;



Lipazla olan reaksiyon sonucu, iki esterin ester değişimi ile yeni iki ester eldesi [Erdik ve diğerleri, 2001]



1.2.3. Lipaz türleri

1.2.3.1. Mikrobiyal Lipazlar: Bitki, hayvan ve mikrobiyal lipazların arasında çok geniş uygulama alanı bulan lipazlar, mikrobiyal lipazlardır. Bunun sebebi, mikropların kolay yetiştirilebilmeleri ve lipazlarının çeşitli hidrolitik ve sentetik birçok reaksiyonu katalizleyebilmeleridir. Mikrobiyal lipazların üretimi için küfler en uygun kaynak olup, özellikle gıda sanayinde kullanılan enzimlerin endüstriyel üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.2.3.2. Bakteriyel Lipazlar: Bakteriyel lipazlar glikoprotein yapısındadırlar, fakat bazı hücre dışı bakteriyel lipazlar lipoprotein yapısındadırlar. Çoğu bakteride enzim üretiminin bazı polisakkaritler tarafından etkilendiğini bildirmiştir. Şimdiye kadar çoğu bakteriyel lipazların yapıcı

ve substratlarına karşı özgül olmadığı ve az bir kısım bakteriyel lipazların da ısıya karşı dayanıklı olduğu bildirilmiştir.

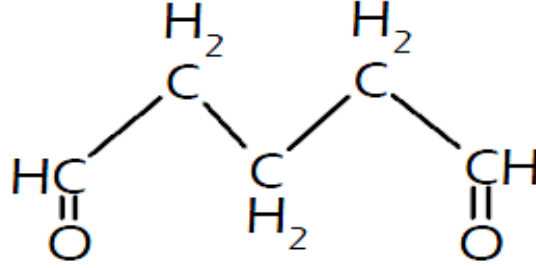
1.23.3. Fungal Lipazlar: Fungal lipazlar üzerinde 1950'lerden beri çalışılmaktadır ve Lawrence, Brockerhoff ve Jensen kapsamlı görüşler sunmuşlardır. Bu lipazlar, düşük maliyetli soy verme özelliklerinin olması, ısıya ve pH'ya karşı dayanıklı olmaları, substrat özgüllüğü ve organik çözücülerde aktif olmalarından dolayı kullanılmaktadırlar. Ticari lipazların başlıca üreticileri *Aspergillus niger*, *Candida cylindracea*, *Candida rugosa*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *R.delemar*, *R. japonicus*, *R. niveus* ve *R. oryzae* türleridir [www.birseoygren.com/hakkında/lipaz, 2007].

1.2.4. Lipaz İmmobilizasyonu

Çeşitli endüstri dallarında lipaz uygulamalarının giderek genişlemesi gereksinim duyulan lipaz miktarını artırmıştır [Bruno et al,2004]. Lipazların endüstriyel uygulamalarda yer almalarının önündeki en önemli engeller; yüksek fiyatları [Shimada et al, 1999, Fukuda et al 2001, Du et al, 2004], işlem şartları altındaki kararsızlıkları ve düşük aktiviteye sahip olmaları şeklinde sıralanmaktadır [Nelson et al,1996, Sihama et al,1999, Watanebe et al,2000, Iso et al,2001, Köse ve diğerleri,2002, Shimada et al,2002, Gaur et al,2006]. Tüm bu faktörler göz önüne alındığında, endüstriyel uygulamalarda kullanılacak immobilize lipazların önemli olduğu görülmektedir.

Serbest enzimle gerçekleştirilen katalizlemenin bilinen sakıncaları [Andersch et al, 1997, Iso et al,2001] ve lipaza özgü çeşitli kısıtlamalar [Giorno et al,2000, Soumanoua et al,2003] nedeniyle üretime yönelik araştırmalarda birkaç çalışma hariç [Nelson et al,1996, Kaieda et al 2001, Kojima et al,2004] immobilize lipazların kullanımı araştırılmaktadır. İmmobilize enzim kullanımı ile enzimin tekrar kullanımının mümkün olması, ürünün enzim içermemesi nedeniyle saflaştırma maliyetinin düşmesi, sürekli bir dönüşüme imkân tanınması, daha kontrollü koşullarda ürün oluşumunun gerçekleştirilmesi, nispeten daha basit ve verimli dönüşüm işlemleri gibi avantajlardan bahsedilmiştir [Bernath et al, 1996]. Bir destek üzerine enzim immobilize prosedürleri ile mekanik dayanım, mikrobiyal rezistans, termal ve kimyasal stabilite, düşük maliyet, hidrofiliklik ve yüksek miktarda enzim tutuklayabilme gibi avantajlar elde edilebilmektedir [Abdulrahman et al,2005]. Ayrıca lipaz enzimi ile gerçekleştirilen pek çok çalışmada immobilizasyon sonrasında aktivite artışları da gözlemlenmiştir. Özellikle çapraz bağlanmış enzim agregat yapısı (Cross Linked Enzyme Aggregate: CLEA) ile lipaz aktivitesinin büyük oranda arttığı gözlenmiş ve bu durum hiper aktivasyon olarak adlandırılmıştır GA pek çok protein çapraz bağlama prosedüründe proteinlerin yüzeyindeki reaktif amino grupları aracılığıyla bağlanmasını sağlamak amacıyla uzun yıllardır sıklıkla kullanılmaktadır [Cao et al,2003,

Schoevaart et al,2004]. GA aktif aldehitler içermekte ancak enzim tutuklama prosedürü sonrasında bunların etkinliği kalmamaktadır. İmmobilize lipaz geliştirilmesinde en sık kullanılan çapraz bağlama aracı olduğu belirtilmektedir [Bastida et al,1998, Atia et al,2005, Bruno et al, 2003]. GA ile gerçekleştirilecek bir kovalent bağlamanın termal ve kimyasal denatürasyona karşı enzimi koruduğu bildirilmiştir [Kuncova et al, 1987].



Şekil 1.14: Glutaraldehitin kimyasal yapı formülü

1.2.5. Lipazların Endüstriyel Uygulamaları

Ticari enzimlere özellikle de mikrobiyal kaynaklı olan enzimlere olan ilgi pek çok alanda kullanıma sahip olmalarından dolayı gün geçtikçe artmaktadır. Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar kimyasal metotlara göre daha ucuz ve de daha basittir. Enzimler başta gıda, eczacılık, deterjan, tekstil ve kozmetik olmak üzere pek çok sanayi dalında yaygın olarak kullanılmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nin 1995 yılındaki yaklaşık ticari enzim satış hacmi 1 milyon dolar olmakla birlikte bu rakamın 2005 yılına kadar ikiye katlanması beklenmektedir. Bu enzimlerin en az %75'lik kısmını hidrolazlar oluşturmaktadır ve bunlarında %90'ı mikroorganizmalardan fermantasyon yolu ile üretilmektedir. Son on yılda mikrobiyal kaynaklı lipazın biyokatalitik potansiyelinin anlaşılmasından sonra, bu enzim de sanayide yaygın olarak kullanılmaya başlanmış ve böylece toplam satış hacminde üçüncü sırada yer almıştır [Jeager et al, 2002].

Protein ekstraksiyonu ve saflaştırma metotları, genetik mühendisliği ve buna bağlı olarak klonlama çalışmalarının ilerlemesi ile lipaz katalizli reaksiyonların klasik kimyasal yöntemlere kıyasla, ticari açıdan daha uygun alternatif oluşturacağı düşünülmektedir. Ekolojik kaygılar da lipaz kullanımını desteklemektedir, lipaz katalizli reaksiyonlar canlı metabolizmasında gerçekleşen metabolik yollara eşdeğer olduğundan bu reaksiyonlar, kimyasal katalizli reaksiyonlara göre çevre açısından sorun oluşturmamaktadır [Falch et al, 1991].

Bu uygulamalara örnek olarak; gıda katkısı (lezzet artırıcı) [Downey et al, 1980], kaliteli kimyasallar (ester sentezleri), deterjanlar (yağların hidrolizi) [Falch, 1991], atık su arıtımı (yağ kalıntılarının uzaklaştırılması ve ayrılması), kozmetik (lipidlerin uzaklaştırılması) [Macrae et al,

1990] eczacılık (gıdalardaki katı ve sıvı yağların sindirimi) [Ghosh et al, 1996] dericilik (hayvan derisindeki yağların uzaklaştırılması), medikal (kan trigliserit tayini) [Elibol ve diğerleri,2000] verilebilir. Bunun yanı sıra lipazların diğer avantajları;

1) Sterospesifiklik, seçimlilik ve substrat seçimliliği gibi özellikleri sayesinde kimyasal katalizatörlere göre daha kaliteli ürün üretimine imkan tanınması,

2) Düşük aktivasyon enerjisine gereksinim duymalarından ve ılımlı koşullarda (düşük ısı ve pH) reaksiyon vermelerinden dolayı, reaksiyon için ihtiyaç duyulan enerjinin azalması ve reaksiyon ürünlerinin ortam ısısından dolayı görecekleri zararın indirgenmesidir.

Yıkama esnasındaki yağ uzaklaştırma işlemi, lipolitik yıkım gerektirdiğinden sentetik kimyasal deterjanlar yerine enzim içeren deterjan üretimi lipazlar için büyük pazar oluşturmaktadır.

Süt endüstrisinde peynirin olgunlaştırılma sürecinin hızlandırılmasın da, peynir benzeri ürünlerin (krema, sos, çorba) üretimi amacıyla sütün içerdiği yağın hidrolizinde lipazlar kullanılmaktadır [Downey et al,1980].

Ayrıca lipazlar, katalizledikleri reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin saflığından dolayı katı ve sıvı yağların hidroliz ve interesterifikasyonu için önemli potansiyele sahiptirler. Enzim kullanımında, enzimatik olmayan reaksiyonların gerektirdiği yüksek sıcaklık gibi sert koşullara gerek duyulmadığından, reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin ısı nedeniyle bozulması (koku, renk kaybı) söz konusu olmaz [Sharma et al,2001].

Lipaz teknolojisi ayrıca katı ve sıvı yağlara istenen fonksiyonel ve besinsel özellikler kazandırılarak yeniden yapılandırılmalarına, düşük kalite yağlardan yüksek kalitedeki yağların üretimine olanak sağlar (örneğin kakao yağı, anne sütü benzeri çocuk gıdaları ve çoklu doymamış yağ asitlerince zengin yağ üretimi).

Diğer bir endüstriyel uygulama alanı, ilaç ve kimyasal üretiminde optikçe aktif ve saf polimerlerin (rasemik karışımları yerine) lipaz katalizli sentezidir. Lipaz katalizi ile üretilen monogliseritler, gıda ve kişisel bakım ürünlerinin (cilt, güneş kremleri, banyo yağları) üretiminde emülsifiye edici olarak görev alırlar. Tedavi edici krem olarak kullanılan yağ asidi ve yağ alkollerinin esterlerinin ve biyosüfaktan olarak kullanılan şeker esterlerinin sentezi yine lipaz katalizli reaksiyonlarla gerçekleştirilir [Antonian et al,1988].

Çizelge 1.5: Lipazların başlıca kullanım alanları ve kullanım amaçları

Sanayi Dalı	Etki	Ürün
Unlu mamuller	Lezzet artırıcı, raf ömrü uzatıcı	Unlu mamuller
İçecek	Aroma geliştirici	İçecekler
Kimya	Enantiyo seçicilik	Kiral kimyasallar
Temizleme	Sentez Hidroliz	Kimyasallar Sörfektanlar gibi temizleme ajanlarının uzaklaştırılması
Kozmetik	Sentez	Emülsifiye ediciler, Nemlendirme ajanları
Süt ve süt mamulleri	Süt yağının hidrolizi Peynirin olgunlaştırılması Tereyağın modifiye edilmesi	Lezzet ajanları Peynir Tereyağı
Katı ve sıvı yağlar	Transesterifikasyon Hidroliz	Kakao yağı, margarin Yağ asitleri, gliserol, mono ve digliseridler
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. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

Çalışmada kullanılan kimyasallar lipaz (porcine pancreatic lipase; EC Number: 3.1.1.3), kitosan (CT), paranitrofenil palmitat (p-NPP), p-nitrofenol (p-NP), triton X-100, glutaraldehit (GLA), epiklorohidrin (ECH), perlit, çok duvarlı karbon nanotüp (MWNCTs) (çapı 110-170 nm, uzunluğu=5-9 mikron, 90+%), nitrik asit (HNO₃), sülfirik asit (H₂SO₄), tris (hidroksimetil amino metan), sodyum trifosfat penta bazik (TPP), propanol (Sigma-Aldrich, ABD); gum arabic, sodyum hidroksit (NaOH), sodyum asetat (CH₃COONa), asetik asit (CH₃COOH), potasyum dihidrojenfosfat (KH₂PO₄), dipotasyum hidrojen fosfat (K₂HPO₄) (Merck, Almanya).

Çalışmada kullanılan araç ve gereçler; lipazın aktivitesini ölçmek için UV-vis spektrofotometre (Shimadzu UV), boncukların karakterizasyonu için fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) (Perkin Elmer Spectrum BX), pH'ı ayarlamak için pH metre (Inolab WTW series), inkübatör (GFL), kullanılmıştır.

SEM ve TGA analizleri hizmet alımı karşılığında yaptırılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

2.2 Yöntem

2.2.1 Serbest ve İmmobilize Lipazın Aktivite Tayini

Porcine pancreatic lipaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde, substrat olarak p-nitrofenil palmitat (p-NPP) kullanılarak spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. p-NPP ile gerçekleştirilen enzim aktivitesi çalışmalarında aktivite p-NPP'in enzimatik hidroliziyle gerçekleştirilmektedir [Abramic ve ark., 1999; Dalmau ve ark., 2000; Nthangeni ve ark., 2001; Casa ve ark., 2002; Bruno ve ark., 2004; Bruno ve ark., 2005]. Hidroliz sonucunda p-nitrofenol (p-NP) oluşmakta ve çözeltinin berrak sarı rengi enzim aktivitesine bağlı olarak daha koyu bir sarı renk almaktadır. Sonuçta da p-NP oluşumundan kaynaklanan absorbans artışı spektrofotometrik olarak ölçülmektedir.

Bir Uluslararası Ünite (*International Unit: IU*) lipaz aktivitesi, uygulama koşullarında dakikada 1 μ mol p-NPP parçalanmasını katalizleyen lipaz miktarı (mL) olarak tanımlanmıştır.

2.2.2. p-Nitro Fenol Standart Eğrisinin Oluşturulması

p-nitrofenol standart grafiği oluşturmak için 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08 ve 0,1 mM p-nitrofenol çözeltileri hazırlandı. Çözeltileri hazırlamak için tampon olarak; 200 mg Triton X-100 üzerine 50 mg gum arabic 50 mL pH:7,5 (0,05 M) fosfat tamponu emülsifiye edildi ve 9:1 oranında propanol ile karıştırıldı. Hazırlanan p-nitrofenol çözeltilerinin üzerine %1 (w/v) lik Tris çözeltisinden ilave edilerek 410 nm de ölçümü alındı. p-NP ürününün molar absorpsiyon

katsayısı ($\epsilon = 10500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) deneysel olarak çizilen standart grafiğinden belirlenerek enzim aktivite değerlerinin hesaplanmasında kullanılmıştır.

Çizelge 2.1 : *p*-Nitrofenol standart eğrisi

	Kör	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Distile Su (mL)	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 mM <i>p</i> -NP çözeltisi (μL)	-	10	20	30	40	60	80	100	120	140	160
Tampon (μL)	-	990	980	970	960	940	920	900	880	860	840

%1 lik Tris(w/v) çözeltisinden 1000 μL eklenir.

410 nm de ölçüm alınır

Bulunan değerler ile standart grafiği çizilir. Aktivite tayini için çizelge 2.2 takip edilir.

Çizelge 2.2: Lipaz Aktivite Tayin Yöntemi

	Kör	Örnek
Saf Su	100 μL	---
Substrat	900 μL	900 μL
Serbest Enzim	----	100 μL
İmmobilize Enzim	----	50 mg boncuk
İnkübasyon (15 dakika, 37 °C' de)		
% 1 lik Tris Bazı	1000 μL	1000 μL
Santrifüj (6000 rpm, 15 dakika)		
410 nm de ölçüm alınır		

Substrat: Çözelti 1) 200 mg Triton X-100 tartılarak üzerine 50 mg gum arabic ve 50 mL pH:7,5 0,05 M fosfat tamponu eklendi. **Çözelti 2)** 15 mg *p*-NPP tartılarak üzerine 10 mL propanol ilave edildi. Çözelti 1 den 810 μL ve çözelti 2 den 90 μL karıştırılarak substratımız hazırlanmış oldu.

$$U = \frac{\text{Abs} \times V_{\text{topl}}}{\epsilon \times \text{Süre (dk)} \times \text{Enzim Miktarı (mL)}}$$

2.2.3. Protein Tayini

Protein miktarı tayini ise Bradford [Bradford, 1976] yöntemi ile gerçekleştirildi. Bradford tarafından geliştirilen ve boyasının kullanıldığı bu yöntem oldukça duyarlıdır. (5-100 µg protein/mL).

Bradford reaktifinin hazırlanması için 40 mg Comassie Brilliant Blue G-250 alınarak üzerine 50 mL % 95 lik etanol ilave edildi. Çözelti iyice karıştırıldıktan sonra üzerine derişik fosforik asitten 55 mL ilave edilmiş ve distile su ile karışım 1 litreye tamamlandı.

Standart protein eğrisinin çizimi için sırasıyla 0,02, 0,05, 0,1, 0,125, 0,15, 0,2 mg/mL olan sığır serum albümin (BSA) çözeltileri hazırlandı. Bu stokların her birinden ayrı ayrı 0,1 mL alınarak üzerine 2 mL Bradford reaktifi eklendi ve 10 dk. oda sıcaklığında bekletilip 595 nm. de absorbansları ölçüldü. Bu değerler, derişime karşı grafiğe geçirilerek standart protein eğrisi oluşturuldu, elde edilen grafik örneklerin protein içeriklerinin belirlenmesinde kullanıldı.

2.2.4. İmmobilizasyon Verimi ve Yükleme Etkinliğinin Hesaplanması

İmmobilizasyon verimi (% İY) aşağıdaki formüle göre hesaplandı [Cristovao et al,2011].

$$\% \text{ İY} = \frac{U_{\text{akt}}}{U_{\text{total}} - U_{\text{kalan}}} \times 100 \quad (1)$$

U_{akt} : İmmobilize enzimin aktivitesi

U_{total} : Serbest enzimin aktivitesi

U_{kalan} : Filtratta bulunan enzim aktivitesi

İmmobilize lipaz aktivitesi gram taşıyıcı başına düşen aktivite olarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı [Güler S,2012]:

$$A(U/g) = \frac{U_{\text{akt}}}{W_{\text{taşıyıcı}}} \quad (2)$$

U_{akt} : İmmobilize enzimin aktivitesi

$W_{\text{taşıyıcı}}$: Kullanılan taşıyıcının ağırlığı

Taşıyıcı üzerine bağlanan protein miktarı, total protein miktarından bağlanmayan protein miktarı çıkartılarak % yükleme etkinliği hesaplandı.

$$\% \text{ Yükleme Etkinliği} = \frac{C_i V_i - C_f V_f}{C_i V_i} \times 100$$

C_i = Serbest enzimin protein miktarı

V_i = Ortama konan enzim çözeltisinin hacmi

C_f = Filtratta bulunan protein miktarı

V_f = Filtrat hacmi

2.2.5. Kompozit Boncukların Hazırlanması

2.2.5.1. Perlitin Aktivasyonu

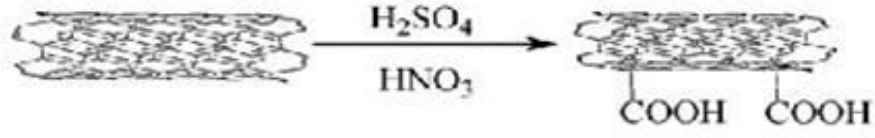
Bir miktar perlit öncelikle istenen boyutlarda elendi. (63 mesh elek kullanıldı.) Elenen perlit bir gece boyunca metanolde bekletildi. Distile su ile iyice yıkandıktan sonra üzerine 5 N NaOH çözeltisi eklendi ve 30 dk kaynar su banyosunda bekletildi. Daha sonra süzme işlemi gerçekleştirildi ve nötral oluncaya kadar distile su ile yıkandı.

2.2.5.2. Kitosan- Perlit Kompozit Boncuklarının Hazırlanması

Kitosan-perlit kompozit boncukları hazırlamak için öncelikle %2 lik kitosan çözeltisi hazırlandı. % 2'lik (w/v) kitosan çözeltisi, 2 g kitosanın % 2 lik asetik asit çözeltisinde çözülmesiyle hazırlandı. (100 mL için) Daha sonra hazırlanan bu çözeltiliye aktive edilmiş perlitte 1 gr eklendi. . Homojen bir süspansiyon elde edildikten sonra süspansiyon, TPP (pH:8,2) çözeltisine bir şırınga yardımı ile damla damla ilave edildi ve oluşan boncukların sertleşmesi için 4 saat bekletildi. Sertleşen boncuklar distile su ile iyice yıkanarak +4 °C de muhafaza edildi.

2.2.5.3. Çok Duvarlı Karbon Nanotüpün (MWCNTs) Aktivasyonu

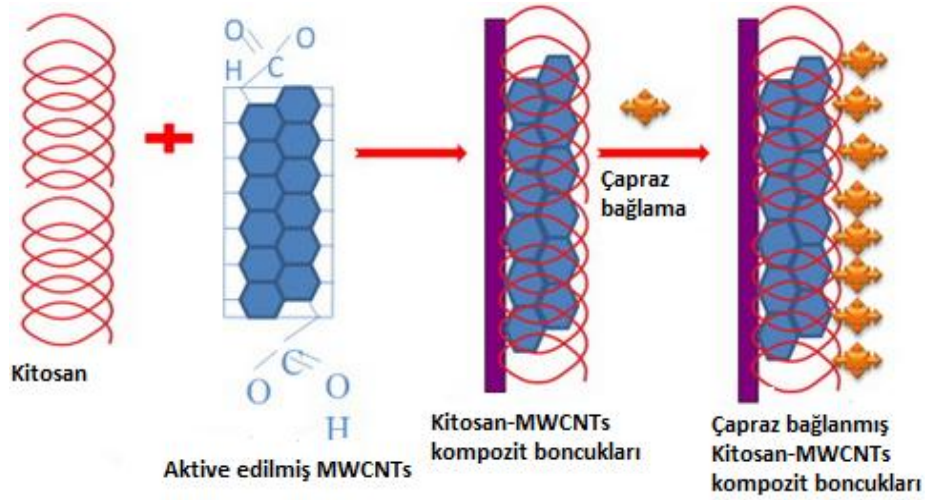
Çok Duvarlı Karbon Nanotüp,, 3:1 (v/v) konsantre H₂SO₄-HNO₃ asit karışımı kullanılarak kimyasal olarak aktive edildi. Aktivasyon işlemi 3.5 saat 55 °C' de manyetik karıştırma altında reflüks ile yapıldı. Aktifleştirme ile MWCNT' ün -COOH grupları aktifleştirilerek, karboksil grubu fonksiyonlandırılmış MWCNTs elde edildi (MWCNTs-COOH) [Want et al,2011]. Elde edilen MWCNT-asit süspansiyonu santrifüjlenerek, MWCNTs katı olarak ayrıldı. Ayrılan katı nötral olana kadar ultra saf su ile yıkandı ve etüvde kurutuldu.



Şekil 2.1: MWCNTs ün H_2SO_4 ve HNO_3 ile Aktivasyonu

2.2.5.4. Kitosan-Çok Duvarlı Karbon Nanotüp (kitosan-MWCNTs) Boncukların Hazırlanması

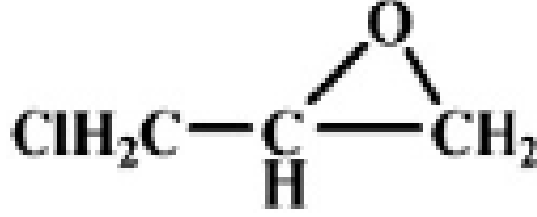
Kitosan-MWCNTs kompozit boncukları hazırlamak için öncelikle %2 lik kitosan çözeltisi hazırlandı. % 2'lik (w/v) kitosan çözeltisi, 2 g kitosanın % 2 lik asetik asit çözeltisinde çözülmesiyle hazırlandı. (100 mL için) Daha sonra hazırlanan bu çözeltiliye aktive edilmiş MWCNT den 400 miligram eklendi. Homojen bir süspansiyon elde edildikten sonra süspansiyon, TPP (pH:8,2) çözeltisine bir şırınga yardımı ile damla damla ilave edildi ve oluşan boncukların sertleşmesi için 4 saat bekletildi. Sertleşen boncuklar distile su ile iyice yıkanarak $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi.



Şekil 2.2: Kitosan-MWCNTs ECH ile çapraz bağlı kompozit boncuk hazırlanması

2.2.6. Kitosan-Perlit ve Kitosan – MWCNTs Kompozit Boncukların Epiklorohidrin (ECH) ile Muamelesi

Yapılan immobilizasyon denemeleri sonucu ECH ın epoksi grupları üzerinden çapraz bağlamada rol aldığı ortaya kondu.



Şekil 2.2: ECH ın Kimyasal Yapı Formülü

2.2.6.1. ECH ile apraz Bağlama Süresinin Etkisi

Optimum ECH inkübasyon süresinin belirlenmesi için boncuklar 1-2-3-4-5-6 ve 24 saat süreyle 50 mM ECH çözeltisiyle 50 °C de çapraz bağlandı. Çapraz bağlanan boncuklar distile su ile iyice yıkandı ve 1 mg/mL konsantrasyonunda 2 mL enzim çözeltisi eklenerek, inkübe edildi. 410 nm de aktive ölçümleri sonucunda optimum inkübasyon süresi belirlendi.

2.2.7. İmmobilizasyon Süresinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Çapraz bağlı boncuklar üzerine enzimin optimum bağlanma süresinin belirlenmesi amacıyla farklı sürelerde (1-2-3-4-5-6 ve 24 saat) 1 mg/mL konsantrasyonunda 2 mL enzim çözeltisi boncuklarla inkübe edildi. Belirtilen sürelerin sonunda immobilize enzim aktiviteleri ölçülerek optimum immobilizasyon süresi belirlendi.

2.2.8 Lipaz Enzim Konsantrasyonunun Etkisi

Optimum enzim konsantrasyonunu belirlemek için lipazın 0,5-5 mg/mL arasında değişen konsantrasyonlarında 2 mL enzim çözeltisi kullanıldı. Aktivite ölçümleri alınarak immobilizasyon için optimum enzim konsantrasyonu bulundu.

2.2.9 Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyon

2.2.9.1 Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzimler protein yapısında olduklarından sıcaklıkla denature olabilirler. Bu nedenle sıcaklık enzim aktivitesini etkileyen önemli parametrelerden biridir.

Serbest ve immobilize lipazın aktivitelerinin sıcaklığa bağımlılığını belirlemek amacı ile 18-70 °C sıcaklık aralığında aktivite ölçümleri yapılarak optimum sıcaklık değerleri belirlendi.

2.2.9.2. Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine pH Etkisi

Enzimler, elektrolit karakterli olduklarından, enzim aktifliği pH ile değişme gösterir [Michael, 1980]. Enzim, substrat ve koenzim moleküllerinde asidik ve bazik grupların varlığı ve pH değişimi ile enzim-substrat (ES) kompleksinin kararlılığını etkiler. Kararlı ES kompleksi oluştuğunda tepkime hızı maksimumdur. Bunun için enzimler için tepkime hızının maksimum olduğu optimum pH değerleri belirlenir.

Optimum pH belirlenmesi için pH 4,0-10,0 aralığında (0,05 M asetat (pH 4,0 – 5,0), 0,05 M fosfat (pH 6,0 – 7,0), 0,05 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,05 M glisin-NaOH (pH 9,0 – 10,0)) farklı tamponlar kullanıldı. Optimum koşullarda enzim aktiviteleri ölçüldü. Optimum pH değerleri belirlendi.

2.2.10. Kinetik Parametreler

İmmobilizasyon sırasında enzim proteinindeki konformasyonel değişiklikler, sterik engeller, mikroçevre etkileri ve difüzyon etkileri, immobilize enzimlerin serbest enzimden farklı davranışlar göstermesine neden olurlar. O nedenle immobilize enzimlerin kinetik davranışlarının incelenmesi, kinetik sabitlerinin tayini ve serbest enzimle kıyaslanması oldukça önemlidir [Coşkun, 2007].

Kinetik parametreleri belirlemek üzere farklı konsantrasyonlarda (2mM- 20mM aralığında) bir seri *p*-NPP çözeltileri hazırlandı. Serbest ve immobilize lipaz enzimleri için V_{max} ve K_m değerleri Lineweaver Burk grafiği ile belirlendi [Temizkan, 2004].

2.2.11. Kararlılık Testleri

Enzim immobilizasyonunun en büyük amaçlarından biri enzimin kararlılığının gerek medikal gerekse endüstriyel uygulamalardaki kullanılabilirlik etkinliğinin artırılmasıdır [Temizkan,2004]. İmmobilize enzimler için tekrar kullanılabilirliği kapsayan işlem kararlılıkları önemlidir. Serbest enzimler biyoteknolojik kullanımlarında sadece tek kez kullanılırlar ve işlem sonrası reaksiyon ortamından ayırlamadığı için tekrar kullanımları mümkün değildir. Ayrıca serbest enzim

ortamda kirlilikte yaratabilmektedir. Biyoteknolojik uygulamalarda enzimin defalarca kullanılabilmesi amacıyla immobilizasyon işlemleri gerçekleştirilmektedir.

2.2.11.1. Termal Kararlılık

Termal kararlılık, immobilize enzimlerin uygulamalarında önemli bir kriter olduğundan bu konuda pek çok çalışma yapılmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda serbest enzimler deaktive olurken, immobilize enzimlerde taşıyıcı genellikle yüksek sıcaklığa karşı koruyucu durumuna gelmektedir. Immobilizasyon işlemi ile enzimlerin biçimsel esnekliği değişmektedir. Immobilizasyon, enzimin sertliğini arttırmaktadır, bu da genellikle enzimin yükselen sıcaklığa karşı kararlılığın artmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle birçok çalışmada immobilizasyon işlemi sonucunda enzimin sıcaklık kararlılığında gelişme görülmektedir [Chang et al,2005]. Immobilize boncukların ve serbest enzimin termal kararlılığı, immobilize ve serbest enzimin farklı sıcaklıklarda (4-25-37-50-60-70-80 °C) 1 saat inkübe edildikten sonra optimum koşullarda aktivitelerinin ölçülmesiyle belirlendi.

2.2.11.2. pH Kararlılığı

İmmobilize ve serbest enzimin pH kararlılığını belirlemek için; immobilize enzim ve serbest enzim pH 4,0-10,0 aralığında (0,05 M asetat (pH 4,0 – 5,0), 0,05 M fosfat (pH 6,0 – 7,0), 0,05 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,05 M glisin-NaOH (pH 9,0 – 10,0) farklı tamponlarda 1 saat süreyle bekletildi. Daha sonra belirlenen optimum koşullarda enzimdeki aktivite kaybı incelendi.

2.2.11.3. Depo Kararlılığı

Enzimlerin immobilizasyon depo kararlılıklarının, yani ne kadar süreyle aktivitelerini koruyabildiklerinin belirlenmesi önemlidir. Kovalent bağlanma yöntemiyle kitosan üzerine, fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle perlit ve MWCNTs üzerine immobilize edilen lipaz enzimlerinin depo kararlılıkları incelendi.

Lipazın depo kararlılığını belirlemek için, enzim immobilizasyon sonrası immobilizasyonda kullanılan tamponla yıkanarak +4 ve +25 °C'de 8 hafta bekletildi. İmmobilize enzimlerin bu süre içinde belirli aralıklarla ölçümleri alındı.

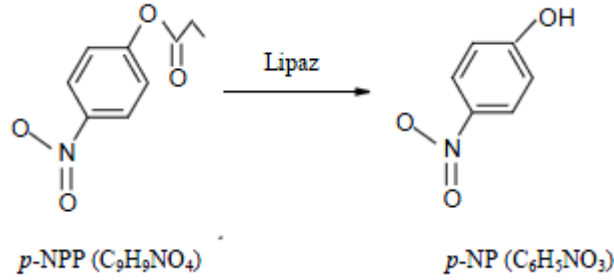
2.2.11.4. Tekrar Kullanılabilirlik

Enzim immobilizasyonunun amaçları arasında enzimlerin birçok kere kullanılmasını sağlayarak maliyeti düşürmek ve enzimlerin kesikli veya sürekli reaktörlerde kullanımlarını sağlamak sayılmaktadır. Bu nedenle immobilize edilen bir enzimin tekrar kullanılabilirlik özelliği çok önemlidir. Farklı taşıyıcılarda immobilize edilen lipazın tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için;

immobilize enzimden 50 mg tartılıp (paralel denemeler halinde) optimum reaksiyon koşullarında aktivite tayini yapıldı. Daha sonra boncuklar reaksiyon ortamından ayrıldı ve üst fazın absorbansı 410 nm'de ölçüldü. Immobilize enzim içeren boncuklar 0,05 M pH 7.5 fosfat tamponuyla yıkandı ve aktivite ölçüm prosedürü tekrarlandı. Aktivite ölçümlerine % kalan aktivite değeri %50 nin altına düşene kadar devam edildi.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

p-Nitrofenol kullanılarak spektrofotometrik yöntemle enzim aktivitesinin belirlendiği pek çok çalışmada en sık kullanılan yöntem Winkler ve Stuckmann'ın enzim aktivite ölçüm yöntemi ve en sık kullanılan enzim substratı *p*-nitrofenol palmitatdır. (*p*-NPP). *p*-NPP ile gerçekleştirilen enzim aktivitesi çalışmalarında genellikle esteraz aktivitesi *p*-NPP'in enzimatik hidroliziyle gerçekleştirilmektedir [Abramic ve ark., 1999; Dalmau ve ark., 2000; Nthangeni ve ark., 2001; Casa ve ark., 2002; Bruno ve ark., 2004; Bruno ve ark., 2005]. Hidroliz sonucunda *p*-nitrofenol (*p*-NP) oluşmakta ve çözeltinin berrak sarı rengi enzim aktivitesine bağlı olarak daha koyu bir sarı renk almaktadır. Sonuçta da *p*-NP oluşumundan kaynaklanan absorbans artışı spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Lipaz enzim aktivitesi ölçümü için oldukça hassas sonuçlar verdiği belirtilen bu yöntemin kullanıldığı bir çalışmada maksimum hatanın % 5 olduğu bildirilmiştir [Palomo et al, 2002].



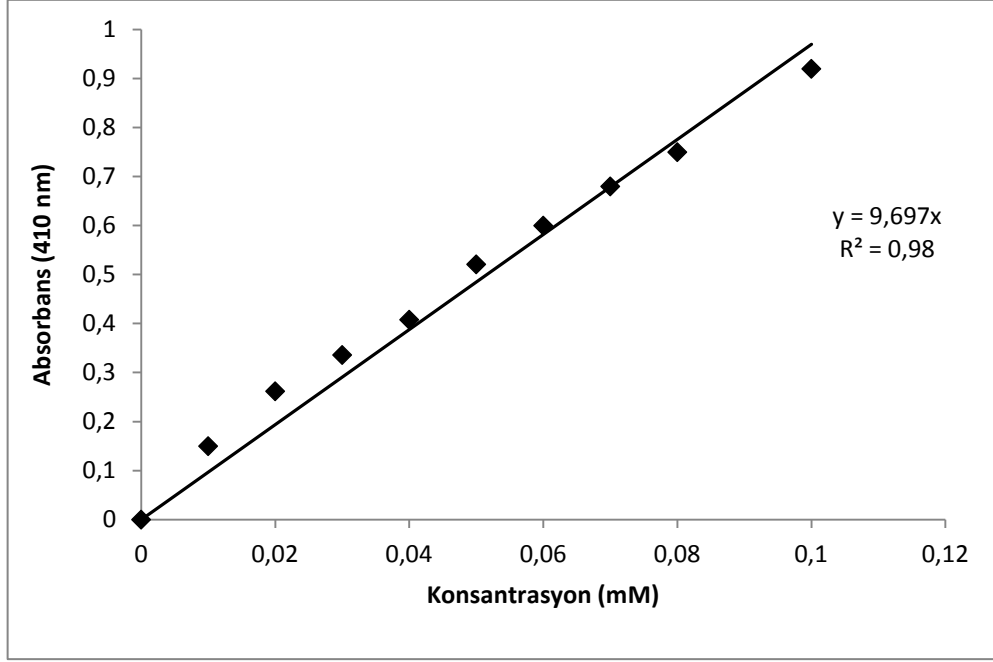
Çalışmada substrat olarak *p*-NPP kullanılarak spektrofotometrik yöntemle porcine pancreatic lipazın aktivitesinin belirlenmesinde ölçüm şartlarının yöntem üzerine etkileri incelendi. Çalışma koşullarında gerçekleştirilen Lipaz enzim aktivitesi ölçümünün güvenli ve kontrollü koşullarda gerçekleştirilebilmesi için kullanılan substrat (*p*-NPP) sıcaklık, pH enzim konsantrasyonu faktörlerini içerecek şekilde ele alındı. Bu sayede enzim aktivite ölçümünü etkileyebilecek koşulların ortadan kaldırılması hedeflendi.

3.1. Aktivite ve Protein Standart Grafikleri

3.1.1. *p*-NP Standart Eğrisinin Oluşturulması

p-Nitrofenol standart eğrisinin oluşturulmasında 0,005-0,1 mM aralığında bir seri nitrofenol çözeltisi 1 mM stok çözülden yola çıkılarak hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerin 410 nm de absorbansı ölçüldü. Bu değerler derişime karşı grafiğe geçirilerek *p*-NP standart eğrisi oluşturuldu.

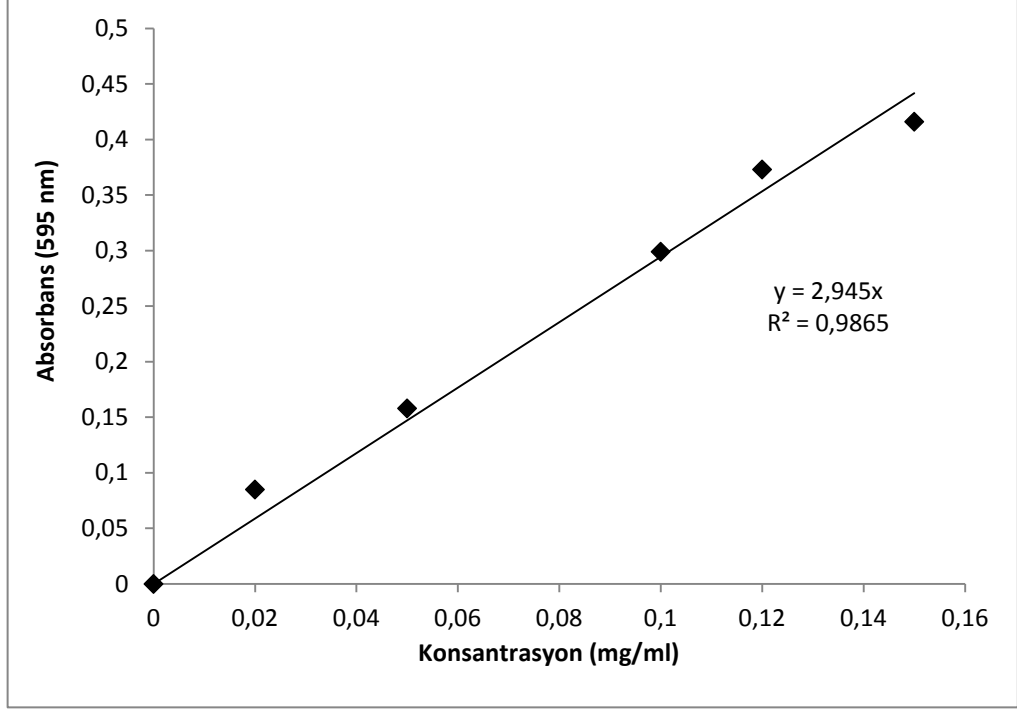
p-NPP ile gerçekleştirilen enzim aktivitesi çalışmalarında aktivite *p*-NPP'ın enzimatik hidroliziyle gerçekleştirilmektedir [Abramic et al,1999, Dalmau et al,2000, Nthangeni et al, 2001, Casa et al, 2002, Bruno et al, 2004, Bruno et al, 2005]. Hidroliz sonucunda *p*-nitrofenil (*p*-NP) oluşmakta ve çözeltinin berrak sarı rengi enzim aktivitesine bağlı olarak daha koyu bir sarı renk almaktadır. Sonuçta da *p*-NP oluşumundan kaynaklanan absorbands artışı spektrofotometrik olarak ölçülmektedir.



Şekil 3.1: *p*-Nitrofenol standart eğrisi

3.1.2. Protein Standart Grafiğinin Oluşturulması

Standart protein eğrisinin çizimi için sırasıyla 0,02, 0,05, 0,1, 0,125, 0,15, 0,2 mg/mL olan sığır serum albümin (BSA) çözeltileri hazırlandı. Bu stokların her birinden ayrı ayrı 0,1 mL alınarak üzerine 2 mL Bradford reaktifi eklendi ve 10 dk. oda sıcaklığında bekletilip 595 nm. de absorbandsları ölçüldü. Bu değerler, derişime karşı grafiğe geçirilerek standart protein eğrisi oluşturuldu, elde edilen grafik örneklerin protein içeriklerinin belirlenmesinde kullanıldı



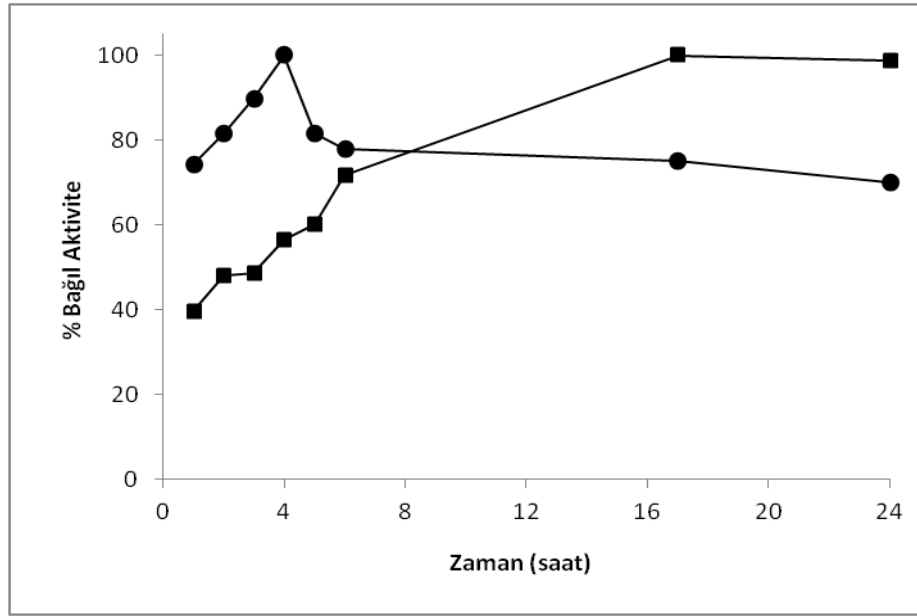
Şekil 3.2 : Protein Standart Grafiği

3.2. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Epiklorohidrin ile çapraz bağlama süresi, lipaz enziminin immobilizasyon süresi, enzim konsantrasyonu, sıcaklık ve pH'ın etkisi immobilizasyon koşullarının optimizasyonunda incelendi.

3.2.1. ECH ile Çapraz Bağlama Süresinin İmmobilizasyon Üzerine Etkisi

ECH ile çapraz bağlama süresinin immobilizasyon üzerine etkisi incelenmesi amacıyla her iki taşıyıcının sabit miktarları üzerine 50 mM konsantrasyonunda ECH çözeltisi eklendi. Farklı sürelerde (1,2,3,4,5,6,17 ve 24 saat) ECH ile çapraz bağlanmış boncuk üzerine 1mg/ml olacak şekilde lipaz enzimi immobilize edildi. Yapılan aktivite ölçümleri sonucunda optimum çapraz bağlama süresi kitosan-perlit üzerine immobilize edilen boncuklar için 4 saat, kitosan-MWCNTs üzerine immobilize edilen boncuklar için 17 saat olarak belirlendi.

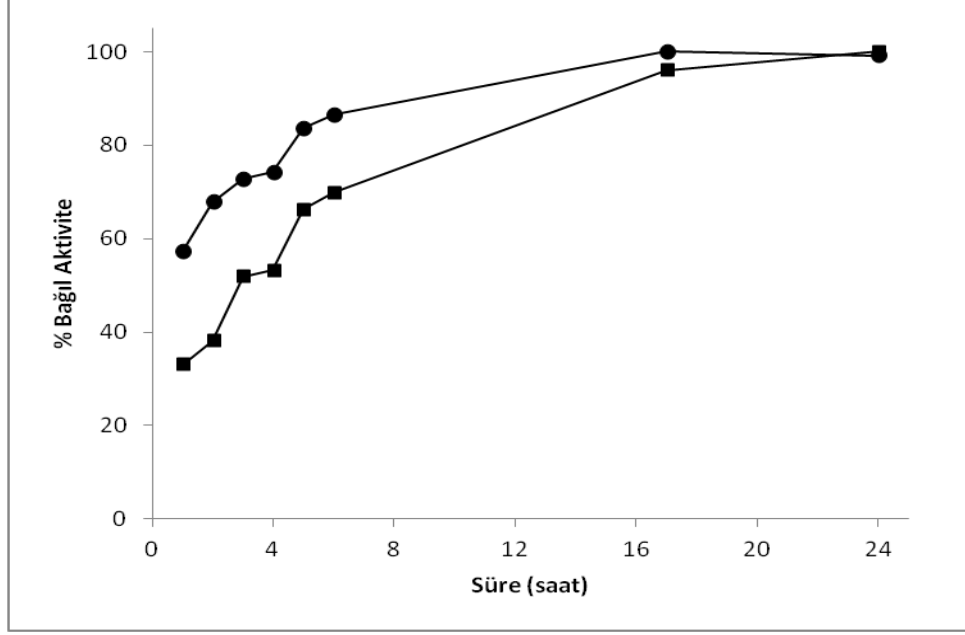


Şekil 3.3: ECH ile çapraz bağlama süresinin belirlenmesi

kitosan-perlit kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen lipaz(●),kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen lipaz (■) ,50 mg immobilize enzim.

3.2.2. İmmobilizasyon Süresinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

İmmobilizasyon süresinin enzim aktivitesi üzerine etkisini incelemek için belirlenen optimum çapraz bağlama sürelerine kompozit boncuklar ECH ile çapraz bağlandı. Daha sonra hazırlanan 1 mg/ml lipaz çözeltisi 1saat-24 saat aralığında çapraz bağlanmış boncuk üzerine immobilize edildi. Yapılan aktivite ölçümleri sonucunda optimum immobilizasyon süresi her iki taşıyıcı içinde 24 saat bulundu.

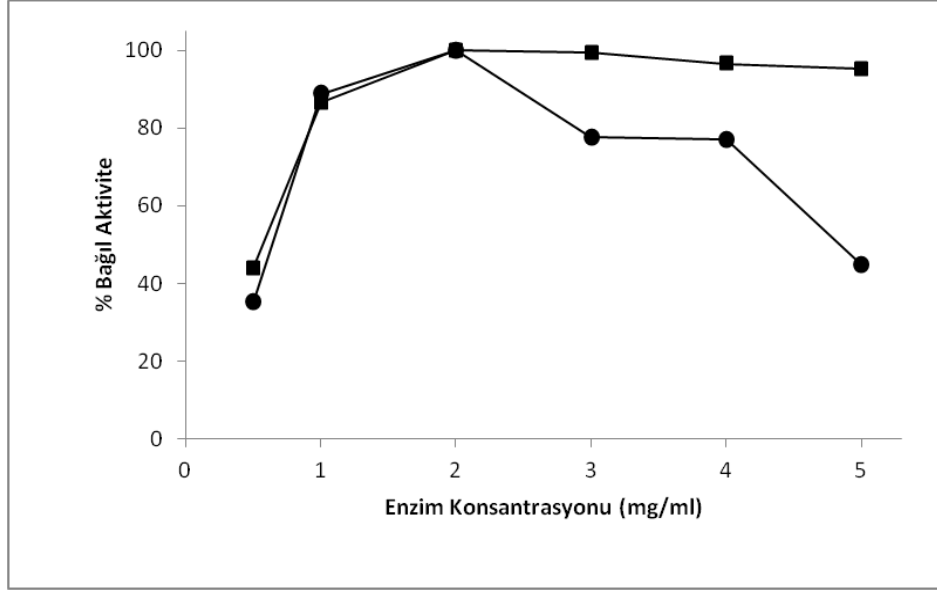


Şekil 3.4: İmmobilizasyon süresinin enzim aktivitesi üzerine etkisi

Kitosan-perlit kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen lipaz(●), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen lipaz (■) ,50 mg immobilize enzim

3.2.3.Lipaz Konsantrasyonunun Enzim İmmobilizasyonu Üzerine Etkisi

Lipaz konsantrasyonunun enzim immobilizasyonu üzerine etkisini incelemek için belirlenen optimum sürelerde çapraz bağlama yapıldı ve kitosan-perlit, kitosan-MWCNTs kompozit boncukları (50 mg) farklı konsantrasyonlarda (0,5-5 mg/ml arasında değişen) lipaz ile optimum immobilizasyon süresi kadar muamele edildi. Bağıl aktivite hesaplarından sonra her iki taşıyıcı içinde optimum konsantrasyon 2 mg/ml olarak hesaplandı.



Şekil 3.5: Enzim immobilizasyonu için optimum lipaz konsantrasyonunun belirlenmesi
Kitosan-perlit kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen lipaz(●), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen lipaz (■) , 50 mg immobilize enzim

3.3.Taşıyıcı Üzerine Bağlanan Protein Miktarı ve İmmobilizasyon Verimi

Taşıyıcı üzerine bağlanan protein miktarını belirlemek için çalışmalar sırasında filtrat ve yıkama sularında protein tayini yapıldı. Bradford standart grafiği kullanılarak kitosan-perlit ve kitosan-MWCNTs kompozit boncukları için ayrı ayrı yükleme etkinliği hesaplandı.

Çizelge 3.1: Kitosan-perlit ve kitosan-MWCNTs kompozit boncuklar üzerine immobilize edilmiş lipazın % verim ve % yükleme etkinliği

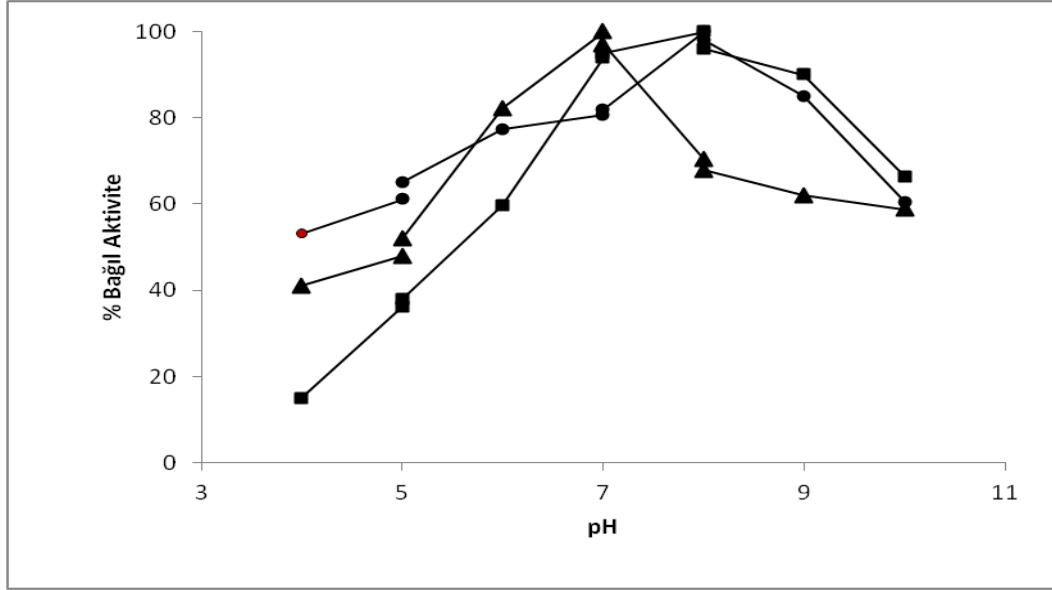
	İmmobilizasyon Verimi (%)	Yükleme Etkinliği (%)	Protein miktarı	Hacimsel Boncuk Aktivitesi	Spesifik Boncuk Aktivitesi
Kitosan-perlit kompozit boncuk	%61,27	%51,17	1,02 mg	0,125 U/g	0,130
Kitosan-MWCNTs kompozit boncuk	%64,3	%38,23	1,16 mg	0,174 U/g	0,150

Serbest Enzim Aktivitesi: 0,0628 U/mL, Serbest Enzim Spesifik Aktivitesi: 0,233

3.4.Serbest ve İmmobilize Lipazın Optimum pH larının Belirlenmesi

İmmobilize ve serbest lipaz enzimi aktivitelerinde ortam pH'ının değişimiyle aktivite kaybı olup olmadığı belirlendi.

Şekilde görüldüğü gibi en yüksek aktivite değeri %100 alınarak serbest ve immobilize lipaz enziminin optimum pH'nı belirlemek için pH 4,0- 5,0- 6,0- 7,0 -8,0 -9,0 ve 10,0 pH değerlerinde aktivite ölçümleri yapıldı.



Şekil 3.6: Serbest ve İmmobilize Lipazın Optimum pH larının Belirlenmesi

Serbest lipaz enzimi(▲), Kitosan-perlit kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen lipaz(●), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen lipaz (■) ,50 mg immobilize enzim

Geliştirilen yöntemle elde edilen immobilize lipazın aktivitesi üzerine pH'nın etkisi incelendiğinde immobilize lipazın serbest enzime kıyasla yüksek pH değerlerinde daha aktif olduğu ve optimum pH değerinin değiştiği görüldü. Serbest enzim için optimum pH düzeyi pH:7,0 olarak belirlenirken kitosan-perlit ve kitosan-MWCNTs için bu değer pH:8,0 olarak belirlendi.

Pek çok çalışmada pH'nın serbest ve farklı yöntemlerle immobilize lipaz enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmalardan birinde pH: 4,0–9,0 aralığında serbest ve mikro tanecikler üzerine glutaraldehitte çapraz bağlanarak immobilize edilmiş *Candida rugosa* kaynaklı lipaz enzim aktiviteleri üzerine pH'nın etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada optimum pH değerleri serbest lipazda pH:7,0 bulunurken immobilize lipazda 1 birim olmak üzere alkalın bölgeye kaydığı bildirilmiştir [Bayramoğlu ve diğerleri, 2005]. Lipaz immobilizasyon çalışmalarında immobilize lipaz enziminin optimum pH düzeyinin genellikle alkali alana doğru kaydığı belirtilmekte ve görülmektedir. Başka bir çalışmada vinil alkol ile çapraz bağlanmış

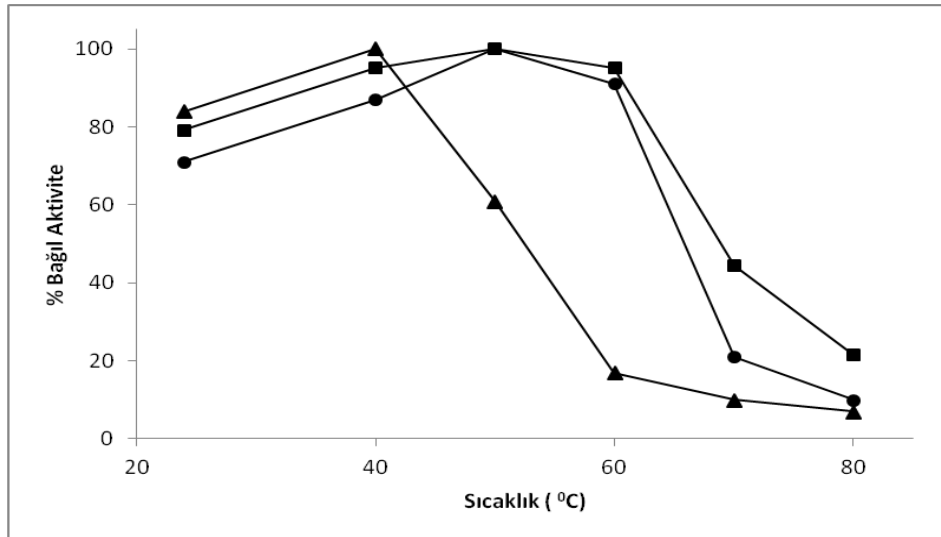
adipolidiklorür üzerine porcine pancreatic kaynaklı lipaz immobilize edilmiştir. pH:7,0-10,0 arasında serbest ve immobilize lipaz üzerine pH'ın etkisi incelendiğinde, serbest lipaz için bu değer pH 8,5 bulunurken immobilize lipazda 0,5 birim kayma göstererek pH:9,0 bulunmuştur. Aminlenmiş silikajel ve süksinimid desteği üzerine porcine pancreatic kaynaklı lipaz için immobilizasyon yöntemi geliştirilen başka bir çalışmada da immobilize ve serbest enzim için optimum pH değerleri 7,5 bulunurken, 7,5 dan yüksek pH lar için immobilize enzimin aktivitesi yine %100 e yakın bulunmuştur.

Genellikle polikasyonik desteklere enzim bağlanması optimum pH da asidik bir kaymaya neden olur. Kitosan polikasyonik bir destek olmasına rağmen immobilize enzimin optimum pH'ı farklı bir kayma gösterdi. OH gruplarını etkinleştirmek için kullanılan ECH reaktifi kitosan desteğini anyonik yapar ve optimum pH farklı bir yöne kayar. İmmobilize lipazın optimum pH'ındaki benzer bir kayma PVC, sefaroz, kitin ve agaroz [Shaw et al,1990] selit [Fadiloğlu ve diğerleri, 1997] içinde aynı şekilde literatürde bildirilmiştir.

3.5.Serbest ve İmmobilize Lipazın Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi

İmmobilize ve serbest lipaz enzimi aktivitelerinde reaksiyon ortamının sıcaklık değişimiyle aktivite kaybı olup olmadığı belirlendi.

Şekilde görüldüğü gibi en yüksek aktivite değeri %100 alınarak serbest ve immobilize lipaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 25, 40, 50, 60,70 ve 80 °C değerlerinde aktivite ölçümleri yapıldı.



Şekil 3.7: Serbest ve İmmobilize Lipazın Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Serbest lipaz enzimi (▲), Kitosan-perlit kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen lipaz(●), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen lipaz (■) ,50 mg immobilize enzim

Geliştirilen yöntemle elde edilen immobilize lipazın aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi incelendiğinde immobilize lipazın serbest enzime kıyasla yüksek sıcaklık değerlerinde daha aktif olduğu ve optimum sıcaklık değerinin değiştiği görüldü. Serbest enzim için optimum sıcaklık düzeyi 40 °C olarak belirlenirken kitosan-perlit ve kitosan-MWCNTs için bu değer 50 °C olarak belirlendi.

Başka çalışmalarda da sıcaklığın serbest ve farklı yöntemlerle immobilize edilmiş lipaz enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Bir çalışmada glutaraldehit ile aktive edilmiş nanofibril membran üzerine lipaz için bir immobilizasyon yöntemi geliştirilmiştir. 30 °C - 60 °C arasında yapılan optimum sıcaklık denemesinde serbest enzim için 40 °C bulunan sıcaklık immobilize enzim için 50 °C bulunmuştur. Yüksek sıcaklıklar enzim ile destek arasındaki kovalent bağlama sonucunda, enzim üzerinde konformasyonel sınırlamalara yol açabilir. (Huang et al, 2007)

Yapılan başka bir çalışmada lipaz immobilizasyonu için kitosan-nanofibril membranlar hazırlanmıştır. Bu çalışmada yapılan 25-55 °C ler arasında gerçekleştirilen sıcaklık denemesinde optimum sıcaklık serbest enzim için 35 °C bulunurken bu değer immobilize enzim için 47 °C ye yükselmiştir [Zhu et al, 2012].

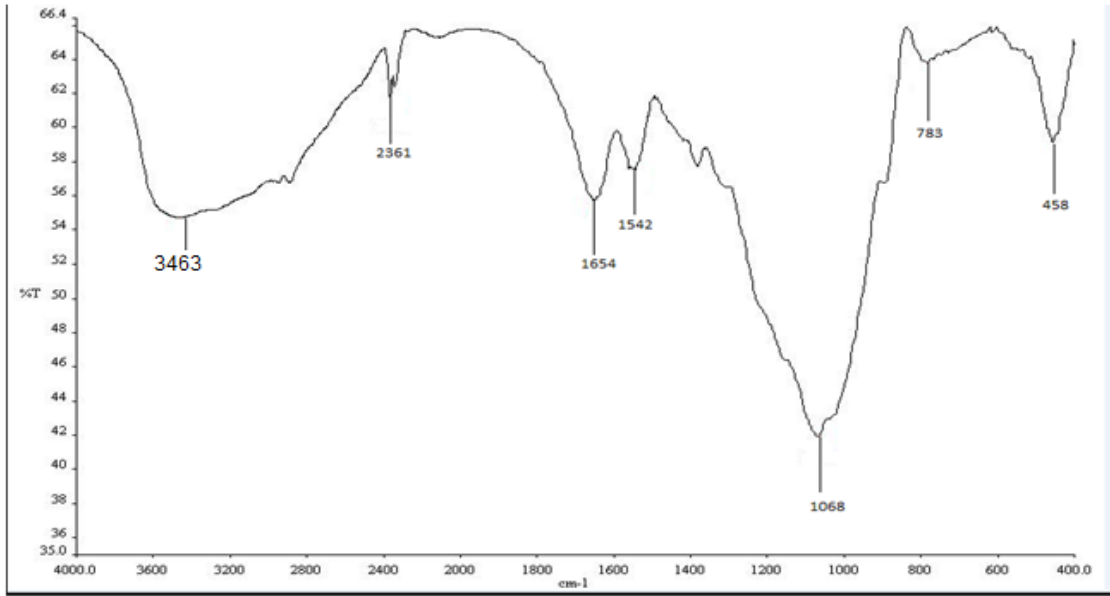
Enzimin desteğe kovalent bağlanması ile konformasyonel hareketliliği düşmektedir. Bundan dolayı katalitik reaksiyonlar için uygun bir yapı elde etmek için yüksek enerji gerekmektedir. Bu da immobilize enzimin optimum sıcaklığının artmasına sebep olur [Zhu et al, 2012].

Başka bir çalışmada da amino-fonksiyonlu sıralanmış gözenekli SBA-15 üzerine immobilize edilmiş lipazın 20-70 °C aralığında aktivitesi ölçülmüş immobilize enzimin serbest enzime kıyasla daha yüksek sıcaklıklarda daha yüksek aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Enzim molekülü ile modifiye edilmiş destek arasındaki güçlü etkileşimden dolayı daha fazla koruma meydana gelmiştir. Bu da immobilize enzim için sıcaklığın artmasına sebep olmuştur [Xu et al, 2011].

3.6.Fiziksel Karakterizasyon

3.6.1 Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) Analizi

Kızılötesi (IR) absorpsiyon spektroskopisi bir tür titreşim spektroskopisidir. IR ışınları molekülün titreşim hareketleri tarafından soğurulmaktadır. Matematiksel Fourier dönüşümü spektroskopisinde ışın şiddeti, zamanın bir fonksiyonu olarak alınır. Her dalga boyunu ayrı ayrı tarama gereksiz hızı ve yüksek çözünürlükte spektrumlar elde edilebilir. Bu yöntem ile, moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak katı, sıvı, gaz veya çözelti halindeki organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar, iki bileşiğin aynı olup olmadığı, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik ya da alifatik olup olmadığı belirlenebilir. Ayrıca biyokimyasal olarak; karbonhidrat fosfolipit amino asit ve proteinlerin yapı analizlerinde belirleyicidir [Fessenden et al, 2001].



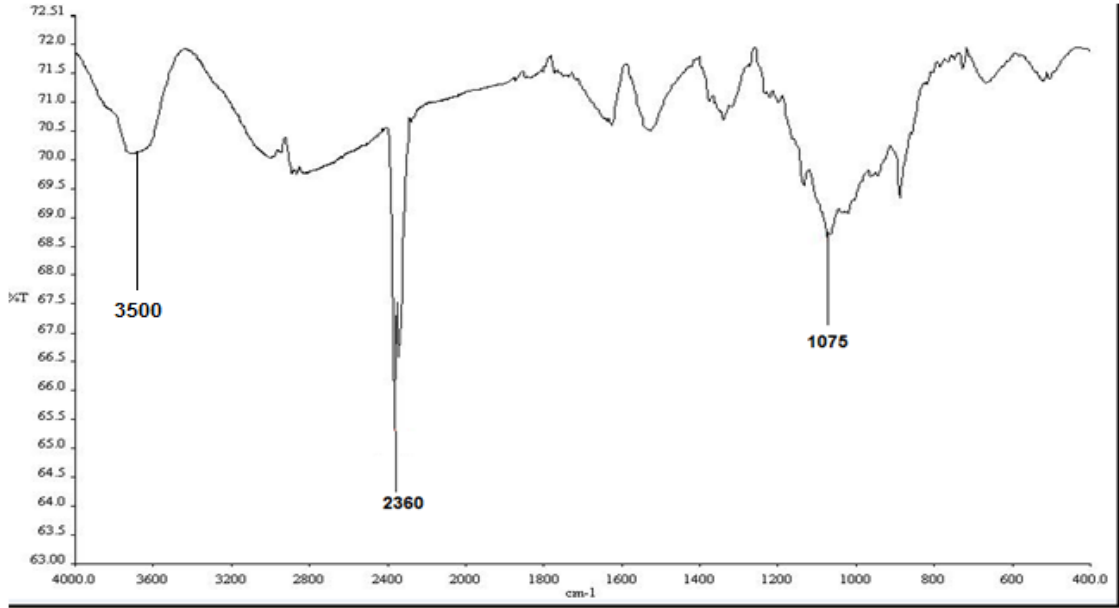
Şekil3.8: Kitosan-perlit kompozit boncuk FTIR analizi

3463 cm^{-1} de gözlenen yayvan pik yapıdaki OH gruplarının varlığını gösterir. 1654 cm^{-1} de C=O gerilmesi, 1542 cm^{-1} de N-H gerilmesi (2. Amit bandı) ve 1068 cm^{-1} de Alifatik C-H düzlem içi eğilmeleri görülmektedir



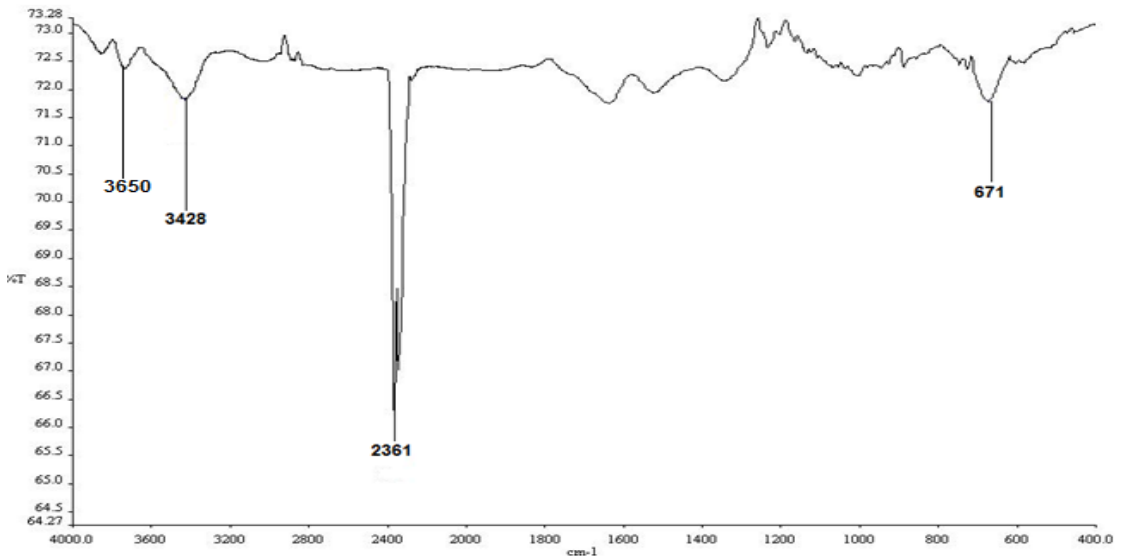
Şekil 3.9: ECH ile çapraz bağlı kitosan-perlit kompozit boncuk FTIR analizi

3592 cm^{-1} de gözlenen yayvan pik yapıdaki OH gruplarının varlığını gösterir. Epoksit gruplarına ait pik ise 2360 cm^{-1} de görülmektedir. 1073 cm^{-1} de Alifatik C-H düzlem içi eğilmeleri görülmektedir.



Şekil 3.10: Kitosan-MWCNTs kompozit boncuk FTIR analizi

3500 cm^{-1} de gözlenen yayvan pik yapıdaki OH gruplarının varlığını gösterir. 1075 cm^{-1} de Alifatik C-H düzlem içi eğilmeleri görülmektedir

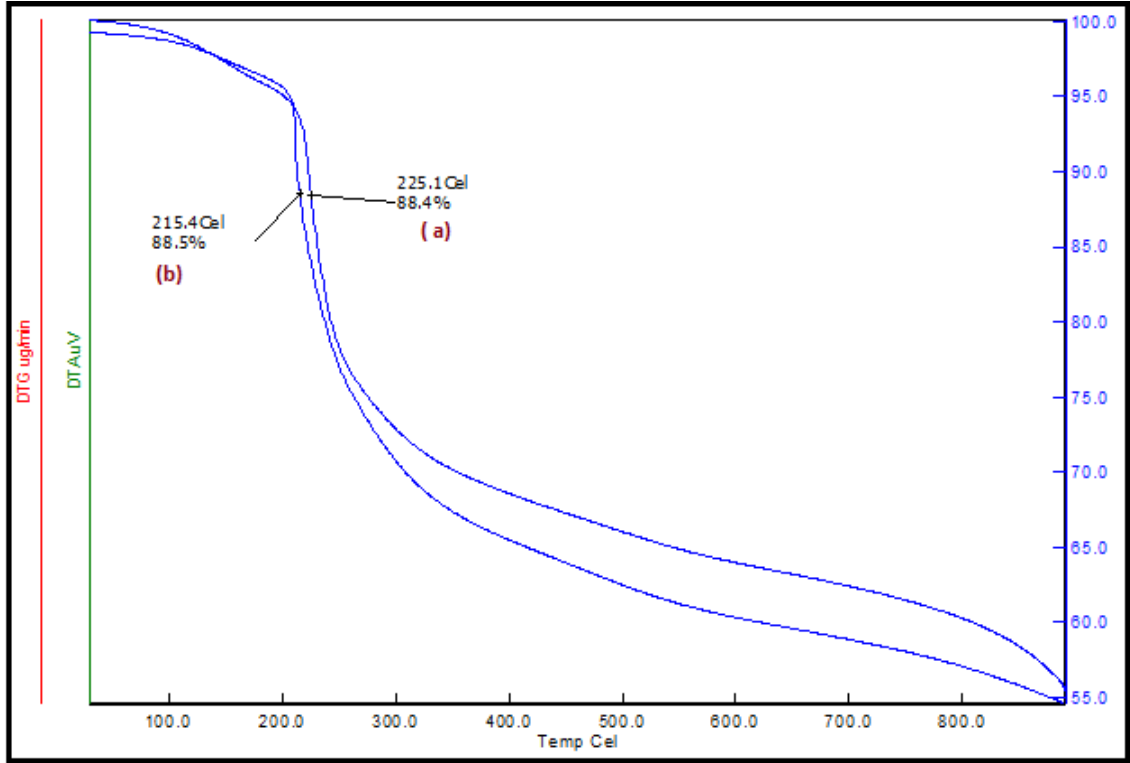


Şekil 3.11: ECH ile çapraz bağlı kitosan-MWCNTs kompozit boncuk FTIR analizi

3650 cm^{-1} civarında gözlenen iki çatallı pik R-NH_2 grubunun varlığını gösterir. 3428 cm^{-1} de gözlenen yayvan pik yapıdaki OH gruplarının varlığını gösterir. Epoksit gruplarına ait pik ise 2361 cm^{-1} de görülmektedir. 1073 cm^{-1} de Alifatik C-H düzlem içi eğilmeleri görülmektedir.

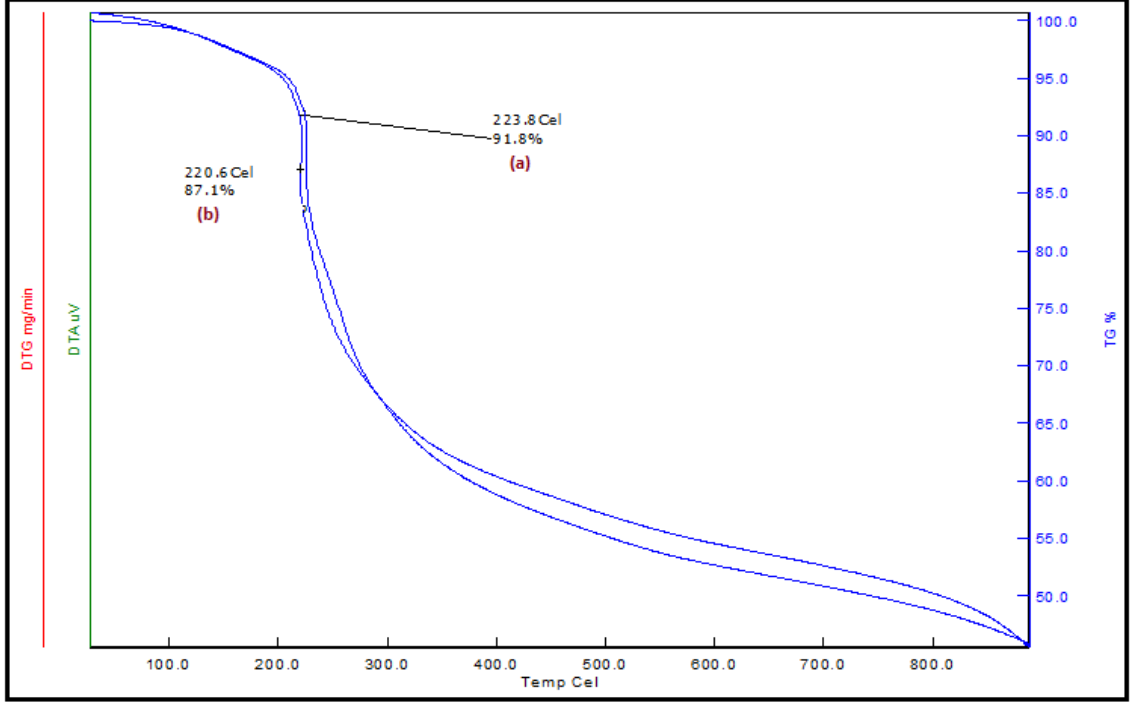
3.6.2.TGA

TGA ağırlığın yani numunenin kütlesinin numunenin sıcaklığına ya da zamana göre ölçümüdür. Bizde deneyimizde boncukların ısıya karşı dayanıklılıkları ölçüldü. Analiz örnekte sıcaklığın etkisiyle uğradığı ağırlık kayıplarını ölçen hassas bir terazi kullanıldı..



Şekil 3.12: a) Kitosan-perlit kompozit boncuk b) Kitosan-perlit ECH ile çapraz bağlanmış kompozit boncuk TGA sonuçları

Kitosan-perlit kompozit boncuk ve çapraz bağlı kitosan-perlit kompozit boncukların termogravimetrik analizi yapıldı. 30-227 °C arasında ağırlık kaybı kitosan-perlit kompozit boncuk için %57 ECH ile çapraz bağlı kitosan-perlit için % 55 dir.

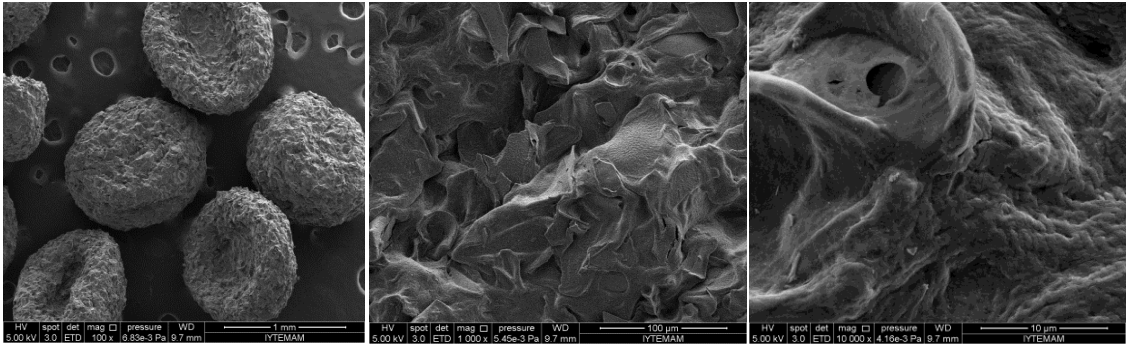


Şekil 3.13: a) Kitosan-perlit kompozit boncuk b) Kitosan-MWCNTs ECH ile çapraz bağlanmış kompozit boncuk TGA sonuçları

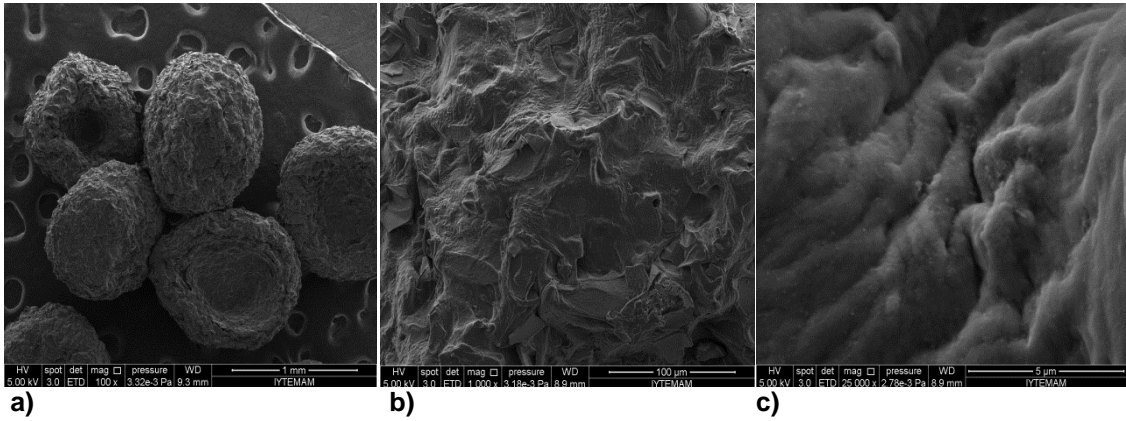
Kitosan-MWCNTs kompozit boncuk ve çapraz bağlı kitosan-MWCNTs kompozit boncukların termogravimetrik analizi yapıldı. 30-227 °C arasında ağırlık kaybı kitosan-perlit kompozit boncuk ve ECH ile çapraz bağlı kitosan-perlit için % 45 dir.

3.6.3.SEM

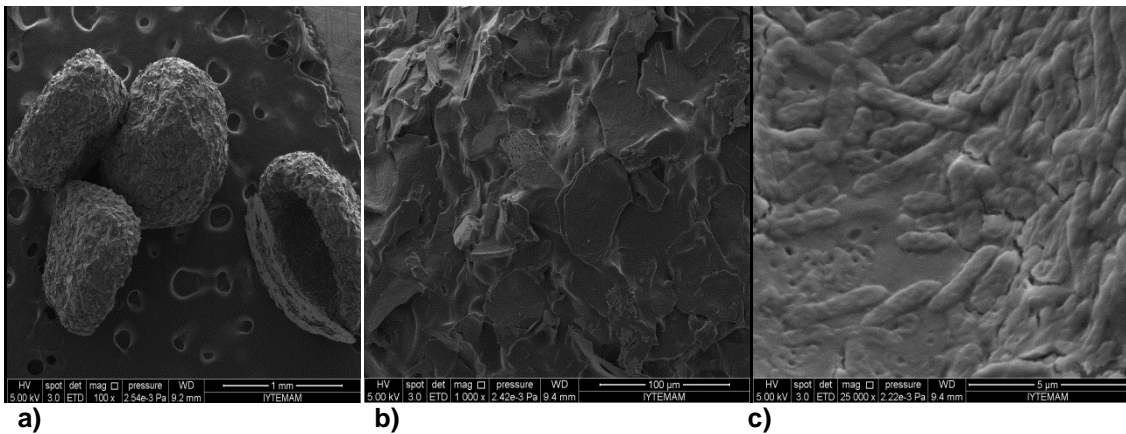
Taramalı Elektron Mikroskopunda (SEM) görüntü, yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine odaklanması, bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ısınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla elde edilir.



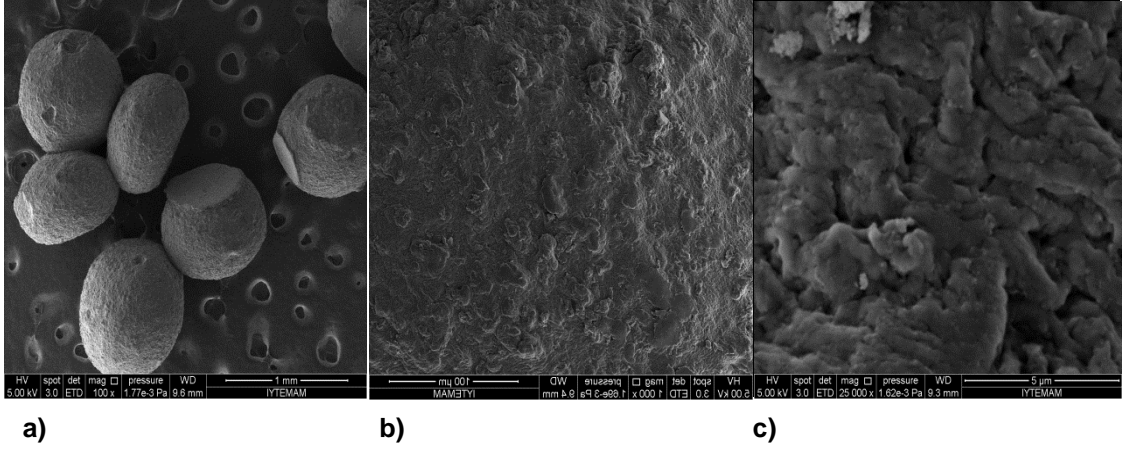
Şekil 3.14: a) Kitosan-perlit kompozit boncuk 100 x büyüme b) Kitosan-perlit kompozit boncuk 1000 x büyüme c) Kitosan-perlite kompozit boncuk 10.000 x büyüme



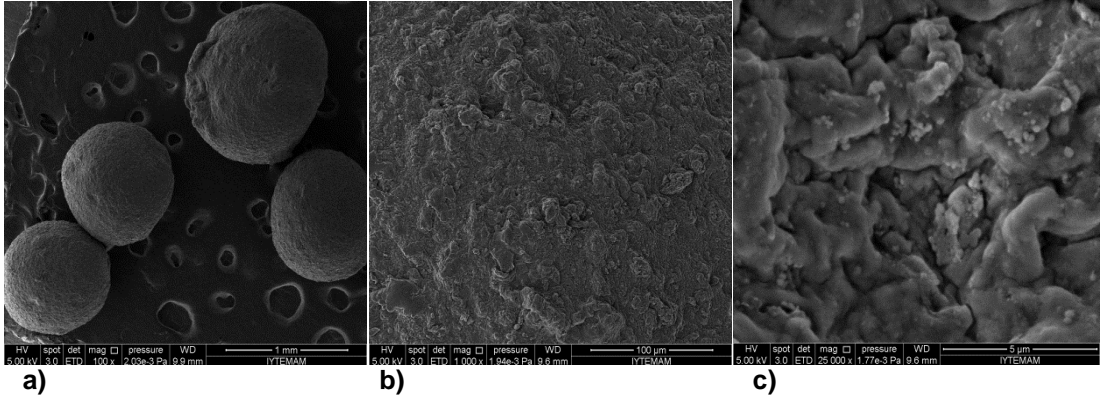
Şekil 3.15: a) ECH ile çapraz bağlı kitosan-perlit kompozit boncuk 100 x büyüme b) ECH ile çapraz bağlı kitosan-perlit kompozit boncuk 1000 x büyüme c) ECH ile çapraz bağlı kitosan-perlite kompozit boncuk 25.000 büyüme



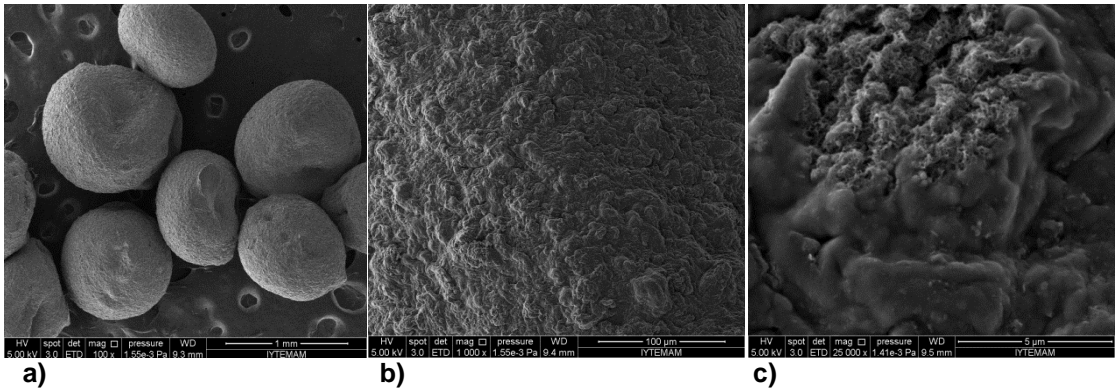
Şekil 3.16: a) Lipaz ile immobilize edilmiş kitosan-perlit kompozit boncuk 100 x büyüme b) Lipaz ile immobilize edilmiş kitosan-perlit kompozit boncuk 1000 x büyüme c) Lipaz ile immobilize edilmiş kitosan-perlite kompozit boncuk 25.000 büyüme



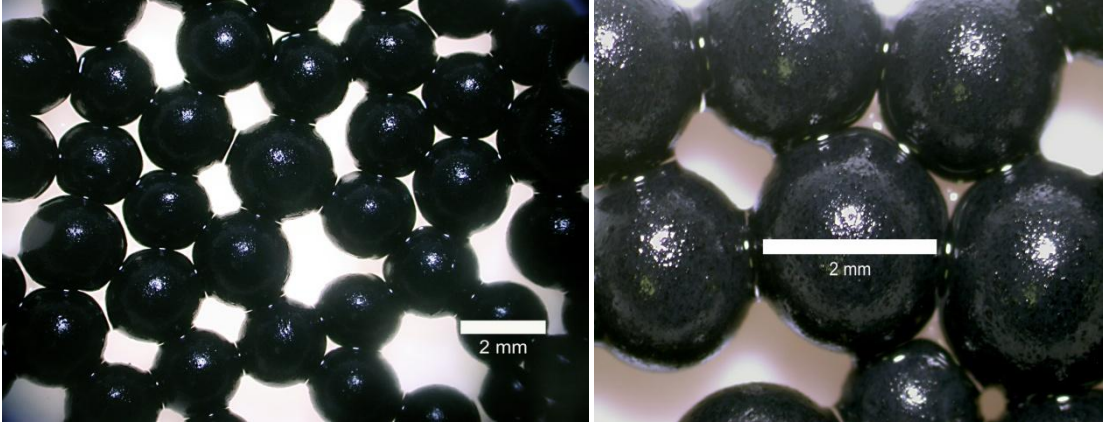
Şekil 3.17: a) Kitosan-MWCNTs kompozit boncuk 100 x büyüme b) Kitosan-MWCNTs kompozit boncuk 1000 x büyüme c) Kitosan-MWCNTs kompozit boncuk 25.000 büyüme



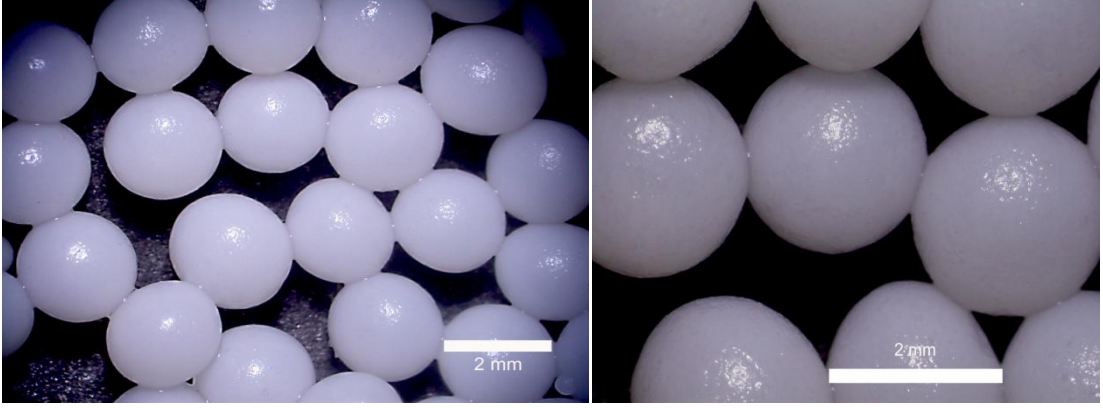
Şekil 3.18: a) ECH ile çapraz bağlı kitosan-MWCNTs kompozit boncuk 100 x büyüme b) ECH ile çapraz bağlı kitosan-MWCNTs kompozit boncuk 1000 x büyüme c) ECH ile çapraz bağlı kitosan-MWCNTs kompozit boncuk 25.000 büyüme



Şekil 3.19: a) Lipaz ile immobilize edilmiş kitosan-MWCNTs kompozit boncuk 100 x büyüme b) Lipaz ile immobilize edilmiş kitosan-MWCNTs kompozit boncuk 1000 x büyüme c) Lipaz ile immobilize edilmiş kitosan-MWCNTs kompozit boncuk 25.000 büyüme



Şekil 3.20: Kitosan-MWCNTs kompozit boncukları



Şekil 3.21: Kitosan-perlit kompozit boncukları

Çizelge 3.2: Yaş boncukların boyutları

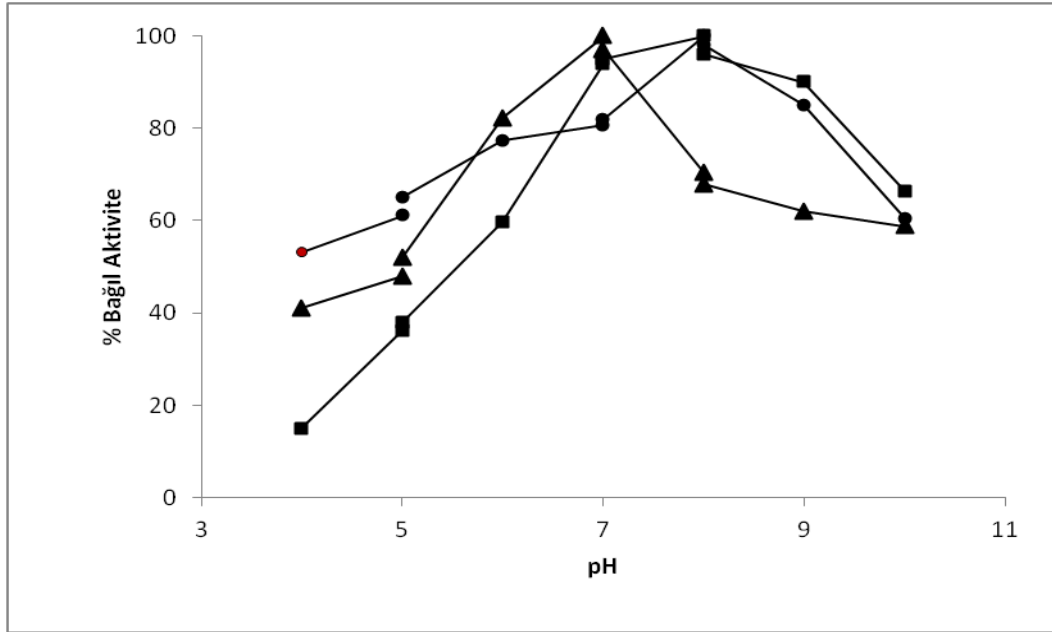
Kitosan-perlit kompozit boncuk	ECH ile Çapraz bağlanmış Kitosan-perlit kompozit boncuk	Kitosan-MWCNTs kompozit boncuk	ECH ile Çapraz bağlanmış Kitosan-MWCNTs kompozit boncuk
1,95 mm	1,86 mm	2,12 mm	1,96 mm

3.7.Stabilite Testleri

3.7.1.Serbest ve İmmobilize Lipazın pH stabilitesi

Kitosan üzerine immobilize edilen lipazların pH stabiliteyi immobilize enzimin pH: 3,0-10,0 arasında değişen tampon çözeltiler içerisinde bekletilmesi sürecinde aktivitede meydana gelen azalmadan yararlanılarak belirlendi. 1 saatlik sürenin sonunda immobilize ve serbest enzim aktivitelerinde meydana gelen değişiklik ölçüldü.

Şekilde görüldüğü gibi en yüksek aktivite değeri %100 alınarak serbest ve immobilize lipaz enziminin pH stabilitesi belirlendi.



Şekil 3.22: Serbest ve İmmobilize lipazın pH Stabilitesi

Serbest lipaz enzimi(▲), Kitosan-perlit kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen lipaz(●), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen lipaz (■) ,50 mg immobilize enzim

En yüksek aktivite değeri %100 alındı. Geliştirilen yöntemle elde edilen immobilize lipazın her pH düzeyinde stabilitesinin arttığı ve pH stabilite aralığının genişlediği görüldü. Özellikle düşük pH larda kitosan-perlit üzerine immobilize edilmiş lipaz için aktivite değerinin önemli ölçüde arttığı şekilde de görülmektedir. Alkali bölgeye doğru çıktıkça yine immobilize enzim için % kalan aktivite değerinin arttığı görüldü.

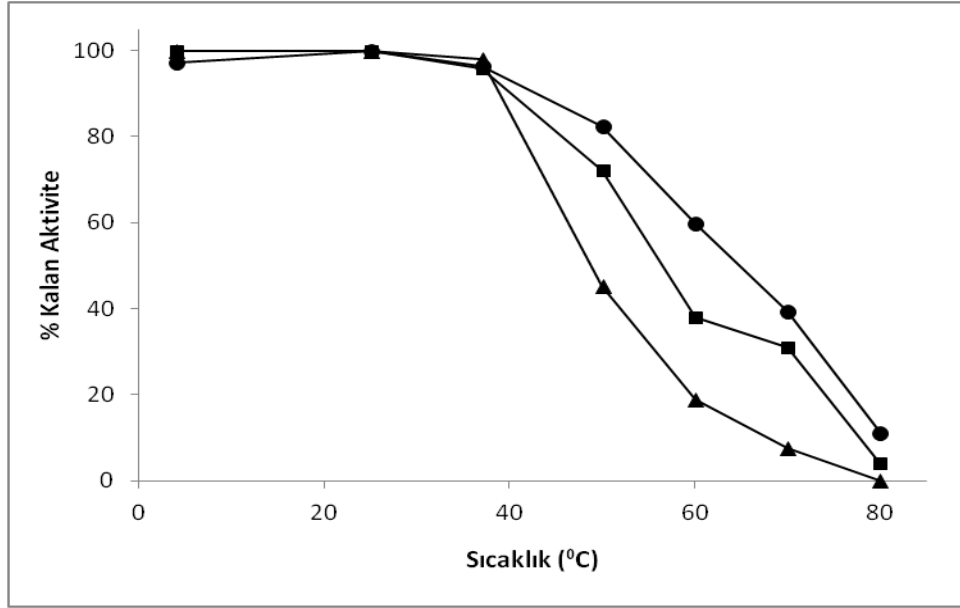
Lipazların stabiliteyi artması endüstriyel bir gereksinimi karşılamaktadır. Enzim immobilizasyonu ile enzimin stabilitesi genellikle artmaktadır. Daha önce yapılan bir lipaz enzim

immobilizasyon çalışmasında pH stabilitesi için pH; 3,0-13,0 aralığında çalışılmıştır. Bu çalışmada pH: 5 te immobilize enzimin bağıl aktivitesi yaklaşık %92 iken serbest enzimde %40 civarındadır. Aynı çalışmada pH: 6 da immobilize enzimin bağıl aktivitesi %100 olurken serbest enzimin % 70 kadardır [Hung et al, 2003].

Kovalent bağlama ile enzim immobilizasyonunda genellikle pH dayanımı artırılmış sistemler elde edilir. Burada da daha dayanıklı bir lipaz sistemi elde edilmiştir. Kovalent bağlama ile enzim immobilizasyonu adsorpsiyon gibi zayıf enzim tutuklama yöntemlerine kıyasla enzimi birden fazla noktadan desteğe bağlayarak dayanıklılığını artırır [Albayrak ve diğerleri, 2002].

3.7.2.Serbest ve İmmobilize Lipazın Termal Stabilitesi

Kitosan üzerine immobilize edilen lipazların sıcaklık stabilitesi immobilize enzimin +4 ile 80 °C arasında değişen sıcaklıklarda tampon çözeltiler içerisinde bekletilmesi sürecinde aktivitede meydana gelen azalmadan yararlanılarak belirlendi. 1 saatlik sürenin sonunda immobilize ve serbest enzim aktivitelerinde meydana gelen değişiklik ölçüldü.



Şekil 3.23: Serbest ve İmmobilize Lipazın Sıcaklık Stabilitesi

Serbest lipaz enzimi(▲), Kitosan-perlit kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen lipaz(●), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen lipaz (■), 50 mg immobilize enzim

En yüksek aktivite değeri %100 alındı. Sonuçlar incelendiğinde termal stabilitenin serbest ve immobilize enzim için 40 °C ye kadar neredeyse aynı aktivite gösterdiği görüldü. Ancak daha

yüksek sıcaklık değerleri için immobilize lipazın her sıcaklık düzeyinde stabilitesinin arttığı ve termal stabilite aralığının genişlediği görüldü.

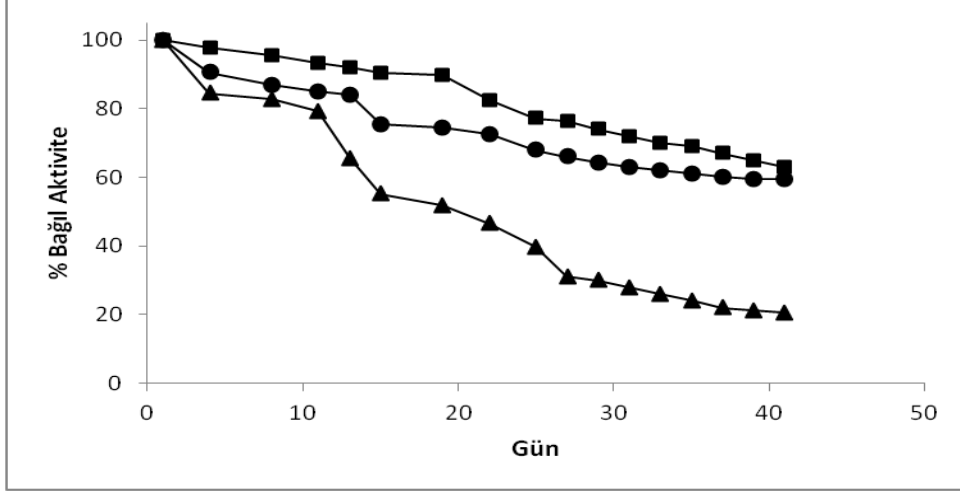
Kovalent bağlarla gerçekleştirilecek bir enzim immobilizasyon yöntemiyle lipazların stabilitesinin artırılması endüstriyel bir ihtiyaçtır. Genel olarak serbest enzime kıyasla immobilize edilmiş enzim özellikle de kovalent bağ ile immobilize enzimler yüksek sıcaklık veya organik çözücüler gibi denatüre edici koşullara karşı daha dayanıklı bir biçimsel mimariye sahiptir (Bagi et al, 1997, Kuncova et al,1997, Nilsson et al,1984] Enzim immobilizasyonu ile enzimin sıcaklık stabilitesi genellikle artmaktadır [Albayrak et al, 2002a, Albayrak, et al 2002b.].

Serbest ve immobilize lipazların sıcaklık ve pH stabilitelerinin karşılaştırıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır. Bir çalışmada 50 ve 60 °C sıcaklıklarda 120 dk boyunca bekletilen serbest ve mikro tanecikler üzerine glutaraldehitte çapraz bağlanarak immobilize edilmiş *Candida rugosa* kaynaklı lipaz enziminin termal stabiliteleri karşılaştırılmıştır. 120 dk'nın sonunda serbest lipaz 60 °C'de %11; 50 °C'de %56 oranında relatif aktivite gösterirken; immobilize enzim sırasıyla %67 ve %94 düzeyinde aktivite göstermiştir.

Başka bir çalışmada polivinil alkol ile çapraz bağlanmış destek üzerine immobilize edilen porcine pancreatic kaynaklı lipaz için stabilite testi yapılmış; 4-60 °C arasında belli sıcaklıklarda 1 saat bekletilen serbest ve immobilize lipazların termal stabiliteleri karşılaştırılmıştır. 40 ve 50 °C de immobilize lipazın serbest enzime kıyasla yaklaşık olarak 2,5 kat yüksek aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. [Kılınç ve diğerleri 2002]. Bu stabilite artışı çok noktadan destek üzerine enzimin kovalent bağla bağlanarak yapısal kararlılık kazanması ile açıklanmıştır [Bayramoğlu ve diğerleri, 2005]. Termal stabilite ile endüstriyel uygulamalarda enzim denatürasyonu nedeniyle ulaşılamayan yüksek sıcaklıklarda çalışabilme olanağı doğmaktadır. Lipaz enziminin katalizlediği transesterifikasyon gibi yüksek sıcaklıklara çıkan reaksiyonlarda lipazın termal stabilitesi oldukça önemlidir.

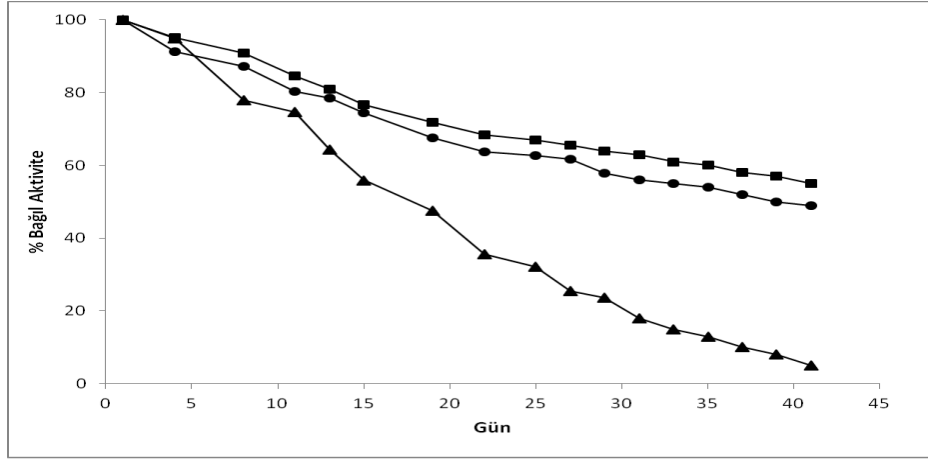
3.7.3. Depolama Kararlılığı

Serbest ve immobilize lipazın farklı depolama şartları altında aktivitelerini ne oranda korudukları belirlendi.



Şekil 3.24: Serbest ve immobilize lipazın +4 °C depolama kararlılığı

Serbest lipaz enzimi (▲), kitosan-perlit kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilmiş lipaz (●), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilmiş lipaz (■), 50 mg immobilize enzim



Şekil 3.25: Serbest ve immobilize lipazın oda sıcaklığında depolama kararlılığı

Serbest lipaz enzimi (▲), Kitosan-perlit kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilmiş lipaz (●), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilmiş lipaz (■), 50 mg immobilize enzim

Yaptığımız çalışmada immobilize enzimin serbest enzime kıyasla daha yüksek stabilite gösterdiği gözlemlendi. 40 günün sonunda; +4 °C de kitosan-perlit kompozit boncuk üzerine immobilize edilmiş lipaz için % kalan aktivite değeri %59; kitosan-MWCNTs kompozit boncuklar üzerine immobilize edilmiş lipaz için % kalan aktivite değeri %63 olarak ölçülürken bu değer serbest enzimde %20 olarak ölçüldü. Oda sıcaklığında ise kitosan-perlit kompozit boncuk üzerine immobilize edilmiş lipaz için % kalan aktivite değeri %48; kitosan-MWCNTs kompozit boncuklar üzerine immobilize edilmiş lipaz için % kalan aktivite değeri %55 olarak ölçülürken bu değer serbest enzimde %5 olarak ölçüldü.

Pek çok çalışmada depolama kararlılığı serbest ve farklı yöntemlerle immobilize lipaz enzimi için değerlendirilmiştir.

Yapılan bir çalışmada polivinil alkol ile çapraz bağlanmış nano fibril membran üzerine *Candida Rugosa* kaynaklı lipaz için bir immobilizasyon yöntemi geliştirilmiştir. Bu çalışmada pH: 7,0 fosfat tamponunda +4 °C de 30 gün bekletilen immobilize ve serbest lipaz için belli aralıklarla ölçüm alınarak depolama stabilitesi karşılaştırılmıştır. 30 günün sonunda immobilize lipazın aktivitesi % 56,2 ye düşerken, serbest enzimin aktivite değerinin 10 gün sonunda % 36,6 ya düştüğü görülmüştür. [Huang et al, 2007]. Bu yapısal dayanıklılık immobilizasyonun denatürasyonu engellemesinden kaynaklanır [Huang et al, 2007].

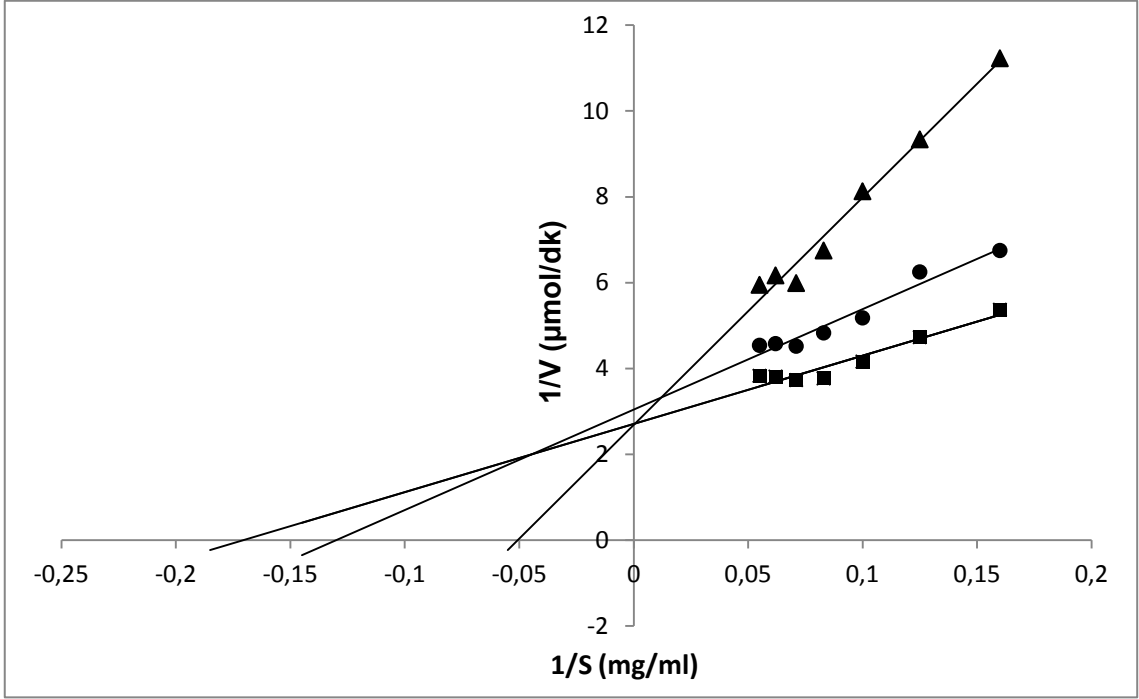
Başka bir çalışmada polivinil alkol ile çapraz bağlanmış destek üzerine immobilize edilen porcine pancreatic kaynaklı lipaz için depolama testi yapılmış. 55 gün boyunca +4 °C de pH:7'de bekletilen immobilize ve serbest lipaz için aktivite değerleri belli aralıklarla ölçülmüştür. 55 günün sonunda immobilize lipazın aktivitesi % 80 e bulunurken, serbest enzim için bu değer % 20 bulunmuştur [Telefoncu ve diğerleri, 2002].

Kovalent bağlama ile yapılan enzim immobilizasyon çalışmalarında, immobilize edilmiş lipaz enziminin aktivitesinin genellikle arttığı gözlemlenmiştir.

3.8. Serbest ve immobilize Lipazın Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Çalışmanın son aşamasında Lineweaver-Burk doğrusallaştırma grafiği ile V_{max} ve K_M değerleri serbest, kitosan-perlit kompozit boncuk üzerine ve kitosan-MWCNTs üzerine immobilize edilmiş lipaz enzimleri için belirlenerek şekilde gösterildi.

Doygunluk substrat (p-NPP) konsantrasyonunu ve K_M ile V_{max} değerlerini belirleyebilmek için 2-20 mM konsantrasyon aralığı kullanılarak serbest ve immobilize lipazın aktivite değeri ölçüldü. Hesaplamalara göre serbest enzim için V_{max} değeri 0,38 U.mg pro.⁻¹, K_M değeri 20 µM, kitosan-perlit için V_{max} değeri 0,33 U.mg pro.⁻¹, K_M değeri 7,69 µM , kitosan-MWCNTs için V_{max} değeri 0,38 U.mg pro.⁻¹, K_M değeri 5,88 µM dir.



Şekil 3.26: Lipaz için Lineweaver-Burk grafiği

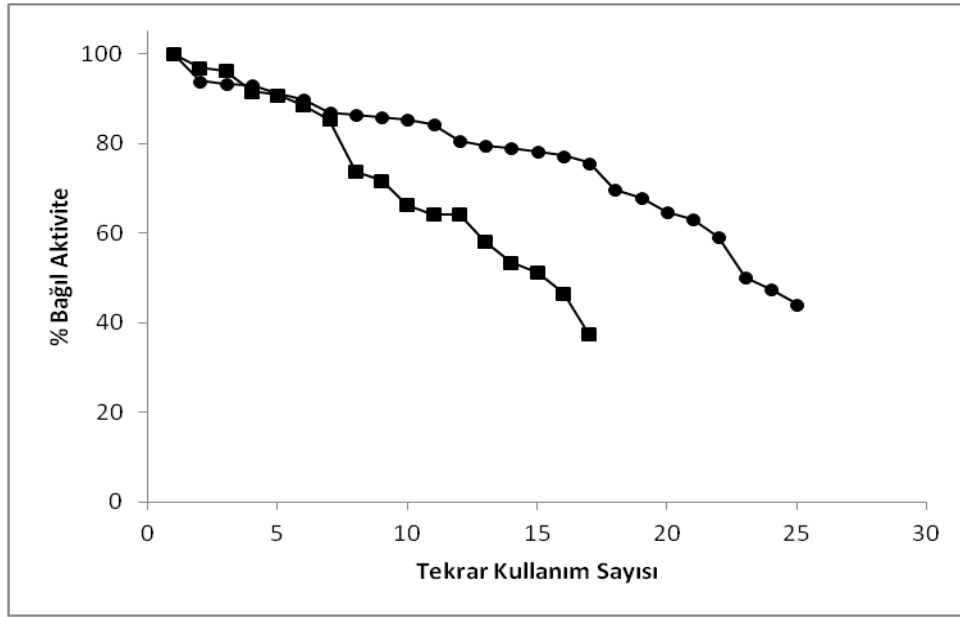
Serbest lipaz enzimi(▲), Kitosan-perlit kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen lipaz(●), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen lipaz (■), 50 mg immobilize enzim

Yapılan çalışmalar incelendiğinde lipaz enziminin kaynağına, immobilizasyon yöntemine ve destek özelliklerine bağlı olarak serbest ve immobilize enzimlerde K_m ve V_{max} değerlerinin büyük farklılıklar gösterdiği görülmekte ve belirtilmektedir [Bruno et al., 2005]. Bir çalışmada polipropilen üzerine immobilize edilmiş *Candida rugosa* kaynaklı lipaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri *p*-nitro fenil asetat substratı kullanılarak belirlenmiş bu değerler serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 2700 μM ve 39.2 U.mg pro.⁻¹ ile 2600 μM ve 9.7 U.mg pro.⁻¹ bulunmuştur. Aynı lipaz bir başka çalışmada cam alkilamin boncuklar üzerine immobilize edilerek K_m ve V_{max} değerleri *p*-nitrofenil propiyonat substratı ile belirlenmiştir. Serbest enzim için değerler belirtilmezken immobilize lipaz enzimi için sırasıyla bu değerler 288 μM ve 615 U.mg pro.⁻¹ Polisiloksan-polivinil alkol kompozit üzerine (POS-PVA) glutaraldehit aracılığıyla çapraz bağlanmış ve serbest *Mucor miehei* kaynaklı lipaz enziminin K_m ve V_{max} değerleri *p*-nitrofenil propiyonat substratı ile belirlenmiştir. K_m ve V_{max} değerleri serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 390.4 μM ve 55.2 U.mg pro.⁻¹ ile 228.3 μM ve 36.1 U.mg pro.⁻¹ bulunmuştur [Bruno et al., 2005]. Immobilize enzimler için birbirinden çok farklı K_m değerleri elde edilebilmektedir. Serbest ve GA ile aktive edilmiş naylon-6 destek materyali üzerine çapraz bağlanarak immobilize formdaki *Bacillus coagulans* (BTS-3) kaynaklı lipaz enzimlerinin karakterize edildiği

bir çalışmada enzim aktivitesi *p*-NPP ile belirlenmiştir. İmmobilize lipaz enzimi için bulunan V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 4 mM ve 10 $\mu\text{mol/dk/L}$, serbest enzim için bulunan değerlerse; 3.8 mM ve 0.72 $\mu\text{mol/dk/L}$ bulunmuştur. Lipaz enziminin substrata afinitesi serbest ve immobilize enzim için neredeyse aynıdır. *Pseudomonas cepacia* kaynaklı serbest lipaz enzimi için V_{max} : 30 $\mu\text{mol/dk/L}$ ve K_m : 12 Mm değerleri yine *p*-NPP ile belirlenmiştir. *Candida rugosa* kaynaklı lipaz enziminin kitosan üzerine immobilize formu içinse K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 18 mM ve 96.1 U/mg protein olduğu bildirilmiştir [Pahujani et al., 2008].

3.9.Tekrar Kullanılabilirlik

Enzimlerin genel olarak geri kazanılması zordur. İmmobilizasyonda enzim için tekrar kullanılabilirlik ekonomik açıdan çok önemlidir. İmmobilize enzim bu özelliği sayesinde serbest enzime kıyasla çok avantajlıdır.



Şekil 3.27: İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği

Kitosan-perlit kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen lipaz(●), Kitosan-MWCNTs kompozit taşıyıcı üzerine immobilize edilen lipaz (■) ,50 mg immobilize enzim

Yaptığımız çalışmada kitosan-perlit kompozit boncuk üzerine immobilize edilen enzim için tekrar kullanılabilirliğinin kitosan-MWCNTs üzerine immobilize edilen enzime göre daha yüksek olduğu görüldü. Tekrarlanabilirliğin yüksek olması endüstriyel açıdan bize avantaj kazandırmaktadır.

Daha önce yapılan yapılan bir çalışmada kitosan-çift katmanlı biyomimetik membran ve kitosan-PANcMA membran üzerine *Candida Rugosa* kaynaklı lipaz için immobilizasyon yöntemi

geliştirilmiştir. Yapılan tekrarlılık testleri sonucunda; 10 kez kullanım sonrası kitosan-çift katmanlı biyomimetik membran üzerine immobilize edilmiş membranda % 47 aktivite kaybı, kitosan-PANCMA membran üzerine edilmiş membranda % 38 aktivite kaybı gözlemlenmiştir [Ye et al, 2005]. Enzim inaktivasyonunun sebebi kullanımlar sonucunda protein ve protein sızıntısından kaynaklanan denatürasyondur [Ye et al, 2005]. Bu sonuçlar bize tekrarlanabilirliğin gözenek yapısı ve taşıyıcı yüzey özelliklerine göre değiştiğini göstermiştir.

3.10. Genel değerlendirme

Lipaz enziminin endüstride kullanım alanı oldukça geniş bir yelpazede seyretmektedir. Her geçen gün artan enzim maliyetleri immobilize enzime dikkat çekmektedir. Enzimin geri dönüşünü sağlamak artık endüstriyel bir gereksinim haline gelmiştir.

Bu çalışmada porcine pancreatic lipazın kitosan-perlit ve kitosan- MWCNTs olmak üzere iki farklı taşıyıcı üzerine immobilizasyonu sağlandı. Çalışmadan çıkarılan sonuçlara göre kitosan-perlit kompozit boncuklar üzerine immobilize edilmiş lipazın ECH ile çapraz bağlama süresi 4 saat, kitosan-MWCNTs üzerine immobilize edilmiş lipaz için 20 saat bulundu. Kompozit boncukları immobilize etmek için kullanılan lipaz konsantrasyonu her iki taşıyıcı içinde 2 mg/ml bulundu Lipaz ile kompozit boncukları immobilize etme süresi her iki taşıyıcı içinde 24 saat olarak bulundu. İmmobilizasyondan sonra immobilize lipazın optimum pH'ı alkali bölgeye doğru 1.0 pH birimi kaydığı gözlemlendi. Optimum sıcaklık değeri serbest enzim için 37 °C iken her iki taşıyıcı üzerine immobilize edilmiş enzim için 50 °C ye yükseldi.. Hesaplamalara göre serbest enzim için V_{max} değeri 0,38 U.mg pro.⁻¹, K_M değeri 20 μ M, kitosan-perlit için V_{max} değeri 0,33 U.mg pro.⁻¹, K_M değeri 7,69 μ M , kitosan-MWCNTs için V_{max} değeri 0,38 U.mg pro.⁻¹, K_M değeri 5,88 μ M dir. İmmobilizasyon çalışmalarında endüstriyel uygulamalar yönünden özellikle üzerinde durulan pH, depolama ve sıcaklık stabiliteyi bu yöntem ile oldukça başarılı sonuçlar vermiştir. Geliştirilen yöntemle diğer lipaz immobilizasyon çalışmalarına paralel olarak pH, sıcaklık ve depolama stabiliteyi bir artış olduğu bulundu. Endüstriyel uygulamalar açısından yüksek sıcaklıklara çıkmayı gerektiren endüstriyel uygulamalarda sıcaklık stabilitesi oldukça önemlidir. Özellikle tekrar kullanılabilirlikte elde edilen sonuçlar endüstride maliyet açısından büyük önem arz etmektedir. Kovalent bağlarla gerçekleştirilecek bir enzim immobilizasyon yöntemiyle genel olarak serbest enzime kıyasla immobilize edilmiş enzim yüksek sıcaklık veya organik çözücüler gibi denatüre edici koşullara karşı daha dayanıklı bir hal almaktadır.

KAYNAKLAR

Abdul Rahman, M.B., Tajudin, S.F., Hussein, M.Z., Abdul Rahman, R.Z.J., Salleh, A., Basri, M., 2005. Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* as biocatalyst for effective esterification. *Applied Clay Science*, 29 : 111-116

Abramic, M., Lescic, I., Korica, T., Vitale, L., Saenger, W., Pigac, J., 1999. Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25 : 522-529.

Aehle, W., Enzymes in Industry Production and Applications, Wiley- VCH, Weinheim,2004.

Akoh, C.C., Min, D.B., "Microbial Lipases" ve "Enzymatic Interesterification" Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology (1998), Marcel Dekker, Inc, New York, sf. 641-698.

Aksoy C., Lipaz ve Üreaz Enzimlerinin Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, (2003).

Albayrak, N., Yang, S.T., 2002a. Immobilization of β -galactosidase on fibrous matrix by polyethyleneimine for production of galacto-oligosaccharides from lactose. *Biotechnol. Progr.*, 18 : 240-251.

Albayrak, N., Yang, S.T., 2002b. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on tosylated cotton cloth. *Enzym. Microbiol. Technol.*, 31 : 371-383

Andersch, P., Berger, M., Hermann, J., Laumen, K., Lobell, M., Seemayer, R., Waldinger, C., Schneider, M.P., 1997. Ester synthesis via acyl transfer (Transesterification) [19]. *Methods-In-Enzymology*, 286 : 406-443.

Antonian E. 1988 Recent advances in the purification, characterization and structure determination of lipases. *Lipids*. 23 (12):1101–1106

Arıca M. Y., Epoxy-derived pHEMA membrane for use bioactive macromolecules immobilization, *Jour. Appl. Polym. Sci.*, 77, 2000-2008, 2000.

Atalan, Ö.Ö., "immobilize Beta-Glukuronidaz/Arilsülfataz enzimi kullanarak GC-MS yöntemi ile morfin analizi", Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 13-16 (2006).

Atia, K. S., El-Arnaouty, M. B., Ismail, S. A., Dessouki, A. M., 2003. Characterization and Application of Immobilized Lipase Enzyme on Different Radiation Grafted Polymeric Films: Assessment of the Immobilization Process Using Spectroscopic Analysis. *Journal of Applied Polymer Science* 90 : 155-167.

Bagi, K., Simon, L.M., Szajani, B, 1997. Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. *Enzyme Microb. Technol.*, 20: 531-535

Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernandez-Lafuente, R., Huguet, J., Guisan, J.M.A., 1998. A Single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol. Bioeng.*, 58 : 486-493.

Bayramoğlu, G., Kaya, B., Arıca, M.Y., 2005. Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto spacer-arm attached poly(GMA-HEMA-EGDMA) microspheres. *Food Chemistry*, 92 : 261-268.

Bernath F.R., Venkatasubramanian, K., 1986. Methods of enzyme immobilization. *In Manual of industrial microbiology and biotechnology* (Editör: A.L., Demain ve N.A., Solomon). American Society for Microbiology, Washington, D.C. p. 230-346.

Bickerstaff, G.F., "immobilization of Enzymes and cells", Humana press, Totowa, New Jersey, 12-32 (1997).

Bioresource Technology, Polymer Nylon-6 for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability. 99 : 2566-2570.

Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye- binding, *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254, 1976.

Branderberger, H., 1955, *Angew. Chem.*, 67,661.

Bruno, L.M., Coelho, J.S., Melo, E.H.M., Lima-Filho, J.L., 2005. Characterization of *Mucor miehei* lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21 : 189-192.

Bruno, L.M., Coelho, J.S., Melo, E.H.M., Lima-Filho, J.L., 2005. Characterization of *Mucor miehei* lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21 : 189-192.

Bruno, L.M., Pinto, G.A.S., Castro, H.F., Lima-Filho, J.L., Melo, E.H.M., 2004. Variables that affect immobilization of *Mucor miehei* lipase on nylon membrane. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20 : 371-375.

Cao, L., Van Langeny, L., Sheldon, R.A., 2003. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?. *Current Opinion in Biotechnology*, 14 : 387-394.

Casa, R.M., Guisaín, J.M., Sañchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V., 2002 Modification of the activities of two different lipases from *Candida rugosa* with dextrans. *Enzyme and Microbial Technology*, 30 : 30–40.

Chang, M.Y. and Juang, R.S., 2005. Activities, stabilities, and Reaction Kinetics of Three Free and Chitosan-Clay Composite Immobilized Enzymes, *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 75-82.

Coşkun, G., Glutatiyon-S-transferaz Enziminin Farklı Taşıyıcılarda İmmobilizasyonu ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2007.

Çiçek, Y. E., 2002. Pişmiş toprak tuğla, bimsbeton, gazbeton ve perlitli yapı malzemelerinin fiziksel, kimyasal ve mekanik özelliklerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Cristovao R. O., Tavares A. P.M., Brigida A. I, Loureiro J. M., Boaventuraa R. A.R., Macedo E. A., Coelho M. A. Z., Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 72 (2011) 6– 12.

D.T.Michael, Immobilized enzyme, John Wiley and Sons., New York, (1980).

Dalmau, E., Montesinos, J.L., Lotti, M., Casas, C., 2000. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26 : 657-663.

Devlet Planlama Teşkilatı, 2001. 8. *Kalkınma Planı (2001-2005) Madencilik Özel İhtisas Komisyonu Raporu*, Ankara.

Dias, A.A., Bezerra R.M., and Pereira, A.N., *Bioresource Technol.*, 92, 7(2004).

Dodor D.E., Hwang H. and Ekunwe I.N., *Enzyme Microb. Tech.*, 35, 210(2004).

Downey, W., 1980. Review of the Progress of Dairy Science: Flavor impairment from pre- and post-manufacture lipolysis in milk and dairy products. *J. Dairy Res.* 47, 237-252.

Du, W., Xu, Y., Liu, D., Zeng, J., 2004. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 30 : 125–129.

Edwards W., Leukes W. D., Rose P.D., Burtan S. G., Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan-coated polysulphone capillary membranes for improved phenolic effluent Bioremediation, *Enzy. and Microb. Technol.* , 25,769- 773, 1999.

Elibol, M., Ozer, D., 2000. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rizopus arrhizus*. *Proc. Biochem.* 36, 325–329.

Erdik, E., Obalı, M., Yüksekısık N., Öktemer, A., Pekel, T., _hsanoglu, E., “Denel Organik Kimya 4.baskı” *A.Ü.F.F Döner Sermaye _sletmesi Yayınları No:44*, Ankara, 93, 468-482 (2001).

Erkoç Ş., “Karbon Nanoyapılar”, *Bilim ve Teknik*, (ODTU Fizik Bölümü), Ocak 2001

Falch, E.A., 1991. Industrial enzymes, developments in production and application. *Biotechnol. Adv.* 9, 643-658.

Fessenden, R. J., Fessenden, J. S., Logue, M. W., *Organik Kimya*, Uyar, T.(editör), 2001.

Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H., 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J.Bioscienc. Bioeng.*, 92 : 406-416.

Gaur, R., Pant, H., Jain, R., Khare, S.K., 2006. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chem.*, 97 : 426–430.

Ge B., Tan Y., Xie Q., Ma M., Ya S., Preparation of chitosan–dopamine-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite for electrocatalytic oxidation and sensitive electroanalysis of NADH, *Sensors and Actuators B* 137 (2009) 547–554.

Ghosh, P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P., and Davidson, S. “Microbial lipases: Production and applications”, *Sci. Prog.*, 79(2): 119-157 (1996).

Ghosh, P.K., Saxena, R.X., Gupta, R., Yadav, R.P., Davidson, S., 1996. Microbial lipase: production and applications. *Sci. Prog.* 79, 119-157.

Giorno, L., Enrico, D., 2000. Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. *TIBTECH.*, (18) : 339-349.

Gjellesvik M.A. Islam¹, F. Parveen¹, K. Hossain¹, S. Khatun¹, Md. R. Karim¹G.S. Kim², N. Absar¹ and Md. S. Haque^{1,*} Purification and Biochemical Characterization of Lipase from the Dorsal Part of *Cirrhinus reba*

Güler S., Kitosan Türevlerinde İmmobilize Edilen Lakkaz Enziminin Aktiviteleri, Stabiliteleri ve Reaksiyon Kinetiklerinin İncelenmesi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Ens., Yüksek Lisans Tezi, Manisa, 2012.

Hartmeier, W., 1968, İmmobilisierte Biokatalysatoren, Springer Verlag, New York.

<http://www.nano.gov/>

<http://www.nanotube.msu.edu>

<http://www.pertas.net/PERLITMADENI.html>, 10.12.2006

[http:// www.birseygoren.com/hakkinda/lipaz](http://www.birseygoren.com/hakkinda/lipaz), 2007

Huang X., Ge D., Xu., 2007, Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization, *European Polymer Journal* 43 (2007) 3710–3718

Hung, T., Giridhar R., Chiou, S., Wu W., Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 26 (2003) 69–78, 2003

Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., Shrestha, S., 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzyme.*, 16 : 53–58.

Jaeger K.,E., Eggert T., 2002. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*,13 : 390-397.

Jaeger K.E., Schneidinger B., Rosenau F., Werner M., Lang D., Dijkstra B.W., Schimossek K., Zonta A., Reetz M.T., "Bacterial lipases for biotechnological applications", *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, 3,(1997), 3-12.

Kaieda, M., Samukawa, T., Kondo, A., Fukuda, H., 2001. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. *J. Biosci. Bioeng.*, 91 : 12–15.

Kara, F. , Üreazın Aljinat/Kitosan Polielektrolit ve Poli(Akrilamid-co-akrilikasit)/ karragenan Interpolimer Komplekslerine İmmobilizasyonu, 2006, Yüksek lisans tezi

Karadağ ,H., Soya Fasulyesi Lipoksijenazının Poliakrilamid Jel Üzerine İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Adana, 2001

Kilinc, A., Önal,S., Telefoncu, A., Chemical attachment of porcine pancreatic lipase to crosslinked poly(vinyl alcohol) by means of adipoyldichloride , *Process Biochemistry* 38 (2002) 641_ 647

Kojima, S., Du, D., Sato, M., Park, E.Y., 2004. Efficient production of fatty acid methyl ester from waste activated bleaching earth using diesel oil as organic solvent. *J. Biosci. Bioeng.*, 98 : 420-424.

Köse, Ö., Tüter, M., Aksoy, H.A., 2002. Immobilized *Candida antarctica* lipasecatalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. *Bioresource Technol.*, 83 : 125–129.

Krajewska, B., 2004. Application of Chitin- and Chitosan- Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review, *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 126-139.

Kuncova, G., Sivel, M., 1997. Lipase Immobilized in Organic-Inorganic Matrices. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* , 8 : 667-671.

Kuncova, G., Sivel, M., 1997. Lipase Immobilized in Organic-Inorganic Matrices. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* , 8 : 667-671.

Lante A., Crapisi A., Krastanov A. and Spettoli P., *Process Biochem.*, 36, 51(2000).

Ma L., Lu W., Wen J., Encapsulation of lactate dehydrogenase in carbon nanotube doped alginate–chitosan capsules, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 56 (2009) 102–107.

Macrae, A., Roehl, E.L., Brand, H.M., 1990. Bio-esters in cosmetic. *Drug Cosmet. Ind.* 147, 36±39.

Manecke, G., and Gilbert, K.E., 1953. *Naturwiss.*,42,212

Nelson, L.A., Foglia, T.A., Marner, W.N., 1996. Lipase-catalyzed production of biodiesel. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73 : 1191-1195.

Nelson, L.A., Foglia, T.A., Marner, W.N., 1996. Lipase-catalyzed production of biodiesel. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73 : 1191-1195.

Nilsson, K., Mosbach, K., 1984. Peptide synthesis in Aqueous-organic solvent mixtures with α -chymotrypsin immobilized to tresyl chloride activated agarose. *Biotech Bioeng.*, 26 : 1146-1154.

Nthangeni, M.B., Patterton, H.G., Tonder, A., Vergeer, W.P., Litthauer, D., 2001. Overexpression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 705-712.

Öztürk,N. Hidrofobik Nanoyapılarda Candida Rugosa Lipaz İmmobilizasyonu, 2006, Yüksek lisans tezi

Pahujani, S., Kanwar, S.S., Chauhan, G., Gupta, R., 2008. Glutaraldehyde activation of Palomo, J.M.,

Ferna´ndez-Lorente, G., Mateo, C., Ortiz, C., Ferna´ndez-Lafuente, R., Guisana, J.M., 2002a. Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters. *Enzyme and Microbial Technology*, 31 : 775-783.

Petersen M.T.N., Fojan P., Petersen S.B., "How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution", *Journal of biotechnology*, 85,issue 2, (2001),119-131.

Schoevaart, R., Wolbers, M.W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A.P.G., van Rantwijk, F., van der Wielen, L.A.M., Sheldon, R.A.,2004. Preparation, Optimization, and Structures of Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs). *Biotechnol. Bioeng.*, 87 : 754–762.

Sharma, R., Chistib, Y. and Banerjee, U.C. 2001. Production, purification, Characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*,19; 627–662

Sharma, R., Chistib, Y. and Banerjee, U.C. 2001. Production, purification, Characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*,19; 627–662

Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H., Tominaga, Y., 1999. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 76 : 789–793.

Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 17 : 133–142.

Soumanoua, M.M., Bornscheuer, U.T., 2003. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzym. Microbiol. Technol.*, 33 : 97–103.

Schmid R.D., Verger,R., *Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications.*

Shaw JF, Chang RC, Wang FF, Wang YJ. Lipolytic activities of a lipase immobilized on six selected supporting materials. *Biotechnol Bioeng*, 1990;35:132_ 7.

Tan H., Feng W., Ji P., Lipase immobilized on magnetic multi-walled carbon nanotubes, *Bioresource Technology* 115 (2012) 172–176.

Teke, A.B., Farklı yöntemlerle üreaz/alanin Dehidrogenaz enzim çiftinin immobilizasyonu ve sistemin kan üre düzeyini düşürebilme olanaklarının araştırılması, 2008

Telefoncu A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.

Telefoncu, A., 1997. Enzimoloji.Yüksek Lisans Yazokulu. 21-27 Eylül 1997. Kuşadası, Aydın, Türkiye.446 s.

Toydemir,N., 1968, Toprak Taşıyıcı Döşeme Bloklarının Rasyonelasyon Üzerine bir deneme, Doktora Tezi, İTÜ, İstanbul

Türk B., İmmobilize lipaz enzimi kullanarak etil büterat üretimi, 2008, Yüksek Lisans Tezi

Verger 1997: Verger, R., "Interfacial activation of lipases: facts and artifacts", TIBTECH reviews, 15,(1997), 32-38.

Wang Q., Zhang B., Lin X., Weng W., Hybridization biosensor based on the covalent immobilization of probe DNA on chitosan–mutiwalled carbon nanotubes nanocomposite by using glutaraldehyde as an arm linker, Sensors and Actuators B 156 (2011) 599– 605.

Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H., Tominaga, Y., 2000 Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77 : 355-360.

Wiseman, A., 1975, Handbook of Enzyme Biotechnology, Halsted Press, New York

Wiseman A. (Editor), Handbook of Enzyme Biotechnology, TJ Pres Ltd., Cornwall, UK, 465-466,1995.

Worsfold, P.J., 1995. Classification and Chemical Characteristics of Immobilized Enzymes, *Pure& Appl. Chem*, 67(4), 597-600.

Xu, Yun-qiang, Guo-wei Zhou*, Cui-cui Wu, Tian-duo Li, Hong-bin Song, Improving adsorption and activation of the lipase immobilized in amino-functionalized ordered mesoporous SBA-15, *Solid State Sciences* 13 (2011) 867-874

Yalçın, S., 1983 'inşaat sektöründe genlenmiş perlit kullanımı', Etibank Matb., Ankara, Türkiye
Yalçın,S. İnşaat sektöründe Perlit,1983

Ye P., Xu Z., Che A., Wu J., Seta P., Chitosan-tethered poly(acrylonitrile-co-maleic acid) hollow fiber membrane for lipase immobilization, *Biomaterials* 26 (2005) 6394–6403

Zaborsky, O. R., 1977. In *Biomedical Application of Immobilized Enzymes Proteins Vol. 1*, (T. M. S. Chang. ed.), Plenum, New York.

Zamora, P.P., Pereira,C.M., Tiburtius,E.R.L., Moraes, S.G., Rosa, M.A., Minussi, R.C., and Durán,N., *Appl. Catal. B-Environ.*, 42, 131(2003)

Zhu, J., Gang S., Lipase immobilization on glutaraldehyde-activated nanofibrous membranes for improved enzyme stabilities and activities, *Reactive & Functional Polymers* 72 (2012) 839–845