



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SOL- JEL TEKNİĞİNE GÖRE MANYETİK NANOPARTİKÜLLERE LİPAZ İMMOBİLİZASYONU VE BAZI ENANTİYOSEÇİMLİ TEPKİMELERDE KULLANILMASI

Kübra ETCİ

YÜKSEK LİSANS

Kimya Anabilim Dalı

Temmuz-2011

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Kübra ETCİ tarafından hazırlanan "Sol- Jel Tekniğine Göre Manyetik Nanopartiküllere Lipaz İmmobilizasyonu Ve Bazı Enantiyoseçimli Tepkimelerde Kullanılması" adlı tez çalışması 04/07/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	**İmza**
Başkan Prof. Dr. Mustafa YILMAZ	.....
Danışman Prof. Dr. Mehmet SEZGİN	.....
Üye Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK	.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Bayram SADE
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Bap tarafından 10201025 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Kübra ETCİ

06.07.2011

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

SOL- JEL TEKNİĞİNE GÖRE MANYETİK NANOPARTİKÜLLERE LİPAZ İMMOBİLİZASYONU VE BAZI ENANTİYOSEÇİMLİ TEPKİMELERDE KULLANILMASI

Kübra ETCİ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet SEZGİN

2011, 95 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Mehmet SEZGİN
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK

Enzimlerin üretimi için ham madde sınırlıdır. Bu yüzden hammadde olarak mikrobiyal kaynaklar kullanılmaya başlanmıştır. Fakat ham maddenin izole edilmesi ve arıtılması çok pahalı olması öte yandan enzimlerin aktivitelerini kaybetmeden geri kazanılması imkansızdır. Enzimler reaksiyon ortamından geri kazanılmak istendiğinde proses kontrolü gibi bazı zorluklarla karşılaşılabilir ve bunlar işlem sırasında veya işlem sonrasında yüksek aktivite kaybetmeden uzaklaştırılabilmelidirler. Bu yüzden bu çalışmada, destek materyali olarak manyetik (Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI; Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2) nanopartikülleri hazırlandı ve bu nanopartiküller lipaz immobilizasyonu için kullanıldı. Bu çalışmada immobilizasyon şartlarının optimizasyonu çalışmaları (optimum pH, sıcaklık, ısıl kararlılık, depo kararlılığı gibi) gerçekleştirildi. İmmobilize lipazların katalitik özellikleri bazı profen türevi aromatik karboksilli asit metil esterlerinin (R/S- naproksen metil esteri, R/S- 2-fenoksipropiyonik asit metil esteri ve R/S-mandelik asit metil esteri) enantiyoseçimli hidrolizi üzerinde gerçekleştirildi./incelendi.

Anahtar Kelimeler: Enantiyoseçimli hidroliz, immobilizasyon, lipaz, manyetik nanopartikül, sol-gel tutuklama.

ABSTRACT

MS THESIS

BY SOL- GEL TECHNIQUE, IMMOBILIZATION OF LIPASE ON MAGNETIC NANOPARTICLES AND THEIR USING AT SOME SELECTED ENANTIOSELECTIVE REACTIONS

Kübra ETCİ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN CHEMİST

Advisor: Prof. Dr. Mehmet SEZGİN

2011, 95 Pages

Jury
Prof. Dr. Mehmet SEZGİN
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK

The raw material for production of enzymes were limited,then microbial orijinated sources were began to use as raw material but isolation and purification of these raw materials are very expensive processes. On the other hand, it is impossible to recover the enzymes without loosing the enzyme activity during the processes. This is caused to some difficulties as process control and must be recover from the process with as much as higher activity either at the end of process or at any time during the process. So in this study, as support magnetic Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI and Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2 nanoparticules were prepared and the nanospheres were used for the lipase immobilization. Here in, studies of optimization of the immobilization conditions(optimum pH, temperature, thermal stability, storage) were obtained. The catalytic properties of the immobilized lipases were utilized to the enantioselective hydrolysis of some profen derivatives of aromatic carboxylic acid methyl esters (R/S-Naproxen methyl ester, R/S-2-phenoxypropionic acid, R/S-mandelic acid methyl ester).

Keywords: Enantioselective hydrolysis, immobilization, lipase, magnetic nanoparticles, sol-gel entrapment.

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Mehmet SEZGİN yönetiminde yapılarak Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü' ne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur. Bu çalışma S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğü 10201025 nolu proje olarak desteklenmiştir.

İlk olarak bu çalışmanın seçiminde, hazırlanmasında ve araştırılmasında her türlü bilgi ve öneriyle bana yön veren, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet SEZGİN' e ve Prof. Dr. Mustafa YILMAZ hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca bana laboratuvar imkanı sağlayan Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. İbrahim KARATAŞ' a, ve Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde görev yapan çok değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarımda bana her konuda yardımcı olan ve tezimin hazırlanmasında emeği geçen Arş. Gör. Dr. Elif YILMAZ'a Arş. Gör. Arzu UYANIK'a, arkadaşlarım, Serkan SAYIN'a, Şükrak KÜÇÜKKARTALLAR' a ve diğer yüksek lisans öğrencilerine teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmam boyunca bana büyük sabır ve ilgi gösteren, maddi, manevi yardımlarını ve desteklerini benden esirgemeyen çok değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kübra ETCİ
KONYA-2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Enzimler ve Genel Özellikleri 1
1.2. Lipazlar 2
1.3. *Candida rugosa* Lipazı (CRL) 4
1.4. Enzim İmmobilizasyonu 5
1.4.1.İmmobilizasyon yöntemleri 8
1.5. Nanopartiküller 19
1.5.1. Manyetit-Demir Oksit Nanopartikülleri 19
1.6. Lycopodium clavatumdan Sporopollen 22
1.7. Naproksen 23
1.8. Fenoksi-Propiyonik Asit 25
1.9. Mandelik Asit 26

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **28**

3. MATERYAL VE YÖNTEM **37**

3.1. Kullanılan Aletler 37
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler 37
3.3. YÖNTEM 38
3.3.1. Lipaz Aktivitesinin tayini 38
3.3.2. Protein miktarı 38
3.3.3. Optimum pH tayini 39
3.3.4. Optimum sıcaklık tayini 40
3.4. Kararlılık testleri 40
3.4.1. Termal kararlılık 40
3.4.2. Depo kararlılığı 40
3.4.3. Tekrar kullanılabilirlik 40
3.5. Lipaz İmmobilizasyonu 41
3.5.1. Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün sentezi 41
3.5.2. Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün APTES ile modifiye edilmesi 41
3.5.3. Sporopollenin-HMDI ile etkileştirilmesi 42
3.5.4. Manyetik Fe_3O_4- APTES nanopartikülünün Spo-HMDI ile etkileştirilmesi 42
3.5.5. Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün EPPTMS ile modifiye edilmesi 43
3.5.6. Sporopollenin-NH_2 elde edilmesi 44
3.5.7. Manyetik Fe_3O_4- EPPTMS nanopartikülünün Spo-NH_2 ile bağlanması 44

3.5.8. Fonksiyonlandırılmış manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerine sol-jel tutuklama metoduna göre lipaz immobilizasyonu 45
3.6. HPLC Çalışmaları 46
3.6.1. Naproksen metil ester türevinin sentezi 46
3.6.2. (*R*/*S*)- 2-fenoksi propiyonik asit metil ester sentezi 48
3.6.3. (R/S)-Mandelik Asit Metil Ester Türevi 49

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 52

4.1. Lipaz immobilizasyonu için farklı manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerinin hazırlanışı ve karekterizasyonu 52
4.1.1. Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün sentezi 52
4.1.2. Sporopollenin-HMDI ile etkileştirilmesi 54
4.1.3. Manyetik Fe_3O_4- APTES nanopartikülünün Spo-HMDI ile bağlanması 55
4.1.4. Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün EPPTMS ile modifiye edilmesi 57
4.1.5. Sporopollenin-NH_2 ile fonksiyonlandırılması 58
4.1.6. Manyetik Fe_3O_4- EPPTMS nanopartikülünün Spo-Amin' e bağlanması 59
4.2. Sol-Jel Tekniğine göre Lipaz İmmobilizasyonu 61
4.2.1. Fonksiyonlandırılmış Manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerine sol-jel tutuklama metoduna göre lipaz immobilizasyonu 61
4.3. İmmobilize Lipazların Enantiyoseçimli Tepkimelerde Kullanılması 70
4.3.1. Manyetik immobilize lipazlar ile (R,S)-Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi 71
4.3.2. Manyetik immobilize lipazlar ile (*R*/*S*)- 2-Fenoksi Propiyonik Asit Metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi 74
4.3.3.Manyetik immobilize lipazlar ile (R/S)-Mandelik Asit metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi 77

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 79

5.1. Sonuçlar 79

KAYNAKLAR 80

ÖZGEÇMİŞ 94

SİMGELER

Simgeler

CRL	*Candida rugosa* lipaz
p-NPP	*p*-nitrofenil palmitat
TEOS	Tetraetoksisilan
OTES	Oktiltrietoksisilan
MTMS	Metiltrimetoksisilan
PVA	Polivinilalkol
HMDI	Hekzametilendiizosiyanat
SPO	Sporopollenin
APTES	Aminopropiltrietoksisilan
EPPTMS	Epoksipropoksipropilsilan

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler ve Genel Özellikleri

Enzimler, canlı sistemlerinde gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonlarda yer alan protein yapılı biyokatalizörlerdir. Kimyasal katalizörlerin aksine, prosesin enerji gereksinimini azaltarak düşük sıcaklık (genellikle 20-40 ^{o}C) ve basınçta (atmosfer basıncı), sulu çözeltilerde ılımlı koşullar altında reaksiyonları katalizleme özelliğine sahiptirler. Optimum pH aralıkları genellikle 5-8' dir. Kimyasal katalizörlerde karşılaşılan bozulma, izomerizasyon, rasemizasyon ve yeniden düzenlenme gibi yan reaksiyonlar gözlenmemektedir. Biyokatalizörler, tepkimeleri kimyasal katalizörlere göre 10^{8}-10^{10} kat daha hızlı katalizlerler. Kimyasal katalizörler genellikle % 0,1–10 derişim aralığında kullanılırken, biyokatalizörler aynı katalitik etkiyi 10^{-3} - 10^{-4} derişiminde gösterebilirler (Tiryaki, 1993; Kennedy, 1995; Faber 2000; Bakkal, 2006).

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 kullanılabilme imkanı 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 (Gezer, 2009).

Çizelge 1.1 Enzimlerin Kullanım Alanları (Telefoncu, 1997)

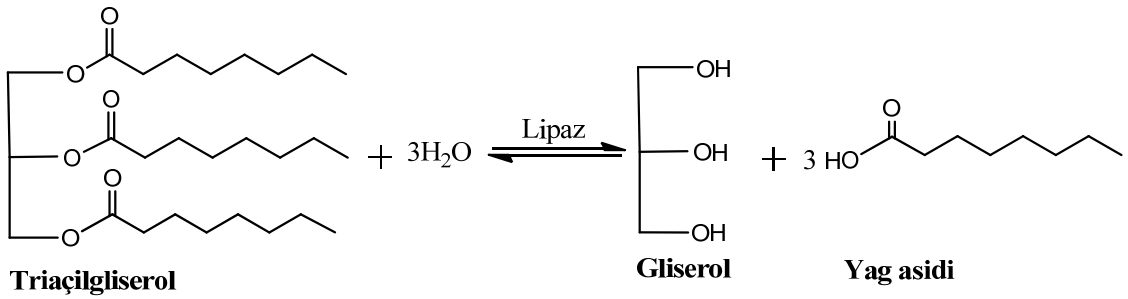
Enzim	**Kullanım alanı**
Kolesterol oksidaz	Tıp' ta kolesterol tayininde
Proteazlar, lipaz, amilaz	Deterjan sanayinde
Laktaz, mikrobiyal proteazlar	Süt ve süt ürünleri endüstrisinde
Pektinaz, selülaz, limonaz	Meyve suyu sanayinde
Proteaz, lipaz	Deri sanayinde
Amilaz, glukoz izomeraz	Nişasta endüstrisinde
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

Ünite: Bir mikromol substratı bir dakikada ve optimal koşullarda ürüne çeviren enzim miktarı bir ünite olarak kabul edilmektedir. Enzim üniteleri U şeklinde gösterilmektedir.

Spesifik Aktivite: Bir miligram proteinde bulunan enzim ünite sayısı spesifik aktivite olarak kabul edilir. Spesifik aktivite ünite/mg protein olarak kabul edilmektedir.

1.2. Lipazlar

Lipazlar, tri-, di- ve monoaçilgliserollerin (hayvan, bitki ve mikrobiyal yağların ana bileşeni) karboksil ester bağlarının bölünmelerini (hidrolizini) katalizleyen enzimlerdir. Bu reaksiyon sonucu karboksilik asitler ve alkoller oluşur (Bakkal, 2006).



Şekil 1.1. Lipazların genel hidroliz şeması

Biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan enzimlerin yaklaşık %25'i lipazlardır. (Benjamin, 1998; Mutlu 2006).

Lipazlar (E.C.3.1.1.3), hidrolazlar sınıfında olup triaçil gliserol ester hidrolazlar olarak adlandırılırlar (Bakkal, 2006).

Farklı mikroorganizmalardan elde elden lipazlar en küçük 20-25 kDa moleküler ağırlığında iken en büyükleri ise 60-65 kDa molekül ağırlığına sahiptir (Cygler ve Schrag, 1999). Yapılan araştırmalar sonucunda tüm lipazların α/β-hidrolaz katlanması (merkezde her iki taraftan α-heliksler ile kaplanan hidrofobik β-düzlemi), Ser-His-Asp/Glu katalitik üçlüsünden oluşan bir aktif konum, bir oksianyon boşluğu (substratın karbonil grupları üzerindeki oksianyonların gelişiminin dengede tutulmasını sağlar ve pek çok durumda aktif konumu kapatan α-heliksten oluşan bir kapak içerdikleri gözlemlenmiştir (Jaeger ve Reetz, 1998; İşbakan, 2006).

Lipazlar (E.C.3.1.1.3) sentetik organik kimyada yüksek bölge ve enantiyoseçimlilikle farklı rasemik bileşiklerin (rasemik sekonder alkoller, rasemik karboksilik asitler) kinetik rezolüsyon katalazinde en çok kullanılan enzimler arasındadır (Wong ve Whitesides, 1994; Schmid ve Verger, 1998; Jose ve ark., 2007).

Lipazlar birçok bakteri mantardan kültür ortamında üretilmektedir. Lipazlar sadece hidroliz değil aynı zamanda uzun zincirli açilgliserollerin sentezini de katalizlemektedirler. Biyoteknolojide önemli kullanımı olan deterjanlarda, gıda katkı maddelerinin üretiminde, kağıt endüstrisinde ve streoseçiçi transformasyonların biyokatalizinde kullanılmaktadır. Bu uygulama lipazları organik kimyada enzimler sınıfında en yaygın kullanılan enzim olduğunu gösterir. Bu durum lipazları organik kimyada biyokatalizörlerin önemli bir grubu yapmaktadır (Jaeger ve Reetz, 1998).

Lipazlar, esterleşme, transesterleşme ve hidroliz tepkimelerini düşük sıcaklıkta katalizlemeleri, susuz ortamda kararlı ve aktif olmaları, kofaktör gerektirmemeleri, yüksek katalitik güçleri, ucuz olmaları, yüksek substrat seçimlilikleri, yan ürün oluşumunu önlemeleri nedeniyle yaygın olarak kullanılırlar (Sharma ve ark., 2001; İşbakan, 2006).

Lipazların endüstrideki bazı uygulama alanları Çizelge 1.2'de verilmiştir. (Sharma ve ark., 2001).

Çizelge 1.2. Lipazların endüstrideki bazı uygulamaları

Endüstri	Tepkime	Ürün/uygulama
Deterjan	Yağların hidrolizi	Fabrikalardan yağ atıklarının uzaklaştırılması
Süt ürünleri	Süt yağının hidrolizi, peynirin olgunlaşması	Süt, peynir ve tereyağında tat geliştirme
İçki	Aroma geliştirme	İçki
Yağ	Transesterleşme, hidroliz	Kakao yağı, margarin, yağ asitleri, gliserol
Et ve balık	Tat artırma	Et balık ürünleri
Kimyasallar	Enantiyomseçimlilik, sentez	Kiral yapı taşları
Farmasotik	Transesterleşme, Hidroliz	Sindirime yardımcı, özel yağlar
Kozmetik	Sentez	Nemlendirme
Deri	Hidroliz	Deri Ürünleri
Kağıt	Hidroliz	Kaliteli kağıt üretimi

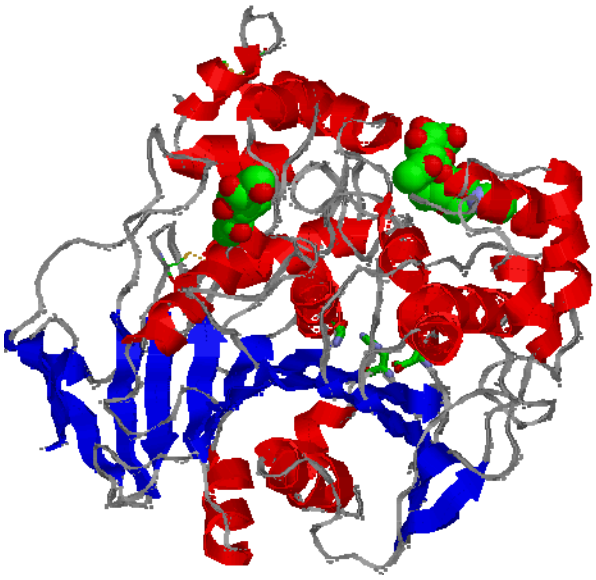
Endüstriyel uygulamalarda lipazlar hala serbest olarak kullanılmasına rağmen son yıllarda enzimlerin tekrar kullanılması ile teknolojik proseslerin ekonomisini iyileştirmek ve klasik enzimatik yöntemlerde yaşanan ürün ile enzimin ayrılma zorluklarını önlemek için, lipazlar immobilize edilmektedir (Bailey, 1986; Webb, 1992; Benjamin ve Pandey, 1998; Paiva ve ark., 2000; Kamori ve ark., 2002; Bakkal 2006).

1.3. *Candida rugosa* Lipaz (CRL)

CRL, Serin, Glutamin ve Histidin (Ser- His-Glu) katalitik üçlüsünden oluşan ve 31 amino asitten oluşan bir kapağı olan aktif bölgeye sahiptir. (Benjamin ve Pandey, 1998; Paiva ve ark., 2000; Bakkal 2006). Bu kapak aktif bölgeyi kısmen kaplar. Kapağın aktif bölgeye bakan yüzeyi hidrofobik, diğer yüzeyi ise hidrofiliktir (Tejo ve ark., 2004). Kapak açık ve kapalı olmak üzere iki farklı konformasyonda bulunabilir. Kapak kapalıyken 90° hareket ettiğinde açık forma gelir. Kapağın görevi enzimin aktif konumuna substrat girişini sağlamaktır (Secundo ve ark., 2003). Kapalı konumda enzim inaktif ve enantiyoseçimliliği düşük, açık konumda ise aktif ve enantiyoseçimliliği yüksektir. Enzimler organik çözücülerde genellikle çözünmezler. Bu durumda tepkime su-organik çözücü iki faz ara yüzeyinde gerçekleşir. CRL, prolin aminoasitinin hidrofobik yüzeyiyle su-yağ arayüzeyine bağlanır (James ve ark., 2003). Enzim aktivitesinin arayüzeyde artması arayüzey aktivasyonu olarak bilinir. Diğer birçok lipaz türünde gözlenmeyen arayüzey aktivasyonu *Candida rugosa* lipazda gözlenmektedir. CRL enzimi suda çözündüğü zaman kapağı kapalı ve hidrofilik kısmı çözücüye doğru

dönüktür. Lipazın su-organik çözücü arayüzeyine adsorbsiyonundan sonra kapak açılır ve enzimin hidrofobik kısmı ara yüzeyde ortaya çıkar (Mutlu, 2006).

Mikrobiyal lipazlar arasında, *Candida rugosa* lipaz yaygın uygulama alanlarından dolayı yağ hidrolizinde, transesterleşmede, esterifikasyonda ve enantiyoseçimli biyodönüşümlerde çok önemli bir enzimdir (Bezbradica ve ark., 2006; Santos ve Castro, 2006; Ting ve ark., 2006). Bu lipaz yüksek aktivite ve düşük fiyatından dolayı endüstride en çok kullanılan enzimlerden biri olmuştur (Vakhlu ve ark., 2006; Bezbradica ve ark., 2006; Santos ve ark., 2008).



Şekil 1.2. *Candida rugosa* lipazının üç boyutlu yapısı

1.4. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, hücrelerde sentezlenen, canlı organizmalarda oluşan tüm reaksiyonların ılımlı koşullarda gerçekleşmesini ve bu reaksiyonların uyumlu bir biçimde koordinasyonunu sağlayan protein yapısındaki spesifik katalizörlerdir. (Telefoncu, 1997). Enzimler suda çözünürler ve endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması mümkün değildir. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılamadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması düşünülebilir (Telefoncu, 1997). 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 (Telefoncu, 1997). Belirtildiği gibi katalizör olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek mümkün olmadığından enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizörler olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir. Ayrıca serbest enzimler sürekli sistemlere de uygulanamazlar (Telefoncu, 1997). Tüm bu sorunları olumlu yönde çözümleyebilmek, enzimleri daha çekici hale getirmek için enzim immobilizasyonu üzerine yoğunlaşılmıştır (Aksoy, 2003).

Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel ya da kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matris veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklanmasıyla immobilize edilirler (Telefoncu, 1997).

Enzimlerin biyokatalizör olarak kimyasal uygulamalara göre birçok üstünlükleri olmasına rağmen, endüstriyel kullanımlarında karşılaşılan sorunlar nedeni ile çoğu proseste kullanımları ekonomik değildir; enzimlerin immobilizasyonu ile karşılaşılan sorunlar çözülebilmektedir. Biyokatalizör olarak kullanılan biyoproseslerin ekonomik olabilmesi için, en uygun katalizör seçimi ve reaksiyon koşullarının belirlenmesinin yanında, biyokatalizörün sürekli sistemlerde uzun süre veya kesikli sistemlerde defalarca kullanılabilmesi oldukça önemlidir. İmmobilize enzimler sürekli reaktörlerde uzun süre, kesikli reaktörlerde defalarca kullanılabilirler; enzimlerin ısıl ve işletim kararlılıkları artar, reaksiyon ortamından ayrılmaları kolay ve ekonomik bir hale gelir. Bu özellikleri ile tutuklanmış enzimler, pahalı olan substrat ve enzimden yüksek verim alınmasını sağlamaktadır (Bakkal, 2006; Wang ve ark., 2007; Aktsipetrov, 2002; Dennler ve ark., 2008; Cui ve ark., 2010). Enzim immobilizasyon teknolojisi enzimin tekrar kullanılabilirliğini geliştirmek, enzimlerin aktivitesinin kararlılığını artırmak için etkili bir yoldur (Chang ve ark., 2008). İmmobilize lipazlar katalizör olarak sürekli reaksiyon sistemlerinde kullanılabilirler ve aynı zamanda lipazın termal ve pH kararlılığı lipazın taşıyıcı matrikse immobilizasyonuyla artırılabilir (Park ve ark., 2002). Böylece, immobilize lipazlar sert/zor istenilmeyen sıcaklık ve pH şartları altında kullanılmaktadırlar. Lipazın immobilizasyonu çözünmez olmasını sağlar ve böylece daha sonra lipaz reaksiyon karışımından kolayca ayrılabilir (Tischer ve Wedekind, 1999; Kim ve ark., 2000; Oh ve ark., 2007). Bu yüzden enzim teknolojisinde suda çözünmeyen desteklerde enzimin immobilizasyonu aktif araştırma konusu olmuştur. İmmobilize enzimlere fiziksel adsorpsiyon (Macario ve ark. 2005; Reshmi ve ark.

2007), kovalent bağlama (Bruice ve ark. 2005; Carolan ve ark. 2007), polimerlere tutuklama ya da enkapsülasyon (Han ve ark. 2006; Betancor ve ark. 2005) ve çapraz bağlama (Cao ve ark., 2000; Wilson ve ark., 2004) gibi farklı stratejiler önerilmiştir (Lei ve ark., 2009).

Farklı yöntemlerle çözünmez forma getirilmiş olan immobilize enzimlerin serbest enzimlere göre bazı üstünlükleri vardır. Bunlar (Telefoncu 1997);

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilirler ve ürünlerin enzimler tarafından kirletilmesi gibi bir problem oluşmaz.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.s.) karşı daha dayanıklıdırlar.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilirler.
- Sürekli işlemlere uygulanabilirler.
- Serbest enzimlere kıyasla daha kararlıdırlar.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalaması (autolysis) olasılığı azalır.
- Mekanistik çalışmalar için uygundur.

Genel olarak immobilizasyon yöntemlerini şekil 1.2'deki gibi sınıflandırmak mümkündür.



Şekil 1.3. İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

1.4.1. İmmobilizasyon yöntemleri

1.4.1.1. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri

Taşıyıcıya bağlama yöntemi uygulamalarında enzim için uygun taşıyıcı seçimi önemlidir. Bu yöntemde bağlanma kimyasal (kovalent veya iyonik) ya da fiziksel (adsorbsiyon) yolla gerçekleşeceği için enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler dikkate alınmalıdır. Taşıyıcı seçiminde partikül büyüklüğü, toplam yüzey hidrofobik grupların hidrofobik gruplara oranı ve taşıyıcının kimyasal bileşimi gibi kriterler esas alınır (Telefoncu, 1997).

Çizelge1.3. Enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan taşıyıcılar

Anorganik	**Doğal polimerler**	**Sentetik polimerler**
Kil, cam	Selüloz	Polistiren türevleri
Silikajel	Nişasta	Poliakrilamid
Bentonit	Dextran	Naylon
Hidroksiapatit	Agar ve agaroz	Vinil ve alil polimerler
Titandioksit	Karragenan	Oxiranlar
Nikeloksit	Kollagen	Metakrilat
Pomza taşı	Kitin kitosan	İ. Değiştirici reçineler
Aktif karbon	Jelatin	M. anhidrid polimerler
Metaller	Albumin	Siklodekstrin polimerleri

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıda aranan nitelikler;

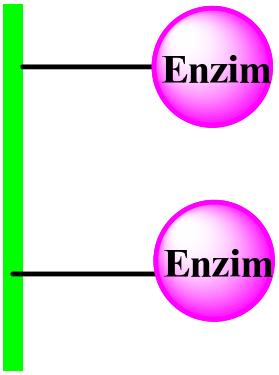
- Hidrofilik karakter
- Suda çözünmeme
- Gözenekli (poröz) yapı
- Mekanik stabilite ve uygun partikül formu
- Kimyasal ve termal stabilite
- Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcıların ılıman koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşıma
- Mikroorganizmalara karşı dirençli olma
- Ucuz olma
- Zehirsiz olma
- Rejenere olabilme

Enzim immobilizasyonu ılımlı koşullarda (oda sıcaklığı, nötr pH vb.) yapılmalıdır. Yüksek sıcaklık, kuvvetli asidik veya bazik ortam, organik çözgenler ve

yüksek tuz konsantrasyonu ile muamele, denatürasyona ve böylece enzim aktivitesinin kaybına neden olur. Aktif merkezde farklı fonksiyonlara sahip iki bölge vardır. Katalitik merkez ve substrata spesifikliği sağlayan merkez (Telefoncu, 1997). Aktif merkezdeki amino asitler veya merkezin üç boyutlu yapısı değişirse katalitik aktivite de düşer ve substrat spesifikliği değişir. Bu yüzden yapılacak immobilizasyon işleminde herhangi bir kovalent bağlama söz konusu ise bu bağlamanın enzim aktivitesi için gerekli olan amino asitler üzerinden gerçekleşmemesine ve bu grupların bağlanma sırasında sterik olarak engel oluşturmamasına dikkat edilmelidir. Kovalent bağlama enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir. Enzim immobilizasyonu yaparken, enzim immobilizasyonu esnasında veya sonrasında enzim aktif merkezine zarar vermeyecek bir yöntem seçilmelidir. İşlem sırasında herhangi bir bağlanma söz konusuysa (iyonik veya kovalent bağlanma) bu bağlanmanın ya aktif merkez için esansiyel amino asitler üzerinden gerçekleşmeyeceği taşıyıcılar seçilmelidir. İmmobilizasyonda bahsedilen yöntemlerin ayrı ayrı kullanılabildiği gibi, kombine olarak kullanılmaları da mümkündür (Telefoncu, 1997).

Kovalent Bağlama:

Enzimlerin reaktif taşıyıcılara kovalent bağlanması protein kimyasında bilinen yöntemler ile ve genelde sulu ortamda gerçekleştirilir. Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir (Telefoncu, 1997). Taşıyıcıya kovalent bağlanma enzim zincirindeki amino asitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir. Taşıyıcı suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde de hidrofobik karakterde olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik kararlılığa sahip olmalıdır. Bu tür taşıyıcıların seçiminde enzim-taşıyıcı bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözgenlere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilir (Telefoncu, 1997; Goldstein ve Manecke, 1976; Mosback, 1976; Öztürk, 2006).



Şekil.1.4. Kovalent bağlama (Guisan, 2006)

Adsorpsiyon:

Bu yöntem, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılıp belli bir süre etkileştirildikten sonra, enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimlerdir. Adsorbanlar çok değişik türde olmakla birlikte iyi bir adsorbsiyon sağlayabilmek için genellikle adsorbanın bir ön işlemden geçirilmesi gerekmektedir. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan adsorbanlar; aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, $CaCO_3$, kül, kollodyum, silikajel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır. Adsorbsiyon yönteminin avantajı; enzim immobilizasyon işleminin basit oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi ve bir yandan immobilizasyon gerçekleştirilirken diğer yandan da enzim saflaştırılmasına olanak sağlamasıdır. İşlem kolay olduğu gibi ılımlı koşullarda gerçekleşmekte ve önemli ölçüde enzim inaktivasyonuna da neden olmamaktadır (Knežević, 2004; Andrade ve Hlady, 1986).

Yöntemin dezavantajları ise; her ne kadar immobilizasyon işlemi kolaysa da optimal koşulların saptanması çok güçtür. Eğer enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa bu durumda desorpsiyon sonucu enzim serbest hale geçmekte ve ürünlerin kirlenmesine neden olmaktadır (Telefoncu, 1997; Aksoy, 2003).

İyonik Bağlama:

Bu yöntem, iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. Bazı durumlarda iyonik bağlama yanında

fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır. İyonik bağlama ılımlı koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçışı söz konusudur (Telefoncu, 1997; Karaca 2006).

1.4.1.2. Çapraz Bağlama Yöntemleri

Küçük moleküllü bi- veya multi-fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlar. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH'a ve immobilize edilecek enzime çok bağımlıdır. İntermoleküler bağlanmalar yanında intramoleküler bağlanmalar da söz konusudur (Telefoncu, 1997).

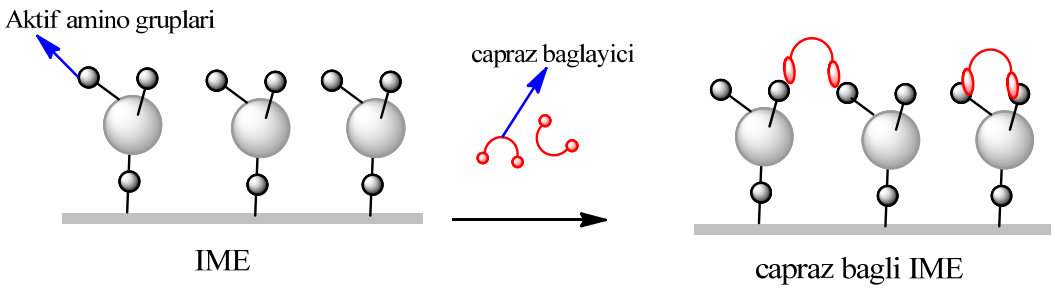
Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu dört farklı şekilde gerçekleştirilir;

a) Enzimin yalnız bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu

b) Enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu

c) Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıda adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu

d) Enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonudur. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehid, klorformat ve karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bisoksiranlar, divinilsulfanlar, p-benzokinonlar, geçiş metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir. Çapraz bağlama reaksiyonu ılımlı koşullarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur (Telefoncu, 1997; Öztürk, 2006).



Şekil.1.5. Çapraz bağlı immobilize enzimler (Cao, 2005)

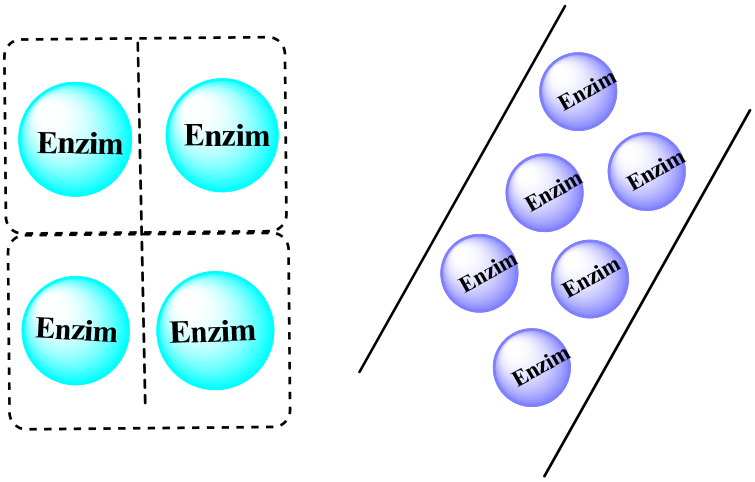
1.4.1.3. Tutuklama Yöntemleri

Tutuklama yönteminde, bağlama yöntemlerinde yapılan immobilizasyondan farklı olarak enzim molekülünün kimyasal veya fiziksel yollarla herhangi bir taşıyıcıya bağlanmadan belirli bir ortamda tutulması sağlanır. Tutuklama işlemleri sırasında enzim moleküllerinin polimer matris içindeki kafeslerde veya yarı geçirgen membranlar içinde veya mikrokapsülleme ve misellerde tutulması sağlanır. Bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama immobilizasyonundan ayıran en önemli özellik, enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır (Telefoncu, 1997).

Polimer Matriste Tutuklama:

Polimerizasyon ve çapraz bağlamanın oluştuğu ortamda enzim de bulunduğu takdirde enzim çapraz bağlama sonucu oluşan odacıklarda (kafes) tutuklanmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamittir (Telefoncu, 1997). Bu metot, yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması esasına dayanır. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiye geçmeleri engellenmektedir. Çapraz bağ yüzdesi öyle ayarlanmalıdır ki, enzim molekülleri tutuklanabilsin ancak substrat moleküllerinin enzim moleküllerine ulaşmasına engel olmasın. Çapraz bağ yüzdesinin aşırı olması substratın enzimin aktif merkezine ulaşmasını engellemekle kalmayıp enzimin zincir yapısını da zorlayarak aktivite kaybına veya tamamen inaktif olmasına neden olabilir (Telefoncu, 1997). Bu nedenle optimal bir çapraz bağ yüzdesi saptanması önemlidir. Bu oran enzime ve taşıyıcıya bağımlı olarak değişir. Uygun çaplı substrat molekülleri polimer kafes içinde tutuklanmış enzim moleküllerine ulaşır ve reaksiyon ürünleri de dışarı çıkar. Bu yöntem ile immobilize edilecek enzimin substratının küçük moleküllü olması gerekir. Bu yöntemin avantajları; çok kolay uygulanması, gerçek bir fiziksel yöntem oluşu ve çok az miktar enzimle gerçekleştirilmesidir. Nötral, suda çözünmeyen taşıyıcılarla da immobilizasyon gerçekleştirilmekte ve kimyasal bir bağlanma olmadığından yüklü taşıyıcıya gerek duyulmamaktadır. Yöntemin dazavantajları ise; immobilizasyon işlemi sırasında inaktivasyonun deney koşullarına çok sıkı bağımlı oluşu ve immobilize

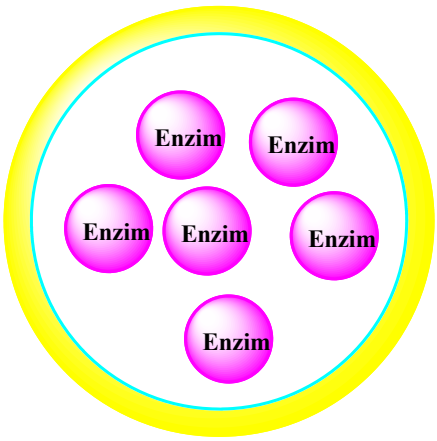
enzimin ancak küçük moleküllü substratlara karşı iyi bir aktivite göstermesidir (Telefoncu, 1997).



Şekil.1.6. Matrikste tutuklama (Guisan, 2006)

Membranda Tutuklama (mikrokapsülleme):

Tutuklama yönteminin bu tipinde ortam yarı geçirgen membran ile üç boyutlu olarak kuşatılmıştır. Kullanılan membranın gözenek çapları ve immobilize edilecek enzim substratının molekül büyüklüğü, substrat girişi ve ürün çıkışlarını engellemeyecek boyutta olmalıdır (Telefoncu, 1997; Özdemir, 2010). Bu yöntem, substrat molekülleri küçük olan enzim immobilizasyonunda kullanılmakta olup, substratı makromoleküler olan enzimler için uygun değildir. Enzimler daha çok kimyasal mikrokapsülleme ile immobilize edilmektedir. Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu sürekli ve sürekli olmayan yarı geçirgen mikrokapsüllerde tutuklama olmak üzere iki grupta incelenebilir. Sürekli mikrokapsüllerde çerçeve membran katı, süreksiz mikrokapsüllerde ise bir sıvı tabakadır. İmmobilizasyonda kullanılan çerçeve maddesinin (membran) yarı geçirgen olması zorunludur (Telefoncu, 1997). Ayrıca bu yarı geçirgen membranların gözenek çapları, substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına imkan verecek bir büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse bu yöntem ile immobilize enzimin verimliliği o ölçüde yüksek olacaktır (Menek, 1999; Özdemir, 2010).

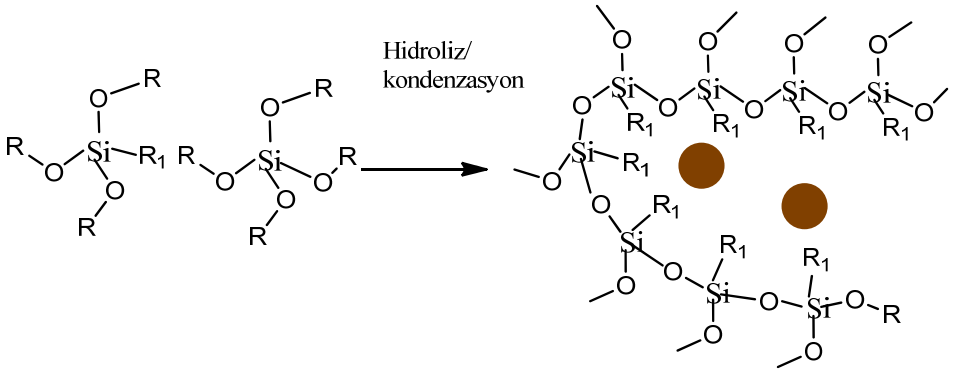


Şekil.1.7. Mikrokapsülleme (Guisan, 2006)

Sol-jel tutuklama:

İmmobilize enzimler hazırlamak için inorganik sol-jel fiziksel tutuklama tekniklerinin kullanımı 1990 yılından beri enzim immobilizasyonunun önemli bir alanı olmuştur (Braun ve ark., 1990). Bu metod 1950' lerin ortasından beri bilinmektedir. Ancak Dickey ilk kez biyolojik aktivitenin kalan bir kısmıyla silika asit türevli camlarda bazı enzimlerin tutuklanabildiğini gösterdikten (Dickey, 1955) sonraki 30 yılda tutuklanmış proteinlerin/enzimlerin hazırlanması için bu metodun kullanıldığını gösteren birkaç yayın bulunmaktadır (Venton ve ark., 1984; Janczarski ve ark., 1976; Glad ve ark., 1985).

Şekil 1.8' de gösterildiği gibi tutuklanmış enzim moleküllerinin yakınlığını değiştirmekle (sürfektantlar veya crown eterler gibi conformer seçicilerinin eklenmesi (Reetz ve ark., 2003), asetilenmiş dekstran veya polisakkaritler ya da, polimerler, ve bazı metal tuzları (Shtelzer ve ark., 1992; Uo ve ark., 1992) gibi farklı özellikteki maddelerin eklenmesi suretiyle) aktivite, kararlılık ya da seçicilik gibi enzim performansı önemli oranda düzenlenmektedir. Sol-jel tutuklanma metoduna göre immobilize olmuş enzimin kararlılığı enzim konsantrasyonuna, pH' a, iyonik kuvvette ve diğer immobilizasyon şartlarına oldukça bağlı olduğu bulunmuştur. Matrikste tutuklanmış enzimin konsantrasyonunun artırılması enzimin termostabilitesinin artırmasına neden olduğu gözlenmiştir (Arica ve ark., 1996; Cao, 2005).



Şekil.1.8. Sol-jel matriksinde enzim tutuklanması (Gao, 2004)

Sol-jel tutuklama yönteminin enzim immobilizasyonu için kolay ve etkili bir yol olduğu kanıtlanmıştır (Brzozowski ve ark., 1991). Avnir ve ark. (1994) bu tekniğe öncülük etmişlerdir. Destek maddesinin inertliği, termal dayanıklılığı, ılıman şartları metodun ayırıcı karakteristik özellikleri arasındadır (Yılmaz, 2010).

Enzim tutuklamasına dayalı sol jel tutuklama yöntemi ilk kez 1990 yılında Avnir ve ark. tarafından alkali fosfataz enzimine uygulanmıştır (Braun ve ark.,1990). Avnir ve ark. sol-jel kafesinin özelliklerini ve sol-jel prosesin prensibini açıklamışlardır. Tutuklanmış enzimlerin ve mikroçevre kafeslerin homojenitesi enzimlerin katalitik aktivitesine katkı sağladığı gözlenmiş. 1990' lardan beri enzimler, proteinler, antijenler, virüsler, bakteriler, hücreler gibi ilgi çeken çeşitli biyolojik aktif türler sol-jel prosesiyle ince film, fiber ya da granüllerden oluşmuş farklı seramik ya da cam matrikslerde immobilize edilmişlerdir (Avnir ve ark., 1994; Avnir, 1995; Gao, 2004).

İsopropanol, polivinilalkol, siklodekstrinler veya sürfektanlar gibi katkı maddeleri lipaz immobilizasyonunda sol-jel tutuklama yönteminin etkisini artırmaktadırlar. Böyle heterojen biyokatalizörlerin uygulamasının hedefi; iyonik sıvılarda ve organik çözücülerde esterifikasyon veya transesterifikasyon reaksiyonlarını gerçekleştirmektir.

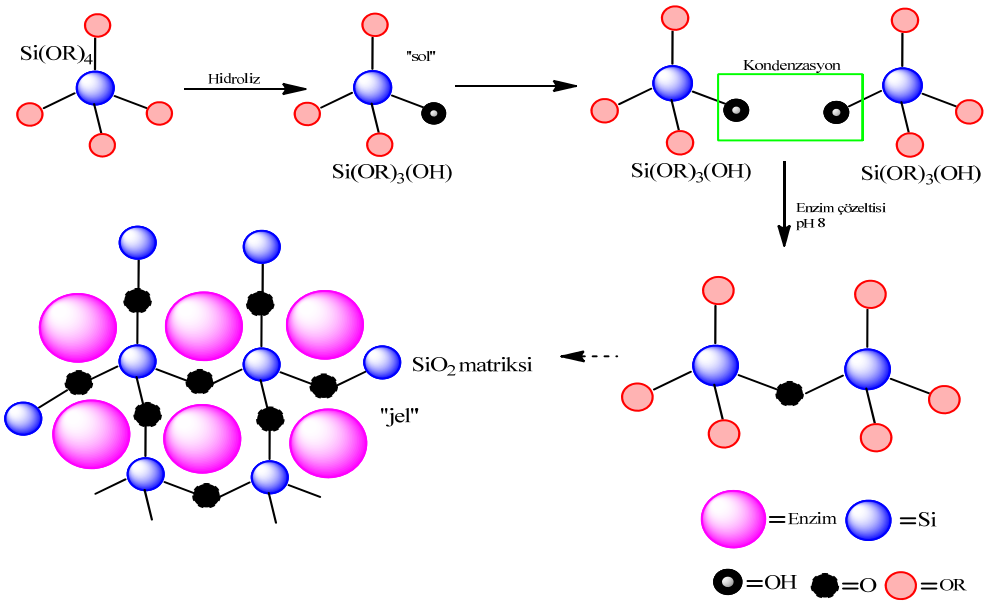
Farklı enzim immobilizasyon medotları arasında tutuklama, biyomoleküllerin serbestliğinden ve hazırlanmasının kolay olmasından dolayı özellikle ilgi odağı olmuştur. Yöntemin uygulanması kolay ve tekrarlanabilirliği oldukça yüksektir ve karmaşık cihazlar gerektirmemektedir. Sol-jel tutuklama çalışmalarında, polimer matrikste biyomoleküllerin tutuklanması gerçekleştirilir ve oluşan matriks ile biyomolekül arasında kovalent bağ yoktur. Bu tutuklama metodu dönmeyi ve sarmalın hareketini sınırlandırmaktadır ve aynı zamanda enzim-substrat etkileşmesine izin

vermektedir (Edmiston ve ark., 1994; Dave ve ark., 1995; Gottfried ve ark., 1999; Hartnett ve ark., 1999). Bunların yanında tutuklanmış biyomolekülün sızıntısı olmaksızın düşük molekül ağırlıklı moleküllerin iletilmesini sağlayan matriksin geçirgenliği; farklı boyutta biyomoleküllerin tutunmasına izin veren, ayarlanabilir materyal gözenekliliği vardır. Örneğin floresans sinyallerin absorbansını ölçmeye imkan veren optik özellikleri; kimyasal, termal ve biyolojik bozunmaya dayanıklı ve şişme etkileri ihmal edilebilmesi gibi avantajları vardır. Sol-jel prosesi (Şekil.1.9) oda sıcaklığında ve ilk eklenen organik maddelerin reaksiyonuyla gözenekleri belirlenmiş organosiloksan matriksi ve silika arasındaki metal oksit oluşumuna dayalıdır (Hench ve ark., 1990; Guisan, 2006; Campàs ve Marty, 2006). Oluşan silika matriksi tutuklanan lipazın iç yüzey aktivasyonunu kolaylaştırabilen hidrofobik özellikte olduğu için bu amaçla kullanılmaktadır (Reetz, 2006; Guisan, 2006).

Sol-jel teknikleri tetraalkoksisilan bileşiklerinin[$Si(OR)_4$] asit ya da baz katalizli hidrolizini içermektedir (Hench ve ark., 1990; Brinker ve ark., 1990; Reetz, 2006; Guisan, 2006).

Şekil 1.9' deki gibi ilk basamakta tetrametoksisilan[TMOS; $Si(OCH_3)_4$] veya metiltrimetoksisilan [MTMOS; $H_3Si(OCH_3)_3$] eklenerek bir ya da iki metal alkoksitlerin asidik pH da, su ortamında silisyum hidroksit gruplarının (Si-OH) oluşumuyla hidrolizi gerçekleşir. İkinci basamakta, bazik pH' da, silisyum hidroksit fonsiyonel grupları arasında kondenzasyon reaksiyonu biyomoleküllerin tutuklanacak (Si-O-Si) matriksini oluştururlar (Guisan, 2006; Campàs ve Marty, 2006).

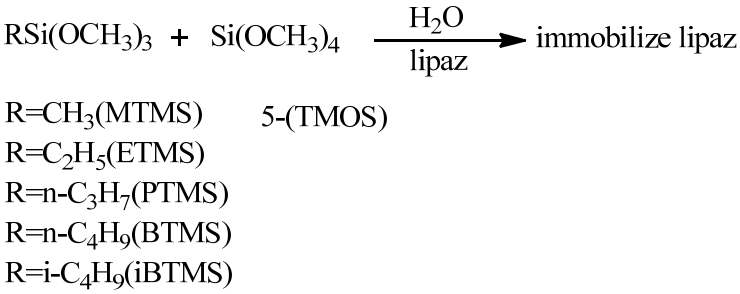
Bir başka deyişle Sol-jel prosesinde reaksiyon ilk silan bileşiğinin hidrolizi sonunda oluşan silisyum hidroksit (Si-OH) monomerlerinin kondenzasyonundan oluşmaktadır. Polikondenzasyon jel oluşumuyla sonuçlanır. Bu adımlar şekil.1.9' de özetlenmiştir (Gao, 2004).



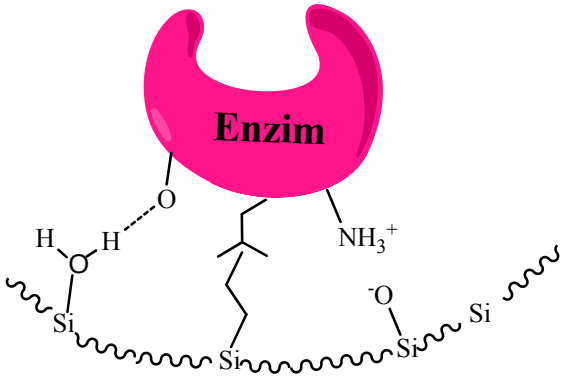
Şekil.1.9. Enzimlerin sol-jel tutuklanması (Nouger, 2002; Gao, 2004)

NAF gibi temel katalizörler sol-jel prosesinde kullanılmaktadır. Böylece silika matriksinde büyük gözeneklilik sağlanmış olur (Reetz, 2006; Guisan, 2006). Daha sonra enzimi kararlı hale getirmek için polivinilalkol ve metiltrimetoksisilan $CH_3Si(OCH_3)_3$ (MTMS) kullanılmıştır (Reetz ve ark., 1995; Reetz ve ark., 1996; Reetz, 2006; Guisan, 2006). Enzim immobilizasyonu için eknenen TMOS ile birlikte alkil grubu metil-, etil-, n-propil-, n- bütil-, n- $C_{18}H_{37}$ ya da 1,6 bis(trimethoxysilyl)-hexane) olan modifiye edilmiş alkoksitleri kullanmışlardır. Eklenen sol- jel katkı maddesinin alkil grupları arttıkça (CH_3<C_2H_5<n-C_3H_7<n-C_4H_9) immobilize lipazın relatif aktivitesinin keskin bir şekilde artığı bulunmuştur (Gao, 2004).

Reetz ve ark., (2003) yaptıkları çalışmada metil<etil<n-propil< n-butil gibi farklı alkiltrimetoksisilan bileşiklerini kullanarak lipaz aktivitesinin artışında alkil etkisini gözlemlemişlerdir (Reetz, 1997), yani silisyum oksit matriksinde artan hidrofobik gruplarla enzim aktivitesinin arttığı görülmüş. Reetz ve ark., (2003) enantiyoselektif reaksiyonlarda heterojen katalizör olarak sol-jel tutuklamanın çok uygun olduğunu gözlemişlerdir.



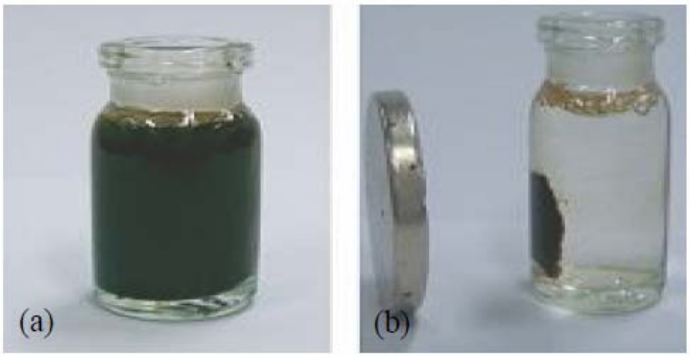
Daha yüksek termal kararlılık ve aktivite, Şekil.1.10'da gösterildiği gibi hidrofobik etkileşimler (Van der Walls) ve iç etkileşimlerin yanı sıra hidrojen bağlarıyla sağlanmaktadır.



Şekil.1.10. Enzimle jel matriks arasında kovalent içetkileşimin olmadığını gösteren genel sol-jel tutuklama şeması (Guisan, 2006)

Hidrofobik iç etkileşimler iç yüzey aktivasyonu ile sonuçlanabilir. Lipaz konformasyonel olarak matrikste açık forma ulaşabilir ve hidrofobik sol-jel materyallerine lipaz tutuklanması ile ilgili ilk çalışma daha önce yapılmıştır (Reetz, 1997).

Bu konuda diğer bir gelişme özellikle sol-jel işlemi sırasında manyetik demir oksitin lipaz immobilizasyonunda kullanılması ile kullanılabilirliğinde büyük pratiklik getirilmesidir (Reetz ve ark., 1998; Reetz, 2006; Guisan, 2006) (Şekil 1.11).



Şekil.1.11. Manyetik Fe_3O_4 nanopartiküller a) manyetik alan olmadığı durum b) manyetik alan altında olduğu durum (Özdemir, 2010)

1.5. Nanopartiküller

1 μm'den küçük boyuta sahip partiküller "nanopartikül" olarak adlandırılmaktadır. Mikropartiküllerle karşılaştırıldıklarında yüzey alanları oldukça büyüktür (Kawaguchi, 2005). Biyoaktif moleküllerin, nanopartiküller tarafından enkapsülasyonu ya da bu moleküllerin partikül yüzeyine immobilizasyonu gerçekleştirilebilmektedir (Orive, 2003).

Nanopartiküllerin avantajları aşağıdaki gibi özetlenebilir (Kahraman 2008):

Kararlılık: Özellikle lipozomlarla karşılaştırıldıklarında polimerik nanopartiküller oldukça kararlı yapılardır. Bu özellikleri, üzerlerinde taşıdıkları biyoaktif moleküllerin kararlılıklarını da arttırmaktadır.

Yüzey alanı: Mikropartiküllerle karşılaştırıldıklarında çok daha büyük yüzey alanına sahiptirler.

Boyut: Boyutlarına göre hücre tarafından fagositoz edilebilirler ya da uzun süre dolaşım sisteminde bulunabilirler.

Modifikasyon: Boyutları değiştirilerek ve çeşitli polimerik kaplamalarla kararlılıkları arttırılabilmektedir.

Taşınım: Herhangi bir taşıyıcıya gerek kalmadan hedef bölgeye enjeksiyon yoluyla ulaştırılabilirler.

1.5.1. Manyetit-Demir Oksit Nanopartikülleri

Manyetit (Fe_3O_4) milattan önce 1500'lü yıllarda keşfedilen ilk manyetik yapıdır. O zamandan günümüze kadar birçok manyetik malzeme bulunmasına karşın hala

üzerinde en çok çalışılan yapı olma özelliğini korumaktadır. Manyetit, ters bir omurga üzerinde oluşmuş kübik bir yapıya sahiptir. Bu yapıyı oluşturan oksijen atomları merkeze bakacak şekilde sıralanırken, Fe katyonları bazı bölgelerde 4, bazı bölgelerde 6 oksijen atomuyla çevrelenmiştir (Kahraman 2008). Oda sıcaklığında elektronlar Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyonları arasında geçiş özelliği göstermektedir. Bu özelliğinden dolayı manyetit yarı metalik malzemeler sınıfında yer almaktadır.

Manyetit; birçok farklı yolla sentezlenebilir. Ancak Fe^{+2} ve Fe^{+3} tuzlarının ikili çöktürmesiyle sentezlenmesi en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Bunun nedeni kolay uygulanabilir verimli bir yöntem olmasıdır (Tartaj, 2005). Sentezlenen nanopartikülün boyutu, şekli ve içeriği kullanılan tuzun çeşidi (örn; klorür, sülfat, nitrat, perklorat), Fe^{+2}/ Fe^{+3} oranı, ortamın pH' sı ve iyonik gücüne göre değişiklik gösterebilmektedir (Sjogren, 1994). Eşitlik 1.1'de görüldüğü gibi, ikili çöktürme yönteminde reaksiyon, Fe^{+2} ve Fe^{+3} tuzlarının sulu çözeltisine (1:2 molar) baz eklenmesiyle gerçekleşir (Maity, 2007; Verada, 2008; Kahraman, 2008).

$$Fe^{2+} + 2Fe^{3+} + 8OH^{-} \longrightarrow Fe_3O_4 + 4H_2O \qquad (1.1)$$

1.5.1.2. Demir Oksit Nanopartiküllerin kullanım alanları

Son yıllarda nanoteknoloji alanında meydana gelen gelişmeler, nanopartiküllerin sentezlenmesine, karakterizasyonuna, fonksiyonel hale getirilmesine ve biyotıp alanındaki uygulamalarda kullanılmasına olanak vermektedir (Moghimi, 2001; Curtis, 2001; Panyam, 2003). Nano boyuttaki demir oksit partikülleri yaklaşık 40 yıldır in vitro tanı çalışmalarında kullanılmaktadır (Gupta, 2005). Başta maghemit (γ-Fe_2O_3) ve manyetit (Fe_3O_4) olmak üzere birçok demir oksit partikülü yapılan çalışmalarda yer almaktadır (Kahraman 2008).

İşlemlere getirdikleri kolaylıklar ve kazandırdıkları üstün nitelikler nedeniyle yaşam bilimlerinde ve biyomedikal alanlarda kullanımı araştırılan ve hızla yaygınlaşan manyetik nanopartiküllerin görüldüğü belli başlı çalışma alanları şöyle sıralanabilir(Tartaj ve ark., 2003; Scherer ve Figueiredo, 2005; Semiz, 2008):

• İn-vivo teşhis amaçlı

- ❖ Manyetik rezonans görüntüleme (Yanase ve ark., 1993);

• in-vivo tedavi amaçlı

- ❖ Kontrollü ilaç uygulamaları (Veiga ve ark., 2000);
- ❖ Gen terapisinde taşıyıcı vektör ya da yönlendirme ve tetikleme ajanı (Guven ve ark., 2005; Muthana ve ark.,2008)
- ❖ Hipertemi (yüksek sıcaklıkla istenmeyen dokuların tahribatı) (Müller- Schulte D. ve Brunner, 1995)

• İn-vitro teşhis ve tedarik amaçlı

- ❖ çeşitli biyolojik moleküllerin izolasyonu ve saflaştırılması (Safarik ve Safarikova, 2001; Berensmeier, 2006).

Biyouyumlu katalitik aktiviteye sahip olması ve düşük toksisite göstermesi Fe_3O_4 nanopartiküllerin biyosensör alanında kullanımı açısından uygun olduklarını göstermektedir (Chen ve Liao, 2002). Ayrıca manyetik nanopartiküller üzerine immobilize edilmiş enzimlerin yüzey alanının artmasına bağlı olarak aktivitesinin arttığı ve kütle transferi sınırlaması olmadığından enzim substrat etkileşiminin daha hızlı gerçekleştiği belirtilmiştir (Rossi ve ark., 2004; Özdemir, 2010).

Organik sentezde enzimlerin kullanımı cesaret vericidir ve hızlı bir şekilde büyüyen bölgededir. Çünkü enzimler genellikle ılıman reaksiyon şartlarında yüksek kemo-, regio-, ve stereo- seçicilik göstermektedirler. Ancak enzimlerin kullanımı sık sık denatürasyonla ve reaksiyon koşulları altında biyokatalizörün deaktivasyonuyla, geri dönüşümde ve de geri kazanmadaki zorluklarla engellenmektedir. Katı matrikse enzim immobilizasyonu bu problemleri çözmek için en etkili metodlardan biri olarak görülmüştür (Bornscheuer, 2003; Cao, 2005). Kolay ayrılabilmeleri bölgesel yönlendirilebilmelerinden dolayı manyetik nanopartiküller büyük ilgi odağı haline gelmiş ve biyotıpta ve biyoteknolojide (Lu ve ark., 2007; Tartaj ve ark., 2005; Xu ve Sun, 2007), kataliz çalışmalarında (Zeng ve ark. 2006), çevresel arıtmada/temizlemede (Horak ve ark., 2007) kullanılır hale gelmiştir. Çeşitli enzimlerin kovalent bir şekilde manyetik partiküllere bağlandığı ve serbest hallerinden daha yüksek stabilite gösterdiği anlaşılmış, ancak enzim aktivitesi genellikle destekle protein arasında kimyasal bağ oluşumundan dolayı azalmıştır (Zeng ve ark., 2006; Dyal ve ark., 2003; Gardimalla ve ark., 2005; Zhang ve ark., 2008).

Nanopartiküllerin tümör tedavisinde kullanımı da gündeme gelmektedir. Yapılan çalışmalarda, manyetik bir merkeze sahip nanopartiküllerin manyetik alan yardımıyla tümör bölgesine yönlendirilmesi söz konusudur. Böylece sadece tümör bölgesine özgü

bir tedavi uygulanabilecek, kullanılan ilacın dozu ve buna bağlı olarak da meydana gelen yan etkiler azaltılacaktır (Brigger, 2002; Kahraman, 2008).

Süperparamanyetik nanopartiküller biyotıpta bazı etkileyici imkanlar sunmaktadır. Fe_3O_4 en yaygın kullanılan nanopartiküllerden biridir (Willard ve ark., 2004; Ma ve ark., 2005). Süperparamanyetik davranış nanopartiküllerin örnekten daha kolay ve daha hızlı mıknatısa cevap verdiğini ve dış manyetik alan kalkar kalkmaz manyetik nanopartiküllerin manyetikliğinin kaybolduğunu söylemektedir. Bu özelliklere dayalı olarak süperparamanyetik nanopartiküller vascular sistem ile iletilebilir ve manyetik alan yardımıyla vücudun belli bölgelerinde yoğunlaşabilirler. Manyetit nanopartiküller bu özellikleri dolayısıyla demir nanopartikülleri kanser hipetermisinden (Kim ve ark., 2005; Park ve ark., 2005), DNA saflaştırılmasına ilaç hedef salınımına v.b. (Arruebo, 2007) kadar değişen çoğu uygulama alanlarında kullanılır (Wang ve ark., 2008).

1.6. Lycopodium clavatumdan Sporopollen

Sporopollenin birçok polen taneciklerin ve mikro sporların dış yüzeyini teşkil eden maddelerdir. Sporopollenin tabii bir madde olup dış etkilere karşı büyük bir direnc sahiptir. Sporopollenin, spor kaynaklarının dış kısmında kalan zarar görmemiş hücre zarlarında olduğu gibi 500 milyon yıldan beri eskimiş tortular içerisinde yaşayan canlılardan meydana gelen fiziksel ve kimyasal dayanıklılığa sahip maddelerdir (Atkin ve ark., 2005).

Sporopollenin günümüzde genel olarak biyopolimer olarak düşünülmektedir ve detaylı olarak kimyasal yapısı net bir şekilde bilinmemektedir. Kaba formülü $C_{90}H_{144}O_{27}$ şeklindedir (Brooks ve Shaw, 1968; Shaw ve ark., 1971; Gode ve Pehlivan 2007).

Sporopollenin ile ilgili yapılan spektroskopik (Shaw ve Apperley, 1996) ve bozunma çalışmalarıyla (Domínguez ve ark., 1999) karotenoit bağlayıcılar (Brooks ve ark., 1971), ile fenoller, kumarik ya da ferulic asitler gibi iş gören fonksiyonel grupların sporopollenin yapısını oluşturduğu anlaşılmıştır (Thomasson ve ark., 2010). Sporopollenin büyük ölçüde kimyasal ataklara karşı dayanıklı, yüksek kapasiteye sahip kararlı olan kimyasal yapısını sürekli koruyan Lycopodium clavatum dan elde edilen doğal bir polimerdir ve sporopollenin mineral asitlerine ve alkalilere maruz kaldıktan

sonra bile çok iyi stabilite sergilemektedir ve gözenek duvarlarının yapısı tamamen doğaldır (Brooks ve Shaw, 1968; Shaw ve ark., 1971; Göde ve Pehlivan 2007).

Sporopollenin polikatyonik, biyobozunur, biyoaktif ve biyouyumluluk gibi biyolojik ve kimyasal özelliklerinde bir çok yeterliliğe sahiptir. Böylece sporopollenin kromatografik destek maddesi ve kontrollü ilaç salınım için taşıyıcı olarak kullanılmaktır. Sporopollenin partikülleri doğada bütün türlerinde boyutu ve morfolojisi tamamiyle aynıdır. Sporopollenin kabaca yuvarlak şeklindedir ve duvarla birlikte geniş iç kabuğu 1 ve 2 μm kalınlığındadır. Doğada 1 ile 240 nm arasında değişen çaplarda bulunmaktadır (Atkin ve ark., 2005).

Bu çalışmada sporopollenin maddesinin tercih edilmesindeki sebepler şunlardır;

1. Elde Edilebilirliği: Tabii olarak bitkilerde mevcut olmasından dolayı kolayca elde edilebilir ve pahalı değildir.
2. Kimyasal Kararlılığı: Sporopollenin büyük bir kimyasal kararlılığa sahip olup, çeşitli çözücülerle reaksiyona sokluduğunda bir çözünme görülmemiştir.
3. Fiziksel ve Isı Yönünden Kararlılığı: Sporopollenin fiziksel ve ısı yönünden kararlılığa sahip olan büyük molekül ağırlıklı çapraz bağlarla bağlı tabii bir polimerdir.
4. Tanecik Büyüklüğü: Sporopollenin 25 mikron çapında sabit çok ince tanecikli homojen bir yapıya sahiptir. Bu sabit mesh büyüklüğü sporopolleninin önemini artırır.

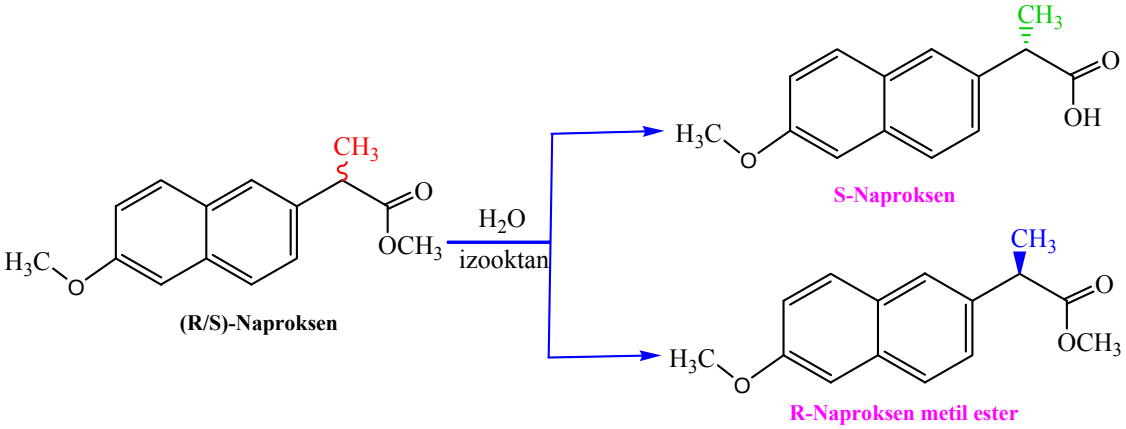
1.7. Naproksen

Rasemik karışımlardan enantiyomerlerin ayrılması işlemine rezolüsyon (ayrılma) denir. Rezolüsyonun amacı, enantiyomerlerden birini saf ya da zenginleştirilmiş olarak elde etmektir.

$C_{14}H_{14}O_3$ kapalı formülüne sahip olan Naproksen, beyaz kristal bir yapıdadır. Molekül ağırlığı 230.27, pKa = 4.15, pH = 2.2 - 3.7, erime noktası = 154 – 158 °C' dır (British Pharmacopoeia 1993). Naproksen; kimyasal olarak α-metil-6-metoksi-2-naftalin-asetik asit ya da 2-(6-metoksi-2-naftil) propiyonik asit olarak adlandırılan stereoid olmayan iltihap giderici ilaçlar (Nonsteroidal Antiınflamatuar Drugs; NSAIDs) grubunun alt grubu olan profenlerin üyesi bir ilaçtır. NSAIDs, antipiretik (ateş düşürücü), analjezik (ağrı kesici) ve antiinflamatuar özelliğe sahip olup vücuttaki

iltihaplanma prosesini kortizonsuz olarak inhibe eder (Kayaalp, 1992). Tedavide tablet, fitil, yarı katı jel olarak kullanılırlar (Tezcan ve Tarımcı, 1990).

Naproksen aromatik grup, asidik grup, yan zincirler ve bir kiral karbon atomuna sahiptir. Kiral olan α-CH_3'deki karbon atomu Naproksen molekülüne rasemik özellik kazandırmaktadır. Naproksenin -R ve –S olmak üzere iki formu vardır (Şekil1.12). Birçok NSAIDs'da olduğu gibi ilaç aktivitesi enantiyomerlerden birinde daha fazladır. S-Naproksen R- enantiyomerine göre 28 kat daha aktif olarak etki gösterir ve R-Naproksenin toksik özelliği de vardır. Bu özellikler sebebiyle rasemat halinde bulunmayan profen üyesi tek ilaç Naproksendir (Lee ve ark. 2001).



Şekil.1.12. *(R,S)*-Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizi

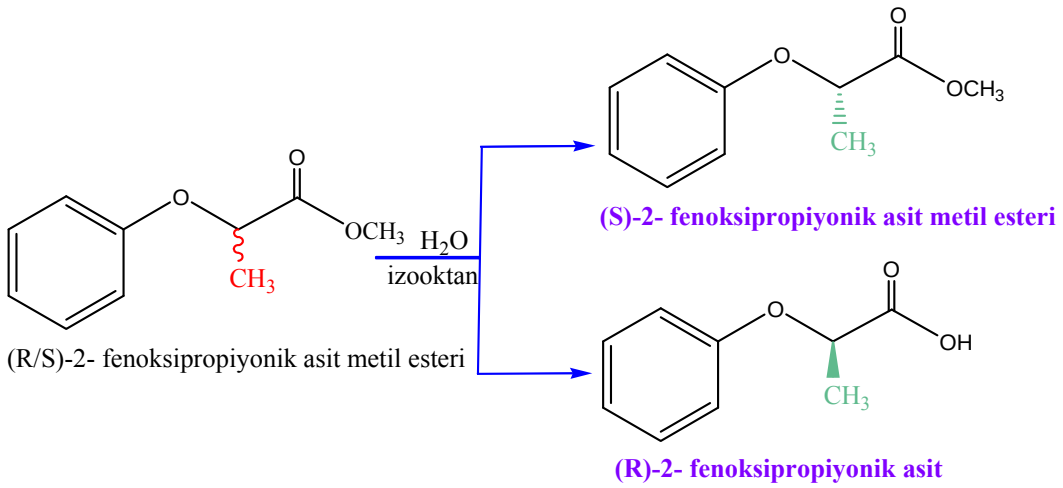
S-Naproksen, tepkimede kiral bir etki yokken oluşan rasemik karışımından klasik rezolüsyon, kinetik rezolüzyon ya da asimetrik sentez yöntemleriyle ayrılabilir. Klasik rezolüsyon yöntemi endüstride yaygın olarak kullanılmasına rağmen, diğer yöntemler de alternatif olarak geliştirilmektedir. Kinetik rezolüsyonla enantiyomerik saflıkta ilaç üretimi ise, rasemik karışımdan enantiyoseçimli olarak kimyasal veya biyokimyasal katalizör kullanımıyla gerçekleştirilir. Kinetik rezolüsyonda, koşulların ılımlı olması ve enzimin enantiyoseçimliliğinin yüksek olması nedenleriyle biyokimyasal yapıdaki katalizörler tercih edilir.

S-Naproksene olan yüksek enantiyoseçimliliği nedeniyle bilim adamları tarafından en çok kullanılan lipaz enzimi ise *Candida rugosa* lipazıdır (CRL). S-Naproksen, CRL biyokatalizörlüğünde rasemik Naproksen metil esterin hidroliz tepkimesi sonucu ayrılmaktadır. Enzimatik hidroliz tepkimelerinin gerçekleştiği sistemler su ile karışabilen organik çözücü, su ile karışmayan organik çözücü veya suyla

doygun organik çözücülü sistemlerdir. İki fazlı sistemler; yüksek substrat çözünürlüğü, biyokatalizör ve ürünün kolay uzaklaşabilmesi, substrat ve ürün inhibisyonunun az olması gibi sebeplerle tercih edilirler. İki fazlı sistemde gerçekleşen rasemik Naproksen metil esterin hidroliz tepkimesinde, rasemik naproksen organik bir çözücüde çözünmekte, tepkime su-organik çözücü arayüzeyinde gerçekleşmekte ve oluşan ürün S-Naproksen ise suya geçmektedir. Su-organik çözücü iki fazlı sistemlerde yüksek verim eldesi için optimize edilmesi gereken başlıca reaksiyon parametreleri çözücü türü, organik faz/sulu faz hacim oranı, sıcaklık, sulu fazın pH değeri, substrat ve enzim derişimleri, karıştırma hızı ve katkı maddesi ilavesidir (Mutlu, 2006). Bu parametreler lipaz enantiyoseçimliliğini, aktivite ve kararlılığını etkilemektedir. İlk olarak A.B.D'de 1976 yılında üretilen ve ülkemizde de yaygın olarak kullanılan Naproksenin Türkiye'de üretiminin gerçekleştirildiğine dair bilgi bulunmamaktadır. S-Naproksenin CRL enzimi katalizörlüğünde iki fazlı sistemde enantiyoseçimli hidroliz tepkimesi süreli yayın literatüründe de oldukça az yer almaktadır. Literatürdeki çalışmalar daha çok esterleşme tepkimesi ile Naproksen esteri üretimi üzerine yoğunlaşmıştır (Mutlu, 2006).

1.8. Fenoksi-Propiyonik Asit

2-fenoksi propiyonik asitler ve türevleri yaygın olarak böcek öldürücü (herbicides) olarak kullanılmaktadırlar. Ancak sadece R- enantiyomerleri biyolojik olarak aktiftirler. (S)- enantiyomeri kaslarda klorit zincirini inhibe ettiği için kas tahribatı ve spazmı gibi kötü etkilere sahiptir (Colton ve ark., 1995). Rasemik asitlerin rezolüsyonu üzerine yapılan çoğu çalışmalar (R) – asitleri için % 90 üzerinde enantiyoselektivite içeren fakat yetersiz sonuçlar alınmıştır (Pan ve ark., 1990; Ueji ve ark., 1992; Fukui ve ark., 1991). Tsai ve Dordick (1996) saf *Candida rugosa* lipaz kullanarak n-bütanolle (4- klorofenoksi) propiyonik asitin esterleşmesinde yüksek enantiyoselektivite elde ettiklerini yayınlamalarına rağmen, saf enzimin kullanılması saflaştırma maliyetlerinden dolayı ekonomik bulunmamıştır (Ujang, 2003).

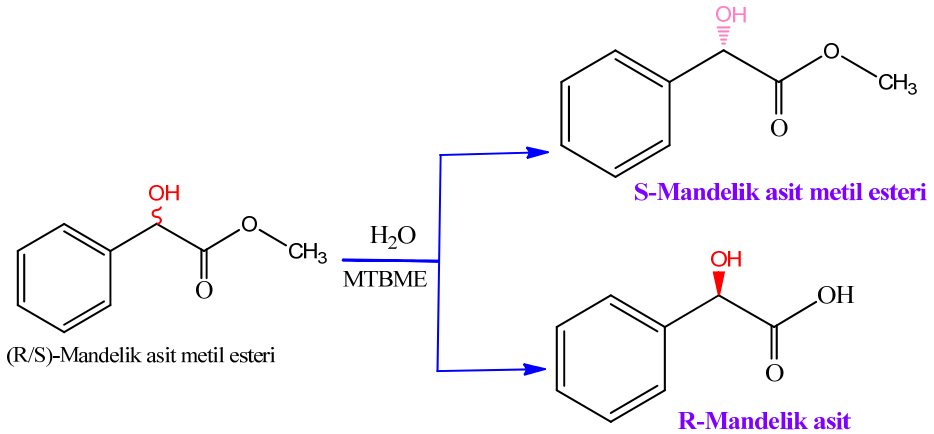


Şekil.1.13. *(R,S)*- Fenoksi-propiyonik asit metil esterin enantiyoseçimli hidrolizi

1.9. Mandelik Asit

Mandelik asit (α-hidroksibenzen-asetikasit), $HOCH(C_6H_5)COOH$ kimyasal formülü ile bir 8 karbonlu alfa-hidroksi asit (AHA)'tir.

Glikolik asit molekülünden daha büyük olan mandelik asit molekülü daha geniş kullanılan bir alfa-hidroksi asit (AHA)'tir. Onun küçük molekül ağırlığı ve büyüklüğünden dolayı cilt yüzeyine nüfuz etme yeteneği daha iyidir. Kozmetikte AHA geniş bir şekilde kullanılmıştır. Mandelik asit (α-hidroksibenzen-asetikasit), aromatik gruba sahip AHA bileşikleri arasında en küçük olanıdır. Bir asimetrik karbon atomuna sahiptir ve bu yüzden iki kiral izomeri vardır. R ve S-mandelik asit enantiomerleri olup farmakolojik etkinliklerine bu durum tesir eder. Mandelik asit idrar yolları enfeksiyonlarının tedavisinde yıllardır tıpta kullanılmaktadır (Karaçoban, 2006).



Şekil.1.14. *(R,S)*- Mandelik asit (MA) metil esterin enantiyoseçimli hidrolizi

Enantiyomerleri ile birlikte rasemik bir bileşik olan mandelik asitler yaygın olarak rezolüsyon prosesine uygun kristalizasyon için popüler model olan çözücü ajan olarak kullanmışlardır (Jacques ve ark., 1994; Lorenz ve ark., 2004; Mao ve ark., 2010).

Mandelik asit türevleri yaygın bir şekilde yarı sentetik penisilinlerin sentezinde ve diğer farmakolojik sentezlerde kullanılmaktadır (Mill ve ark. 1983; Yamazaki ve Maeda 1986; Hua ve ark., 2011).

R-Mandelik asit (MA) yarı sentetik penisilinler, antitümör ajanlar, cephalosporins, antiyobezite ajanları gibi farmakolojik ilaçların üretimi için önemli bir ilaç ara maddesidir (Terreni ve ark., 2001; Xiao ve ark. 2008; Tang ve ark. 2009) ve aynı zamanda rasemik alkollerin ve aminlerin rezolüsyonu için kiral çözücü ajan olarak kullanılmaktadır (Whitesell ve Reynolds 1983; Zingg ve ark., 1988; Xuea ve ark., 2010).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

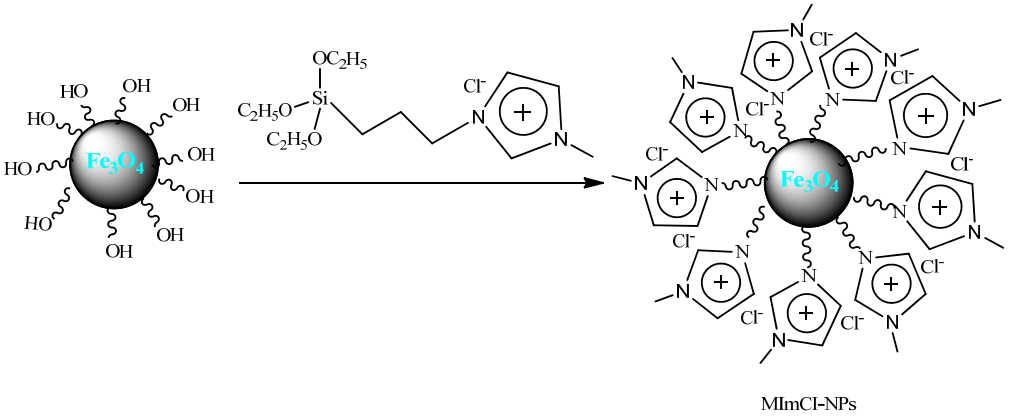
Son yıllarda çeşitli manyetik ayırma işlemleri biyomolekülleri ayırmak ve saflaştırmak için geliştirilmiştir (Saiyed ve ark., (2003). Böyle tekniklerle sunulan avantaj kolay ve hızlı geri dönüşümü ve özellikle kompleks karışımdan moleküllerin ayrılabilmesine dönük spesifiktir. Son on yılı aşkın süredir uygun stabilleştiricili mikrometre ya da yarı mikrometre boyutlu manyetik nanopartikül yüklü sistemler içeren proteinlerin, enzimlerin ve ilaçların bağlanmasında taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Örneğin Ramchand ve ark., (2001) silan yüklü ferrite partiküllerini radyoimmunolojik yöntemde kullanılırken heparin ile stabilleştirilmiş koloidal manyetit tüm kandan hücrelere bağlanma için kullanılmışlardır. Bu çalışmada dekstran yüklü manyetit ilaç taşıyıcı olarak kullanılmıştır.

Manyetik taşıyıcılara immobilize edilmiş biyolojik aktif bileşikler aynı zamanda direk bir şekilde biyolojik deney için ya da hedef molekülleri veya hücreleri modifiye etmek/yakalamak için affinite ligand olarak kullanılmıştır. Örneğin Abudiab ve Beitle (1998) kompleks proteinleri izole etmek için metal affinite ayırmaya immobilize edilmiş/ olmuş manyetik geliştirmişlerdir. Protein karışımının ayrılmasını ve metal affinite gösterdiği model proteinlerin metal iyonları ile etkileşiminde, bu metod manyetik agarozun yüzeyine iminodiasetik asit (IDA) ’ in bağlanmasını içermektedir.

Polimer nanopartiküller yaygın olarak son on yılda çeşitli uygulamalarından dolayı araştırılmıştır. Özellikle micellar nanopartiküllere kendiliğinden benzeyen polimerler etkili bir şekilde ilaç salınımında araç olarak kullanılırlar. Yaygın çeşitli biyoaktif bileşenler, yükleme ilaçlar ve nanotaşıyıcılar da ilaç salınımını daha iyi geliştirmek için önemli çabalar devam etmektedir(Padney ve ark., 2008). Diğer kaydadeğer katı destek maddelerinin yanı sıra manyetik destek maddeleri ile immoblize enzimler reaksiyon ortamından çok daha kolay ayrılabilir ve dış manyetik alan uygulandığında bu immobilize partilüller tepkime kabında/çözeltiden kolaylıkla ayrılabilirler. Bu manyetik ayırma işlemi işlem ve sermaye maliyetini azaltabilirler. Ancak enzim mühendisliğinde şu anki ulaşılabilir manyetik destek maddeleri kompleks karışım proseslerinin yetersiz enzim yükleme kapasitesi ve yüksek maliyeti yaygın uygulanabilirliğiyle sınırlamakta olduklarını yayınlamışlar (Khng ve ark., 1998; Xue ve Sun, 2002; Liu ve ark., 2005).

Suber ve ark. (2001), farklı iyon değiştirici reçineleri, selüloza dayalı polistirenleri ve Fe_3O_4 nanopartikülleri sentezini karşılaştırmalı yapısal, morfolojik çalışmasını yayınlamışlardır.

Naka ve arkadaşları (2008) yaptıkları çalışmada, alkali hidroliziyle $FeCl_2$ ve $FeCl_3$' den hazırlanan demiroksit nanopartiküllerini silanlı kaplama ile imidazolyum katyonunun kondenzasyonuyla N-metilimidazolyum yapılarını elde etmişlerdir. Sentezlenen demir nanopartiküllerinin oda sıcaklığında süperparamanyetik davranış sergilediğini ifade etmişlerdir.

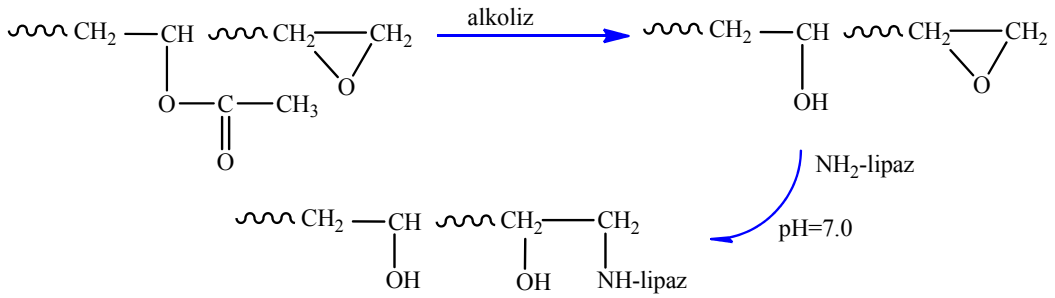


Şekil.2.1. İmidazolyum katyonu ile demir oksit nanopartiküllerinin modifiye edilmesi

Wang ve arkadaşları (2008) ise, süperparamanyetik magnetit nanopartikülleri demir iyonlarının kitosan hidrojeliyle etkileştirilmesiyle sentezlemişler ve kitosanın indirgeyici etkisini tartışmışlardır. Manyetit ve kitosan arasındaki etkileşim FTIR ve TGA ile incelenmiş ve kitosan hidrojelini amino gruplarının şelatlama yoluyla süperparamanyetik nanopartikülleri sentezlemede rolü olduğunu gözlemlemişlerdir.

Wu ve arkadaşları (2009), manyetik Fe_3O_4-kitosan nanopartiküllerinin hazırlanmasına yeni bir metod önermişler ve TEM, XRD ile karakterize ettikten sonra *Candida rugosa* tip VII lipaz immobilize etmişlerdir.

Yong ve arkadaşları (2008), *Candida rugosa* lipazına süspansiyon polimerizasyonuyla hazırladıkları manyetik mikrokürelere immoblize edip aktivite ve kinetik parametrelerini incelemişlerdir.



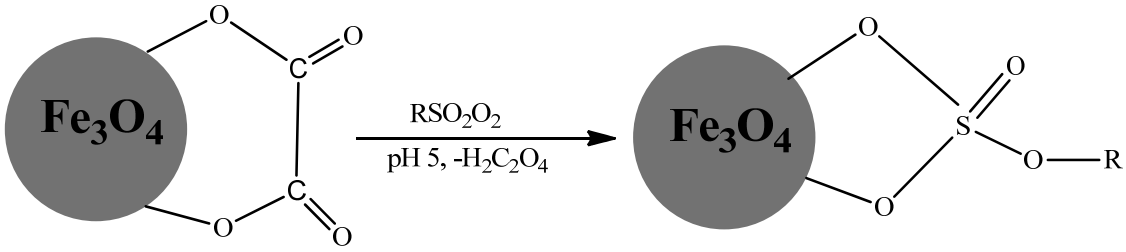
Şekil 2.2. Manyetik mikrokürelerle lipaz immobilizasyonu

Aynı lipazla Chang ve ark. (2007), adsorpsiyon metoduna göre Celite üzerine lipaz immobilizasyon çalışması yapmışlar ve immobilize enzimin karakteristiğini ve en uygun çalışma koşullarını araştırmışlardır.

Liu ve arkadaşları (2005), manyetik mikro kürelere *Candida Cylindracea* lipazı immobilize etmişler ve manyetik ve morfolojik özelliklerini SEM, TEM ile karakterize etmişlerdir. Enzim aktivitelerine bakıp serbest lipazla karşılaştırmışlardır.

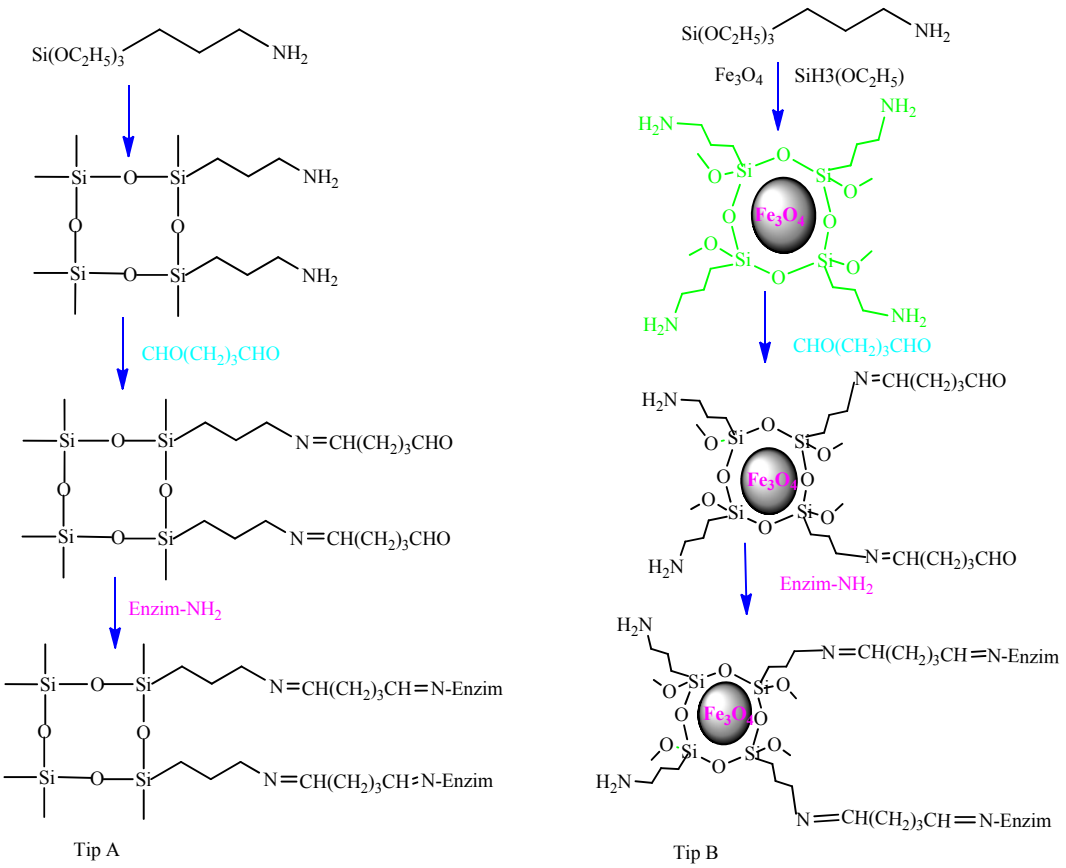
Bir başka çalışmada Lee ve ark. (2009), yüzeyi modifiye edilmiş nanoboyutlu (S-NSM) partikülleri enzim immobilizasyonu için destek maddesi olarak önermişler ve immobilize *Porcine Pankreatik* lipazı' nın spesifik yağ hidrolizinde serbest lipazdan daha yüksek aktivite gösterdiğini ifade etmişlerdir.

Farklı bir lipazla çalışan Dyal ve arkadaşları ise (2003), γ-Fe_2O_3 manyetik nanopartiküllere immobilize edilmiş *Candida rugosa* lipazınının enzimatik aktivitesini ve stabilitesini artırdığını gözlemlemişlerdir.



Şekil.2.3. Candida rugosa lipazına immobilize ettikleri manyetik nanopartikülünün sentezi (SDS-NMS)

Chaubey ve arkadaşları da (2009), *Arthrobacter sp.* lipazını (ABL) 3-aminopropiltrietoksisilan ve tetroetilortosilikatın kopolimerizasyonundan türetilen manyetik olan (Tip B) ve manyetik olmayan (Tip A) iki farklı destek maddesine immobilize etmişler ve immobilize olmuş enzimleri enantiyoselektif tepkimelerde kullanmışlardır.



Şekil.2.4. Manyetik olan (Tip B) ve manyetik olmayan (Tip A) destek maddelerine sol-jel metoduna göre ABL lipazının immobilizasyonu

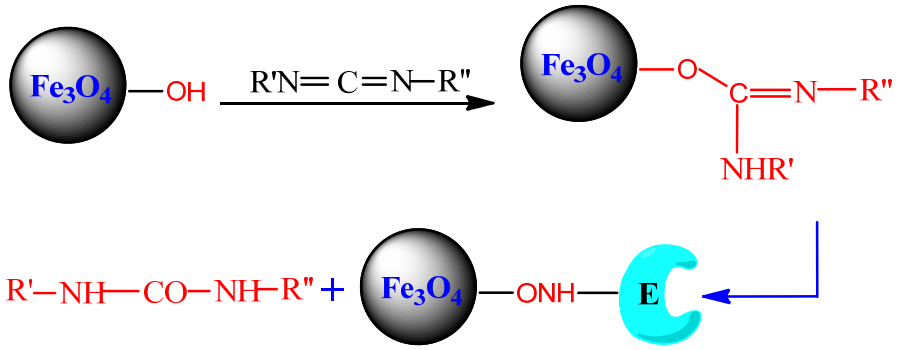
Manyetitin ayrılma özelliğinden yararlanmak için Lee ve ark. (2008), manyetik ayrılabilen polianilin nanofiberleri sentezleyerek enzime immobilize etmişler ve immobilize enzim aktivitesini serbest enzime göre % 80 oranında koruduğunu gözlemişler ayrıca bu immobilize enzimi rasemik Ibuprofenin enantiyoselektif reaksiyonunda kullanmışlardır.

Sol jel tekniği kullanarak Zhang ve ark. (2008), manyetik nanopartikülleri enzim immobilizasyonunda kullanmışlar ve rasemik sekonder alkolerin rezolüsyonunda immobilize enzim aktivitesini kaybetmeden manyetik olarak en az 7 kez tekrar kullanılabilirliğini göstermişlerdir.

Başka bir çalışmada ise Bai ve ark. (2006), laurik asitle stabilleştirilmiş manyetik partikülleri elde ettikten sonra karbodiimit aktivasyonu yoluyla *Candida rugosa* lipazının kovalent bağlı immobilizasyonu için laurik asit varlığında hazırlamışlardır ve rasemik mentolün rezülüsyonunda kullanmışlardır. Yapılan analizler

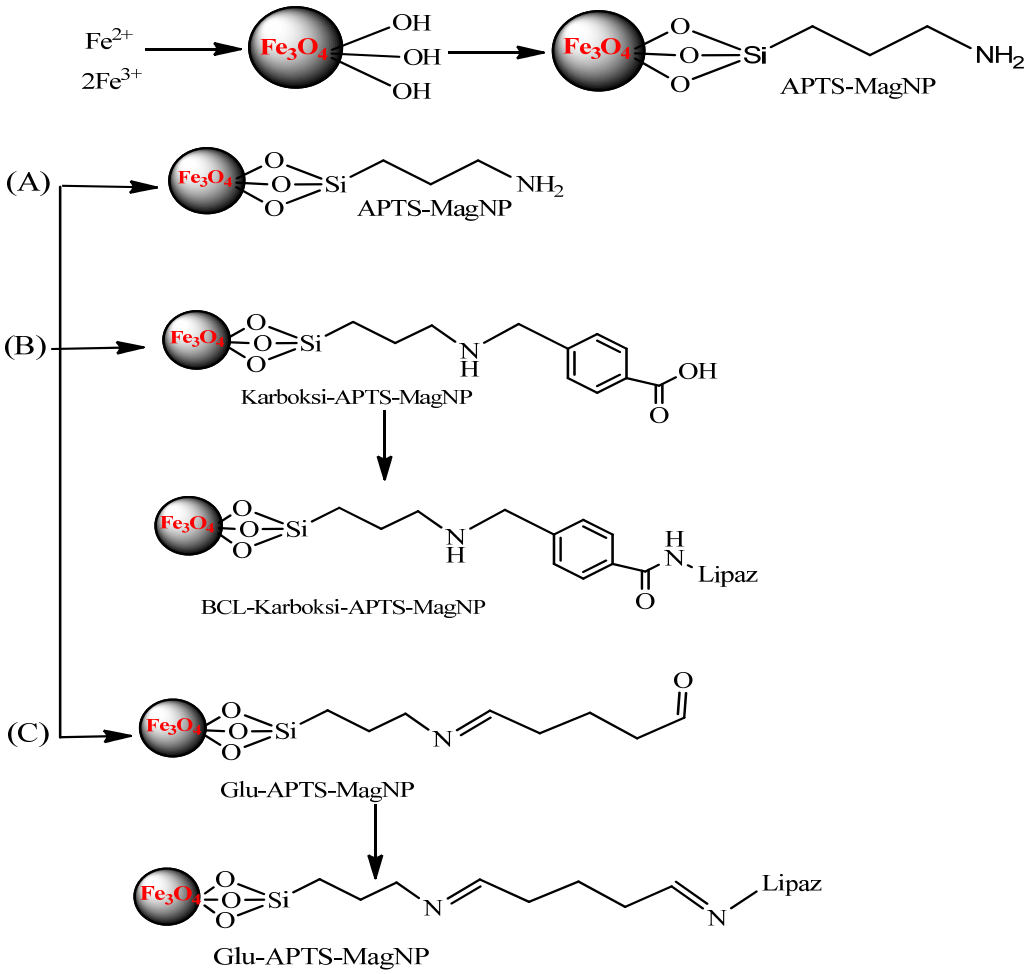
sonucunda %96' dan daha yüksek verimde dönüşüm ve % 88 üzerinde enantiyomerik saflıkta (-)-mentol elde etmişlerdir.

Mehta ve ark. (1997) proteinlerin ve enzimlerin karbodiimit varlığında kolay bir yoldan hazırlanan manyetik partiküller kovalent bağlanma ile bağlanabildiğini göstermişlerdir.



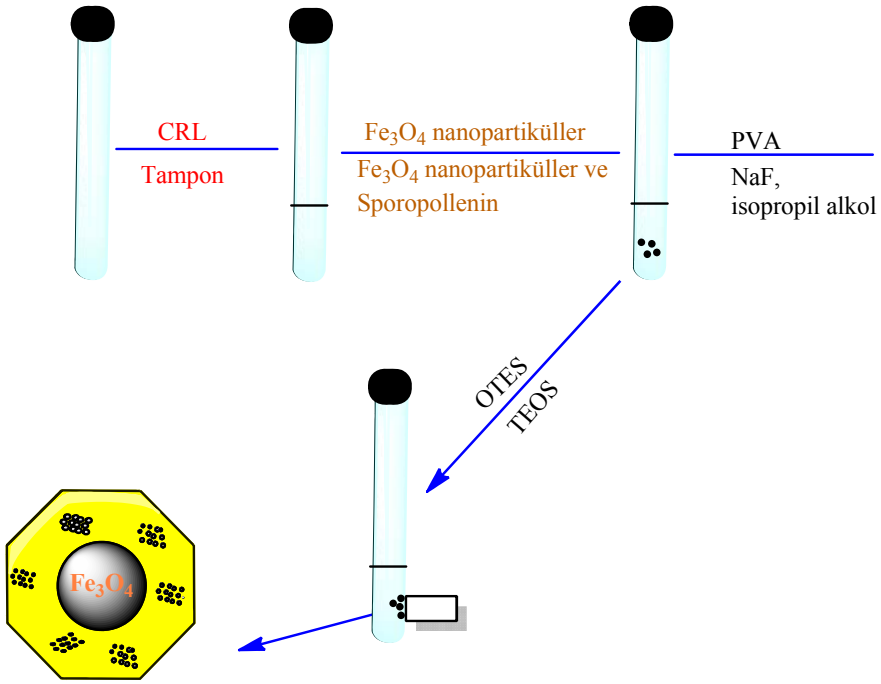
Şekil.2.5. Karbodiimit varlığında manyetik partiküllere lipaz immobilizasyonu

Rebelo ve ark. (2010) adsorpsiyon, yarı kimyasal adsorpsiyon metodları kullanılarak sentezlemiş oldukları nanopartiküllere immobilize edilen B.C.L.' ı (*Burkholderia cepacia* lipase) etkili bir şekilde transesterifikasyon reaksiyonuyla R/S-1-feniletanolün enzimatik kinetik rezolüsyonunda tekrar tekrar kullanılabilen biyokatalizör olarak uygulanmışlar. Dönüşüm % 50 olduğu E>200 enzimatik kinetik rezolüsyonu işleminde oluşan R esteri ile ve kalan S alkolleri ee' nin >% 99' un üzerine olduğunu gözlemlemişlerdir. Glutaraldehit metoduyla immobilize edilmiş enzimin katalizlenmiş transesterifikasyon reaksiyonunda 8 kullanım için % 50 dönüşüm ve (E>200) tekrar kullanılabilirlik gözlemlemiştir.



Şekil.2.6. Süperparamanyetik nannopartiküllere B. Cepacia lipazının immobilizasyonu (A= adsorpsiyon metodu; B=karboksibenzaldehit metodu; C= glutaraldehit metodu

Yılmaz ve ark. (2011) manyetik Fe_3O_4 partikülleri ve manyetik Fe_3O_4 partiküllü sporopollenin (Fe_3O_4-Spo-E) varlığında *Candida rugosa* lipazını sol-jel tutuklama metoduna göre immobilize ederek bu immobilize lipazları rasemik naproksenin enantiyoseçimli hidrolizinde kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlardan S-Naproksen oluşumunda sporopollen kullanıldığı (Fe_3O_4-Spo) destek maddesinin enantiyoseçimliliğinin 400' ün üzerinde olduğu E = >400, oysa serbest lipazın E'sinin 166 olduğunu gözlemişlerdir.



Şekil.2.7. Manyetik Fe_3O_4 partikülleri ve manyetik (Fe_3O_4-Spo-E) nanopartikülerine sol-tutuklama protokolü

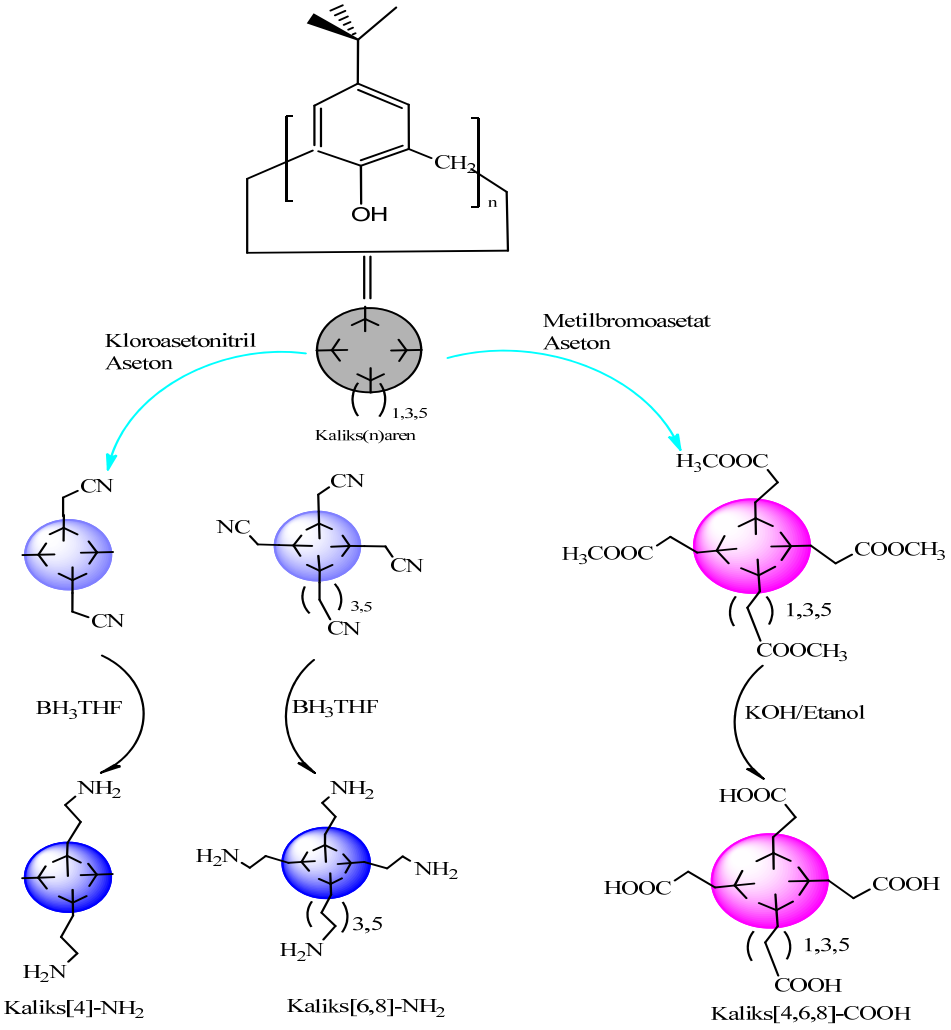
Uyanık ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada *Candida rugosa* lipazı kaliks(aza)crowns destek maddeleri varlığında sol-jel tutuklama metoduna göre immobilize etmişler ve rasemik naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz reaksiyonunda kullanmışlardır. Bu reaksiyon sonucunda immobilize lipazların serbest lipaza göre % 48,4 dönüşüm gösterdiği ve 6 kullanımdan sonra kalan dönüşüm yüzdesinin % 18 olduğunu gözlemlemişlerdir.

Tutar ve ark. (2009) doğal bir polimer olan *Lycopodium clavatum*' den elde edilen sporopollenini *Candida rugosa* lipazına adsorpsiyon metoduna göre immobilize etmişler ve immobilize lipazın optimum pH' nın 6.0 ve sıcaklığının ise 40 ^{o}C olduğunu bulmuşlardır.

Takaç ve Bakkal (2007) *Candida rugosa* lipazını Amberlite XAD 7 destek maddesine immobilize etmişlerdir ve rasemik naproksen metil esterinin hidrolizinde kullanmışlardır. Naproksen metil esterinden en iyi dönüşüm ve enantiyoseçimlilik için pH 6 ve sıcaklık 45 ^{o}C' de bulmuşlardır.

Şahin ve ark. (2009) yaptıkları bir başka çalışmada kaliks[n]aren (n= 4, 6, 8) amin ve karboksilik asit türevlerini *Candida rugosa* lipazına sol-jel tekniğine göre immobilize etmişlerdir. İmmobilize lipazı naproksen metil esterinin enantiyoseçimli

hidrolizinde kullanmışlardır ve serbest lipaza göre immobilize lipazların yüksek aktivite ve enantiyoseçimlilik gösterdiğini yayınlamışlardır/gözlemlemişlerdir.



Şekil.2.8. Kaliks[n]aren türevlerinin sol-jel tutuklama şeması

Yılmaz ve ark. (2010) doğal bir polimer olan *Lycopodium clavatum*' den elde edilen sporopollenini ve aktive edilmiş olan sporopollenini *Candida rugosa* lipazına sol-jel tutuklama metoduna göre immobilize etmişler ve immobilize lipazları naproksen metil esterinin hidrolizinde kullanmışlardır. Serbest lipaza göre immobilize lipazlar yüksek dönüşüm ve enantiyoseçimlilik göstermiştir. Serbest lipazın enantiyoseçimliliği 166 iken immobilize Spo-E' nin enantiyoseçimliliğinin (E) 400' ün üzerinde olduğunu gözlemişlerdir.

Bu çalışmada destek materyali olarak Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI ve Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2 nanopartikülleri sol-jel metoduna göre *Candida rugosa* lipazın

immobilizasyonunda kullanıldı. İmmobilize lipazlar rasemik naproksenin, rasemik 2-fenoksipropiyonik asit metil esterinin ve rasemik mandelik asit metil esterinin kinetik rezolüsyonunda kullanılması amaçlandı.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Aletler

- UV-Visible spektrofotometre (Shimadzu 1700)
- FTIR spektrometresi (Perkin ELMER 100)
- Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) (Agilent 1200)
- Soğutmalı santifüj (Sigma)
- Soğutmalı inkübatör (Zhicheng)
- pH metre (Thermo)
- Liyofilizatör (Labconco)
- Vakumlu etüv (Binder)
- Taramalı elektron mikroskopisi (SEM, Zeis, EVO LS10, England)

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Candida rugosa lipaz (CRL, E.C.3.1.1.3, Type VII) (Sigma), *p*-nitrofenil palmitat (*p*-NPP) ($C_{22}H_{35}NO_4$) (Sigma), *Lycopodium clavatum* (25µm) (Fluka), Bradford reaktifi (Sigma), Bovine Serum Albumin 99 % (BSA) (Sigma), Sodyum karbonat (Sigma), Tetraetoksisilan (TEOS) (Sigma), Oktiltrietoksisilan (OTES) (Sigma), metiltrimetoksisilan (MTMS), polivinilalkol (PVA, 4% W/V), Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Merck), Hekzametilendiizosiyanat (HMDI), [3-(2,3-Epoksipropoksi)-propil]-trimetoksisilan] (EPPTMS) (Merck),3-aminopropiltrietoksisilan (APTES) (Fluka), İmmobead 150 ye immobilize edilmiş *Candida rugosa* (Sigma), (R/S)-Mandelik asit (Sigma), (R)-metil mandelat (Sigma), (S)-metil mandelat (Sigma), (R/S)- Metil mandelat (Sigma), Optikçe saf *S*-Naproksen (Sigma), Rasemik Naproksen ve metil esteri ticari olarak sağlanamadığı için laboratuvarda sentezlendi. Rasemik 2-fenoksi propiyonik asit (2-PPA) (Sigma), Rasemik 2-fenoksi propiyonik asit metil esteri ticari olarak sağlanamadığı için laboratuarda sentezlendi.

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler analitik saflıkta olup, Merck veya Sigma firmasından temin edildi. Tüm sulu çözeltiler, Miilipore Milli-Q Plus su arıtma cihazıyla saflaştırılan saf su ile hazırlandı.

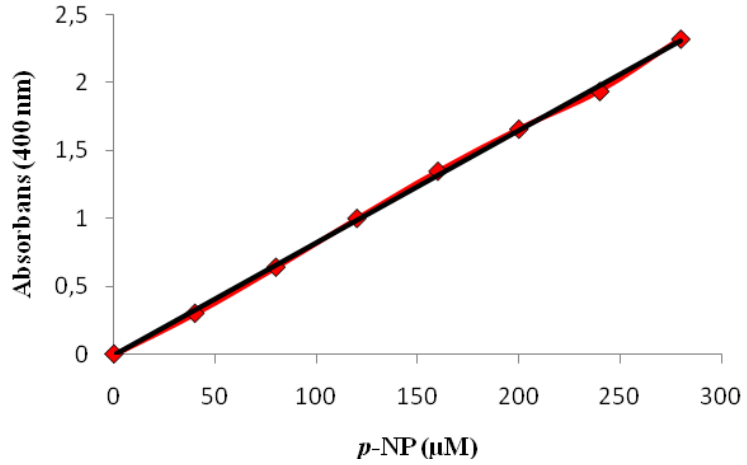
3.3. YÖNTEM

3.3.1. Lipaz Aktivitesinin tayini

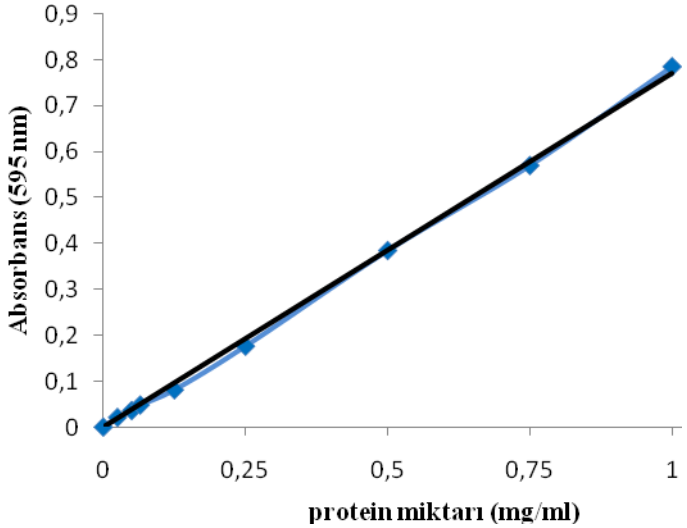
1 mL fosfat tampon çözeltisi (pH 7,0) içerisinde bulunan belirli miktarlardaki serbest lipaz veya immobilize lipaz (belli miktarda alınan) karışımına 2-propanol içerisinde hazırlanan 14,4 mM'lık *p*-NPP çözeltisinden 1 mL ilave edilerek oda sıcaklığında 5 dk karıştırılır. Daha sonra reaksiyon 2 mL 0,5 N Na_2CO_3 ilavesiyle durdurulur. Karışım santifüj edilerek, enzimatik aktivite UV-visible spektrofotometresinde, açığa çıkan *p*-nitrofenol'ün (*p*-NP) 410 nm dalga boyundaki absorbansından bulunur. Bu absorbans değeri standart olarak çizilen *p*-NP (mol/litre) kalibrasyon grafiğinde (Şekil 3.1) yerine konularak açığa çıkan *p*-NP'ın miktarı spektrofotometrik olarak tespit edilir. Lipazın 1 Unit (U)'i, dakikada 1 µmol *p*-NPP hidroliz etmek için gerekli olan lipaz miktarıdır. Bu verilerden yararlanılarak serbest ve immobilize lipazların aktiviteleri belirlenir (Hung, 2003; Chiou, 2004).

3.3.2. Protein miktarı

Serbest ve immobilize lipaz içerisindeki protein miktarı Bradford metoduna göre bulunur. Bunun için standart olarak Bovin serum albumin (BSA)'in belirli konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanarak bu çözeltilerin 0,1 mL'si 3 mL Bradford reagent (Coomassie Brilliant Blue G-250) ile etkileştirilip 595 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülür. Standart olarak, absorbans-protein miktarı (mg/ml) grafiği çizilir (Şekil 3.2) ve yapılan protein çalışmalarında bu grafik referans alınır (Bradford, 1976).



Şekil 3.1. Standart *p*-NP (*p*-nitrofenol)- absorbans grafiği (*λmax=410 nm*)



Şekil 3.2. Standart protein miktarı (mg/ml)- absorbans grafiği (*λmax* =595 nm)

3.3.3. Optimum pH tayini

Farklı pH değerlerinde (pH 3,0–8,0) serbest ve immobilize enzimin aktiviteleri ölçülerek optimum pH değerleri belirlenir. Aktivite ölçümleri 30 ^{o}C'de gerçekleştirilir.

3.3.4. Optimum sıcaklık tayini

Farklı sıcaklık değerlerinde (25–60 ^{o}C), 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,0) 20 dk aralıklarla serbest ve immobilize enzimin hidrolitik aktiviteleri ölçülerek optimum sıcaklık değerleri belirlenir. Aktivite ölçümleri pH 7'de gerçekleştirilir.

3.4. Kararlılık testleri

3.4.1. Termal kararlılık

Enzimler protein yapısında olduklarından, sıcaklık artışlarına karşı hassastırlar, bu nedenle enzimatik reaksiyonlar için yüksek sıcaklıklar tercih edilmez. Ancak enzimin termal kararlılığı artırılabilirse endüstriyel açıdan potansiyele sahip preparatlar hazırlanmış olur.

Serbest ve immobilize lipazın termal kararlılığını incelemek amacı ile serbest ve immobilize enzim çözeltileri 60 °C' de ve farklı zaman aralıklarında (20-120 dakika) tutularak yukarda belirtilen yönteme göre aktiflikleri tayin edildi.

3.4.2. Depo kararlılığı

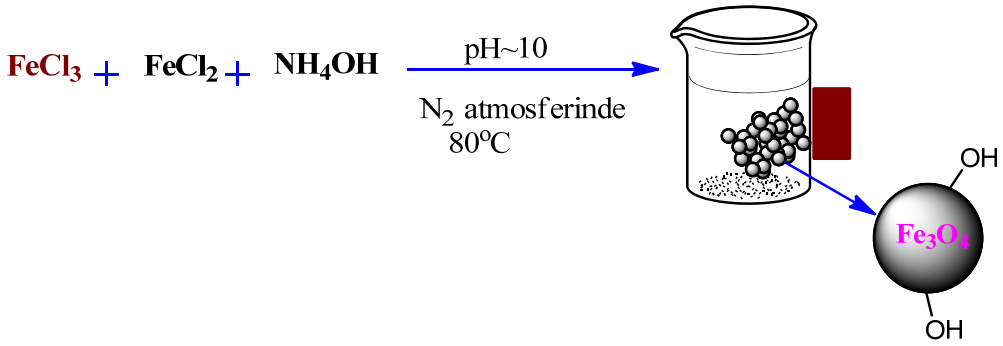
Depo kararlılığı uzun süre saklama durumunda aktivite kaybının bir ölçüsüdür. Bu süre içinde enzimin katalitik potansiyelinden yararlanılmaz. Genellikle immobilize enzimlerin depo kararlılıkları serbest enzimlerden iyidir. İmmobilize enzim +4 ^{o}C' de muhafaza edilir, standart ölçüm koşullarında (pH 7, 30 ^{o}C), periyodik ararlıklarla aktivitelerindeki değişim gözlenir.

3.4.3. Tekrar kullanılabilirlik

İmmobilize lipazın tekrar kullanım sayısını ölçmek amacı ile belli bir miktar alınan immobilize enzim örneğinin kısım 3.3.1'de belirtilen metod kullanılarak aktivitesi tayin edilir. Santifüjlenip yıkanan immobilize enzimin aynı şekilde arka arkaya aktiviteleri tayin edilerek kaç kez tekrar kullanılabilirliği bulunur.

3.5. Lipaz İmmobilizasyonu

3.5.1. Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün sentezi



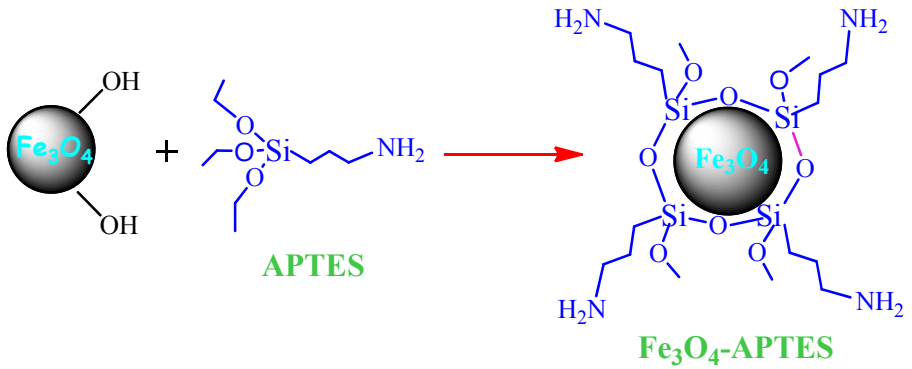
Şekil 3.3. Fe_3O_4 nanopartiküllerinin sentezi

Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonları birlikte çöktürülerek Fe_3O_4 nanopartikülleri hazırlanmaktadır (Young ve ark. 2008). Bunun için 1,0 M $FeCl_2$ ve 1,75 M $FeCl_3$'den 50 şer ml deiyonize su içerisine ilave edilir. Daha sonra bu iki karışım 250 ml'lik üç boyunlu reaksiyon balonuna aktarılır ve karışım geri soğutucu altında N_2 atmosferinde 60 ^oC ye kadar ısıtılır. Reaksiyon ortamı 60 ^oC ulaştığında % 25 (W/%) NH_4OH ile pH ~ 10-11'e ayarlanır. Ortam bazik olduğunda demir oksit partiküllerinin oluşması ile birlikte reaksiyon ortamı koyu kahverengi renge bürünür. Bu aşamadan sonra reaksiyon 80 ^oC de 1 saat daha reflaks edilir. Reaksiyon sonunda manyetik nano partiküller bir mıknatıs yardımıyla su içerisinden alınır ve yine deiyonize su ile pH nötral oluncaya kadar yıkanır. Nanopartiküller vakumlu etüvde 70 °C'de 12 saat kurutulur. Koyu kahverengi Fe_3O_4 partikülleri elde edilir (Şekil 3.3). FTIR: (Fe_3O_4) Fe-O bandı 590 cm^{-1}'de gözlemlenir (Yılmaz, 2010).

3.5.2. Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün APTES ile modifiye edilmesi

1 g Fe_3O_4 nano partikülleri 60 ml etanol içerisine ilave edilir ve 1 saat karıştırılır. Ardından 12 mL NH_4OH çözeltisi eklenir ve 10 dk süre ile karışım homojen oluncaya kadar karıştırılır. Sürekli mekanik karıştırma altında, reaksiyon karışımına 6 mL APTES eklenir. Reaksiyon 50 °C' de 8 saat karıştırılır. Reaksiyon sonucunda manyetik

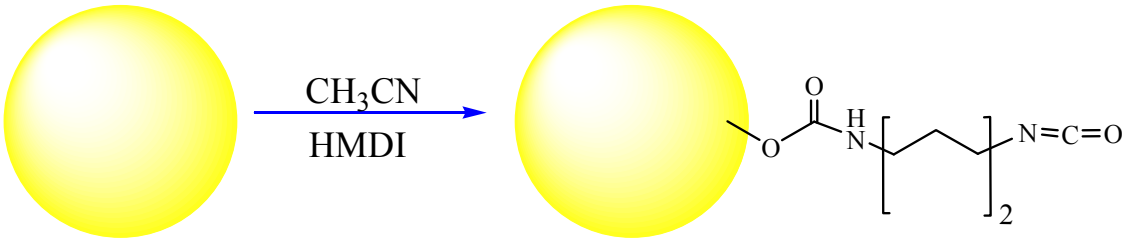
partiküller bir mıknatıs yardımıyla alınır ve sırasıyla etil alkol, deyonize H_2O ile nötür pH' a kadar yıkanır. Ardından manyetik partiküller vakum altında 12 saat kurutulur (Şekil 3.4). FTIR: 1115 ve 1030 cm^{-1}(Si–O), 1640 cm^{-1} amin bandı (NH_2), 2924 ve 2854 cm^{-1} (C-H) titreşim bandları (-CH_2) ve 580 cm^{-1} Fe–O (Yılmaz, 2010).



Şekil 3.4. APTES modifiye edilmiş Fe_3O_4 nano partiküllerinin hazırlanması

3.5.3. Sporopollenin-HMDI ile etkileştirilmesi

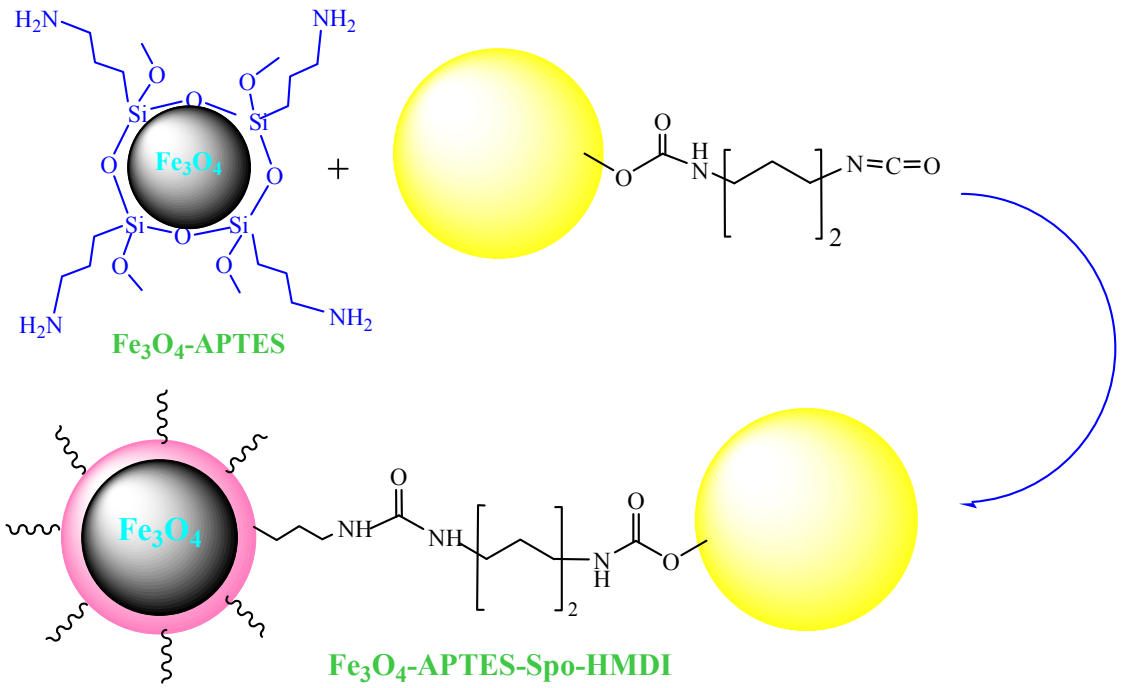
100 ml'lik balon içerisine, 1 g sporopollenin ve 10 mL kuru asetonitril oda sıcaklığında yarım saat karıştırılır. Daha sonra karışıma damla damla 2,5 mL hekzametilendiizosiyanat eklenir. Reaksiyon 70°C'de termostatlı bir ısıtıcıda 1.5 saat süreyle gerçekleştirilir. Çökelek süzülür, aseton ile birkaç kez yıkanır. Daha sonra ürün (Şekil 3.5) 60 °C' lik vakumlu etüvde 24 saat kurutulur (Yılmaz, 2010). FTIR: 2255 cm^{-1} (–N=C=O), 1730 cm^{-1}, (-N-C=O).



Şekil 3.5. Sporopollenine HMDI bağlanması

3.5.4. Manyetik Fe_3O_4- APTES nanopartikülünün Spo-HMDI ile etkileştirilmesi

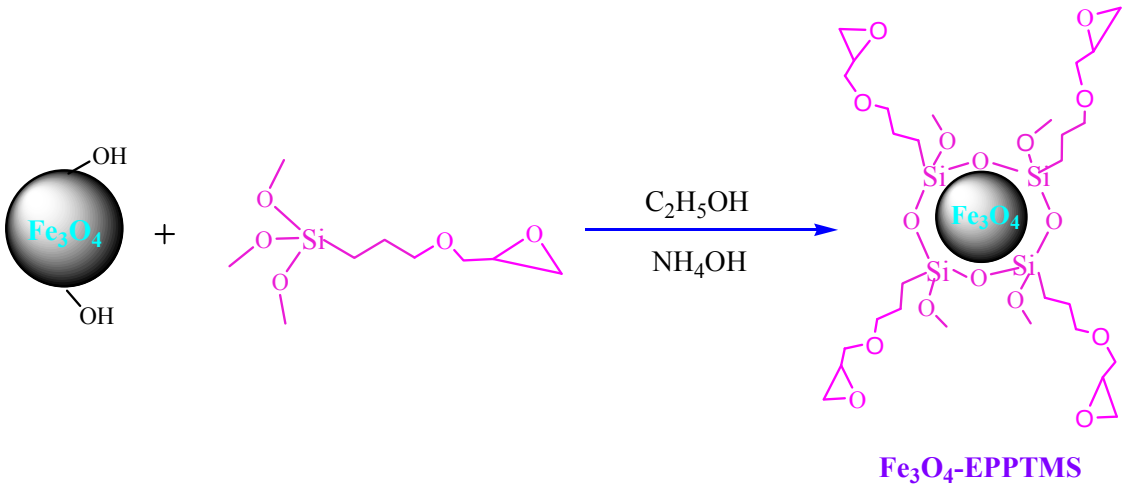
100 ml' lik iki balonda ayrı ayrı 1 g Fe_3O_4-NH_2 ve 1 g Spo-HMDI 15 ml kuru asetonitril oda sıcaklığında yarım saat karıştırılır. Daha sonra her iki çözelti birleştirilir ve reaksiyon 70 ^oC de 5 saat karıştırılır. Reaksiyon sonunda oluşan manyetik nanopartiküller asetonla yıkanır ve mıkantıs yardımıyla alınır (Şekil 3.6). FTIR: 3363 cm^{-1}(O-H), 2921,5 ve 2855 cm^{-1} alifatik (C-H), 1737 ve 1718 cm^{-1} (C=O) bandı, 1216 ve 1137 cm^{-1} (C-O) bandı, 1618 cm^{-1} (-N-C=O) bandı.



Şekil 3.6. Manyetik Fe_3O_4-APTES nanopartikülüne Spo-HMDI bağlanması

3.5.5. Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün EPPTMS ile modifiye edilmesi

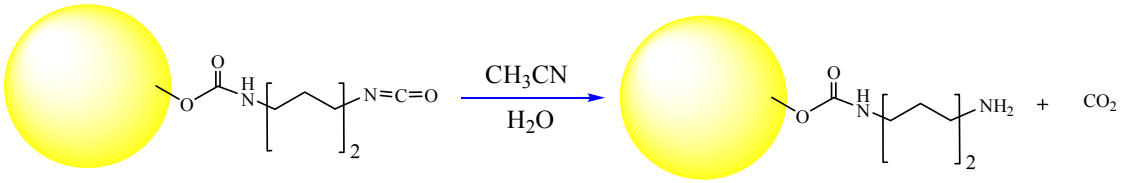
1 g Fe_3O_4 nano partikülleri 60 ml etanol içerisine ilave edilir ve 1 saat karıştırılır. Ardından 12 mL NH_4OH çözeltisi eklenir ve 10 dk süre ile karışım homojen oluncaya kadar karıştırılır. Sürekli mekanik karıştırma altında, reaksiyon karışımına 6 mL EPPTMS eklenir. Reaksiyon 50 °C' de 8 saat karıştırılır. Reaksiyon sonucunda manyetik partiküller bir mıknatıs yardımıyla alınır ve sırasıyla etil alkol, deiyonize H_2O ile nötür pH' a kadar yıkanır. Ardından manyetik partiküller (Şekil 3.7) vakum altında 12 saat kurutulur. FTIR: 3362(C-O), 1454 ve 1267 (C-O-C), 1195, 1085, 1019 ve 913 (Si–O), 579 (Fe–O) bandları gözlendi.



Şekil 3.7. EPPTMS modifiye edilmiş Fe_3O_4 nano partiküllerinin hazırlanması

3.5.6. Sporopollenin-NH_2 elde edilmesi

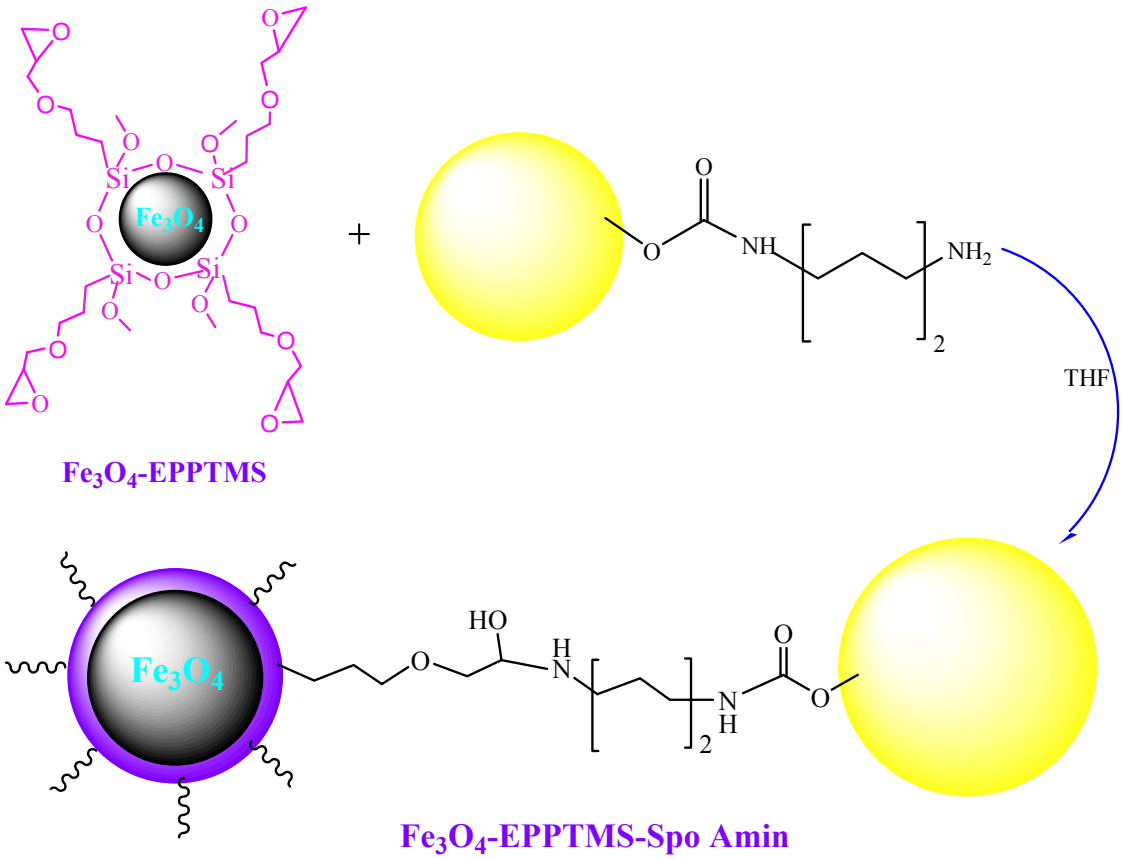
100 ml lik balonda 2 g Spo-HMDI 20 ml saf su ve 2 ml asetonitril ile 12 saat geri soğutucu altında oda sıcaklığında karıştırılır. Ardından çökelek (Şekil 3.8) mıknatıs yardımı ile alınır ve su ile yıkanır. 4 saat vakumda kurutulur. FTIR: serbest -NH_2 gruplarına ait karakteristik band 3326 cm^{-1}, 1620 cm^{-1} (NH_2) bandı (Yılmaz, 2010).



Şekil 3.8. Spo-HMDI' den Spo-NH_2 elde edilmesi

3.5.7. Manyetik Fe_3O_4- EPPTMS nanopartikülünün Spo-NH_2 ile bağlanması

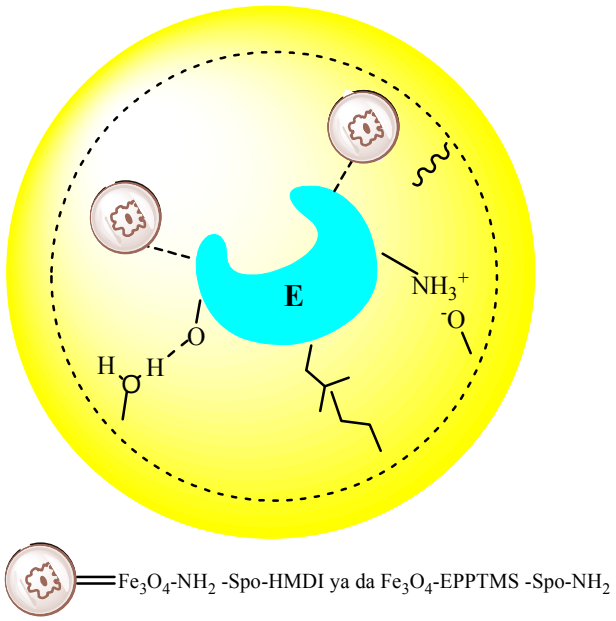
100 ml' lik balonda 0,5 g Fe_3O_4-EPPTMS; 0,5 gr Spo-NH_2 25 ml THF ve 1 ml trietilaminle geri soğutucu altında 12 saat süre ile kaynatılır. Reaksiyon sonunda su ve asetonla 2 kez yıkadıktan sonra ve vakumlu etüvde kurutulur (Şekil 3.9). IR: 3389 (O-H; Epoksi; NH), 2929 ve 2853 cm^{-1}'(-C-H), 1723 cm^{-1} (-O-C=O), 1650 cm^{-1}(–NH-C=O), 1200 ve 1259 (C-O-C), 1118, 1032 ve 892 (Si–O), 586 (Fe–O).



Şekil 3.9. Manyetik Fe_3O_4-EPPTMS nanopartikülüne Spo-NH_2 bağlanması

3.5.8. Fonksiyonlandırılmış manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerine sol-jel tutuklama metoduna göre lipaz immobilizasyonu

Candida rugosa lipaz (60 mg), fosfat tamponu içerisinde (390 µL, 0,05 M, pH 7,0) karıştırılır. Karışım üzerine istenilen destek maddesinden (Fe_3O_4-APTES+Spo-HMDI veya Fe_3O_4- EPPTMS+Spo-NH_2 (0,05 g), 100 µL polivinil alkol (%4 w/v), 50 µL NaF çözeltisi (0,1 M) ve 100 µL isopropil alkol ilave edilerek karıştırılıp homojenize edilir. Daha sonra 780 µL oktil trietoksisilan (2,5 mmol) ve 74 µL tetraetoksisilan (TEOS, 0,5 mmol) konularak karıştırılır. 1-2 dk sonra jel oluşumu başlar. Oluşan bu jelatimsi karışım bir gece +4^{o}C de bekletilerek 10 mL distile su ve 10 mL isopropil alkol ile yıkanır (Şekil 3.10). Daha sonra karışım liyofilizatörde kurutulur (Reetz, 2003).



Şekil 3.10. Sol-jel immobilizasyon modeli

3.6. HPLC Çalışmaları

3.6.1. Naproksen metil ester türevinin sentezi

Naproksen metil esteri sentezinde, öncelikle piyasada tek enantiyomeri bulunan *S*-Naproksen rasemleştirilerek (R/S)-Naproksen rasematına dönüştürülür. Daha sonra Fischer esterleşme metoduna göre metanol ile asidik ortamda etkileştirilerek (R/S)-Naproksen metil ester türevi elde edilir.

3.6.1.1. (*S*)-Naproksen'in Rasemleştirilmesi

2 g (*S*)-Naproksen ve 1.78 g sodyum hidroksit (NaOH) 15 mL etilenglikol içerisinde 175 ^oC'de 6 saat karıştırılarak kaynatılır. Reaksiyon sonrasında karışım üzerine distile su ilave edilir ve pH 4.0'e ayarlanır. Oluşan ürün süzülerek su ile yıkanır ve vakum altında kurutulur. Rasemleşme HPLC sisteminde, yaklaşık olarak aynı alana sahip piklerin (R/S) varlığı ile doğrulanır (Wu, 2000).

3.6.1.2. (*R*/*S*)-Naproksen Metil Ester Sentezi

4 mmol (R/S)-Naproksen 30 mL metanol içerisinde çözünür. Daha sonra üzerine 1 mL H_2SO_4 ilave ederek karıştırılarak kaynatılır. 2 saat sonra reaksiyon ortamına distile su ilave edilerek ürün çöktürülür. Oluşan ürün kloroform ile ekstraksiyon yapılarak organik faza alınır. Organik faz $MgSO_4$ ile kurutulur. Organik faz'ın vakum altında uzaklaştırılması ile (R/S)-Naproksen metil ester türevi elde edilir. Verim %90, ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$); δ=1.6 (3H,d, *J*=7.4 Hz), 3.63 (3H, s), 3.86 (1H, q, *J*=7.0 Hz), 3.92 (3H, s) 7.15 (2H, m), 7.4 (1H, m), 7.65 (3H, m), ^{13}C-NMR (400 MHz, $CDCl_3$), 18.82, 45.17, 52.13, 55.73, 105.93, 119.33, 126.15, 126.40, 127.39, 129.14, 129.48, 133.91, 135.88, 157.92, 175.32.

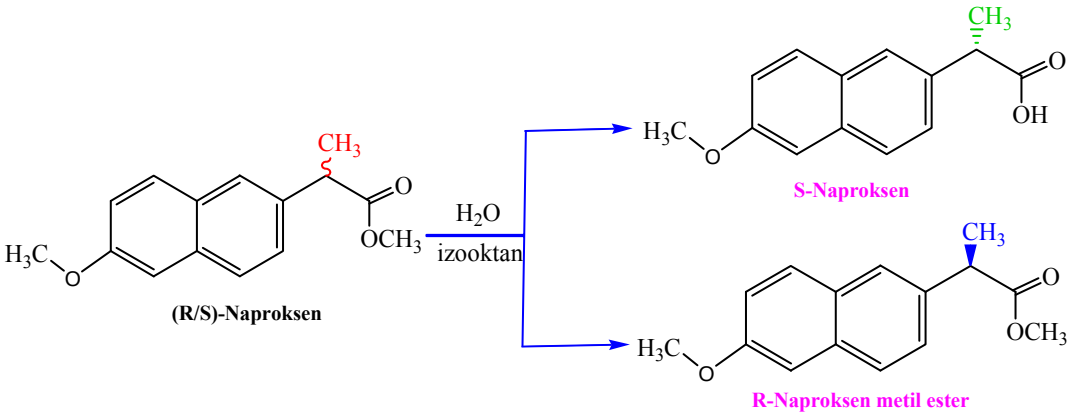
3.6.1.3. İmmobilize Lipazlar ile (R/S)-Naproksen metil ester'in enantiyoseçimli hidrolizi

Serbest lipaz ile yapılan Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz çalışmalarında 0,781 mg/mL (0,05 M fosfat tamponu pH 7,0 içerisinde) enzim çözeltisi kullanıldı. Bu çözelti, immobilize lipazları serbest lipaza göre kıyaslamak amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda bulundu. Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz reaksiyonlarında kullanılan immobilize edilmiş lipazların miktarı serbest lipazın kullanılan miktarına karşılık gelen Unit'e eşdeğer olacak şekilde belirlendi.

3.6.1.4. Genel Prosedür

5 mL'lik vial içerisine 2 mL serbest enzim çözeltisi (0,781mg/mL, pH 7.0, 0,05 M fosfat tamponu) ya da serbest lipaz'a eşdeğer Unit'de immobilize lipaz konulur. Daha sonra üzerine 100 µL (R/S)-Naproksen metil esterinin izooktandaki çözeltisi (20 mM) ilave edilir ve 24 saat 35 ^oC de çalkalamalı inkübatör içerisinde karıştırılır. Daha sonra karışım üzerine 2 mL izooktan konularak ekstraksiyon yapılır. İzoktan fazındaki numune, HPLC cihazına verilerek (R/S)-Naproksen metil esterinin (R)-Naproksen ya da (S)-Naproksen'e enantiyomerik olarak dönüşümü belirlenir (Şekil 3.11).

Bunun için kiral bir kolon olan Chiracel ODH kolon, n- hekzan / 2-propanol /trifloroasetikasit 100/1/0,1 (h/h) oranında taşıyıcı fazında 1 ml/ dk akış hızında gerçekleştirilmiş ve UV dedektörde (λ = 254 nm'de okunur (Cernia ve ark. 2002).



Şekil 3.11. (R/S)-Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi (Yılmaz, 2010)

3.6.2. (*R*/*S*)- 2-fenoksi propiyonik asit metil ester sentezi

2-Fenoksi Propiyonik asit metil esteri sentezi Fischer esterleşme metoduna göre metanol ile asidik ortamda etkileştirilerek (R/S)-2-Fenoksi Propiyonik asit metil esteri elde edilir. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$); δ=3.68 (3H,s), 4.89 (1H, m), 1.61 (3H, d), 6.99 (1H, d), 7.01 (1H, t), 6.99 (1H, d), 7.34 (1H, t), 7.34 (1H, t), ^{13}C-NMR (400 MHz, $CDCl_3$), 18.82, 45.17, 52.13, 55.73, 105.93, 119.33, 126.15, 126.40, 127.39, 129.14, 129.48, 133.91, 135.88, 157.92, 175.32. 18.4, 52.2, 75.3, 114.4, 114.4, 120.3, 157.4, 129.3, 129.3, 170.8.

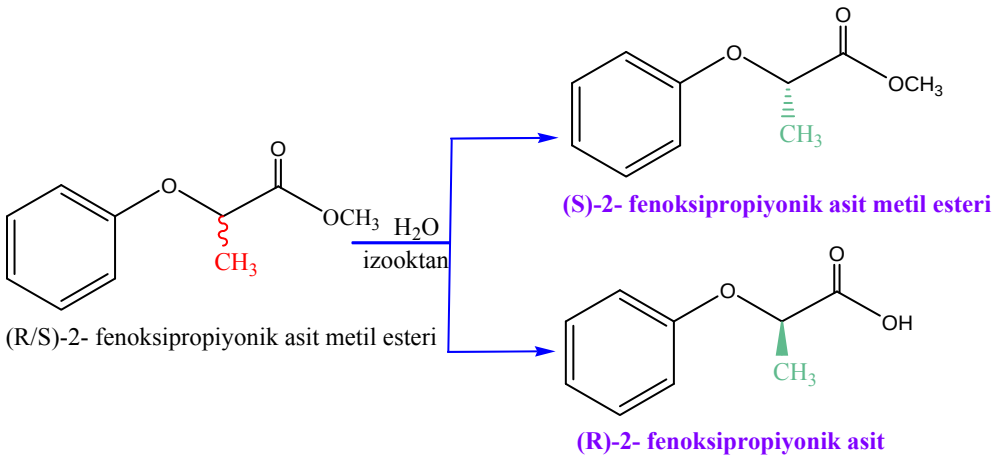
3.6.2.1. İmmobilize Lipazlar ile (R/S)- 2-fenoksi propiyonik asit metil ester'in enantiyoseçimli hidrolizi

Serbest lipaz ile yapılan rasemik 2-fenoksi propiyonik asit metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz çalışmalarında 0,4875 mg/mL (0,05 M fosfat tamponu pH 7,0 içerisinde) enzim çözeltisi kullanıldı. Oran 2-fenoksi propiyonik asit metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz reaksiyonlarında kullanılan immobilize edilmiş lipazların miktarı serbest lipazın kullanılan miktarına karşılık gelen Unit'e eşdeğer olacak şekilde belirlendi.

3.6.2.3. Genel Prosedür

5 mL'lik vial içerisine 2 mL serbest enzim çözeltisi (0,4875mg/mL, pH 7.0, 0,05 M fosfat tamponu) ya da serbest lipaza eşdeğer Unit'de immobilize lipaz konulur. Daha sonra üzerine 200 µL (R/S)- 2-fenoksi propiyonik asit metil esterinin izooktandaki çözeltisi (20 mM) ilave edilir ve 1 saat 35 ^{o}C' de çalkalamalı inkübatör içerisinde karıştırılır. Daha sonra karışım üzerine 2 mL izooktan konularak ekstraksiyon yapılır. İzoktan fazındaki numune, HPLC cihazına verilerek (R/S)- 2-fenoksi propiyonik asit metil esterinin (R)- 2-fenoksi propiyonik asit ya da (S)- 2-fenoksi propiyonik asit'e enantiyomerik olarak dönüşümü belirlenir (Şekil 3.12).

Bunun için kiral bir kolon olan Chiracel ODH kolon, hekzan / 2-propanol 90/10 (h/h) oranında taşıyıcı fazında 1 ml/ dk akış hızında gerçekleştirilmiş ve UV dedektörde λ = 254 nm' de okunur.



Şekil 3.12. (R/S)- 2-fenoksi propiyonik asit metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi

3.6.3. (R/S)-Mandelik Asit Metil Ester Türevi

(R/S)-Mandelik asit metil esteri, (R/S)-mandelik asit, R-mandelik asit, S-mandelik asit ticari olarak Sigma' dan temin edilmiştir.

3.6.3.1. İmmobilize lipazlar ile (R/S)-Mandelik asit metil ester'in enantiyoseçimli hidrolizi

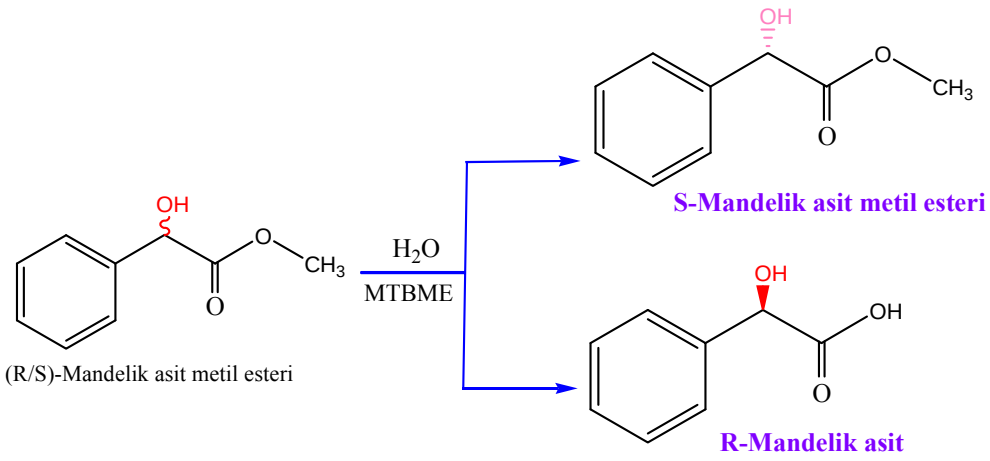
Serbest lipaz ile yapılan mandelik asit metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz çalışmalarında 7,81 mg/mL (0,05 M fosfat tamponu pH 7,0 içerisinde) enzim çözeltisi

kullanıldı. Bu çözelti, immobilize lipazları serbest lipaz' a göre kıyaslamak amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda bulundu. Mandelik asit metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz reaksiyonlarında kullanılan değişik tekniklerle immobilize edilmiş lipazların miktarı serbest lipazın kullanılan miktarına karşılık gelen Unit'e eşdeğer olacak şekilde belirlendi.

3.6.3.2. Genel Prosedür

5 mL'lik vial içerisine 2 mL serbest enzim çözeltisi (7,81mg/mL, pH 7.0, 0,05 M fosfat tamponu) ya da serbest lipaz'a eşdeğer Unit'de immobilize lipaz konulur. Daha sonra üzerine 100 µL (R/S)-mandelik asit metil esterinin MTBME(metil tersiyer-bütil metil eter) deki çözeltisi (20 mM) ilave edilir ve 24 saat 35 ^{o}C de çalkalamalı inkübatör içerisinde karıştırılır. Sonra karışım üzerine 2 mL ter-bütilmetil eter konularak ekstraksiyon yapılır. MTBME fazındaki numune, HPLC cihazına verilerek (R/S)-mandelik asit metil esterinin (R)- mandelik asit ya da (S)- mandelik asit' e enantiyomerik olarak dönüşümü belirlenir (Şekil 3.13).

Bunun için kiral bir kolon olan Chiracel ODH kolon, hekzan / 2-propanol 90/10 (h/h) oranında taşıyıcı fazında 1 ml/ dk akış hızında gerçekleştirilmiş ve UV dedektörde λ = 254 nm'de okunur.



Şekil 3.13. (R/S)-Mandelik Asit metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi

HPLC'de elde edilen sonuçlara göre yapılan hesaplamalar literatürdeki (Chen ve ark., 1982) formüller kullanılarak yapılır. Enantiyomerik fazlalık (ee), dönüşüm oranı (c veya x), enantiyoseçimlilik (E) gibi değerler aşağıdaki bağıntılar kullanılarak

bulunmaktadır. Rasemik Naproksen metil esterinin, rasemik 2-fenoksi propiyonik asit metil esterinin ve rasemik mandelik asit metil esterlerinin hidroliz sonuçları elde edilen katı ve/veya sıvı fazdaki ürünün HPLC analizleri ile her bir enantiyomer için derişimler belirlendikten sonra enantiyomerik fazlalık (girdi için: ees ve ürün için: eep), enantiyomerik oran (E) ve dönüşüm oranı değerleri (c) aşağıdaki eşitlikler (3.1; 3.2) kullanılarak hesaplandı.

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]} \qquad (3.1)$$

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \qquad ee_s = \frac{C_R - C_S}{C_R + C_S} \qquad ee_p = \frac{C_S - C_R}{C_S + C_R} \qquad (3.2)$$

ee_s : Kalan substratın enantiyomerik fazlalığı

ee_p : Oluşan ürünün enantiyomerik fazlalığı

C_R : R enantiyomerinin konsantrasyonu

C_S: S enantiyomerinin konsantrasyonu

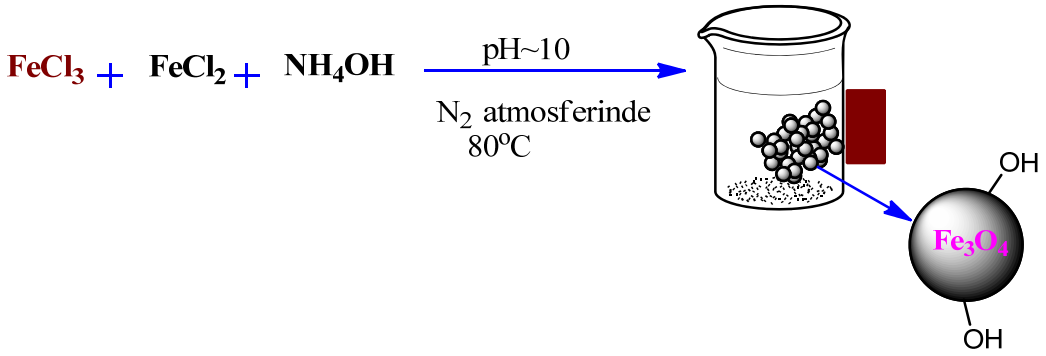
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Bu çalışma üç bölümden oluşmaktadır. Birincisi lipaz immobilizasyonu için gerekli destek maddelerinin hazırlanışı, ikincisi sol-jel tekniğine göre lipaz immobilizasyonu, üçüncüsüde immobilize lipazların *S*-Naproksenin, R-2-fenoksipropiyonik asit ve R-metil mandelik asit enantiyomerlerinin oluşturulmasında kullanılmasıdır.

4.1. Lipaz immobilizasyonu için farklı manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerinin hazırlanışı ve karakterizasyonu

4.1.1. Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün sentezi

Bu çalışmada *Candida rugosa* lipaz immobilizasyonu için öncelikle manyetik Fe_3O_4 nanopartikülleri literatürde verilen tekniklere göre hazırlandı.

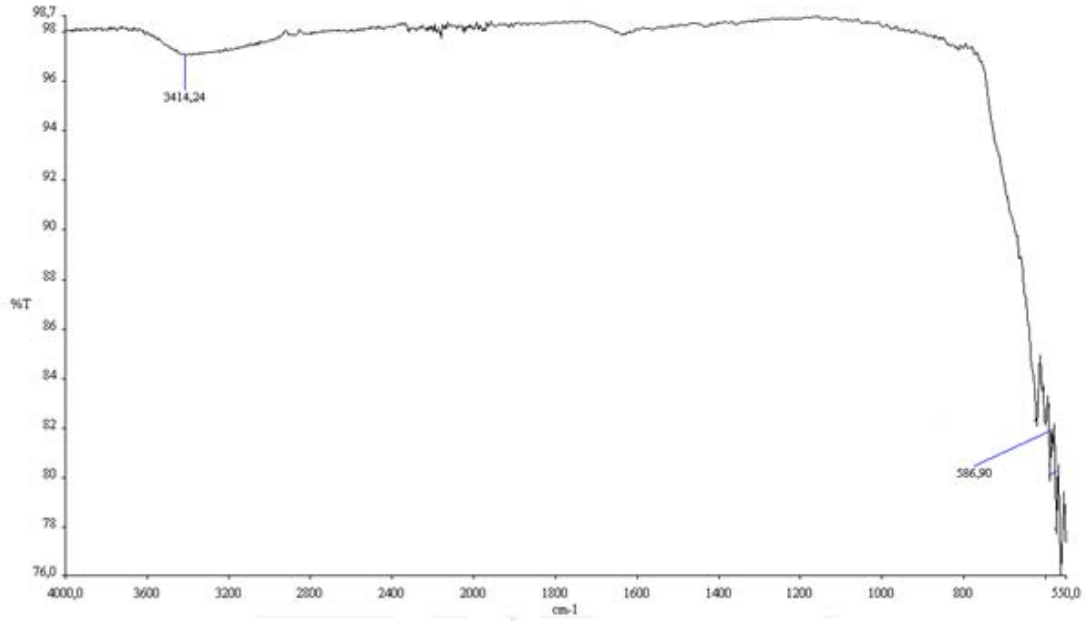


Şekil 4.1. Fe_3O_4 nanopartiküllerinin sentezi

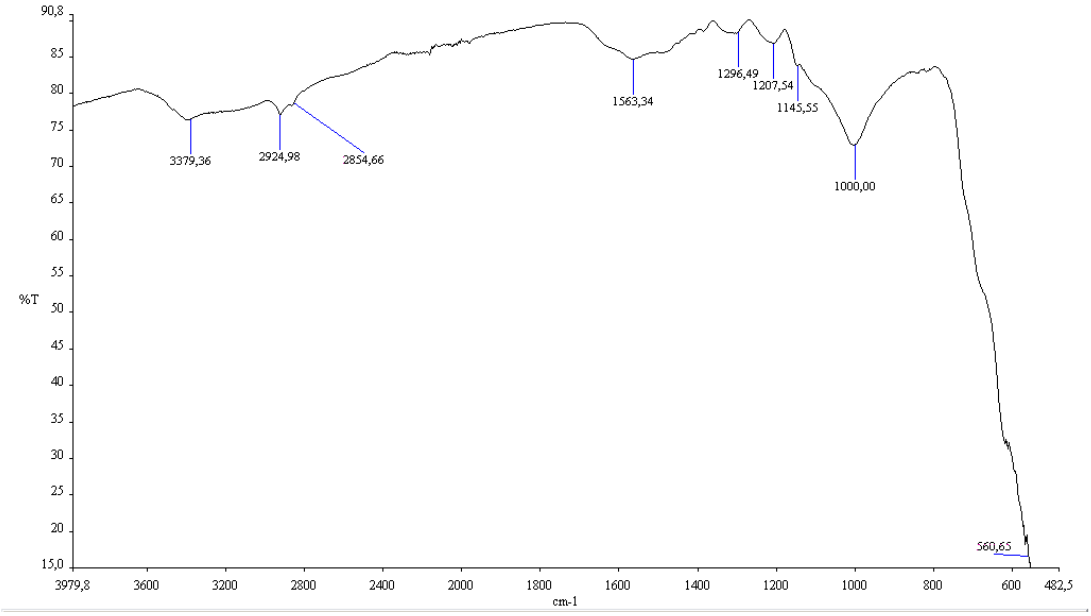
Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülü uygun oranlarda alınan Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonları birlikte bazik ortamda çöktürülerek hazırlandı (Young ve ark., 2008). Reaksiyon sonucu oluşan magnetik nannopartiküller bir mıknatıs ile kolayca sulu çözeltiden alındı ve bir sonraki basamakta kullanıldılar. Bu tekniğe göre sentezlenen manyetik nanopartikülünün yaklaşık boyutu 10 nm civarındadır. Fe_3O_4 nanopartikülüne ait FTIR spektrumuna baktığımızda 590 cm^{-1}' de Fe-O bandı gözlendi. Daha sonra sentezlenen nanopartikül farklı uçlu alkilsilan bileşikleri ile modifiye edilerek fonksiyonlandırıldı. Kullanılan aminopropiltrietoksisilan (APTES) ve epoksipropoksitrimetoksisilan (EPPTMS) uygun koşullarda sentezlenen Fe_3O_4 nanopartikülü ile tepkime sonucunda amino grubu ve epoksi grubu taşıyan manyetik nanopartiküller elde edildi. Böylece

manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerinin yüzeydeki hidroksil grupları ve APTES arasındaki reaksiyonla APTES ile modifiye olmuş manyetik Fe_3O_4 nanopartikülleri elde edildi. Bu reaksiyonda ilk olarak APTES bazik ortamda su fazında/suda Si-O-CH_3 bağları –OH gruplarına dönüşür. Daha sonra manyetik Fe_3O_4' ün yüzeyindeki serbest –OH grupları ile silanol grupları arasında kondenzasyon gerçekleşir ve Fe-O-Si bağları elde edilmiş olur. Oluşan manyetik nanopartiküller bir mıknatıs yardımıyla reaksiyon ortamından alınır ve yıkanır.

Elde edilen partiküllerin karakterizasyonu FTIR ile karakterize edildi. APTES ile modifiye edilmiş manyetik Fe_3O_4 nanopartikülün FTIR spekturumunda 1115 ve 1030 cm^{-1} de silika bandları (Si–O), 1640 cm^{-1} amin bandı (NH_2), 2924 ve 2854 cm^{-1} C-H titreşim badları (-CH_2) ve 580 cm^{-1} Fe–O titreşim bandının varlığı ile gözlendi (Yılmaz, 2010).

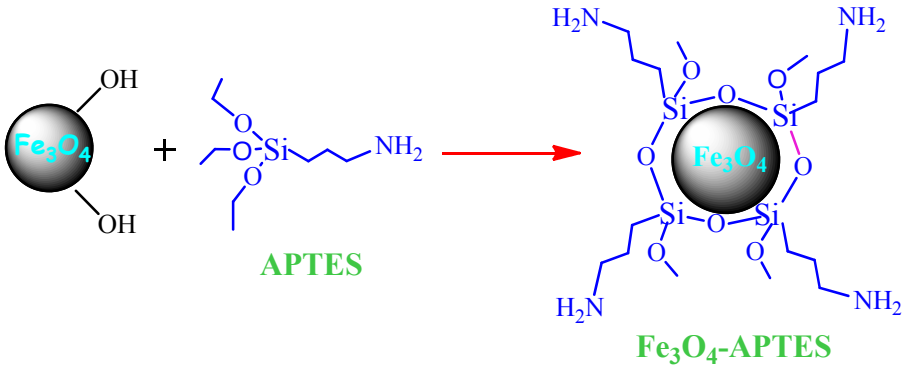


(a)



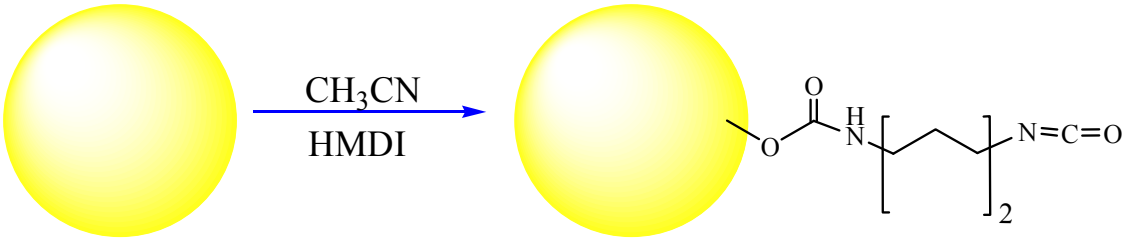
(b)

Şekil 4.2. a: Fe_3O_4 ve b: Fe_3O_4-APTES' nin FT-IR spektrumları



Şekil 4.3. APTES modifiye edilmiş Fe_3O_4 nano partiküllerinin hazırlanması

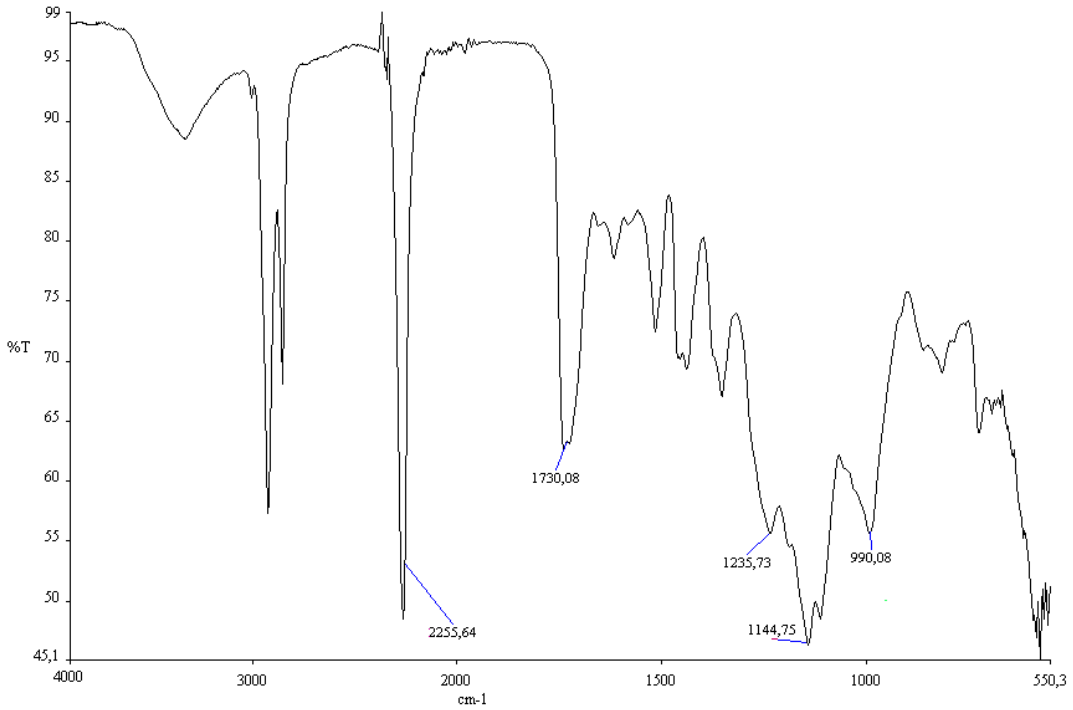
4.1.2. Sporopollenin-HMDI ile etkileştirilmesi



Şekil 4.4. Sporopollenine HMDI bağlanması

Sporopollenin asetonitril içersinde oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra hekzametilendiizosiyanat ile etkileştirildi. Bu işlem sonunda izosiyanat uçlu

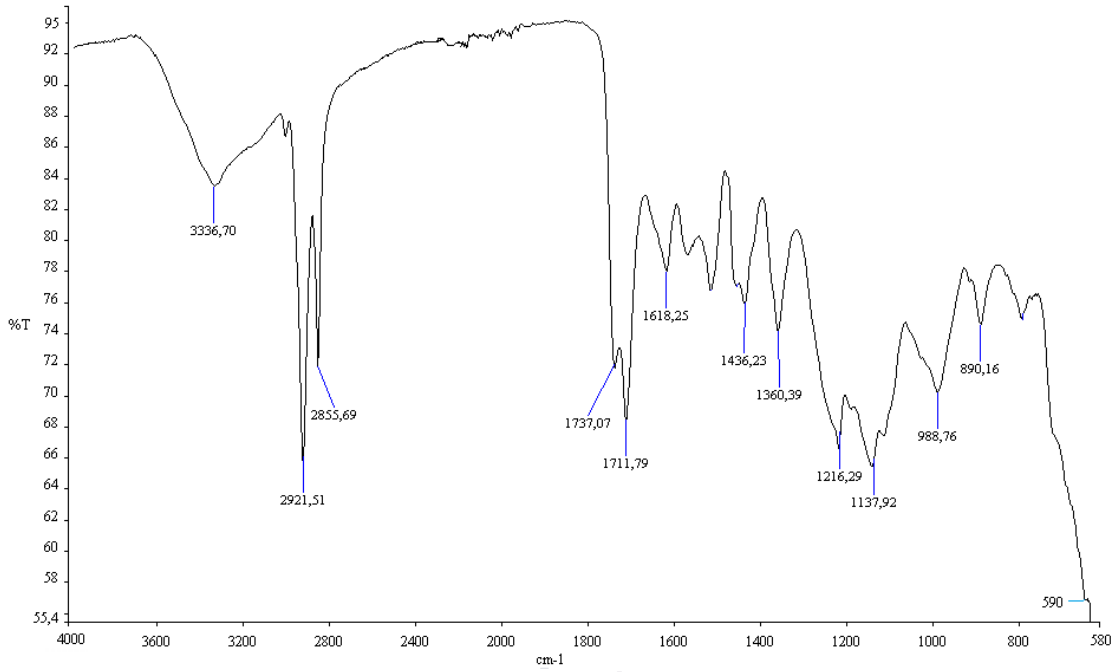
Sporopollenin(Spo-HMDI) elde edildi. Spo-HMDI'nin karekterizasyonu ve takibi FTIR ile doğrulandı. FTIR spektrumunda izosiyanat (–N=C=O) grubuna ait (2255 cm^{-1}) bantlarının ortaya çıkması ve 1730 cm^{-1}'deki (O-C=O) karbonil grubuna ait karakteristik band gözlenmesi ile anlaşıldı (Şekil 4.4) (Yılmaz, 2010).



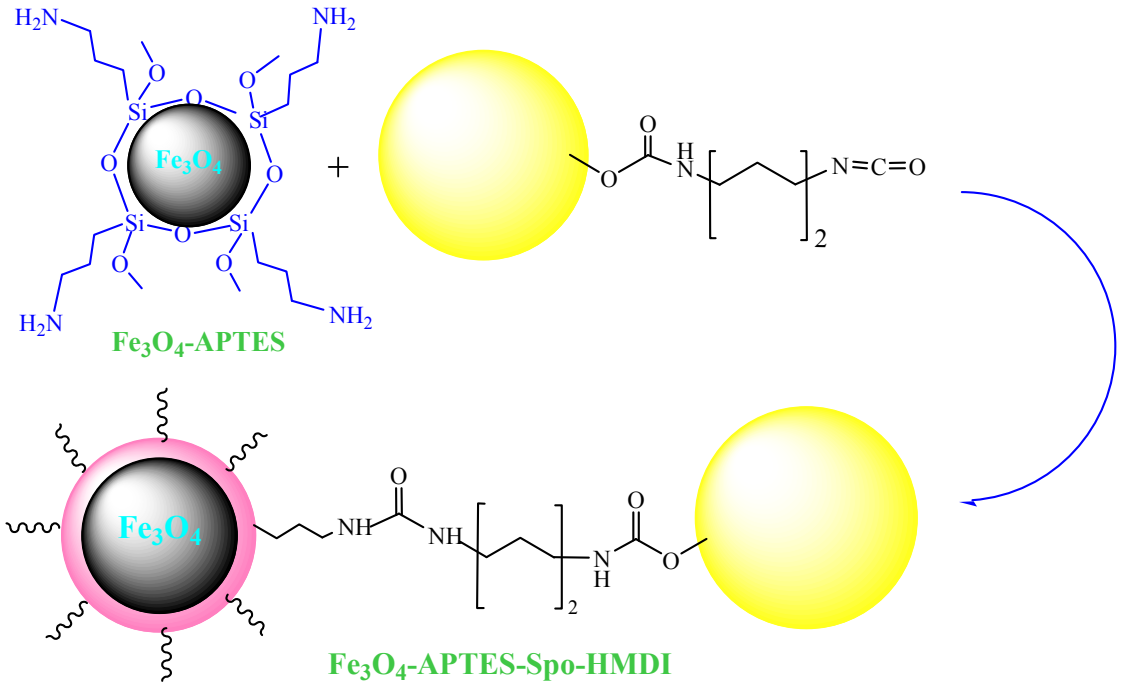
Şekil 4.5. Spo-HMDI FTIR spektrumu

4.1.3. Manyetik Fe_3O_4- APTES nanopartikülünün Spo-HMDI ile bağlanması

Daha önceden sentezlenen amino uçlu Fe_3O_4 nanopartikülü ile –N=C=O fonksiyonel gruplu sporopollenin asetonitril içerisinde etkileştirildi. Tepkimenin tamamlandığı izosiyanat grubuna ait bandların (2255 cm^{-1}) kaybolmasından anlaşıldı. Oluşan ürün reaksiyon ortamından bir mıknatıs yardımı ile alınarak yıkandı ve vakumda kurutularak bir sonraki basamak için saklandı.



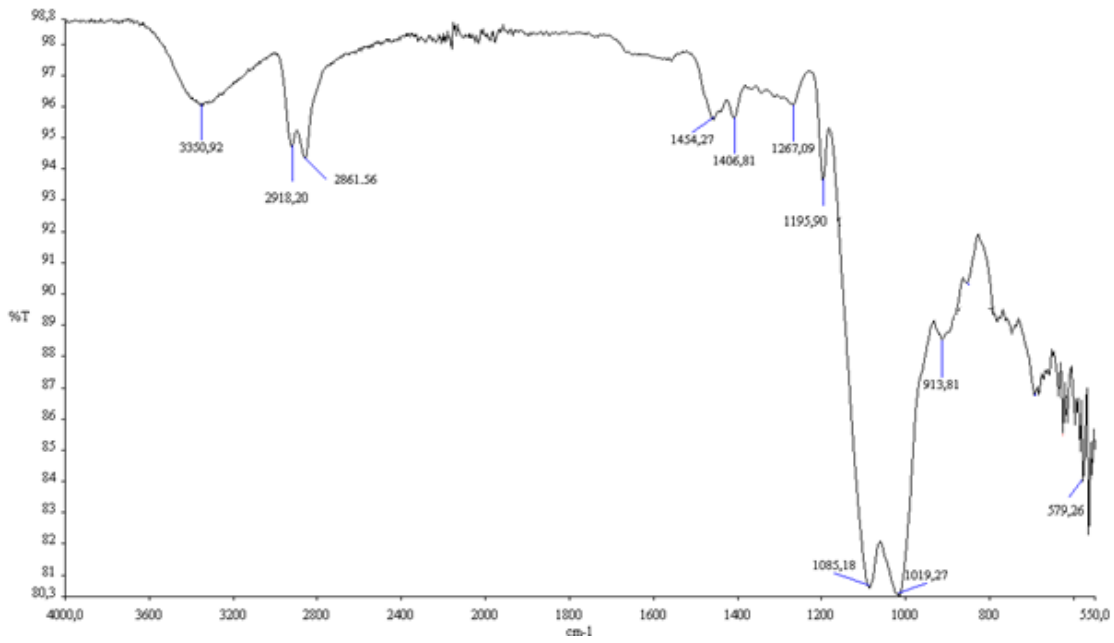
Şekil 4.6. Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI' nin FT-IR spektrumları



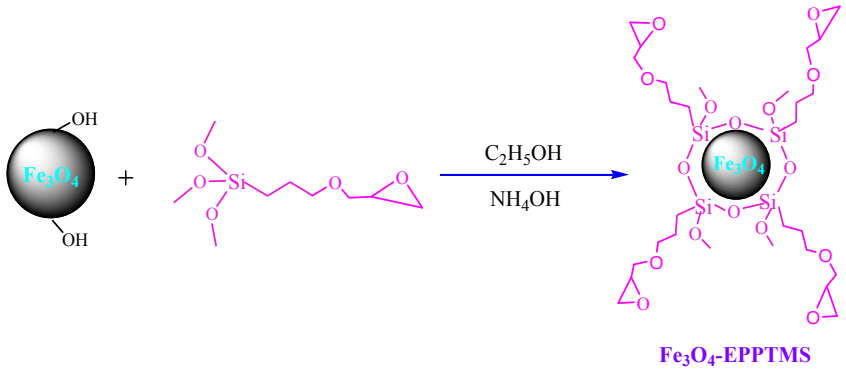
Şekil 4.7. Manyetik Fe_3O_4-APTES nanopartikülüne Spo-HMDI bağlanması

4.1.4. Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün EPPTMS ile modifiye edilmesi

Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün 3-(2,3-epoksipropoksi)-propil]-trimetpksisilan (EPPTMS) ile modifiye edilmesi, APTES ile modifiye edilmiş Fe_3O_4 nanopartikül sentezine göre yapıldı. Bu yapılan sentezdeki tek değişiklik APTES yerine EPPTMS' nin kullanılmasıdır. Reaksiyon sonucunda manyetik partiküller bir mıknatıs yardımıyla alındı. Partiküle ait FTIR spektrumunda 3350 (C-O), 1454 ve 1267 (C-O-C), 1195, 1085, 1019 ve 913 (Si–O), 579 (Fe–O) bandları gözlendi (Şekil 4.8).

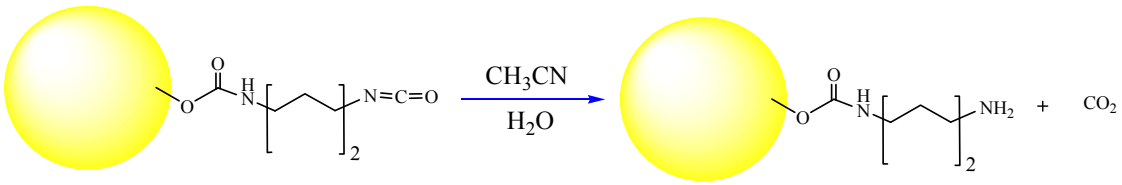


Şekil 4.8. Fe_3O_4-EPPTMS' nin FT-IR spektrumları



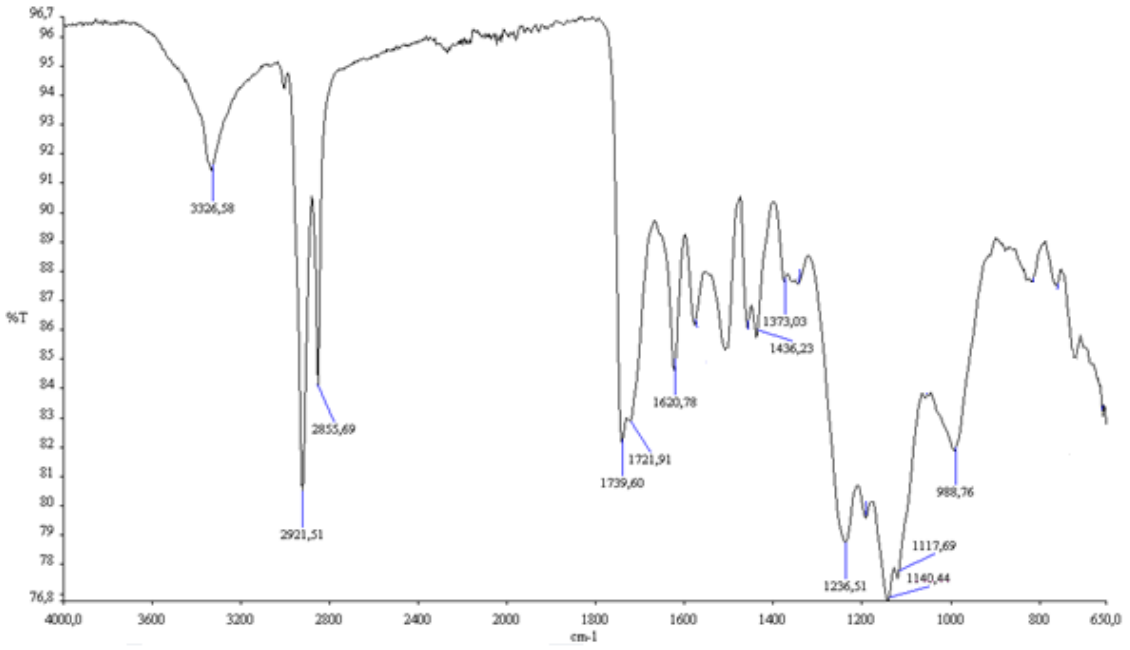
Şekil 4.9. EPPTMS modifiye edilmiş Fe_3O_4 nano partiküllerinin hazırlanması

4.1.5. Sporopollenin-NH_2 ile fonksiyonlandırılması



Şekil 4.10. Spo-HMDI' den Spo-NH_2 elde edilmesi

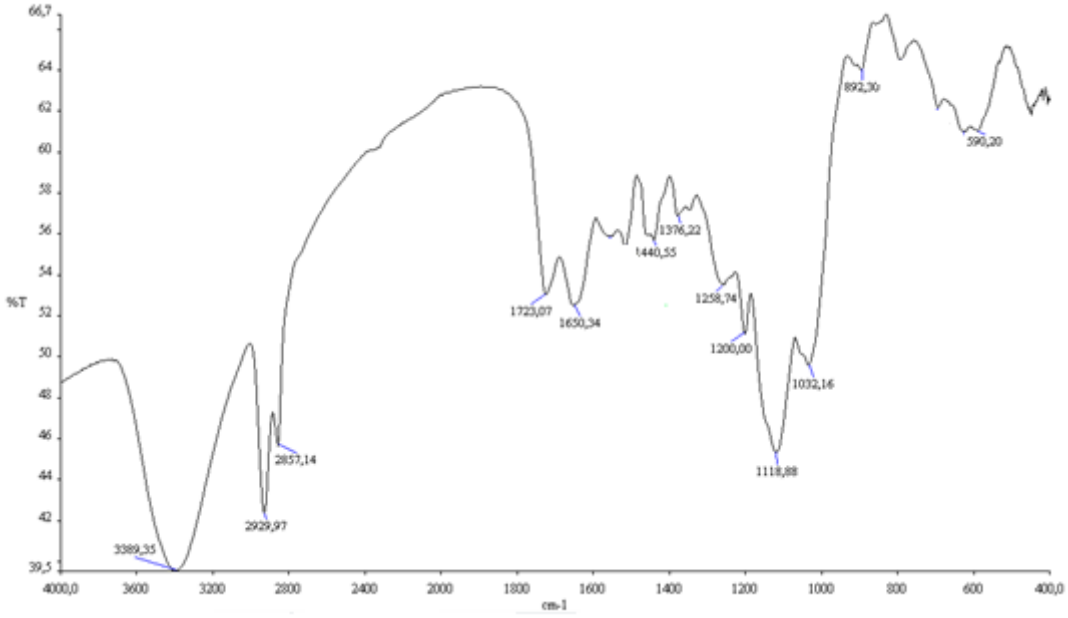
Spo-HMDI destile su ve asetonitril ortamında etkileştirilerek literatüre göre CO_2 gazı çıkışı ile amino fonksiyonel gruplarına dönüştürüldü. Elde edilen ürünün FTIR spektrumunda izosiyonat grubuna ait 2270 cm^{-1} deki band kaybolarak yerine 1739 cm^{-1} ve 1620 cm^{-1}' de(O-C=O) bandlar meydana gelmiştir. Ayrıca serbest -NH_2 gruplarına ait karakteristik band 3326 cm^{-1}(NH)' de gözlendi. FTIR spektrumuna baktığımızda 1620 cm^{-1}' deki amin bandının oluşumu ve 2270 cm^{-1}' deki izosiyonat bandının kaybolmasından Spo-HMDI' nin Spo-NH_2 polimerine dönüştüğü ispatlanır (Şekil 4.11) (Yılmaz, 2010).



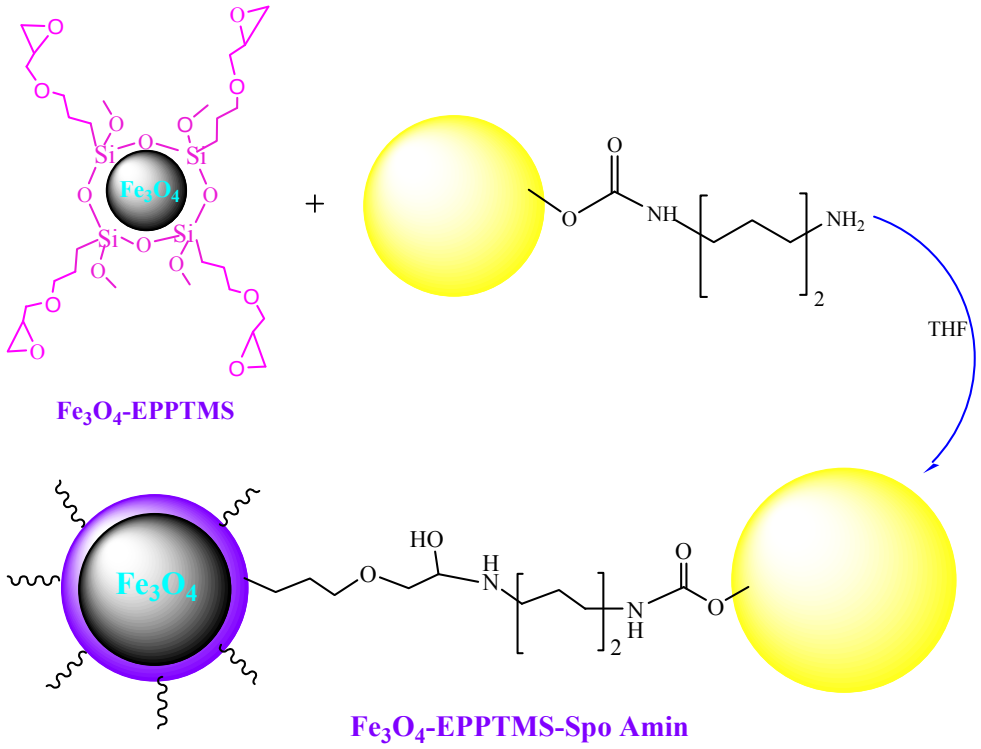
Şekil 4.11. Spo-NH_2 FTIR spektrumu

4.1.6. Manyetik Fe_3O_4- EPPTMS nanopartikülünün Spo-Amin' e bağlanması

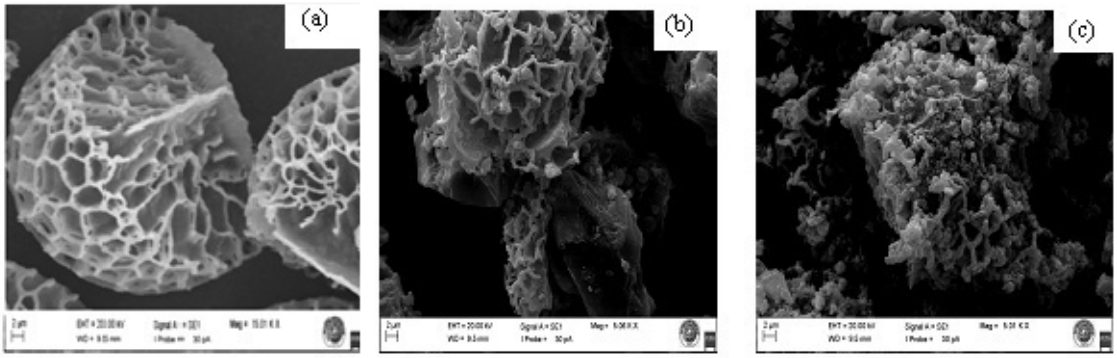
Epoksi grubu taşıyan Fe_3O_4 nanopartikülleri, NH_2 –grubu ile fonksiyonlandırılan sporopollenin ile reaksiyona sokuldu. Oluşturulan partiküller bir mıknatıs yardımı ile ayrıldıktan sonra yıkanıp, kurutulduktan sonra FTIR spektrumu alındı. Bu spektrumda OH ve NH grubuna ait bandları 3389 cm^{-1}' de, alifatik –CH- piklerini 2929 ve 2853 cm^{-1}' de, -O-C=O grubuna ait pikleri 1723 cm^{-1}' de, –NH-C=O bandını 1650 cm^{-1}' de, 1259 ve 1200 C-O-C bandlarına ait ve 1118, 1032 ve 892 cm^{-1}' deki bantlar Si-O bandlarını ve 590 cm^{-1}' deki band Fe-O grubuna aittir. Ayrıca 1650 cm^{-1}' deki bandlar epoksi grubu ile tepkimeye girmeyen serbest $–NH_2$ grubuna da ait olabilir (Şekil 4.12 ve 4.13).



Şekil 4.12. Fe_3O_4- EPPTMS-Spo-NH_2 FTIR spektrumu



Şekil 4.13. Manyetik Fe_3O_4-EPPTMS nanopartikülüne Spo-NH_2 bağlanması

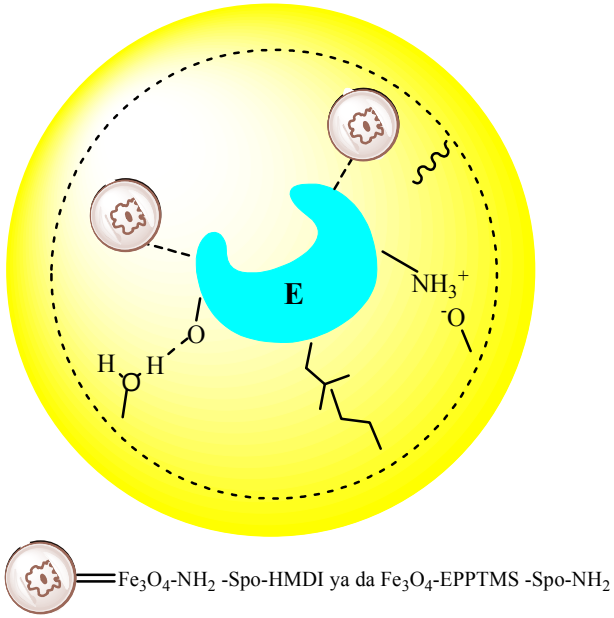


Şekil 4.14. a: Spo, b: Manyetik Fe_3O_4-EPPTMS-Spo- ve c: NH_2Manyetik Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES) SEM fotoğrafı

SEM fotoğrafı, sporopollenin, manyetik Fe_3O_4-EPPTMS-Spo ve tutuklanmış lipaz arasındaki morfolojik farklılıkları doğrulamaktadır (Şekil 4.14). Sporopollenin üzerine manyetik Fe_3O_4-EPPTMS' nin bağlı olduğu görülmektedir (Şekil 4.14(b)).Tutuklamadan sonra sporopollenin'nin yüzey boşluğu lipaz ile doldurulmuş olduğu görülmektedir (Şekil 4.14(c)).

4.2. Sol-Jel Tekniğine göre Lipaz İmmobilizasyonu

4.2.1. Fonksiyonlandırılmış Manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerine sol-jel tutuklama metoduna göre lipaz immobilizasyonu



Şekil 4.15. Sol-jel metodu ile fonksiyonlandırılmış manyetik nanopartiküller üzerine lipaz immobilizasyonu

Sol-jel tutuklama metotlarıyla lipaz immobilizasyonu Bölüm 3.5.8' de ayrıntılı anlatıldı. Yapılan literatür araştırmalarında manyetik partiküllerin lipaz immobilizasyonunda ayırma işlemlerinde getirdiği kolaylık ve basit işlem dikkate alınarak bu çalışmada *Candida rugosa* lipaz sol-jel tutuklama metoduna göre fonksiyonlandırılmış nanopartiküller (Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI; Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2) ile immobilize edildi (Şekil 4.15). Bu çalışmalara ek olarak manyetik nanopartikül kullanmadan Spo-HMDI biyopolimerini de lipaz immobilizasyonunda kullanarak elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı. Bu çalışmalarda sol-jel tekniğinde kullanılan OTES yerine MTMS kullanarak enzim aktivitesine alkil grubunun etkisi araştırıldı.

Çizelge 4.1. Optimum reaksiyon şartlarında serbest ve immobilize lipazların aktivitesi

	Tutuklanan Protein (mg/g)	Tutuklanan Protein yüzdesi (%)	Lipaz Aktivitesi (U/g destek maddesi)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Aktivite Verimi (%)
Lipaz[a]	28.5	58.40	95.1	3.32	100[b]
Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-E_{tut}(OTES) **(1)**	7,7	18,32	76,6	9,95	300
Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES) **(2)**	37,6	89,50	434,6	11,7	348,2

[a] destek maddeleri kullanmadan tutuklanmış serbest lipaz
[b] serbest lipaz için aktivite verimi % 100 olarak alındı.

Çizelge 4.2. Optimum reaksiyon şartlarında serbest ve immobilize lipazların aktivitesi

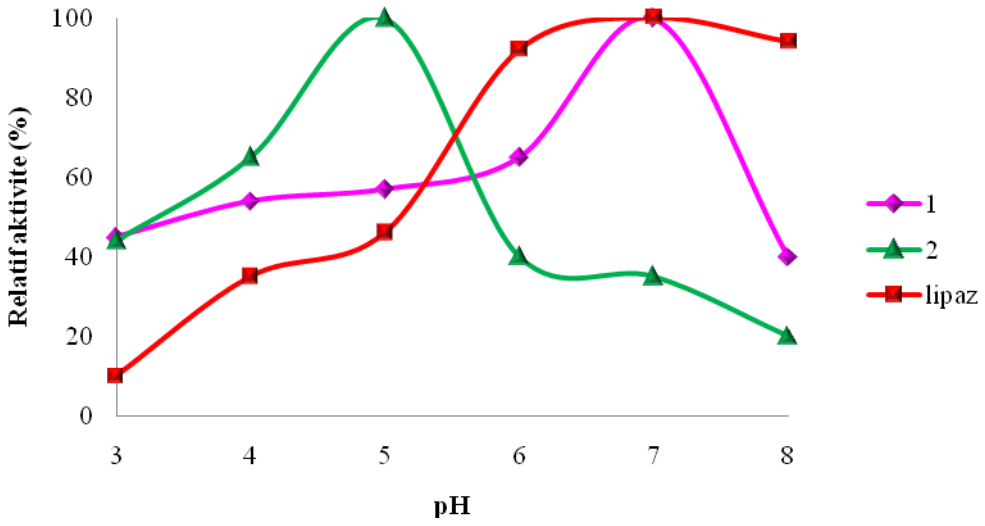
	Tutuklanan Protein (mg/g)	Tutuklanan Protein yüzdesi (%)	Lipaz Aktivitesi (U/g destek maddesi)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Aktivite Verimi (%)
Lipaz[a]	13,0	32,0	13,0	1,0	100,0[b]
Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-E_{tut}(MTMS) **(3)**	21,7	52,0	58,5	2,7	81,3
Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(MTMS) **(4)**	30,6	72,9	159,5	5,2	157

[a] destek maddeleri kullanmadan tutuklanmış serbest lipaz
[b] serbest lipaz için aktivite verimi % 100 olarak alındı.

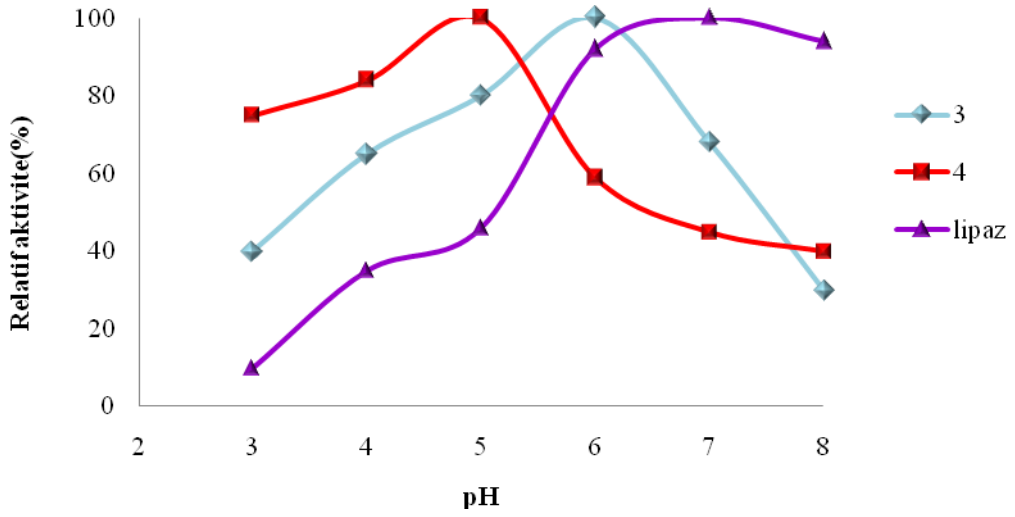
Çizelge 4.1 ve 4.2'de tutuklanmış lipazların aktiviteleri görülmektedir. Tutuklanmış lipazlar arasında en iyi aktive verimi Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES)' de gözlendi. Diğer tutuklanmış lipazlara kıyasla daha çok etkili olduğu bulundu. Sırasıyla aktiviteleri Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-E_{tut}(OTES), Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES)' nin 76,6 ve 434,6 U/g olarak bulunmuştur. Ayrıca bu immobilize lipazlar arasında spesifik aktivitesi en yüksek Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES) olduğu gözlendi.

4.2.1.1. Aktiviteye pH ve sıcaklığın etkisi

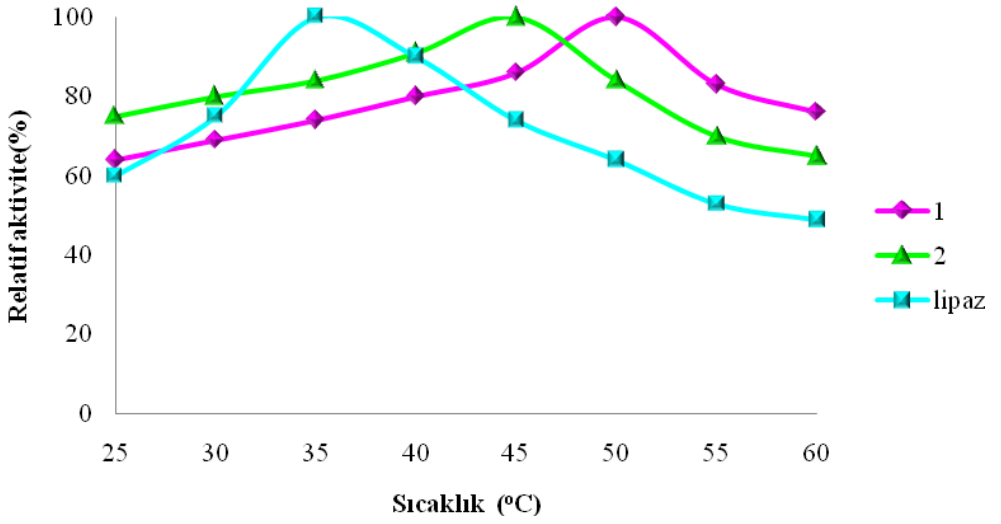
p-NPP'ın hidrolizinde serbest ve tutuklanmış lipazların katalitik aktivitesi farklı pH'larda (3.0-8.0) incelendi. Şekil 4.16 ve 4.17'de görüldüğü gibi serbest lipazın optimum pH'ı 7.0 iken, OTES ile tutuklanmış lipazların (1, 2) optimum pH'ı sırasıyla 7.0 ve 5.0 iken MTMS ile tutuklanmış lipazların(3, 4) optimum pH'sırasıyla 6.0, 5.0'tir. İmmobilize lipazlar serbest lipazdan daha iyi pH kararlılığı gösterdi. pH kayması başlıca enzim ve destek maddesinin etkileşimine ve immobilizasyona bağlıdır. Isıya dayanıklı *Humicola Lanuginosa* lipazı Ca-alginat ve prepolimer reçine olan ENTP 4000 üzerine hapsetme yöntemi ile ve Amberlite XAD-7 reçinesi üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest ve her immobilize lipaz için optimum pH 7 bulunmuştur (Omar ve ark., 1988; Karaca, 2006). pH' ın değişmesi lipazın konformasyonu, kullanılan bileşiklerin yapısı, immobilizasyon metodu ve lipaz yüzeyindeki yük yoğunluğu ile ilgilidir. Optimum pH' da görülen bir asidik kayma immobilize enzimin polikatyonik bir yapıya geçtiğini göstermektedir (Faber ve ark., 1993; Yılmaz ve ark., 2011).



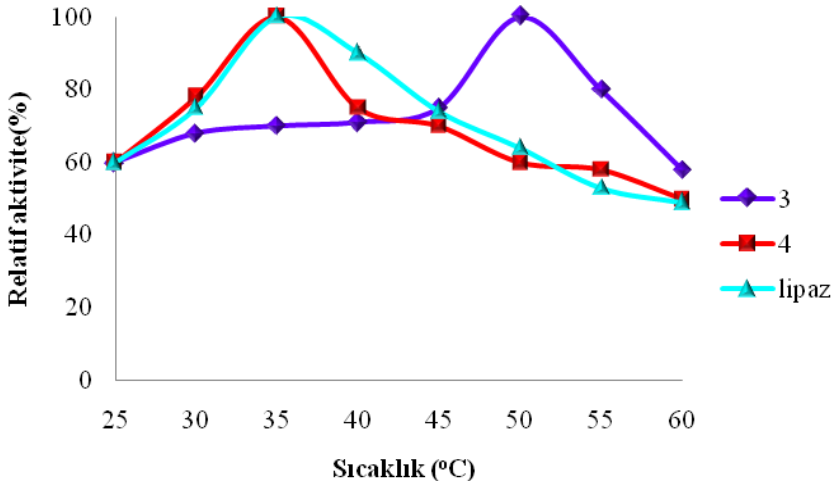
Şekil 4.16. Lipaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi 1: Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-E_{tut}(OTES), 2: Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES),



Şekil 4.17. Lipaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi 3:Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-E_{tut}(MTMS), 4: Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(MTMS))



Şekil 4.18. Lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi (1: Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-E_{tut}(OTES), 2: Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES)



Şekil 4.19. Lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi (3:Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-E_{tut}(MTMS), 4: Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(MTMS)

Serbest ve immobilize edilen lipazların aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile çeşitli sıcaklıklarda gerçekleştirilen reaksiyonlara ait relatif aktivite değerlerinin sıcaklık ile değişimi şekil 4.18 ve 4.19' da verildi. Şekilden görüldüğü gibi serbest lipazın optimum sıcaklığının 35°C, sırasıyla OTES ile tutuklanmış lipazların (1, 2) optimum sıcaklığı 50°C ve 45°C olduğu görülmektedir. MTMS ile tutuklanmış lipazların optimum sıcaklığı ise sırasıyla (3, 4) 50°C, 35°C olduğu görülmektedir. Demir destekli immobilize lipazlar için immobilizasyon yöntemi, optimum sıcaklık değerlerini daha yüksek değerlere doğru çekilmesini sağladı.

Moreno ve ark., (1995) alüminaya tutuklanmış *Candida cylindrecea* lipazı ile 2-fenil propiyonik asit etil ester hidrolizi için optimum sıcaklık değerini 55 ^oC olarak belirlemişlerdir (Bakkal, 2006).

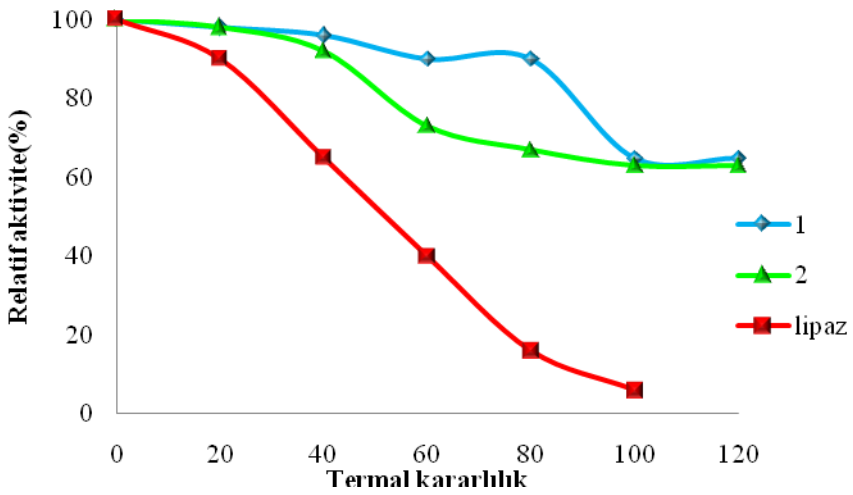
Lin ve ark., (2003) çalışmalarında polipropilen toz üzerine tutuklanmış lipaz MY (*Candida rugosa*) ile (R,S)-naproksen 2,2,2 trifloro etil esterin hidrolizini 45 ^oC' de gerçekleştirmişlerdir. Tutuklama matrisi ve substrata bağlı olarak tutuklanmış enzimin optimum sıcaklık değerinin değiştiği görülmektedir. Bu çalışmada, (R,S)-Naproksen metil esterin Amberlite XAD-7'ye tutuklanmış CRL ile enantiyoseçimli hidrolizinde optimum tepkime sıcaklığı 45 ^oC olarak belirlenmiştir (Bakkal, 2006).

Bilindiği gibi sıcaklığın artması ile moleküller arası çarpışma artmakta ve buna bağlı olarak da genellikle tepkimenin hızı artmaktadır. Enzimler protein yapısında oldukları için optimum sıcaklığın üzerinde denatürasyona uğrarlar. Sıcaklığın artması ile enzimin aktifliği azalır. Eudragit E 30D özel isimli akrilik-metakrilik polimer yapı

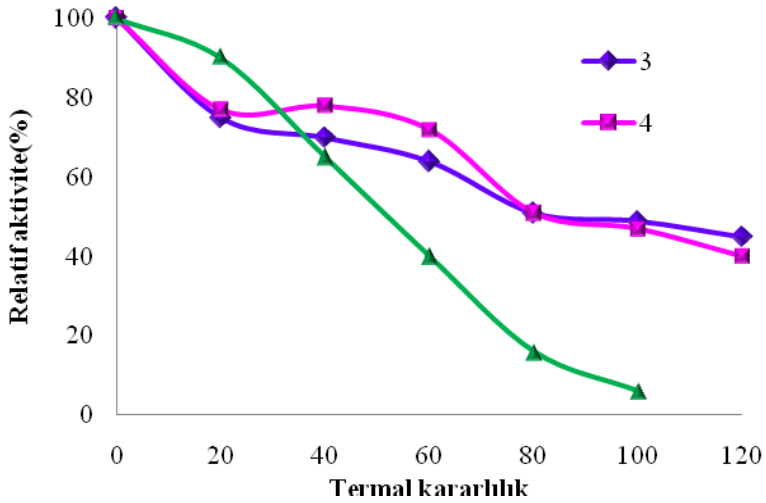
üzerine hapsetme yöntemi ile pankreatik lipaz immobilize edildiğinde immobilizasyon sonucunda enzimin ısısal kararlılığının arttığı ve optimum sıcaklığının değişmediği görülmüştür (Telefoncu ve ark., 1990). Lipaz enzimi PVC, kitosan, kitin, agaroz, sefaroz, ve trisakril üzerine immobilize edildiğinde serbest lipaz için optimum sıcaklık 35°C iken immobilize lipaz için optimum sıcaklık 45°C bulunmuştur (Shaw ve ark., 1990). Isıya dayanıklı *Humicola Lanuginosa* lipazı Ca-alginat ve prepolimer reçine olan ENTP 4000 üzerine hapsetme yöntemi ile ve Amberlite XAD-7 reçinesi üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest ve Ca-alginatla immobilize edilen lipaz için optimum sıcaklık 50°C, ENTP 4000 ile immobilize edilen lipaz ile Amberlite XAD-7 üzerine immobilize edilen lipaz için optimum sıcaklık 60°C bulunmuştur (Omar ve ark., 1988; Karaca, 2006).

4.2.1.2. Termal kararlılık

Serbest ve tutuklanmış lipazlar 60 °C'de 2 saat inkübe edildi ve enzim aktivitesi çeşitli zaman aralıklarında ölçüldü.



Şekil 4.20. İmmobilize lipazların termal kararlılığı (1: Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-E_{tut}(OTES), 2: Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES)



Şekil 4.21. İmmobilize lipazların termal kararlılığı 3: Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-E_{tut}(MTMS), 4: Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(MTMS))

Şekil 4.20 ve 4.21' de ise serbest ve immobilize lipazın aktivitesinin 60 °C'de zamanla değişim grafiğidir. Serbest lipaz 60 °C' de 100 dakikanın sonunda başlangıç aktivitesinin tümünü yitirirken, OTES ile immobilize olmuş lipazlar (1, 2) sırasıyla 120 dakika sonunda hala başlangıç aktivitelerinin % 65, % 63'ni korurken, MTMS ile immobilize olmuş lipazlar (3, 4) % 45 ve %40' nı koruyabildi.

Sol-jel tutuklama yöntemi ile immobilizasyon sonucu enzim, kararlılığını daha fazla korumuştur. İmmobilizasyon sürecinde enzim ile destek materyali arasındaki etkileşimlerin enzimin tersiyer yapısını koruduğu sanılmaktadır (Karaca, 2006).

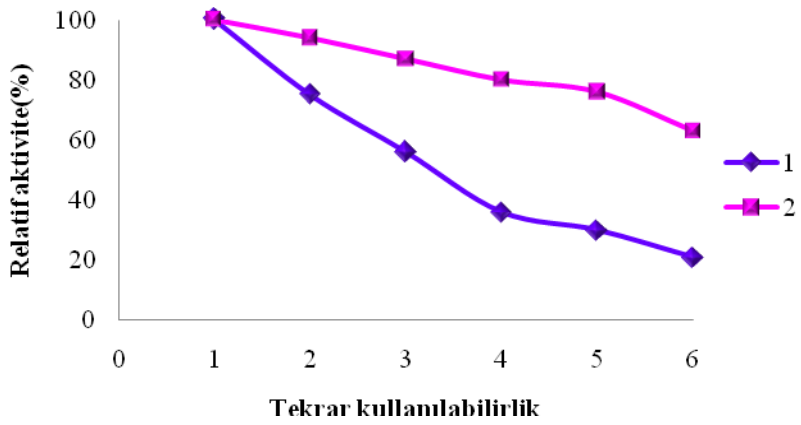
Candida rugosa lipazı kitosan üzerine immobilize edildiğinde serbest lipazın 30 °C' nin üstünde yüksek aktiflik gösterdiği, immobilize lipazın ise 40 °C' nin üstünde yüksek aktiflik gösterdiği bildirilmiştir. 60 °C' de serbest lipazın % 12 immobilize lipazın ise % 23 aktifliğini koruduğu gözlenmiştir (Hung ve ark., 2003; Karaca, 2006).

4.2.1.3. Tekrar kullanılabilirlik

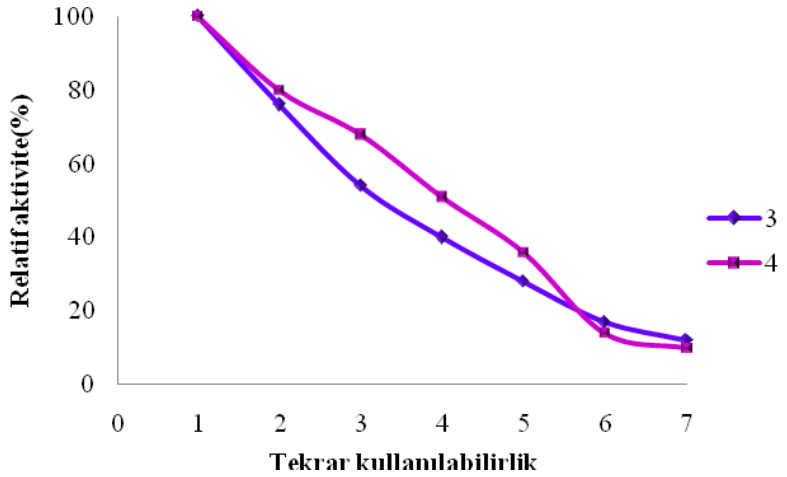
İmmobilize edilen lipazın tekrar kullanım sayısını ölçmek amacıyla kısım 3.4.1' de belirtilen metod kullanılarak aktiflikler tayin edildi. Şekil 4.22 ve 4.23'de immobilize lipazların tekrar kullanılabilirliği görülmektedir. 6. kullanım sonunda sırasıyla immobilize lipazlar (1, 2, 3, 4) % 21, % 63, %17 ve % 14' dür. İmmobilize lipazların tekrar kullanım sayısını ölçmek amacıyla aktiflikleri tayin edildi. Serbest enzime göre immobilize enzim birçok kez ve uzun süre kullanılabilir. İmmobilize enzimin bu

özelliği endüstriyel uygulamalarda çok önemlidir. Serbest enzime göre immobilize enzim birçok kez ve uzun süre kullanılabilir. İmmobilize enzimin bu özelliği endüstriyel uygulamalarda çok önemlidir. Çünkü üretim maliyeti sürekli kullanıma bağlı olarak düşer. Sürekli kullanım ile enzim aktifliğinde bir değişim gözlenmiştir (Karaca, 2006).

İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği ekonomik olarak çok önemlidir ve karalılıktaki bir artış immobilize enzimi serbest enzime daha cazip kılmaktadır. Sol-jel tekniği kullanılarak immobilize lipazın uzun süreli reaksiyon kararlılığı gerektiren endüstriyel uygulamalar için kullanılabileceği görülmektedir. İmmobilize enzimlerin aktivitesi tekrar kullanım sayısında artış ile azalmıştır.



Şekil 4.22. İmmobilize lipazların tekrar kullanılabilirliği (1: Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-E_{tut}(OTES), 2: Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES)

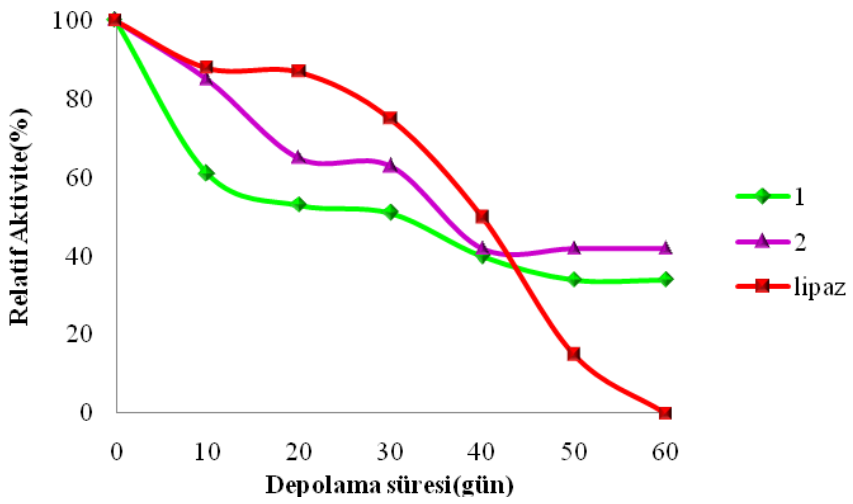


Şekil 4.23. İmmobilize lipazların tekrar kullanılabilirliği (3: Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-E_{tut}(MTMS), 4: Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(MTMS)

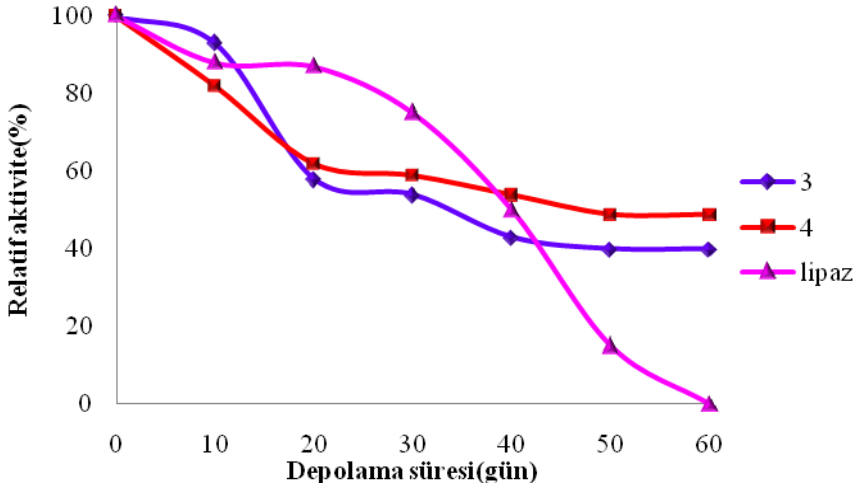
4.2.1.4. Depolama kararlılığı

Şekil 4.24 ve 4.25'de görüldüğü üzere immobilize enzimlerin depo kararlılığı serbest enzime oranla oldukça iyidir. 60 günlük bir depolama süresi (+4 °C) sonunda immobilize enzim (1) aktivitesini % 34, immobilize enzim (2) % 42, immobilize enzim (3) % 40 ve immobilize enzim (4) ise % 49 aktivitelerini oranından korurken, serbest enzim aktivitesini 14 günde tamamen kaybettiği gözlendi. Serbest enzimle karsılaştırıldığında immobilizasyonun, enzimin kararlılığını daha uzun bir süre korumasını sağladığı gözlendi.

Enzimler çözelti içinde saklandıkları zaman yapısal değişime uğrarlar. Buna baglı olarak da aktivitelerinde azalma veya tümüyle yok olma gözlenebilir. İmmobilizasyon işlemi ile enzim aktifliği iyileştirilebilir. Şekil 4.24 ve 4.25'de görüldüğü gibi immobilize enzimin aktifliği serbest enzimin aktifliğine göre daha fazla korunmuştur. *Candida rugosa* lipazı kitosan üzerine hidroksil gruplarının aktivasyonu ile immobilize edildiğinde 30 günün sonunda enzimin %54 aktifliğini koruduğu görülmüştür (Chiou ve ark., 2004; Karaca, 2006).



Şekil 4.24. Serbest ve immobilize lipazların depolama kararlılığı 1: Fe_3O_4-APTES- Spo-HMDI-E_{tut}(OTES), 2: Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES),



Şekil 4.25. Serbest ve immobilize lipazların depolama kararlılığı (3:Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-E_{tut}(MTMS), 4: Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(MTMS)

4.3. İmmobilize Lipazların Enantiyoseçimli Tepkimelerde Kullanılması

HPLC'de elde edilen sonuçlara göre yapılan hesaplamalar literatürdeki (Chen ve ark., 1982) formüller kullanılarak yapılmıştır. Enantiyomerik fazlalık (ee), dönüşüm oranı (c veya x), enantiyoseçimlilik (E) gibi değerler aşağıdaki bağıntılar kullanılarak bulunmaktadır.

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]}$$

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \qquad ee_s = \frac{C_R - C_S}{C_R + C_S} \qquad ee_p = \frac{C_S - C_R}{C_S + C_R}$$

ee_s : Kalan substratın enantiyomerik fazlalığı

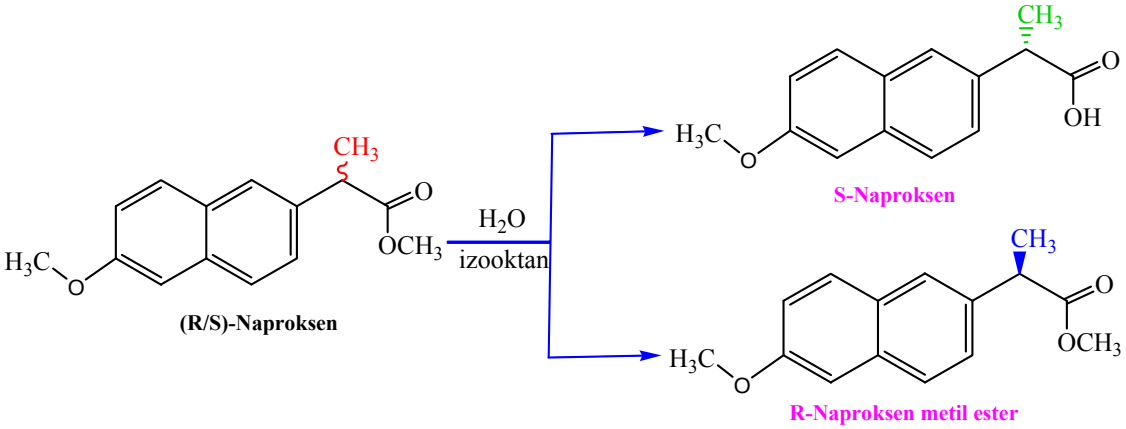
ee_p : Oluşan ürünün enantiyomerik fazlalığı

C_R : R enantiyomerinin konsantrasyonu

C_S: S enantiyomerinin konsantrasyonu

4.3.1. Manyetik immobilize lipazlar ile (R,S)-Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi

Bu çalışmada *Candida rugosa* lipaz prosedüre göre manyetik nanopartikül destekli sol-jel tutuklama yapılarak (R,S)-Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidroliz reaksiyonunda kullanıldı. Bunun için sol-jel tutuklama prosedürüne göre amino ve epoksi grubu ile fonksiyonlandırılmış manyetik nanopartiküller (1: Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI- E_{tut}(OTES), 2: Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES), 3:Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-E_{tut}(MTMS), 4: Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(MTMS))kullanıldı.



Şekil 4.26. *(R,S)*-Naproksenin metil esterin enantiyoseçimli hidrolizi

Çizelge 4.3'de immobilize lipazlarla katalizlenmiş rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizi sonuçları görülmektedir. Dönüşüm (c), enantiyomerik aşırılık (ee) ve enantiyomerik oran (E) (R,S)-Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde tutuklanmış lipazlar ile gösterildi. İmmobilize lipazlar ile rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizi sulu tampon çözelti/izooktan (ikili faz) reaksiyon sisteminde çalışıldı (Şekil 4.26).

Çizelge 4.3. Sol-jel tutuklama metodu ile immobilize edilen manyetik bazlı polimerler ile (R,S)-Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi

	***C* (%)**	***ee*$_s$ (%)**	***ee*$_p$ (%)**	***E***
Lipaz$_{tut}$[a]	37.9	60	>98	166.0
Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI- Etut(OTES) **(1)**	30	42	>98	150,23
Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES) **(2)**	24,62	32	>98	133,66

[a] manyetik kullanmadan tutuklanmış lipaz OTES kullanarak

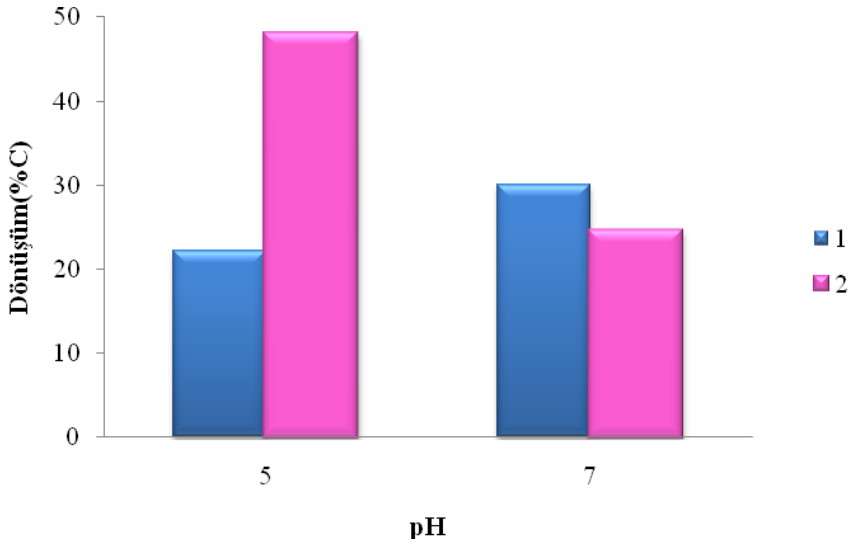
Çizelge 4.4. Sol-jel tutuklama metodu ile immobilize edilen manyetik bazlı polimerler ile (R,S)-Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi

	***C*(%)**	***ee*$_s$ (%)**	***ee*$_p$ (%)**	***E***
Lipaz$_{tut}$[a]	29	40	>98	142
Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-Etut(MTMS) **(3)**	14,28	16,32	>98	114,59
Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(MTMS) **(4)**	25,19	33	>98	138,14

[a] manyetik kullanmadan tutuklanmış lipaz MTMS kullanarak

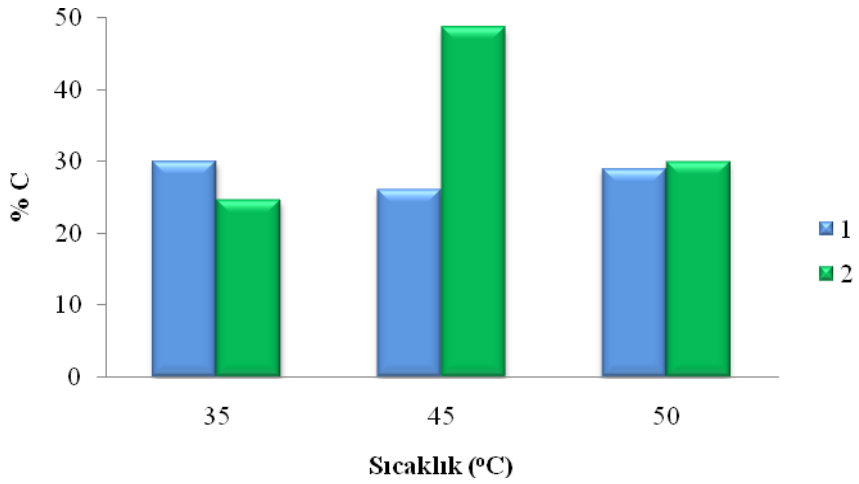
Çizelge 4.3 ve 4.4' e baktığımızda immobilize lipazlar ile rasemik Naproksenin, 24 saat süre sonunda düşük verimde ürüne ve düşük enantiyoseçimlilik gösterdiği gözlendi. Reaksiyona girmeyen Naproksen metilat (R)-esteri ve oluşan asidin enantiyofazlalığı (ee_p) % 98 olarak bulundu. Elde edilen sonuçlar literatürdeki sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Buna örnek olarak Tsai ve ark., (2006) yaptıkları bir çalışmada *Candida rugosa*' dan elde edilen MY lipazı kullanmışlar ve bir model sistem olarak su ile doymuş izooktanda (R,S)-Naproksen'in hidrolizini katalizlemişlerdir. E değerini 510 olarak bulmuşlar (Yılmaz, 2010). Sol-jel metoduna göre immobilize edilen Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI- Etut(OTES); Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES); Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI- Etut(MTMS); Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(MTMS) destek maddeleri optimum şartlarda düşük enantiyoseçimlilik ve düşük dönüşüm gösterdi (Çizelge 4.3 ve 4.4).

Tutuklanmış lipazların enantiyoseçimliliğine etkisi farklı pH'larda (5.0 ve 7.0) inkübe edilerek belirlendi. Çünkü kiral rezolüsyonda bir katalizör olarak enzim kullanıldığında, bir enzimin konformasyonu iyonlaşmaya bağlı olduğu için pH'ın değişmesi kiral seçiciliği etkiler (Pereira ve ark., 2001).



Şekil 4.27. Rasemik naproksen metil esterin hidrolizinde dönüşüme karşı pH'ın etkisi (1: Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-E_{tut}(OTES), 2: Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES)

Tutuklanmış lipazların enantiyoseçiciliğine pH'ın etkisi farklı pH'larda (5.0 ve 7.0) farklı destek maddeleri varlığında tutuklanmış lipazları inkübe ederek belirlendi. Optimum pH değerleri yüzde dönüşüm (c) karşı çizilen pH grafiğinden incelendi (Şekil 4.27). Fe_3O_4-APTES- Spo-HMDI-E_{tut}(OTES)' nin optimum pH 'ı 7.0 iken, Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES)'nin optimum pH' ı 5.0 olarak gözlendi.



Şekil 4.28. Rasemik naproksen metil esterin hidrolizinde dönüşüme karşı sıcaklığın etkisi

Çizelge 4.3 ve 4.4'de immobilize enzimlerin pH=7' de ve 24 saatte % ee_p, % ee_s % c ve E değerleri verildi. Fe_3O_4-APTES- Spo-HMDI-E_{tut}(OTES), Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-

NH_2-E_{tut}(OTES), 24 saat sonunda 35 °C' de sırasıyla % 30 ve % 24,62 dönüşüme ulaşırken, Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-E_{tut}(MTMS) ve Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(MTMS) aynı zaman sonunda, 35 °C' de % 14,28 ve % 25,19 dönüşüme ulaştığı görüldü. Yapılan optimum sıcaklık çalışmalarında Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES) 'nin optimum sıcaklığı 45 ^oC, Fe_3O_4-APTES- Spo-HMDI-E_{tut}(OTES)' nin ise optimum sıcaklığı 50 ^oC olarak tespit edildi (Şekil 4.28).

4.3.2. Manyetik immobilize lipazlar ile (*R*/*S*)- 2-Fenoksi Propiyonik Asit Metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi

Çizelge 4.5. Sol-jel tutuklama metodu ile immobilize edilen manyetik bazlı polimerler ile (*R*/*S*)- 2 fenoksi propiyonik asit Metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi

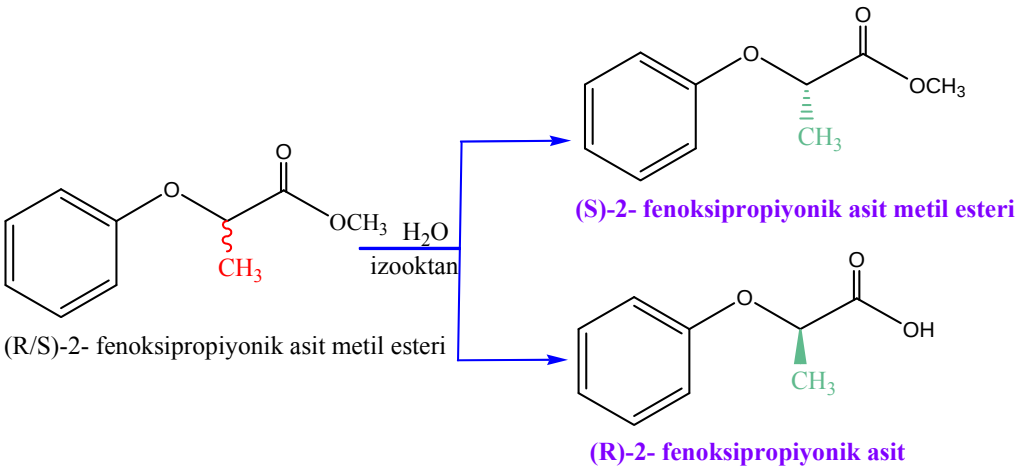
	***c* (%)**	***ee*$_s$ (%)**	***ee*$_p$ (%)**	***E***
$Lipaz_{tut}$[a]	42	71	>98	217,39
Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-Etut(OTES) **(1)**	44,32	78	>98	235,95
Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES) **(2)**	42,01	71	>98	212,29

[a] manyetik kullanmadan tutuklanmış lipaz OTES

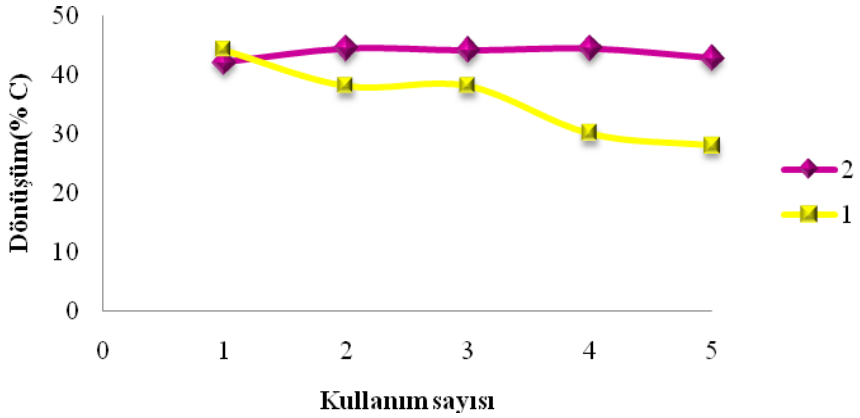
Çizelge 4.6. Sol-jel tutuklama metodu ile immobilize edilen manyetik bazlı polimerler ile (*R*/*S*)- 2 fenoksi propiyonik asit metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi

	***c* (%)**	***ee*$_s$ (%)**	***ee*$_p$ (%)**	***E***
$Lipaz_{tut}$[a]	25,19	33	>98	138,12
Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-Etut(MTMS) **(3)**	26,86	36	>98	143,4
Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(MTMS) **(4)**	32,9	48	>98	204,1

[a] manyetik kullanmadan tutuklanmış lipaz MTMS

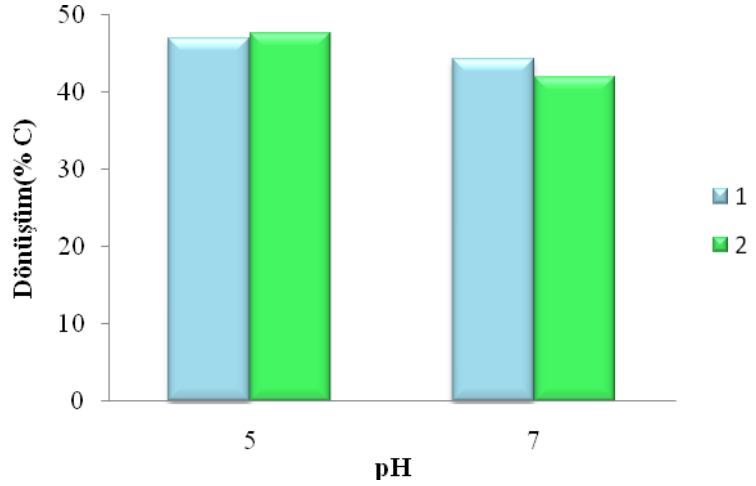


Şekil 4.29. (*R*/*S*)- 2-fenoksi propiyonik asit metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi



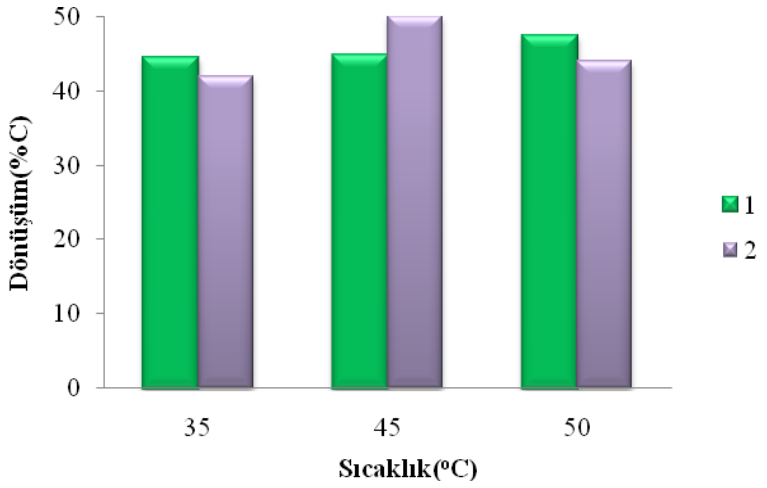
Şekil 4.30. Rasemik 2-fenoksi propiyonik asit metil esterin hidrolizinde dönüşüme karşı tekrar kullanılabilirliğin etkisi

İmmobilize lipazların tekrar kullanılabilirliği (R,S)-2-fenoksipropiyonikasit metil esterinin hidroliz reaksiyonu ile HPLC tekniğine göre belirlendi. Şekil 4.30'den görüldüğü gibi sırasıyla Fe_3O_4-APTES- Spo-HMDI-E_{tut}(OTES) beşinci kullanımdan sonra dönüşüm oranı % 38 iken, Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES)' in beşinci kullanımdan sonra dönüşüm oranının % 44' e düştüğü gözlendi.



Şekil 4.31. Rasemik 2-fenoksi propiyonik asit metil esterin hidrolizinde dönüşüme karşı pH' ın etkisi

Tutuklanmış lipazların enantiyoseçiciliğine pH'ın etkisi farklı pH'larda (5.0 ve 7.0) farklı destek maddeleri varlığında tutuklanmış lipazları inkübe ederek belirlendi. Optimum pH değerleri yüzde dönüşüm (c) karşı çizilen pH grafiğinden incelendi (Şekil 4.31). Fe_3O_4-APTES- Spo-HMDI-E_{tut}(OTES)' nin optimum pH 'ı 7.0 iken, Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES)'nin optimum pH' ı 5.0 olarak gözlendi.



Şekil 4.32. Rasemik 2-fenoksi propiyonik asit metil esterin hidrolizinde dönüşüme karşı sıcaklığın etkisi

Çizelge 4.5 ve 4.6'da immobilize enzimlerin pH=7' de ve 1 saatte % ee_p, % ee_s % c ve E değerleri verildi. Fe_3O_4-APTES- Spo-HMDI-E_{tut}(OTES), Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES), 1 saat sonunda 35 °C' de sırasıyla % 78 ve % 71 dönüşüme ulaşırken, Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-E_{tut}(MTMS) ve Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(MTMS) aynı zaman sonunda, 35 °C' de pH=7' de % 36 ve % 48 dönüşüme ulaştığı görüldü. Yapılan

optimum sıcaklık çalışmalarında Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES) 'nin optimum sıcaklığı 45 ^oC, Fe_3O_4-APTES- Spo-HMDI-E_{tut}(OTES)' nin ise optimum sıcaklığı 50 ^oC olarak tespit edildi (Şekil 4.32).

Bu çalışmalara ek olarak ticari olarak satılan immobead-150 immobilize edilmiş CRL lipazının rasemik 2-fenoksi propiyonik asit metil esterinin hidrolizinde farklı pH' larda (5.0 ve 7.0) kullanıldığında 35 °C' de pH=5' de % 21 ve pH=7' de % 24 dönüşüm gösterdiği gözlendi.

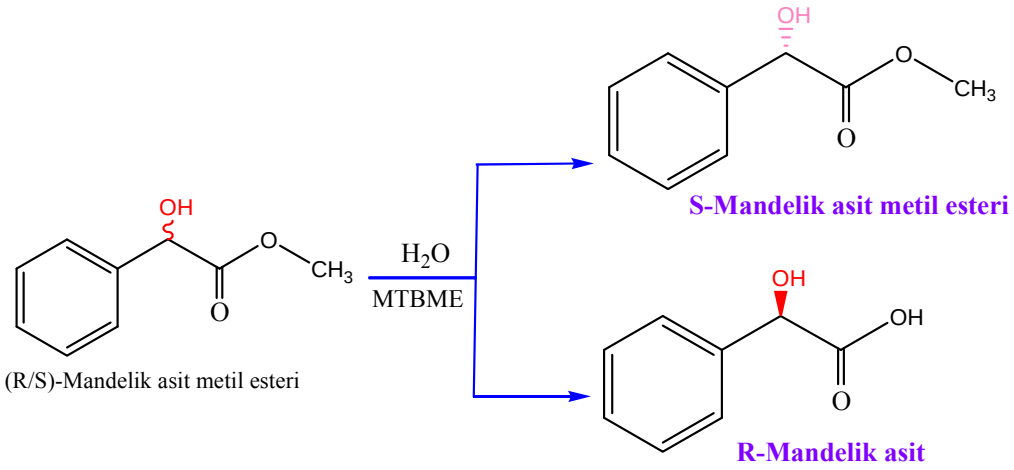
4.3.3. Manyetik immobilize lipazlar ile (R/S)-Mandelik Asit Metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi

Çizelge 4.7' de immobilize enzimlerin pH=7' de ve 24 saatte % ee_p, % ee_s % c ve E değerleri verildi. Fe_3O_4-APTES- Spo-HMDI-E_{tut}(OTES), Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES), 24 saat sonunda 35 °C' de sırasıyla % 15,3 ve % 25 dönüşüme ulaştığı görüldü. Böyle sonuçlar elde edildiği için Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-E_{tut}(MTMS) ve Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(MTMS) destek maddeleri enantiyoseçimli hidroliz tepkimesinde kullanılmadı. Buradan anlaşılıyor ki substrat değiştikçe enzimin enantiyoseçimliliğide değişmektedir.

Çizelge 4.7. Sol-jel tutuklama metodu ile immobilize edilen manyetik bazlı polimerler ile (R/S)- Mandelik Asit metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi

	***c* (%)**	***ee*$_s$ (%)**	***ee*$_p$ (%)**	***E***
Lipaz[a]	24,62	32	>98	133,66
Fe_3O_4-APTES-Spo-HMDI-Etut(OTES) **(1)**	13,5	15,3	>98	115,22
Fe_3O_4-EPPTMS-Spo-NH_2-E_{tut}(OTES) **(2)**	20,33	25	>98	125,61

[a] manyetik kullanmadan tutuklanmış lipaz OTES



Şekil 4.33. (R/S)-Mandelik asit metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

- Bu çalışmada amino ve epoksi uçlu manyetik nanopartiküllerin sentezi gerçekleştirildi.
- Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin karakterizasyonu yapıldı.
- Sol-jel tekniğine göre hazırlanan destek maddeleri *Candida rugosa* lipazına immobilize edildi.
- İmmobilize lipazların optimum şartları belirlendi ve kararlılık testleri deneyleri yapıldı. Bu çalışmalarda sol-jel tekniğinde kullanılan OTES ve MTMS kullanarak enzim aktivitesine alkil etkisi araştırıldı.
- Son olarakta immobilize lipazlar bir anti-inflammator olan *S*-Naproksenin oluşumunda, R-2-fenoksipropiyonik asit eldesinde ve R-metil mandelik asit oluşumunda kullanıldı.
- S-naproksen ve R-2-fenoksipropiyonik asit için yüksek anantiyoseçimlilik ve dönüşüm elde edilirken, R-metil mandelik asit için aynı sonuçlar elde edilmemiştir. Bu bize immobilize enzimlerin enantiyoseçimlilik ve dönüşümde substrat seçimli olduğunu göstermektedir. Bu sebeble R-metil mandelik asit için farklı lipazlarla çalışılması önerilebilir.

KAYNAKLAR

Abudiab, T. and Beitle, R. R., Jr., 1998, Preparation of magnetic immobilized metal affinity separation media and its use in the isolation of proteins, *Journal Chromatography A.,*795(2), 211–217.

Aksoy, C., 2003, Lipaz ve üreaz enzimlerinin çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1-68.

Aktsipetrov, O.A., 2002, Nonlinear magneto-optics in magnetic nanoparticles, *Colloıds And Surfaces A: Physıcochemıcal And Engıneerıng Aspects*, 202, 165–173.

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.

Arruebo M., Rodrigo FP, Ibarra MR, Santamaria J., 2007, Magnetic nanoparticles for drug delivery, *Nanotoday*, 2(3);22–32.

Andrade, J.D., and Hlady, V., 1986, Protein adsorption and materials biocompatibility: A tutorial review and suggested hypotheses, *Advances in Polymer Science*, 79,1-63.

Avnir D., Braun O. S. and Ottolenghi M., 1994, Enzymes and other proteins entrapped in sol-gel materials, *Chemistry of Materials*, 6, 1605-1614.

Avnir D., 1995, Organic chemistry within ceramic matrices: doped sol-gel materials, *Accounts of Chemical Research,* 28, 328-334.

Atkin S.L., Beckett S., Mackenzie G., USA patent 20050002963 (2005).

Atkin, S.L., Barrier, S., Stephen, T.B., Brown, T., Mackenzıe, G. and Madden, L., Encapsulation Of Proteins And Oligonucleotides Into Sporopollenin Exines And Their Potential Application To Drug Delivery.

Bai, S., Guo, Z., Liu, W., Sun, Y., 2006, Resolution of (±)-menthol by immobilized Candida rugosa lipase on superparamagnetic nanoparticles, *Food Chemistry*, 96, 1-7.

Bailey, J.E., and Ollis, D.F. 1986, Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd Edition. McGraw Hill, Singapure.

Bakkal, M., 2006, Tutuklanmış *Candida Rugosa* Lipazı İle Rasemik Naproksen Metil Esterden (S)-Naproksen Üretiminde Proses Parametrelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-139.

Bayramoğlu, G., Kaya, B., Arıca, M.Y., 2004, Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase onto Spacer –arm Attached Poly (GMA-HEMA-EGDMA) Microspheres, *Food Chemistry,* 1-8.

Benjamin, S. and Braun, S, Rappoport S, Zusman R, Avnir D, Ottolenghi M., 1990, Biochemically active sol–gel glasses; the trapping of enzymes, *Materials Letters,* 10,1–5.

Benjamin, S. and Pandey, A. 1998. *Candida rugosa* lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology. Yeast, 14; 1069–1087.

Berensmeier, S., 2006, Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73; 495-504.

Betancor, L., Lopez-Gallego, F., Hidalgo, A., Fuentes, M., Podrasky, O., Kuncova, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R., 2005, Advantages of the pre-immobilization of enzymes on porous supports for their entrapment in sol-gels*, Biomacromolecules*, 6 (2); 1027-1030.

Bezbradica, D., Mijin, D., Siler-Marinkovic, S., Knezevic, Z., 2006, The *Candida rugosa* lipase catalyzed synthesis of amyl isobutyrate in organic solvent and solvent-free system: A kinetic study, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38;11–16.

Bornscheuer, U.T., 2003, Immobilizing enzymes: how to create more suitable biocatalysts, *Angewandte Chemie International Edition*, 42, 3336–3337.

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

Braun S., Rappoport S., Zussman R., Avnir D. and Ottolenghi M., 1990, Sol-gel based enzyme immobilization, *Materials Letters*, 10, 42-49.

Braun, S, Rappoport, S, Zusman, R, Avnir, D, Ottolenghi, M., 1990, Biochemically active sol–gel glasses; the trapping of enzymes, *Materials Letters*,10,1–5.

Brigger, I., Dubernet, C., 2002, Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Advanced Drug Delivery Reviews*., 54, 631–651.

Brinker, C. J. and Scherer, G. W., 1990, Sol-Gel Science: *The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press, Boston.

Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., et. al., 1991, A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex, *Nature* (London), 351, 491–494.

Brooks, J., Shaw, G., 1968. Identity of sporopollenin with older kerogen and new evidence for the possible biological source of chemicals in sedimentary rocks, *Nature* , 220, 678–679.

Bruice T.C., Bruice P.Y., Covalent intermediates and enzyme proficiency, 2005, *Journal of the American Chemical Society*, 127 (36), 12478-12479.

Campàs M. and Marty J.L., 2006, Encapsulation of Enzymes Using Polymers and Sol-Gel Techniques, Humana Press Inc., Totowa, NJ.,92-97.

Candida rugosa şekli: http://www.au-kbc.org/beta/bioproj2/index.html [Ziyaret tarihi: 20.05.2011].

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.

Cao L.Q., 2005, Immobilized enzymes: science or art, *Current Opinion in Chemical Biology*, 9, 217–226.

Cao, L., 2005, Carrier-bound Immobilized Enzymes Principles, Applications and Design, *Strauss GmbH, Morlenbach,Germany* ,373-378.

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.

Chang, S.F., Chang, S.W., Yen, Y.H., Shieh, C.J., 2007, Optimum immobilization of Candida rugosa lipase on Celite by RSM, *Applied Clay Science,* 37,67–73.

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(c-glutamic acid) by RSM, *Bioresource Technology*, 99; 2800-2805.

Chaubey, A., Parshad, R., Taneja, S.C., Qazi, G.N., 2009, Arthrobacter sp. lipase immobilization on magnetic sol–gel composite supports for enantioselectivity improvement, *Process Biochemistry*, 44,154–160.

Chen, C.S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G., Sih, C.J. 1982, Quantitative Analyses of Biochemical Kinetic Resolutions of Enantiomers, *Journal of the American Chemical Society***,** 104, 7294–7299.

Chen, D.H., Liao, M.H., 2002, Preparation and characterization of YADH-bound magnetic nanoparticles, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*,16, 283-291.

Chiou, S.H., Wu, W.T., 2004, Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase on Chitosan with Activation of the Hydroxyl Groups, *Biomaterials,* 25, 197-204.

Cernia E, Deflini M, Cocco ED, Palloci C, Soro S., 2002, Investigation of lipase catalysed hydrolysis of naproxen methyl ester: use NMR spectrescopy methods to study substrate–enzyme interaction. *Bioorg Chem*, 30, 276–84.

Colton I.J., Ahmed S.N., Kazlauskas R.J., 1995, A 2-propanol treatment increases the enantioselectivity of Candida rugosa lipase toward esters of chiral carboxylic acids, *The Journal of Organic Chemistry*, 60, 212-217.

Cygler, M. and Schrag, J.D., 1999, Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1441, 205-214.

Cui, Y., Li, Y.,Yang, Y., Liu, X., Lei, L., Zhou, L., Pan, F., 2010, Facile synthesis of amino-silane modified superparamagnetic Fe_3O_4 nanoparticles and application for lipase immobilization, *Journal of Biotechnology*, 150, 171-174.

Curtis, A., Wilkinson, C., 2001, Nanotechniques and approaches in biotechnology, *Trends in Biotechnology*, 19, 97–101.

Dave, B., Soyez, H., Miller, J. M., Dunn, B., Valentine, J. S., and Zink, J. I., 1995, Synthesis of protein-doped sol-gel SiO2 thin films: evidence for rotational mobility of encapsulated cytochrome *c*, *Chemistry of Materials*, 7, 1431–1434.

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.

Dickey, F.H., 1955, Specific adsorption, *The Journal of Physical Chemistry*, 59; 695–707.

Dominguez, E., Mercado, J.A., Quesada, M.A., Heredia, A., 1999, Pollen sporopollenin: Degradation and structural elucidation, *Sexual Plant Reproduction*, 12 (3), 171-178.

Dyal, A., Loos, K., Noto, M., Chang, S.W., Spagnoli, C., Shafi, K.V.P.M., Ulman, A., Cowman, M., Gross, R.A., 2003, Activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on γ-Fe_2O_3 magnetic nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*,125, 1684–1685.

Edmiston, P. L., Wambolt, C. L., Smith, M. K., and Saavedra, S. S., 1994, Spectroscopic characterization of albumin and myoglobin entrapped in bulk sol-gel glasses, *Journal of Colloid and Interface Science*, 163, 395–406.

Faber, K., 2000, Biotransformations in Organic Chemistry, 4th Edition, Springer-Verlag, Berlin.

Faber, K., Ottolina, G., Riva, S., 1993. Selectivity-enhancement of hydrolase reactions, *Biocatalysis*, 8, 91–132.

Fukui, T., Kawamoto, T., Sonomoto, K., Tanaka, A., 1991, Construction of a non-support bioreactor: optical resolution of 2-(4-chlorophenoxy) propanoic acid in an organic solvent system, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, 563-567.

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.

Gardimalla, H.M.R., Mandal, D., Stevens, P.D., Yen, M., Gao, Y., 2005, Superparamagnetic nanoparticle-supported enzymatic resolution of racemic carboxylates, *Chemical Communications*, 35,4432–4434.

Gezer, E., 2009, Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu Ve Aromatik Esterlerin Sentezinde Kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antakya/Hatay, 1-67.

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.

Goldsteın, L., and Manecke, G., 1976, *Applied Biochemistry And Bioengineering*, Academic Press, New York, 123-125.

Gottfried, D. S., Kagan, A., Hoffman, B. M., and Friedman, J. M., 1999, Impeded rotation of a protein in a sol-gel matrix. *J. Phys. Chem. B,* 103, 2803–2807.

Göde, F. ve Pehlivan, E., 2007, Sorption of Cr(III) onto chelating b-DAEG–sporopollenin and CEP–sporopollenin, *Bioresource Technology*, 98, 904–911.

Guisan, J. M., 2006, Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells, Second Edition, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 92-100.

Gupta, A. K., Gupta, M, 2005, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, Biomaterials, 26, 3995–4021.

Güven, G., 2005, Eş boyutlu, katyonik, fonksiyonel grup içeren/içermeyen manyetik nanopartiküllerin sentezi, karakterizasyonu ve nükleik asit uygulamaları, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara,1-85.

Han Y., Lee S.S., Ying J.Y., 2006, Pressure-driven enzyme entrapment in siliceous mesocellular foam, *Chemistry of Materials*, 18 (3), 643-649.

Hartnett, A. M., Ingersoll, C. M., Baker, G. A., and Bright, F. V., 1999, Kinetics and thermodynamics of free flavin and the flavin-based redox active site within glucose oxidase dissolved in solution or sequestered within a sol-gel-derived glass, *Analytical Chemistry*, 71, 1215–1224.

Hench, L. L. and West, J. K., 1990, The sol-gel process, *Chemical Society,* 90, 33–79.

Hench, L. L. and West, J. K., (1990), The sol-del process, *Chemical Review*, 90, 33–72.

Horak, D., Babic, M., Mackova, H., Benes, M.J., 2007, Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations, *Journal of Separation Science*, 30, 1751–1772.

Hua Q., Dabin L., Chunxu, L., 2011, Ultrasonically-promoted synthesis of mandelic acid by phase transfer catalysis in an ionic liquid, *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 1035-1037.

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.

İşbakan, N., 2006, Lipaz Enzimi Biyokatalizörlüğünde Enantiyomerik Saflıkta 1-Fenil-1-Propanolün Transesterleşme Tepkimesiyle Kinetik Rezolüsyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-109.

Jacques, J., Collet A., Wilen, S.H., 1994, Enantiomers, Racemates, and Resolutions, Krieger, Florida,464.

Jaeger, K.E and Reetz, M. T., 1998, Microbial lipases form versatile tools for biotechology, *Trends in Biotechnology*, 16, 396-403.

James, J., Lakshmit, B.S and Raviprasad, V., 2003, Insıghts from molecular Dynamics into pH-dependent enantioselective hydrolysis of ibu profen esters by *Candida rugosa* lipase, *Protein Enginering*, 16, 1017-1024.

Janczarski, I., Mazur, A, Witkowski, K., Lubaszka, E., 1976, Activity of cholinesterase included on silica gel, *Acta Physiologica Polonica*, 27,301–306.

Jose, M.P., Rosa, L.S., Gloria, F.L., Roberto, F.L., Jose M. G., 2007, Glutaraldehyde modification of lipases adsorbed on aminated supports: A simple way to improve their behaviour as enantioselective biocatalyst, *Enzyme and Microbial Technology*, 40,704–707.

Kahraman, A.S., 2008, Non-Manyetik Ve Manyetik Lateks Partiküllerin Sentezi, Karakterizasyonu Ve Doku Mühendisliği Uygulamaları, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 1-97.

Kamori, M., Yamashita, Y. and Naoshima, Y., 2002, Enz yme immobilization utilizing a porous ceramics support for chiral synthesis, *Chirality*, 14, 558-561.

Karaca, N., 2006, Poli(N,N-Dimetilakrilamit-Ko-Akrilamit) ve Poli(N-İzopropilakrilamit-Ko-Akrilamit)/$_K$-Karragenan Polimerleri Kullanılarak Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006, 1-73.

Karaçoban Z., 2006, Asit Katkılı Polianilin Katalizörleri İle DL-Mandelik Asitin Esterleşme Reaksiyonları Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,1-45.

Kawaguchi, S., Ito, K., 2005, Dispersion Polymerization, *Advanced Polymer Science*, Springer, Heidelberg, 175, 299–328.

Kayaalp, S.O., 1992, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 6.Baskı, 2, 2071-2072.

Kennedy, J.F., 1995, Handbook of Enzyme Biotechnology, Third Edition, *Editör Allen Wisemann, EllisHorwood*, 235-310.

Khng, H.P., Cunliffe, D., Davies, S., Turner, N.A., Vulfson, E.N., 1998, The synthesis of sub-micron magnetic particles and their use for preparative purification of proteins, *Biotechnology and Bioengineering*, 60, 419-424.

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.

Kim, D.H., Lee, S.H., IM, K.H., Kim, K.N., Kim, K.M., Kim, K.D., Park, H., Shim, I.B., Lee, Y.K., 2005, Biodistribution of chitosan-based magnetite suspensions for targeted hyperthermia in ICR mice, *IEEE Transactions on Magnetics*, 41(10), 4158–4160.

Knezevic, Z.D., Siler-Marinkovic, S.S. and Mojovic, L.V, 2004, Immobilized Lipases As Practical Catalysts, *BIBLID*, 35i 151-164.

Koneracká, M., Kopcansky, P., Timko, M., Ramchand, C.N., Saiyed, Z.M., Trevan, M., and Sequeira, A.D., 2006, Immobilization of Enzymes on Magnetic Particles, Spain, 232-243.

Lee, E. G., Won, H.S and Chung, B. H., 2001, Enantioselective hydrolysis of racemic naproxen methyl ester by two-step acetone–treated *Candida rugosa* lipase, *Process Biochemistry*, 37, 293-298.

Lee, G., Kim, J., Lee, J.H., 2008, Development of magnetically separable polyaniline nanofibers for enzyme immobilization and recovery, *Enzyme and Microbial Technology*,42, 466–472.

Lee, D.G., Ponvel, K.M., Kim, M., Hwang, S., Ahn, I.S., Lee, C.H., 2009, Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*,57, 62–66.

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.

Lin, H.Y. and Tsai, S.W., 2003, Dynamic kinetic resolution of (R, S)-Naproxen 2,2,2-trifluoroethyl ester via lipase-catalyzed hydrolysis in micro-aqueous isooctane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 25, 111-120.

Liu, X., Guana, Y., Shen, R., Liu, H., 2005, Immobilization of lipase onto micron-size magnetic beads, *Journal of Chromatography B*, 822, 91–97.

Lorenz, H., Seidel-Morgenstern, A., 2004, A contribution to the mandelic acid phase diagram. Thermochimica Acta, 415, 55-61.

Lu, A.H., Salabas, E.L., Schuth, F., 2007, Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application , *Angewandte Chemie International Edition*, 46, 1222–1244.

Ma, Z.Y., Guan, Y.P., Liu, X.Q., Liu, H.Z., 2005, Covalent immobilization of albumin on micron-sized magnetic poly(methyl methacrylate-divinylbenzene-glycidyl methacrylate) microspheres prepared by modified suspension polymerization, *Advances in Polymer Technology*,16, 554–558.

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.

Maity, D., Agrawal, D. C., 2007, Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 308, 46–55.

Mao, S., Zhang, Y., Rohani, S., Ray, A.K., 2010, Kinetics of(R,S)- and(R)-mandelic acid in an unseeded cooling batch crystallizer, *Journal of Crystal Growth*,312, 3340–3348.

Mehta, R. V., Upadhyay, R. V., Charles, S. W., and Ramchand, C. N., 1997, Direct binding of protein to magnetic particles, *Biotechnoogy Technology,* 11(7), 493–496.

Menek, A., 1999, Glutatyon-S-Transferaz enziminin immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 70s.

Moghimi, S. M., Hunter, A. C., Murray, J. C., 2001, Long-circulating and targetspecific nanoparticles: theory to practice, *Pharmacological Reviews,* 53, 283–318.

Moreno, J. M. and Sinisterra, J. V.,1995, A systematic analysis of the variables that control a highly stereoselective resolution of racemic non-steroidal antiinflammatory drugs using immobilized lipase from *Candida cylindracea*, *Journal of Molecular Catalysis A : Chemical*, 98, 171-184.

Mosback, K., 1976, Immobilized Enzymes, Methods İn Enzymology, Academic Press, New York, 44.

Muthana, M., Scott, S. D., Farrow, N., Morrow, F., Murdoch, C., Grubb, S., Brown, N., Dobson, J., Lewis, C. E., 2008, A novel magnetic approach to enhance the efficacy of cell-based gene therapies, *Gene Therapy*, 15(12), 902-910.

Mutlu D., 2006, Rasemik Naproksen Esterden Enantiyoseçimli Hidroliz İle S-Naproksen Üretiminde Reaksiyon Parametrelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-101.

Müller-Schulte, D., Brunner, D., 1995, Novel magnetic microspheres on the basis of poly(vinyl alcohol) as affinity medium for quantitative detection of glycated haemoglobin, *Journal of Chromatography A,* 711, 53-60.

Naka, K., Narita, A., Tanaka, H., Chujo,Y., Morita, M., Inubushi, T., Nishimura, I., Hiruta, J., Shibayama, H., Koga, M., Ishibashi, S., Seki, J., Kizaka-Kondoh, S. and Hiraoka, M., 2008, Biomedical applications of imidazolium cation-modified iron oxide nanoparticles, *Polymers For Advanced Technologıes*, 19, 1421–1429.

Noguer, T., Tencaliec, A., Calas-Blanchard, C., Avramescu, A., and Marty, J.-L., 2002, Interference-free biosensor based on screen-printing technology and solgel immobilization for determination of acetaldehyde in wine, *Journal Of AOAC Internatıonal*, 85(6),1383.

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.

Omar, I.C., Saeki, H., Nıshıo, N., Nagai, S., 1988, Hydrolysis of Triglycerides by Immobilized Thermostable Lipase from *Humicola Lanuginosa*, *Agricultural Biology and Chemistry*, 52(1), 99-105.

Orive, G., Hernandez, R. M., 2003, Survival of different cell lines in alginate–agarose microcapsules, *European Journal of Pharmaceutical Science*, 18, 23–30.

Özdemir Ç., 2010, Farklı Nanomalzemeler İle Glukoz Biyosensörlerinin Hazırlanması ve Uygulama Potansiyellerinin Araştırılması,Yüksek Lisans tezi Ege üniversitesi,İzmir, 14-15.

Öztürk, N., 2006, Hidrofobik Nanoyapılarda *Candida Rugosa* Lipaz İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi Adnan Menderes Üniverstesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 1-128.

Paiva, A.L., Balcao, V.M. and Maltaca, F. X., 2000, Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 187-204.

Pan, S.H., Kawamoto, T., Fukui, T., Sonomoto, K., Tanaka A., 1990, Stereoselective esterification of halogen-containing carboxylic acids by lipase in organic solvent; effects of alcohol chain length, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34, 47-51.

Pandey, M.K.,Tyagi, R., Gupta, B., Parmar, V.S., Kumar, J., Watterson, A.C., 2008, Synthesis and Characterization of Novel Amphiphilic Polymers as Drug Delivery Nano, *Journal of Macromolecular Science®, Part A: Pure and Applied Chemistry,* 45, 932–938.

Panyam, J., Labhasetwar, V., 2003, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55,329–347.

Park, J.H., Im, K.H., Lee, S.H., Kim, D.H., 2005, Preparation and characterization of magnetic chitosan particles for hyperthermia application, *Journal of Magnetism and Magnetic Material*, 293, 328–333.

Park, S.W., Choi, S.Y., Chung, K.H., Hong, S.I., Kim, S.W., 2002, Characteristics of GL-7-ACA acylase immobilized on silica gel through silanization, *Biochemical Engineering Journal*, 11, 87-93.

Pereira, E.B., Castro, H.F., Moraes, F.F., Zanin, G.M., 2001, Kinetic Studies of Lipase from *Candida rugosa:* A Comparative Study of the Free and the Immobilized Enzyme on Porous Chitosan Beads, *Applied Biochemical Biotechnolnology*, 91, 739–752.

Ramchand, C. N., Pande, P., Kopcansky, P., and Mehta, R. V., 2001, Application of magnetic fluids in medicine and biotechnology, *Indian Journal of Pure and Applied Physics*, 39, 683–686.

Rebelo L.P., Netto C.G.C.M., Toma E. H. and Andrade L.H., 2010, Enzymatic Kinetic Resolution of (RS)-1-(Phenyl)ethanols by Burkholderia cepacia Lipase Immobilized on Magnetic Nanoparticles, *Journal of the Brazilian Chemical Society,* 21, 1537-1542.

Reetz, M. T., Zonta, A., and Simpelkamp, J., (1995) Efficient heterogeneous biocatalysts by entrapment of lipases in hydrophobic sol-gel materials, *Angewandte Chemie* 107, 373–376; *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34, 301–303.

Reetz, M. T., Zonta, A., and Simpelkamp, J., 1996, Efficient immoblization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials, *Biotechnology and Bioengineering* , 49, 527–534.

Reetz, M. T., 1997, Entrapment of biocatalysts in hydrophobic sol-gel materials for use in organic chemistry, *Advanced Materials* (Weinheim, Ger.), 9, 943–954.

Reetz, M. T., Zonta, A., Vijayakrishnan, V., and Schimossek, K., 1998, Entrapment of lipases in hydrophobic magnetite-containing sol-gel materials: magnetic separation of heterogeneous biocatalysts, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 134, 251–258.

Reetz, M.T., Tielman, P., Wiesenhoefer, W., Koenen, W., Zonta, A., 2003, Second generation sol–gel encapsulated lipases: robust heterogeneous biocatalysts, *Advanced Synthesis Catalysis*, 345, 717–728.

Reetz, M.T., 2006, Practical Protocols for Lipase Immobilization Via Sol-Gel Techniques, Humana Press Inc., Totowa, NJ., 80-85.

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.

Rossi, L.M., Quach, A.D. and Rosenzweig, Z., 2004, Glucose oxidase-magnetite nanoparticle bioconjugate for glucose sensing, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380, 606-613.

Saiyed, Z. M., Telang, S. D., and Ramchand, C. N., 2003, Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine, *BioMagnetic Research and Technology*, 1, 2.

Safarikova, M., Safarik I., 2001, The Application of Magnetic Techniques in Biosciences, *Magnetic and Electrical Separation*, 10, 223-252.

Santos, J.C., Castro, H.F., 2006, Optimization of lipase-catalysed synthesis of butyl butyrate using a factorial design, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 1007–1011.

Santos, J.C., Mijone, P.D., Nunes G.F.M., Perez V.H., Castro H.F., 2008, *Candida rugosa* lipase on chemically modified hybrid matrix of polysiloxane–polyvinyl alcohol with different activating compounds, 2008, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 61, 229–236.

Saravanan, P., Singh, V.K., 1998, An efficient synthesis of chiral nonracemic diamines: Application in asymmetric synthesis, *Tetrahedron Letters*, 39, 167-170.

Schmid, R.D., Verger, R., 1998, Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. Angew Chem Int Ed, 37, 1609–33.

Scherer, C., Figueiredo Neto, A. M., 2005, Ferrofluids: Properties and Applications, *Brazilian Journal of Physics,* 35, 718-727.

Secundo, F., Carrea, G., Tarabiono, C. and Brocca, S., 2003, Activity and enantioselectivity of wildtype and lid mutated *Candida rugo*sa lipase ısoform 1 in organic solvents, *Biotechnology and Bioengineering,* 86, 237- 240.

Semiz, E., 2008, Manyetik Yüklü Polimerik Nanopartikül Esaslı Plazmid Dna Saflaştırma Kitlerinin Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara,1-120.

Sharma, R., Chisti Y. and Banerjee, U. C., 2001, Production, purification, characterization,and applications of lipases, *Biotechnology Advances,* 19, 627-662.

Shaw, G., Brooks, J., Grant, P.R., Muir, M., Van Gijzel, P., 1971. In: Shaw, G. (Ed.), Sporopollenin. Academic Press, London, New York, 112, 305–348.

Shaw, J.F., Chang, R.C., Wang, F.F., Wang, Y.J., 1990, Lipolytic Activities of a Lipase Immobilized on Six Selected Supporting Materials, *Biotechnology Bioengineering*, 35(2), 132-137.

Shaw, G., Apperley, D.C., 1996, 13C-NMR spectra of Lycopodium clavatum sporopollenin and oxidatively polymerised β-carotene, *GRANA*, 35(2), 125-127

Shtelzer S, Rappoport S, Avnir D, Ottolenghi M, Braun S., 1992, Properties of trypsin and acid phosphatase immobilized in sol–gel matrices, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 15, 227–235.

Sjogren, C. E., Briley-Saebo, K., Hanson, M., Johansson, C., 1994, Magnetic characterization of iron oxides for magnetic resonance imaging, *Magnetic Resonance in Medicine*, 31, 268–272.

Suber L., FogilaS., Ingo G.M. and Boukos N., 2001,Synthesis, and structural and morphological characterization of iron oxide-ion-exchange resin and –cellulose nanocomposites, *Applied Organometaaicl. Chemistry,* 15, 414–420 .

Sun, S., Zeng, H., 2002, Size–controlled synthesis of magnetite nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, 124, 8204–8205.

Şahin, O., Erdemir S., Uyanik A., Yilmaz M., 2009, Enantioselective hydrolysis of (R/S)-Naproxen methyl ester with sol–gel encapculated lipase in presence of calix[n]arene derivatives, *Applied Catalysis A: General*, 369, 36-40.

Takac S., Bakkal M., 2007, Impressive effect of immobilization conditions on the catalytic activity and enantioselectivity of Candida rugosa lipase toward S-Naproxen production, *Process Biochemistry*, 42, 1021–1027.

Tang K.W., Yi J.M., Huang K.L., Zhang G.L., 2009, Biphasic recognition chiral extraction: a novelmethodfor separation of mandelic acid enantiomers, *Chirality* 21; 390–395.

Tartaj, P., Morales, M. del P. Veintemillas-Verdaguer, S., Gonzalez-Carreno, T., Serna, C. J., 2003, The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine, *Journal of physics D: Applied Physics*, 36, 182-197.

Tartaj, P., Morales, M. P., Gonzales-Carreno, T., Veintemillas-Verdaguer, S., Serna, C. J., 2005, Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 290, 28–34.

Tejo, B. A., Salleh, A.B and Pleiss, J., 2004, Structure and dynamics of *Candida rugosa* lipase: The role of organic solvent, *Journal Molecular Model*, 10, 358-366.

Telefoncu, A., Dinçkaya, E., Verlop, K.D., 1990, Preparation and Characterization of Pancreatic Lipase Immobilized in Eudragit-Matrix, *Application Biochemistry Biotechnology*, 26(3), 311-317.

Telefoncu A., 1997, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.

Terreni M., Pagani G., Ubiali D., Ferndandez-Lafuente R., Mateo C., Guisan J.M., 2001, Modulation of penicillin acylase properties via immobilization techniques: one-pot chemoenzymatic synthesis of cephamandole from cephalosporin C, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11, 2429–2432.

Tezcan, N., Tarımcı, N., 1990, Studies on the commercial naproxen tablets in turkish drug market, *Journal Faculty Pharmacy*, 20, 1-2.

Thomasson Matthew, J., Baldwin, D.J., Diego-Taboada, A., Atkin, S.L., Mackenzie, G., Wadhawan, J.D., 2010, Electrochemistry and charge transport in sporopollenin particle arrays, *Electrochemistry Communications*,12, 1428–143.

Ting, W.J., Tung ,K.Y., Giridhar, R., Wu, W.T., 2006, Application of binary immobilized *Candida rugosa* lipase for hydrolysis of soybean oil, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 42, 32–38.

Tiryaki, Ö. İ., 1993. Endüstriyel Proseslerde Biyokatalizör Pelletlerin Kullanımı, Yüksek Lisans Semineri, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Tischer, W. and Wedekind, F., 1999, Immobilized enzymes: methods and applications, *Topics in Current Chemistry***,** 200, 95–126.

Tsai, S.W., Dordick, J.S., 1996, Extraordinary enantiospecificity of lipase catalysis in organic media induced by purification and catalyst engineering, 52, 296-300.

Tsai, S.W., Chen, C.C., Yang, H.S., Ng, I.S., Chen, T.L. 2006, Implication of substrate-assisted catalysis on improving lipase activity or enantioselectivity in organic solvents, *BBA Protein and Proteomics*, 1764, 1424-1428.

Tutar, H.,Yilmaz, E., Pehlivan, E., Yilmaz, M., 2009, Immobilization of *Candida rugosa* lipase on sporopollenin from *Lycopodium clavatum*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 315–320.

Ueji, S., Fujino, R., Okubo, N., Miyazawa, T., Kurita, S., Kitadani, M., et al., 1992, Solvent-induced inversion of enantioselectivity in lipasecatalyzed esterification of 2-phenoxy acids, *Biotechnology Letters*,14, 163-168.

Ujang, Z., Husain, W.H., Seng, M.C., Rashid, A.H.A., 2003, The kinetic resolution of 2-(4-chlorophenoxy) propionic acid using Candida rugosa lipase, *Process Biochemistry*, 38, 1483-1488.

Uo, M., Yamashita, K., Suzuki, M., Tamiya, E., Karube, I., Makishima, A., 1992, Immobilization of yeast cells in porous silica carrier with sol–gel process, *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 100, 426–429.

Uyanik, A., Sen, N.,Yilmaz M., 2011, Improvement of catalytic activity of lipase from Candida rugosa via sol–gel encapsulation in the presence of calix(aza)crown, *Bioresource Technology*,102, 4313–4318.

Vakhlu, J., Kour, A., 2006, Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning, *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(1), 69–85.

Veiga, V., Ryan, D. H., Sourty, E., Llanes, F., Marchessault, R., H., 2000, Formation and Characterization of Superparamagnetic cross-linked high amylose starch, *Carbohydrate Polym*er**,** 42, 353–357.

Venton, DL., Cheeseman, KL., Chatterton, RT., Anderson, TL., 1984, Entrapment of highly specific antiprogesterone antiserum using polysiloxane copolymers, *Biochimica et Biophysica Acta,* 797, 343–347.

Vereda, F., Vicente, J., Hidalgo-Alvarez, R., 2008, Colloidal characterization of micron-sized rod-like magnetite particles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 319, 122–129.

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.

Wang, Y., Li, B., Zhou, Y., Jia, D., 2008, Chitosan-İnduced Synthesis Of Magnetite Nanoparticles Via İron İons Assembly, *Polymers For Advanced Technologıes*, 19,1256-1261.

Webb, C. E., 1992. Enzyme Nomenclature, *Academic Press.,* 306-307.

Whitesell, J.K., Reynolds, D., 1983, Resolution of chiral alcohols with mandelic acid, *The Journal of Organic Chemistry*, 48, 3548–3551.

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.

Willard, M.A., Kurihara, L.K., Carpenter, E.E., Calvin, S., Haris, V.G., 2004, Chemically prepared magnetic nanoparticles, *International Materials Reviews*, 49, 125–170.

Wong C.H., Whitesides GM., 1994, Enzymes in synthetic organic chemistry, *Tetrahedron Organic Chemistry* series, 12. Oxford: Pergamon.

Wu, Y., Wang, Y., Luo, G., Dai, Y., 2009, In situ preparation of magnetic Fe_3O_4-chitosan nanoparticles for lipase immobilization by cross-linking and oxidation in aqueous solution, *Bioresource Technology*, 100, 3459–3464.

Wu, J.Y., Liu, S.W., 2000. Influence of alcohol concentration on lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic Naproxen in isooctane: under controlled water activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 124–130.

Xiao, M.T., Huang, Y.Y., Ye, J., Guo, Y.H., 2008, Study on the kinetic characteristics of the asymmetric production of R-(−)-mandelic acid with immobilized Saccharomyces cerevisiae FD11b, *Biochemical Engineering Journal*, 39, 311–318.

Xuea, Y.P., Liua, Z.Q., Xub, M., Wanga, Y.J., Zhenga, Y.G., Shena, Y.C., 2010, Enhanced biotransformation of (R,S)-mandelonitrile to (R)-(−)-mandelic acid with in situ production removal by addition of resin, *Biochemical Engineering Journa,* 53, 143–149.

Xue, B., Sun, Y., 2002, Fabrication and characterization of a rigid magnetic matrix for protein adsorption, *Journal of Chromatography A*, 947 (2), 185-193.

Xu, C.J., Sun, S.H., 2007, Monodisperse magnetic nanoparticles for biomedical applications, *Polymer International*, 56, 821–826.

Yanase, N., Noguchi, H., Asakura, H., Suzuta, T., 1993, Preparation of magnetic latex particles by emulsion polymerization of styrene in the presence of a ferrofluid, *Journal of Applied Polymer Science*, 50, 765-776.

Yılmaz, E., Sezgin, M.,Yılmaz, M., 2010, Enantioselective hydrolysis of rasemic naproxen methyl ester with sol–gel encapsulated lipase in the presence of sporopollenin, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62, 162–168.

Yılmaz, E., 2010, Farklı teknikler kullanarak değişik destek materyallerine lipaz immobilizasyonu ve bir anti-inflammator olan S-naproksenin oluşumunda kullanılması, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Entitüsü, Konya, 1-275.

Yılmaz, E., Sezgin, M.,Yılmaz, M., 2011, Immobilization of Candida rugosa lipase on magnetic sol–gel composite supports for enzymatic resolution of (R,S)-Naproxen methyl ester, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69, 35–41.

Yong, Y., Bai, Y.X., Li, Y.F., Lin, L., Cui, Y.J., Xia, C.G., 2008, Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity, Process Biochemistry, 43, 1179–1185.

Zhang, Y., Li, J., Han, D., Zhang, H., Liu, P., Li, C., 2008, An efficient resolution of racemic secondary alcohols on magnetically separable biocatalyst, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 365, 609–613.

Zeng, L., Luo, K.K., Gong, Y.F., 2006, Preparation and characterization of dendritic composite magnetic particles as a novel enzyme immobilization carrier, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38, 24–30.

Zingg, S.P., Amett, E.M., McPhail, A.T., Bothnerby, A.A., Gilkerson, W.R., 1988, Chiral discrimination in the structures and energetics of association of stereoisomeric salts of mandelic acid with alfa phenethylamine, ephedrine, and pseudoephedrine, *Journal of the American Chemical Society*,110, 1565–1580.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Kübra ETCİ
Uyruğu : T.C
Doğum Yeri ve Tarihi : Konya- 22.11.1984
Telefon : 0535 934 78 37
Faks :
e-mail : kubraetc84@gmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Cumhuriyet lisesi, Selçuklu, Konya	**2003**
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	**2008**
Yüksek Lisans	:	Selçuk Ün. Fen Bilimleri Ens. ,Selçuklu, Konya	**2011**
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER
İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER