



**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**

**LİPAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU ve AROMATİK**  
**ESTERLERİN SENTEZİNDE KULLANIMI**

**ESRA GEZER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANTAKYA/HATAY**

**EYLÜL-2009**

# I

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	III
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	3
1.1.1. İmmobilize Edilen Enzimden Beklenen Özellikler.....	4
1.1.2. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması.....	4
1.2. Lipaz.....	5
1.2.1. Lipazın Kullanım Alanları.....	5
1.2.2. Sodyum Alginat.....	6
1.2.3. Kitosan.....	7
1.3. Aromalar.....	7
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	9
3.MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
3.1. Materyal.....	13
3.2. Yöntem.....	14
3.2.1. İmmobilize Lipaz Örneklerinin Hazırlanması ve İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu.....	14
3.2.1.1. Lipaz enziminin Ca-Alg/Kitosan Jele Hapsetme Yöntemiyle İmmobilizasyonu.....	14
3.2.1.2. Lipazın Ca-Alg/Kitosan Jele İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu.....	14
3.2.1.3. Lipazın Kitosan Desteğe İmmobilizasyonu.....	15
3.2.1.4. Kitosan Desteğe İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu.....	16

## II

3.2.2. İmmobilize CRL ve PPL ile Aromatik	
Ester Sentezi.....	17
3.2.2.1. İmmobilize CRL ve PPL ile Sentezlenecek Aromatik	
Esterlerin Seçimi.....	18
3.2.2.2. İmmobilize CRL ve PPL ile Sentezlenen Aromatik	
Esterlerin GC-MS Analizlerinin Yapılması.....	19
3.2.3. Ester Üretiminde Reaksiyon Ortamındaki	
Çözücü Etkisi.....	19
3.2.4. Ester Üretiminde Sıcaklığın Etkisi.....	19
3.2.5. Ester Üretiminde Substrat Derişimlerinin Etkisi.....	19
3.2.6. İmmobilize Edilmiş CRL ve PPL Örneklerinin Kesikli	
ve Sürekli Dolgu Yataklı Kolon Reaktörlerde	
Kullanımının Araştırılması.....	19
3.2.7. İmmobilize Lipaz Enzimlerinin Termal Kararlılıklarının	
Belirlenmesi.....	20
3.2.8. Lipaz Örneklerinin İmmobilize Formda Depolama	
Kararlılıklarının Belirlenmesi.....	20
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	21
4.1. Ester Seçimi.....	21
4.2. GC-MS Analiz Sonuçları.....	21
4.3. İmmobilize Enzimlerin Farklı Çözücü Ortamlarındaki Ester	
Üretim Etkinliklerinin Belirlenmesi.....	23
4.4. Ca-Alg/Kitosan Jele İmmobilizasyon Koşullarının	
Optimizasyonu.....	24
4.4.1. Ca-Alg/Kitosan Jeline İmmobilize Edilmiş Lipaz	
Örneklerindeki Kuruluk Oranı.....	27
4.5. Kitosan Desteğe İmmobilizasyon Koşullarının	
Optimizasyonu.....	29
4.6. İmmobilize CRL ve PPL ile Aroma Esterleri Üretimine	
Sıcaklığın Etkisi.....	33

### III

4.7. Ca-Alg/Kitosan Jele İmmobilize Edilmiş Lipaz ile Ester Üretimine Substrat Değişiminin Etkisi.....	35
4.8. Kesikli Reaktörde Ester Üretim Etkinliğinin Araştırılması.....	42
4.9. Sürekli Reaktörde Ester Üretim Etkinliğinin Araştırılması.....	44
4.10. İmmobilize Lipaz Enzimlerinin Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi.....	47
4.11. Lipaz Örneklerinin İmmobilize Formda Depolama Kararlılıkları.....	48
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR.....	53
TEŞEKKÜR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	56

## IV ÖZET

### LİPAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU ve AROMATİK ESTERLERİN SENTEZİNDE KULLANIMI

Bu çalışmada başlıca kalsiyum-alginat/kitosan (Ca-Alg/Kitosan) jele hapsedme yöntemiyle ve kitosan desteğe kovalent bağla immobilize edilmiş *Candida rugosa* (CRL) ve domuz pankreası (PPL) kaynaklı lipaz enzimleri kullanılarak aromatik ester üretimi amaçlanmıştır. Başlangıçta lipaz katalizi ile 15 farklı aroma esteri sentezlenmiş ve kokularına göre izoamil asetat ve hekzil asetat olmak üzere 2 tanesi araştırma amacıyla seçilmiştir. Aroma ester sentezi 4 enzim örneği (2 farklı lipaz ve 2 farklı destek) ve 2 farklı aroma esteri için ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Reaksiyon ortamını belirlemek için ester sentezi hekzan, heptan, toluen, ksilen, kloroform ve ayrıca çözücüsüz ortamda gerçekleştirilmiştir. Tüm enzim türü ve aromalar için en iyi sonuçlar heptan ortamı için elde edilirken çözücüsüz ortamda en düşük üretim elde edilmiştir. İmmobilizasyon koşulları Ca-Alg/kitosan destek için sodyum alginat derişimi, kitosan derişimi, glutaraldehit derişimi ve kuruluk oranı, kitosan destek için ise arakol türü ve glutaraldehit derişimi açısından optimize edilmiştir. Ester sentezi için reaksiyon sıcaklıkları 30-60 °C arasında değiştirilmiş ve en iyi sonuçlar Ca-Alg/Kitosan ve kitosan destek için sırasıyla 45 ve 40 °C olarak elde edilmiştir. Asit ve alkol substratlarının derişimleri 10, 25, 50, 75 ve 100 mM arasında kullanılarak substrat çiftlerinin en uygun derişim değerleri elde edilmeye çalışılmıştır. En yüksek ester üretimi genellikle 50 mM asit ve alkol derişimlerinde elde edilmiş ve daha yüksek substrat derişimlerinde ester veriminin düştüğü gözlenmiştir. Ester üretimi ayrıca kesikli ve dolgu yataklı sürekli kolon reaktörlerde 8 saat reaksiyon süresince gerçekleştirilmiştir. İmmobilize lipazların 40 °C'deki termal kararlılıkları 24 saat süreyle belirlenmiştir. Ayrıca depolama kararlılıkları 4 °C'de 60 gün boyunca izlenmiştir. 60 günün sonunda Ca-Alg/kitosana immobilize edilmiş CRL ve PPL lipazlarının başlangıca göre sırasıyla % 36,8 ve % 33 aktivite gösterdikleri gözlenmiştir. Kitosan destek kullanıldığında ise bu değerler *Candida rugosa* ve domuz pankreası lipazları için sırasıyla %24,4 ve % 21,3 olarak belirlenmiştir.

2009, 56 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** *Candida rugosa* lipazı, Domuz pankreası lipazı, İmmobilizasyon, Sodyum alginat, Kitosan, Aroma esteri, izoamil asetat, hekzil asetat.

## ABSTRACT

## IMMOBILIZATION OF LIPASE ENZYME AND USING FOR PRODUCTION OF FLAVOR ESTERS

This study was mainly aimed the aroma ester production by immobilized *Candida rugosa* (CRL) and porcine pancreatic (PPL) origin lipases entrapped into calcium alginate/chitosan (Ca-Alg/Chitosan) gel and covalently bound onto chitosan support. Firstly fifteen different aroma esters were synthesized by lipase catalysis and two of them, *iso*-amyl acetate and hexyl acetate, were selected to investigate according to their fragrance. Aroma ester synthesis for 4 enzyme samples (2 different lipases with 2 different supports) and for 2 different flavors were investigated in detail. Ester synthesis were carried out in hexane, heptane, toluen, xylen, chloroform and also in solvent free medium. The best results were obtained in heptane for all enzyme types and aroma esters while in solvent free medium production was the lowest. Immobilization conditions such as sodium alginate, chitosan and glutaraldehyde concentrations and drying level for Ca-Alg/Chitosan support, and spacer arm type and glutaraldehyde concentration for chitosan support were optimized. Reaction temperatures for ester synthesis were changed between 30 and 60 °C and the best results were obtained at 45 °C and 40 °C for Ca-Alg/Chitosan and chitosan supports, respectively. Acid and alcohol concentrations used as 10, 25, 50, 75 and 100 mM to determine optimal substrate concentration couples. It was found that maximum ester production were achieved generally at 50 mM acid and alcohol substrates, and ester yields decreased at higher substrate concentrations. It was also carried out the production of esters in batch and continuous fixed bed column reactors for 8 hours of reaction time. Thermal activities of immobilized lipases were investigated during 24 hour at 40 °C. Storage stabilities at 4 °C was also determined for 60 days. It was observed that, *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase immobilized into Ca-Alg/Chitosan beads showed 36.8 % and 33% of their initial activity, respectively at the end of the 60 days. These values were determined as 24.4 % and 21.3 % for *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase immobilized onto chitosan, respectively.

2009, 56 pages

**Key Words:** *Candida rugosa* lipase, Porcine pancreatic lipase, Immobilization, Sodium alginate, Chitosan, Aroma esters, Iso-amyl acetate, Hexyl acetate

## VI

### SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

1,3-DAP	1,3-Diamino propan
1,4-DAB	1,4-Diamino bütan
1,5-DAP	1,5-Diamino pentan
1,6-DAH	1,6-Diamino hekzan
AA	Asetik Asit
Ca-Alg	Kalsiyum Alginat
CRL	<i>Candida rugosa</i> Lipazı
GAL	Glutaraldehit
HA	Hekzil Alkol
HAc	Hekzil Asetat
IAAc	<i>izoamil</i> Asetat
IAA	<i>izoamil</i> Alkol
Na-Alg	Sodyum Alginat
PPL	Porcine pancreatic Lipazı

## VII ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 1.1. Enzimlerin kullanım alanları.....	1
Çizelge 1.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması.....	4
Çizelge 3.1. Alkol-asit bileşimlerinin oluşturduğu esterler.....	18
Çizelge 4.1. Ca-Alg/Kitosan jeli ile farklı çözücü ortamlarında ester üretimi.....	23
Çizelge 4.2. Kitosan destek kullanılarak farklı çözücü ortamlarında ester üretimi.....	23
Çizelge 4.3. CRL ve PPL'nin Ca-Alg/Kitosan jele immobilizasyonunda Na-Alg derişiminin optimizasyonu.....	25
Çizelge 4.4. CRL ve PPL'nin Ca-Alg/Kitosan jele immobilizasyonunda Kitosan derişiminin optimizasyonu.....	25
Çizelge 4.5. CRL ve PPL'nin Ca-Alg/Kitosan jele immobilizasyonunda GAL derişiminin optimizasyonu.....	26
Çizelge 4.6. Farklı arakollar üzerinden kitosan desteğe immobilize edilmiş lipaz örneklerinin bağlanma miktarları ve ester üretim etkinlikleri.....	30
Çizelge 4.7. Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ile ester sentezinde substrat derişimi etkisi.....	37
Çizelge 4.8. Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş PPL ile ester sentezinde substrat derişimi etkisi.....	38
Çizelge 4.9. Kitosan desteğe immobilize edilmiş CRL ile ester sentezinde substrat derişimi etkisi.....	40
Çizelge 4.10. Kitosan desteğe immobilize edilmiş PPL ile ester sentezinde substrat derişimi etkisi.....	41



## VIII ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 1.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.....	3
Şekil 1.2. Lipazın etki mekanizması.....	5
Şekil 1.3. Lipazın susuz ortamda transesterifikasyon aktivitesi.....	5
Şekil 1.4. Na-Alg'ın kimyasal yapısı.....	6
Şekil 1.5. Kitosanın kimyasal yapısı.....	7
Şekil 3.1. Ca-Alg molekülünün kimyasal yapısı.....	14
Şekil 3.2. Kitosan'ın GAL ile aktifleştirilip immobilizasyona hazırlanması.....	15
Şekil 3.3. Kitosanın immobilizasyona hazırlanması.....	16
Şekil 3.4. Ester üretiminin gerçekleştiği sürekli dolgu yataklı kolon reaktör şeması.....	20
Şekil 4.1. IAAC'ın kimyasal oluşum reaksiyonu.....	21
Şekil 4.2. HAC'ın kimyasal oluşum reaksiyonu.....	21
Şekil 4.3. IAAC üretiminde reaksiyon karışımının GC-MS kromatogramı.....	22
Şekil 4.4. HAC üretiminde reaksiyon karışımının GC-MS kromatogramı.....	22
Şekil 4.5. Ca-Alg/Kitosan jelinin bağlı ağırlığı ile IAAC üretim etkinliğinin değişimi.....	27
Şekil 4.6. Ca-Alg/Kitosan jelinin bağlı ağırlığı ile HAC üretim etkinliğinin değişimi.....	28
Şekil 4.7. Optimum koşullarda elde edilen ve enzim içermeyen Ca-Alg/Kitosan jelleri.....	29
Şekil 4.8. Optimum koşullarda elde edilen ve lipaz içeren Ca-Alg/Kitosan jelleri.....	29
Şekil 4.9. Kitosan desteğe immobilizasyon aşamasında kullanılan GAL derişiminin IAAC üretim etkinliği üzerine etkisi.....	31
Şekil 4.10. Kitosan desteğe immobilizasyon aşamasında kullanılan GAL derişiminin HAC üretim etkinliği üzerine etkisi.....	31

## IX

Şekil 4.11. Saf kitosan.....	32
Şekil 4.12. Arakol bağlanarak % 0,5 GAL ile aktifleştirilen kitosan.....	32
Şekil 4.13. Lipaz ile immobilize edilmiş kitosan destek.....	32
Şekil 4.14. Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ve PPL ile IAAc üretimine sıcaklığın etkisi.....	33
Şekil 4.15. Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ve PPL ile HAc üretimine sıcaklığın etkisi.....	33
Şekil 4.16. Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ve PPL ile IAAc üretimine sıcaklığın etkisi.....	34
Şekil 4.17. Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ve PPL ile HAc üretimine sıcaklığın etkisi.....	34
Şekil 4.18. Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ile IAAc üretim etkinliğine substrat derişiminin etkisi.....	36
Şekil 4.19. Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ile HAc üretim etkinliğine substrat derişiminin etkisi.....	36
Şekil 4.20. Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş PPL ile IAAc üretim etkinliğine substrat derişiminin etkisi.....	37
Şekil 4.21. Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş PPL ile HAc üretim etkinliğine substrat derişiminin etkisi.....	38
Şekil 4.22. Kitosan desteğe immobilize edilmiş CRL ile IAAc üretim etkinliğine substrat derişiminin etkisi.....	39
Şekil 4.23. Kitosan desteğe immobilize edilmiş CRL ile HAc üretim etkinliğine substrat derişiminin etkisi.....	39
Şekil 4.24. Kitosan desteğe immobilize edilmiş PPL ile IAAc üretim etkinliğine substrat derişiminin etkisi .....	40
Şekil 4.25. Kitosan desteğe immobilize edilmiş PPL ile HAc üretim etkinliğine substrat derişiminin etkisi .....	41
Şekil 4.26. Kesikli reaktör sisteminde Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ve PPL kullanılarak IAAc üretim etkinliğinin zamana bağlı değişimi.....	42

Şekil 4.27. Kesikli reaktör sisteminde Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ve PPL kullanılarak HAc üretim etkinliğinin zamana bağlı değişimi.....	43
Şekil 4.28. Kesikli reaktör sisteminde Kitosan desteğe immobilize edilmiş CRL ve PPL kullanılarak IAac üretim etkinliğinin zamana bağlı değişimi.....	43
Şekil 4.29. Kesikli reaktör sisteminde Kitosan desteğe immobilize edilmiş CRL ve PPL kullanılarak HAc üretim etkinliğinin zamana bağlı değişimi.....	44
Şekil 4.30. Sürekli reaktör sisteminde Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL kullanılarak IAac ve HAc üretim etkinliğinin zamana bağlı değişimi.....	45
Şekil 4.31. Sürekli reaktör sisteminde Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş PPL kullanılarak IAac ve HAc üretim etkinliğinin zamana bağlı değişimi.....	45
Şekil 4.32. Sürekli reaktör sisteminde Kitosan desteğe immobilize edilmiş CRL kullanılarak IAac ve HAc üretim etkinliğinin zamana bağlı değişimi.....	46
Şekil 4.33. Sürekli reaktör sisteminde Kitosan desteğe immobilize edilmiş PPL kullanılarak IAac ve HAc üretim etkinliğinin zamana bağlı değişimi.....	46
Şekil 4.34. IAac üretiminde kullanılan immobilize CRL'nin zamana bağlı olarak termal kararlılığı.....	48
Şekil 4.35. IAac üretiminde kullanılan immobilize PPL'nin zamana bağlı olarak termal kararlılığı.....	48
Şekil 4.36. IAac üretiminde kullanılan Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ve PPL enzimlerinin depolama kararlılığı .....	49
Şekil 4.37. IAac üretiminde kullanılan Kitosan desteğe immobilize edilmiş CRL ve PPL enzimlerinin depolama kararlılığı .....	49

## 1. GİRİŞ

Enzimler hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapılı maddelerdir. Canlı organizmalarda gerçekleşen pek çok reaksiyon enzimlerle katalizlenmektedir. Enzim katalizli bir reaksiyon enzimsiz bir reaksiyona göre  $10^7$ - $10^{16}$  kat daha hızlı gerçekleşir.

Enzimler *in vivo* koşullarda etkinlik gösterebildikleri gibi, *in vitro* şartlar sağlandığında da aktivite göstermeleri enzimlerin canlı olmayan koşullardaki kullanımını sağlamıştır. Böylece enzimlerin birçok alanda kullanımı yaygınlaşmış, endüstriyel anlamda birçok proseste ekonomik olarak rahatlama sağlanmıştır.

Hücre içinde çok önemli metabolik görevleri gerçekleştiren enzimler, endüstride birçok farklı amaç için kullanılmaktadır. Çizelge 1.1.'de tıp, eczacılık, tarım, hayvancılık, çevre, gıda, kağıt, tekstil, deterjan vb. birçok alanda yaygın olarak kullanılan enzimler özetlenmiştir.

**Çizelge 1.1.** Enzimlerin kullanım alanları (Telefoncu, 1997).

<b>Enzim</b>	<b>Kullanım Alanı</b>
Kolesterol oksidaz	Tıp'ta kolesterol tayininde
Proteazlar, lipaz, amilaz	Deterjan sanayinde
Laktaz, mikrobiyal proteazlar	Süt ve süt ürünleri endüstrisinde
Pektinaz, selüloz, limonaz	Meyve suyu sanayinde
Proteaz, lipaz	Deri sanayinde
Amilaz, glukoz izomeraz	Nişasta endüstrisinde
Katalaz, amilaz	Tekstil sanayinde
Amilaz, amiloglikozidaz, pentosanaz	Ekmek sanayinde
Redüktaz, amilaz, fosfataz, oksidazlar	Analitik amaçlı analizlerde
Termolizin	Aspartam üretiminde
Ksilenaz	Kağıt endüstrisinde
Papain, katalaz	Et sanayinde
Penisilin amidaz, oksidazlar,	Eczacılıkta

Enzimler canlı organizmalar tarafından üretilbildikleri için enzim kaynağı olarak bitkiler, hayvanlar ve çoğunlukla mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Son zamanlarda mikroorganizmalar, kolay çoğalabilmeleri, enzim oluşumunun rahat kontrol edilebilir olması nedeniyle potansiyel enzim kaynağı olarak görülmektedir. Ancak mikrobiyal kaynaklardan enzim saflaştırılması oldukça masraflı bir iştir. Endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması çok zordur. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılmadığından reaksiyonun kontrolü çok zordur. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması düşünülebilir. Ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırmaktadır. Katalizör olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek olanaksız olduğunda enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin spesifik ama o ölçüde pahalı katalizör olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir. Ayrıca serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanamazlar. Bu nedenle saflaştırılan enzimlerden olabildiğince faydalanmak için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir. Farklı yöntemlerle çözünmez forma getirilmiş olan immobilize enzimlerin serbest enzimlere göre bazı üstünlükleri vardır. Bunlar;

- ❖ Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilirler (süzme, santrifüjleme, v.b.)
- ❖ Ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir sorun teşkil etmezler.
- ❖ Çevre koşullarına (sıcaklık, pH v.s.) karşı daha dayanıklıdır.
- ❖ Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- ❖ Sürekli sistemlere uygulanabilir.
- ❖ Serbest enzime kıyasla daha kararlıdır.
- ❖ Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- ❖ Birbirini izleyen seri reaksiyonlar için kullanımı uygundur.
- ❖ Bazı koşullarda serbest enzimlerden daha yüksek aktivite gösterebilir.
- ❖ Enzimin kendi kendini parçalama olasılığı azdır.

### 1.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

İmmobilizasyon, kelime itibariyle hareketsiz hale getirmek, kımıldatmamak anlamına gelmektedir. Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel ya da kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla veya suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllere tutuklamayla immobilize edilirler. Enzimlerin suda çözünür formda immobilizasyonunda ise enzimler modifikasyona uğrayabildikleri için mikroçevreleri de değişmektedir. Enzim çözeltisini bir membran ile ürün ve substrattan ayırırsak doğal durumda kalmasını sağlamış oluruz. Bu amaçla ultrafiltrasyon (UF) ve mikrofiltrasyon (MF) membranlarından yararlanılır. Kofaktöre gereksinim duyan enzimlerin immobilizasyonu söz konusu ise küçük molekülü olan kofaktörlerin yarı geçirgen membrandan çıkmamaları için polietilenglikol (PEG) gibi suda çözünen polimerlere kovalent bağlanması gerekir. Genel olarak immobilizasyon yöntemlerini Şekil 1.1.'deki gibi sınıflandırmak mümkündür.



Şekil 1.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

### 1.1.1. İmmobilize Edilen Enzimden Beklenen Özellikler

Kullanılan immobilizasyon tekniği ne olursa olsun immobilize edilen enzimden beklenen özellikler şunlardır:

- ◆ Yüksek kararlılık göstermesi
- ◆ Sürekli üretimde kullanılabilmesi
- ◆ Reaksiyon kontrolüne olanak vermesi
- ◆ Elde edilen üründe yüksek saflık sağlanması
- ◆ Katalitik etkinliğinin yüksek olması
- ◆ Tekrar kullanılabilir olması
- ◆ Ekonomik olması

### 1.1.2. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması

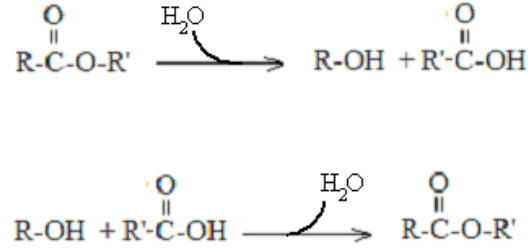
Enzimlerin çoğuna uygulanabilen çok sayıda immobilizasyon tekniği geliştirilmesine karşın, enzimlerin bileşenlerinin ve kimyasal özelliklerinin oldukça geniş, ürünlerin ve substratların farklı özelliklerde olmaları nedeniyle bütün enzimler veya uygulamalar için geçerli tek bir yöntem belirlemek mümkün değildir. Bu nedenle immobilizasyonu düşünülen her farklı enzim için ve her farklı durumda bir veya birkaç değişik yöntem önerilebilir. Çizelge 1.2.'de immobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanmaları gösterilmiştir.

**Çizelge 1.2.** İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması (Telefoncu, 1997).

Karakteristik	Karşı Bağlama	Fiziki Adsorpsiyon	İyonik Bağlanma	Şelat veya Metale Bağlama	Kovalent Bağlanma	Tutuklama
Hazırlama	Orta	Kolay	Kolay	Kolay	Zor	Zor
Bağlanma Gücü	Güçlü	Zayıf	Orta	Orta	Güçlü	Orta
Enzim Aktivitesi	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük
Desteğin Tekrar Kullanılabilirliği	İmkansız	Mümkün	Mümkün	Mümkün	Nadiren	İmkansız
İmmobilizasyon Maliyeti	Orta	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek	Orta
Kararlılık	Yüksek	Düşük	Orta	Orta	Yüksek	Yüksek
Genel Uygulanabilirlik	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Evet
Enzimin Mikrobiyal Ataklara Karşı Korunabilmesi	Mümkün	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Evet

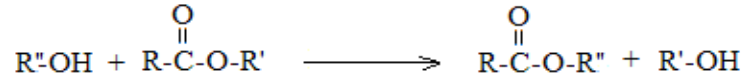
## 1.2. LİPAZ

Endüstriyel öneme sahip enzimlerden biri de lipaz enzimidir. Lipaz (EC. 3.1.1.3), triaçilgliserolü gliserol ve yağ asitlerine parçalayan hidrolaz grubu bir enzim olarak tanımlanır. Ancak lipaz enzimi sulu ortamda genel olarak ester bağı için hidrolitik aktivite gösterirken susuz ortamda ise alkol ve karboksilik asitten ester bağı oluşturarak sentetik aktivite gösteren oldukça kullanışlı bir enzimdir. Bu nedenle çok farklı substratlar için katalitik aktivite göstermesi ve susuz organik çözücü ortamında kullanılabilmesi gibi avantajlara sahiptir. Şekil 1.2.'de birinci reaksiyonda lipazın sulu ortamda ester bağını parçaladığı hidrolitik aktivitesi, ikinci reaksiyonda ise susuz ortamda ester bağının oluştuğu sentetik aktivitesi görülmektedir.



**Şekil 1.2.** Lipaz'ın etki mekanizması

Ayrıca Şekil 1.3.'de görüldüğü gibi lipaz enziminin susuz ortamda transesterifikasyon aktivitesi de bulunmaktadır.



**Şekil 1.3.** Lipaz'ın susuz ortamda transesterifikasyon aktivitesi

Bu nedenle, çözücüsüz ortamda veya organik çözücü içeren ortamlarda lipaz enzimi farklı özellikteki esterlerin sentezinde oldukça fazla bir şekilde kullanım potansiyeline sahip olduğundan endüstriyel önemi gittikçe artmaktadır.

### 1.2.1. Lipaz'ın kullanım alanları

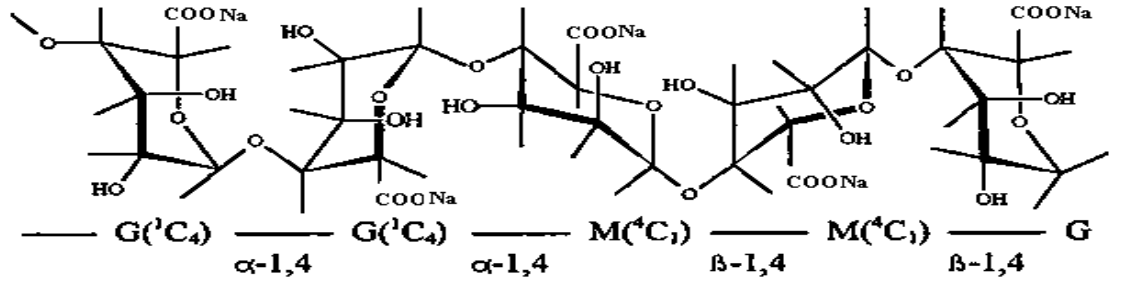
Lipazlar tereyağına aroma kazandırmada, çikolata endüstrisinde, kremalarda, karamellerde kullanım alanına sahiptir. Margariner, fırın ürünleri ve bitkisel ürünler gibi ürünlerde lipazla modifiye edilmiş tereyağı ürünleri aroma geliştirici olarak kullanılmaktadır. Lipazların gıda endüstrisinde, biyomedikal uygulamalarda,



biyosensörler ve pestisitlerin yapımında, deterjan ve deri sanayinde, çevre yönetiminde, kozmetik ve parfüm sanayinde uygulama alanları bulmaktadır. Deterjanlarda kullanımı yağ kaynaklı lekelerin kolayca çıkarılması amacıyla, dericilikte yalnızca derinin yüzeyindeki değil, içindeki yağları da temizleyerek, deriyi tabaklama ve boyama gibi işlemler için kullanılmaktadır. Ekmek sanayinde kullanımında hamurun işlenebilirliğinde kolaylık, hamur stabilitesinde artış, ekmek içi yumuşaklık, ekmek hacminde artış sağlar (Kıran ve ark., 2009).

### 1.2.2. Sodyum alginat

Alginatlar kahverengi deniz yosunları tarafından üretilen dallanmamış, lineer yapıda olan karbohidrat polimerleridir. D-Mannuronik asidin (M)  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) bağlı oligomerleri ile L-guluronik asidin (G)  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) oligomer bloklarının birleşmesi ile oluşmuştur (Won ve ark., 2005). Şekil 1.4’de Na-Alg’ın kimyasal yapısı gösterilmiştir.

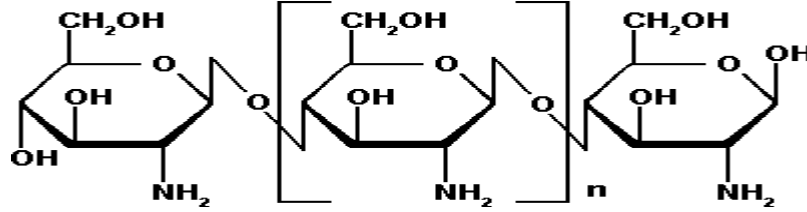


Şekil 1.4. Na-Alg’ın kimyasal yapısı (Anonim, 2009)

Sodyum alginatın suda çözünmesi ve su tutma kapasitesi yüksektir. Jelleşme hızı yüksektir ve istenildiğinde bazı uygulamalarla jelleşme hızı düşürülebilir. Sodyum alginat ısıya dayanıklı ve geriye dönüştürülemeyen özellikte jel oluşturur. Kullanım alanları eczacılık, dişçilik, tekstil endüstrisi, kağıt üretimi, yapııştırıcı üretimi olarak örneklendirilebilir (Anonim, 2009).

### 1.2.3. Kitosan

Kitosan, poli-N-asetilglukozamin esaslı kitinin deasetilasyonu ile elde edilen ve monomeri D-glukozamin olan doğal selülozik bir karbohidrat polimeridir. Şekil 1.5.'de kitosanın kimyasal yapısı görülmektedir.



Şekil 1.5. Kitosanın kimyasal yapısı (Anonymous, 2009)

Yengeç, karides, ıstakoz gibi eklem bacaklıların kabuklarında, bazı bakteri ve mantarların hücre duvarlarında bulunur. Toksik olmaması ve biyoaktif özelliklerinin de bulunmasından dolayı kitosan, ilaç sanayi ve medikal uygulamalarda da sıkça kullanılmaktadır. Kitosanın günümüzdeki en yaygın kullanımı, sindirim sistemindeki yağları tutarak bloke etmesi sebebiyle zayıflama haplarındadır (Anonim, 2009).

### 1.3. AROMALAR

Aromalar endüstriyel alanda oldukça geniş kullanıma sahip olan koku ve tat veren maddelerdir. 400'e yakın yapay ve 1800 doğala özdeş aroma bulunmaktadır. Aromaların önemli bir sınıfını esterler oluşturmaktadır. Esterler, çok farklı özellikleri olan kimyasal maddelerdir ve endüstride çok sayıda kullanım alanına sahiptirler: Yüzey aktif madde olarak; koku, aroma verici olarak, parfüm, kozmetik ve gıda endüstrisinde, eczacılıkta, süt endüstrisinde, pasta ve şekerleme üretiminde kullanılmaktadırlar. Meyve ve çiçeklere koku ve tat veren bileşiklerin çoğu ester yapısında olan bileşiklerdir ve doğal kaynaklarından izole edilmeleri oldukça pahalı ve zahmetli işlemlerdir. Bu maddelerin gıda ve kozmetik endüstrisinde yıllık tüketimlerinin tonlarla ifade edildiği düşünülürse aroma ve tat veren esterlerin doğal kaynaklarından izolasyonu yerine sentez yolu ile elde edilmeleri daha ekonomiktir (Bezbradica ve ark., 2007). Bu değerli esterlerin endüstriyel kullanımının daha ekonomik olması için kimyasal sentez yoluna gidilmiş, ancak bu yöntemlerde yüksek sıcaklık ve katalizör kullanımının gerekliliği yüzünden hem yan reaksiyonlar meydana geldiği hem de sentezlenen esterlerde yapı

bozulmaları ve kalitede düşmeler gözlenmiştir. Bu nedenle istenmeyen bu durumların engellenmesi amacıyla enzimatik yollarla üretim yapılmaya başlanmıştır. Lipaz enzimi ile susuz ortamda karboksilik asit ve alkollerden aromatik ester sentezinin yapıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Yahya ve ark., 1998; Bezbradica ve ark., 2007; Kara-Chaabouni ve ark., 2006; Lee ve ark., 1998; Salah ve ark., 2007; Othman ve ark., 2008; Lu ve ark., 2008).

Bu çalışmada öncelikle *Candida rugosa* ve domuz pankreası olmak üzere 2 farklı kaynaktan izole edilmiş olan ve ticari olarak satılan lipaz örneklerinin immobilize edilmesi ve elde edilen immobilize lipaz örnekleri ile endüstriyel öneme sahip 2 aroma esteri olan izo-amil asetat (IAAc) ve hekzil asetat (HAc)'in sentezi amaçlanmıştır. Enzimler kalsiyum-alginat/kitosan jele hapsedme ve arakol bağlanarak modifiye edilmiş kitosan desteğe kovalent bağlama olmak üzere 2 farklı yöntemle immobilize edilecektir. Ayrıca immobilizasyon koşulları optimize edilecek ve sıcaklık, substrat derişimi, reaksiyon süresi gibi çalışma koşullarının ester üretimine etkileri belirlenerek immobilize enzimlerin depolama ve termal kararlılıkları belirlenmiştir.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

**Ozyılmaz ve Gezer (2009)**, *Candida rugosa* ve domuz pankreası lipazlarını Ca-Alg jele hapsetme yöntemiyle immobilize ederek izoamil asetat (muz kokusu), etil valerat (elma kokusu), bütül asetat (ananas kokusu) sentezinde kullanmışlardır. Çalışmada immobilizasyon koşullarını Na-Alg, CaCl<sub>2</sub>, enzim derişimi açısından optimize etmişlerdir. Ester sentezini çözücüsüz ve hekzan ortamında gerçekleştirdiklerinde, her 3 ester sentezinin hekzan ortamında daha yüksek verimlilik gösterdiğini belirlemişlerdir. İmmobilize enzim miktarı, sıcaklık, substrat derişimi, reaksiyon süresi gibi çalışma koşullarının ester üretimine etkisini araştırmışlardır.

**Lu ve ark. (2008)**, gliserol triolatın oleik asit metil esterine immobilize *Candida sp.* 99-125 lipaz katalizliğindeki transesterifikasyonunu dimetilsülfoksit, asetonitril, aseton, tetrahidrofuran, *t*-bütanol, diklorometan, benzen, kloroform, toluen, karbontetraklorür, sikloheksan, *n*-hekzan ortamlarında gerçekleştirmişlerdir. Bu reaksiyon koşullarından en fazla verimi karbontetraklorür ortamında elde etmişlerdir.

**Bezbradica ve ark. (2007)**, serbest haldeki porcine pancreatic lipazını çözücüsüz ve izooktan ortamında *n*-bütanoik asidin ve *n*-oktanoik asidin *n*-pentanol, *n*-heptanol ve geranoil alkolleriyle oluşturdukları esterlerin sentezinde katalizör olarak kullanmışlardır. Zamana bağlı olarak gerçekleştirdikleri reaksiyonlarda *n*-bütanoik asidin üç esterinin de izooktan ortamında, *n*-oktanoik asidin esterlerinden ise oktil oktanoat ile heptil oktanoatın çözücüsüz ortamda, propil oktanoatın ise izooktan ortamında daha çok sentezlendiğini belirtmişlerdir. Bütanoik asidin oktanoik aside göre daha yüksek polariteye sahip olmasıyla sonuçların makul karşılandığını belirtmişlerdir.

**Salah ve ark. (2007)**, *Rhizopus oryzae* kaynaklı lipaz enzimini bütanol ve asetik asit arasındaki esterifikasyon reaksiyonuyla bütül asetat esteri (ananas aroması) üretiminde kullanmışlardır. Lipazın bulunmadığı ortamda sadece substrat içeren sistemde % 3 bütül asetat elde etmişlerdir. Aynı koşullar altında immobilize lipaz katalizliğindeki ester üretim verimliliğini % 25 olarak bulmuşlardır. Optimum çalışma koşullarını 500 IU immobilize lipaz, 1:1 asetik asit:bütanol molar oranı olarak belirlemişlerdir. Çözücüsüz reaksiyon ortamında ester dönüşümünü % 60, heptan ve hekzan varlığında gerçekleştirdiklerinde ise sırasıyla % 80 ve % 76 olarak bulmuşlardır.

**Petkar ve ark. (2006)**, *Humicola lanuginosa*, *Candida antarctica* ve *Rhizomucor miehei* kaynaklı lipaz örneklerinin adsorpsiyonla immobilize edilmiş formlarını

*izooktan* ortamında bütül oleat sentezinde kullanmışlardır. Aktiviteyi titrimetrik yöntemle belirlemişlerdir. Ayrıca destek yüzeyine oktadesil bağlayarak desteğin hidrofobiklik özelliğini arttırmış ve lipaz örnekleri adsorbe edildiğinde esterifikasyon aktivitesinde artış olduğunu gözlemişlerdir.

**Wu ve ark. (2006)**, *Candida rugosa* lipazını önce glutaraldehit ile etkinleştirip daha sonra kalsiyum alginat içine hapsederek immobilize etmişlerdir. 2-propanol ortamında çapraz bağlanma süresince enzim aktivitesinde belirgin bir artış gözlemlemişlerdir. 2-propanol ortamında zeytin yağının hidrolizinde kullandıkları enzimin, 2-propanol içermeyen ortama göre daha yüksek aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

**Karra-Châabouni ve ark. (2006)**, *Staphylococcus simulans* kaynaklı lipazı  $\text{CaCO}_3$ , Celite 545, cam boncuk ve karboksimetil sefadeks desteklere adsorpsiyon yöntemiyle immobilize etmişlerdir. İmmobilize formdaki enzimleri yeşil elma (etil valerat) ve armut (hekzil asetat) aroması üretiminde kullanmışlardır. Farklı reaksiyon koşulları için zamana bağlı olarak esterleşme reaksiyonunu izlemişlerdir. 1:1 asit:alkol molar oranında, 37 °C'de % 20 su içeren reaksiyon karışımında etil valerat dönüşümünü % 51 olarak bulmuşlardır. 1:1 asit:alkol molar oranında 37 °C'de % 10 su içeren reaksiyon karışımında hekzil asetat dönüşümünü % 41 olarak bulmuşlardır.

**Park ve ark. (2006)**, *Alcaligenes* kaynaklı lipazı farklı büyüklükteki silika jel destek yüzeyine adsorbe etmişler ve daha sonra yağ ve metanolü substrat olarak kullanarak transesterifikasyon yöntemiyle yağ asidi metil esteri sentezlemişlerdir. Bu çalışmayı yine *n*-hekzan ortamında gerçekleştirmişlerdir.

**Matto ve Husain (2006)**, pektin ve sodyum alginatın sulu çözeltisiyle peroksidaz enzimini karıştırarak bir şırınga yardımıyla  $\text{CaCl}_2$  çözeltisine damlatmışlar, oluşan karışımı 2 saat boyunca karıştırıcıda yavaşça karıştırmışlardır. Daha sonra kalsiyum alginat-pektin jelleri 4 °C'deki 0,1 M pH 5,6 asetat tamponu ile yıkayıp karakterizasyonunu belirlemişlerdir.

**Yu ve ark. (2005)**, *Candida rugosa* kaynaklı lipazı farklı tuz ortamlarında liyoflize ederek laurik asit ve 1-propanolün *izooktan* ortamındaki esterleşme reaksiyonunda kullanmışlardır.

**Bayramoğlu ve ark. (2005)**, *Candida rugosa* kaynaklı lipazı poli(GMA-HEMA-EGDMA) desteğe direkt ve 1,6-diaminohekzan arakolu üzerinden kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Ancak elde ettikleri immobilize enzimleri ve serbest lipazı

sadece zeytin yağı hidrolizinde kullanmışlar, esterifikasyon reaksiyonlarında kullanmamışlardır.

**Kumar ve ark. (2005)**, 3 farklı ticari lipaz örneğini süperkritik karbondioksit varlığında uzun zincirli yağ asitlerinin *izoamil* alkol ile esterleşme reaksiyonunda kullanarak aroma verici bileşikler elde etmişlerdir.

**Won ve ark. (2005)**, *Candida rugosa* kaynaklı lipazı kalsiyum alginat jele hapsetme yöntemiyle immobilize ederek *p*-nitrofenil bütiratın hidrolizinde kullanmışlar ancak esterifikasyon aktivitesini araştırmamışlardır.

**Dave ve Madamwar (2005)**, polivinilalkol (PVA), alginat, borik asit ve % 2 CaCl<sub>2</sub> içeren bir polimer karışıma *Candida rugosa* lipazını immobilize etmişlerdir. PVA'ün jelin güçlenmesine katkı sağladığını bunun yanı sıra kalsiyum alginatın jelin dış görünüş özelliklerini geliştirdiğini gözlemlemişlerdir. İzooktan içinde etil hekzanoatın sentezi için immobilize edilen enzimin performansını değerlendirmişlerdir. Neticede yüksek esterifikasyon yeteneğini olan, 10 aylık raf ömrüne sahip jeller elde etmişlerdir.

**Bai ve Zhou (2004)**, domuz pankreası lipazını silika jel ve polisüksinimid üzerindeki amin grupları üzerinden immobilize etmişlerdir. Enzim aktivitesinin belirlenmesinde yağ asitlerinin hidrolizinden yararlanmışlardır. İmmobilizasyon çözeltisinin tekrar kullanımı, reaksiyon ortamının sıcaklığı, pH derecesi ve immobilize lipazın depolama kararlılığını araştırmışlardır.

**Hung ve ark. (2003)**, lipaz enzimini ikili immobilizasyon tekniği ile kitosan üzerindeki amino ve hidroksil grupları üzerinden immobilize etmişlerdir. Lipazı ilk olarak kitosan taneciklerine üzerindeki hidroksil gruplarının karbondiimidle aktivasyonu, hemen ardından glutaraldehit ile amino gruplarına çapraz bağlamayla daha fazla lipaz bağlayarak immobilize etmişlerdir. Optimum çalışma koşulları altında ikili immobilizasyon tekniği kullanarak hazırlanmış immobilize lipazı kıyaslayarak bağlanan protein miktarını 287,2 µg/g-kitosan ve aktiviteyi 13,8 U/g-kitosan olarak gözlemlemişlerdir.

**Chiou ve Wu (2003)**, *Candida rugosa* lipazını kitosana karbondiimid üzerinden kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Lipaz aktivitesini belirlerken *p*-Nitrofenil palmitat substratını kullanarak spektrofotometrik olarak belirlemişlerdir. Kitosan taneciklerinin ıslak ve kuru formlarını kullanarak immobilize lipazın özelliklerini

incelemiş ve kıyaslamışlardır. İmmobilizasyon sayesinde pH ve sıcaklık değişimlerine karşı enzimin termal kararlılığının güçlendiğini belirtmişlerdir.

**Chiang ve ark. (2003)**, endüstriyel açıdan önemli bir ester olan cis-3-hekzen-1-il asetatın sentezinde, ticari olarak satılan immobilize lipaz (Lipozyme IM-77) enzimini kullanmışlardır. Çalışmada cis-3-hekzen-1-ol ve triasetinin transesterifikasyonu ile sentez yapılmış, asetik asidin direkt kullanımı ile esterifikasyon yöntemi denenmemiştir. Reaksiyon ortamında organik çözücü olarak ise sadece *n*-heptan kullanılmıştır.

**Güvenç ve ark. (2002)**, çözücüsüz bir sistemde immobilize *Rhizomucor miehei* ve *Candida antartica* lipazları kullanarak çözücüsüz bir sistemde izoamil asetat esterinin üretimini araştırmışlardır. Asit:alkol molar oranı, enzim türü ve miktarı, reaksiyon süresi, sıcaklığı gibi parametreler üzerinde çalışmışlardır. Ester üretiminde kullanılan *Candida antartica* lipazının *Rhizomucor miehei* lipazından 8,3 kat daha yüksek aktivite gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Literatürde ester üretiminde kullanılan enzim derişimlerinin aksine düşük enzim derişiminde yüksek ester konsantrasyonu elde etmişlerdir.

**Matsumoto ve Ohashi (2002)**, *Candida rugosa* lipazını, Ca-Alg jele, Ca-Alg'ın inorganik kapsüllerine immobilize ederek termal kararlılığını araştırmışlardır. Enzim içeren ve içermeyen Ca-Alg jellerini 60 °C'nin altında inkübe etmişler, diğer teknikle immobilize edilen enzim örneklerine göre daha yüksek kararlılık gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Bunu da lipaz ve alginat arasındaki kuvvetli affiniteye bağlamışlardır.

**Zaidi ve ark. (2002)**, *Candida rugosa* kaynaklı lipaz enzimini naylona glutaraldehit üzerinden kovalent olarak immobilize ederek bütül oleat, oleil bütirat ve oleil oleat üretiminde kullanmışlardır. Ancak sentezi sadece *n*-hekzan ortamında gerçekleştirmişlerdir.

**Stark ve Holmberg (1989)**, silika desteğe hidrofilik bir arakol olan polietilenglikol bağlamışlar ve sulu ortamda hidrolitik aktivitede arakolsuz duruma göre büyük bir artış olduğunu, *n*-hekzan ortamında transesterifikasyon reaksiyonunda ise pek bir değişiklik olmadığını rapor etmişlerdir. Ayrıca organik çözücülerde esterifikasyon aktivitesi için desteğin hidrofobik karakterinin artırılmasının daha uygun olabileceğini önermişlerdir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

**Kimyasallar:**Çalışmada kullanılan *Candida rugosa* (1170 U/mg prot.) ve domuz pankreası (329 U/mg prot.) kaynaklı lipaz enzimleri, sodyum alginat ve glutaraldehit kimyasalları Sigma'dan, kitosan, 1,3 diaminopropan, 1,4 diamino bütan, 1,5 diamino pentan, 1,6 diamino hekzan, kalsiyum klorür Aldrich firmasından, hekzan, heptan, etil alkol, asetik asit, sodyum hidroksit maddeleri Riedel-de-Haen'den, izoamil alkol, heksil alkol, kloroform, ksilen, toluen, aseton, hidroklorik asit, fosforik asit ve bromokresol indikatörü Merck firmasından tedarik edilmiş olup hepsi en yüksek saflık derecesindedir.

#### Araç ve gereçler:

Cihazlar	Marka
UV-Vis spektrofotometre	Shimadzu UV-1208
GC-MS	Hewlet Packard HP 6890 Series GC System
Vakum pompası	Nüve N022AN.18
Peristaltik pompa	Ismatec
Etüv	Nüve FN400
pH metre	İnolab wtw series
Termostatlı çalkalayıcı	Heidolph Inkubator 1000
Analitik terazi	Sartorius BL210S
Girdap karıştırıcı	Nüve NM110
Magnetik karıştırıcılı ısıtıcı	Heidolph MR3001

Bunların dışında kullanılan malzemeler; otomotik pipet, fraksiyonlu destilasyon düzeneği, ayırma hunisi, vida kapaklı cam şişe, erlen, balon, balon joje, mezür, büret.

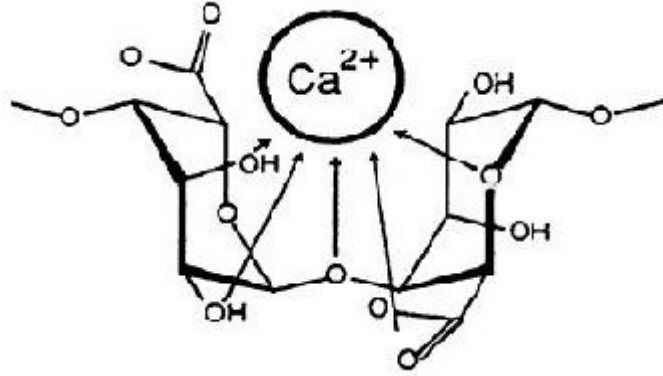


## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. İmmobilize Lipaz Örneklerinin Hazırlanması ve İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

#### 3.2.1.1. Lipazın Ca-Alg/Kitosan Jele Hapsetme Yöntemiyle İmmobilizasyonu

Alginat jeli  $Ca^{+2}$  iyonları varlığında Şekil 3.1.'de görüldüğü gibi çapraz bağlanmalar yaparak jelleşir. Na-Alg ve kitosan içeren çözelti küt uçlu şırınga ile  $CaCl_2$  ve GAL karışımı olan çözeltiliye damlatıldığında  $Ca^{+2}$  iyonları ile alginat arasında ve kitosan ile glutaraldehit arasında çapraz bağlanmalar oluşur.



Şekil 3.1. Ca-Alg molekülünün kimyasal yapısı (Anonim, 2009)

Na-Alg/Kitosan karışımına lipaz enzimi homojen bir şekilde karıştırılıp GAL içeren  $CaCl_2$  çözeltisine damlatıldığında enzim çapraz bağlanmalarla meydana gelen gözenekler içine hapsolarak immobilize edilmiş olur.

#### 3.2.1.2. Lipazın Ca-Alg/Kitosan Jele İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Çalışmada Na-Alg ve kitosan çözeltisinin 100 ml'si GAL içeren 4 °C'deki  $CaCl_2$  çözeltisinin 200 ml'sine küt uçlu bir şırınga yardımı ile damlatıldıktan hemen sonra jel oluşumu sağlanmıştır. Jellerin sertleşmesi için 4 °C'de 2 saat bekletilmiş ve jeller süzülerek ayrılmıştır. Jeller hem enzim içeren hem de enzim içermeyen Na-Alg/Kitosan karışımı kullanılarak elde edilmiş, böylece Ca-Alg/Kitosan jellerinin lipaz içeren ve içermeyen formları oluşturulmuştur. Her çalışmada elde edilen süzüntü hacmi ölçülmüş ve protein derişimi 280 nm'de ölçülerek standart lipaz grafiklerine göre belirlenmiştir. Enzim içeren ve içermeyen bu jeller oda sıcaklığında atmosfere açık olacak şekilde, başlangıç ağırlığının 1/6'sına ulaşınca kadar kurutulmuştur. Elde edilen jellerin 1 gramı başına hapsedilen lipaz miktarı (mg/g jel) eşitlik 3.1.'e göre hesaplanmıştır.

$$C_E = \frac{C_m V_m - C_0 V_0}{m_E} \dots\dots\dots(3.1.)$$

Burada;

$C_E$  : gram destek başına bağlanan enzim miktarı (mg/g destek)

$C_0$  : immobilizasyonda kullanılan lipaz çözeltisindeki protein derişimi (mg/ml)

$V_0$  : immobilizasyonda kullanılan lipaz çözeltisinin hacmi (ml)

$C_m$  : immobilizasyondan sonra elde edilen süzütünün protein derişimi (mg/ml)

$V_m$  : immobilizasyondan sonra elde edilen süzütünün hacmi (ml)

$m_E$  : immobilizasyondan sonra elde edilen jel miktarı (g)

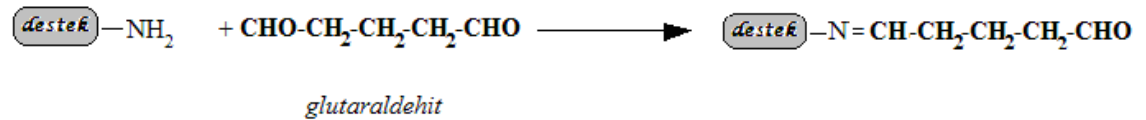
Çalışmada  $C_0$  ve  $V_0$  zaten bilinmektedir ve  $V_m$  ise mezür kullanılarak ölçülmüştür.  $C_m$  değerlerini belirlemek için enzimsiz ve enzimli ortam için yapılan jelleşme sonucunda elde edilen süzüntülerin 280 nm’de çizilen standart grafikleri kullanılmıştır

Çalışmada  $CaCl_2$  derişimi 2 M ve lipaz derişimi 3 mg/ml olarak seçilmiştir (Ozyılmaz ve Gezer, 2009). Ancak jelleşmenin temel bileşenlerinden olan Na-Alg derişimi % 1-2,5 (w/v) aralığında, kitosan derişimi % 0,5-2 (w/v) aralığında ve GAL derişimi % 0,05-0,25 (v/v) aralığında optimize edilmiştir.

Ca-Alg/Kitosan jellerinin kuruma oranının ester üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, optimum koşullarda elde edilen jellerin eşit miktarları farklı sürelerde kurutulmuştur. Ağırlıkları başlangıçta aynı, ancak kurutma sonunda farklı olan immobilize enzimler (% 100, % 80, % 40, % 27 ve % 16,7) kullanılarak IAAC ve HAc üretimi gerçekleştirilmiş, en uygun kuruma oranı seçilmiştir.

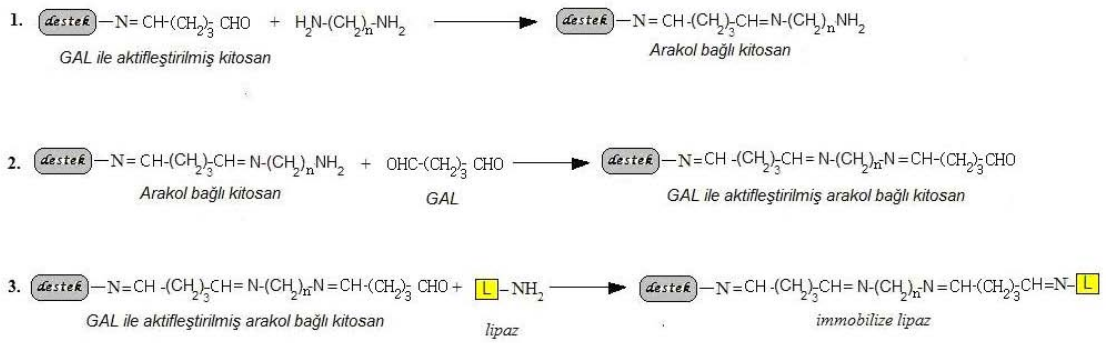
### 3.2.1.3. Lipazın Kitosan Desteğe İmmobilizasyonu

Bünyesinde  $-NH_2$  grupları bulunan kitosana lipaz enzimi direkt bağlanamayacağından öncelikle bir dialdehit olan GAL ile etkinleştirilir (Şekil 3.2.).



**Şekil 3.2.** Kitosan’ın GAL ile aktifleştirilip immobilizasyona hazırlanması

Elde edilen destek direkt lipaz immobilizasyonunda kullanıldığı gibi diamino alkan türevleri ile etkinleştirilerek ara kol bağlanması amacıyla da kullanılmıştır. 1,3 diamino propan, 1,4, diamino bütan, 1,5 diamino pentan ve 1,6 diamino hekzan ara kolları eklendikten sonra destekler tekrar GAL ile etkinleştirilerek immobilizasyona hazır hale getirilmişlerdir (Şekil 3.3.).



**Şekil 3.3.** Kitosanın immobilizasyona hazırlanması

Kitosan desteğin önce GAL ile aktifleştirilmesinde amin grubu ile aldehit grubu arasında bir imin bağı (Schiff bazı) oluşmaktadır. 1. aşamada ortama diamino alkan eklendiğinde destek yüzeyindeki aldehit grubuyla diamino alkanın amino grubu arasında yeni bir bağ oluşmaktadır. Lipaz enziminin desteğe bağlanması için destek yüzeyinde serbest bir aldehit ucu gerekmektedir. Bu nedenle diamino alkan grubu ile etkinleştirilen destek 2. aşamadaki gibi tekrar GAL ile muamele edilerek yüzeyde yeni bir serbest aldehit ucu oluşturulmuştur. 3. aşamada lipaz enzimi üzerinde bulunan lizin amino asidi artığındaki amino grubu ile destek yüzeyinde bulunan serbest aldehit grubu arasında yine bir imin bağı oluşturarak desteğe kovalent olarak bağlanmıştır. Böylece CRL ve PPL'nin immobilize edileceği biri ara kolsuz olmak üzere 5 immobilize lipaz örneği elde edilmiştir.

#### 3.2.1.4. Kitosan Desteğe İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Kitosan desteğin immobilizasyona hazırlanmasında öncelikle GAL ile aktifleştirme işlemi yapılmıştır. Bunun için başlangıçta 1 g kitosan 25 ml % 0,5 (v/v) GAL ile 2 saat etkinleştirilerek aktifleştirilmiştir. Kuruyan destek daha sonra 0,1 M derişimli diamino alkan grubuyla 5 saat 40 °C'deki su banyosunda etkinleştirilmiştir. Bu işlemin ardından bolca saf su ile yıkanıp kurumaya bırakılan destek, enzim

bağlanmadan önce tekrardan GAL ile aktifleştirilerek immobilizasyona hazır hale getirilmiştir. Desteğin 1 g'ı için 1mg/ml derişimli 20 ml lipaz çözeltisi ile immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Ester sentezi hem immobilize lipaz örnekleriyle hem de enzim içermeyen kitosan destek üzerinden yapılmıştır. Desteğe bağlanan lipaz miktarının belirlenmesinde Lowry yönteminden yararlanılmış, hesaplamalar eşitlik 3.1.'deki gibi yapılmıştır.

### 3.2.2. İmmobilize CRL ve PPL ile Aromatik Ester Sentezi

Çalışmada Ca-Alg/Kitosan jele ve kitosan desteğe immobilize edilmiş olan CRL ve PPL ile iki farklı aroma esterinin sentezi incelenmiştir. Kullanılan substratların tümü oda sıcaklığında ve sıvı haldedir. Ester sentezi vida kapaklı cam şişelerde termostatlı çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir. Heptan içinde hazırlanmış olan 25 mM alkol ve 25 mM asit çözeltisinin 10 ml'si 0,1 g Ca-Alg/Kitosan jel (veya 0,01 g kitosan) ile 60 dk boyunca 40 °C sabit sıcaklıkta etkinleştirilmiştir. Reaksiyon sonunda immobilize enzimden ayrılan heptan fazı 2 defa 10'ar ml 25 mM NaOH ile sonra da 2 defa 10'ar ml su ile ekstrakte edilerek su fazına alınan ekstrakt fazları toplanmıştır. Çalışmada esterleşme reaksiyonuna katılmayan asit böylece aşırı NaOH ile nötrleştirilmiştir. Daha sonra NaOH'in aşırısı yaklaşık 25 mM (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> primer standardına karşı ayarlanmış) HCl çözeltisi ile bromokresol indikatörü varlığında geri titre edilmiştir. Bu çalışmalar sadece CRL ve PPL içeren Ca-Alg/Kitosan jel (veya kitosan destek) değil aynı zamanda enzim içermeyen jel (veya kitosan destek) kullanılarak da 3 defa tekrarlanarak yapılmıştır. Kullanılan destek miktarı ve saat başına elde edilen µmol ester miktarları eşitlik 3.2.'ye göre hesaplanmıştır:

$$M_{ester} (\mu mol ester / g \cdot saat) = \frac{V_0 - V_E}{m_E} \times C_{HCl} \times \frac{1}{t} \dots\dots\dots(3.2.)$$

Burada;

V<sub>0</sub>: Enzimsiz destek içeren ortam için harcanan HCl hacmi (ml)

V<sub>E</sub>: Enzimli (CRL veya PPL) destek içeren ortam için harcanan HCl hacmi (ml)

m<sub>E</sub>: Kullanılan destek miktarı (g)

C<sub>HCl</sub>: HCl çözeltisinin derişimi (mM)

t: Reaksiyon süresi (sa)

### 3.2.2.1. İmmobilize CRL ve PPL ile Sentezlenecek Aromatik Esterlerin Seçimi

Esterlerin seçiminde literatürde belirtilen kokularının yanı sıra duyuşal olarak verdikleri kokularda incelenmiştir. Literatürde belirtilen, farklı alkol ve asitler kullanılarak elde edilen esterlerin kokuları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Alkol-asit bileşimlerinin oluşturduğu esterler (Anonim, 2009)

Alkol	Asit	Ester Adı	Verdiği Koku
i-amil alkol	Asetik asit	i-amil asetat	Muz Kokusu
Etil alkol	Formik asit	Etil format	Çilek Kokusu
Pentil alkol	Bütirik asit	Pentil bütirat	Kayısı Kokusu
Benzil alkol	Asetik asit	Benzil asetat	Yasemin Kokusu
n-hekzil alkol	Asetik asit	Hekzil asetat	Armut Kokusu
Bütil alkol	Bütirik asit	Bütil bütirat	Ananas Kokusu
Etil alkol	Heptanoik asit	Etil heptanoat	Ahududu Kokusu
Metil alkol	Anthranilik asit	Metil anthranilat	Yasemin Kokusu
Etil alkol	Valerik asit	Etil valerat	Yeşil elma Kokusu
cis-3-hekzen-1-ol	Asetik asit	cis-3-hekzen-1-il asetat	Çimen Kokusu
İzopropil alkol	Asetik asit	İzopropil asetat	Karışık meyve Kokusu
Metil alkol	Benzoik asit	Metil benzoat	Ylang ylang Kokusu
Amil alkol	Valerik asit	Amil valerat	Elma Kokusu
Bütil alkol	Asetik asit	Bütil asetat	Ananas Kokusu
Metil alkol	Bütirik asit	Metil bütirat	Çilek Kokusu

Çizelge 3.1.'de belirtilen alkol ve asitler lipaz enzimi ile 5 saat boyunca etkileştirilmiş ve ester kokularının literatür verileri ile uygunluğu duyuşal olarak belirlenmeye çalışılmıştır. Denenen esterler içinde en uygun olan 2 tanesi tez kapsamına alınmıştır.

### **3.2.2.2. İmmobilize CRL ve PPL ile Sentezlenen Aromatik Esterlerin GC-MS Analizlerinin Yapılması**

İmmobilize CRL ve PPL ile ester üretildiği duyusal olarak kokularından anlaşılmıştır. Ancak yine de GC-MS analizi yapılarak esterlerin üretildiği ispatlanmaya çalışılmıştır. Bunun için *Hewlet Packard HP 6890 Series GC System* marka GC-MS cihazı ve Innowax kolonu kullanılmıştır. Çalışma 150°C izotermal koşullarda MSD dedektörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.3. Ester Üretimine Reaksiyon Ortamındaki Çözücü Etkisi**

Çalışmada aroma esterlerini sentezlerken farklı organik çözücü ortamları denenmiştir. Hekzan, heptan, kloroform, ksilen, toluen ve çözücsüz ortamlarda esterler sentezlenerek çözücü ortamının ester üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır.

### **3.2.4. Ester Üretimine Sıcaklığın Etkisi**

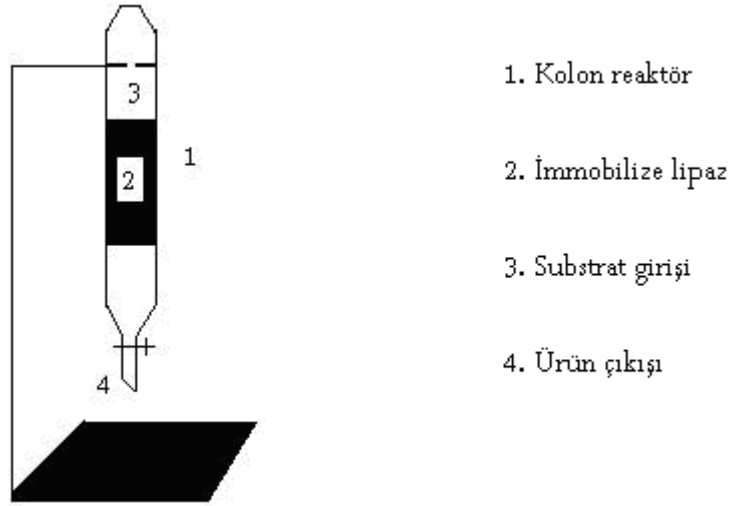
Bu çalışmada ester üretimi 30-60 °C aralığındaki 6 farklı sıcaklıkta gerçekleştirilerek en yüksek etkinliğin gözlemlendiği sıcaklıklar belirlenmiştir.

### **3.2.5. Ester Üretimine Substrat Değişimlerinin Etkisi**

Ester sentezinde asit ve alkol olmak üzere iki substrat kullanılmaktadır. Çalışmada 10-100 mM arasında alkol değişimleri değiştirilerek her bir değişim noktası için 10-100 mM aralığındaki asit değişimleri denenmiştir. Böylece en yüksek ester üretiminin gerçekleştiği alkol ve asit molar oranı belirlenmiştir.

### **3.2.6. İmmobilize Edilmiş CRL ve PPL Örneklerinin Kesikli ve Sürekli Dolgu Yataklı Kolon Reaktörlerde Kullanımının Araştırılması**

Bu çalışmada kesikli ve sürekli reaktörlerde 8 saat süresince daha önce belirlenmiş çözücü ortamında ester üretim etkinliği araştırılmıştır. Asit ve alkolün optimum molar oranında hazırlanmış 50 ml substrat karışımı başına 1 gram Ca-Alg/Kitosan jeli veya 0,05 gram kitosan destek kullanılmıştır. Çalışmalarda kesikli reaktör olarak vida kapaklı, geniş ağızlı cam şişeler kullanılmış ve substrat ile enzimin etkileşebilmesi amacıyla reaksiyon 8 saat süresince orbital çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir. Aynı koşullarda kullanılan dolgu yataklı kolon reaktör şeması Şekil 3.4.'deki gibidir.



**Şekil 3.4.** Ester üretiminin gerçekleştiği sürekli dolgu yataklı kolon reaktör şeması

### 3.2.7. İmmobilize Lipaz Enzimlerinin Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi

İki farklı desteğe immobilize edilen lipaz örneklerinin 40 °C deki termal kararlılıkları 24 saat boyunca araştırılmıştır. Farklı zaman aralıklarında alınan lipaz örnekleri ile IAAC sentezinin miktarına göre enzimin etkinliği gözlenmiştir.

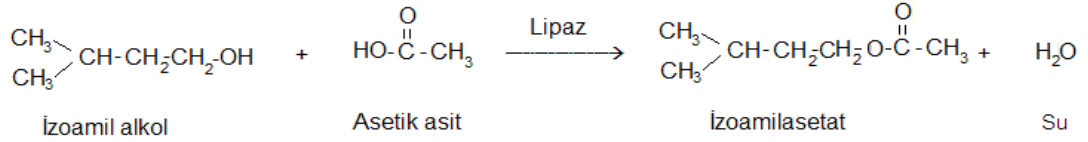
### 3.2.8. Lipaz Örneklerinin İmmobilize Formda Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi

Ca-Alg/Kitosan jelle ve kitosana immobilize edilen enzimlerin 60 gün boyunca 4 °C'de bekletilerek belirli periyotlarda ester üretim etkinliği IAAC için belirlenmiştir.

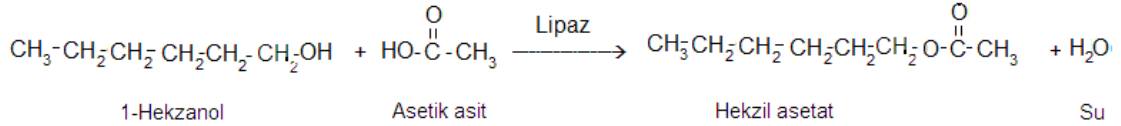
## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1. Ester Seçimi

Denenen esterler içerisinde izoamil asetat (IAAc) ve hekzil asetat (HAc) aromatik özelliği olan ve literatürle örtüşen 2 ester olarak seçilmiştir. Bu aromaların alkol asit substratlarından üretim reaksiyonları Şekil 4.1. ve 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. IAAc'ın kimyasal oluşum reaksiyonu

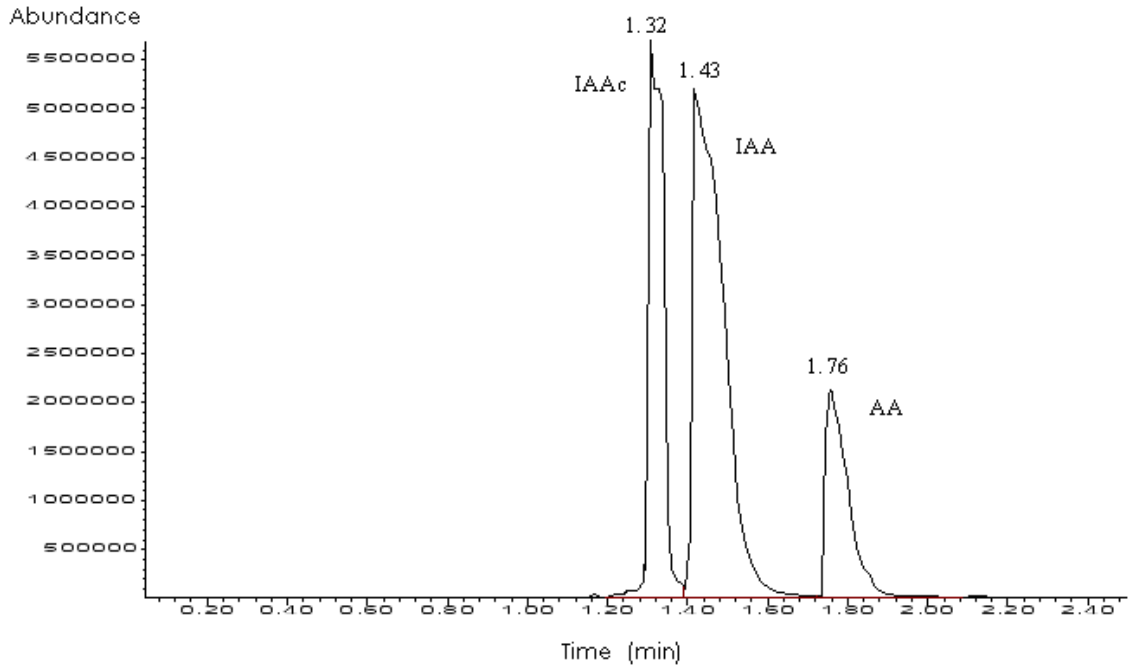


Şekil 4.2. HAc'ın kimyasal oluşum reaksiyonu

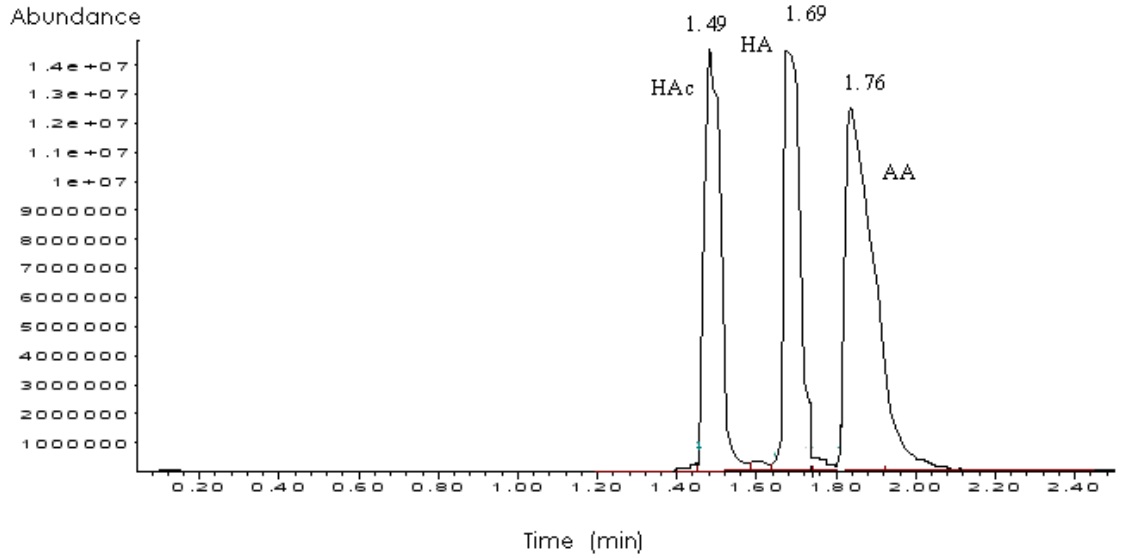
### 4.2. GC-MS Analiz Sonuçları

IAAc ve HAc aroma esterlerinin sentezi, hekzan içinde hazırlanmış 50'şer mM alkol ve asit substratının lipaz ile 2 saat etkinleştirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımının GC-MS analizi yapıldığında IAAc ve HAc için sırasıyla Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.'deki kromotogramlar elde edilmiştir.





**Şekil 4.3.** IAAc üretiminde reaksiyon karışımının GC-MS kromatogramı



**Şekil 4.4.** HAc üretiminde reaksiyon karışımının GC-MS kromatogramı

Kromatogramlarda hegzana ait pikler cihaz tarafından otomatik olarak çıkarılmıştır. Elde edilen kromatogramlarda alkol ve asit substratları ile beraber esterlere ait pikler de görülmektedir. Böylece aroma esterlerinin sentezlendiği sadece duyuşal olarak değil GC-MS analizleri ile de doğrulanmıştır.

### 4.3. İmmobilize Enzimlerin Farklı Çözücü Ortamlarındaki Ester Üretim Etkinliklerinin Belirlenmesi

Tüm immobilize lipaz örnekleri çözücüsüz ortam, hekzan, heptan, kloroform, toluen, ksilen ortamlarında ester sentezlenmek amacıyla kullanılmış ve en iyi reaksiyon ortamı belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma 2 aroma esteri ve 2 farklı lipaz enzimi için gerçekleştirilmiş olup Ca-Alg/Kitosan jeli için elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1.'de özetlenmiştir.

**Çizelge 4.1.** Ca-Alg/Kitosan jeli ile farklı çözücü ortamlarında ester üretimi

Reaksiyon ortamı	HAc		IAAc	
	$\mu\text{mol /g (Ca-Alg/ Kit) dk}$		$\mu\text{mol /g (Ca-Alg/Kit) dk}$	
	CRL	PPL	CRL	PPL
Çözücüsüz	2,70±0,56	2,58±1,13	2,81±0,34	2,40±0
Hekzan	7,90±0,35	7,40±0,51	6,04±0,51	5,81±0
Heptan	<b>10,70±0,34</b>	<b>9,60±0,48</b>	<b>12,80±0,52</b>	<b>9,40±0,46</b>
Kloroform	3,60±0,40	2,70±0,51	3,52±0,51	3,10±0,85
Toluen	5,30±1,19	6,10±0,85	10,11±0,68	8,04±0,86
Ksilen	4,10±0,68	2,90±0,52	7,08±0,56	7,40±1,36

Çizelge 4.1. incelendiğinde ester üretiminin en fazla heptan ortamında gerçekleştiği gözlenmiştir. En düşük ester üretimi ise çözücüsüz ortamda gerçekleşmiştir. Kitosan desteğine immobilize edilmiş iki lipaz örneği için farklı organik çözücü ortamlarında ester üretim verimlilikleri ise Çizelge 4.2.'de verilmektedir.

**Çizelge 4.2.** Kitosan destek kullanılarak farklı çözücü ortamlarında ester üretimi

Reaksiyon ortamı	HAc		IAAc	
	$\mu\text{mol /g kitosan dk}$		$\mu\text{mol /g kitosan dk}$	
	CRL	PPL	CRL	PPL
Çözücüsüz	10,20±0,52	10,50±0,56	10,71±0,65	10,10±0,58
Hekzan	27,50±0,19	29,21±0	32,10±0,86	29,22±0,34
Heptan	<b>36,30±0,34</b>	<b>36,30±0,58</b>	<b>44,63±0,39</b>	<b>40,43±0,20</b>
Kloroform	31,30±0,85	30,40±0,69	21,74±0,51	23,80±0,61
Toluen	26,30±0,68	27,52±0,78	19,20±1,37	13,85±0,34
Ksilen	23,80±0,40	18,81±0,51	9,60±0,57	10,40±0,17

Kitosan desteğe immobilize edilmiş CRL ve PPL ile en iyi ester üretimi Ca-Alg/Kitosan jelde olduğu gibi heptan ortamında gerçekleşmiştir. Tüm veriler göz önünde bulundurulduğunda her iki destek ve enzim türü için de genel olarak en çok ester üretimi, organik çözücüler içinde polaritesi düşük olan heptan ve hekzan ortamında gerçekleşirken en düşük ester üretimi ise Ca-Alg/Kitosan örnekleri için kloroformda, kitosan için ise ksilende gerçekleşmiştir. Ancak çözücüsüz ortamda her çalışma koşulu için oldukça düşük oranda ester sentezlendiği gözlenmektedir.

Literatürde benzer çalışmalar yapıldığında organik çözücü ortamında çözücü içermeyen ortama göre daha yüksek verimlilik gözlenmiştir. Been-Salah ve ark. (2007) hekzan, heptan, kloroform ve *t*-butanol içeren reaksiyon ortamında lipaz katalizliğinde bütül asetat sentezlemişlerdir. Bu organik çözücü ortamlarından bütül asetatın en çok hekzan ve heptan ortamında üretildiğini kaydetmişlerdir. Bezbradraa ve ark. (2007) çözücüsüz ve *izooktan* ortamlarında bütirik asidin farklı esterlerini zamana bağlı olarak sentezlemişlerdir ve 72 saat sonunda çözücüsüz ortamdaki ester verimliliğini % 20 *izooktan* ortamındaki ise % 90 olarak elde etmişlerdir. Kara-Chaabouni ve ark. (2006), etil valerat ve hekzil asetat esterlerini immobilize lipaz katalizliğinde *n*-hekzan, *n*-heptan ve çözücüsüz ortamda sentezlemişler en fazla verimi her iki ester için de *n*-heptan ortamında elde ettiklerini belirtmişlerdir.

#### 4.4. Ca-Alg/Kitosan Jele İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

İmmobilizasyonun bazı aşamalarında önceki çalışmalarımızda elde edilen verilerden yararlanılmıştır. İmmobilizasyonda kullanılan CRL ve PPL enzimlerinin derişimleri 3mg/ml, CaCl<sub>2</sub> derişimi ise 2 M olarak seçilmiştir (Ozyilmaz ve Gezer, 2009). Jelleşmede öncelikle Na-Alg derişimi optimize edilmeye çalışılmıştır. Bunun için Na-Alg çözeltisine eklenen kitosan derişimi % 1,5, CaCl<sub>2</sub> çözeltisindeki GAL derişimi ise % 0,1 oranında sabit tutularak Na-Alg derişimi % 1-2,5 aralığında değiştirilmiştir. CRL ve PPL için elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3.'de özetlenmiştir.

**Çizelge 4.3.** CRL ve PPL'nin Ca-Alg/Kitosan jele immobilizasyonunda Na-Alg derişiminin optimizasyonu

	$C_{Na-Alg}$ (%)	Bağlı lipaz mg/g jel	Aktivite (U g jel <sup>-1</sup> )		Spesifik Aktivite U mg <sup>-1</sup>	
			IAAc	HAc	IAAc	HAc
CRL	1,0	14,11	3,83±0,68	3,96±0,38	0,27±0,05	0,28±0,03
	1,5	<b>15,04</b>	<b>7,33±0,52</b>	<b>7,42±0,56</b>	<b>0,49±0,03</b>	<b>0,49±0,04</b>
	2,0	12,60	5,83±0,34	5,42±0,68	0,46±0,03	0,43±0,05
	2,5	11,82	4,17±0,51	3,75±0,34	0,35±0,04	0,32±0,03
PPL	1,0	16,80	4,25±0,20	2,71±0,34	0,25±0,01	0,16±0,02
	1,5	<b>18,70</b>	<b>7,83±0,51</b>	<b>5,96±0,28</b>	<b>0,42±0,03</b>	<b>0,32±0,01</b>
	2,0	17,60	5,92±0,34	5,43±0,52	0,32±0,02	0,31±0,03
	2,5	17,12	3,75±0,84	3,63±0,64	0,22±0,05	0,21±0,04

Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi tutuklanan enzim miktarı % 1,5 Na-Alg derişimine kadar artmış ancak daha sonra Na-Alg derişimi arttıkça azalmıştır. % 1,5 Na-Alg derişimine kadar üretilen IAAc ve HAc miktarlarında artma gözlenmiş, ancak yüksek Na-Alg derişimlerinde ester miktarları azalmıştır. Bu nedenle optimum Na-Alg derişimi % 1,5 olarak seçilmiştir.

% 1,5 Na-Alg ve % 0,1 GAL derişimi sabit tutularak kitosan derişimi % 0,5-2,0 arasında değiştirilmiş ve bağlanan protein miktarı ve etkinlikleri Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.4.** CRL ve PPL'nin Ca-Alg/Kitosan jele immobilizasyonunda Kitosan derişiminin optimizasyonu

	$C_{Kitosan}$ (%)	Bağlı lipaz mg/g jel	Aktivite (U g jel <sup>-1</sup> )		Spesifik Aktivite U mg <sup>-1</sup>	
			IAAc	HAc	IAAc	HAc
CRL	0,5	10,30	3,33±0,45	5,63±0,38	0,32±0,04	0,55±0,04
	1,0	14,81	5,54±0,78	5,96±0,64	0,37±0,05	0,40±0,04
	1,5	<b>15,0</b>	<b>8,63±1,03</b>	<b>9,0±0,71</b>	<b>0,58±0,07</b>	<b>0,60±0,05</b>
	2,0	12,71	7,08±0,56	7,43±0,34	0,56±0,04	0,58±0,03
PPL	0,5	25,70	3,33±0,34	4,08±0,34	0,13±0,01	0,16±0,01
	1,0	27,32	5,13±0,25	5,96±0,65	0,19±0,01	0,22±0,02
	1,5	<b>32,30</b>	<b>7,79±0,64</b>	<b>8,75±0,82</b>	<b>0,24±0,02</b>	<b>0,27±0,03</b>
	2,0	26,70	6,18±0,36	6,72±0,45	0,23±0,01	0,25±0,02

Çizelge 4.4’de görüldüğü gibi CRL ve PPL enzimlerinin Ca-Alg/kitosan jelde tutuklanma oranı % 1,5 kitosan derişimine kadar artmış, daha yüksek kitosan derişimlerinde ise azalma gözlenmiştir. Ester üretim aktivitesi de bu noktada en yüksek değeri gösterdiğinden jel oluşumunda kullanılacak kitosan derişimi % 1,5 olarak seçilmiştir.

Ca-Alg/Kitosan jele immobilizasyonda son basamak olarak GAL derişiminin optimizasyonu yapılmıştır. Bunun için Na-Alg ve kitosan derişimleri % 1,5’de sabit tutularak GAL derişimi % 0,05-0,25 aralığında değiştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5.’da verilmiştir.

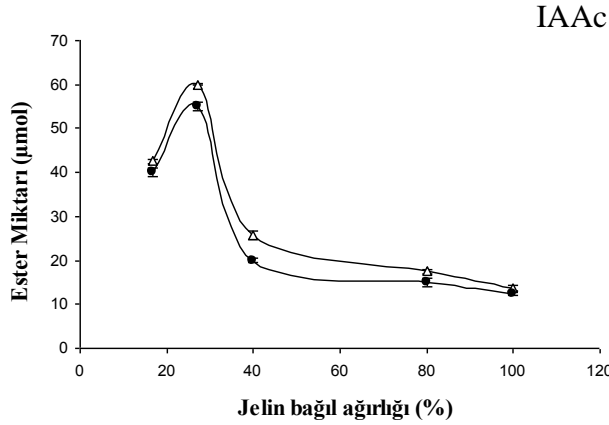
**Çizelge 4.5.** CRL ve PPL’nin Ca-Alg/Kitosan jele immobilizasyonunda GAL derişiminin optimizasyonu

	$C_{GAL}$ (%)	Bağlı lipaz mg/g jel	Aktivite (U g jel <sup>-1</sup> )		Spesifik Aktivite U mg <sup>-1</sup>	
			IAAc	HAc	IAAc	HAc
CRL	0,05	11,20	4,04±0,45	4,88±0,38	0,36±0,04	0,44±0,03
	0,1	11,82	8,33±0,34	10,0±0,45	0,70±0,03	0,85±0,04
	0,15	<b>12,74</b>	<b>10,13±0,52</b>	<b>11,0±0,52</b>	<b>0,80±0,04</b>	<b>0,86±0,04</b>
	0,2	9,30	5,83±0,38	6,67±0,34	0,63±0,04	0,72±0,04
	0,25	8,82	4,62±0,34	5,22±0,38	0,52±0,04	0,59±0,04
PPL	0,05	25,91	3,63±0,52	4,29±0,52	0,14±0,02	0,17±0,02
	0,1	30,80	8,04±0,38	8,63±0,45	0,26±0,01	0,28±0,01
	0,15	<b>31,22</b>	<b>8,75±0,52</b>	<b>10,67±0,56</b>	<b>0,28±0,02</b>	<b>0,34±0,02</b>
	0,2	22,40	5,83±0,38	5,71±0,32	0,26±0,02	0,25±0,01
	0,25	20,41	4,36±0,25	4,63±0,52	0,21±0,01	0,23±0,03

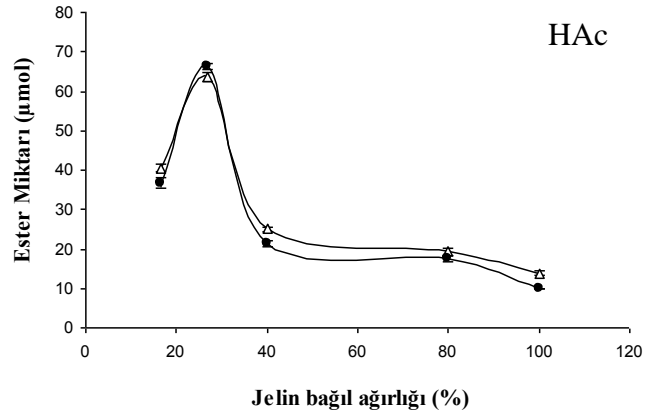
Çizelge 4.3., 4.4. ve 4.5.’de görüldüğü gibi Na-Alg, kitosan ve GAL derişimlerinin yüksek değerlerinde immobilize edilen CRL ve PPL miktarı azalmaktadır. Bu durum jelleşmeyi sağlayan Na-Alg, kitosan ve GAL derişimleri arttıkça çapraz ve kovalent bağlanma oranının artması ve dolayısıyla enzimin küçülen gözeneklere daha az oranda girebilmesi ile açıklanabilir. Benzer duruma literatürde de rastlanmaktadır. Ozyılmaz ve Gezer (2009), CRL ve PPL kaynaklı lipazı Ca-Alg jele immobilize ettiklerinde Na-Alg ve CaCl<sub>2</sub> derişimlerindeki artışa bağlı olarak bağlanan enzim miktarında azalma gözlemişlerdir.

#### 4.4.1. Ca-Alg/Kitosan Jeline İmmobilize Edilmiş Lipaz Örneklerindeki Kuruluk Oranı

Lipaz katalizörlüğünde alkol ve asitten ester sentezi susuz ortamda gerçekleşmektedir. Ancak her enzim gibi lipazın da katalitik etkinlik gösterebilmesi için bünyesinde belirli miktarda su ihtiva etmesi gerekmektedir. Bu nedenle başlangıçta elde edilen Ca-Alg/Kitosan jeli farklı oranlarda kurutularak bünyesinde farklı miktarlarda su bulundurmaları sağlanmıştır. İmmobilizasyondan sonra elde edilen ve ağırlığı 30 g olan Ca-Alg/Kitosan jellerinin 4 tanesinin ağırlığı 24, 12, 8 ve 5 g oluncaya kadar her bir noktadaki eşdeğer ağırlıkları için ester sentezi gerçekleştirilmiş, en çok üretilen ester hangi kuruluk noktasında olduğu araştırılmıştır. Elde edilen jellerin bağıl ağırlıkları başlangıçtaki yaş ağırlığa göre belirlenerek her aromanın üretim miktarı IAAC ve HAC için sırasıyla Şekil 4.5. ve 4.6.'da verilmiştir.



Şekil 4.5. Ca-Alg/Kitosan jelinin bağıl ağırlığı ile IAAC üretim etkinliğinin değişimi (Δ: CRL, ●: PPL)



**Şekil 4.6.** Ca-Alg/Kitosan jelinin bağıl ağırlığı ile HAc üretim etkinliğinin değişimi (Δ: CRL, ●: PPL)

Şekil 4.5. ve 4.6.'da jelin en iyi % 27'lik bağıl ağırlıkta iken maksimum ester üretimi sağladığı gözlenmiştir. Jel içeriğindeki su miktarı arttıkça ester üretim etkinliği azalmıştır.

Lipaz enziminin katalitik aktivite göstermesi için enzimin mikro çevresinde aktif olmasını sağlayacak miktarda su içermesi gerekmektedir. Ancak mikro çevrede enzimin aktif formda tutulması için gerekenden fazla miktarda su bulunması durumunda enzim hidrolitik aktivite gösterme eğiliminde bulunacağından ester sentezlenme eğilimi azalacaktır (Brink ve Tramper, 1985). Bu nedenle bünyesinde çok miktarda su bulunan Ca-Alg/Kitosan jellerinin en yüksek sentetik aktiviteyi gösterecek oranda kurutulması son derece önemlidir. Bu çalışmada da elde edilen jellerin başlangıç ağırlıklarının % 27'sine ulaşmaya kadar su kaybetmeleri durumunda en yüksek sentetik aktiviteyi gösterdikleri belirlenmiştir. Jel in daha fazla miktarda su kaybetmesi durumunda ester üretimindeki azalmanın nedeni enzimin mikro çevresinde katalitik aktivite göstermesini sağlayacak su miktarının azalmasına bağlanabilir.

% 1,5 Na-Alg, % 1,5 kitosan ve % 0,15 GAL kullanılarak elde edilen ve başlangıç ağırlığının % 27'si olacak şekilde kurutulmuş Ca-Alg/Kitosan jelinin enzim içermeyen ve içeren örneklerinin fotoğrafları sırasıyla Şekil 4.7. ve 4.8.'de verilmiştir.



**Şekil 4.7.** Optimum koşullarda elde edilen ve enzim içermeyen Ca-Alg/Kitosan jelleri



**Şekil 4.8.** Optimum koşullarda elde edilen ve lipaz içeren Ca-Alg/Kitosan jelleri

#### **4.5. Kitosan Desteğe İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu**

Kitosana lipaz immobilizasyonunun ilk aşamasında kitosan destek % 0,5 GAL ile aktifleştirilmiştir. İmmobilizasyonun yapıldığı destek ve enzim arasındaki mesafenin arttırılması amacıyla farklı arakollar üzerinden enzim immobilizasyonu araştırılmıştır. Bu işlemde sonra GAL ile etkinleştirilen desteğe ayrı ayrı 0,1 M 1,3 diamino propan (1,3 DAP), 1,4 diamino bütan (1,4 DAB), 1,5 diamino pentan (1,5 DAP) ve 1,6 diamino hekzan (1,6 DAH) grupları bağlanmıştır. Enzimin bağlanabilmesi için tekrardan % 0,5 GAL ile etkinleştirilen desteğe daha sonra 1mg/ml derişimli lipaz örnekleri immobilize edilmiştir. Çizelge 4.6.'da bu arakollar üzerinden bağlanan lipaz miktarları ve IAAC ve HAC üretim etkinlikleri gösterilmiştir.



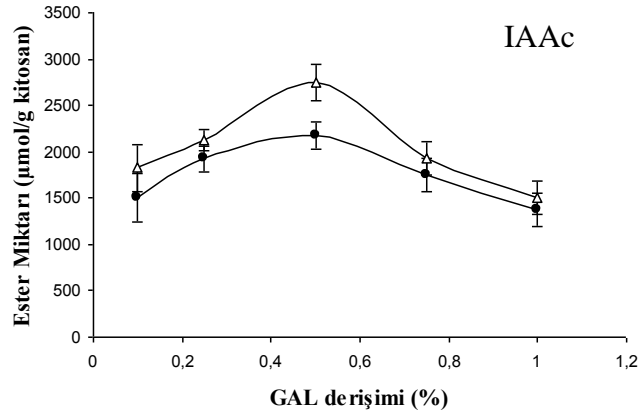
**Çizelge 4.6.** Farklı arakollar üzerinden kitosan desteğe immobilize edilmiş lipaz örneklerinin bağlanma miktarları ve ester üretim etkinlikleri

	Arakol türü	Bağlanan Protein (mg enzim proteini/g destek)	Ester Miktarı (μmol / g kitosan)	
			IAAc	HAc
<b>CRL</b>	<b>Arakol yok</b>	1,61	1750	1500
	<b>1-3 DAP</b>	1,69	<b>2300</b>	<b>2325</b>
	<b>1-4 DAB</b>	1,04	2175	1675
	<b>1-5 DAP</b>	0,81	1925	1325
	<b>1-6 DAH</b>	0,66	1500	1250
	<b>Arakol yok</b>	1,91	1750	1000
<b>PPL</b>	<b>1-3 DAP</b>	1,54	<b>2050</b>	<b>1975</b>
	<b>1-4 DAB</b>	1,36	1950	1800
	<b>1-5 DAP</b>	0,67	1925	1750
	<b>1-6 DAH</b>	0,57	1550	1625
	<b>Arakol yok</b>	1,91	1750	1000

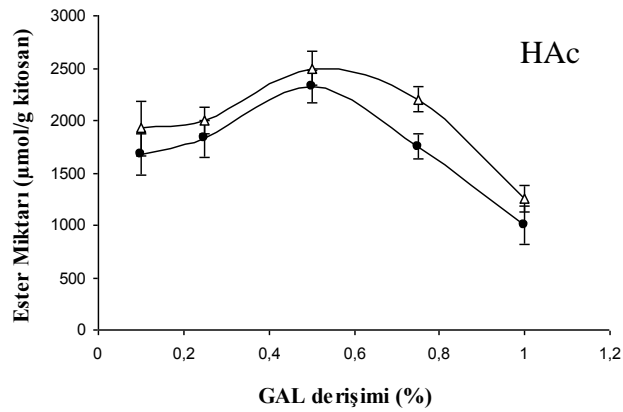
Çizelge 4.6.'ye göre aroma esteri üretiminde kullanılmak üzere hazırlanmış % 0,5 GAL ile aktifleştirilmiş kitosan desteğine bağlanan 1,3 DAP'nın 1,4 DAB, 1,5 DAP ve 1,6 DAH ve arakol içermeyen kitosan desteğine immobilize edilmiş CRL'nin en çok 1,3 DAP'a, PPL'nin ise arakol içermeyen desteğe bağlandığını, ancak ester sentezi yapıldığında ise her iki lipaz örneği için de en iyi etkinliğin 1,3 DAP'ın gösterdiği belirlenmiştir. İmmobilizasyonun yapıldığı destek ve enzim arasındaki mesafenin arttırılması amacıyla arakol kullanımı literatürde sıklıkla rastlanan bir durumdur. Ozyılmaz (2009), 1,6 diamino hekzan arakolu ile modifiye ettiği silika jele lipaz enzimini kovalent olarak immobilize etmiş ve *p*-nitrofenolün asetik asit ve palmitik asit esterlerini hem serbest hem de arakol içermeyen desteğe immobilize ettiği lipaz örneklerine göre daha yüksek etkinlikte sentezlemiştir.

Çalışmanın bundan sonraki bölümlerinde CRL ve PPL, 1,3 DAP arakolu ile modifiye edilmiş kitosana immobilize edilerek kullanılmıştır.

Kitosan destek, arakollar bağlanmadan önce ve bağlandıktan sonra GAL ile etkinleştirilmiştir. Bu aşamada GAL derişimi % 0,1-1,0 aralığında optimize edilmiştir. GAL çözeltisinin farklı derişimleri ile kullanılarak yapılan immobilize edilmiş lipaz örnekleri ile IAAc ve HAc üretimi Şekil 4.9. ve 4.10.'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.9.** Kitosan desteğe immobilizasyon aşamasında kullanılan GAL derişiminin IAac üretim etkinliği üzerine etkisi ( $\Delta$ : CRL,  $\bullet$ : PPL)



**Şekil 4.10.** Kitosan desteğe immobilizasyon aşamasında kullanılan GAL derişiminin HAc üretim etkinliği üzerine etkisi ( $\Delta$ : CRL,  $\bullet$ : PPL)

Şekil 4.9. ve 4.10.'da % 0,5 GAL derişimi kullanılarak hazırlanan lipaz örneklerinin en iyi IAac ve HAc üretimini bu noktada gerçekleştirdikleri görülmektedir. Bu nedenle kitosan desteğin lipaz immobilizasyonu sırasındaki 2 aşamasında da % 0,5 GAL kullanılmıştır.

Şekil 4.11.'de saf kitosanın, Şekil 4.12.'de arakol bağlanarak % 0,5 GAL ile aktifleştirilen kitosanın ve Şekil 4.13.'de lipaz ile immobilize edilmiş desteğin fotoğrafları gösterilmektedir.



**Şekil 4.11.** Saf kitosan



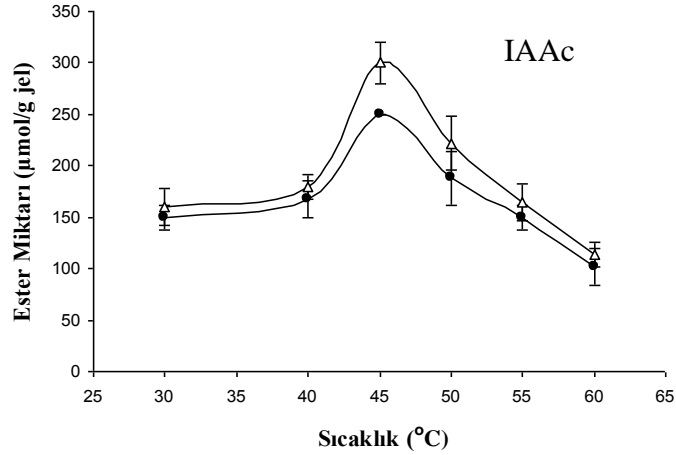
**Şekil 4.12.** Arakol bağlanarak % 0,5 GAL ile aktiveştirilen kitosan



**Şekil 4.13.** Lipaz ile immobilize edilmiş kitosan destek

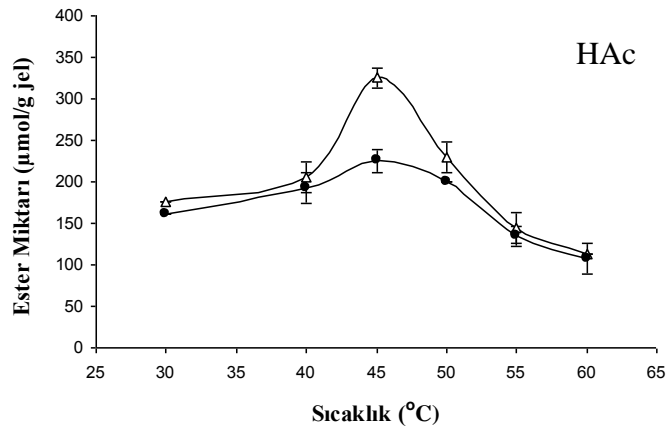
#### 4.6. İmmobilize CRL ve PPL ile Aroma Esterleri Üretimine Sıcaklığın Etkisi

İmmobilize CRL ve PPL ile IAac ve HAc üretimi 30-60 °C arasında olmak üzere 6 farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiş, elde edilen sonuçlar Ca-Alg/Kitosan destek ile IAac ve HAc sentezi için sırasıyla Şekil 4.14. ve 4.15.'de verilmiştir.



**Şekil 4.14.** Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ve PPL ile IAac üretimine sıcaklığın etkisi (Δ: CRL, ●: PPL)

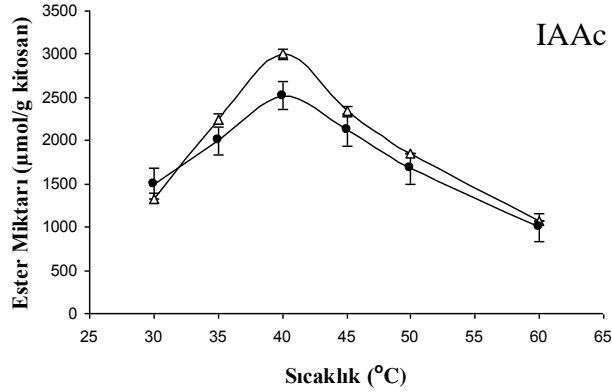
Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ve PPL örnekleri ile IAac üretiminin gösterildiği Şekil 4.14. incelendiğinde, her iki lipaz örneği ile sentezlenen IAac'ın 45 °C'de en yüksek verimliliği gösterdiği görülmektedir.



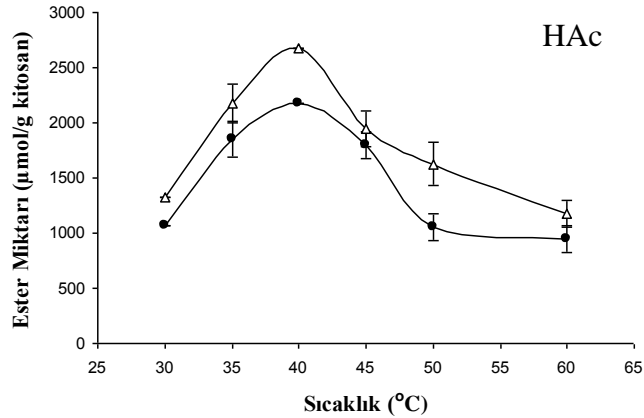
**Şekil 4.15.** Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ve PPL ile HAc üretimine sıcaklığın etkisi (Δ: CRL, ●: PPL)

Şekil 4.15. incelendiğinde ise en fazla HAc üretiminin IAAc'da olduğu gibi 45 °C'de gerçekleştiği görülmektedir. Şekil 4.14. ve 4.15. birlikte incelendiğinde IAAc ve HAc üretiminin en fazla CRL kullanıldığında gerçekleştiği gözlenmektedir.

Kitosan desteğe arakol yardımıyla immobilize edilmiş CRL ve PPL ile, sıcaklığa bağlı olarak IAAc ve HAc üretimi sırasıyla Şekil 4.16. ve 4.17.'de görülmektedir.



Şekil 4.16. Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ve PPL ile IAAc üretimine sıcaklığın etkisi (Δ: CRL, ●: PPL)



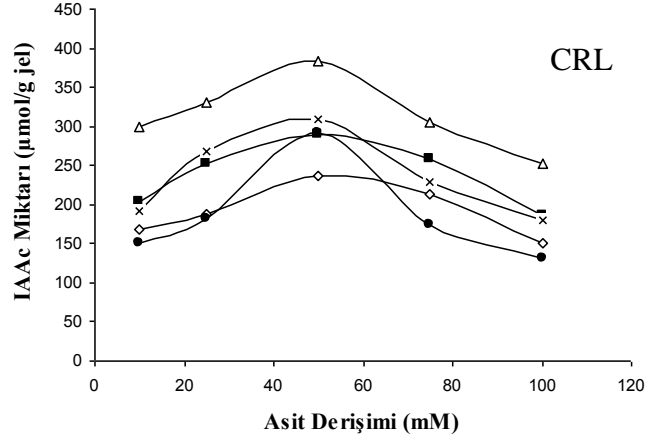
Şekil 4.17. Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ve PPL ile HAc üretimine sıcaklığın etkisi (Δ: CRL, ●: PPL)

Şekil 4.16. ve 4.17. incelendiğinde IAAc ve HAc esterlerinin en fazla 40 °C'de üretildikleri görülmektedir. Ancak CRL kullanılarak elde edilen esterlerin PPL kullanılarak üretilen esterlerden daha fazla olduğu gözlenmektedir. Literatürde de immobilize lipaz örnekleri ile aroma ester üretimi üzerine sıcaklığın etkisi ile ilgili

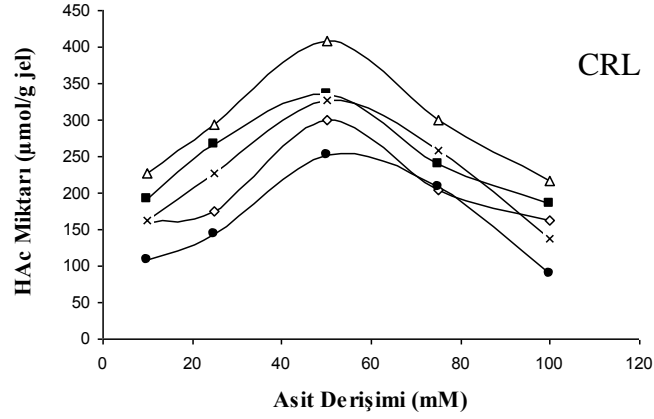
birçok çalışma bulunmaktadır. Güvenç ve ark.(2002) çözücüsüz bir sistemde immobilize lipaz kullanarak ürettikleri IAAC sentezinde enzimin en iyi etkinliği 30 °C'de gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Hung ve ark. (2003) kitosan desteğine çapraz bağlayarak immobilize ettikleri *Candida rugosa* lipazının karakterizasyonunu belirlerken en iyi aktiviteyi 30 °C'de gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Karra Châabouni ve ark. (2006) CaCO<sub>3</sub>'a adsorpsiyonla immobilize ettikleri *Staphylococcus simulans* lipazı ile etil valerat ve hekzil asetat sentezlemişler ve optimum sıcaklıkları 45 °C ve 37 °C olarak belirlemişlerdir. Substratların termodinamik özellikleri kimyasal etkinliklerini ve denge koşullarını belirleyen temel etkidir. Termodinamik özellikler ise başta sıcaklık olmak üzere substratın zincir uzunluğu ve özellikle lipaz için çözücü türüne bağlı olarak değişir (Vaysse ve ark. 2002). Sıcaklık özellikle substratın fiziksel özelliklerini etkilediği için aynı enzim kullanıldığında optimum sıcaklıkların substrat türüne göre farklılık göstermesi ve üretilen ester miktarlarının farklı olması beklenen bir sonuçtur. Ancak çalışmada kullanılan substratların fiziksel ve kimyasal özellikleri birbirine benzediğinden optimum sıcaklıklar birbirine yakın çıkmıştır.

#### **4.7. Ca-Alg/Kitosan Jele İmmobilize Edilmiş Lipaz ile Ester Üretimine Substrat Derişiminin Etkisi**

Bu çalışmada immobilize lipaz örnekleri kullanılarak heptan içinde hazırlanan 10, 25, 50, 75 ve 100 mM aralığındaki alkol derişimlerinin her bir noktası için 10, 25, 50, 75 ve 100 mM asit derişimleri denenmiş, en iyi asit-alkol molar oranının saptanması amaçlanmıştır. Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilen CRL örnekleri kullanılarak üretilen IAAC ve HAC miktarları Şekil 4.18. ve 4.19'da verilmiştir.



**Şekil 4.18.** Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ile IAAC üretim etkinliğine substrat derişiminin etkisi (IAA derişimi; ◇: 10mM, ■: 25mM, △: 50mM, ✕: 75mM, ●: 100mM)



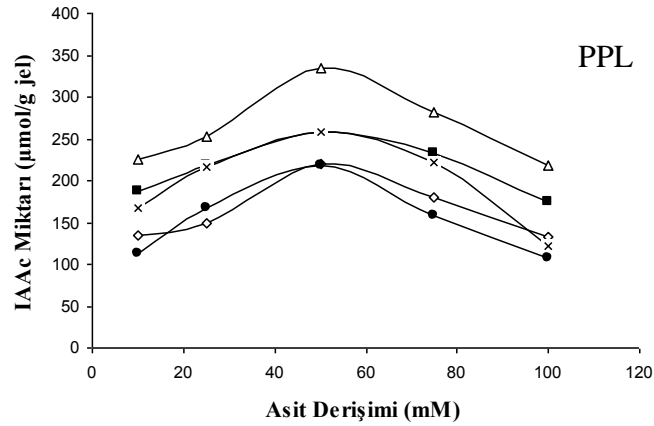
**Şekil 4.19.** Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ile HAc üretim etkinliğine substrat derişiminin etkisi (HA derişimi; ◇: 10mM, ■: 25mM, △: 50mM, ✕: 75mM, ●: 100mM)

Şekil 4.18.'de farklı substrat derişimlerinde IAAC üretimi incelenmiştir. CRL ile en fazla IAAC üretiminin 50 mM asit ve 50 mM alkol substrat karışımı ile gerçekleştiği görülmektedir. Şekil 4.19.'da HAc üretiminde ise IAAC üretiminde olduğu gibi en yüksek verimlilik 50 mM alkol ve 50mM asit derişimi olarak tespit edilmiştir. IAAC ve HAc sentezine ait çizilen Şekil 4.18. ve 4.19.'a ait değerler Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.7.** Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ile ester sentezinde substrat derişimi etkisi

CRL		Alkol Derişimi (mM)				
Asit Derişimi (mM)		10	25	50	75	100
IAAc ( $\mu\text{mol/g.jel}$ )	10	167,5 $\pm$ 20,4	204,1 $\pm$ 0,0	300,0 $\pm$ 20,4	192,1 $\pm$ 40,8	150,0 $\pm$ 20,4
	25	187,5 $\pm$ 54,2	252,0 $\pm$ 23,4	330,1 $\pm$ 36,1	267,6 $\pm$ 42,6	182,4 $\pm$ 19,8
	50	237,5 $\pm$ 42,6	289,8 $\pm$ 11,4	384,0 $\pm$ 10,2	309,0 $\pm$ 20,4	292,5 $\pm$ 0,0
	75	212,5 $\pm$ 11,4	259,2 $\pm$ 20,4	306,0 $\pm$ 11,4	228,0 $\pm$ 10,2	174,6 $\pm$ 13,2
	100	150,0 $\pm$ 58,8	186,1 $\pm$ 39,0	252,0 $\pm$ 21,0	180,1 $\pm$ 61,8	132,0 $\pm$ 19,8
HAc ( $\mu\text{mol/g.jel}$ )	10	160,2 $\pm$ 20,6	192,5 $\pm$ 16,0	228,5 $\pm$ 11,50	162,2 $\pm$ 52,6	108,1 $\pm$ 24,0
	25	175,0 $\pm$ 33,3	267,0 $\pm$ 20,6	294,0 $\pm$ 39,6	228,5 $\pm$ 19,0	144,0 $\pm$ 32,0
	50	300,0 $\pm$ 28,5	336,0 $\pm$ 20,6	408,0 $\pm$ 38,0	327,0 $\pm$ 19,0	252,5 $\pm$ 32,0
	75	205,2 $\pm$ 19,0	240,0 $\pm$ 21,8	300,0 $\pm$ 11,5	258,2 $\pm$ 58,0	207,6 $\pm$ 33,3
	100	162,5 $\pm$ 26,5	186,0 $\pm$ 32,0	217,5 $\pm$ 19,0	138,0 $\pm$ 28,50	90,0 $\pm$ 39,6

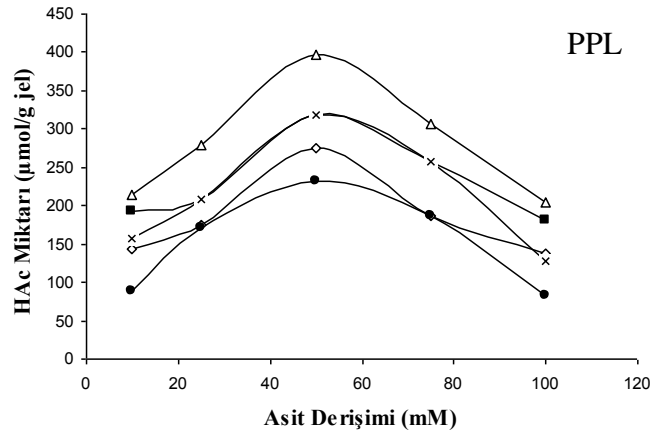
PPL kullanılarak üretilen IAAc ve HAc esterlerinin substrat optimizasyon eğrileri sırasıyla Şekil 4.20. ve 4.21.'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.20.** Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş PPL ile IAAc üretim etkinliğine substrat derişiminin etkisi (IAA derişimi;  $\diamond$ : 10mM,  $\blacksquare$ : 25mM,  $\Delta$ : 50mM,  $\times$ : 75mM,  $\bullet$ : 100mM)

PPL kullanılarak üretilen IAAc ile tıpkı CRL ile üretiminde olduğu gibi en yüksek verimlilik 50 mM asit ile 50 mM alkol karışımında elde edilmiştir.





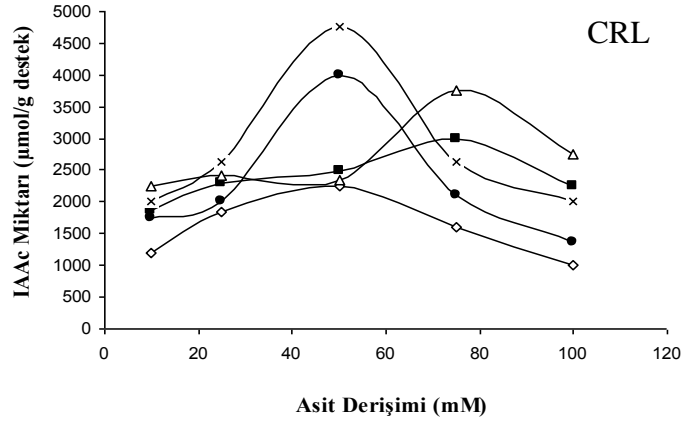
**Şekil 4.21.** Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş PPL ile HAc üretim etkinliğine substrat derişiminin etkisi (IAA derişimi; ◇: 10mM, ■: 25mM, △: 50mM, ×: 75mM, ●: 100mM)

10 ve 100 mM asetik asit ile yapılan çalışmalarda alkol derişimine bağı olarak ester üretimi düşüktür. 50 mM asetik asit kullanıldığında her alkol derişimi için en yüksek ester üretimi gerçekleşmiştir. Genel olarak 50 mM alkol derişimi ile en yüksek ester üretimi meydana gelmiştir. Benzer şekilde, Şekil 4.20 ve 4.21’de görüldüğü gibi 50 mM asit ve alkol derişimine kadar, substrat derişimi arttıkça ester üretim etkinliği artmış, ancak daha yüksek substrat derişimlerinde ise ester üretiminde düşüş gözlenmiştir. Şekil 4.20. ve 4.21.’e ait veriler Çizelge 4.8.’de verilmiştir.

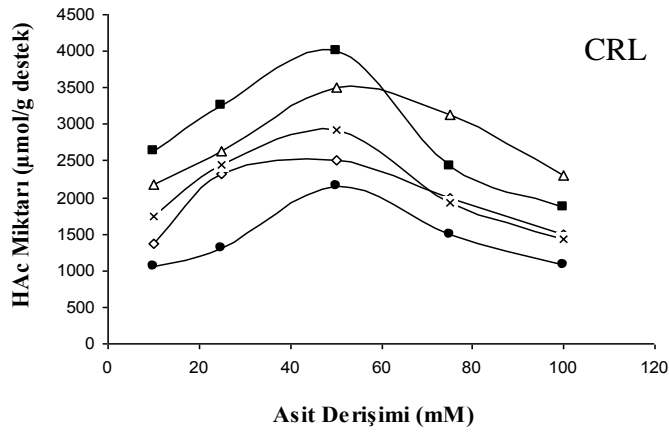
**Çizelge 4.8.** Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş PPL ile ester sentezinde substrat derişimi etkisi

PPL		Alkol Derişimi (mM)				
Asit Derişimi (mM)		10	25	50	75	100
IAAc (µmol/g jel)	10	135,0±52,6	187,5±51,2	225,7±15,0	168,1±19,0	112,5±39,3
	25	150,0±16,9	219,3±19,0	252,4±0,0	217,2±20,6	168,1±20,6
	50	220,2±40,4	258,3±33,3	334,9±19,0	258,2±19,0	217,2±52,6
	75	180,5±0,0	232,8±20,6	282,7±58,2	222,0±57,10	157,5±20,6
	100	132,5±19,0	174,1±19,0	219,0±15,0	121,2±0,0	107,4±0,0
HAc (µmol/g jel)	10	142,5±0	192,6±26,5	213,6±19,8	157,5±0	87,60±0
	25	175,0±58,0	208,8±24,0	279,6±33,3	209,0±58,0	171,0±11,5
	50	274,8±0	317,4±19,0	396,0±19,0	318,0±0	232,5±11,5
	75	187,5±0	257,4±19,0	306,0±19,0	258,20±0	187,5±11,5
	100	137,4±36,0	180,0±0	204,5±19,0	127,2±21,8	82,5±19,0

Kitosan destek kullanılarak üretilen IAAc’n üretim verimliliği Şekil 4.22.’de, HAc üretim verimliliği Şekil 4.23.’de gösterilmektedir.



**Şekil 4.22.** Kitosan desteğe immobilize edilmiş CRL ile IAac üretim etkinliğine substrat derişiminin etkisi (IAA derişimi; ◇: 10mM, ■: 25mM, △: 50mM, ×: 75mM, ●: 100mM)



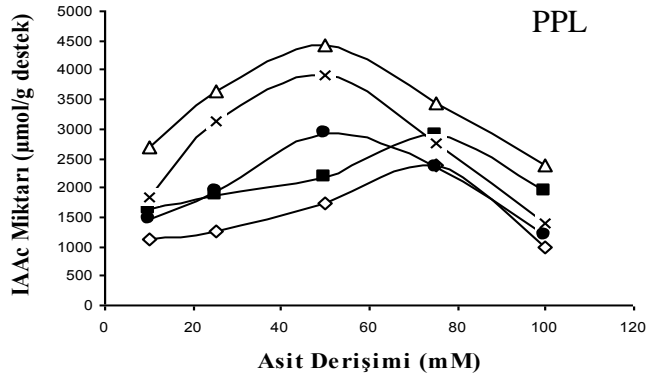
**Şekil 4.23.** Kitosan desteğe immobilize edilmiş CRL ile HAc üretim etkinliğine substrat derişiminin etkisi (HA derişimi; ◇: 10mM, ■: 25mM, △: 50mM, ×: 75mM, ●: 100mM)

Kitosana immobilize edilmiş CRL ile IAac üretiminde 50 mM asit ve 75 mM alkol karışımı kullanılarak, HAc üretiminde ise 50 mM asit ve 25 mM alkol karışımı ile en yüksek verimlilik elde edilmiştir. Kitosana immobilize edilmiş CRL örnekleriyle sentezlenen IAac ve HAc'a ait veriler Çizelge 4.9.'da verilmiştir.

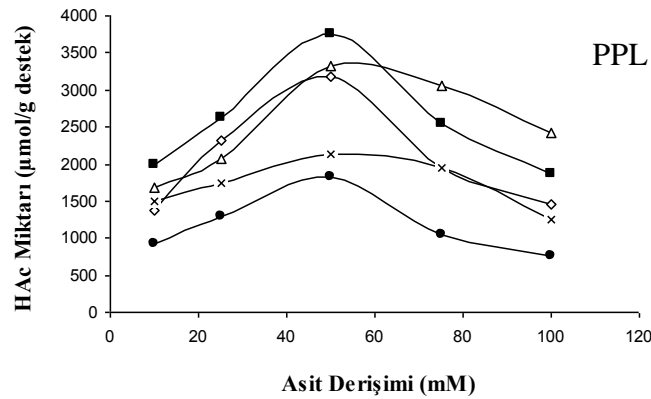
**Çizelge 4.9.** Kitosan desteğe immobilize edilmiş CRL ile ester sentezinde substrat derişimi etkisi

CRL		Alkol Derişimi (mM)				
Asit Derişimi (mM)		10	25	50	75	100
IAAc ( $\mu\text{mol/g}$ kit.)	10	1200,0 $\pm$ 408,3	1875,0 $\pm$ 204,1	2250,1 $\pm$ 412,5	1998,0 $\pm$ 35,4	1750,2 $\pm$ 204,1
	25	1850,0 $\pm$ 202,5	2299,0 $\pm$ 186,6	2424,0 $\pm$ 120,0	2625,2 $\pm$ 120,0	2008,0 $\pm$ 202,5
	50	2250,1 $\pm$ 186,6	2500,0 $\pm$ 312,0	2355,0 $\pm$ 405,0	4750,2 $\pm$ 204,1	4000,0 $\pm$ 186,6
	75	1602,0 $\pm$ 208,2	3000,0 $\pm$ 204,1	3750,20 $\pm$ 120,0	2625,0 $\pm$ 165,2	2100,2 $\pm$ 109,0
	100	1002,2 $\pm$ 102,1	2250,1 $\pm$ 208,2	2750,0 $\pm$ 408,3	1998,0 $\pm$ ,0,0	1361,0 $\pm$ 102,3
HAc ( $\mu\text{mol/g}$ kit.)	10	1375,2 $\pm$ 0,0	2625,0 $\pm$ 306,2	2175,0 $\pm$ 408,5	1750,2 $\pm$ 120,5	1050,0 $\pm$ 0,0
	25	2325,0 $\pm$ 306,2	3252,0 $\pm$ 0,0	2628,0 $\pm$ 214,2	2450,0 $\pm$ 202,5	1300,2 $\pm$ 214,0
	50	2502,0 $\pm$ 0,0	4002,0 $\pm$ 102,0	3499,8 $\pm$ 208,8	2925,0 $\pm$ 120,5	2149,8 $\pm$ 102,0
	75	1999,8 $\pm$ 306,0	2425,2 $\pm$ 98,0	3124,8 $\pm$ 186,6	1924,8 $\pm$ 214,0	1500,0 $\pm$ 202,5
	100	1500,0 $\pm$ 202,5	1875,0 $\pm$ 0,0	2299,8 $\pm$ 100,0	1425,5 $\pm$ 312,6	1075,2 $\pm$ 88,5

İmmobilize PPL örneklerin kullanılarak gerçekleştirilen IAAc ve HAc sentezine ait grafikler sırasıyla Şekil 4.24. ve 4.25.'de verilmiştir.



**Şekil 4.24.** Kitosan desteğe immobilize edilmiş PPL ile IAAc üretim etkinliğine substrat derişiminin etkisi (IAA derişimi; ◇: 10mM, ■: 25mM, △: 50mM, ✕: 75mM, ●: 100mM)



**Şekil 4.25.** Kitosan desteğe immobilize edilmiş PPL ile HAc üretim etkinliğine substrat derişiminin etkisi (HA derişimi; ◇: 10mM, ■: 25mM, △: 50mM, ✕: 75mM, ●: 100mM)

Şekil 4.24.'de PPL kullanılarak IAAC üretimi gerçekleştirildiğinde 50 mM asit ve 50 mM alkol karışımı ile, Şekil 4.25'de HAc üretimi gerçekleştirildiğinde ise 50 mM asit ve 25 mM alkol karışımı ile en fazla ester üretimi gerçekleşmiştir. Kitosan desteğe immobilize edilmiş lipaz örnekleri ile üretilen ester miktarlarına ait veriler Çizelge 4.10.'da gösterilmiştir.

**Çizelge 4.10.** Kitosan desteğe immobilize edilmiş PPL ile ester sentezinde substrat derişimi etkisi

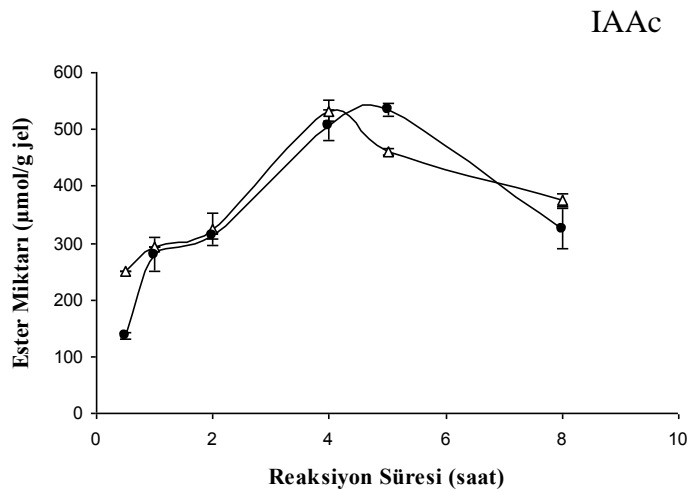
	PPL Asit Derişimi (mM)	Alkol Derişimi (mM)				
		10	25	50	75	100
IAAC (µmol/g kit.)	10	1125,0±35,4	1625,0±120,0	2675,0±98,2	1825,2±0,0	1447,2±130,0
	25	1249,8±202,5	1875,0±0,0	3625,2±120,6	3123,0±186,6	1924,8±204,1
	50	1750,2±0,0	2175,0±108,0	4425,0±408,3	3925,2±120,0	2925,0±120,0
	75	2374,8±100,0	2875,2±124,2	3426,0±412,5	2749,8±100,0	2346,0±0,0
	100	1002,0±186,6	1924,8±202,5	2374,8±312,0	1399,8±108,0	1200,0±98,0
HAc (µmol/g kit.)	10	1375,0±418,5	2000,0±306,0	1675,0±108,0	1500,0±98,0	925,5±312,0
	25	2325,0±120,5	2625,0±88,5	2075,2±306,0	1750,5±100,0	1300,6±412,5
	50	3175,0±202,5	3750,0±102,0	3325,5±124,2	2125,2±212,0	1825,0±408,3
	75	1950,0±0,0	2550,0±202,5	3050,0±0,0	1950,0±202,5	1050,0±418,5
	100	1450,0±214,0	1875,0±0,0	2425,2±212,0	1250,0±0,0	750,0±0,0

Karra-Châabouni ve ark. (2006), *Staphylococcus simulans* kaynaklı immobilize lipaz örnekleri ile etil valerat ve heksil asetat esterlerinin sentezini gerçekleştirmişlerdir. 1:1 asit:alkol molar oranında etil valerat dönüşümünü % 51, 1:1 asit:alkol molar oranında heksil asetat dönüşümünü % 41 olarak bulmuşlardır. Yüksek alkol

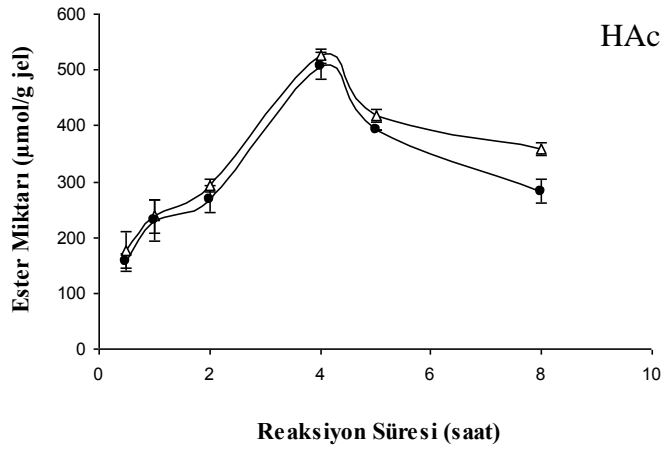
derişimlerinde reaksiyon hızında düşüşler gözlemlenmiştir. Salah ve ark. (2007), lipaz katalizliğinde bütül asetat sentezinde kullandıkları asit ve alkolün derişimlerini optimize ederek en iyi dönüşümün 1:1 asit alkol molar oranında olduğunu kaydetmişlerdir. Ancak asit:alkol molar oranının 1'den daha büyük değerlerinde asetik asidin lipazı denatüre ettiğini kaydetmişlerdir. Güvenç ve ark. (2002), izoamil asetat sentezinde substrat bileşimini farklı oranlarda denemiş, yüksek derişimlerdeki asidin ve alkolün reaksiyon hızını düşürdüğünü, buna bağlı olarak lipaz enzimini inhibe ettiğini kaydetmişlerdir. Ozyılmaz ve Gezer (2009), izoamil asetat, bütül asetat ve etil valerat esterlerinin en iyi substrat bileşimlerini belirlemek için çalışmışlar, yüksek asit ve alkol bileşimli substrat karışımlarının reaksiyon ortamındaki enzimi inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

#### 4.8. Kesikli Reaktörde Ester Üretim Etkinliğinin Araştırılması

Bu çalışma ile kesikli reaktör kullanarak zamana bağlı olarak IAac ve HAac esterlerinin sentezi amaçlanmıştır. Kesikli reaktör olarak vida kapaklı 100 ml'lik cam şişeler kullanılmıştır. Reaksiyon süresi 30 dk ile başlayıp maksimum 8 saate kadar çıkarılmıştır. Şekil 4.26.'da Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ve PPL örnekleri ile IAac üretimi, Şekil 4.27.'de ise HAac üretimi gösterilmiştir.



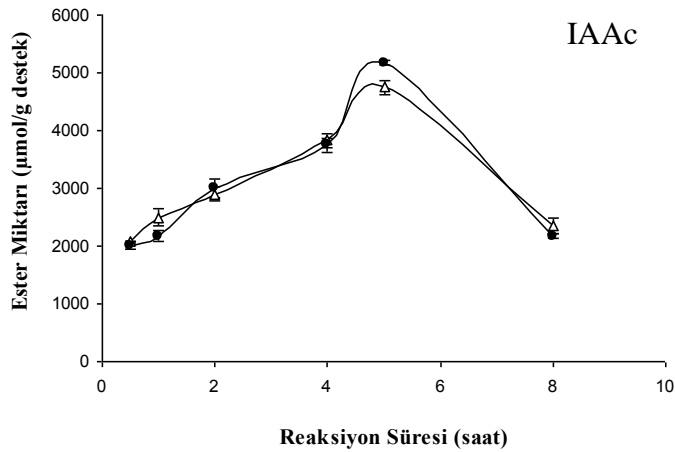
**Şekil 4.26.** Kesikli reaktör sisteminde Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ve PPL kullanılarak IAac üretim etkinliğinin zamana bağlı değişimi (Δ: CRL, ●: PPL)



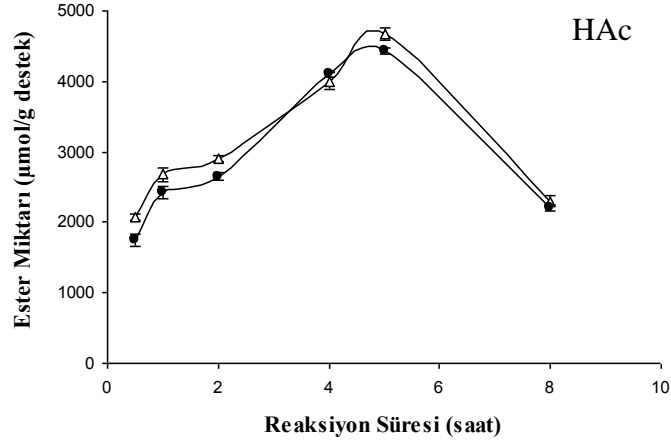
**Şekil 4.27.** Kesikli reaktör sisteminde Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ve PPL kullanılarak HAc üretim etkinliğinin zamana bağlı değişimi (Δ: CRL, ●: PPL)

Şekil 4.26. incelendiğinde IAac üretimi, CRL kullanılarak 4 saatte, PPL kullanılarak ise 5 saatte maksimum verimliliğe ulaşmıştır. Şekil 4.27.'de HAc üretiminde ise her iki lipaz örneği ile 4 saatte maksimum verimlilik elde edilmiş, 4 saat sonrasında ise zamana bağlı olarak üretim verimliliği azalmıştır.

Kitosana immobilize edilmiş CRL ve PPL kullanılarak üretilen IAac ve HAc esterlerinin üretim verimlilikleri Şekil 4.28. ve 4.29.'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.28.** Kesikli reaktör sisteminde Kitosan desteğe immobilize edilmiş CRL ve PPL kullanılarak IAac üretim etkinliğinin zamana bağlı değişimi (Δ: CRL, ●: PPL)

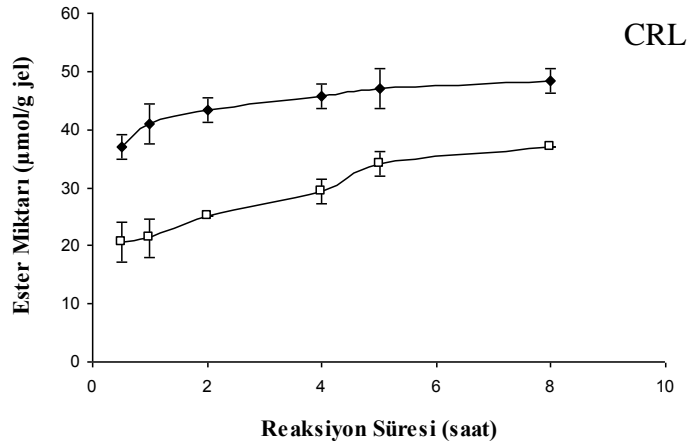


**Şekil 4.29.** Kesikli reaktör sisteminde Kitosan desteğe immobilize edilmiş CRL ve PPL kullanılarak HAC üretim etkinliğinin zamana bağlı değişimi ( $\Delta$ : CRL,  $\bullet$ : PPL)

Kitosana immobilize edilmiş lipaz örnekleri ile kesikli reaktör çalışması sonunda IAAC üretimi Şekil 4.28.'de incelendiğinde 5 saatin sonunda maksimum ester üretimi gerçekleşmiştir. Şekil 4.29.'da ise HAC üretimi her iki lipaz örneği için de 5 saatin sonunda en fazla üretilmiştir. Ancak her iki aroma ve lipaz örneği incelendiğinde de maksimum üretim etkinliğinden sonra ester üretiminde düşüş gözlenmiştir.

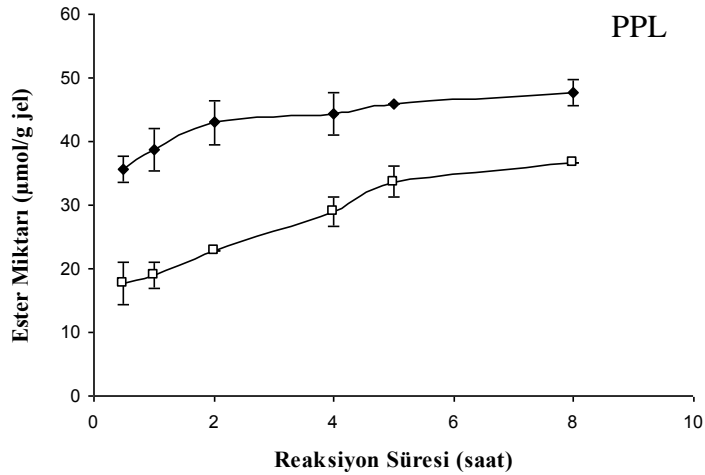
#### 4.9. Sürekli Reaktörde Ester Üretim Etkinliğinin Araştırılması

Sürekli reaktör sisteminde, reaktör olarak dolgu yataklı kolon kullanılmış ve substrat kolondan dakikada 0,1 ml hızla geçirilerek ester üretimi gerçekleştirilmiştir. Kesikli reaktörde olduğu gibi belirli periyotlarda kolondan alınan ürün çözeltisindeki reaksiyona girmeyen asit titrimetrik olarak belirlenerek g jel başına üretilen ester miktarı hesaplanmıştır. Şekil 4.30.'da sürekli reaktör sisteminde lipaz örnekleri ile IAAC üretimi gösterilmiştir.



**Şekil 4.30.** Sürekli reaktör sisteminde Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL kullanılarak IAAc ve HAc üretim etkinliğinin zamana bağlı değişimi (◆:IAAc, □:HAc)

Şekil 4.30. incelendiğinde IAAc üretiminin HAc üretimine göre daha fazla gerçekleştiği görülmektedir. Zamana bağlı olarak her iki aroma esterinin oluşumu artmış, ancak bu artış zamanla azalmıştır. Şekil 4.31.'de ise immobilize PPL kullanılarak sentezlenen IAAc ve HAc esterlerinin üretim verimlilikleri gösterilmektedir.

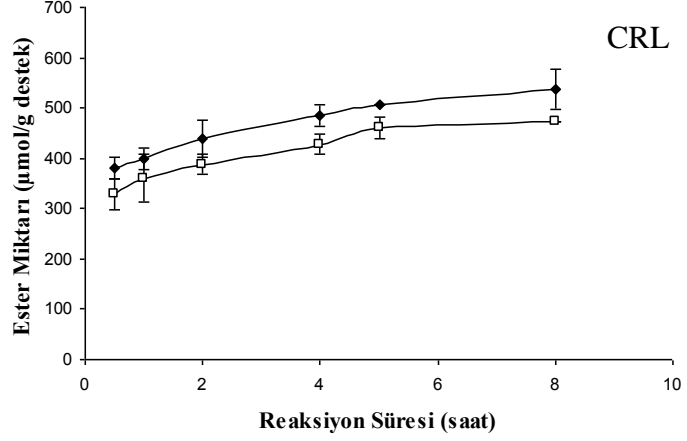


**Şekil 4.31.** Sürekli reaktör sisteminde Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş PPL kullanılarak IAAc ve HAc üretim etkinliğinin zamana bağlı değişimi (◆:IAAc, □:HAc)

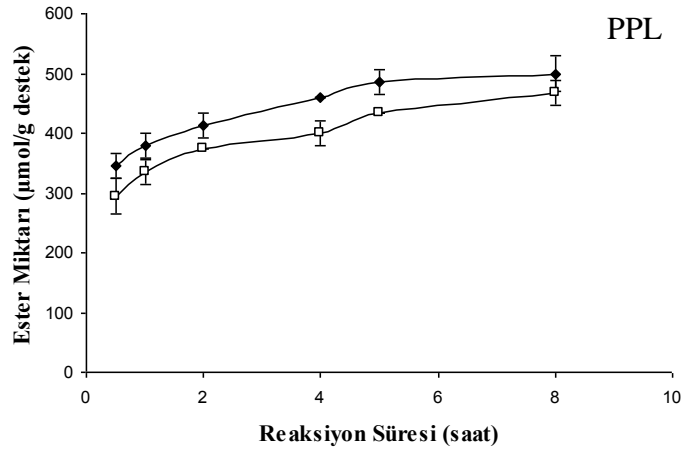
CRL'de olduğu gibi PPL kullanılarak üretilen aroma esterlerinin sentezi zamanla artmakta, zamanla artış farkı Şekil 4.31.'de görüldüğü gibi azalmaktadır. IAAc üretim



verimliliğinin HAC'a göre daha fazla olduğu gözlenmektedir. Kitosan destek kullanılarak sürekli reaktörde üretilen IAAC ve HAC esterlerinin zamana bağlı üretimleri sırasıyla Şekil 4.32. ve 4.33.'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.32.** Sürekli reaktör sisteminde Kitosan desteğe immobilize edilmiş CRL kullanılarak IAAC ve HAC üretim etkinliğinin zamana bağlı değişimi (◆:IAAC, □:HAC)



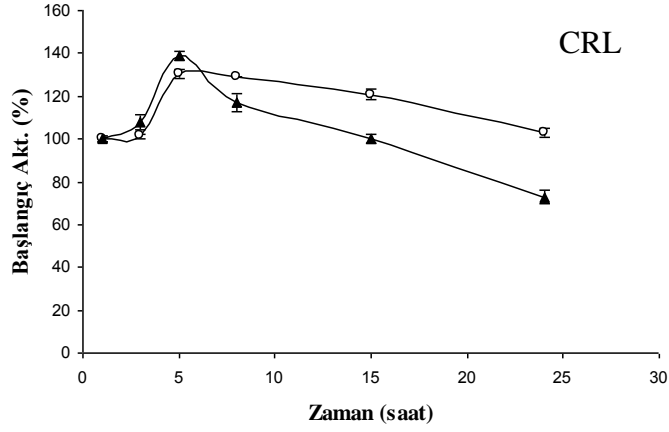
**Şekil 4.33.** Sürekli reaktör sisteminde Kitosan desteğe immobilize edilmiş PPL kullanılarak IAAC ve HAC üretim etkinliğinin zamana bağlı değişimi (◆:IAAC, □:HAC)

Her iki lipaz örneğinde de aromaların üretimleri zamana bağlı olarak önce hızlı bir şekilde artmış, daha sonra bu artış zamanla azalmıştır.

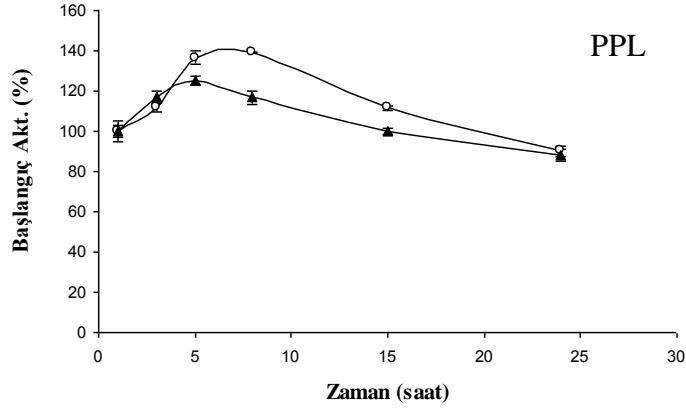
Kesikli reaktör sistemi ile sürekli reaktör sistemi kıyaslandığında kesikli reaktörde kısa süreli çalışmayla daha yüksek verimlilik elde edilmiştir. Bu nedenle kesikli reaktörle kısa süreli çalışmanın, sürekli reaktörle ise uzun süreli çalışmanın ester üretimi üzerine olumlu etkisi olduğu düşünülebilir. Kesikli reaktörle uzun süreli çalışmanın sonunda ester üretiminin önce artış gösterirken sonradan azalmaya başlamış olması esterlerin bir kısmının hidroliz olmasıyla açıklanabilir. Lipaz enziminin katalitik aktivite göstermesi için, enzimin mikro çevresinde aktif olmasını sağlayacak miktarda su içermesi gerekmektedir. Ancak zamanla sentezlenen ester miktarındaki artışa bağlı olarak enzim etrafında su birikimi olacaktır. Enzim moleküllerinin mikro çevresindeki su, enzimi aktif formda tutmak ve polar bileşikleri bu çevre içinde kolayca yakalamak için gereklidir. Enzimatik sentezlerde polar olmayan organik bileşenlerin çözücü olarak seçilmeleri bunun en önemli nedenidir (Bezbradica ve ark., 2007). Enzimin aktif formda tutulması için gereken su miktarından fazla olan su organik faza geçemeyeceği için destek tarafından tutulacak ve bir süre sonra enzim-substrat etkileşimini azaltmakla kalmayıp aynı zamanda ortamda sentezlenmiş olan esterlerin bir kısmını da hidroliz edecektir. Yani reaksiyon yönü sentez yönünden hidroliz yönüne kayacaktır (Brink ve Tramper, 1985). Sürekli reaktör sisteminde ester miktarı kesikli reaktör sisteminde olduğu gibi belirgin bir azalmaya uğramamaktadır. Bu durum oluşan esterlerin kolondan uzaklaşması ve immobilize enzim ile uzun süreli etkileşime girmemesine bağlanabilir.

#### **4.10. İmmobilize Lipaz Enzimlerinin Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi**

İki farklı desteğe immobilize edilen lipaz örneklerinin 40 °C deki termal kararlılıkları 24 saat boyunca araştırılmıştır. Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ve PPL örneklerinin termal kararlılıkları incelenmiş olup Şekil 4.34. ve 4.35.'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.34.** IAAc üretiminde kullanılan immobilize CRL'nin zamana bağlı olarak termal kararlılığı (▲: Ca-Alg/Kitosan, ○:Kitosan)



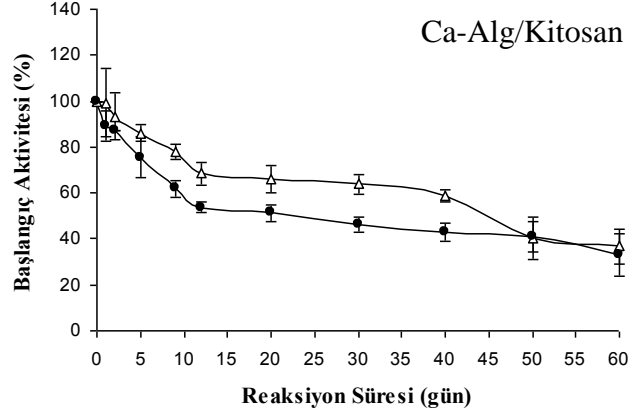
**Şekil 4.35.** IAAc üretiminde kullanılan immobilize PPL'nin zamana bağlı olarak termal kararlılığı (▲: Ca-Alg/Kitosan, ○:Kitosan)

40 °C su banyosunda bekletilen ve farklı zaman aralıklarında alınana örneklerle IAAc sentezi gerçekleştirilen immobilize lipaz örneklerinin termal kararlılıkları incelenmiş olup, genel itibariyle ilk 5 saatte zamana bağlı olarak 40°C'de bekletilen enzim örneklerinin aktivitelerinde artma gözlenmiş, ilerleyen zaman aralıklarında alınan lipaz örnekleri ile sentezlenen ester miktarında düşüşler gözlenmiştir. Ester oluşumunun zamanla azalması 40 °C immobilize formda bekletilen lipaz örneklerinin zamanla aktivitelerini kaybetmelerinden kaynaklanabilir.

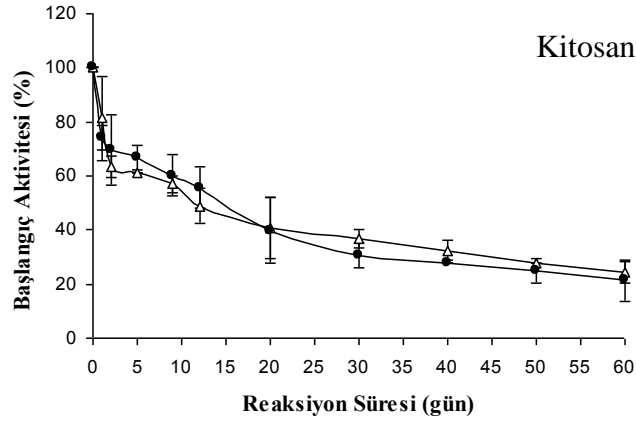
#### 4.11. Lipaz Örneklerinin İmmobilize Formda Depolama Kararlılıkları

Ca-Alg/Kitosan jele ve kitosana immobilize edilen enzimlerin 60 gün boyunca 4°C'de bekletilerek belirli periyotlarda ester üretim etkinliği IAAc için belirlenmiştir.

Şekil 4.36. ve 4.37.'de sırasıyla Ca-Alg/kitosan ve kitosan destek için elde edilen depolama kararlılıkları görülmektedir.



Şekil 4.36. IAAC üretiminde kullanılan Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ve PPL enzimlerinin depolama kararlılığı ( $\Delta$ : CRL,  $\bullet$ : PPL)



Şekil 4.37. IAAC üretiminde kullanılan Kitosan desteğe immobilize edilmiş CRL ve PPL enzimlerinin depolama kararlılığı ( $\Delta$ : CRL,  $\bullet$ : PPL)

Şekil 4.36.'da Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ve PPL örneklerinin IAAC üretimi üzerine aktiviteleri incelenmiş ve gün geçtikçe enzim aktivitesinin, buna bağlı olarak da ester oluşumunun azaldığı gözlenmiştir. Aynı şekilde Şekil 4.37. incelendiğinde kitosana immobilize edilmiş lipaz örneklerinin gün geçtikçe aktivitelerini yitirdikleri gözlenmiştir. Ancak her iki destek türü için enzim aktivitesi incelendiğinde kitosanın Ca-Alg/Kitosan jele göre daha hızlı aktivitesini kaybettiği söylenebilir. Bu

durum kitosana immobilize edilmiş lipaz örneklerinin, kitosan desteğin yüzeyinde bulunarak daha hızlı, Ca-Alg/Kitosan jelle hapsedilerek daha yavaş aktivite kaybetmesiyle açıklanabilir. 60 günün sonunda IAAC oluşumunda Ca-Alg/Kitosan jel CRL ile % 36,8 PPL ile % 33 aktivite göstermiştir. Kitosan destek ise CRL ile % 24,4 PPL ile ise % 21,3 aktivite göstermiştir. Hung ve ark. (2003), 25 °C’de beklettikleri serbest ve immobilize lipaz örneklerinin 7 günlük depolama kararlılıklarını incelemişlerdir. 7 günün sonunda serbest lipazın başlangıca göre % 35, immobilize lipazın ise % 67 aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Chiou ve Wu (2004), 25 °C’deki serbest lipazın ve ıslak ve kuru olmak üzere iki farklı immobilize lipaz örneklerinin 30 gün boyunca depolama kararlılıklarını araştırmışlardır. 30 günün sonunda serbest lipazın başlangıca göre % 5 , kuru immobilize lipaz örneğinin % 50 ve yaş immobilize lipaz örneğinin neredeyse hiç aktivite kaybetmediğini kaydetmişlerdir.

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmanın ilk aşamasında ester seçimi yapılmış, literatürle örtüşen ve GC-MS analizleri ile de varlığı gösterilen izoamil asetat (muz aroması) ve hekzil asetat (armut aroması) esterleri seçilmiştir.

Reaksiyonun gerçekleşeceği ortamı belirlemek amacıyla farklı çözücü ortamları denenmiş, ester oluşumunun en iyi heptan ortamında gerçekleştiği, en düşük verimin ise çözücüsüz ortamda gerçekleştiği gözlenmiştir. Kullanılan çözücüler içinde karbon sayısı en yüksek olan heptandır ve en yüksek verimlilik bu ortamda gözlenmiştir. Daha yüksek verimlilik elde etmek için karbon sayısı daha fazla olan (n-oktan gibi) çözücüler kullanılabilir.

Ca-Alg/Kitosan jele en uygun immobilizasyon koşulları CRL ve PPL için % 1,5 (w/v) Na-Alg, % 1,5 (w/v) Kitosan ve % 0,15 (v/v) GAL olarak bulunmuştur. Ayrıca ester sentezinde kullanılacak olan bu jellerin içerdikleri su oranlarına göre etkinlikleri incelenmiş, bağıl ağırlığı başlangıç ağırlığına göre % 27 olan jeller kullanılmıştır. Ca-Alg/Kitosan jeller kullanılarak üretilen ester miktarlarının sonuçlarına göre enzimin en iyi bu koşullarda etkin olduğu gözlenmiştir.

Kitosan desteğe enzim immobilizasyonundan önce bağlanacak olan arakol seçimi yapılmış, en iyi ester üretimini 1,3 DAP üzerinden bağlanan lipaz örnekleri göstermiştir. Bu aşamadan sonra kitosan destek, arakol bağlanmadan ve bağlandıktan sonra kullanılacak olan GAL'ın farklı derişimleri kullanılarak optimize edilmiş en iyi verimliliğin % 0,5 (v/v) GAL ile etkinleştirilen kitosanın gösterdiği gözlenmiştir.

Ca-Alg/Kitosan jele lipazın bağlanma oranı kitosan desteğe göre daha yüksek çıkmıştır. Ancak gram destek başına ester üretim etkinliği Ca-Alg/Kitosan jele göre yaklaşık 10 kat daha fazla bulunmuştur.

İmmobilize lipaz örneklerinin en yüksek etkinlik gösterdikleri sıcaklık noktası belirlenmiş, Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilen her iki lipaz örneğinde 45 °C'de, kitosana immobilize edilen lipaz örnekleriyle yapılan ester sentezinde ise 40 °C'de en yüksek verimlilik elde edilmiştir.

Substrat derişimlerinin ester üretimi üzerine etkisi ayrıntılı olarak incelenmiştir. Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş CRL ve PPL örnekleri ile sentezlenen iki esterinde 50 mM asit ve 50mM alkol bileşim oranında en iyi verimliliği gösterdiği gözlenmiştir. Kitosan desteğe immobilize edilen CRL ile IAAC sentezi

gerçekleştirildiğinde 50 mM asit ve 75 mM alkol bileşimi ile, HAc sentezinde ise 50 mM asit ve 25 mM alkol bileşiminde en yüksek verimlilik elde edilmiştir. PPL kullanılarak gerçekleştirilen IAAC sentezinde 50 mM asit ve 50 mM alkol, HAc sentezinde ise 50 mM asit ve 25 mM alkol bileşimlerinin en yüksek verimliliği gösterdikleri bulunmuştur. Genelde asit ve alkolün yüksek derişimlerinde ester üretim etkinliğinde düşüşler gözlenmiş, bu da yüksek derişimlerde hazırlanan substratların enzimi inhibe etmelerine bağlanmıştır.

Optimum koşullarda hazırlanmış Ca-Alg/Kitosan jele immobilize edilmiş lipaz örnekleri ile kesikli reaktörde IAAC sentezi gerçekleştirilmiş, CRL ile 4 saatte, PPL ile 5 saatte en yüksek verimliliğe ulaşılmıştır. HAc sentezinde ise her iki lipaz örneğinde de 4 saatte en fazla verim elde edilmiştir. Kitosan desteğe immobilize edilen CRL ve PPL örnekleri ile IAAC ve HAc esterlerinin üretimlerinin en fazla 5 saatte gerçekleştiği belirlenmiştir.

Sürekli reaktör kullanılarak üretilen IAAC ve HAc esterlerinin üretimlerinin zamanla arttığı ancak IAAC üretiminin HAc'a göre daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Her iki destek türüne immobilize edilen CRL ve PPL örneklerinin termal kararlılıkları incelenmiş, ilk 5 saatten sonra lipaz örneklerinin ester üretimindeki etkinliklerinin azaldığı gözlenmiştir.

İmmobilize enzimler için yapılan depolama kararlılığı çalışmalarında 60 günün sonunda lipaz örneklerinin ilk günlük etkinliklerini göstermeyerek aktivite kaybettikleri kaydedilmiştir. Kitosan desteğin Ca-Alg/Kitosan jele göre daha hızlı aktivite kaybettiği kaydedilmiştir.

Çalışma kapsamı farklı aromatik esterlerin sentezlenmesi ile genişletilebilir. Ayrıca sadece aromatik esterler değil, endüstriyel öneme sahip farklı esterlerin sentezi de gerçekleştirilebilir. Ca-Alg jele kitosandan başka (jelatin, pektin gibi) polimerler karıştırılarak ester sentezinde kullanılacak farklı kompozit jeller de elde edilebilir.

**KAYNAKLAR**

- Altun, G., D., Cetinus, S., A., 2007. Immobilization of Pepsin on Chitosan Beads. **Food Chemistry**, 100, 964-971.
- Anonim, 2009. Na-Alg'ın kimyasal yapısı. [www.fao.org/docrep/W6355E/w6355e1w.gif](http://www.fao.org/docrep/W6355E/w6355e1w.gif)
- Anonim, 2009. Sodyum Alginat. [www.hammaddeler.com](http://www.hammaddeler.com)
- Anonim, 2009. Kitosan. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kitosan>
- Anonim, 2009. Ca-Alg molekülünün kimyasal yapısı. <http://blog.khymos.org/wp-content/2006/09/calcium-alginate.jpg>
- Anonim, 2009. Ester Seçimi. <http://en.wikipedia.org/wiki/Ester>
- Anonymous, 2009. Kitosanın kimyasal yapısı <http://www.nutrimart.com/chitosan>
- Bayramoğlu, G., Kaya, B., Arica, M., Y., 2005. Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto spacer-arm attached poly(GMA-HEMA-EGDMA) microspheres. **Food Chemistry**, 92, 261-68.
- Bezbradica, D., Mijin, D., Marinkovic, S., S., Knezevic, Z., 2007. The effect of substrate polarity on the lipase-catalyzed synthesis of aroma esters in solvent-free systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 45, 97-101.
- Chiou, S., H., Wu, W., T., 2004. Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase on Chitosan with Activation of the Hydroxyl Groups. **Biomaterials**, 25, 197-204.
- Chiang, W., D., Chang, S., W., Shieh, C., J., 2003. Studies on the optimized lipase-catalyzed biosynthesis of cis-3-hexen-1-yl acetate in n-hexane, **Process Biochemistry**, 38, 1193-99.
- Çetinus, Ş., A., Öztop, H., N., 2003. Immobilization of Catalase into Chemically Crosslinked Chitosan Beads. **Enzyme and Microbial Technology**, 32, 889-894.
- Dave, R., Madamwar, D., 2006. Esterification in Organic Solvents by Lipase Immobilized in Polymer of PVA-alginate-boric acid. **Process Biochemistry**, 41, 951-955.
- Güvenç, A., Kapucu, N., Mehmetoğlu, Ü., 2002. The Production of Isoamil Acetate Using Immobilized Lipases in a Solvent-Free System. **Process Biochemistry**, 38, 379-386.
- Hung, T., C., Giridhar, R., Chiou, S., H., Wu, W., T., 2003. Binary Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase on Chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 26, 69-78.
- Karra-Châabouni, M., Ghamgui, H., Bezine, S., Rekik, A., Gargouri, Y., 2006. Production of flavour esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. **Process Biochemistry**, 41, 1692-98.
- Kıran, Ö., E., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N., 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. KSÜ. Fen ve Mühendislik dergisi, 9(1):12-19.
- Kumar, R., Modak, J., Madras, G., 2005. Effect of the chain length of the acid on the enzymatic synthesis of flavors in supercritical carbon dioxide. **Biochemical Engineering Journal**, 23, 199-202.
- Lee, K., K., B., Poppenborg, L., H., Stuckey, D., C., 1998. Terpene ester production in a solvent phase using a reverse micelle-encapsulated lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, 23, 253-260.



- Lu, J., Nie, K., Wang, F., Tan, T., 2008. Immobilized lipase *Candida* sp. 99-125 catalyzed methanolysis of glycerol trioleate: Solvent effect. **Bioresource Technology**, 99, 6070-6074.
- Matsumoto, M., Ohashi, K., 2002. Effect of immobilization on thermostability of lipase from *Candida rugosa*. **Biochemical Engineering Journal**, 14, 75-77.
- Matto, M., Husain, Q., 2006. Entrapment of porous and stable concanavalin A-peroxidase complex into hybrid calcium alginate-pectin gel. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 81, 1316-1323.
- Othman, S., S., Basri, M., Hussein, M., Z., Rahman, M., B., A., Rahman, R., N., Z., A., Salleh, A., B., Jasmani, H., 2008. Production of highly enantioselective (-)-methyl butyrate using *Candida rugosa* lipase immobilized on epoxy-activated supports. **Food Chemistry**, 106, 437-443.
- Ozyilmaz, G., 2009. The effect of spacer arm on Hydrolytic and Synthetic Activity of *Candida Rugosa* Lipase immobilized on silica gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 56, 231-36.
- Ozyilmaz, G., Gezer, E., 2009. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, (baskıda).
- Park, E., Y., Sato, M., Kojima, S., 2006. Fatty acid methyl ester production using lipase-immobilizing silica particles with different particle sizes and different specific surface areas. **Enzyme and Microbial Technology**, 39 889-96.
- Petkar M., Lali, A., Caimi, P., Daminati, M., 2006. Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 39, 83-90.
- Salah, R., B., Ghamghui, H., Miled, N., Mejdoub, H. and Gargouri, Y., 2007. Production of Butyl Acetate Ester by Lipase from Novel Strain of *Rhizopus Oryzae*. **The Society for Biotechnology**, 103, 368-372.
- Stark, M., B., Holmberg, K., 1989. Covalent immobilization of lipase in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, 34, 942-50.
- Telefoncu, A., 1997. **Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu**, 193-312.
- Wu, J., C., Selvam, V., Teo, H., H., Chow, Y., Talukder, M., M., R. & Choi, W., J., 2006. Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase by Cross-Linking with Glutaraldehyde Followed by Entrapment in Alginate Beads. **Biocatalysis and Biotransformation**, 24(5), 352-357.
- Won,, K., Kim, S., Kim, K., J., Park, H., W., Moon, S., J., 2005. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. **Process Biochemistry**, 40, 2149-54.
- Yahya, A., R., M., Anderson, W., A., Moo-Young, M., 1998. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, 23, 438-450.
- Zaidi, A., Gainer, J., L., Carta, G., Mrani, A., Kadiri, T., Belarbi, Y., Mir, A., 2002. Esterification of fatty acids using nylon-immobilized lipase in n-hexane: kinetic parameters and chain-length effects. **Journal of Biotechnology**, 93, 209-16.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında büyük bir titizlik, sabır ve özveriyle bana destek olan, gerçekleştirdiği bilimsel projelere beni dahil ederek ufkumu genişleten, tez çalışmalarımı yürütmem için bana iyi bir çalışma ortamı hazırlayan değerli danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Gül ÖZYILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu bilimsel projenin gerçekleşmesine katkı sağlayan Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında desteği ve yardımlarıyla hep yanımda olan hayat yoldaşım Erhan YAĞIZ'a ve meslektaşım Fethiye GANİMGİL'e ve beni bu günlere getiren, her zaman maddi-manevi desteğini gördüğüm sevgili aileme sonsuz teşekkürler..

## ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Hatay'ın Antakya ilçesinde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Antakya'da tamamladım. 2003 yılında girdiğim Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesinden 2007 yılında mezun oldum. Aynı yıl Mustafa Kemal Üniversitesi Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans yapmaya hak kazandım. Yüksek Lisans eğitimim sırasında Tübitak araştırma projelerinde 1 yıl bursiyer olarak çalıştım.