

TC.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KESTANEDEN (*CASTANEA SATIVA*)
SAFLAŞTIRILAN LİPAZ ENZİMİNİN ÇEŞİTLİ
TAŞIYICILARA İMMOBİLİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra AYAR

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Tez Danışmanı : Bahar BİLGİN SÖKMEN

Aralık 2017

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KESTANEDEN (*CASTANEA SATIVA*)
SAFLAŞTIRILAN LİPAZ ENZİMİNİN ÇEŞİTLİ
TAŞIYICILARA İMMOBİLİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra AYAR

Enstitü Anabilim Dalı : Fen Bilimleri Enstitüsü

Bu tez 11/12/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

..... Dr.
.....
Jüri Başkanı

..... Dr.
.....
Üye

.... Dr.
.....
Üye

..... Dr.
Enstitü Müdürü

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Esra AYAR

11/12/2017

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca, tez çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde yardım ve desteğini hiç esirgemeyen çok değerli danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Bahar BİLGİN SÖKMEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca cihaz kullanımı ve bilgileri konusunda deneyim ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Kimyager Rıdvan İLGÜN'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve bugünlere gelmemi sağlayan canım aileme, daima yanımda olan biricik eşime ve tez çalışmam boyunca yardımlarından dolayı yüksek lisans arkadaşım Tuğba KARADİREK'e en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No: FEN-BAP-C-140316-05) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VI
TABLolar LİSTESİ.....	VIII
ÖZET.....	IX
SUMMARY	X
BÖLÜM 1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler ve Genel Özellikleri.....	1
1.1.1. Enzim Kullanmanın Avantajları.....	3
1.2. Lipazlar.....	3
1.2.1. Lipazların Kullanım Alanları.....	4
1.2.1.1. Lipazların Endüstriyel Uygulamaları.....	4
1.2.1.1.1. Gıda Sanayinde Lipazlar.....	6
1.2.1.1.2. Deterjan Endüstrisinde Lipazlar.....	6
1.2.1.1.3. İlaç Endüstrisinde Lipazlar.....	7
1.2.1.1.4. Kozmetik ve parfüm endüstrisinde lipazlar.....	7
1.2.1.1.5. Deri endüstrisinde lipazlar.....	7
1.2.1.1.6. Kâğıt Hamuru ve Kâğıt Endüstrisinde Lipazlar.....	7
1.2.1.1.7. Organik Sentezde Lipazlar.....	7
1.2.1.1.8. Biyosensör Olarak Lipazlar.....	8
1.3. Enzim İmmobilizasyonu ve Tarihi.....	8
1.3.1. İmmobilizasyonun Avantaj ve Dezavantajları.....	9
1.3.2. İmmobilizasyon Yöntemleri.....	11
1.3.2.1. Taşıyıcıya Bağlama Metodu.....	12
1.3.2.1.1. Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi.....	13

1.3.2.1.2. İyonik Bağlama Yöntemi.....	14
1.3.2.1.3. Kovalent Bağlama Yöntemi.....	14
1.3.2.2. Çapraz Bağlama Yöntemleri.....	17
1.3.2.3. Tutuklama Yöntemleri.....	18
1.3.2.3.1. Kafes yöntemi.....	19
1.3.2.3.2. Mikrokapsülleme yöntemi.....	20
1.3.2.3.3. Sol-jel tutuklama.....	20
1.3.3. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması.....	21
BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	23
BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. DeneYlerde Kullanılan Cihazlar.....	25
3.2. Metod.....	26
3.2.1. Lowry Yöntemi ile Protein Miktar Tayini.....	26
3.2.1.1. Ayıraçlar.....	26
3.2.1.2. Deneyin Yapılışı.....	26
3.2.1.3. Bovin Serum Albumini Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi.....	26
3.2.2. Lipaz Aktivitesi Tayini.....	27
3.2.2.1. Esteraz Aktivitesi Tayini.....	27
3.2.2.1.1. Ayıraçlar.....	27
3.2.2.1.2. Deneyin Yapılışı.....	27
3.2.3. Kestane Tohumu Lipazının İmmobilizasyonu.....	28
3.2.3.1. Kovalent Bağlama ile İmmobilizasyon.....	28
3.2.3.2. Adsorpsiyon Yöntemi ile İmmobilizasyon.....	29
3.2.3.2.1. Kestane Tohumu Lipazının Alümina'ya İmmobilizasyonu.....	29
3.2.3.2.2. Kestane Tohumu Lipazının Cam Boncuklara İmmobilizasyonu.....	29
3.2.3.3. İyonik Bağlama Yöntemi ile İmmobilizasyon.....	30
3.2.4. Lipazın Çeşitli Taşıyıcılardaki % Tutuklanmaları.....	30
3.3. İmmobilize Kestane Tohumu Lipazının Esteraz Aktivitesine Göre Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi.....	30

3.3.1. İmmobilize Kestane Tohumu lipazının Esteraz Aktivitesi ve Protein Miktar Tayini.....	31
3.3.2. İmmobilize Lipazın Esteraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisinin İncelenmesi	31
3.3.3. Esteraz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi.....	31
3.3.4. İmmobilize Lipazın Esteraz Aktivitesine Zamanın Etkisi.....	32
BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	33
4.1. Lipazın Çeşitli Taşıyıcılardaki % Tutuklanmaları.....	33
4.2. İmmobilize Lipazın Kinetik Özellikleri.....	33
4.2.1. İmmobilize Lipaz Esteraz Aktivitesine pH'nın Etkisi.....	33
4.2.2. İmmobilize Lipaz Esteraz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi.....	37
4.2.3. İmmobilize Lipazın Esteraz Aktivitesine Zamanın Etkisi.....	41
BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ	45
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

kDa	:	Kilo Dalton
μmol	:	Mikromol
μg	:	Mikrogram
$\mu\text{g/ml}$:	Mikrogram / Mililitre
μL	:	Mikrolitre
mM	:	Milimolar
mg/ml	:	Miligram/Mililitre
mL	:	Mililitre
M	:	Molar
Nm	:	Nanometre
$^{\circ}\text{C}$:	Santigrat Derece
%	:	Yüzde



ŞEKİLLER LİSTESİ

1.1. Enzim Substrat İlişkisi.....	1
1.2. Lipazların katalitik aktivasyonu.....	4
1.3. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Sınıflandırılması.....	12
1.4. Fizisel Adsorpsiyon.....	13
1.5. Kovalent bağlama.....	14
1.6. Çapraz Bağlanma.....	18
1.7. Enzim Tutuklama.....	19
1.8. Enzimin Bir Kapsül İçerisinde Tutuklanması.....	20
1.9. Sol-jel matrikste enzim tutuklanması.....	21
4.1. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Silikajele İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği.....	32
4.2. Adsorpsiyon Yöntemi ile Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği.....	32
4.3. Kovalent Olarak Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği.....	33
4.4. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Deniz Kumuna İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği.....	33
4.5. İyonik Bağlama Yöntemi ile Amberlite'e İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği.....	34
4.6. Adsorpsiyon Yöntemi ile Alüminaya İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği.....	34
4.7. Kestane Lipazı ile İmmobilize Lipazların Optimum pH Grafiği.....	35
4.8. Adsorpsiyon Yöntemi ile Alüminaya İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği.....	35
4.9. İyonik Bağlama Yöntemiyle Amberlite'e İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği.....	36

4.10. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Deniz Kumuna İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği.....	36
4.11. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Silikajele İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği.....	37
4.12. Adsorpsiyon Yöntemi ile Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği.....	37
4.13. Kovalent Olarak Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği.....	38
4.14. Kestane Lipazı ile İmmobilize Enzim Optimum Sıcaklık Grafiği.....	38
4.15. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Deniz Kumuna İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine Zamanın Etkisi.....	40
4.16. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipaz Aktivitesine Zamanın Etkisi.....	40
4.17. Kovalent Bağlama ile Silikajele İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine Zamanın Etkisi.....	41
4.18. Adsorpsiyon Yöntemi ile Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine Zamanın Etkisi.....	41
4.19. Adsorpsiyon Yöntemi ile Aluminaya İmmobilize Edilen Lipaz Aktivitesine Zamanın Etkisi.....	42
4.20. İyonik Bağlama Yöntemi ile Amberlite'e İmmobilize Edilen Lipaz Aktivitesine Zamanın Etkisi.....	42
4.21. İmmobilize ve Doğal Lipaz Aktivitesine Zamanın Etkisi.....	43

TABLÖLAR LİSTESİ

1.1. Enzimlerin Kullanım Alanları.....	2
1.2. Mikrobiyal Lipazların Sanayide Önemli Kullanım Alanları.....	5
1.3. Enzimlerin Kovalent Bağlama Metotları: Hidroksil Fonksiyonlu Matriksin Aktivasyonu.....	17
1.4. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması.....	22
4.1. Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilize Edilmiş Lipaz Enziminin % Tutuklanmaları.....	31
4.2. İmmobilize ve Serbest Enzimin Optimum pH ve Sıcaklık Değerleri.....	39

KESTANEDEN (*CASTANEA SATIVA*) SAFLAŞTIRILAN LİPAZ ENZİMİNİN ÇEŞİTLİ TAŞIYICILARA İMMOBİLİZASYONU

ÖZET

Lipazlar, sistematik adı triaçilgliserol açilhidrolaz olup, sulu ortamda triaçilgliserollerin hidrolizini katalizleyerek di- ve monoaçilgliserollere ve gliserole dönüştürebilen, susuz ortamda ise ester bağlarını oluşturabilen enzimlerdir.

Enzimleri kimya ve biyoteknoloji alanında daha çekici hale getirebilmek için özellikle son 30 yıl içinde enzim immobilizasyonu üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. İmmobilize enzimlerin endüstride, birçok alanda kullanımının yaygınlaştığı görülmektedir.

Bu çalışmada, kestane (*Castanea sativa*) tohumundan ilk kez saflaştırılan lipaz enziminin çeşitli taşıyıcılara adsorpsiyon, kovalent ve iyonik bağlama yöntemleri ile immobilize edilmesi ve kinetik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. İmmobilize edilen lipaz enziminin kinetik özellikleri incelenerek serbest lipaz enzimi ile kıyaslaması yapılmıştır.

Saflaştırılan lipaz çeşitli taşıyıcılar üzerine adsorpsiyon, kovalent ve iyonik bağlama yöntemleri ile immobilize edildi. Protein miktarı Lowry yöntemine göre, lipaz esteraz aktivitesi ise Erlanson yöntemine göre tayin edildi.

Kestaneden saflaştırılan lipazın optimum pH'sının 10, optimum sıcaklığının 30°C olduğu bulundu. Kestane lipazının çeşitli taşıyıcılar (Silikajel, deniz kumu, Amberlite IRA-900, alumina, cam boncuk) üzerine immobilize edilerek immobilize lipazların optimum pH, optimum sıcaklık, optimum reaksiyon süresinin tayini gibi kinetik özellikleri de incelendi.

Anahtar Kelimeler: Lipaz, immobilizasyon, kestane (*Castanea sativa*)

LIPASE PURIFICATION FROM THE SEEDS OF CHESTNUT (*CASTANEA SATIVA*) AND ITS IMMOBILIZATION ON VARIOUS SUPPORTS

SUMMARY

Lipases are enzymes whose systematic name is triacylglycerol acylhydrolase which is able to catalyze the hydrolysis of triacylglycerols in aqueous medium to convert di and monoacylglycerols and glycerol to ester bonds in anhydrous medium

In order to make the enzymes more attractive in the field of chemistry and biotechnology, the focus has been on enzyme immobilization in the last 30 years. The use of immobilized enzymes seems to be widespread across the industry.

In this study, it is aimed to investigate the immobilization and kinetics of lipase enzyme purified from chestnut (*Castanea sativa*) seeds by adsorption, covalent and ionic binding methods to various carriers. The kinetic properties of the immobilized lipase enzyme were examined and compared with the free lipase enzyme.

Purified lipase was immobilized on various supports by adsorption, covalent and ionic attachment methods. In the purification process, the protein content was determined by using Lowry method, and lipase esterase activity was assayed with Erlanson's method. Immobilization of the lipase purified from chestnut seeds on several supports (Silikagel, seasand, Amberlite IRA-900, alumina, glass beads), kinetic properties such as optimum pH and temperature, optimum reaction time were also examined.

Keywords: Lipase, immobilization, chestnut (*Castanea sativa*)



BÖLÜM 1. GİRİŞ

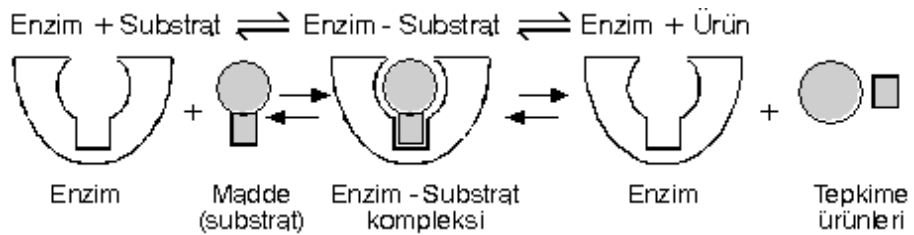
1.1. Enzimler ve Genel Özellikleri

Enzimler, canlı sistemlerde gerçekleşen kimyasal reaksiyonlarda bulunan, hiçbir yan ürün oluşturmayan, biyolojik katalizörlerdir [1]. Reaksiyonları hızlandırırlar.

Enzimlerin yapısında proteinle birlikte protein olmayan kısım bulunur. Protein olmayan kısım metal iyonu ise kofaktör, karmaşık yapıda organik bir madde ise koenzim olarak adlandırılır. Kofaktörler birçok enzimin katalitik etki gösterebilmesi için gerekli olan maddelerdir. Kimi zaman reaksiyon için ikisi de gereklidir. Enzimler sıcaklıkta etkisini kaybederken, kofaktörler sıcaklığa karşı dayanıklıdırlar. Etkin olan enzim-kofaktör kompleksine *holoenzim* denir. Kofaktörsüz proteine ise apoenzim adı verilir. Apenzim aktif değildir [2].

Enzimlerin etki gösterdiği maddeye substrat denir. Biyokimyasal reaksiyonlarda substrat ürüne dönüşürken, enzim hiç başkalaşıma uğramaz. Reaksiyon esnasında enzimler bir veya birkaç atomu ya da fonksiyonel grubu substrattan ayırır veya substrata eklerler.

Enzim molekülünde kofaktör ve koenzimlerin olduğu, enzim-substrat kompleksinin biçimlendiği küçük bir alan aktif merkezi bulundurur. Aktif merkezde substrat bağlanma merkezi ve bir ya da daha fazla katalitik aktivite bölgeleri yer almaktadır. Buralar aminoasit kalıntılarında meydana gelmiş ve özel geometrisi olan alanlardır.



Şekil 1.1. Enzim-Substrat İlişkisi [3]

Enzimler reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürürler. Bir enzim her zaman bir tür tepkimeyi yönetir. Substrat yüzeyi çoğaldıkça enzim aktivitesi de artar. Enzimler hem sulu hem de organik ortamda aktiftirler. Enzimlerin yer aldığı reaksiyonların birçoğu tersinirdir [2].

Enzimler, genellikle canlı ortamlarda etki gösterirken gerekli şartlar sağlandığında dış ortamlarda da etkilerini gösterebilirler. Bu nedenle enzimler birçok sektörde kullanılabilen olup, endüstriyel alanda birçok süreçte kullanılabilen olanağı sağlanmaktadır. Enzimler, canlı ortamlarda çok önemli metabolik olayları yerine getirirken, ayrıca sanayide birçok farklı amaç için değerlendirilmektedir [4].

Tablo 1.1. Enzimlerin Kullanım Alanları [5]

Enzim	Kullanım alanı
Kolesterol oksidaz	Tıp'ta kolesterol tayininde
Proteazlar, lipaz, amilaz	Deterjan sanayinde
Laktaz, mikrobiyal proteazlar	Süt ve süt ürünleri endüstrisinde
Pektinaz, selülaz, 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, oksidaz	Eczacılıkta

Enzimler, sistematik olarak etki ettikleri tepkime türüne göre isimlendirilmekte ve gruplandırılmaktadır. Buna sisteme göre enzimler altı gruba ve her grup alt sınıflara ayrılmıştır:

- Oksidoredüktazlar: Biyolojik redoks tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir.
- Transferazlar: bu tür enzimler bazı grupların bir bileşik molekülünden diğerine transferini katalizler.

- c) Hidrolazlar: Ester, eter, amid (peptid), asit anhidrit, C-C, C-Halojen, P-N ve glikolizit bağlarına etki ederek bu moleküllerin hidroliz tepkimelerini katalizler ve etki ettikleri bağ türüne göre de alt sınıflara ayrılırlar. Lipaz enzimi bu gruptadır.
- d) Liyazlar: Organik bir bileşikteki C-C, C-O, C-S ve C-Halojen bağlarının uzaklaştırılıp, çift bağların oluşturulduğu tepkimeleri kataliz etmektedirler.
- e) İzomerazlar: Molekül içi çevrilmeleri, Geometrik ya da optik izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizlemektedirler.
- f) Ligazlar: Bu sınıftaki enzimler, iki molekülden yeni C-O, C-N, C-S, C-C bağlarını oluşturarak birleşmesini katalizler [1].

1.1.1. Enzim Kullanmanın Avantajları

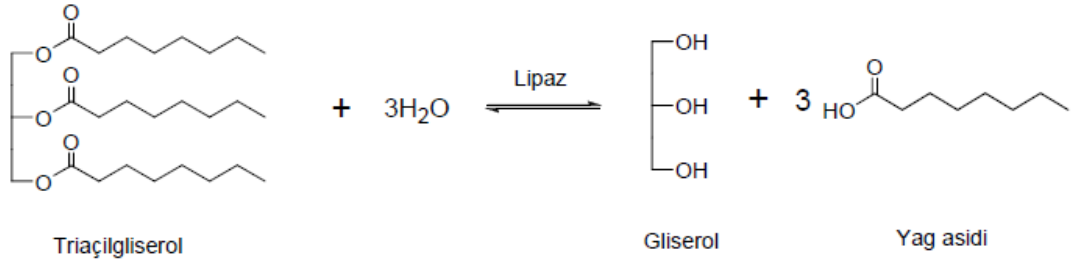
1. Kimyasal katalizörlere göre tepkimeyi daha fazla hızlandırır.
2. Reaksiyon ortamından geri dönüştürülerek yeniden yararlanılabilirler.
3. Kemo-selektivite, regio-selektivite, diastereo-selektivite ve enantio-selektivite gösterirler.
4. Reaksiyonun aktivasyon enerjisini azaltarak reaksiyonu düşük enerjili ve düşük sıcaklıkta meydana getirirler [6].
5. Enzimlerin birçok türde naturel kontrol mekanizmaları bulunmaktadır. Enzimlerin aktivitesi, içerisinde oldukları koşullara göre yeniden ayarlanabilir.
6. Enzimler, reaksiyonun tipine ve substrata özgündür. Enzim bulunan reaksiyonlarda yan ürün meydana gelmediği için verim %100' dür. Süreç aşamaları daha azdır [7].

1.2. Lipazlar

Lipazlar, hidrolaz sınıfı olan, tri-, di- ve monoasilgliserollerin (hayvan, bitki ve mikrobiyal yağların temel bileşeni) karboksil ester bağlarının parçalanmalarını (hidrolizini) sağlayan enzimlerdir [8,9]. Lipaz enziminin katalizlediği bu reaksiyonlar genellikle tersinirdir.

Lipaz enzimlerinin birçoğu suda çözünür, bununla birlikte suda çözünmeyen substratlar üzerinde etki gösterir [10]. Lipazların doğal substratları olan uzun zincirli yağ asitlerinin gliserol esterleri, suda çok az çözünmektedir. Lipaz enzimleri, suyla karışmayan substrat fazı ile enzimin çözündüğü sulu faz arasındaki ara yüzeyde ester

bağlarının hidroliz reaksiyonunu katalize ederler. Lipazların suda çözünen ester bileşiklerine karşı aktiviteleri oldukça düşüktür [8].



Şekil 1.2. Lipazların Katalitik Aktivasyonu

Günümüzde lipazlar özellikle gıda sanayinde; peynir, tereyağı, sos ve çorba gibi birçok maddenin imalatında çok yaygın olarak kullanılmaktadır [9-11]. Lipazların deterjan sanayinde en önemli uygulama alanı; evlerde ve sanayide çamaşır ve bulaşık yıkama deterjanlarına katılmalarıdır [8-10]. Kağıt sanayisinde; üretilen kağıt hamurundan, trigliseridler ve balmumu olarak bilinen ağacın hidrofobik bileşenlerini ayırmak için de lipaz kullanılmaktadır [8].

Lipazlar hem hidroliz hem de uzun zincirli açilgliserollerin sentezini katalizlemektedirler. Bu durum lipazların organik kimyada enzimler arasında en fazla kullanılan enzim olduğunu gösterir [12].

Endüstriyel uygulamalarda lipazlar halen serbest olarak kullanılmasına karşın günümüzde enzimlerin tekrar tekrar kullanılması ile teknolojik süreçlerin ekonomisini daha iyi hale getirmek ve klasik enzimatik yöntemlerde görülen ürün ile enzimin ayrılma güçlüklerini engellemek amacıyla, lipazlar immobilize edilmektedir [13-16].

1.2.1. Lipazların Kullanım Alanları

1.2.1.1. Lipazların Endüstriyel Uygulamaları

Endüstriyel alandaki potansiyelinden dolayı bakteriyel ve fungal lipaz üretimi yaygınlaşmıştır. Protein özütleme ve saflaştırma yöntemleri, genetik alanda yapılan

çalışmaların geliştirilmesi ile lipaz katalizli tepkimelerin alışlagelmiş kimyasal yöntemlere göre, ticari açıdan daha uygun bir seçenek oluşturması beklenilmektedir. Ticari enzimlere olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Enzimlerin katalizlediği tepkimeler kimyasal yöntemlere kıyasla daha ucuz ve de daha kolaydır. Enzimler basta gıda, eczacılık, deterjan, tekstil ve kozmetik olmak üzere birçok endüstriyel alanda sıklıkla kullanılmaktadır [12].

Tablo 1.2. Mikrobiyal Lipazların Bazı Endüstriyel Kullanım Alanları [17]

Sanayi Dalı	Etki	Ürün
Unlu Mamuller	Lezzet arttırıcı, raf ömrü uzatıcı	Unlu mamuller
İçecek	Aroma geliştirici	İçecekler
Kimya	Enantiyo seçicilik	Kiral kimyasallar
Temizleme	Sentez hidroliz	Kimyasallar sörfektanlar gibi temizleme ajanlarının uzaklaştırılması
Kozmetik	Sentez	Emülsifiye ediciler, nemlendirme ajanları
Süt ve Süt Mamulleri	Süt yığınının hidrolizi, peynirin olgunlaştırılması, tereyağının modifiye edilmesi	Lezzet ajanları, peynir, tereyağı
Katı ve Sıvı Yağlar	Transesterifikasyon Hidroliz	Kakao yağı, margarin yağ asitleri, gliserol, mono ve digliseridler
Soslar	Kalite geliştirilmesi	Mayonez, krema
Sağlıklı Gıdalar	Transesterifikasyon	Sağlıklı gıdalar
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri
Et ve Balık	Lezzetin geliştirilmesi ve yağın uzaklaştırılması	Et ve balık ürünleri
Kağıt	Hidroliz	Kağıt ürünleri
Eczacılık	Transesterifikasyon	Özellikle lipitler sindirim destekçileri

1.2.1.1.1. Gıda Sanayinde Lipazlar

Son zamanlarda doğal ürünlere olan ilginin artmasıyla beraber gıda endüstrisinde geleneksel kimyasal işlemler yerine enzimlerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Günümüzde lipazlar özellikle peynir, tereyağı, sos ve çorba gibi birçok gıdanın üretiminde çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İtalyan peynirlerinde tadın meydana getirilmesi, Çedar peynirinde olgunlaşmanın çabuklaştırılması ve işlenmiş mavi peynirde tadın iyileştirilmesi süreçleri lipaz enziminin yardımlarıyla gerçekleştirilen işlemler arasında gösterilebilir. Lipaz eklenmesi ilk olarak kısıp-zincirli (C₄-C₁₄) yağ asitlerinin açığa çıkmasıyla beraber sabun gibi bir tadın elde edilmesine neden olur. Lipaz enzimiyle kısmen hidrolize edilen tereyağı, kaymağımsı bir tada sahip olmasıyla beraber, sıvı yağlar, katı yağlar, tahıllar, şekerlemeler, unlu mamuller, patlamış mısır ve tüketime hazır gıdalar gibi çeşitli gıda maddelerine ilave edilmektedir.

Lipaz enzimiyle modifikasyona uğratılmış hamurlara ve unlu mamüllere, şekerlemelere, kremalara ve kahve beyazlatıcılarına süt tadı vermesi için eklenmektedir. Süt yağlarının hidroliz reaksiyonu da lipaz tarafından kontrol edilmektedir. Lipaz kullanılan süt endüstrisinde, lipaz miktarı, pH, sıcaklık ve emülsiyon konsantrasyonunun belirli değerlerde tutulması spesifik yağ asitlerinin kontrollü açığa çıkmasını sağlar.

1.2.1.1.2. Deterjan Endüstrisinde Lipazlar

Lipazların deterjanlardaki kullanımı en yaygın ticari uygulamalardandır. Toplam lipaz satışının % 32'sini deterjan enzimleri oluşturur [12, 18].

Enzimler deterjanlardaki istenmeyen kimyasalların uzaklaştırılmasını sağlar. Aynı zamanda enzimler zararlı kalıntı bırakmadan biyolojik olarak uzaklaştırılabilirler. Her sene üretilen yaklaşık 13 milyar ton deterjana 1000 ton lipaz eklenmektedir. Deterjana suyun ilavesiyle beraber deterjanın yapısına eklenen lipaz, amilaz, selüloz ve proteaz gibi enzimler deterjandaki kimyasal bağların parçalanmasını hızlandırır [12, 19].

1.2.1.1.3. İlaç Endüstrisinde Lipazlar

Kimyasal yöntemlerle üretilmeyen yeni ilaçların yapımında, kiral bileşiklerin üretilmesinde lipazlardan faydalanılır. Bunun yanında angiotensin-I dönüştürücü enzimler, antiinflamatuvar ilaçlar ve β -blokerlerin elde edilmesinde lipazlar kullanılır [20].

1.2.1.1.4. Kozmetik ve parfüm endüstrisinde lipazlar

Sanayide kozmetik ve kokulu maddelerin üretiminde lipazlar kullanılır. Kozmetik ve kokulu bileşiklerin üretiminde lipazların kullanıldığı literatürdeki çalışmalarda gösterilmektedir [21].

1.2.1.1.5. Deri endüstrisinde lipazlar

Deri endüstrisinde post ve deri işleme işlemi alışlagelmiş bir yöntemdir. Deri işleme, deri altı yağlarının giderilmesi, derideki kılların ayıklanması ve doldurma uygulamalarını gerektirmektedir. Lipazları içeren bir enzim karışımı deri işlemede kullanılabilir [19, 22].

1.2.1.1.6. Kâğıt Hamuru ve Kâğıt Endüstrisinde Lipazlar

Kâğıt sanayisinde üretilen kâğıt hamurundan katranı uzaklaştırmak için lipaz kullanılmaktadır. Katran, kâğıt hamuru ve kâğıt üretiminde önemli problemlere neden olan trigliseridler ve balmumu olarak bilinen ağacın hidrofobik bileşenlerini tanımlamak için kullanılmaktadır. Japonya'daki Nippon Kâğıt Endüstrisi, trigliseridlerin yaklaşık %90 kadarını hidroliz etmek için *Candida rugosa*'dan elde edilen lipaz enzimi ile bir katran kontrolü metodu geliştirmiştir [12, 23].

1.2.1.1.7. Organik Sentezde Lipazlar

Lipazlar kimyasal, bölgesel ve stereo seçici transformasyon reaksiyonlarının çoğunda katalizör olarak kullanılmaktadır [24].

1.2.1.1.8. *Biyosensör Olarak Lipazlar*

Katı ve sıvı yağ sanayinde, gıda teknolojisinde ve klinik çalışmalarda, triaçilgliserol miktarının saptanması fazlasıyla önem taşır. Analiz için kullanılan kimyasal metodlar masraflı ve uzun süren yöntemlerdir. Son yıllarda mikrobiyal lipazların biyosensör bileşeni olarak kullanımı, umut vadeden bir çalışma olarak kabul edilir. Biyosensörler; biyolojik, biyokimyasal, kimyasal ve elektronik bileşenlerden meydana gelmektedir. Biyosensörlerin komponentleri arasında; enzimler, proteinler, antikolar, hücre özütleri, hücreler, immobilize veya bağlı konumda uygun sinyal üreticileri bulunmaktadır. Lipazların en önemli analitik kullanımları klinik amaçlı lipitlerin saptanmasıdır.

1.3. Enzim İmmobilizasyonu ve Tarihçesi

Tarihte ilk kez enzim immobilizasyonunu 1916 yılında Nelson ve Grifin, adsorpsiyon yöntemiyle gerçekleştirmiş [25]; daha sonra fizyolojik olarak etkin proteinlerin kovalent bağlanma yolu ile çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu ile ilgili çok sayıda çalışma bildirilmiştir. Modern anlamda ise ilk olarak Grubhofer ve Schleith, 1953 yılında birkaç immobilize enzim (karboksipeptidaz, diyastaz, pepsin ve ribonükleaz) hazırlayarak kinetik özelliklerini incelemişlerdir [26]. Daha sonra dünyanın her tarafından bilim insanlarının enzimleri değişik amaçlarla immobilize ettiği literatürlerde bildirilmektedir [27, 28].

1956 yılında Mitz, katalazın DEAE-selüloz üzerine iyonik bağlanma yoluyla immobilizasyonunu gerçekleştirmiştir.[29]. Bernfeld ve Wan bazı enzimlerin (tripsinin, papain, amilaz ve ribonükleaz), poliakrilamid jel içine tutuklanmasını 1963 yılında yayımlamıştır [30]. Quioco ve Richards 1964'te, karboksipeptidaz A enziminin glutaraldehit ile çapraz bağlandığını belirtmişlerdir [31]. Karbonik anhidraz enziminin mikrokapsül yöntemiyle immobilizasyonu ise, 1964'te Chang tarafından ortaya konulmuştur [32]. Katchalski-Katzir ve arkadaşları, immobilize enzimlerin teorik olarak anlaşılmasında önemli katkılar sağlamışlardır [33].

1969 yılında immobilize enzimlerin endüstriyel uygulama alanlarında, başarılı olan ilk isimler arasında Chibata ve arkadaşları gelmektedir. Fungal aminoaçilaz enzimini

iyonik bağlanma yöntemiyle immobilize ederek, N-açıl-D,L-amino asitleri hidrolizle, L-amino asitlere ve N-açıl-D-amino asitlere reaksiyonunu gerçekleştirmişlerdir [34]. Chibata ve arkadaşları ise 1973 yılında, mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonun ilk endüstriyel uygulaması olan yüksek aktivitede aspartaz içeren *Escherichia coli* hücrelerinin poliakrilamit jel içine tutuklayarak, amonyum fumarattan L-aspartat üretmişlerdir.

Enzimler, canlı organizmalarda oluşan bütün reaksiyonların ılımlı şartlarda meydana gelmesini ve bu tepkimelerin uyumlu bir şekilde koordinasyonunu sağlayan, hücre içinde sentezlenen, protein yapıda biyokatalizörlerdir [35]. Enzimler suda çözünürler, endüstriyel çalışmaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiği için katalizör olarak kullanılmakta olan serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması imkansızdır. Serbest enzim, tepkime ortamından istenilen zamanda giderilemediğinden tepkimenin kontrolü çok zordur. Tepkimenin istenilen zamanda durdurulması için inhibitör ilave edilmesi düşünülebilir [36]. Fakat bundan dolayı serbest enzim ile kirletilen tepkime reaktanlarına yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün ya da ürünlerin bu tür kirlilik unsurlarının giderilmesi maliyeti çok arttırmaktadır [37]. Serbest enzimin reaksiyon ortamından aktivitesini kaybetmeden çıkarabilmesi mümkün olmadığı gibi yeniden kullanılması da mümkün olmamaktadır. Aynı zamanda serbest enzimler sürekli sistemlerde kullanılamazlar [38]. Bütün bu sorunları olumlu açıdan çözümlenebilmek amacıyla enzim immobilizasyonu üzerine yoğunlaşmıştır [2].

Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal şekilde bağlanarak, suda çözünmeyen reaktan veren bir kopolimerizasyon reaksiyonuna enzim molekülünün monomer katılmasıyla ve aynı zamanda suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsül yapısında hapsedilmesiyle immobilize edilirler [25].

1.3.1. İmmobilizasyonun Avantaj ve Dezavantajları

Biyokatalizör olarak kullanılan enzimlerin daha ucuz temin edilebilmesi amacıyla, en uygun katalizör seçimi ve reaksiyon şartlarının belirlenmesiyle birlikte,

biyokatalizörün sürekli sistemlerde uzun süre ya da kesikli sistemlerde tekrar işlenebilmesi oldukça önemlidir. İmmobilize enzimler sürekli sistemlerde uzun süre, kesikli sistemlerde tekrar kullanılabilirler; böylece hem enzimlerin ısı ve işletim kararlılıkları artar, hem de tepkime ortamından ayrılmaları basit ve ekonomik bir hale gelir. Bu özellikler sayesinde immobilize enzimler, pahalı olan substrat ve enzimden yüksek verim alınmasına yol açmaktadır [39-43].

Enzim immobilizasyon teknolojisi enzimin tekrar işlenebilirliğini geliştirmek, enzimlerin aktivitesinin kararlılığını fazlaştırmak için etkili bir yöntemdir [44]. İmmobilize lipazlar hem katalizör olarak sürekli reaksiyon sistemlerinde kullanılabilir hem de lipazın termal ve pH kararlılığı lipazın taşıyıcı matrikse immobilize edilmesiyle arttırılabilir [45]. Bundan dolayı, immobilize lipazlar güç sıcaklık ve pH şartları altında uygulanmaktadırlar. Lipazın immobilizasyonu çözünmez olmasına neden olur ve böylece daha sonra lipaz tepkime ortamından kolayca ayrılabilir [44-46]. Bundan dolayı enzim teknolojisinde suda çözünmeyen sistemlerde enzimin immobilizasyonu araştırma konusu olmuştur. İmmobilize enzimlere fiziksel adsorpsiyon [47, 48], kovalent bağlama [49, 50], polimerlere adsorpsiyon veya enkapsülasyon [51, 52] ve çapraz bağlama [53, 54] gibi farklı stratejiler önerilmiştir [55]. Farklı teknikler yoluyla çözünmez durumdaki immobilize enzimlerin serbest enzimlere göre bazı üstünlükleri olmaktadır. Bunlar [56];

- a. Reaksiyon sonunda ortamdan basit bir şekilde giderilebilirler ve enzimlerin ürünleri kirletmesi gibi bir sorun meydana gelmez.
- b. pH, sıcaklık gibi ortam koşullarına daha dayanıklıdırlar.
- c. Defalarca ve uzun süre kullanılabilirler.
- d. Ürün oluşumu kontrol edilebilir.
- e. Sürekli sistemlerde kullanılabilirler.
- f. Serbest enzimlere göre daha çok kararlıdırlar.
- g. Mekanizmalı tepkimelere uygulanabilir.
- h. Otoliz (enzimin kendini parçalaması) imkanı azalır.
- i. Enzimin yarılanma ömrü artar [51].

Enzim immobilizasyonunun birçok avantajı olmasına rağmen kullanımını aşağıdaki sebeplerden dolayı sınırlanmaktadır:

- a. Çözülebilir enzimlerin maliyetinin daha düşük olması.
- b. Geleneksel metodların değiştirilmek istenmemesi.
- c. Belirlenmiş süreçleri değiştirmek için yeni yatırımlara gerek duyulması.
- d. İmmobilizasyon sürecinde kullanılacak olan taşıyıcının maliyeti.
- e. Sistemin başarımı [52].

Genel olarak immobilizasyon yöntemleri Şekil 1.3'teki gibi sınıflandırılabilir.

1.3.2. İmmobilizasyon Yöntemleri

Günümüzde immobilizasyon teknolojisindeki gelişmelerle immobilizasyon işleminde oluşabilecek problemlere hızlı ve etkili çözümler sağlanabilmektedir, fakat tüm enzimler için kabul edilen genel bir metod bulunmamaktadır [57]. İmmobilizasyon yöntemi seçilirken kullanılacak olan enzimin kimyasal yapısı ve bileşimi, substratın ve oluşacak ürünün özellikleri göz önünde bulundurulmalıdır [58]. Bunun yanında, immobilizasyon sırasında, enzimin aktivitesini yitirmesine sebep olmayacak bir yöntem seçilmesine dikkat edilmelidir. İmmobilizasyon sürecinde enzim substara bağlanırken enzimin aktif bölgesi koruyucu gruplar yardımıyla korunur. Sonra koruyucu gruplar, enzim aktivitesini yitirmeden giderilir. Bazen bu koruyucu etki substrat veya yarışan tip inhibitör yardımıyla sağlanabilir [55].



Şekil 1.3. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Sınıflandırılması [59]

1.3.2.1. Taşıyıcıya Bağlama Metodu

En bilinen immobilizasyon yöntemi olan Taşıyıcıya Bağlama Metodu, enzimlerin suda çözünmeyen taşıyıcılara bağlanması ile gerçekleşmektedir. Genel olarak; suda çözünen gruplardaki ve bağlanan enzim miktarındaki artış immobilize enzimin aktivitesinin artmasına neden olmaktadır.

Bu yönteme göre bağlanan enzimin miktarı ile immobilizasyon sonrasındaki enzimin aktivitesi taşıyıcının yapısına bağlıdır [55]. Taşıyıcının belirlenmesi immobilize enzimin performansı açısından çok fazla önem taşımaktadır. Taşıyıcı seçiminde en önemli etken enzimin türüdür [55]. Taşıyıcı seçiminde tanecik boyutu, yüzey alanı, polar grupların apolar gruplara oranı ve taşıyıcının kimyasal yapısı gibi etkenler göz önünde bulundurulur [35].

Taşıyıcıya bağlama metodu üç alt sınıfta incelenmektedir:

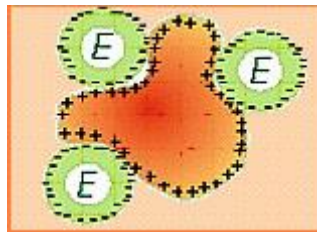
- a. Fiziksel Adsorpsiyon
- b. İyonik Bağlanma
- c. Kovalent Bağlanma

1.3.2.1.1. Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi

İmmobilizasyon için kullanılan en kolay yöntemdir. Yöntem; yüzey aktif suda çözünmeyen bir adsorbanın, enzim çözeltisi ile karıştırılarak enzimin fazlasının yıkanarak uzaklaştırılması esasına dayanır.

Eşdağılımlı enzim bağlayabilmek amacıyla kullanılan son yöntem; karıştırmalı ya da çalkalamalı bir banyoda, taşıyıcının enzim çözeltisine konulması ve karıştırılması ya da sürekli çalkalanması ile yapılır. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimleri etkindir. Yöntemin başarılı olabilmesi için adsorban genellikle ön işlemden geçirilir. Enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan adsorbanlar; aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, CaCO₃, kül, kollodyum, Silikajel, bentonit, hidrosiapatit, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır [60].

Adsorplanan enzimin aktif merkezi bu işlemde etkilenmez, enzim serbest haldeki aktifliğini korur. Fakat enzim, bağlanmada rol alan etkileşimlerin kuvvetli olmamasından dolayı desorpsiyona uğrar. Bu sebeple yöntem dayanıklı değildir. İşlem sırasında aktivite kaybı ve üründe kirlilik oluşabilmektedir. Yüksek tuz veya substrat miktarı enzim desorpsiyon hızında artışa neden olmaktadır. Özellikle düşük derişim aralıklarında etkinlik gösteren enzimler için dezavantajdır Enzimin taşıyıcıya fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilmesi Şekil 1.4'te görülmektedir [61].



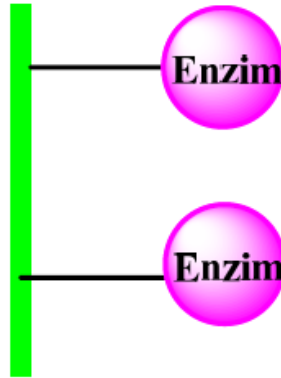
Şekil 1.4. Fiziksel Adsorpsiyon

1.3.2.1.2. İyonik Bağlama Yöntemi

İyonik bağlama yöntemi enzimin suda çözünmeyen ve iyon değiştirici kalıntıları ihtiva eden bir taşıyıcıya iyonik bağlanması prensibine dayanmaktadır. Enzim ile taşıyıcı arasında fiziksel adsorpsiyon yöntemine göre daha kuvvetli bağ oluşur. Bu yöntemde kullanılan taşıyıcılar; selüloz gibi organik maddeler organik ve silika gibi inorganik destekleyici maddeler iyon değiştiricilerdir. Fiziksel adsorpsiyonda olduğu gibi iyonik bağlanmada da immobilizasyon basit bir şekilde gerçekleştirilmektedir. İyonik bağlama ılımlı şartlarda gerçekleştiği için enzimin yapısında ve aktif merkezde değişikliğe sebep olmaz [35, 37].

1.3.2.1.3. Kovalent Bağlama Yöntemi

Kovalent bağlama yöntemi enzimin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya kovalent olarak bağlanması esasına dayanmaktadır. Diğer yöntemlere göre daha karmaşık ve zor şartlarda gerçekleştirilir. Bu yöntemde taşıyıcı ile enzimin aktif bölgesindeki fonksiyonel gruplar arasında bağ oluşmaması gerekir. Taşıyıcı suda çözünmemelidir [29]; ayrıca enzimin taşıyıcıyı parçalamaması, taşıyıcının enzimde mikroorganizma üremesine imkan vermemesi, pH ve çözücülere dayanıklı olması gibi özellikler göstermesi göz önünde bulundurulur [35, 62, 63].



Şekil 1.5. Kovalent Bağlama [64]

Kovalent bağlamaya bir örnek olarak Cho ve Rhee'nin gerçekleştirmiş olduğu silika bazlı immobilizasyonunda enzim aktivasyon aracı olarak glutaraldehitinde

aracılığıyla florisil üzerine immobilize edilmiştir. Bu immobilize lipaz zeytinyağının hidrolizi için kullanılmıştır [65].

Knezevic ve ark. Eupergit C destek maddelerine *C. rugosa* lipazın immobilizasyon için üç farklı kovalent immobilizasyon yöntemi kullanmışlardır [66]. Geliştirilmiş bu immobilizasyon tekniği sulu sistemde oldukça basit olmasıyla birlikte yeniden uygulanabilir ve lipaz uygulamaları için ideal bir çözüm sağladığını öne sürmüşlerdir. Etkin bağlantı olabilmesi için enzim ve taşıyıcı immobilizasyondan önce etkin hale getirilmelidir. Genellikle enzimin bağlanması için taşıyıcı immobilizasyon öncesi aktive edilir [67].

Kovalent bağ yöntemi uygulanan immobilize enzimin performansını etkileyen faktörler sırasıyla:

- a. Taşıyıcının gözenek boyutu, partikül büyüklüğü
- b. Taşıyıcının kimyasal özellikleri
- c. Enzimin bağlanma özelliği
- d. İmmobilizasyon işleminden sonra veya immobilizasyon sırasındaki enzimin molekül şekli
- e. Enzimleri bağlamak amacıyla kullanılan ortamın şartları
- f. Taşıyıcı ve enzim arasında meydana gelen bağ sestane
- g. Taşıyıcıların içinde veya üzerindeki enzim miktarı

Kovalent bağlanma metodunun avantaj ve dezavantajları:

Avantajları:

- a. Enzim kararlılığı genellikle artar.
- b. Aktive edilmiş taşıyıcıya enzimi bağlamak basittir ve bağlı olmayan enzim yıkama ile giderilebilir.
- c. Enzim ve taşıyıcı arasında güçlü etkileşim olduğu için enzim çözeltiye karışmaz.
- d. Reaksiyon ortamından istenilen zaman giderilebilir.
- e. Sürekli sistemler için uygulanabilir.
- f. Değişik fiziksel şekillerde (tabaka, partikül vb.) üretilebilirler.

Dezavantajları:

- Bağlanma aktivite için zorunlu aminoasit fonksiyonel grupları ile gerçekleştiğinden dolayı enzimin aktivitesinde düşüş gözlenebilir.
- Enzimin taşıyıcıya bağlanması için pahalı hazırlıklar gerekli olabilir.
- Enzimin zor reaksiyon şartlarına maruz kalmasıyla ürün veriminde düşüş gözlenir.
- Taşıyıcının yenilenememesi.

Kovalent bağlama yönteminde proteinlerin immobilizasyonu yaygın olarak kullanılır. Bu yöntemin avantajı enzim ile taşıyıcı arasında meydana gelen etkileşim güçlü olduğu için enzim çözelti ortamına sızmaz. Ancak aktivitenin yüksek olması için temel aminoasit fonksiyonel grupları katalitik aktivite için destek maddesine kovalent bağlanma gerektirmemelidir. Bu durum bazen sıkıntı doğurabilir. Reaksiyon genellikle sulu ortamda gerçekleşir. Bu yöntemde kullanılan taşıyıcılar aktive edilmelidir. Yöntemin gerçekleştirilmesi çok kolay değildir. Enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ güçlü olduğu için bazen enzimatik aktivitenin arttığı da gözlenmektedir [68]. Fonksiyonel gruplar içeren taşıyıcıya göre farklı reaksiyonlar geliştirilmiştir [69]. Bağlama yöntemleri genelde iki grupta incelenir: (1) bir polimere bir reaktif grup eklenmesiyle taşıyıcının aktivasyonu (2) aktivite edilmiş bir grup elde etmek amacıyla polimerin ana yapısının modifikasyonu. Bu aktivasyon süreçleri genel olarak, bağlama kısmında proteinlerdeki güçlü nükleofillerle tepkimeye girip destek maddesindeki elektrofilik grupları elde etmek amacıyla tasarlanırlar. Taşıyıcıya kovalent bağlama yolunun temel prensipleri proteinlerin kimyasal modifikasyonu için kullanılmasıyla benzerdir. Genellikle tepkimelerde, aminoasitlerin yan zincirlerinde lizin (ϵ -amino grup), sistein (tiyol grup), aspartik asit veya glutamik asit (karboksilli asit) bulunanlar kullanılırlar.

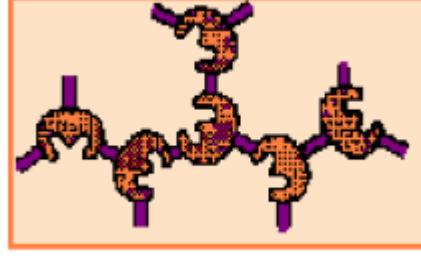
Tablo 1.3. Enzimlerin Kovalent Bağlama Metotları: Hidroksil Fonksiyonlu Matriksin Aktivasyonu [70]

Aktivasyon metodu	Reaktantların grubu (aktivite edilmiş matriks ile)	Referans
Tresil klorür (2,2,2-trifluoroethanesulfonyl klorür), sülfonil klorür	Tiyol, aminler	Lawson ve ark. (1983)
Siyonejen bromür	Amin	Axén ve ark. (1967)
Epoksitler	Tiyol, amin	Porath ve Axén, (1976)
Epiklorhidrin	Tiyol, amin	Porath ve Axén, (1976)
Glutaraldehit	Amin	Porath ve Axén, (1976)
Glisidol-glioksil	Amin	Guisán (1988)
N-hidroksi süksinimidil	Amin	Wilchek ve Miron, (1982); Drobnick ve ark. (1982)

1.3.2.2. Çapraz Bağlama Yöntemleri

Enzimlerin çapraz bağlanma yöntemi, protein moleküllerine veya suda çözünmeyen bir taşıyıcı üzerindeki fonksiyonel gruplara, proteinin moleküller arası çapraz bağlanması ile elde edilmektedir. Enzimlerin kendisi üzerine çapraz bağlanması masraflı olmakla birlikte aynı zamanda yeterli olmayan bir metoddur. Bu durumda proteinin bir bölümü taşıyıcı gibi davrandığı için enzimatik aktivite düşmektedir. Genellikle çapraz bağlanmanın diğer immobilizasyon yöntemleriyle beraber uygulanması daha iyidir. Enzimin kovalent bağlanmayla immobilizasyon yapıldığı esnada çapraz bağlanma da kullanıldığında desorpsiyon çok az gözlenmektedir. Adsorblanmış enzimleri stabilize etmek ve poliakrilamit jellerden sızıntıyı önlemek çapraz bağlanmanın sıklıkla kullanıldığı alanlardır [55].

Enzimin taşıyıcıya çapraz bağlanması aşağıdaki şekilde şematize edilmiştir:



Şekil 1.6. Çapraz Bağlanma

Çapraz bağlanma ile immobilizasyon, protein ve reaktif miktarı, pH ile immobilize edilecek enzime bağlı olmakla birlikte moleküleri bağlanmalar yanında moleküller arası bağlanmalar da oluşmaktadır [35]. Enzim immobilizasyonu bu yöntem ile dört farklı şekilde uygulanabilir;

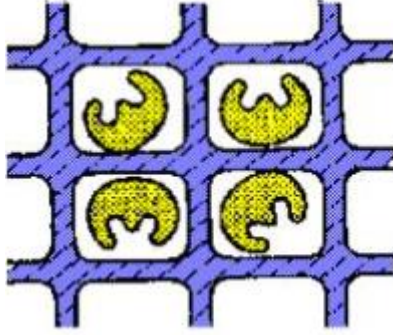
- a) Enzimin sadece difonksiyonel reaktif ile tepkimesi
- b) Enzimin ortamda diğer bir protein olması halinde bifonksiyonel ajan ile tepkimesi
- c) Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıda adsorpsiyonu işlemi sonrasında bifonksiyonel ajanla tepkimesi
- d) Enzimin bifonksiyonel reaktifin etkin hale getirdiği polimer taşıyıcı ile tepkimesidir.

En sık kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehid, klorformat ve karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bisoksiranlar, divinilsulfanlar, pbenzokinonlar, geçiş metal iyonları ve epiklorhidrinler olmakla birlikte çapraz bağlama reaksiyonu ılıman şartlarda uygulanmadığından bazen önemli miktarda aktivite düşüşü gözlenebilmektedir [35, 71].

1.3.2.3. Tutuklama Yöntemleri

Tutuklama yönteminde, diğer yöntemlerden farklı olarak enzimin kimyasal ya da fiziksel yollarla bir taşıyıcıya bağlanmadan belirli bir ortamda adsorpsiyonu gerçekleştirilir. Tutuklama esnasında enzim moleküllerinin polimer taşıyıcı içindeki kafeslerde ya da yarı geçirgen zar içinde ya da mikrokapsülleme ve misellerde tutulması gerçekleştirilir. Enzimin fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir

taşıyıcıya bağlanmış olmaması bu metodu kovalent bağlama ve çapraz bağlamadan farklı kılan en önemli faktördür [35].



Şekil 1.7. Enzim Tutuklama

Biyokatalizörleri tutuklama yöntemi kafes, lipozom, mikrokapsül, membran ve ters misel olmak üzere 5 çeşittir.

1.3.2.3.1. Kafes yöntemi

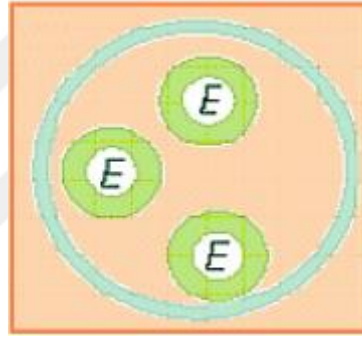
Kafes yönteminde enzim polimerin matriksinde çapraz bağlama sonucu oluşan odacıklarda (kafes) tutuklanır. Bu yöntemde en sık kullanılmakta olan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanan poliakrilamittir [35]. Bu yöntem, yüksek düzeyde çapraz bağlı bir polimerin enzim içinde oluşturulması temeline dayanır. Polimerleşme sonrasında enzim molekülleri çapraz bağlar arasında tutuklanır ve bundan dolayı ortama geçmeleri önlenir, çapraz bağ yüzdesi çok iyi ayarlanmalıdır. Biyokatalizör molekülleri tutuklanabilmeli fakat substrat moleküllerinin biyokatalizör moleküllerine ulaşmasına engel olmamalıdır. Çapraz bağ yüzdesinin fazla olursa bu durum hem substratın enzimin aktif merkezine ulaşmasını engel olur hem de enzimin zincir yapısının da bozulmasına yol açarak aktivite kaybına sebep olabilir [35]. Bu yüzden bir çapraz bağ yüzdesi ayarlamaya dikkat edilmelidir. Çapraz bağ yüzdesi enzime ve taşıyıcıya bağlıdır. Bu metodla immobilize edilecek enzimin substratının küçük molekül olması gerekir.

Kafes yönteminin avantajları; çok basit uygulanabilmesi, fiziksel bir yöntem olması ve aynı zamanda fazla miktarda enzimle gerçekleştirilmesine gerek olmamasıdır. Suda çözünmeyen taşıyıcılarla da immobilizasyon uygulanmaktadır. Yöntemin

dezavantajları ise; immobilizasyon uygulanırken aktivite kaybının deney koşullarına bağımlı oluşu ve immobilize enzimin yalnız küçük molekül substratlara iyi aktivite göstermesidir [35].

1.3.2.3.2. Mikrokapsülleme yöntemi

Mikrokapsül yönteminde biyokatalizör yarı geçirgen polimer zar içerisinde tutuklanır. Bu yöntemin avantajları substrat ve enzime geniş yüzey alanı sağlayabilmesi ve aynı zamanda birçok türde enzimin de hemen hemen aynı şekilde immobilize edilebilmesidir. Yöntemin dezavantajları ise yüksek molekül ağırlıklı substratlarda gerçekleştirilememesi, bazı durumlarda enzimin aktivitesini kaybetmesi, zarın duvarına yapışması veya mikrokapsüllerden damlamasıdır [56].



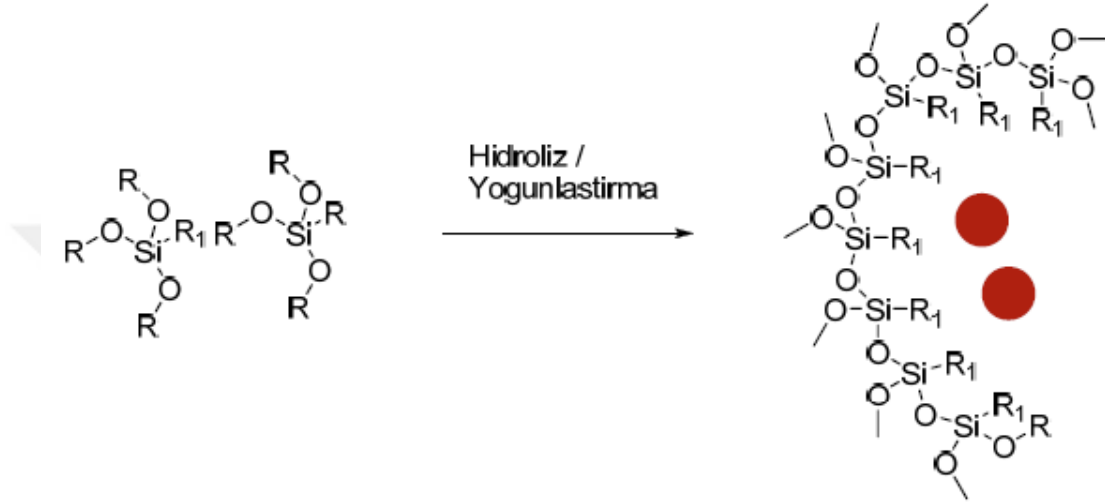
Şekil 1.8. Enzimin Bir Kapsül İçerisinde Tutuklanması

1.3.2.3.3. Sol-jel tutuklama

Enzim immobilizasyonu için inorganik sol-jel fiziksel tutuklama yöntemi 1950 yılından itibaren bilinmekle birlikte kullanımı 1990 yılından bu yana önem kazanmıştır [72]. Dickey ilk defa biyolojik aktivitenin bir miktar silika asit türevli camlarda kimi enzimlerin tutuklanabildiğini ispatlamıştır [73]. Sonraki 30 yılda tutuklanmış biyokatalizörlerin hazırlanması amacıyla bu yöntemin kullanıldığını belirten birkaç çalışma bulunmaktadır [74, 75].

Jel tutuklama yöntemi, enzimin çapraz bağlanmış suda çözünmeyen bir polimer zarın boşlukları içerisine hapsedilmesidir. Sol-jel tutuklanmış enzimin dayanıklılığı, enzim

miktarı, pH, iyonik güç ve diğer immobilizasyon koşullarına bağlı olduğu bilinmektedir [76]. Matriste hapsedilmiş enzimin miktarının artmasıyla enzim termal kararlılığının artmasını sağlar. Bilinen tutuklamanın dezavantajları tutuklanan biyokatalizörlerin tümü muhtemelen katalitik olarak inaktiftir [77]. Matriste içersindeki bazı enzim molekülleri tutuklanma süreci sırasında aktivite kaybına uğrayabilir.



Şekil 1.9. Sol-jel matriste enzim tutuklanması [70]

1.3.3. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması

Bugüne kadar çeşitli enzimler için birçok değişik immobilizasyon metodu gerçekleştirilmiş ve önerilmiştir. Fakat enzimlerin birbirlerinden farklı kimyasal özellikleri ve bileşenleri olması, aynı zamanda kullanılan substrat ve ürünün farklı kimyasal karakterizasyonu olması sebebiyle tüm enzimler için ve bütün koşullarda kullanılacak bir metod belirlemek imkansızdır. Uygulama koşullarına göre her immobilizasyon metodunun avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Dolestaneyla farklı enzimler için farklı koşullarda değişik yöntemler belirlenebilir. Tablo 1.4.'te immobilizasyon yöntemlerinin birbirlerine karşı kıyaslanması belirtilmiştir [35, 22].

Tablo 1.4. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması

Özellik	Fiziksel adsorpsiyon	İyonik bağlama	Çapraz bağlama	Kovalent bağlama	Tutuklama
Hazırlama	Kolay	Kolay	Zor	Zor	Zor
Bağlama gücü	Zayıf	Orta	Kuvvetli	Kuvvetli	Kuvvetli
Enzim aktivitesi	Düşük	Yüksek	Orta	Yüksek	Yüksek
Desteğin tekrar kullanılabilirliği	Mümkün	Mümkün	İmkansız	Nadiren	İmkansız
İmmobilizasyonun maliyeti	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek	Düşük
Kararlılık	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Genel uygulanabilirlik	Düşük	Orta	Düşük	Orta	Yüksek

Bu çalışmada, Giresun Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında kestaneden (*Castanea sativa*) ilk defa saflaştırılan lipaz enziminin çeşitli taşıyıcılara farklı yöntemler kullanılarak immobilizasyonu ve immobilize enzimin kinetik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Etçi Sol jel tutuklama metoduyla manyetik nanopartiküllere *C. rugosa* lipaz enziminin immobilizasyonunu gerçekleştirerek optimum pH'sını 7, optimum sıcaklığını 50°C olarak gözlemlemiştir [21].

Turgut lipaz enzimini armut kabuğu, akasya yaprağı ve kaolin üzerine yapmış olduğu immobilizasyonu sonucu immobilize lipazın optimum pH'sının 9, optimum sıcaklığının 40°C olduğu sonucuna ulaşmıştır.

Şengül yapmış olduğu çalışmada *C. Rugosa* lipazının kovalent bağlama metoduyla Glutaraldehit ara kolu üzerinden manyetik nanopartiküllere immobilizasyonu sonucu optimum pH'sını 7, optimum sıcaklığını 40°C olarak belirlemiştir.

Aslan ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada Amberzyme üzerine kovalent bağlama yöntemi uygulayarak *Pseudomonas Fluorescens* lipazının immobilizasyonu sonucu optimum pH'sını 9 bulmuştur [33].

Yılmaz kovalent bağlama metoduyla *C. rugosa* lipazının cam boncuklara yapmış olduğu lipaz immobilizasyonu sonucu lipazın optimum pH'sını 5, optimum sıcaklığını 45°C, ayrıca sol jel tutuklama metoduyla gerçekleştirdiği immobilizasyonda ise immobilize lipazın optimum pH'sını 6, optimum sıcaklığını 50°C olarak bulmuştur [34].

Bitkisel kaynaklı yağlı tohumların lipaz aktivitesine etki eden pH değerleri üzerine yapılan çalışmalarda; Beisson ve arkadaşları ayçiçek tohum lipazının optimum pH'sı 8-9 olarak saptamıştır [10], Prabhu ve arkadaşları pirinç kepeği lipazının optimum pH'sını 7-7,5 olarak bulmuştur [81], Fuchs ve arkadaşları hint yağı bitki tohumundan elde edilmiş lipazın optimum pH'sını 4,2 [82], Haas ve arkadaşları *Umbellularia californica* tohumlarından saflaştırılan lipazın optimum pH'sını 8,5

olarak [83] bulmuştur. Kestane tohumu lipazının pH stabilitesi incelendiğinde pH 9'da enzimin yüksek olduğu görülmektedir.

Çeşitli bitkisel kaynaklı lipazların optimum sıcaklıkları incelendiğinde; Abigor ve arkadaşları Palm yağı (*Elaeis guineensis*)'ndan saflaştırılan lipazın optimum sıcaklığını 30°C olarak bulmuştur [84], Sanz ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada acı bakladan saflaştırılan lipazın optimum sıcaklığını 25°C olduğunu belirtmiştir [85].



BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı: Arçelik

Destile Su Cihazı: Nüve-NS-108

Etüv: Binder

pH Metre: Butech

UV-VIS Spektrofotometre: T80+PG Instruments

Terazi: Shimadzu AUx220

Hassas Terazi: Sartorius

Su Banyosu: Memmert

Otomatik Pipetler: Brand Pipetleri, Dragon Lab.

Manyetik Karıştırıcı: Chiltern Hotplate HS 31

Vorteks: Velp Scientifica

Rotary Evaporatör: Büchi Rotavapor R-200

Liyofilizatör: Operon (Freeze Dryer -86 °C)

3.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Protein miktar tayininde; standart olarak kullanılan sığır serum albümini, Folin C ayıracı, Na₂CO₃, NaOH, dipotasyum tartarat Merck; CuSO₄ ise Sigma marka kullanıldı.

Enzim aktivite tayininde dimetil sülfoksit (DMSO-Sigma), substrat olarak p-nitrofenil asetat (p-NPA) (Sigma) kullanıldı. Aktivite tayini için sodyum asetat (CH₃COONa.3H₂O-Merck), asetik asit (Sigma) ve Tris (Merck) kullanıldı. İmmobilizasyonunda silikajel (Merck), cam boncuk (Sigma, çapı 212-300 µ),

alumina (Sigma), Amberlite IRA-900 (Sigma IRA-900), deniz kumu (Merck), glutaraldehit (Merck), 3-aminopropiltrioksi silan (Merck), $K_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (Merck), $KH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (Merck), NaCl (Merck), H_2SO_4 (Merck), toluen (Merck), NaOH (Merck), aseton (Merck) ve HCl (Merck) kullanıldı.

3.2. Metod

3.2.1. Lowry Yöntemi ile Protein Miktar Tayini [86]

3.2.1.1. Ayıraçlar

A ayıracı: 0,1 N NaOH içinde çözünmüş % 2 Na_2CO_3 çözeltisi

B ayıracı: % 0,5 $CuSO_4$ 'ın % 1 dipotasyum tartarat'taki çözeltisi

Folin C ayıracı: Folin çalışma çözeltisi: Folin ayıracı 1/3 oranında distile su ile seyreltildi.

C ayıracı (Alkali bakır çözeltisi): 50 mL A ayıracına 1 mL B ayıracı ilave edildi.

3.2.1.2. Deneyin Yapılışı

Bir deney tüpüne, protein miktarı tayin edilecek çözeltiden 0,5 mL kondu, üzerine 2,5 mL C ayıracı ilave edilerek iyice karıştırıldı. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 0,25 mL seyreltik Folin ayıracı ilave edildi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Oluşan mavi-mor renkli çözeltinin absorbansı spektrofotometrede, 500 nm'de ayıraç körüne karşı okundu. Okunan bu absorbans değerinin sığır serum albumini ile çizilen standart grafiğe uygulanmasıyla, protein miktarı % mg olarak saptandı.

3.2.1.3. Bovin Serum Albumini Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi

Bovin serum albuminin distile sudaki % 100 mg'lık çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden uygun seyreltmeler ile % 10-90 mg'lık konsantrasyonlardaki çalışma çözeltileri hazırlandı. Elde edilen standart çözeltilere Lowry deneyi uygulandı. Deney 10 kez tekrarlandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler metodu

uygulanarak serum albumini regresyon denkleminde standart grafiği çizilerek protein miktarları hesaplandı.

3.2.2. Lipaz Aktivitesi Tayini

Lipaz enzimi esteraz ve hidrolaz olmak üzere iki farklı aktiviteye sahiptir. Çalışmamızda kestane tohumu lipaz aktivitesi, esteraz aktivitesi tayin yöntemine göre spektrofotometrik olarak yapıldı [87].

3.2.2.1. Esteraz Aktivitesi Tayini

3.2.2.1.1. Ayıraçlar

0,050 M Sodyum asetat tampon çözeltisi (pH=5,0): 0,6804 g $\text{NaCH}_3\text{COO}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ destile suda çözülerek balon jodede 100 mL'ye tamamlandı. 0,050 M asetik asid çözeltisi ile pH'sı 5,0'e ayarlandı.

DMSO

Substrat çözeltisi: 18 mg p-nitrofenil asetat (p-NFA) 1 ml DMSO'te çözüldü ve 99 mL 0,050 M $\text{NaCH}_3\text{COO}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ tamponu ilave edildi. Substrat çözeltisi günlük olarak hazırlandı ve 1 saat içerisinde kullanıldı. 0,500 M Tris-HCl tamponu (pH=7,4) çözeltisi: 6,55 g Tris destile suda çözülerek balon jodede 100 mL'ye tamamlandı. 0,500 M HCl çözeltisi ile pH'sı 7,4'e ayarlandı.

3.2.2.1.2. Deneyin Yapılışı

Esteraz aktivitesi, Erlanson'a göre substrat olarak p-NFA kullanılarak spektrofotometrik yöntemle tayin edildi [87]. Bir deney tüpüne substrat ve enzim çözeltilerinden 0,5'er mL konarak, 0,5 mL 0,5 M Tris-HCl tamponu ilave (pH=7,4) edildi. Karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Çözeltinin absorbansı spektrofotometrede, 400 nm'de, 60 mM sodyum fosfat tamponuna karşı (pH=7,0) karşı okundu. Bu absorpsiyon değerinin p-nitrofenol regresyon denklemine uygulanmasıyla enzim tarafından, oda sıcaklığında, 1 dakikada açığa çıkarılan p-

nitrofenol miktarı $\mu\text{mol/dakika}$ olarak belirlendi. Bir ünite enzim aktivitesi; 1 dakikada açığa çıkan p-nitrofenol'ün miktarıdır ($\mu\text{mol/dakika}$).

3.2.3. Kestane Tohumu Lipazının İmmobilizasyonu

Çalışmamızda lipazın immobilizasyonu için kovalent bağlama, adsorpsiyon ve iyonik bağlama yöntemleri kullanıldı.

3.2.3.1. Kovalent Bağlama ile İmmobilizasyon

Önce reaktif olmayan Silikajel, deniz kumu ve gözenekli cam, aşağıda belirtildiği gibi ayrı ayrı aktive edildi. Bunun için 5 g Silikajel (60-120 mesh) 3-aminopropiltrioksil silanın toluendeki çözeltisine (20 mL 3-aminopropiltrioksil silan + 180 ml toluen) ilave edildi. 120 °C'de yağ banyosunda, 12 saat, geri soğutucu altında kaynatıldı. Cam filtreden süzülde ve aseton ile birkaç kez yıkandı, vakum desikatöründe kurutuldu. Deniz kumu ve gözenekli cam boncuk da aynı şekilde aktive edildi.

1 g aktive edilmiş Silikajel, 1 g deniz kumu ve 1 g gözenekli cam boncuk ayrı ayrı alınarak enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Bunun için aktive edilmiş üç taşıyıcı sırasıyla 0,5 N NaOH ve su ile yıkandı. 24 ml 0,05 M (pH = 7,0) fosfat tamponu ve 2 ml glutaraldehit (% 25 w/w) ilave edildi, oda sıcaklığında 2 saat mekanik olarak karıştırıldı. Taşıyıcılara bağlanmayan glutaraldehit atıklarını uzaklaştırmak için 10 mL tampon ile yıkandı ve cam süzgeçten filtre edildi. Glutaraldehit ile kovalent bağlanmış üç farklı taşıyıcıya 5'er ml kestane tohumundan elde edilen lipaz çözeltisi ilave edilerek, oda sıcaklığında 2 saat mekanik karıştırıcıda karıştırıldı. Taşıyıcılara kovalent olarak bağlanmamış enzimleri uzaklaştırmak için 1 M NaCl içeren tampon ile bir kaç kez yıkandı. Cam filtreden süzülde ve su trompunda 15 dakika kurutuldu, bir gece vakum desikatöründe bekletildi, derin dondurucuda saklandı. Yıkama sularında protein tayini yapıldı. Preparatların aktivite ölçümleri ve tutuklu enzim miktarları tayin edildi [88].

3.2.3.2. Adsorpsiyon Yöntemi ile İmmobilizasyon

Çalışmada kestane tohumlarından saflaştırılan lipaz alümina ve cam boncuklara adsorpsiyon yöntemi ile belirtilen şekilde immobilize edildi.

3.2.3.2.1. Kestane Tohumu Lipazının Alümina'ya İmmobilizasyonu

Alümina, alüminyum oksitten oluşan, çözünürlüğü organik ve inorganik açıdan ihmal edilecek kadar az olan bir taşıyıcıdır. Protein moleküllerini zayıf adsorpsiyonla bağlayabildiğinden immobilizasyonlarda inorganik taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Alümina ile immobilizasyon yapılmadan önce, nem çekici özelliği nedeniyle alümina 100 °C'de kurutuldu. Kestane tohumu lipazının taşıyıcı olarak seçilen alüminaya adsorpsiyon yöntemi ile immobilize olup olamayacağını araştırmak amacıyla 2,5 ml (mg protein/ml) kestane tohumu lipaz çözeltisi 2,5 g alümina ile +4 °C'de yarım saat bir cam bagetle karıştırıldı. Bu karışımın üzerine 7,5 mL soğuk aseton yavaş yavaş eklenerek karıştırmaya devam edildi. Karışım bir saat buzdolabında zaman zaman karıştırılmak suretiyle bekletildikten sonra vakumlu filtrasyon uygulandı. Soğuk asetonla (yaklaşık 15 ml) yıkandı. Yıkama sularındaki aseton rotarotaevaporatörde uçurulduktan sonra kalan artık, bidestile su ile 10 mL'ye tamamlandı. Enzim preparatı vakumlu desikatörde kurutulup derin dondurucuda saklandı. Yıkama sularında protein tayinleri yapıldı [87].

3.2.3.2.2. Kestane Tohumu Lipazının Cam Boncuklara İmmobilizasyonu

Gözenekli olmayan cam boncuklar enzim immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan taşıyıcılardır. İmmobilizasyon öncesinde cam boncukların içerdiği olası safsızlıklar giderildi. Bu amaçla cam boncuklar 4 M HCl çözeltide 30 dakika karıştırıldı, asidin uzaklaştırılması için sonrasında bidestile su ile yıkandı ve 120 °C'de 2 saat kurutuldu. Kurutulan cam boncuklar ayrıca kloroform:metanol (1:1) çözücü sistemi ile yıkanarak 150 °C'de kurutuldu. Bu aşamadan sonra cam boncuklar immobilizasyona hazır hale getirilmiş oldu. 1 g yıkanmış cam boncuklar 2 mL kestane tohumu lipaz çözeltisi ile oda sıcaklığında karıştırıldı ve süzüldü. Süzülen cam boncuklar önce asetonla sonra 0,1 M fosfat tamponu ile yıkandı. Enzim

preparatı vakumlu desikatörde kurutulup derin dondurucuda saklandı. Yıkama sularında protein miktarı tayin edildi [87].

3.2.3.3. İyonik Bağlama Yöntemi ile İmmobilizasyon

Kestane tohumu lipazı, anyon değiştirici reğine Amberlite IRA-900'e iyonik bağlama yöntemi ile immobilize edildi. Amberlite IRA-900 makroporöz yapıda, 25000-30000 Å çapında gözenek aralığına sahip 16-50 mesh partikül büyüklüğünde olan bir anyon değiştirici reğinedir. Sıvı hidrokarbonlar, aseton, alkoller, eterler ve diğer birçok organik çözücülerdeki çözünürlüğü ihmal edilecek kadar azdır. Destek meteryali olarak sık kullanılan bir reğinedir [87].

Kestane lipazı anyon değiştirici reğine Amberlite IRA-900'e iyonik bağlama yöntemi ile immobilize edildi. 2 ml kestane tohumu lipazı üzerine 1 g Amberlite IRA-900 ilave edilip karıştırıldıktan sonra derin dondurucuda donduruldu. Kurutulmuş olarak elde edilen immobilize enzimler aseton ile iyice yıkanarak tutuklanmayan veya zayıf tutuklanan enzimler uzaklaştırıldı. Vakumlu desikatörde kurutulduktan sonra derin dondurucuda saklandı. Yıkama sularında protein tayinleri yapıldı.

3.2.4. Lipazın Çeşitli Taşıyıcılardaki % Tutuklanmaları

İmmobilizasyon yöntemlerinde anlatıldığı şekilde çeşitli taşıyıcılara immobilize edilen lipaz çözeltilisinin immobilizasyonları sonucu b iriktirilen yıkama sularındaki protein içerikleri, immobilizasyondan hemen sonra Lowry yöntemine göre tayin edildi [86]. Yıkama suları tamamen rotaevaporatörde destile edildi. Kalan kısım bidestile su ile 10 mL'ye tamamlandı. Yıkama sularındaki protein miktarları protein standart eğri denkleminde yararlanılarak hesaplandı. Başlangıçta ortama katılan protein miktarından yıkama sularında tespit edilen protein miktarı arasındaki fark tutuklanmış enzim miktarını vermektedir.

3.3. İmmobilize Kestane Tohumu Lipazının Esteraz Aktivitesine Göre Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi [86]

3.3.1. İmmobilize Kestane Tohumu lipazının Esteraz Aktivitesi ve Protein Miktar Tayini

İmmobilize lipaz enziminin aktivite tayini için 10 mg immobilize enzim (enzim + taşıyıcı) 2,5 mL destile su ile bir deney tüpünde 1 dakika çalkalandı, süzgeç kağıdından süzüldü. Elde edilen çözeltide (İmmobilize enzim çözeltisi) esteraz aktivitesi tayini spektrofotometrik yöntemle göre yapıldı. İmmobilize lipaz enzimlerinde protein tayinleri Lowry yöntemine [86] göre yapıldı.

3.3.2. İmmobilize Lipazın Esteraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisinin İncelenmesi

Kestanedan elde edilen lipazın optimum pH'sını belirlemek amacıyla enzimin pH = 4-12 aralığında gösterdiği esteraz aktivitesi ölçüldü. pH=4-5 aralığında asetat tamponu, pH=6-8 aralığında fosfat tamponu, pH=9-10 aralığında glisin-NaOH tamponu, pH=11-12 aralığında ise Na₂HPO₄-NaOH tamponu kullanıldı. Aktivite tayini, son hacim 0,3 ml olacak şekilde p-NFA'nın 0,1 mL sulu çözeltisine, 0,1 mL enzim çözeltisi ve 0,1 ml 0,5 M Tris-HCl tamponu (pH=7,4) ilavesiyle oluşturuldu. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve 5 dakika sonunda serbest kalan p-nitrofenol, 400 nm'de 60 mM sodyum fosfat tamponuna (pH=7,0) karşı spektrofotometrede okundu.

Tüm denemeler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Denemeler 10 kez yapılarak ortalamaları alındı. Değişik pH değerlerinde elde edilen esteraz aktivitesi ordinata, pH değerleri apsise konarak optimum pH eğrisi çizildi.

3.3.3. Esteraz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

3.2.3'te anlatıldığı şekilde hazırlanan immobilize enzim çözeltisinden 4'er mL alınarak 10-70 °C arasında, sıcaklık her defasında 10 °C artırılarak, su banyosunda 30 dakika süre ile tutuldu. Oda sıcaklığına getirilen çözeltilerde esteraz aktivitesi tayini Erlanson yöntemine göre yapıldı. Denemeler 10 kez tekrarlanarak ortalamaları alındı. Sıcaklık değerleri apsise, elde edilen enzim aktivite değerleri ordinatta olmak

üzere optimum sıcaklık eğrisi çizildi. Oda sıcaklığında yapılan denemenin aktivitesi 100 kabul edilerek (kontrol) her bir sıcaklık için % aktivite değerleri hesaplandı.

3.3.4. İmmobilize Lipazın Esteraz Aktivitesine Zamanın Etkisi

Sıcaklık ve pH sabit tutularak (oda sıcaklığı, pH 7,4) immobilize lipaz çözeltisinin p-NFA substratı ile 1, 5, 10, 15 ve 20. dakikalardaki esteraz aktivitesi tayin edildi.



BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Lipazın Çeşitli Taşıyıcılardaki % Tutuklanmaları

Çeşitli taşıyıcılara farklı immobilizasyon yöntemleri ile immobilize edilen lipazın bu taşıyıcılardaki % tutunmaları Tablo 4.1.'de gösterildi. Lipaz enziminin 98.12 oranında kovalent bağlama yöntemine göre, Silikajele immobilize edildiği görüldü. Adsorpsiyon metoduna göre yapılan immobilizasyon yönteminde, lipaz enziminin en düşük oranda aluminaya adsorplandığı bulundu.

Tablo 4.1. Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilize Edilmiş Lipaz Enziminin % Tutuklanmaları

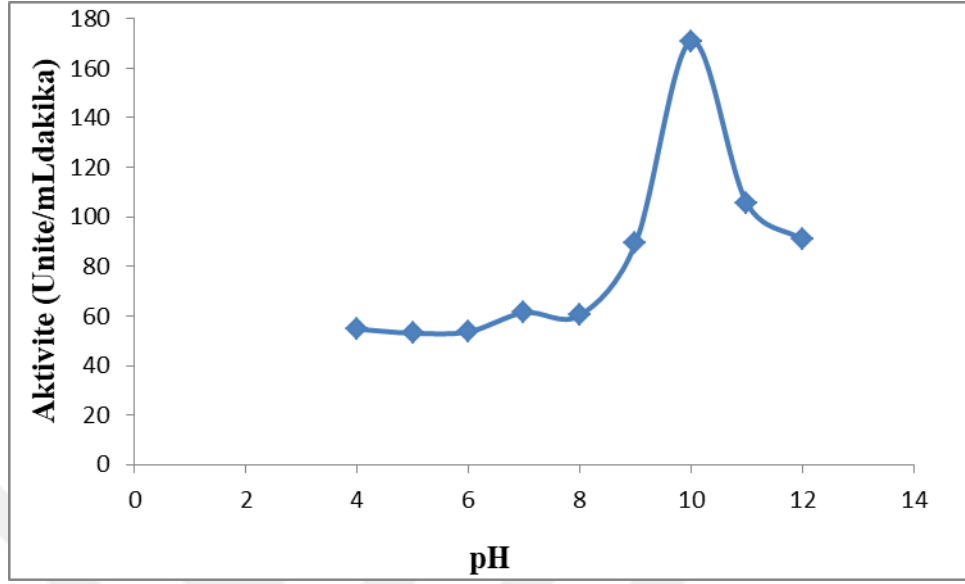
Taşıyıcı	İmmobilizasyon Şekli	% Tutuklanma
Alumina	Adsorpsiyon	44,64
Deniz kumu	Kovalent	68,18
Cam Boncuk	Kovalent	78,408
Silikajel	Kovalent	98,12
Cam boncuk	Adsorpsiyon	74,31
Amberlite IRA-900	İyonik	54,89

4.2. İmmobilize Lipazın Kinetik Özellikleri

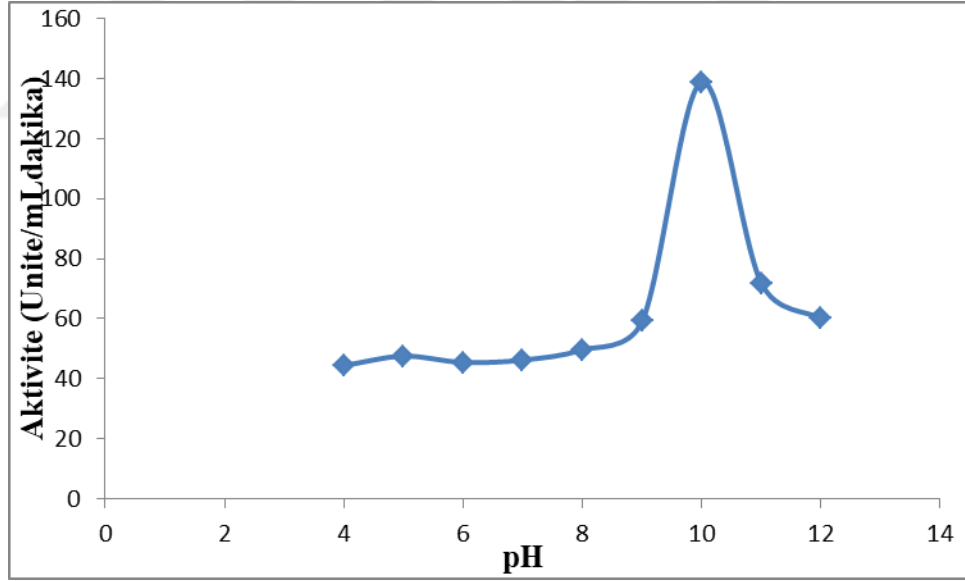
4.2.1. İmmobilize Lipaz Esteraz Aktivitesine pH'nın Etkisi

Çeşitli taşıyıcılar üzerine immobilize edilen lipazın optimum pH değerleri Tablo 4.1.; grafiği ise Şekil 4.1.-4.7.'te verildi. Buna göre immobilize lipazların optimum pH değerlerinin yaklaşık 10 civarında olduğu görüldü. Çalışmamızda kestane lipazının

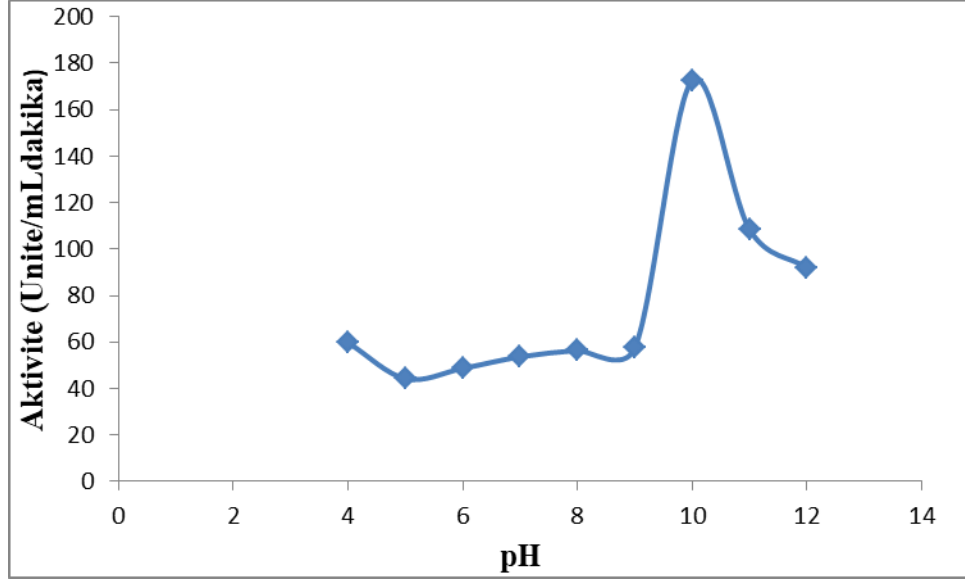
da optimum pH değerinin değeri 10 olarak bulunmuştu (şekil 4.7.). İmmobilizasyon işleminin optimum pH değerlerini değiştirmediği saptandı (4.1.-4.7., Tablo 4.1.).



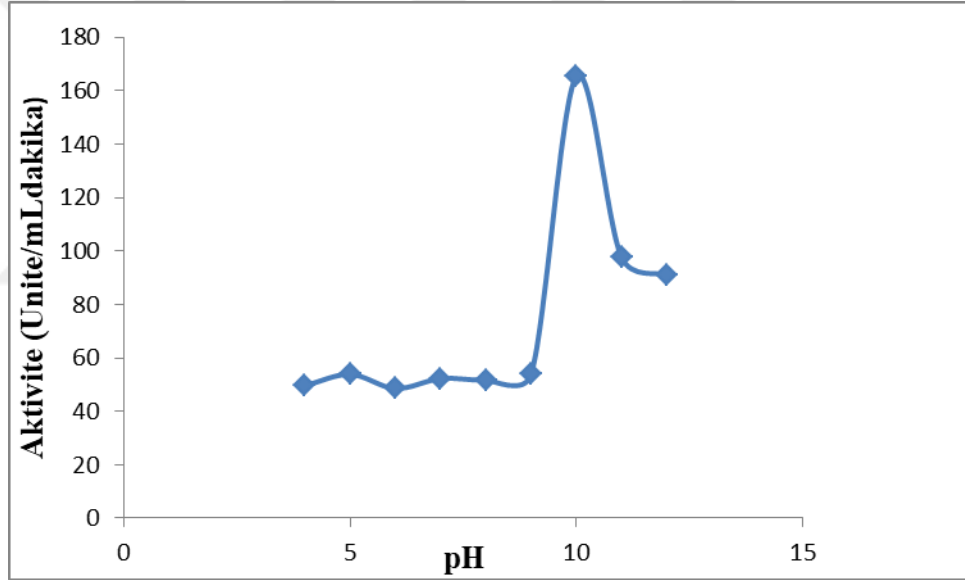
şekil 4.1. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Silikajele İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği



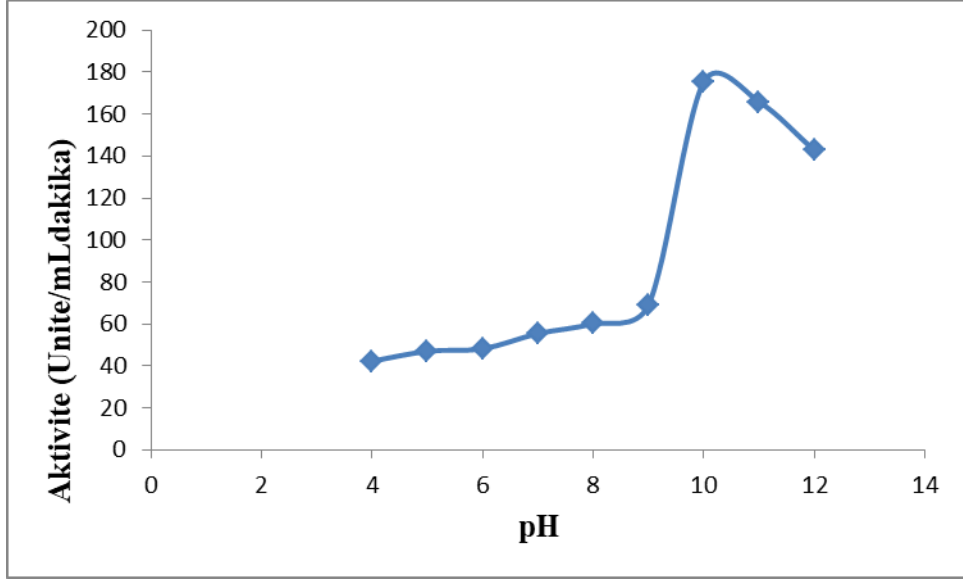
şekil 4.2. Adsorpsiyon Yöntemi ile Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği



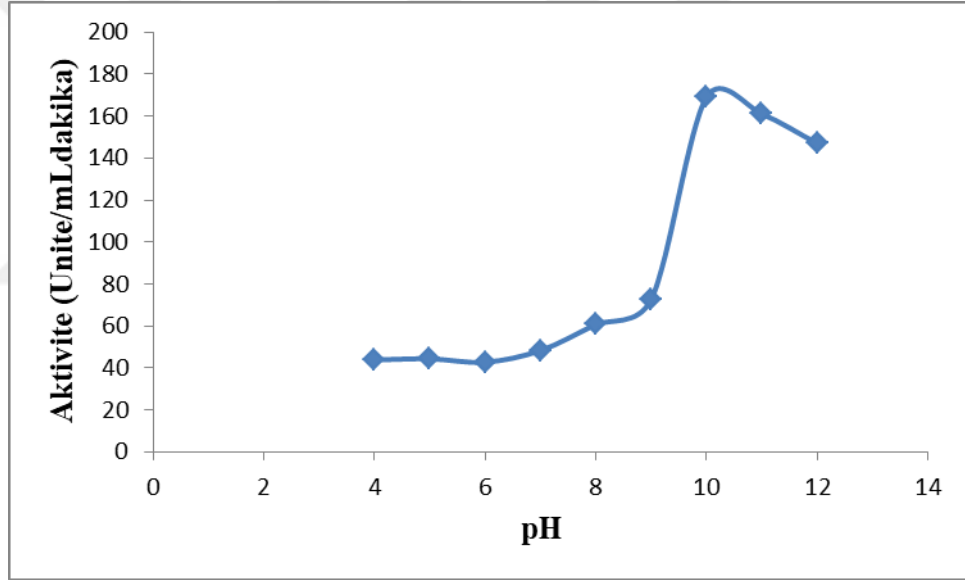
Şekil 4.3. Kovalent Olarak Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği



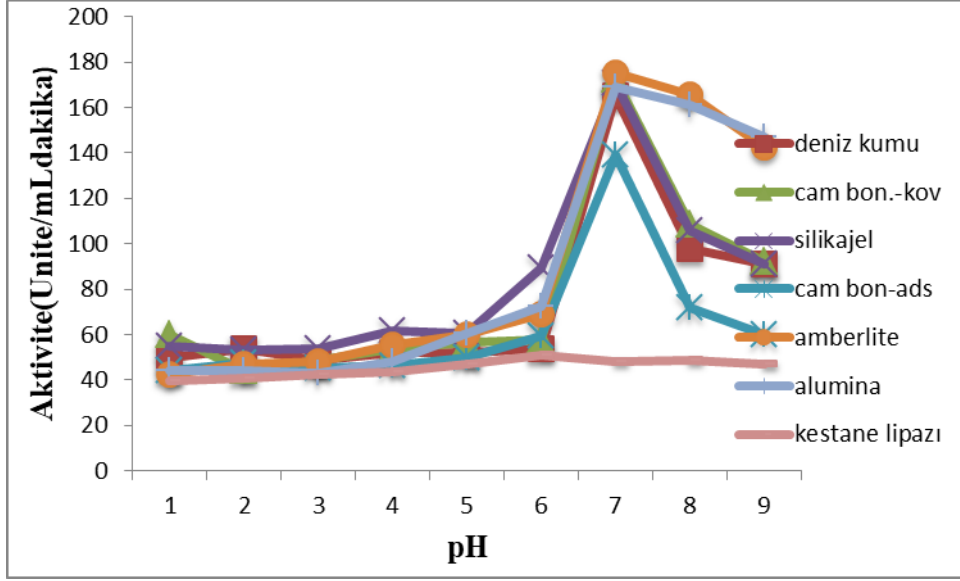
Şekil 4.4. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Deniz Kumuna İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği



Şekil 4.5. İyonik Bağlama Yöntemi ile Amberlite'e İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği



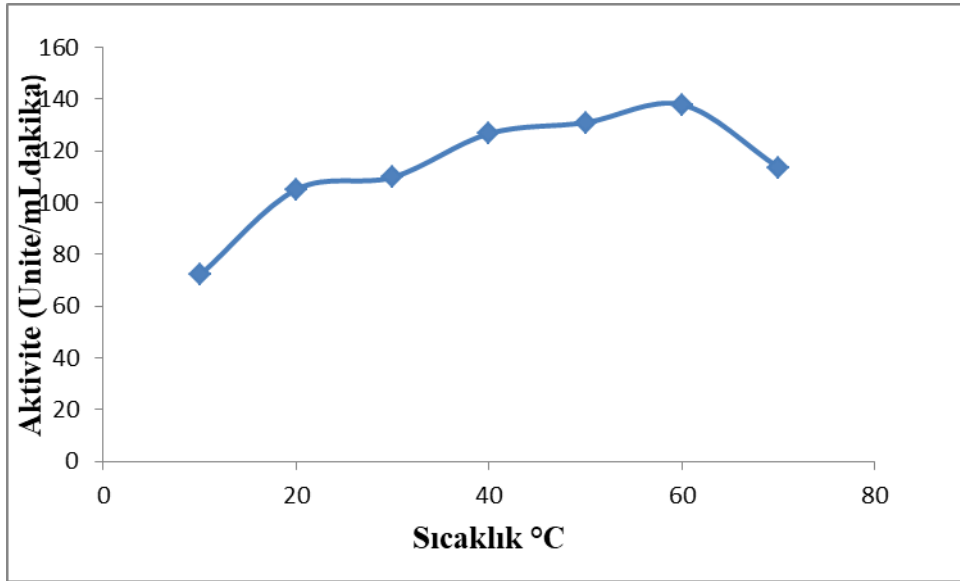
Şekil 4.6. Adsorpsiyon Yöntemi İle Aluminaya İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği



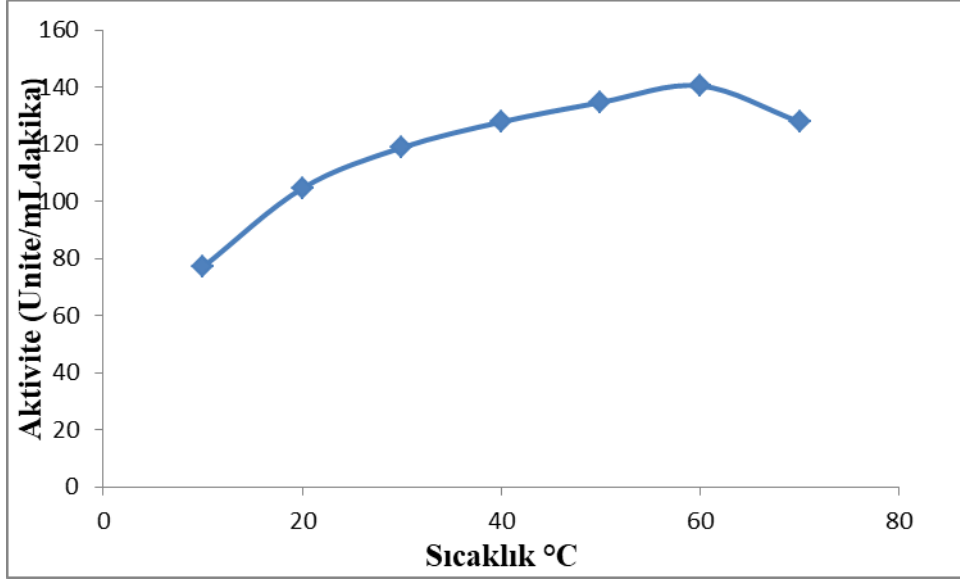
Şekil 4.7. Kestane Lipazı ile İmmobilize Lipazların Optimum pH Grafiği

4.2.2. İmmobilize Lipaz Esteraz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

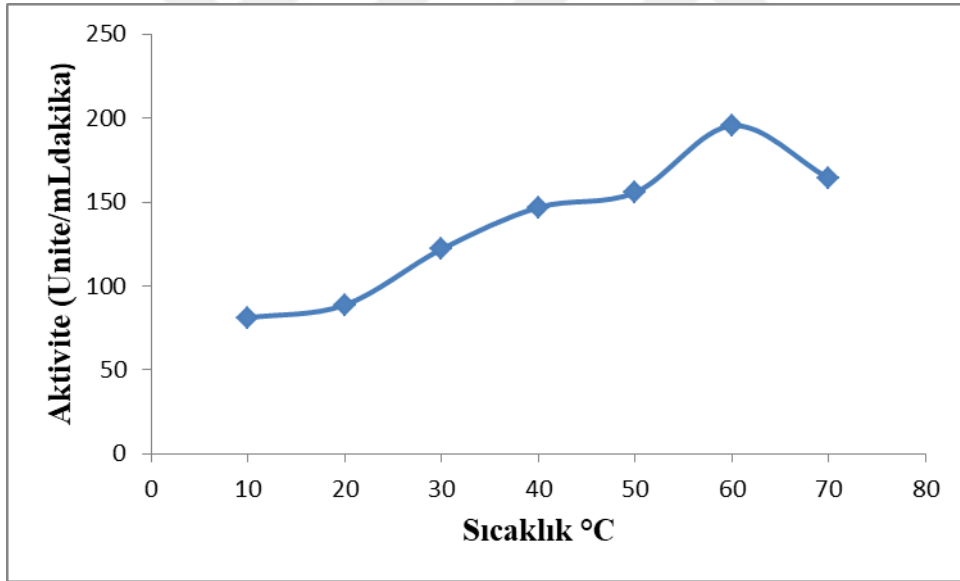
İmmobilize lipazların optimum sıcaklığının 60°C olduğu bulundu (Şekil 4.8.-4.14.). Saflaştırılan lipaz enziminin ise optimum sıcaklık değerinin 30°C olduğu bulunmuştu.



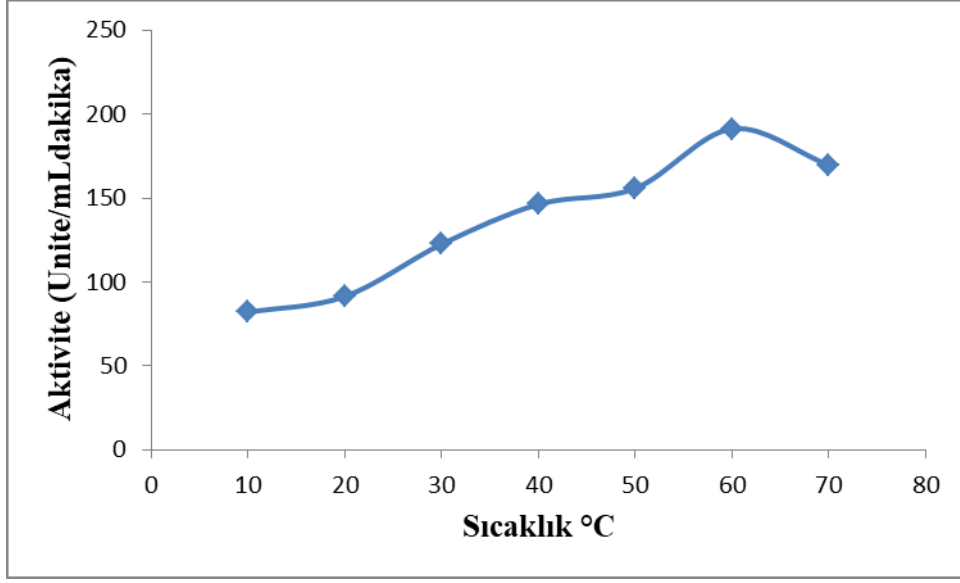
Şekil 4.8. Alüminaya İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği



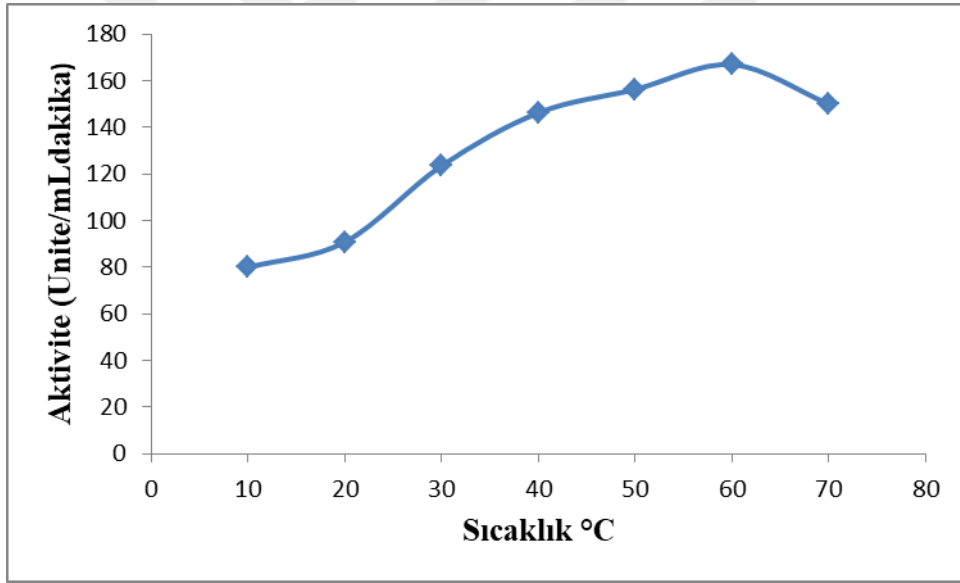
Şekil 4.9. İyonik Bağlama Yöntemiyle Amberlite'e İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği



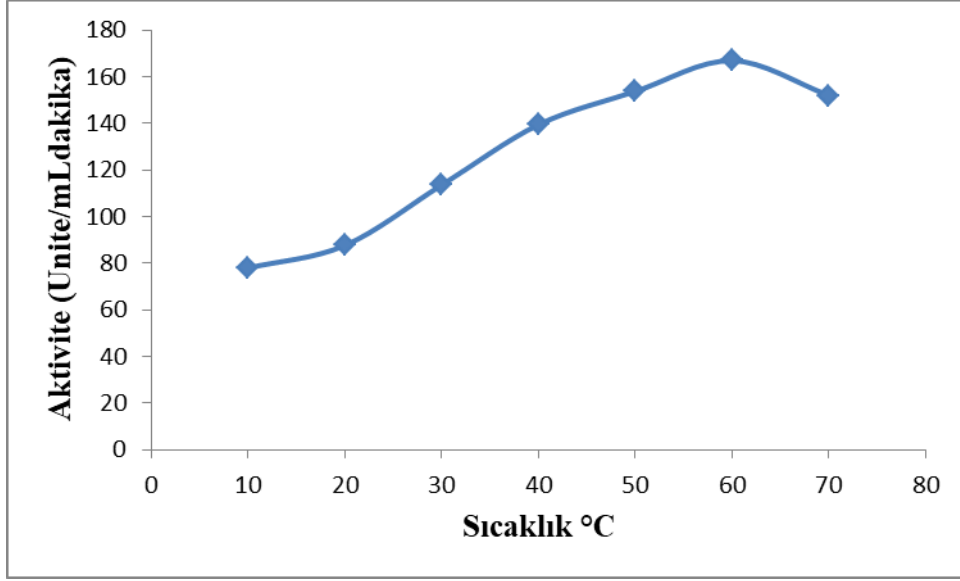
Şekil 4.10. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Deniz Kumuna İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği



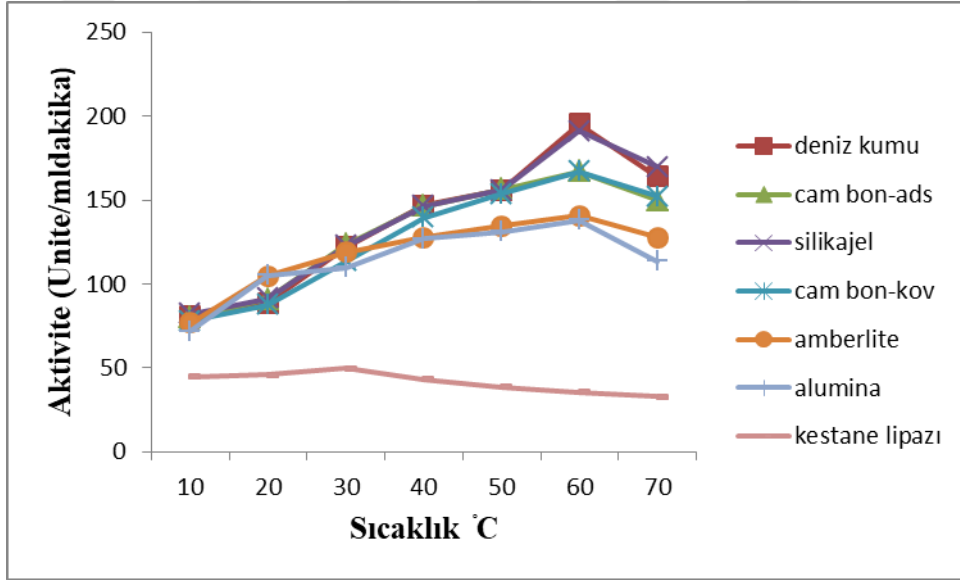
Şekil 4.11. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Silikajele İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği



Şekil 4.12. Adsorpsiyon Yöntemi ile Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği



Şekil 4.13. Kovalent Olarak Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği



Şekil 4.14. Kestane Lipazı İle İmmobilize Enzim Optimum Sıcaklık Grafiği

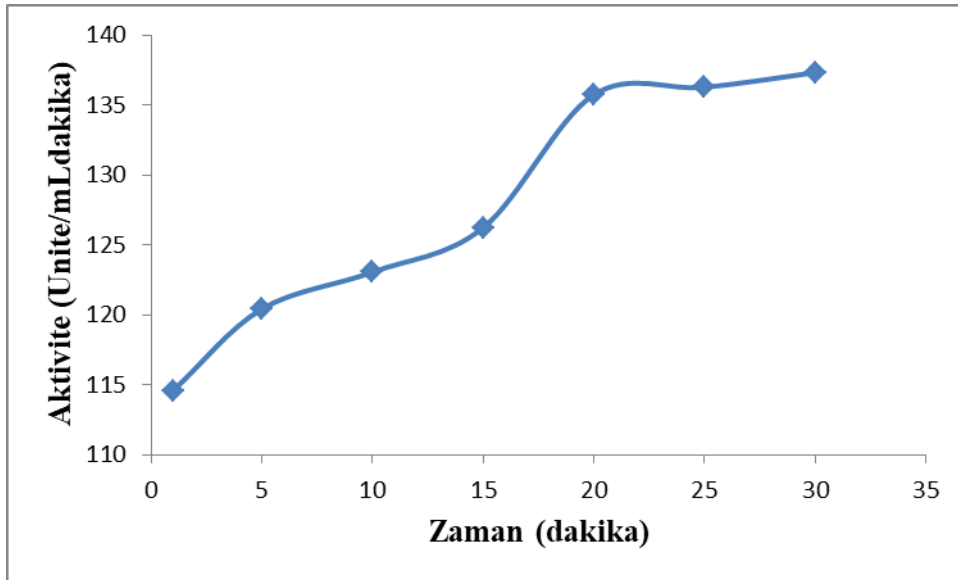
İmmobilize ve doğal lipazın optimum pH ve sıcaklık değerleri Tablo 4.2.'de özetlenmiştir.

Tablo 4.2. İmmobilize ve Serbest Enzimin Optimum pH ve Sıcaklık Değerleri

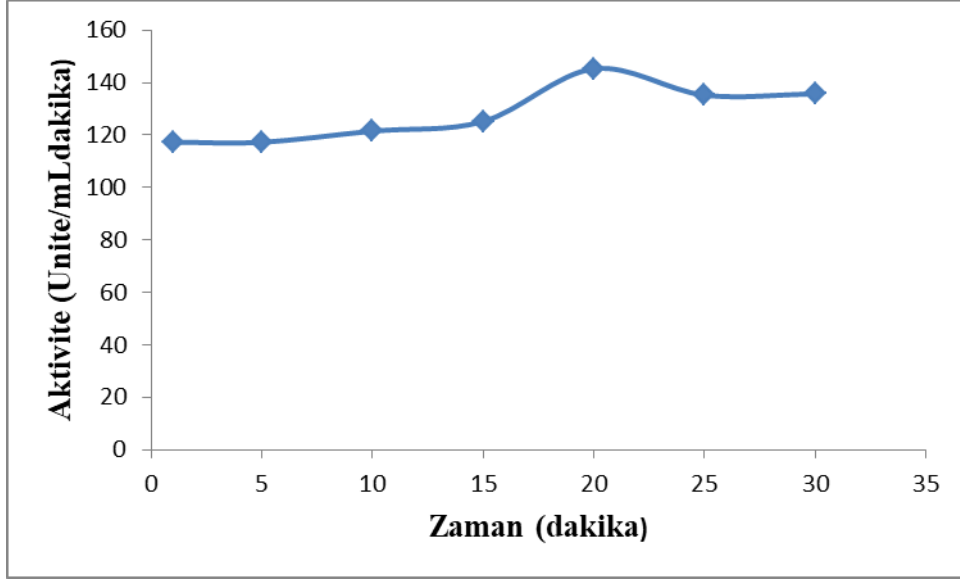
	İmmobilizasyon Türü	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)
Kestane lipazı	-----	10	30
Cam boncuk-enzim	Kovalent	10	60
Cam boncuk-enzim	Adsorpsiyon	10	60
Silikajel	Kovalent	10	60
Deniz kumu	Kovalent	10	60
Alumina	Adsorpsiyon	10	60
Amberlite IRA-900	İyonik	10	60

3.2.3. İmmobilize Lipazın Esteraz Aktivitesine Zamanın Etkisi

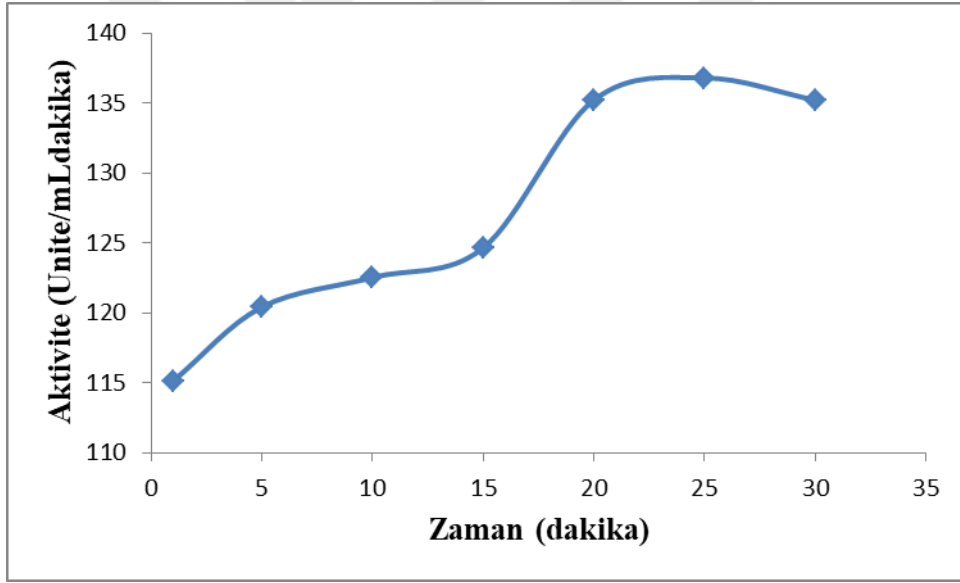
Lipazın esteraz aktivitesi üzerine zamanın etkisi incelendiğinde, esteraz aktivitesinde zamana bağlı olarak az bir artış olduğu bulunurken; doğal enzimde bu değer 5. dakikadan sonra daha fazla oranda olduğu saptandı. İmmobilizasyon işleminin enzim aktivitesini daha kararlı hale getirdiği görüldü (Şekil 4.21.).



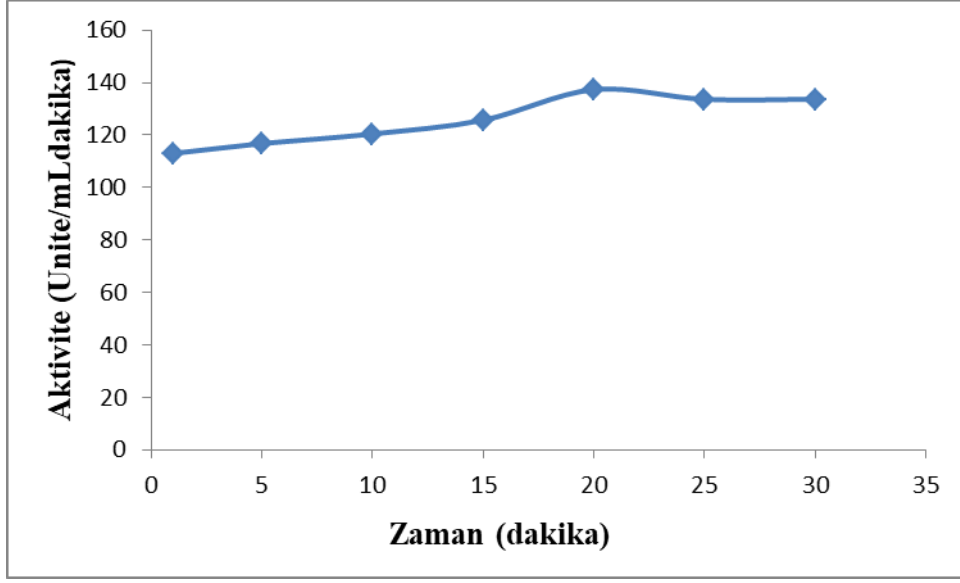
Şekil 4.15. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Deniz Kumuna İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine Zamanın Etkisi



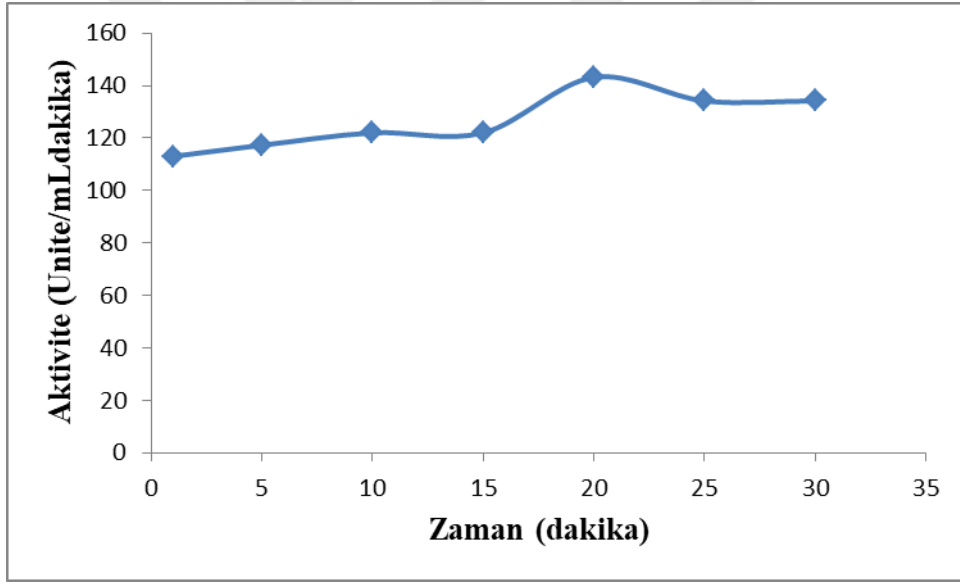
Şekil 4.16. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipaz Aktivitesine Zamanın Etkisi



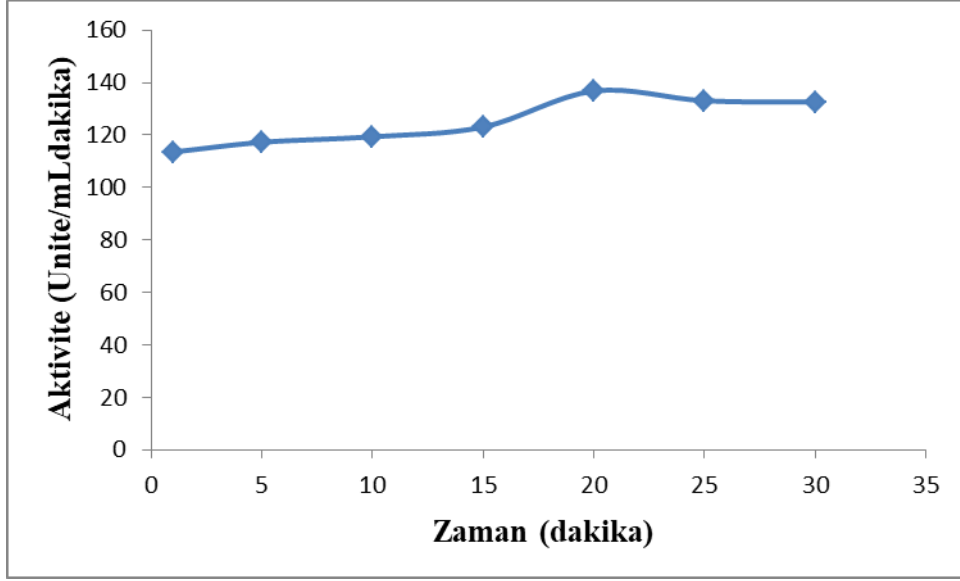
Şekil 4.17. Kovalent Bağlama İle Silikajele İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine Zamanın Etkisi



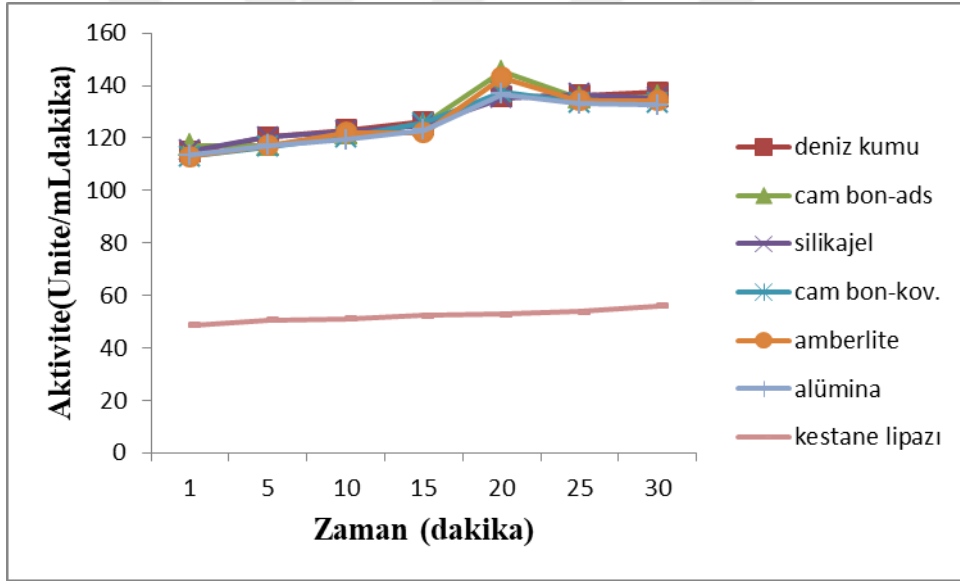
Şekil 4.18. Adsorpsiyon Yöntemi ile Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine Zamanın Etkisi



Şekil 4.19. İyonik Bağlama Yöntemi ile Amberlite'e İmmobilize Edilen Lipaz Aktivitesine Zamanın Etkisi



Şekil 4.20. Adsorpsiyon Yöntemi ile Alüminaya İmmobilize Edilen Lipaz Aktivitesine Zamanın Etkisi



Şekil 4.21. İmmobilize ve Doğal Lipaz Aktivitesine Zamanın Etkisi

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çeşitli endüstriyel işlemlerde (Margarin, süt ve yağ endüstrisinde, deterjan ve gıda endüstrisinde, saf kimyasalların ve ilaçların sentezinde, kağıt imalatında, kozmetik endüstrisinde, eczacılıkta ve tekstilde) kullanılan lipazların, çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan saflaştırıldığı ve bazı kinetik özelliklerinin incelendiği görülmüştür. Lipazın kestane tohumlarından saflaştırılması ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda kestaneden ilk kez saflaştırılan lipazın çeşitli taşıyıcılar üzerine immobilizasyonu gerçekleştirilip kinetik özellikleri incelenmiştir.

İmmobilizasyon tekniği ile enzimlerin kararlılığı arttırılmakta ve enzimler çeşitli endüstri alanlarında bu özellikleri nedeni ile uzun süre kullanılabilir. Bu çalışmada iyonik, kovalent ve adsorpsiyon yöntemi ile lipaz farklı taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiş ve özellikleri incelenmiştir. Kestane tohumu lipazı, en yüksek oranda (% 98,2 oranında) kovalent bağlama yöntemi ile Silikajele tutuklanmış; bunu kovalent bağlı olarak tutuklanan cam boncuk izlemiştir (% 74,41). Tutuklanma en düşük oranda adsorpsiyon yöntemi ile Alumina üzerine yapılmıştır. Adsorpsiyon ile immobilizasyonda taşıyıcı olarak Alumina kullanılmış ve immobilizasyon işleminin diğer yöntemlere göre düşük olduğu görülmüştür. Enzimin aktif merkezi etkilenerek üç boyutlu yapısında değişiklik meydana geldiği için substrata olan ilgi azalmıştır. Bu nedenle aktivitenin azaldığı düşünülmektedir. Çalışmamızda % tutuklanma oranı yüksek olan 6 taşıyıcı seçilmiş ve immobilize lipazın kinetik özellikleri bunlar üzerinde incelenmiştir. İmmobilize kestane lipazları için yapılan pH çalışmalarında immobilize lipazların optimum pH'ları, serbest enziminkiyle aynı, pH 10 civarında belirlenmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin optimum pH'larınının 10 olması, enzimin bazik karakterli bir enzim olduğunu göstermektedir. İmmobilize enzime ait sıcaklık-aktivite değerleri verilmiştir. İmmobilizasyon sonucu lipazın optimum

sıcaklığı pratik olarak değişmiştir. İmmobilize enzime ait sıcaklık-aktivite eğrisinin serbest enzime göre 60°C genişlemiş olması, immobilize lipazın nispeten yüksek aktiviteye sahip olduğunu ve termal kararlılığının arttığını bir kanıttır. Lipazın alginata immobilize edilmesiyle de immobilize lipazlarda aynı sonuçlar bulunmuştur [90]. Serbest ve bağlı enzimlerin esteraz aktivitesinin zamanla etkisi incelendiğinde; doğal enzimde 5. dakikadan sonra görülen aktivite artışı, immobilize lipazlarda görülmemiştir. Başka bir çalışmada da immobilizasyon işleminin, lipazı daha kararlı hale getirdiği görülmektedir [90,91]. İmmobilize lipazlar üzerine çeşitli maddelerin etkileri incelendiğinde; serbest enzimlerde olduğu gibi, yapılarında azot bulunan bileşikler immobilize enzimlerin aktivitelerinde artışa neden olmuştur.

Sonuç olarak kestane tohumlarından saflaştırılan lipaz enzimi ilk kez çeşitli taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiştir. Buna göre;

Kestane tohumu lipazının çeşitli taşıyıcılardaki % tutuklanmaları incelendiğinde; en iyi tutunmanın % 98,2 oranında kovalent bağlama yöntemi ile Silikajele tutuklandığı saptandı.

İmmobilize lipaz enzimlerinin esteraz aktivitelerinde, zamana bağlı olarak az bir artış olduğu görüldü.

1. Kestane Lipazının p-nitrofenil asetat substratına göre optimum sıcaklık değeri 30°C; optimum pH değeri ise 9 iken immobilizasyondan sonra optimum sıcaklık değerinin 30-60°C aralığında; optimum pH değerinin 10 olduğu görüldü.
2. Kestane lipazının esteraz aktivitesi için uygun reaksiyon süresi ise 20 dakika olarak belirlendi. İmmobilizasyondan sonra bu değerin değişmediği gözlemlendi.

Elde edilen sonuçlardan, ülkemizde yetişen ve yurt dışına ihraç edilen kestane tohumlarından lipaz enziminin saflaştırılıp çeşitli immobilizasyon işlemleriyle endüstri alanlarında kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Khrevioğlu, İ. Ö., Keha, E. E. 2009. Biyokimya. Aktif Yayınevi, İstanbul.
- [2] Aksoy, C., 2003, Lipaz ve Üreaz Enzimlerinin Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilizasyonu, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- [3] Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Ersoz, A., Dikmen, N., Menten, G. Özgnen, T. 1993. Harper'ın Biokimyası. pp. 978-975-953-311-3, Barış Kitapevi.
- [4] Gezer, E., 2009. Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu Ve Aromatik Esterlerin Sentezinde Kullanımı. Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 67, Antakya/Hatay.
- [5] Telefoncu, A. 1993. Besin Kimyası. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir
- [6] Wiseman, A. 1986, Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd Edition, Jon Wiley & Sons, Chicester, England.
- [7] Tutar, H., 2009, Candida rugosa Lipaz Enziminin Sporopollenin zerine Adsorbsiyonu ve Karakterizasyonu. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 74, Konya.
- [8] Akova, A. 2002. Çörekotu Lipaz Enziminin Teknolojik Uygulamalar. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul.
- [9] Aydemir, T. 1989. İmmobilize Stereospesifik Lipaz ile Yağ İnteresterifikasyon. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir.
- [10] Beisson, F., Tiss A., Riviere, C., Verger, R. 2000, Methods for Lipases Etection and Assay: A Critical Review. European Journal of Lipid Science and Technology 102: 133-153.
- [11] Cipolatti, E.P., Valrio, A., Nicoletti, G., Theilacker, E., Arajo, P.H.H., Sayer, C., Ninow, J.L., de Oliveira, D. 2014. Immobilization of Candida

- antarctica Lipase B on PEGylated poly(urea-urethane) Nanoparticles by Step Miniemulsion Polymerization, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 109: 116-121.
- [12] Jaeger, K.E., Reetz, M. T., 1998, Microbial Lipases Form Versatile Tools for Biotechnology, *Trends in Biotechnology*, 16: 396-403.
- [13] Bailey, J.E., Ollis, D.F. 1986, *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd Edition. McGraw Hill, Singapore.
- [14] Benjamin, S. and Pandey, A. 1998. *Candida rugosa* lipases: Molecular Biology and Versatility in Biotechnology. *Yeast*, 14: 1069-1087.
- [15] Paiva, A.L., Balcao, V.M., Maltaca, F. X., 2000, Kinetics and Mechanisms of Reactions Catalyzed by Immobilized Lipases, *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 187-204.
- [16] Kamori, M., Yamashita, Y. and Naoshima, Y., 2002, Enzyme Immobilization Utilizing a Porous Ceramics Support for Chiral Synthesis, *Chirality*, 14: 558-561.
- [17] <http://www.iisc.ernet.in/~currsci/july10/articles18.htm/>. Erişim tarihi: 19 Eylül 2017
- [18] Akkuş, P. 2006. Lipaz Kullanılarak şeker Esteri Sentezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Gebze.
- [19] Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V.T. 1999. The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29: 119-131.
- [20] Kierkels, J. G. T., Vleugels, L. F. W., Kern, J. H. A., Meijer, E. M., Kloosterman, M., 1990. Lipase Kinetics: On-line Measurement of the Interfacial Area of Emulsions. *Enzyme and Microbial Technology*, 12: 760-763.
- [21] Snellman, E. A., Colwell, R. R., 2004. *Acinetobacter* Lipases: Molecular Biology, Biochemical Properties and Biotechnological Potential. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31: 391-400.
- [22] Karaca, N. 2006, Poli(N,N-Dimetilakrilamit-Ko-Akrilamit) ve Poli (N-İzopropilakrilamit-Ko-Akrilamit)/K-Karragenan Polimerleri Kullanılarak

- Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 77, Ankara.
- [23] Sharma, R., Chisti Y. and Banerjee, U. C., 2001, Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases, *Biotechnology Advances*, 19: 627-662.
- [24] Rubin, B., Dennis, E. A., 1997, Lipases: Part B: Enzyme Characterization and Utilization, *Methods in Enzymology*, 286, New York: Academic Press, 1-563.
- [25] Nelson, J.M., Griffin, E.G. 1916, Adsorption of Invertase. *Journal of the American Society* 38: 1109-1916.
- [26] Grubhofer, N., Schleith, L. 1953, Modifizierte Ionenaustauscher als Spezifische Adsorbentien, *Naturwissenschaften* 40: 508.
- [27] Mosbach, K. 1971, Enzymes Bound to Artificial Matrixes. *Scientific American* 224: 26-33.
- [28] Manecke, G., Singer, G. 1960, Chemical Transformation of Polystyrene. *Macromolecular Chemistry and Physics* 37: 119-122.
- [29] Mitz, M.A. 1956. New Soluble Active Derivatives of an Enzyme as a Model for Study of Cellular Metabolism. *Science* 123: 1076–1077.
- [30] Bernfeld, P. and Wan, J. 1963. Antigens and Enzymes Made Insoluble by Entrapping Them into Lattices of Synthetic Polymers. *Science* 142: 678–679.
- [31] Quiocho, F.A. and Richards, F.M. 1964. Intermolecular Cross-linking of a Protein in The Crystalline State: Carboxypeptidase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 52: 833-839.
- [32] Chang, T.M.S. 1964. Semipermeable microcapsules. *Science* 146: pp.524-525.
- [33] Katchalski-Katzir, E., Silman, I., Goldman, R. 1971. Effect of The Microenvironment on The Mode of Action of Immobilized Enzymes. *Advances In Enzymology and Related Areas Of Molecular Biology* 34: pp.445-536.
- [34] Chibata, I., Tosa, T., Sato, T., Mori, T. and Matuo, Y. 1972. Fermentation technology. pp.383-389.
- [35] Telefoncu A., 1997, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı*, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.

- [36] Bakkal, M., 2006, Tutuklanmış *Candida Rugosa* Lipazı ile Rasemik Naproksen Metil Esterden (S)-Naproksen Üretiminde Proses Parametrelerinin İncelenmesi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 1-139, Ankara.
- [37] Wang, S.-F., Xie, F., Hu, R.-F., 2007, Carbon-coated Nickel Magnetic Nanoparticles Modified Electrodes as a Sensor For Determination of Acetaminophen, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 123: 495-500.
- [38] Aktsipetrov, O.A., 2002, Nonlinear Magneto-optics in Magnetic Nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 202: 165-173.
- [39] Dennler, S., Fromen, M.C., Casanove, M.J., 2008, Towards Atomic-scale design: a Theoretical Investigation of Magnetic Nanoparticles and Ultrathin Films, *Microelectronics Journal*, 39: 184-189.
- [40] Cui, Y., Li, Y., Yang, Y., Liu, X., Lei, L., Zhou, L., Pan, F., 2010, Facile Synthesis of Amino-silane Modified Superparamagnetic Fe₃O₄ Nanoparticles and Application for Lipase Immobilization, *Journal of Biotechnology*, 150: 171-174.
- [41] Chang, S.-W., Shaw, J.-F., Yang, K.-H., Chang, S.-F., Shieh, C.J., 2008, Studies of Optimum Conditions for Covalent Immobilization of *Candida rugosa* Lipase on Poly(ϵ -glutamic acid) by RSM, *Bioresource Technology*, 99: 2800-2805.
- [42] Park, S.W., Choi, S.Y., Chung, K.H., Hong, S.I., Kim, S.W., 2002, Characteristics of GL-7-ACA Acylase Immobilized on Silicagel Through Silanization, *Biochemical Engineering Journal*, 11: 87-93.
- [43] Tischer, W. and Wedekind, F., 1999, Immobilized Enzymes: Methods and Applications, *Topics in Current Chemistry*, 200: 95-126.
- [44] Kim, D. J., Shin, D. H., Hur, B. K., and Kim, E. K., 2000, Beef Tallow Hydrolysis by Immobilized Lipase, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10, 836.
- [45] Oh, J.M., Lee, D.H., Song, Y.S., Lee, S.G., Kim, S.W., 2007, Stability of Immobilized Lipase on Poly(vinyl alcohol) Microspheres, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 13(3): 429-433.

- [46] Macario A., Katovic A., Giordano G., Forni L., Carloni F., Filippini A., Setti L., 2005, Immobilization of Lipase on Microporous and Mesoporous Materials: Studies of the Support Surfaces, *Studies in Surface Science and Catalysis*, 155: 381-394.
- [47] Reshmi, R., Sanjay, G., Sugunan, S., 2007, Immobilization of α -amylase on Zirconia: A Heterogeneous Biocatalyst for Starch Hydrolysis, *Catalysis Communication*, 8(3): 393-399.
- [48] Bruce T.C., Bruce P.Y., Covalent Intermediates and Enzyme Proficiency, 2005, *Journal of the American Chemical Society*, 127 (36): 12478-12479.
- [49] Carolan N., Forster R.J., O'Fagain C., 2007, Covalent Attachment of Ferrocene to Soybean Peroxidase Glycans: Electron Transfer Mediation to Redox Enzymes Bioconjugate Chemistry, 18 (2): 524-529.
- [50] Han Y., Lee S.S., Ying J.Y., 2006, Pressure-driven Enzyme Entrapment in Siliceous Mesocellular Foam, *Chemistry of Materials*, 18 (3): 643-649.
- [51] Betancor, L., Lopez-Gallego, F., Hidalgo, A., Fuentes, M., Podrasky, O., Kuncova, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R., 2005, Advantages of the Preimmobilization of Enzymes on Porous Supports for their Entrapment in sol-gels, *Biomacromolecules*, 6 (2): 1027-1030.
- [52] Cao L., Van Rantwijk F., Sheldon R.A., 2000, Cross-linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase, *Organic Letters*, 2 (10): 1361-1364.
- [53] Wilson, L., Betancor, L., Fernandez-Lorente, G., Fuentes, M., Hidalgo, A., Guisan, J.M., Pessela, B.C.C., Fernandez-Lafuente, R., 2004. Cross-linked Aggregates of Multimeric Enzymes: a Simple and Efficient Methodology to Stabilize their Quaternary Structure, *Biomacromolecules*, 5(3): 814-817.
- [54] Lei, L., Bai, Y., Li, Y., Yi, L., Yang, Y., Xia, C., 2009, Study on Immobilization of Lipase onto Magnetic Microspheres with Epoxy Groups, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321: 252–258.
- [55] Immobilized Enzymes, 2004. <http://www.lib.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech- Environ/IMMOB/Immobil.htm>. Web adresinden 14 Eylül 2017 Tarihinde edinilmiştir.

- [56] Enzyme Immobilization, 2004.
<http://alfa.ist.utl.pt/~fidel/enzymatic/appendix/immob.html>. Web adresinden 14 Eylül 2017 Tarihinde edinilmiştir.
- [57] Uhlig, H. 1998. *Industrial Enzymes and their Applications*. Wiley J. & Sons, Inc. New York.
- [58] Krajewska, B. 2004, Application of Chitin- and Chitosan-based Materials for Enzyme Immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 126–139.
- [59] Etçi, K. 2011, Sol- jel Tekniğine göre Manyetik Nanopartiküllere Lipaz İmmobilizasyonu ve Bazı Enantiyoseçimli Tepkimelerde Kullanılması, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi 1-95, Konya.
- [60] Telefoncu A. 1986, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- [61] Kennedy, J.F. 1995, *Handbook of Enzyme Biotechnology*, Third Edition, Editör Allen Wisemann, Ellis Horwood, 235-310.
- [62] Goldstein, L., Manecke, G., 1976, *Applied Biochemistry And Bioengineering*, Academic Press, New York, 123-125.
- [63] Mosback, K. 1976, *Immobilized Enzymes, Methods In Enzymology*, Academic Press, New York, 44.
- [64] Guisan, J. M. 2006, *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, Second Edition, Humana Press, Totowa, NJ, 92-100.
- [65] Gao, X., 2004, *Immobilization of Lipases via Sol-Gel Procedures and Application of the Immobilized Lipases in Oleochemical Reactions*, Ph.D., University of Nebraska, Lincoln, NE, 40-49.
- [66] Knezevic, Z., Milosavic, N., Bezbradica, D., Jakovljevic, Z., Prodanovi, R. 2006, Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Eupergit C supports by Covalent Attachment. *Biochemical Engineering Journal*, 30: 269-278.
- [67] Gemeiner, P. 1992, *Materials for enzyme engineering*. in: Gemeiner P (Ed) *Enzyme Engineering*. Ellis Horwood, pp 13-119, New York.
- [68] Mattiasson, B., Kaul, R. 1991, Determination of Coupling Yields and Handling of Labile Proteins in Immobilization Technology. in: *Protein*

- immobilization. Fundamentals and Applications (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, pp 161-179, New York, NY.
- [69] Scouten, W.H. 1987, A Survey of Enzyme Coupling Techniques. In: Methods in Enzymology, volume 135, (Mosbach, K.), Academic Press, pp 30–65, London.
- [70] Yılmaz, E. 2010, Farklı Teknikler Kullanarak Değişik Destek Materyallerine Lipaz İmmobilizasyonu ve Bir Anti-inflammatör olan S-naproxenin Oluşumunda Kullanılması, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi 1-261. Konya.
- [71] Öztürk, N. 2006, Hidrofobik Nanoyapılarda Candida Rugosa Lipaz İmmobilizasyonu, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi 1-128, Aydın.
- [72] Braun S., Rappoport S., Zussman R., Avnir D. and Ottolenghi M., 1990, Sol-gel Based Enzyme Immobilization, Materials Letters, 10, 42-49.
- [73] Dickey, F.H., 1955, Specific adsorption, the Journal of Physical Chemistry, 59: 695-707.
- [74] Venton, D.L., Cheeseman, K.L., Chatterton, R.T., Anderson, T.L. 1984, Entrapment of Highly Specific Antiprogestrone Antiserum Using Polysiloxane Copolymers, Biochimica et Biophysica Acta, 797: 343-347.
- [75] Glad, M., Norrloew, O., Sellergren, B., Siegbahn, N., Mosbach, K., 1985, Use of Silane Monomers for Molecular Imprinting and Enzyme Entrapment in Polysiloxanecoated Porous Silica, Journal of Chromatography, 347: 11-23.
- [76] Arica, O, Suzuki, T, Sano, Y., Murakami, Y. 1996, Immobilization of a Thermostable Enzyme Using a sol-gel Preparation Method, Journal of Fermentation and Bioengineering, 82: 341-345.
- [77] Jin, W., Brennan, J.D. 2002, Properties and Applications of Proteins Encapsulated within Sol-gel Derived Materials. Analytica Chimica Acta, 461: 1-36.
- [78] Turgut, Ü. 2017, Lipaz Enziminin Armut Kabuğu, Akasya Yaprağı ve Kaolin Adsorbanları Üzerindeki İmmobilizasyonun İzoterm ve Kinetiğinin İncelenmesi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ordu.

- [79] Şengül, M. 2015, Lipaz Enzimin Magnetik Nanopartiküllere Farklı Ara Kollar Üzerinden İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu. Ç.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, pp 33-4
- [80] Arslan, Y., Handayani, N. Stavila, E. ve Loos K. 2013. Amberzyme Üzerine Kovalent İmmobilizasyon ile Pseudomonas fluorescens Lipazın Geliştirilmiş Performansı. Türk Biyokimya Derneği Dergisi. 38 (3): 313-318.
- [81] Prabhu, V. A., Tambe, S. P., Gandhi, N. N., Sawant, S. B., Joshi, J. B., 1999, Rice Bran Lipase: Extraction, Activity and Stability, Biotechnology Progress, 15:1083-1089.
- [82] Fuchs, C., Vine, N., Hills, M. J., 1996, Purification and Characterization of Acid Lipase From The Endosperm of Castor Oil Seeds, Journal of Plant Physiology, 149: 23-29.
- [83] Haas, M. J., Cichowicz, D. J., Dierov, J. K., 2001, Lipolytic Activity of Californica-Laurel (Umbellularia Californica) Seeds, Journal of American Oil Chemist's Society, 78, 1067-1071.
- [84] Abigor, D. R., Opute, F. I., Opoku, A. R., Osagie, A. U., 1985, Partial Purification and Some Properties of the Lipase Present in Oil Palm (Elaeis Guineensis) Mesocarp, Journal of the Science of Food and Agriculture, 36: 599-606.
- [85] Sanz, L. C., Olais, J. M., 1990, Characterization of Lupin Seed Lipase, Food Chemistry, 37: 221-228.
- [86] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein Measurement With Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275.
- [87] Erlanson, C., 1970, p-Nitrophenyl acetate as a substrate for a carboxyl-ester hydrolase in pancreatic juice and intestinal content, Scandinavian Journal of Gastroenterology, 5: 333-336.
- [88] Aydemir, T., 1989, İmmobilize Stereospesifik Lipaz ile Yağ İnteresterifikasyonu, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü-Ege Üniversitesi, İzmir.
- [89] Yagar, H., 2000, Ayva Polifenol Oksidazının Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonları, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü-Trakya Üniversitesi, Edirne.

- [90] Kılınç, A., 1990, Alginatta İmmobilize Edilmiş Lipazın Bazı Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans, Fen bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi.
- [91] Aydemir, T., Telefoncu, A., 1994, Lipase Immobilization on Different Supports For Interesterification of fats, Indian Journal of Chemistry, 33: 387-390.
- [92] Amtul, Z., Rahman, A.U., Siddiqui, R.A., Choudhary, M.I. 2002, Chemistry and mechanism of urease inhibition, Current Medicinal Chemistry, 9(14): 1323-1348.



ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Giresun'da doğdu. İlk ve Orta öğrenimini Gazipaşa İlköğretim Okulu'nda; lise öğrenimini 2006-2010 yılları arasında Mimar Sinan Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2010 yılında girdiği Ondokuz Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümünden 2015 yılında ikincilikle mezun oldu. 2015 yılında girdiği Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Yüksek Lisans programına halen devam etmektedir.

