T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI TEKNİKLER KULLANARAK DEĞİŞİK DESTEK MATERYALLERİNE LİPAZ İMMOBİLİZASYONU VE BİR ANTİ-İNFLAMMATOR OLAN *S*-NAPROKSENİN OLUŞUMUNDA KULLANILMASI

Elif YILMAZ

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
KONYA-2010

ÖZET

DOKTORA TEZİ

FARKLI TEKNİKLER KULLANARAK DEĞİŞİK DESTEK MATERYALLERİNE LİPAZ İMMOBİLİZASYONU VE BİR ANTİ-İNFLAMMATOR OLAN *S*-NAPROKSENİN OLUŞUMUNDA KULLANILMASI

Elif YILMAZ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Mehmet SEZGİN
2010, 261 sayfa

Jüri: Prof. Dr. Mehmet SEZGİN
Prof. Dr. Salih YILDIZ
Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK
Doç. Dr. Ali KILINÇ
Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

Triaçilgliserollerin, gliserol ve yağ asitlerine hidrolizini katalizleyen lipazlar, biyolojik sistemlerde en önemli enzimdir. Hayvansal, bitkisel ve bakteriyel kaynaklarda var olan lipazlar, lipit metabolizmasında önemli rol oynarlar. Substratın yapısına ve reaksiyon koşullarına bağlı olarak, lipazlar esterleşme, transesterleşme, hidroliz ve aminoliz gibi reaksiyonları enantiyoseçimli olarak katalizler. Enzimler,

kararlılıklarını ve tekrar kullanılabilirliklerini artırmak amacıyla katı destek maddelerine farklı metotlar (adsorpsiyon, kovalent bağlanma veya tutuklama) kullanılarak immobilize edilirler.

Bu çalışma üç bölümden oluşmaktadır. Birinci bölümde, *Candida rugosa* lipazı immobilize etmek için β-siklodekstrin polimeri, sporopollenin, cam boncuklar, Fe_3O_4 nanopartikülleri gibi destek maddeleri hazırlandı. Bu destek materyallerinin yapıları spektroskopik ve termogravimetrik (TGA), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve geçirim elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak karakterize edildi.

İkinci bölümde, bu destek maddeleri kullanılarak *Candida rugosa* lipaz enzimi kovalent bağlama ve sol-jel tutuklama metoduna göre immobilize edildi. İmmobilize enzimlerin aktiviteleri, optimum pH ve sıcaklık koşulları, termal ve depolama kararlılığı ile tekrar kullanılabilirlikleri incelendi. Sol-jel tutuklama metoduna göre yapılan immobilizasyonda enzimin konformasyonal yapısı çok fazla değişmediğinden aktivitesi kovalent bağlanma metodundan daha yüksek gözlendi.

Üçüncü bölümde immobilize edilen enzimler kullanılarak rasemik Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi incelendi. *S*-Naproksenin enantiyodönüşümü üzerine pH, sıcaklık ve tekrar kullanılabilirlik gibi parametreler incelendi. Sol-jel tutuklama metoduna göre immobilize edilen enzimler serbest lipazdan daha yüksek enantiyoseçimlilik ve dönüşüm gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Lipaz, immobilizasyon, siklodekstrin**,** sporopollenin, cam boncuk, manyetik nanopartikül, enantiyoseçimlilik, Naproksen

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

IMMOBILIZATION OF LIPASE ONTO DIFFERENT SUPPORTS BY DIFFERENT TECHNIQUES AND USE IN THE FORMATION OF *S*-NAPROXEN AN ANTI-INFLAMMATOR

Elif YILMAZ

Selcuk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet SEZGİN

2010, 261 Page

Jury: Prof. Dr. Mehmet SEZGİN
Prof. Dr. Salih YILDIZ
Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK
Assoc. Prof. Dr. Ali KILINÇ
Assoc. Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

Lipase (EC 3.1.1.3 triacylglycerol acylhydrolase,) is an important enzyme in biological systems, where it catalyses the hydrolysis of triacylglycerol to glycerol and fatty acids. The enzyme is distributed among higher animals, plants and microorganisms in which it plays a key role in lipid metabolism. Depending on the nature of substrate and reaction conditions, lipases catalyze wide range of enantioselective reactions such as hydrolysis, esterifications, transesterifications, aminolysis. By using various methos (adsorption, covalent binding, or

encapsulation), enzymes are often immobilized onto solid supports to increase their thermal and operational stability, and recoverability.

This study consists of three parts; in the first part; beta-cyclodextrin polymers, sporopollenin, glass beads and magnetic nanoparticules have been prepared for immobilization of *Candida rugosa* lipase. The structures of prepared supported materials have been identified by spectroscopic, TGA, TEM and SEM techniques.

In the second part of the work; *Candida rugosa* lipase was immobilized onto support materials by using the covalent attachment or the sol-gel encapsulation methods. The optimum pH, temperature, thermal and storage stability, and reuse of the immobilized lipases were determined. It has been observed that the activity of immobilized lipase by sol-gel method is much better than that of the covalent attachmet method due to the interaction between the enzyme and the support, which could prevent the conformation transition of the enzyme.

In the third part; the enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester was studied by using immobilized enzymes and explore the effect of these materials in the enantioselective hydrolysis of (*RS*)-Naproxen methyl ester. The effect of pH, temperature and reuse was also investigated. It was observed that sol-gel encapsulated enzymes had higher conversion and enantioselectivity compared to the sol-gel free lipase.

Keywords: Lipase, immobilization, cyclodextrin, sporopollenin, glass beads, magnetic nanoparticules, enantioselectivity, Naproxen.

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Mehmet SEZGİN yönetiminde yapılarak Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Doktora Tezi olarak sunulmuştur. Aynı zamanda S.Ü. BAP tarafından doktora projesi olarak desteklenmiştir.

Bu çalışmayı BAP 08101024 no.lu Proje ile destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda 106T435 no.lu TÜBİTAK projesinin katkılarından dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca her türlü emeğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Mehmet SEZGİN'e saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez izleme Komitesi (TİK) üyeleri hocalarım Sayın Prof. Dr. Salih YILDIZ ve Sayın Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK'e ilgi ve yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca devamlı yardım ve desteklerini gördüğüm Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. İbrahim KARATAŞ'a ve S.Ü. Fen Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Mustafa ERSÖZ'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında maddi ve manevi desteklerinden dolayı sevgili babam Prof. Dr. Mustafa YILMAZ'a, canım anneme ve biricik kardeşime teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca emeği geçen, S.Ü. Fen Fakültesi Kimya Bölümüdeki hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Beni anlayan, dinleyen ve yalnız bırakmayan, laboratuar hayatını kolaylaştıran, her konuda desteklerini gördüğüm Fatih ÖZCAN ve Kübra ETCİ'ye teşekkür ederim.

Ayrıca S. Ü. Fen Fakültesi Kimya Bölümü Araştırma Görevlileri Esra MALTAŞ, Arzu UYANIK, Ezgi AKCEYLAN, Özlem ŞAHİN, Uzman Selahattin BOZKURT'a; laboratuarlardaki ve depolardaki işlerimi kolaylaştıran Teknisyen Memiş KAÇAR ve Laborant Mustafa KUL'a; S.Ü. M.M.F. Kimya Mühendisliği Bölümü Arş. Gör. Havva Tutar'a; Lisansüstü öğrencilerinden Orkide ÖZHAVZALI, Keziban CAN, Serkan SAYIN ve Mustafa ARSLAN'a, da teşekkür ederim.

Elif YILMAZ

İÇİNDEKİLER

ÖZET……i
ABSTRACT……...iii
ÖNSÖZ…… v
İÇİNDEKİLER…….……vi
SİMGELER……..……..xii
1. GİRİŞ…….……1

1.1. Enzimler ve Genel Özellikleri ……..……1

1.1.1. Enzim Kullanmanın Avantajları…….....…….2

1.2. Lipaz Enzimleri……..…….…….…..3

1.2.1. Lipazların Kaynakları…….……..……..…….4

1.2.1.1. *Candida rugosa* lipaz ……..……...5

1.2.2. Lipazların Yapısı ve Özellikleri ……..……7

1.2.2.1. Lipazların aktivite ölçülmesi ve tanımlanması…….....……..…7

1.2.2.2. Lipaz türleri…….……...……8

1.2.2.3. Lipazların üç boyutlu yapıları ve lipolitik mekanizması……..……..…9

1.2.2.4. Lipazın aktivasyonu ve inhibisyonu ……...…10

1.2.2.5. Lipazların optimum pH'ı……...….12

1.2.2.6. Lipazların optimum sıcaklık ve termal kararlılığı……...……13

1.2.2.7. Lipazların izoelektrik noktası (pI) ……..…..……..14

1.2.2.8. Lipazların organik çözücülerde kararlılık……...….……15

1.2.3. Lipazların Sınıflandırılması……..……..…15

1.2.3.1. 1,3 - Spesifik lipazlar…….…..16

1.2.3.2. Spesifik olmayan (Non-spesifik) lipazlar……16

1.2.3.3.Yağ asiti spesifik lipazlar …….……17

1.2.4. Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar …….…….17

1.2.4.1. Hidroliz ……..…….18

1.2.4.2. Esterifikasyon…….…….19

1.2.4.3. Ester değişimi (Transesterifikayon) …….……..21

1.2.4.4. Doğal olmayan substratların katalizi…….…….…….21

1.3. Lipazların Endüstriyel Kullanım Alanları……..…….……22

1.3.1. Gıda Endüstrisinde Lipazlar……...…….……..24

1.3.2. Deterjan Endüstrisinde Lipazlar…….…...……...26

1.3.3. İlaç Endüstrisinde Lipazlar……..……..27
1.3.4. Organik Sentezde Lipazlar…….…….……...29
1.3.5. Deri Endüstrisinde Lipazlar…….……..30
1.3.6. Kağıt Hamuru ve Kağıt Endüstrisinde Lipazlar …….……...30
1.3.7. Biyosensör Olarak Lipazlar ……..…….……...31
1.3.8. Rasemik Asitlerin ve Alkollerin Ayrışmasında Lipazlar……...……31
1.4. Enzim İmmobilizasyonu……...…….…..33
1.4.1. İmmobilize Enzimlerin Özellikleri……..…….….35
1.4.1.1. Taşıyıcı destek materyali…...…….….35
1.4.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri……...…….……...36
1.4.2.1. Taşıyıcıya bağlama yöntemleri …….…….…….38
1.4.2.1.1. Fiziksel adsorpsiyon …….……38
1.4.2.1.2. Kovalent bağlama ……...…….…….42
1.4.2.1.3. İyonik bağlama ile immobilizasyon ……...…..49
1.4.2.1.4. Şelatlama veya metal bağlama …….…….……50
1.4.2.2. Çapraz bağlama ile immobilizasyon……..…….…….51
1.4.2.3. Tutuklama yöntemleri…….……52
1.4.2.4. Sol-Jel tutuklama yöntemi……..…….……54
1.4.2.4.1. Polimer matrikste tutuklama ……..…..……..55
1.4.2.4.2. Membranda tutuklama …….…….……56
1.4.3. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması……..…….……...57
1.5. Siklodekstrinler ……..…….……58
1.5.1. Siklodekstrinlerin Özellikler…….…….……59
1.6. Sporopollenin…….…..62
1.7. Magnetik Partiküllere Enzim İmmobilizasyonu …….……64
1.8. Naproksen …….…..67
1.8.1 Naproksen ve Özellikleri…….……...67
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI……...…….…….71
3. MATERYAL VE METOD……...…….…..94
3.1. Kullanılan Aletler…….…..94
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler……...…….…94
3.3. Metod……..…….…95

3.3.1. Lipaz Aktivitesinin Tayini…….……95
3.3.2. Protein Miktarı ……...…….…….95
3.3.3. Optimum pH Tayini…….…….…….97
3.3.4. Optimum Sıcaklık Tayini……...…….…….…..97
3.4. Kararlılık Testleri……..…….……..97
3.4.1. pH Kararlılığı…….…97
3.4.2. Termal Kararlılık……...…….…...98
3.4.3. Depo Kararlılığı……..……...…….…...98
3.4.4. Tekrar kullanılabilirlik……..…….…98
3.5. Lipaz İmmobilizasyon Çalışmaları…….…….…99
3.5.1. Beta-Siklodekstrin-hekzametilendiizosiyanat polimerinin sentezi……99
(Polimer-1)
3.5.2. Beta-Siklodekstrin-glutaraldehit polimerinin sentezi …….100
(Polimer-2)
3.5.3. Beta-Siklodekstrin-hekzametilendiizosiyanat polimerine lipaz……..100
immobilizasyonu
3.5.4. Beta-Siklodekstrin-glutaraldehit polimerine lipaz immobilizasyonu ….101
3.5.5. Beta-Siklodekstrin-hekzametilendiizoiyanat polimerine sol-jel……..102
tutuklama metoduna göre lipaz immobilizasyonu
3.5.6. Beta-Siklodekstrin-epiklorhidrin polimeri (β-EP-CD)……103
3.5.6.1. β-EP-CD destek maddesinin iminoasetik asit……...104
(IDA) ile etkileştirilmesi
3.5.6.2. β-EP-CD–IDA destek maddesine bakır (II) yükleme……104
3.5.6.3. β-EP-CD–IDA-Cu^{2+}destek maddesine lipaz immobilizasyonu…….104
3.6. Sporopollenin Aktifleştirilmesi……..105
3.6.1. Sporopollenin-HMDI ile etkileştirilmesi……....106
3.6.1.1. Sporopollenin-HMDI'nın GA ile etkileştirilmesi (Metot A)…….106
3.6.1.2. Sporopollenin-HMDI'nın GA ile etkileştirilmesi (Metot B)…….107
3.6.2. Spo-HMDI-GA destek materyallerine ……..……..107
lipaz immobilizasyonu (kovalent bağlanma)
3.6.3. Sporopollenin ve aktif sporopollenine sol-jel tutuklama…….110
metoduna göre lipaz immobilizasyonu

3.7. Cam boncukların yüzey aktivasyonu……..…..…..110
3.7.1. Cam boncukların silanlanması…….....….110
3.7.2. Modifiye edilmiş cam boncukların GA ile etkileştirilmesi…….…….111
3.7.3. Cam boncuklara lipaz immobilizasyonu (Kovalent bağlama)…….……111
3.7.4. Cam boncuklara sol-jel tutuklama metoduna lipaz immobilizasyonu.…113
3.8. Fe_3O_4 nanopartiküllerinin sentezi……..…….113
3.8.1. APTES modifiye edilmiş Fe_3O_4 nano partiküllerinin hazırlanması…...116
3.8.2. Fe_3O_4 nanopartikülününe sol-gel tutuklama metoduna göre Lipaz…....117
immobilizasyonu
3.9. HPLC Çalışmaları……..……119
3.9.1. Naproksen Metil Ester Türevinin Sentezi……..……..119
3.9.2. (*S*)-Naproksen'in Rasemleştirilmesi (Wu, 2000)…….119
3.9.3. (*R*/*S*)-Naproksen Metil Ester Sentezi……..…….120
3.9.4. İmmobilize Lipazlar ile (R/S)-Naproksen metil ester'in…….121
Enantiyoseçimli Hidrolizi
3.9.5. Genel Prosedür…….121
4. SONUÇ VE TARTIŞMA……...……124
4.1. Lipaz İmmobilizasyonu İçin Farklı Destek Maddelerinin Hazırlanışı ve…..125
Karekterizasyonu
4.1.1. Beta-Siklodekstrin-hekzametilendiizosiyanat polimerinin sentezi …....125
4.1.1.2. Beta-Siklodekstrin-glutaraldehit polimerinin sentezi……127
4.1.2. Bakır yüklü Beta-Siklodekstrin-Epiklorhidrin polimerinin sentezi …....128
4.1.3. Sporopollenin destek maddesi……...……..130
4.1.4. Sporopollenin destek maddesinin HMDI ile……..……..133
etkileştirilmesi (Spo-HMDI)
4.1.4.1. Sporopollenin destek maddesinin GA ile…….…….134
etkileştirilmesi (Spo-HMDI-GA)
4.1.5. Cam boncukların hazırlanması……...…….138
4.1.5.1. Cam boncuk-APTES-GA'in karekterizasyonu …….……138
4.1.6. Manyetik nano partiküllerin sentezi…….143

4.2. Farklı Tekniklerle Lipaz İmmobilizasyon Çalışmaları……..….148

4.2.1. Siklodekstrin bazlı polimerlere lipaz immobilizasyonu……..148
(kovalent bağlanma)
4.2.1.1. Aktiviteye pH ve sıcaklığın etkisi……..152
4.2.1.2. İmmobilize lipazın kararlılığı……...…….155
4.2.2. Siklodekstrin bazlı polimerine lipaz immobilizasyonu……157
(sol-jel tutuklama)
4.2.2.1. Aktiviye pH ve sıcaklığın etkisi……..……...159
4.2.2.2. Termal kararlılık ……...……161
4.2.2.3. Tekrar kullanılabilirlik……..…….161
4.2.2.4. Depolama kararlılığı …….……162
4.2.3. Siklodekstrin-epiklorhidrin polimerlerine lipaz……..…….163
immobilizasyonu
4.2.3.1. Aktiviteye pH ve sıcaklığın etkisi…….….166
4.2.3.2. Termal kararlılık ……..167
4.2.3.3. Tekrar kullanılabilirlik …….....168
4.2.4. Sporopollenin destek maddesine lipaz immobilizasyonu……170
(kovalent bağlanma)
4.2.4.1. Aktiviteye pH ve sıcaklığın etkisi …….175
4.2.4.2. Termal kararlılık ……..…….176
4.2.4.3. Tekrar kullanılabilirlik……...……177
4.2.5. Sporopollenin destek maddesine lipaz immobilizasyonu ……...178
(sol-jel tutuklama)
4.2.5.1. Aktiviteye pH'ın etkisi…….…….180
4.2.5.2. Aktiviteye sıcaklığın etkisi……...…….181
4.2.5.3. Termal kararlılık ve tekrar kullanılabilirlik …….….183
4.2.5.4. Depolama kararlılığı …….……184
4.2.6. Cam boncuklara lipaz immobilizasyonu……..186
(kovalent bağlama ve sol-jel tutuklama)
4.2.6.1. Aktiviteye pH ve sıcaklığın etkisi……..……192
4.2.6.2. Termal kararlılık ……..……194

4.2.6.3. Tekrar kullanılabilirlik …….195
4.2.6.4. Depolama kararlılığı …….……..……..195
4.2.7. Manyetik nanopartikül ve fonksiyonlandırılmış manyetik……..196
nanopartiküller üzerine lipaz immobilizasyonu (sol-jel tutuklama)
4.2.7.1. Aktiviteye pH ve sıcaklığın etkisi …….198
4.2.7.2. Termal kararlılık…….…….200
4.2.7.3. Tekrar kullanılabilirlik……..……....201
4.2.7.4. Depolama kararlılığı……..……201
4.3. İmmobilize Lipazların Enantiyoseçimli Tepkimelerde Kullanılması……....203
4.3.1. β-siklodekstrin bazlı immobilize lipazlar ile (R,S)-Naproksen……...204
metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi
4.3.2. Lipaz immobilize sporopollenin'in (R,S)-Naproksen metil……208
esterinin enantiyoseçimli reaksiyonunda kullanılması
4.3.3. Cam kürecik immobilize lipazlar ile (R,S)-Naproksen……211
metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi
4.3.4. Manyetik immobilize lipazlar ile (R,S)-Naproksen metil esterinin…….214
enantiyoseçimli hidrolizi
5. KAYNAKLAR ……..219
6. EK…….……255
ÖZGEÇMİŞ……261

SİMGELER

APTES	Aminopropiltrietoksisilan
CD	Siklodekstrin
CRL	*Candida rugosa* lipaz
Ed	Etilendiamin
EP	Epiklorhidrin
GA	Glutaraldehit
HMDI	Hekzametilendiizosiyanat
IDA	İminodiasetikasit
OTES	Oktiltrietoksisilan
***p*-NPP**	*p*-nitrofenil palmitat
PVA	Polivinilalkol
Spo	Sporopollenin
TEOS	Tetraetoksisilan

1.GİRİŞ

1.1. Enzimler ve Genel Özellikleri

Enzimler, canlı organizmalardaki reaksiyonları hızlandıran ve genellikle yan ürün oluşturmayan hemen hemen % 100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Enzimler çok etkili ve spesifik biyokatalizörlerdir. Enzimle katalize edilen reaksiyonlar enzimle katalize edilmeyen reaksiyonlardan 10^3-10^{17} defa daha hızlı olabilmektedir.

Enzimlerde protein kısmından başka protein olmayan ve kofaktör denilen bir kısım bulunur. Kofaktörler birçok enzimin katalitik aktivite gösterebilmesi için gerekli olan maddelerdir. Kofaktör bir metal iyonu olabildiği gibi, koenzim denilen kompleks yapıda bir organik bileşik de olabilir. Bazen aktivite için ikisi de gereklidir. Enzimler sıcaklıkta denatüre olurken, kofaktörler ısıya dayanıklıdırlar. Katalitik olarak aktif olan enzim-kofaktör kompleksine holoenzim adı verilir. Kofaktörsüz proteine ise apoenzim denilir. Apoenzim katalitik olarak inaktifdir.

Enzimlerin etkileyip değişikliğe uğrattığı moleküle substrat adı verilir. Enzim biyokimyasal reaksiyonlarda substratı değiştirip ürüne dönüştürürken, kendisi hiç değişikliğe uğramaz. Enzimler substrat dediğimiz molekülden reaksiyon sırasında ya bir ya da birkaç atomu veya fonksiyonel bir grubu koparır ya da substrata eklerler. Enzimler canlı hücreler tarafından biyolojik koşullarda sentez edilirler, fakat aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmaları gerekmez.

Enzim molekülü üzerinde kofaktör ve koenzimlerin yer aldığı, enzim-substrat kompleksinin şekillendiği dar bir bölge aktif merkezi teşkil eder. Aktif merkezde substrat bağlanma merkezi ve bir veya daha fazla katalitik aktivite bölgeleri mevcuttur. Buralar aminoasit kalıntılarından oluşmuş ve özel geometrisi olan yerlerdir.

Enzimler tepkimenin başlaması için gerekli olan aktivasyon enerjisini düşürürler. Bir enzim daima bir çeşit reaksiyonu kontrol eder. Substrat yüzeyi arttıkça enzim aktivitesi de artar. Enzimler hem sulu hem organik ortamda etkinlik

gösterirler. Enzimlerin kontrol ettiği tepkimelerin çoğu çift yönlüdür. Protein yapılı olmalarından dolayı proteinin etkilendiği faktörlerden etkilenirler (Aksoy 2003).

Aktivite tayinlerinde genellikle ya kaybolan substrat miktarı ya da meydana gelen ürün miktarı ölçülür. Enzim aktivite tayininde yöntem seçerken metodun pratik oluşuna ve kısa sürede yapılışına, ayrıca hassas oluşuna da özen göstermek gerekir.

Bir mikromol substratı bir dakikada ve optimum koşullarda ürüne çeviren enzim miktarı bir ünite olarak kabul edilmektedir. Enzim üniteleri U veya UI şeklinde gösterilmektedir.

Bir miligram proteinde bulunan enzim ünite sayısı spesifik aktivite olarak kabul edilir. Spesifik aktivite ünite/mg protein olarak kabul edilmektedir. Bu enzimin saflığının bir ölçüsüdür.

1.1.1. Enzim Kullanmanın Avantajları

- Yan ürün oluşumu hemen hemen hiç gözlenmez.
- Katalitik etkinlik kimyasal katalizörlerinkinden çok fazladır.
- Reaksiyonlar ılıman koşullar altında olur.
- Doğal katalizör oldukları için çevreye zararlı değildirler.
- Proses basamaklarının sayısı daha azdır.
- Kimyasal seçimlilik (kemoselektivite), bölge seçiciliği (regioselektivite), diastomer seçiciliği (diasteroselektivite) ve enantiyomer seçiciliği (enantiyoselektivite) gösteririler.
- Doğal substratlarla sınırlı değildirler ve organik bileşiklere de uygulanabilirler.

1.2. Lipaz Enzimleri

Lipazlar (triaçilgliserol ester hidrolaz, EC 3.1.1.3) triaçilgliserolleri yağ asitleri ve gliserole hidroliz eden enzimler olup hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunurlar (Candenas ve ark., 2001; Mohamed ve ar., 2000; Villeneuve ve ark., 2000, Aksoy 2003).

Lipazların çoğu suda çözünen enzimlerdir ve suda çözünmeyen substratlar üzerinde rol oynarlar (Beisson ve ark., 2000).

Lipazların bilinen üç boyutlu yapıları molekül kütlesi 19-60 kDa aralığında değişir (Garrett ve Grisham1999; Gao 2004). Primer yapısına rağmen farklı orjinli lipazların aminoasit sırasının bir hayli değişmesi ortak özellikleri olarak göze çarpar. Lipazın yapısında en önemli özelliklerinden biri GXSXG pentapeptiddir, burada G:glisin, S: serin, X:herhangi bir aminoasittir. Bu sıra bütün lipazlarda bulunur. Diğer ortak özellik serin, aspartik asit ve histidin amino asitlerinin varlığında yaklaşık ayrı 50 kalıntı bulunur. Bu üçlüde serin pentapeptid bulunur (Brady ve ark., 1990; Svendsen 1994). Lipazların iki ve üç boyutlu yapıları gözden geçirildiği zaman benzer özellikleri yanında bu ortak noktaların önemi de görülmektedir (Gao 2004). Aktif bölgelerine göre serin hidrolazlar olarak sınıflandırılırlar (Antonian 1988).

Lipazlara, biyoteknoloji çalışmalarında çok amaçlı kullanılabilirlikleri, spesifikliğin olmadığı kimyasal proseslere spesifiklik kazandırmaları, çok çeşitli substratları kullanabilme yeteneğine sahip olmaları, çok yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde ve organik çözücülere karşı yüksek kararlılık göstermeleri, yan reaksiyonu önlemeleri ve reaksiyon ürünlerinin ayrılmasıyla ilgili problemleri kolaylaştırmaları gibi birçok özellikleri nedeniyle her geçen gün artan bir ilgi ve talep vardır (Karaca 2006; Paiva ve ark., 2000; Hung ve ark., 2003; Zaitsev ve ark., 2003; Villeneuve ve ark., 2000; Akkuş 2006).

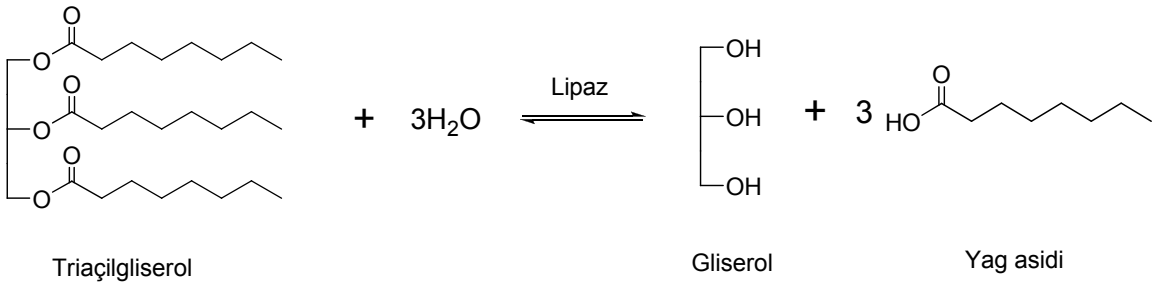
Lipazların enzim pazarındaki payının büyümesinde, bu enzimlerin enantiyo seçiciliği, bölgesel seçiciliği ve geniş substrat özgüllüğü gibi özellikleri etkili olmuştur. Ayrıca lipazların göze çarpan önemli özelliklerinden biri de sulu ve susuz (organik) fazların ara yüzeyinde reaksiyon göstermeleridir ki bu özellikleriyle de esterazlardan ayrılırlar.

Son zamanlarda lipolitik enzimleri ‘gerçek’ lipaz (E.C. 3.1.1.3) olarak sınıflandırabilmek için iki ölçüt tanımlanmıştır (Akkuş 2006).

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

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

Başta hidroliz olmak üzere transesterifikasyon, asidoliz, esterifikasyon ve aminoliz gibi birçok reaksiyonu katalizleme özelliğine sahip lipazlar ılımlı reaksiyon koşulları altında çalışırlar. Organik çözücülerde kullanılabilirler ve spesifik reaksiyonlara seçicilik gösterirler. Etkin olduğu hidroliz reaksiyonu genel olarak Şekil 1.1.’de gösterilmiştir (Zaitsev 2003, Karaca 2006).



Şekil 1.1. Lipazların katalitik aktivasyonu

1.2.1. Lipazların Kaynakları

Lipazlar hayvan, bitki ve mikroorganizma kökenli olabilirler (Gao ve ark., 2000; Kojima ve Shimizu 2003; Saraç ve ark., 2008). Mikroorganizmalardan başlıca bakteri ve mantardan elde edilen lipazlar çoğunlukla organik kimya ve biyoteknolojik uygulamalarda biyokataliz olarak kullanılır.

Biyoteknolojide yaygın olarak kullanılan lipazlara şöyle örnek verebiliriz: (Jaeger ve Reetz 1998):

Mantar türü lipazlar: *Candida rugosa, Candida antarctica, Thermomyces lanuginosus* ve *Rhizomucor miehei*

Bakteriyel lipazlar: *Burkholderia cepacia, Pseudomonas alcaligenes, Pseudomonas mendocina* ve *Chromobacterium viscosum*

Mikrobiyal enzimler bitki ve hayvanlardan isole edilen enzimlerden daha çok kullanışlıdır. Mikrobiyal lipazların yüksek biyoteknolojik potansiyelleri; organik çözücülerde kararlı olmaları, kofaktöre gereksinim duymamaları, geniş substrat spesifitesine sahip olmaları ve yüksek enantiyoselektivite göstermelerinden kaynaklanmaktadır (Jaeger ve Reetz 1998; Saraç ve ark., 2008). Ayrıca üretimleri daha kolay, daha ucuz ve güvenlidir (Wiseman 1995; Hasan ve ark., 2006). Dünya'daki mikroorganizmaların sadece % 2'lik bir kısmı enzim kaynakları olarak test edilmiştir (Hasan ve ark., 2006). Günümüzde genel lipaz üreticilerinin faydalandığı 38 farklı bakteriyel kaynak vardır (Gupta ve ark., 2004). 1998'de bilgi bankasından elde edilen bir araştırmadan bakteriden lipolitik enzimlerinin 217 girişi gözlenmiştir (Jaeger ve ark., 1999).

Kaynaklarına (bakteriyel, mantar, bitki veya hayvan) bağlı olarak lipazlar sıcaklık, dayanıklılık ve pH a bağımlılık, enantiyoselektivite, pozisyonal spesifiklik gibi özelliklerin geniş bir aralığına sahiptirler (Saxena ve ark., 2003).

1.2.1.1. *Candida rugosa* lipaz

Mikroorganizmalar tarafından üretilen hücredışı lipazlar (EC 3.1.1.3) sık sık araştırılmıştır. Çünkü biyoteknolojik proseslerde birçok farklı kullanım alanı bulunmaktadır (Benjamin ve Pandey 1997,1998). Dünya çapındaki ilk adım, lipaz üreten organizmaların taramasında ele almışlardır ve insan sağlığı için hızlı büyüyen biyoteknolojide kullanılmıştır (Jaeger ve ark., 1994, MacRae ve Hammond 1985). Bu büyük ilgi biyoendüstri için *Candida rugosa* lipazları (CRL) tanıtmakta

araştırmacılara önderlik etmiştir (Basri ve ark., 1996; Benjamin ve Pandey 1998b). Literatür araştırmaları lipaz saklamalarının kıyasla çok yaygın olarak çalışılan mikroorganizma olarak *C. rugosa*'yı ortaya çıkarmışlardır (Benyamin ve Pandey 1995, 1996). Spor üretmeyen, pseudofilamentous, tek hücreli ve patojenik olmayan maya, *C. rugosa*'yı sentezler ve birçok araştırıcı tarafından çalışılan lipaz izoenzimlerinin bir karışımı olarak saklanır, enzimlerin ticari hazırlanmasından başlanır ve gelişen 'Lip-tech' endüstrisini ilerletmek için saflaştırılması ve karakterizasyonunda amaçlanır (Alberghina ve ark., 1991; Antonian 1988, Grochulski ve ark., 1993; Kreger-van Rig 1984; Lotti ve ark. 1994).

C. rugosa gen klonlaması ile test edilmiş bir "lipaz minigen ailesin" de kodlanmış en az beş izoenzime sahip enzimlerin bir karışımıdır. Her enzim ve aktif bölgesinde iyi belirlenmiş bir katalitik üçlü ile belli molekül ağırlığı 60 kDa ve 543 aminoasit içeren bir tek polipepetit zincirine sahiptir (Lotti ve ark., 1994). *Candida rugosa* lipaz iç-esterifikasyon, trans-esterifikasyon sterospesifik ve spesifik olmayan hidrolizler reaksiyonlarında kullanılır (Benjamin ve Pandey 1998b; Jaeger ve ark., 1994; MacRae ve Hammond 1985). Şimdiye kadar, CRL niteliğinde olan geniş bir spesifiklik aralığına sahip (substrat, pozisyonal, yağ asidi ve sterotercih) hiç bir lipaz bulunmamıştır. Primer ve sekonder esterler veya gliseritlerde ester bağlarına karşı genel bir ayırım özelliği vardır. Enzimlerin artan fiyatları karşısında bunlar uzun süreli kullanım için, dayanıklılık ve ucuz destek maddelerine tutuklanarak ya da immobilize edilerek kullanılmaktadır (Benjamin ve Pandey 1996b, Malcata ve ark., 1992).

Yağ ve lipit içeren substratların spesifik olmayan biyokatalizi, değerli yiyecek katkıları olarak, aroma ve lezzetin sentezi için, günlük yiyecek endüstrisinde CRL oldukça önemlidir (Ha ve Lindsoy1993; Yunus ve ark., 1996). Bunlara ilaveten CRL'ın deri endüstrisinde ve biyosurfaktant olarak da deterjan formülasyonların (önemli diğer hidrolitik enzimler ile beraber) olağanüstü başarı ile kullanılmıştır (Misset ve ark., 1994).

Son 25 yılda gelişen modern çevreye karşı, özellikle biyo-böcek zehirleri ve biyofarmakolojilerde iyi kimyasalların eldesinde CRL'ın başarısı oldukça fazladır (Bosetti ve ark., 1994; Franssen ve ark., 1996). İyi kimyasalların sentezi ve rezulasyonunda değerli bileşiklerin sentezinde ve sterospesifik hidrolizlerinde ve

maksimum optik saflıkta saf enantiyomerlerin sentezinde bu enzim oldukça ilgi görmüştür (Bianchi ve ark., 1992). Bundan başka son yıllarda bu enzim ile birçok amino asit türevi ve etkili karbonhidrat esterlerinin sentezi gerçekleştirilmiştir (Lalonde 1995; Park ve ark., 1996). Klinik örneklerde özellikle spesifik olmayan CRL gibi bir lipaz biyosensörlerin gelişmesine önderlik etmiştir (Haalck ve ark., 1991; Schoemaker ve ark., 1994). Bir alternatif teknoloji olarak lipazlar yağlı tohumlar ve endüstriyel organizmalardan lipitleri ekstrakte etmek ve fazla lipitleri hidroliz için de kullanılmaktadır (McArdle ve Culver 1994; Sztajer ve Zboinska1988). Lipitli suların, fabrika ve restoran atıklarının biyolojik yoldan arıtmasında lipazlar kullanılmakta ve bu atık teknolojisinden kullanılabilir ürünler elde edilebilmektedir (Benjamin ve Pandey1998b). Tek hücreli proteinleri üretmek amacı ile atık sularda büyüyen hücreler (*in situ*) üretmek diğer bir dikkat çeken alandır (Benjamin ve Pandey 1996c; Lee ve Lee 1996).

1.2.2. Lipazların Yapısı ve Özellikleri

1.2.2.1. Lipazların aktivite ölçülmesi ve tanımlanması

Lipolitik reaksiyonlar, lipolitik substrat ve sulu ortam ile oluşturulan iki fazlı bir sistemin lipit-su ara yüzeyinde gerçekleşir. Bir kriter, açilgliserollerden uzun zincirli yağ asitlerinin hidrolizini katalizlediği zaman bir "gerçek" lipaz (EC 3.1.1.3) olarak bir lipolitik enzim sınıfıdır (Jaeger ve ark., 1999; Illanes 2008). Lipazlar substrat bağlama ve yönetmek için mevcut aktif merkezi ayırarak ara yüzeyle temasda hareket ettiren bu aktif merkezi kaplayan ve *lid* olarak adlandırılan bir polipeptid zinciri içerir ve emülsiyon ara yüzeyinin olmasıyla aktivite edilir. Bununla birlikte lid içeren enzimler gibi istisnalar vardır fakat ara yüzey aktivasyonunu göstermezler (Verger 1997). Lipazlar gliserolden uzun zincirli yağ asit esterlerinin sentezi ve hidrolizini katalizleyen esterazlar olarak belirtilebilirler. Fakat uzun zincirli yağ asidi tam bir tanım değildir. Çoğu lipaz standart substrat olarak

tribütirilgliserol (tribütirin) ile 10 karbon atomundan daha az bir açil zincir uzunluklu ester substratları hidrolizler (Jaeger ve ark., 1999).

Lipazlar serbest yağ asitleri ve gliserol vermek üzere trigliseritleri hidrolizler. Çok fazla lipaz aktivite ölçme teknikleri vardır. Bu konuda spektrofotometri, flurometri, titrimetri, türbidimetri, yüzey gerilim metodu ve HPLC ile serbest yağ asitleri bulma teknikleri sayılabilir (Thompson ve ark., 1999). Lipaz aktivite testi için çok yaygın kullanılan metotlar hidrolitik reaksiyonlara dayanırlar. Tribütirin (tribütirilgliserol) ve triolein (triolelgliserol) lipaz üreten bakterileri tanımlamak için petri kabında denemeler substratlar olarak kullanılır. Bundan başka lipaz aktivitesi değişik zincir uzunluğuna sahip yağ asitlerinin *p*-nitrofenilesterlerin hidroliziyle açığa çıkan *p*-nitrofenolun 410 nm'de spektrofotometrik ölçülmesiyle tayin edilir (Winkler ve ark., 1979; Penchreac'h ve Baratti 1996). Bu metod oldukça yaygın kullanılmaktadır. Bir başka yaygın kullanılan metot trigliseritden açığa çıkan yağ asitlerinin titrasyonudur (Jensen 1983). Lipazlar steroselektif sentetik reaksiyonlar için kullanılabilir. Lipaz steroselektivitesi genellikle bir karboksilik asit ile bir alkolün esterifikasyonu yapılarak belirlenir. Esterifikasyon hızı ve steroselektif ürün oluşumu kiral modifiye olmuş bir kolonda yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve gaz kromatografisi (GC) ile gözlenir.

1.2.2.2. Lipaz türleri

Lipazlar türlerine göre sınıflandırılır. Mevcut farklı veri bankalarının araştırması (e.g. Swiss Protein Sequence Database) amino asit sıra homoloğuna dayanan farklı sonuçlar oraya çıkarır. Jaeger ve ark. (1999) 47 farklı bakteriyel lipaz tanımlarlar ve lipazları 6 türde gruplandırırlar. Homolog serin hidrolazlar, Pleiss ve ark. (2000) tarafından 15 süpertür ve 32 homolog tür olarak ayrılır. Farklı lipazların substrat spesifiklikleri ve spesifik aktivitelerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması lipaz fonksiyonu kadar onların biyoteknolojik uygulamalar için kullanışlılığının belirlemede de kesinlikle araştırma gerektirir. Bununla birlikte sonuçların karşılaştırılması her zaman mümkün değildir. Çünkü esterazlardan lipazları ayırt

etmek için veya spesifik lipaz aktivitelerini belirlemek için kullanılan standart substrat yoktur (Illanes 2008).

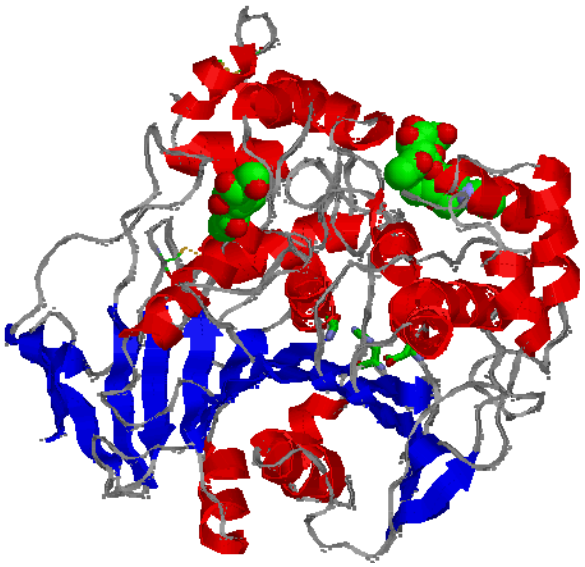
1.2.2.3. Lipazların üç boyutlu yapıları ve lipolitik mekanizması

Farklı kaynaklardan lipazların kristallendirilmesi anlatılmıştır (Misset ve ark., 1994; Jaeger ve ark., 1999). Memeliler, mantar ve bakteriyel lipazlar kristallendirilmiş ve 1990'dan beri lipaz yapısı bakteriyel orjinli pankreatik lipaz hariç hepsi X-ray ile belirlenmiştir (Jaeger ve Reetz 1998). Bu enzimler 20 ile 60 kDa arasında değişen molekül ağırlıklarına sahiptirler. Bunlar diziliş benzerlikleri olmamasına rağmen çok benzer katlanırlar (Smith ve ark., 1992). Diğer hidrolitik enzimlerin X-ray yapısına kıyasla aynı katlanma modeli paylaşan bütün bu enzimleri gösterir. Çünkü hepsi hidrolitik enzimlerdir, ortak katlama modeli α/β hidrolaz katlanması olarak isimlendirilir (Ollis 1992). Bu α/β hidrolaz katlanması altı α helikse kadar ile birleştirilen sekiz farklı β ipliğe kadarın oluşturulmasıyla bir merkez β tabakalı meydana getirilir (Jaeger ve ark., 1999). Lipazların aktif bölgesi histidin, aspartik (veya glutamik) asit ve serin kalıntıları içeren bir katalitik üçlü ile oluşturulur. Serin kalıntısı oksianyon boşluğuna uygun kalıntılar ile hidrojen bağları tarafından sağlamlaştırılmış bir açil enzim vermek için başlatılan substratların ester bağlarının karbonil karbon atomlarında serin oksijen ile nükleofilik atak olduğu yerde oluşan yüksek derecede korunmuş bir pentapeptit GXSXG yerleştirilir. Bu alkol serbest bırakılır ve açil-lipaz kompleksi katalitik devri kapatmak için serbest enzim ve yağ asidi vermek için sonunda hidroliz edilir.

Lide benzeyen yapı varlığında yüzeysel aktivasyonla ilişki gerekli değildir (Jaeger ve Reetz 1998): *Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia glumae* ve *Candida antartica* lipazları aktif bölgelerini kaplayan lidlere sahip olmalarına rağmen yüzeysel aktivasyon göstermezler. *Bacillus subtilis elde* edilen kutinaz ve guinea domuz pankreatik lipaz gibi diğer lipazlar, yüzeysel aktivasyona sahip olmalarına rağmen aktif bölgelerini kaplayan bir lidden yoksundurlar (Jaeger ve ark., 1999). Yüzeysel aktivasyon ve bir lid alanının olmasının sonuçlarına götüren bu gözlemler

bir lipaz olarak bir enzim sınıflandırmak için uygun olmayan bir kriterdir. Bununla birlikte lidin olması lipazların enantiyoselektivitesi, spesifikliği, dayanıklılığı ve aktivitesini ayarlamada önemli bir rol oynamak için önerilebilir (Lowrier ve ark., 1996; Secundo ve ark., 2006).

Günümüzde enzimlerin üç boyutlu yapıları, ayrıntılı bir şekilde X-ışınları kristalografisi ile görüntülenebilmektedir. Şekil 1.2 Bir lipaz enziminin tam bir yapısına örnek olarak *Candida rugosa* lipazının kristal yapısını göstermektedir (www.au-kbc.org/beta/bioproj2/index.html).



Şekil 1.2. *Candida rugosa* lipaz

1.2.2.4. Lipazın aktivasyonu ve inhibisyonu

İyonların ve reaktiflerin lipaz aktivitesine olan etkilerinin incelenmesi sonucu, ağır metal katyonlarının lipaz aktivitesini inhibe ettiği, alkali metal katyonlarının ise artırdığı görülmüştür. Lipaz aktivitesi üzerinde en etkili iyon Ca^{+2} olduğu görülmüştür (Öztürk 2001).

Bu iyon zeytinyağının lipaz katalizli hidrolizini hızlandırır. Bu işlemde Ca^{+2} iyonu:

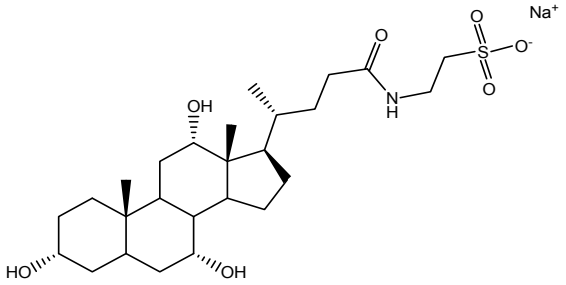
1. Enzime bağlama konformasyonunda bir değişikliğe sebep olur.
2. Yağ-su arayüzeyi için lipazın adsorpsiyonunu artırır.

3. Ürün inhibisyonunun olasılığını ortadan kaldırarak diğer yağ moleküllerinin lipaz bağı yapmalarına imkan vermek üzere yağ-su ara yüzeyinden hidroliz ile üretilen yağ asitlerini uzaklaştırır.

Bununla birlikte, bütirik asit yokluğunda bile suda çözündüğü için kalsiyum iyonu tributirin hidrolizini etkilemez.

Birçok materyalin lipaz aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur. Örnek olarak anyonik sürfaktantlar, bazı proteinler, Co^{+2}, Ni^{+2}, Hg^{+2}, Sn^{+2}, borik asit, dietil-*p*-dinitrofenil fosfat, fenilmetil sülfoilflorit, bazı karbamatlar, β-laktonlar ve diizopropilfloro fosfat gibi fosfor içeren bileşikler verilmiştir (Öztürk 2001; Akoh ve Min 1998). Ayrıca, Zn^{+2}, Mg^{+2}, EDTA ve sodyum dodesil sülfat lipaz aktivitesini bir miktar inhibe eder (http://www.iisc.ernet.in/~currsci/july10/articles 18.html).

Reaktifler veya iyonlar ile lipazın aktivasyonu veya inhibisyonu deney şartlarına, enzim kaynağına ve substrata bağlıdır. Tributirin substrat olduğunda sodyum taurodeksilat safra tuzu pankreatik lipaz aktivitesini inhibe eder ve 10 kDa protein lipazla birlikte inhibisyonu tersine çevirir, Triolein substrat olduğu zaman safra tuzu hidrolitik aktiviteyi uyarır. Bu durum trioleinin tributirinden lipaz için çok daha doğal substrat olduğunu göstermektedir. Dahası *Candida rugosa* lipaz aktivitesinin uyarılması tributirin olmadan substrat olarak zeytinyağı ile normal faz emülsiyonunda yağ asit ürünlerinin kalsiyum tuzları oluşumuna bağlanmaktadır, kalsiyumun yine de invert bir emülsiyona etkisi yoktur. Emülsiyon olmayan bir sistemde kalsiyum substrat olarak zeytinyağı ile *Candida rugosa* lipaz aktivitesine etkisi yoktur. Fakat safra asitinin inhibitör etkileri dengelemeye yönelik olmalıdır. Diğer yandan sodyum taurocholate (Şekil 1.3), substrat olarak zeytin yağı ile *Candida rugosa* lipazın bir emülsiyon deneyi için eklenildiği zaman aktivite safra tuzunun 0.1 mM'dan 0.8 mM konsantrasyonuna kadar kademeli olarak inhibe ettiği görülmüştür. Çizelge 1.1'de örnek verilmiştir (Öztürk 2001, Fadıloğlu 1996).



Şekil 1.3. Sodyum taurocholate

Çizelge 1.1. Mikrobiyal lipazların aktivatörleri ve inhibitörleri

Kaynak	İnhibitörler	Aktivatörler
H. lanuginosa	Co^{+2}, Ni^{+2} ,Cu^{+2} ,Sn^{+2} ,Hg^{+2}	$Lipaz^{+}$,K^{+} ,Ca^{+2}
P. nitens	Ag^{+} ,Hg^{+2} ,Pb^{+2} ,Cu^{+2} ,$KMnO_4$,NBS	Memeli safrası
C. deformans	Cu^{+2} ,Zn^{+2} ,PCMB, EDTA	Ca^{+2} ,Mg^{+2} ,Co^{+2}
A. niger	Ag, iyotasetamit	-
C. rugosa	Hg^{+2} ,Fe^{+2} ,Ca^{+2} ,Mg^{+2} ,Cu^{+2} ,Co^{+2}	-
Bacillus spp.	Cu^{+2} ,Zn^{+2} ,Hg^{+2}	-
P. fluorescens	I_2 ,Fe^{+3} ,NBS	Ba^{+2} ,Ca^{+2}
C. viscosum	Cu^{+2} ,Hg^{+2} ,Sn^{+2}	Ca^{+2} ,Mg^{+2} ,Mn^{+2} ,Safra tuzları
B. bassiana	Fe^{+2} ,Cu^{+2} ,Tween-80	Mg^{+2}
Porcine Pancreas	Ca^{+2} Sr^{+2} Mg^{+2}	Zn^{+2} ,Cu^{+2} ,Hg^{+2} ,iyot PCMB

1.2.2.5. Lipazların optimum pH'ı

Lipazlar sadece belirli pH değerlerinde katalitik olarak aktiftirler ve aktif bölgelerindeki grupların iyonlaşma durumu ve orjinlerine bağlıdırlar. Bazik, asidik ve nötral fonksiyoneller lipazların aktif bölgelerini kapsar ve bundan dolayı katalitik bölgedeki fonksiyonel gruplar iyonlaşma halinde aktiftirler. Çoğu Lipazlar için optimum pH 7 ile 9 arasında değişir (Öztürk 2001).

Mikrobiyolojik kaynaklı lipazlar pH 6,0–7,5 civarında yüksek kararlılık gösterirler. Örneğin, *Pseudomomas* lipaz optimum pH 7,0'de daha yüksek aktivite gösterir ve pH 5,0 ile 10,5 arasında dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Bakterinin doğasına kolayca uyum sağlaması sonucunda aktivite ve dayanıklılığının pH'a bağlılığı kültür şartlarına bağlıdır. Eğer bu organizmalar alkali pH'da yetişirse, üretilen bu lipazların da optimumu alkali bir pH'a olabilirler. Bazı bakteriyel lipazların optimum pH'ları Çizelge 1.2.'de verilmiştir (Öztürk 2001, Fadıloğlu 1996).

Çizelge 1.2. Mikrobiyal lipazların optimum pH

Kaynak	**Substrat**	**Optimum pH**
C. cylindracea	Zeytin yağı	5.0-7.0
	Tribiturin	7.0
P. fluorescens	Susam yağı	7.0
Bacillus spp.	Zeytin yağı	5.5-7.2
G. Candidum		
Lipaz I	Zeytin yağı	8.0
Lipaz II	Zeytin yağı	6.0
H. lanuginosa	Zeytin yağı	7.0
P. nitens	Zeytin yağı	6.0
C. rugosa	Zeytin yağı	7.1
S. thermophilus	Tributirin	9.0
S. faecalis	Tereyağı	7.5
Pseudomanas spp.	Mısır yağı	8.5

1.2.2.6. Lipazların optimum sıcaklık ve termal kararlılığı

Enzimlerin sıcaklık kararlılığı tek veya kombinasyonda en az iki faktör ile etkilenir. Birincisi enzimin primer yapısıdır. Enzim molekülünde hidrofobik amino asitlerin yüksek içeriği dış çevredeki bir değişiklik ile kolaylıkla denatüre olmayan sıkı bir yapı sağlar. Buna ilaveten disülfit köprüleri ve diğer bağlar hem kimyasal denatürasyona hem de sıcaklık inaktivasyonuna yüksek dayanıklılık sağlar. İkincisi, polisakkaritler ve iki değerlikli katyonlar gibi spesifik bileşikler eğer varsa molekülü stabilize edilebilirler (Öztürk 2001).

Genellikle lipazların geniş sıcaklık aralıklarının üzerinde aktif oldukları bilinir. Hayvansal ve bitkisel lipazlar genellikle hücre dışı mikrobiyal lipazlardan daha az sıcaklığa dayaklıdırlar. *Aspergillus niger* lipaz 50^{o}C de dayanıklı olmasına rağmen pankreatik lipazlar 40^{o}C'nin üzerindeki sıcaklıklarda depolamada aktivite

kaybolur. Bazı mikrobiyal lipazların optimum sıcaklık ve termal kararlılığı Çizelge 1.3.'de özetlenmiştir (Öztürk 2001, Fadıloğlu 1996).

Çizelge 1.3. Mikrobiyal lipazların optimum sıcaklık ve termal stabilitesi

Kaynak	Optimum Sıcaklık (^{o}C)	Stabilite (^{o}C)
P. fluorescens	45	-
P. nitens	40	40 (10 dak.)
Bacillus spp.	60	65 (30 dak.)
C. deformans	40-50	-
G. candidum	40	55 (15 dak.)
S. thermophilus	45	45 (1 hafta)
H. lanuginosa	45-55	65 (60 dak.)
C. viscosum	65	60 (10 dak.)
S. faecalis	40	40 (10 dak.)
C. rugosa	30-35	-

1.2.2.7. Lipazların izoelektrik noktası (pI)

İzoelektrik nokta net yükü sıfır olan noktadır. İzoelektrik noktaya yakın proteinler suda daha az çözünmeye eğilimdirler, pI'dan uzak olanlar ise suda daha çok çözünürler. Sulu çözeltide yüklü gruplar polar su molekülleri ve stabilize hidrofobik protein ile etkileşime girerler. Çok sayıda aromatik veya alifatik yan zincirler ve düşük sayıda yüklü gruplar suda az çözünen bir proteini karakterize eder. pI'dan daha da uzaklaştıkça iyonlaşmış grupların sayısı artar ve çözünürlükte artmaya yönelir. Bundan dolayı proteinlerin çözünürlüğünü etkilediği için izoelektrik nokta önemlidir (Whellcuright, 1991). Çizelge 1.4'de örnek verilmiştir. (Öztürk 2001, Fadıloğlu 1996, Peterson ve ark. 2001).

Çizelge 1.4. Çeşitli kaynaklardan elde edilen Lipazların izoelektrik pH'ı

Kaynak	PI
H. lanuginosa	6.6
P. nitens	5.9
G. candidum	4.4-4.8
S. faecalis	3.6
P. fluorescens	4.8-5.1
S. lipolytica	5.2 (Lipaz I)
	4.6 (Lipaz II)
A. niger	4.0 (Lipaz I)
	3.5 (Lipaz II)
C. rugosa	4.5
C. antarctica	6.5
P. glumae	7.0

1.2.2.8. Lipazların organik çözücülerde kararlılıkları

Sentez reaksiyonlarında kullanılan enzimlerin, organik çözücülerde kararlı olması istenir. Literatüre göre, lipazlar organik çözücülerde genellikle kararlıdırlar. Ancak *B. Thermocatenulatus* lipazının aktivitesi aseton, etanol ve metanol varlığında arttığı halde, *Bacillus sp.* Lipazı, hekzan ve *P. Aeruginasa* YS-7 lipazı ile aseton ile inhibe olmaktadır. Öte yandan *Acinetobacter calcoacatius* LP009 lipazı farklı organik çözücülerde yüksek derecede kararsızlık göstermektedir (Gupta ve ark., 2004, Akkuş 2006).

1.2.3. Lipazların Sınıflandırılması

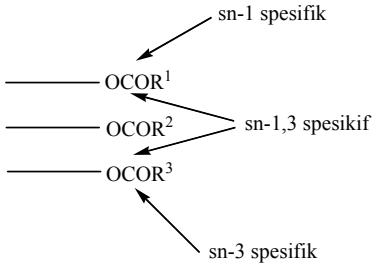
Lipazlar gliseritleri hidrolizleme yeteneklerine göre üç ana gruba ayrılırlar (Kartal 2004) (Şekil 1.4).

1.2.3.1. *1,3 - Spesifik lipazlar*

İlk grup lipazlar 2. pozisyondan parçalayamaz (Şekil 1.4), terminal gruplardan parçaladığından 1,3 spesifik olarak adlandırılırlar. Reaksiyon sonunda triaçilgliserinlerden yağ asitleri, 1,2 (2,3)-diaçilgliserinler ve 2-monoaçilgliserinler oluşur. 1,2 (2,3)-diaçilgliserinler ve özellikle 2-monoaçilgliserinler kimyasal olarak kararsız olup sırasıyla 1,3-diaçilgliserinlere ve 1(3)-monoaçilgliserinlere izomerleşirler. Böylece oluşan izomerler enzim tarafından tekrar substrat olarak kullanılabilirler ve sonuçta 1,3-spesifik lipazlarda spesifik olmayan lipazlar gibi trigliseritleri gliserin ve serbest yağ asitlerine kadar parçalarlar. Pankreas, *Aspergillus niger*, *Psedomonas fluorescens*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus* ve *Mucor* türlerinden elde edilen lipazlar 1,3-spesifiktir.

1.2.3.2. *Spesifik olmayan (Non-spesifik) lipazlar*

İkinci grup lipazlar spesifik değillerdir, hem primer hem sekonder esterleri parçalayabilirler. Reaksiyonda ara ürün olarak diaçil ve monoaçilgliserinler oluşur. Trigliseritler gliserin ve yağ asitlerine parçalanırlar. *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, *Candida rugosa, Staphylococcus aureus* ve *Geotrichum candidum* tarafından üretilen lipazlar spesifik olmayan lipazlar grubuna girerler.



Şekil 1.4. Farklı pozisyon spesifikliğine sahip lipazlar

1.2.3.3. *Yağ asiti spesifik lipazlar*

Üçüncü grup ise pozisyon olarak spesifik olmayan fakat yağ asidi seçimli birkaç lipazın oluşturduğu gruptur. Sadece özel bir tip yağ asidinin bulunduğu ester bağını parçalarlar (*geotrichum candidum* ve çimlenmemiş yulaf tohumları özellikle 9,10 doymamış yağ asitlerinin esterlerini parçalarlar). Lipazlar ayrıca zincir uzunluğu spesifikliği de gösterebilirler (peynir yapımında kullanılan lipazlar, kısa zincirli esterleri parçalarken, orta ve uzun zincir uzunluğuna sahip esterleri parçalamazlar).

Lipazlar, birçok enzimin aksine oldukça geniş substrat spesifikliği ve organik çözücülere karşı toleranslardan dolayı geniş sentetik potansiyele sahiptirler. Çözücü sisteme bağlı olarak hidroliz ya da sentetik reaksiyonlardan birini katalizleyebilirler. Trigliseritlerden başka alifatik, bisiklik ve aromatik esterler hatta organometalik bileşiklerin esterleri lipazlar tarafından substrat olarak kabul edilir. Rasemik esterler ya da birden fazla hidroksil grubuna sahip substratlar kullanıldığında, lipazlar yüksek enantiyo ve bölge seçimlilik ile aktivite gösterirler. Ayrıca oldukça fazla tiyoester ve aktif aminler de substratları olabilirler (Faber ve ark., 2000).

1.2.4. Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar

Lipazlar çeşitli reaksiyonlar için biyokatalizör olarak kullanılmaktadır. Hidrolitik enzimlerin aksine, farklı orjinlerden türeyen lipazlar polar olmayan organik çözücülerde oldukça kararlıdır. Lipazlar birçok değişik reaksiyonu katalizlerler. Örneğin hidroliz ve hidroliz reaksiyonunun tersi de esterifikasyon, transesterifikasyon (asidoliz, interesterifikasyon, alkoliz), aminoliz, oksimoliz ve tiyotransesterifikasyon. İleri (hidroliz) ve tersi (sentez) reaksiyonları arasındaki denge, reaksiyon karışımının su aktivitesi ile kontrol edilir (Öztürk 2001).

1.2.4.1. Hidroliz

Lipazlar su moleküllerinin tüketilmesiyle birlikte triaçilgliserollerin ester bağlarını bölerek katalizler ve bu olaya hidroliz denir (Şekil 1.5). Amerikan yağ asit endüstrisi Colgate-Emercy işlemi kullanarak yağları parçalamışlardır. Bu prosesde çok yüksek sıcaklıktaki buharlar yağ içerisine püskürtülür. Parçalamak için alışılmış şartlar 700 psig basıncı ve 240-260^{o}C veya daha yüksek sıcaklıktır. Bu işlem esnasında çoklu doymamış yağlar önemli bozulmaya uğrar ve kullanım için destilasyonla saflaştırılır. Ayrıca Colgate-Emercy işleminde yağ parçalanması esnasında pound (1 pound: 453,59 g) başına düşen enerjinin 340 btu civarında yani çok yüksek olduğu belirtilmiştir. Bundan dolayı yağ asiti oluşturan materyallerin hızlı bir şekilde hidrolizlenmesini sağlayan etkili ve pahalı olmayan lipaz katalizörlü işlemler geliştirilmiştir. Hidroliz işlemi oksitlenmeyen renksiz bir materyal elde etmek için oda sıcaklığında organik çözücüde yapılır. Yağ asidi asit tuzundan ziyade serbest asit olarak üretilir ve organik çözücü suları kullanarak lipazdan uzaklaştırılabilir. Verim oldukça yüksektir (% 97) (Akoh ve Min, 1998).

Bu yüzden, yağların enzimatik parçalanmasında lipazları kullanmak yüksek verimlilik ve spesifikliğin yanında düşük sıcaklık ve basınçta gerçekleştirildiğinden oldukça caziptir. Bu teknoloji, yağ asitleri, diaçilgliseroller, monoaçilgliseroller, günlük ürünler, tatlandırıcı maddeler ve deterjanların üretiminde kullanılmaktadır (Çizelge 1.4.) (Villeneuve ve ark. 2000; Sökmen 2005).

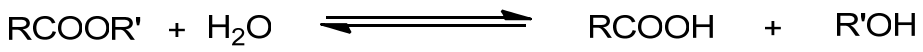
Çizelge 1.4. Lipazların endüstriyel uygulamalarına örnekler

ENDÜSTRİ ALANI	UYGULAMALAR	ÜRÜNLER
Hidrolizler		
Besin (günlük)	Süt yağının hidrolizi	Günlük ürünlerdeki Tatlandırıcılar
Kimyasal yağ işlemi	Katı ve sıvı yağların Hidrolizi	Yağ asitleri, mono- ve diaçilgliseroller Lipit analizi için reaktifler
Kimyasal (deterjan)	Triaçilgliserollerdeki yağ asitleri dağılımının analizi Yağ lekeleri, damlaları ve lipitlerin giderilmesi	Çamaşır ve ev eşyaları için Deterjanlar
Tıp	Kanda triaçilgliserol tayini	Rutin kitler
Esterifikasyon		
Kimyasal (kozmetik)	Esterlerin sentezi	Kiral ara ürünler Esterler,
Gıda (kimyasal ve ilaç)	Doğal yağların Transesterifikasyonu	Katı ve sıvı yağlar (örn: kakao yağ)

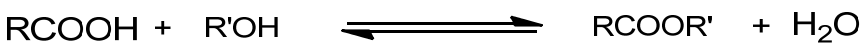
1.2.4.2. Esterifikasyon

Hidrolizin tersi olan, serbest yağ asitleri ile alkol arasında esterifikasyon reaksiyonları düşük su aktivitesi veya çözücüsüz sistem şartları altında az sulu organik çözücülerde lipazlar tarafından katalizlenir (Şekil 1.5). Ester sentezi asit veya baz katalizli ile kimyasal olarak yapılabilmesine rağmen enzim teknolojisinin kullanımı, ılıman koşullarda çalışma, azalmış yan reaksiyonlar ve spesifitesi gibi avantajlarından dolayı önerilmektedir.

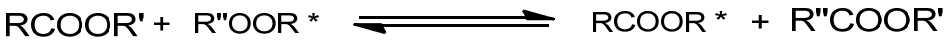
(1) Hidroliz



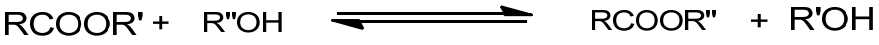
(2) Esterlesme (esterifikasyon)



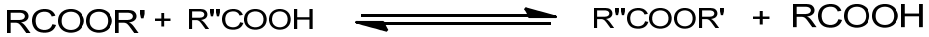
(3) Ester degisimi (interesterifikasyon)



(4) Alkoliz

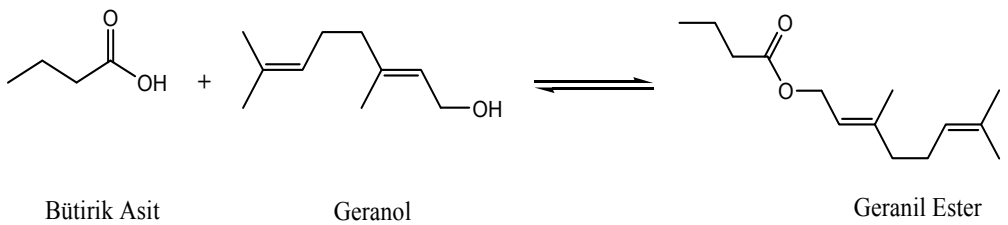


(5) Asidoliz



Şekil 1.5. Sulu ve susuz ortamlarda lipaz tarafından katalizlenen çeşitli reaksiyonlar

Çok kıymetli kimyasallar laurik asit ve mentol veya bütirik asit ve geranolden metil ve geranil esterlerinin üretimi ve primer ve sekonder alifatik ve terpenik alkollerden oleik asit esterlerinin üretimi lipaz katalizli ester sentezi ile yapılır (Şekil 1.6) (Villeneuve ve ark,. 2000).



Şekil 1.6. Geranil ester oluşumu

1.2.4.3. Ester değişimi (Transesterifikayon)

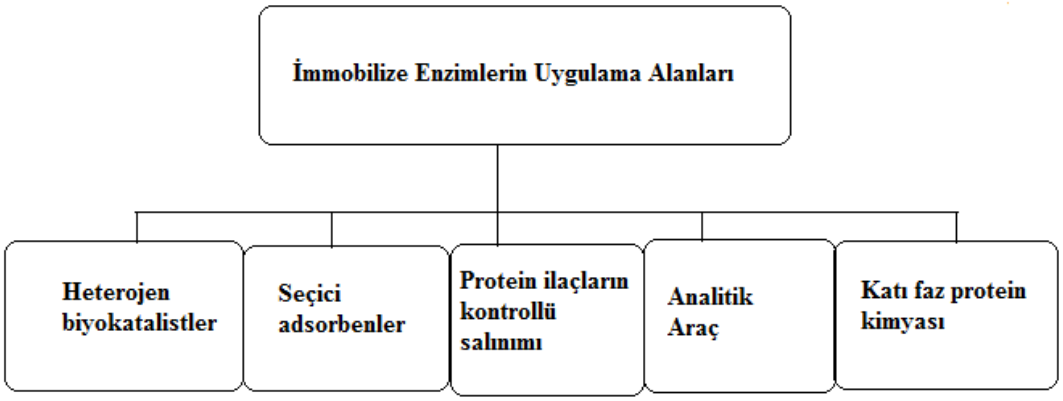
Transesterifikayon terimi bir ester ve bir alkol (alkoliz), bir ester ve başka bir ester (interesterifikasyon) veya bir ester ve bir asit (asidoliz) arasındaki grupların yer değiştirmesi işlemi olarak tanımlanır (Şekil 1.5). Transesterifikasyon, endüstriyel olarak uygun yüksek sıcaklıklarda susuz bir ester ile başka bir reaktant türlerinin bir karışımının ısıtılması sonucu gerçekleştirilir. Alternatif olarak daha düşük sıcaklıklarda alkali metaller veya alkali alkilatlar kullanılabilir. Bununla birlikte, transterifikasyonla hayvansal ve bitkisel yağların modifikasyonu için lipazların kullanımı ılıman koşullar, azalmış yan reaksiyonlar ve spesifite avantajlarından dolayı tercih edilir. Daha ucuz yiyecek maddeleriden kakao yağı üretimi buna bir örnektir. Bu reaksiyon palm yağı ve stearik asit veya palm yağı ve tristearogliserol içeren lipaz katalizli transesterifikasyonu ile gerçekleştirilmektedir (Villeneuve ve ark., 2000).

1.2.4.4. Doğal olmayan substratların katalizi

Lipazlar karboksilik asit esterlerinin hidrolizi ve sentezinin katalizini sınırlamaz. Alkol ve sudan başka bileşenleri de nükleofil olarak tanırlar. Lipazlar, böylece seçicilikle organik çözücülerde oksimoliz, transesterfikasyon, aminoliz gibi farklı reaksiyonları kataliz etme kabiliyetine sahiptirler. Susuz ortamda esterlerin aminolizinde lipazların seçiciliği peptid ve yağ amit sentezi için başarıyla kullanılmıştır. Bu sonuçlar düşük maliyette yeni deterjanlar ve optikçe aktif peptidler, polimerler ve sürfaktantların sentezinde lipaz teknolojisi kullanılarak elde edilmektedir (Villeneuve ve ark., 2000).

1.3. Lipazların Endüstriyel Kullanım Alanları

Son yüzyılın ikinci yarısından beri, sayısız çabalar, çeşitli uygulamalar için çözünmeyen immobilize enzimlerin gelişmesine harcanmıştır (Silman ve Katchalski, 1966). Bu uygulamalarda çözünen kısımlarından ziyade, immobilize enzimlerin kullanımından açıkca yararlanılır. Örneğin, tekrar kullanılabilen heterojen biyokatalizörler bu prosesin kontrolü ve etkili geri dönüşüm ile ürün maliyetini azaltma amacı ile (Vandamme 1983, Schulze ve Wubbolts 1999), dayanıklı ve tekrar kullanılabilen araçlar, analitik ve medikal uygulamalar için kullanılır (Stetter 1951, Clark ve Lyans 1962; Campbell ve ark., 1951; Watanabe ve ark., 1988; Chang 1977, Klein ve Langer 1986; Kircka ve Tharpe 1986). Seçici adsorbentler protein ve enzimlerin saflaştırılmasında (Dunlap 1974), temel araçlar katı-sıvı protein kimyasında (Bickerstaff 1984, Martinek 1985) ve etkili mikroaraçlar protein bazlı ilaçların kontrollü salınımında kullanılılırlar (Cristallini ve ark. 1997) (Şema 1.1).



Şema 1.1. İmmobilize enzimlerin uygulama sırası

Günümüzde yaklaşık olarak 4000 enzim bilinmekte olup, bunlardan 200'ü ticari olarak kullanılmaktadır (Sharma ve ark., 2001). Bu ticari enzimler içerisinde % 3 pazar payına sahip olan (Telefoncu, 1997) lipazlar, biyokatalizörler içerisinde önemli bir yer almakta ve biyoteknolojik uygulamalarda yüksek oranda

kullanılmaktadırlar (Ghosh ve ark., 1996; Benjamin ve Pandey 1998). Lipazlar, hem sulu hem de susuz çözücü sistemlerinde aktivite gösterdikleri için (Gupta ve ark., 2004; Nie ve ark., 2006), endüstride ve tıp alanında önemli bir yere sahiptirler (Bjokling ve ark., 1991). Bu enzimlerin lipit içeren atık suların enzimatik degradasyonu, organik sentez, deterjan formülasyonu, biyosurfektanların sentezi, oleokimyasal endüstri, süt endüstrisi, agrokimyasal endüstri, kağıt yapımı, besin, kozmetik, kimyasal analiz ve ilaç prosesinde umut verici uygulama alanları bulunmaktadır. Lipaz teknolojisindeki gelişmelerle birlikte yeni bileşiklerin sentezi için de bu enzimlerin kullanımları hızla artmaktadır (Ghosh ve ark., 1996; Sharma ve ark., 2001). Mikrobiyal lipazların, biyosensör olarak kullanılmaları ise yeni bir alan olarak ümit vaat etmektedir (Vakhlu ve Kour 2006). Biyoteknolojide çok yaygın olarak kullanılan lipazlar (Jaeger ve Reetz, 1998) Çizelge 1.5'de verilmiştir (White ve White 1997; Kazlauskas ve Bornscheuer 1998; Schmid ve Verger 1998).

Çizelge 1.5. Kullanımı yaygın bazı ticari mikrobiyal lipazlar

Tip	KAYNAK	UYGULAMA ALANI	ÜRETİCİ FİRMA
Fungal			
	C. rugosa	Organik sentez	Amano, Biocatalysists, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
	C. antarctica	Organik sentez	Boehringer Mannheim
	T. lanuginosus	Deterjan katkısı	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	R. miehei	Gıda işlenmesi	Novo Nordisk, Biocatalysists, Amano
Bakteriyel			
	B. cepacia	Organik sentez	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	P. alcaligenes	Deterjan katkısı	Genencor
	P. mendocina	Deterjan katkısı	Genoncor
	Ch. Viscosum	Organik sentez	Asahi, Biocatalysists

1.3.1. Gıda endüstrisinde lipazlar

Gıda imalatının geleneksel kimyasal proseslerini geliştirmek için enzimlerin kullanımı son birkaç yılda ekonomik ve teknolojik avantajları sebebiyle önerilmektedir (Benjamin ve Pandey 1998). Değişik işlemlerden geçirilerek (kimyasal ve inter-esterifikasyon) modifiye olmuş gliseritleri üretmek için bitkisel ve hayvansal yağların inter-esterifikasyonu peynir ve yiyecek maddelerindeki istenir

lezzette, mandıra, sebzeler, fırınlanmış yiyecekler, meyve suları) serbest veya immobilize olmuş *Candida rugosa* lipazlar ile imal edilir (Benjamin ve Pandey 1995, Stead 1986; (Yissum 1991). İtalyan peynirlerinde tat oluşturma, işlenmiş küflü peynirde tat iyileştirme gibi işlemler lipaz enzimi yardımıyla yapılmaktadır.

Gıda endüstrisinde lipazların önemli bir kısmı lipitlerin özellikle bitkisel ve hayvansal yağların biyokatalizinde rol oynarlar (MacRae ve Staines 1994, McGee 1986). Depolama sırasında lipit fraksiyonunda olan en önemli değişiklerden biri de bu ürünlerin karakteristik lezzeti için çok önemli olan serbest yağ asitleri tutularak lipazlar ile katalizlenmiş trigliseritlerin hidrolizidir (Langrand ve ark., 1990). Aksi takdirde trigliseritin istenilen fonksiyonel grubu, kontrollü ester yer değiştirme reaksiyonları ve esterifikasyon ile çıkarılabilir veya yer değiştirilebilir.

Mandıra ürünlerinde güzel koku geliştirilmesi uçucu yağ asitlerinin serbest bırakılmasına bağlıdır. Sığır, koyun ve keçi sütü yağında CRL'ın katalitik fonksiyonu uçucu düz zincirli yağ asitlerinin küçük miktarlarına kıyasla seçici olmayan uçucu dallanmış yağ asitlerinin yüksek miktarlarını elde etmede rol oynar (Jachamanian ve ark., 1996, Langrand ve ark., 1990). Oldukça yararlı gıda ürünlerinin lipaz katalizli interesterifikasyon ve transesterifikasyonunu ticarileştirmek için Japonya ve Avrupada epeyce büyük çabalar harcanmıştır (MacRae ve Hammond 1985, MacRae ve Staines 1994). Örnek olarak CRL içeren sebze yağı modifikasyonu için ester değiştirmesine yüksek endüstriyel kaliteli sebze yağlarında etkili bir şekilde değişebilen triolein gösterilebilir. Unilever şirketi gliseritler ve yağların inter-esterfikasyonu için bir seri patent elde etmiştir. Bu proseslerin çabası dondurma, suni krema, margarin gibi yağ bazlı gıda ürünleri ve emülsiyonda kullanmak için uygun yağların interesterifikasyonu yapmaktır (Benjamin ve Pandey 1998, Jaeger ve ark., 1994).

Geleneksel olarak, yağlı tohumlar, köklü mahsüller, sebzeler ve meyveler mayalanmış gıda, fırınlanmış veya pişirilmiş malzeme olarak bütün dünyada kullanılmaktadır (Lange 1993, Zalacain ve ark., 1995). Mayalanmış sebze ve meyvelerin önemli bir sonucu sezon olmadığı zaman böylece elde edilen bu ürünlerden yiyecek sağlamak için kullanılabilir ve depo edilebilir. Mayalanma ile olan biyodönüşüm mayalanmış ürünlerinin karakteristik ve duyu organlarını etkileyen (organoleptik) özellikleri için katkıda bulunur (Fleming 1991; Zalacain ve

ark., 1995). Birçok durumda mayalama sindirilebilen ve besinler değeri olan son ürünler için de katkıda bulunurlar (Nagooi ve ark. 1990). Örneğin, soya fasülyesi kuru halde oldukça iyi depo edilebilir, fakat soya fasülyesi pişirildiğinde bile kolaylıkla insanlar tarafından tüketilemez. Sıcaklık değiştirildiği zaman soya fasülyesi lezzetli, kolaylıkla sindirilebilen ve besinsel değeri yüksek gıda maddeleri için esas bir materyal olur (Rombouts ve Nout 1995; Zalacain ve ark., 1995).

Lezzet ve güzel kokuca zengin dondurmalar modern yaşamda büyük bir pazara sahiptir. Dondurmada kullanılan kısa veya orta zincirli yağ asitleri içeren lezzetli esterleri üretmek için birçok bilim adamı tarafından araştırılmıştır (Langrand ve ark., 1990, Takahata ve ark., 1993). Bununla birlikte, çözücüsüz sistemlerde üretilen lezzet bileşikleri leziz krema yapmak için güvenilir avantajlara (ürünler kirlilik olarak çözücü içermezler) sahiptirler (Oguntimein 1994). Ester değiştirme reaksiyonları istenilen lezzetli esterleri elde etmek için günümüzde kullanılmaktadır (McCrae ve ark., 1990).

1.3.2. Deterjan endüstrisinde lipazlar

Lipazların en önemli ticari uygulamaları başında çamaşır deterjanlarındaki kullanımları gelmektedir. Toplam lipaz satışının % 32'sini deterjan enzimleri oluşturmaktadır (Jaeger ve Reetz, 1998, Akkuş 2006).

Lipaz enzimi, büyük kimyasal şirket Rohm ve Hassın kurucusu Otto Rohm olarak adlandırılan bir Alman tarafından 1913'de bir çamaşır deterjanının etkisini artırmak için ilk kez kullanmıştır. Hayvan pankreasından elde edilen onun kullandığı bu preolitik enzim oldukça hamdır ve birçok kirlilik içermektedir. Rutin olarak kullanılan ev deterjanlarında kullanılan bir lipaz için, enzim ekstraksiyonunun prosesi yeterince ekonomik değildir. Bununla birlikte günümüzde hidrolitik lipazlar için ticari olarak çok önemli alan ev bulaşık makinelerinde, ev ve endüstriyel çamaşırhanelerde çoğunlukla kullanılan deterjanlara katkı maddesidir. 1994'de Novo Nardisk fungal *Thermomyces lanuginosus* kaynaklı *Aspergillus oryzae'*de ilk ticari rekombinant lipaz enzimi olan "Lipolase"ı piyasaya sürdü. 1995'de iki bakteriyel lipaz Genencor International tarafından üretilen *Pseudomonas alcaligenes*'den

"Lipomax" ve *Pseudomonas mendocina*'dan elde edilen "Lumafast" piyasaya sürüldü (Jaeger ve Reetz, 1998).

Enzimler deterjanlardaki istenmeyen kimyasalların azaltılmasını sağlar ve zararlı kalıntı bırakmadan biyolojik olarak ayrıştırılabilirler. Ayrıca daha düşük yıkama sıcaklığını sağlayarak enerji tasarrufuna katkıda bulunurlar (Karaca 2006).

Lipazların yağları hidrolizleme yeteneklerinden dolayı, endüstride ve evlerde kullanılan deterjanlarda ilave katkı maddesi olarak büyük bir kullanım alanı bulunmaktadır. Sert yıkama koşullarına dayanıklılığı, farklı kompozisyonundaki yağları hidroliz etme yeteneği ve zarar verici yüzey aktif maddelere dayanabilme yeteneği deterjan endüstrisinde aranan özelliklerdir.

Ayrıca deterjan uygulamalarına lipazlar yanında selulaz, amilaz, proteazlarda katkıda bulunurlar (Pandey ve ark. 1999).

1.3.3. İlaç endüstrisinde lipazlar

Bir eczacının en büyük hedeflerinden biri hidroliz gibi sentetik reaksiyonlarla lipaz katalizli biyoaktif bileşikleri yapmaktır. Buna ilaveten optik olarak saf enantiyomerler için *in situ* rasemleştirmedir. CRL sayısız yaşamı koruyan ilaçların üretimi için önde gelen sentetik reaksiyonları katalizleme yeteneğine de sahiptir **(**Çizelge 1.6) (Benjamin ve Pandey, 1998). Etkili kinetik rezulasyon prosesi biyokimyasal inhibitörler, ilaç ara ürünleri, antibiyotikler, sekonder alkoller ve alkoloidlerin enantiyospesifik sentezi için, potansiyel virucide carbovir (HIV'e karşı uygulanır) ve optik olarak aktif steroidal olmayan anti-inflamatör ilaçların hazırlanmasında lipazlardan yararlanılır.

Çizelge 1.6. CRL-katalizlenmiş önemli ilaçlar

Hedef	**İlk hali**	**Reaksiyon**	**Referans**
İbuprofen	Yağ alkolü	Esterifikasyon	Goto ve ark. 1996
Aspirin gibi ilaçlar	Astoksi ve feniletilbenzoatlar	Hidroliz	Cipiciani ve ark. 1996
Asetik asit türevleri	α-bağlı asetik asit ve metil esterler	Hidroliz	Noya ve ark. 1996
Prostaglandin	Çoklu doymamış yağ asitleri	Hidroliz	Wille 1996
Naproksen	Trimetil silil metanol	Esterifikasyon	Stinson 1995, Tsai ve ark. 1996
Ketoprofen	(R,S) kloroetil ketoprofen	Hidroliz	Lalonde 1995
İnhibitör ilaçlar	Trikarboksilik asit Alkenil ester	Esterifikasyon	Seufer-Wasserthal ve ark., 1995
Propaloaminler	Epoksit ve 2-propilamin	Esterifikasyon	Kamal ve Rao 1994
Anti-HIV carbovir	Azobisiklo hept-en-ones	Esterifikasyon	Nakano ve ark. 1994

Genellikle bir kiral merkez içeren ilaçların geleneksel kimyasal sentezi enantiyomerlerin eşit karışımı elde edilir. Son on yıldır, birçok araştırmacı rasemik ilaçların genellikle enantiyomerlerin birinin miktarını artıran prosesler geliştirirken, diğer enantiyomeri istenmeyen yan ürünler oluşturacak şekilde ayrılmasını sağlarlar.

CRL başlıca (S)-sterospesifikliği sayesinde tarım kimyasallarına kadar farmakolojiye büyük katkıda bulunur (Takahashi ve ark., 1995). Goto ve ark. (1996) gözlemişlerdir ki S-(+)-ibuprofen CRL ile kuru homojen organik ortamda tutulan esterifikasyon reaksiyonları ile ester formuna seçici olarak taşınır. Çok sayıda benzer çalışmalar yapılmıştır (Benjamin ve Pandey, 1998). İsooktanda trimetil silil metanol ile rasemik Naproksenin sterospesifikliği (S)-Naproksen ester üretiminde gelişmeler göstermişlerdir (Tsai ve ark. 1996). Yasufuku ve Ueji (1996), esterifikayon reaksiyonu etkili bir biçimde enantiyomerik değerleri ve de stereotercihde değiştiren süresince sıcaklık değişimini gözlemlemişlerdir. Ihara ve arkadaşları (1995) meso-dioller ve vinil asetatla akonitium alkoloitlerin sentezi için kiral yapılar üretiminde çalışırlarken CRL'ı enantiyomerik aşırılık % 96'ın üzerinde alkoloitleri vermişlerdir. İnter-esterifikasyon ve trans-esterifikasyon enantiyoselektivitesi famakolojide dealkilleme ve seçici alkilasyon için büyük öneme sahiptir (Stinson 1995).

1.3.4. Organik sentezde lipazlar

Organik sentezde katalizör olarak kullanılan lipazlar, substrat farklılıklarına göre etki göstermelerinden dolayı sentetik kimya için büyük avantaj sağlamaktadırlar (Ghosh ve ark., 1996). Lipazlar geniş bir çeşitlilik gösteren kemoselektif (kimyasal seçicilik), regioselektif ve stereoselektif transformasyonları katalizlemede kullanılmaktadır. Organik kimyada katalizör olarak kullanılan lipazların büyük çoğunluğu mikrobiyal kaynaklıdır (Sharma ve ark., 2001). Lipazın katalizlediği reaksiyonlarda organik çözücülerin kullanımı, çözücü olarak suya oranla dört temel avantaja sahiptir. Bunlardan birincisi, alkol veya asitlerin rasemik karışımları enantiyomerlerinde çözülmeden önce esterifiye olmaya ihtiyaç duymamaları, ikincisi bu enzimlerin, organik çözücülerde sudan daha kararlı olmaları, üçüncüsü organik çözücülerde çözünmemeleri nedeniyle tekrar kullanılabilirlik için immobilizasyona ihtiyaç duymamaları ve aktif durumlarındaki filtrasyonlarıyla toplanabilmeleri ve son olarak substrat ve ürünlerin sulu solüsyonda kararsız olmalarıyla bu durumda, organik çözücüde reaksiyon ürünün oluşması ve izolasyonu için gerekli olmasıdır (Ghosh ve ark., 1996, Aydoğmuş Öztürk 2006).

Lipazlar organik sentezde önemli katalizörler olarak kullanılır (Bornscheuer ve Kazlauskas 1999; Ghanem ve Aboul-Enein, 2005). Lipazlar trigliseritler olan doğal substratlara karşı yüksek aktivite gösterirler. Hidrolitik reaksiyon susuz sistemde dönüşümlü olduğu için bu katalizörler alkol ve açil donorlerden esterlerin oluşumunu da katalizleyebilirler.

Lipazlar kofaktörler gerektirmezler. Çoğu lipaz doğal olmayan substratların geniş bir aralığını kabul eder ve bundan dolayı organik sentezde uygulamalar için çok yönlüdür. Birçok durumda bunlar mükemmel steroselektivite gösterirler.

Lipazlar optikçe saf bileşikler elde etmesinde yaygın olarak üç temel tür reaksiyonda kullanılır. Bunlar rasemik karboksilli asitleri veya alkollerin kinetik rezulasyonu, meso dioller veya meso dikarboksilik asitlerin enantiyoselektif grup ayırımları, diol türevleri ve prokiral dikarboksilik asitlerin enantiyotopik grup ayırımları (Haraldsson 1992).

Asimetrik sentezin aksine bir kinetik rezulasyon istenilen enantiyomerin maksimum %50'sini verir (Klibanov 1989). Daha yüksek verim elde etmek için istenmeyen enantiyomer ayrılabilir ve ikinci adımda tekrar rasemleştirilebilir. Alternatif olarak bu durum bir dinamik kinetik rezulasyon ile elde edilebilir (Persson ve ark., 1999). Bununla ilgili bir çok metot araştırılmıştır (Williams ve ark., 2002).

1.3.5. Deri endüstrisinde lipazlar

Deri üretimindeki post ve deri işleme işlemi gelenekseldir. Deri işleme, deri altı yağlarının kaldırılması, kılların ayıklanması ve doldurma işlemlerini gerektirir. Proteazlar gibi diğer hidrolitik enzimlerle birlikte lipazlarıda içeren bir enzim karışımı deri işlemede kullanılır (Pandey ve ark., 1999, Karaca 2006).

1.3.6. Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde lipazlar

Kağıt endüstrisinde üretilen kağıt hamurundan katranı ayırmakta lipaz kullanılır. Katran, kağıt hamuru ve kağıt üretiminde ciddi sorunlara sebep olan trigliseridler ve balmumu olarak adlandırılan ağacın hidrofobik bileşenlerini tanımlamak için kullanılır. Japonya'daki Nippon Kağıt Endüstrisi, trigliseridlerin %90'nına kadar olan kısmını hidroliz etmek için *Candida rugosa*'dan elde edilen lipaz enzimini kullanarak bir katran kontrolü yöntemi geliştirmiştir (Jaeger ve Reetz, 1998, Sharma ve ark., 2001).

Ağacın hidrofobik içeriği olarak tanımlanan 'pitch' (trigliseritler ve mumlar), kâğıt hamuru yapımında sorun yaratmaktadır. Lipazlar kâğıt yapımı için kullanılan kâğıt hamurundan belirtilen maddelerin uzaklaştırılması için kullanılır.

1.3.7. Biyosensör olarak lipazlar

Enzimatik biyosensörler veya biyolojik mikro-aygıtlar kimyasal tanılarda, yiyecekte, yağ endüstrisinde, trigliseritleri kantitatif belirlemek için kullanılabilir (Haalck ve ark., 1991, Rakhimov 1986). Gliserol dehidrojenaz ile oksitlenen lipit hidrolizi sırasında serbest gliserolün olduğu yere lipazı kullanarak umut verici yeni bir metot bulmuşlardır. Reaksiyon süresince oluşan NADH flüoresans spektroskopisi ile ölçülmüştür. Yüksek spesifik aktivite ile spesifik olmayan lipaz gliserolün hızlı serbest kalmasına sağlamak için seçilmiştir (Schoemaker ve ark., 1994).

Lipitlerin belirlenmesinde lipazların önemli bir analitik uygulaması özellikle klinik amaçlar içindir. Doktorların ilgilendiği kadar bu prensip tam olarak kalple ilgili şikayeti olan hastaları teşhis için lipazlara imkan tanır (Mitsubishi 1990). Son zamanlarda Pittner ve ark. (1995) tarafından bir CRL biyosensörü geliştirilmiştir. DNA probu veya biyosensörlerin bileşeni olarak bir biyodeneme reaktifi olarak kullanışlı bir enzim-etiketli prob yapmışlardır.

Bir lipaz biyosensörü yapmada önemli bir amaç immobilizasyon ile biyokatalizörlerin tekrar kullanımı kolaylaştırmak için ve lipaz aktivitesinin ara yüzey kısıtlamasıyla karşılaşıldığı durumda substrat sunulmalıdır. Gerçekte çapraz bağlanmış enzim kristalleri (CLEC) olarak lipazın immobilizasyonu bir sıvıda bir analit bulmak için çok kullanışlı bulunmuştur (Pittner 1990, Toshiba 1989).

Lipazlar glikoz oksidaz ile kombinasyonunda pH/oksijen elektrotlarında immobilize edilebilir ve lipit biyosensörü olarak işlev görür (Karube ve Sode, 1988) ve trigliseritler (Iwai 1990) ve kan kolesterol belirlemesinde kullanılabilir (Imamura ve ark., 1989).

1.3.8. Rasemik asitlerin ve alkollerin ayrışmasında lipazlar

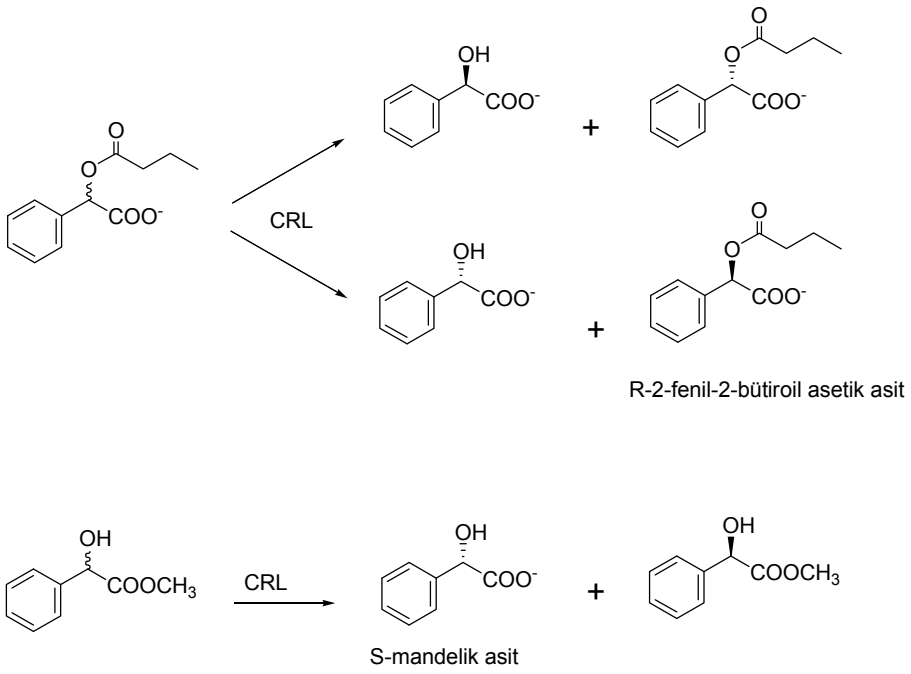
Lipazların stereoseçiciliği, birbiriyle karışmayan bir fazlı sistemlerdeki çeşitli rasemik organik asit karışımlarının ayrıştırılmasında kullanılmaktadır (Klibanov

1990). Aynı zamanda, rasemik alkoller de lipaz-katalizli transesterifikasyonla enantiyomerik olarak saf halde ayrıştırılabilir (Sökmen 2005).

Lipaz katalizli kinetik rezulasyon ile rasematların ayrılması, enantiyomerik olarak saf bileşikler elde etmek için kullanılan çok ilgi çekici metotlardan biridir.

Mikroorganizmalar ve enzimlerin özellikle rasemik karışımların kinetik rezulasyonu için çok uygundurlar. Saf (*S*)-ibuprofen, lipazın katalize ettiği hidroliz ya da esterifikasyon reaksiyonu aracılığıyla elde edilmektedir. Benzer bir şekilde 2-fenoksi-1-propanol; *Pseuduomonas sp.* lipaz kullanılarak ve enantiyo seçici transesterifikasyon reaksiyonu eliyle kendi enantiyomerlerine dönüştürmektedir (Sharma ve ark., 2001, Akkuş 2006).

Palomo ve ark. (2002), *Candida rugosa* lipazı farklı taşıyıcılara immobilize ettikten sonra immobilize olmuş enzimleri enantiyoselektif tepkimelerde kullanmışlar ve uygun koşullarda rasemik 2-fenil-2-bütiroil asetikasit ve rasemik mandelik asiti *R*-2- fenil-2-bütiroil asetikasit ve *S*-mandelik aside dönüştürmüşlerdir (Şekil 1.7.).



Şekil 1.7. Rasemik 2-fenil-2-bütiroil asetikasit ve rasemik mandelik asitin enantiyoselektif tepkimesi

1.4. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler suda çözünen, spesifik biyokatalizörlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olanak dışıdır. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılamadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör katılabilir, ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırılmaktadır. Serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde de pahalı katalizör olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir. Ayrıca serbest enzimler bu özelliklerden dolayı sürekli sistemlere de uygulanamazlar (Aksoy 2003).

Tüm bu sorunları olumlu yönde çözümleyebilmek, biyolojik sistemlerde üretilen proteinlerin büyük bir bölümünü oluşturan, teknik kimya ve biyoteknolojide çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanan enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek için bilim adamları bu katalizörlerin daha ekonomik ve kullanışlı hale getirilme olanaklarının araştırılmasına yönelmişlerdir. Böylece enzimlerin ısısal mekanik ve kimyasal kararlılıklarını artırmak ve birçok kez kullanabilirlik kılma düşüncesi immobilize enzim olgusunu doğurmuştur. Özellikle gıda ve ilaç sanayilerinde, analitik kimya uygulamalarında saf ürün elde etmek amacıyla katalizör olarak kullanılan enzimlerin immobilize edilerek teknolojide kullanılmaları son yıllarda büyük önem kazanmıştır. Özellikle son yıllarda enzim immobilizasyonu üzerine araştırmalar yoğunlaşmış olup bu alanda yapılan yayınların sayısıda yıldan yıla önemli oranda artmaktadır (Fernandez-Lafuente ve ark. 1998; Kılınç ve ark. 2002; Salis ve ark. 2005, Bai ve ark. 2006; Zeng ve ark. 2006; Chiou ve Wu 2004; Desai ve ark. 2006; Krajewska 2004; Hung ve ark. 2003; Messing 1975; Woodward 1985; Sharp ve ark. 1969; Guisan 2006; Noureddini ve Gao 2005; Fuentes ve ark., 2001, Cao 2006).

İmmobilizasyon teknolojisi kimya, biyokimya ve hücre biyolojisi disiplinleri ile biyokimyasal ve proses mühendisliklerini birleştirir (Aktaş 2004, Uygun 2006).

Tarihte ilk enzim immobilizasyonu Nelson ve Griftin (1916) tarafından adsorpsiyon yöntemiyle gerçekleştirilmiş, modern anlamda ise ilk olarak Grubhofer ve Schleith (1953) tarafından bazı immobilize enzim türleri hazırlanarak kinetik parametreleri incelenmiştir. Daha sonra bu alandaki çalışmalar dünyanın her tarafından bilim adamlarının ilgisini çekmiş ve enzimler değişik amaçlarla immobilize edilmiştir (Mosboch 1971, Manecke ve Singer 1960). Biyokatalizörlerin immobilizasyonu üç basamaktan geçerek günümüze kadar gelmiştir (Çizelge 1.7)

Çizelge 1.7. İmmobilize enzimlerin gelişmesindeki adımlar (Hartmeier 1988, Guisan 2006)

Adım	**Tarih**	**Kullanımı**
Birinci	1815	Asetik asit ve atık su muamelesi gibi proseslerde deneysel uygulamaları
İkinci	1960 lar	Tek enzim immobilizasyonu: glikozun izomerizasyonundan L-aminoasitlerin üretimi
Üçüncü	1895-1995	Hücre immobilizasyonu ve kofaktör yenilenmesi içeren çoklu enzim immobilizasyonu

İmmobilizasyon işlemi ile;

1. İmmobilize enzimin optimum pH sı değişebilir.

2. Km değerleri immobilizasyondan etkilenebilir.

3. Enzimin optimum sıcaklığında artışlar olabilir.

4. Matriks, enzim için yeni bir ortam oluşturarak enzimin aktivitesini değişik yollarla etkiler. Enzimin aktif bölgesinde değişikliğe uğrayabilir veya matriks substratın hareketini engelleyebilir (Aksoy 2003).

1.4.1. İmmobilize Enzimlerin Özellikleri

İmmobilizasyon prosesleri başlıca ekonomik yönden avantajlar sağlar. Bununla birlikte, kullanılan immobilizasyon tekniği hangi yöntem olursa olsun immobilize edilen enzimden beklenilen özellikler şunlardır (Telefoncu 1997):

(a) Enzimler tekrar tekrar kullanılabilirler.
(b) Proses kolaylıkla kontrol edilebilir ve devamlı çalıştırılabilir.
(c) Ürünler kolaylıkla ayrılabilir.
(d) Kirlilik problemleri en aza indirilebilir.
(e) Enzim özellikleri (aktivite ve ısıya dayanıklılık gibi) olumlu yönde değiştirilebilir.
(f) Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
(g) Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.

İmmobilize enzimler serbest enzimlere göre birçok üstünlüklere sahiptir. Bu da enzimlerin kesikli veya sürekli işlemlerde kullanımını kolaylaştırmaktadır

1.4.1.1. Taşıyıcı destek materyali

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıda aşağıdaki bazı özellikler bulunmalıdır (Telefoncu 1997).

- Suda çözünmeme
- Hidrofilik karakter
- Gözenekli yapı
- Mekanik stabilite ve uygun partikül formu
- Kimyasal ve termal kararlılık

- Mikroorganizmaya karşı dirençlilik
- Ucuzluk
- Zehirsizlik
- Rejenere olabilme

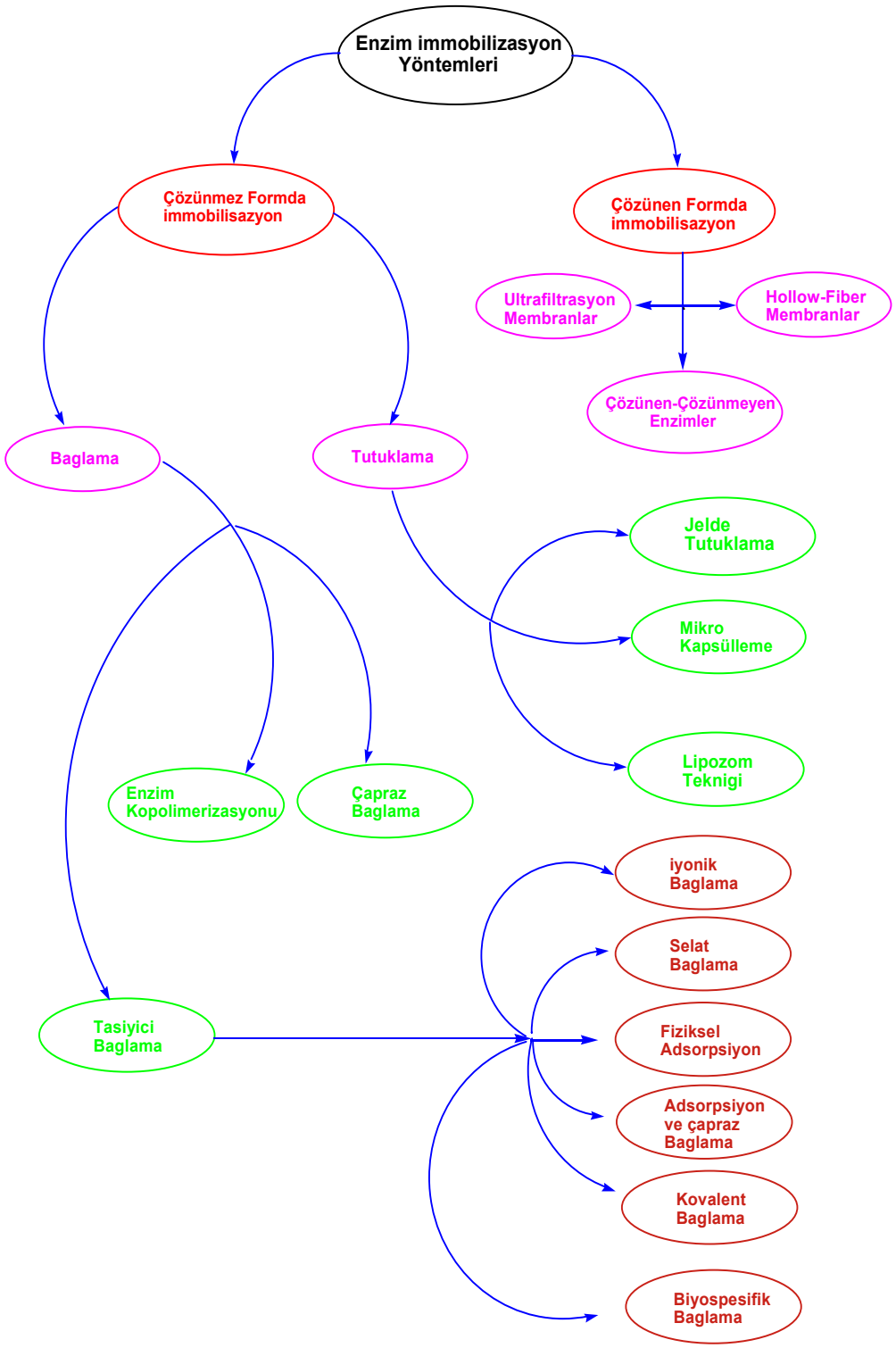
Enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan taşıyıcılar anorganik, doğal ve sentetik polimerlerdir. Bu taşıyıcılara ait örnekler Çizelge 1.8'de verilmiştir.

Çizelge 1.8. Taşıyıcıların sınıflandırılması (Guisan 2006)

Organik
Doğal polimerler ❖ polisakaritler :selüloz, dekstinler, agar, agaroz, aljinat ❖ proteinler : kollojen, albumin ❖ karbon Sentetik polimerler ❖ Polistiren ❖ Diğer polimerler: poliakrilat polimetakrilatlar, poliakrilamit, poliamitler, vinil ve alil polimerler
İnorganik
Doğal mineraller : Bentonit, silika İşlenmiş materyaller : Cam (gözenekli ve gözeneksiz), metaller, gözenekli metal oksitler

1.4.2. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilizasyonunda, fiziksel ve kimyasal bağlama yöntemleri kullanılır. Kimyasal yöntemlerde, enzim ve katı destek arasında, kovalent bağlar oluşturulur. Fiziksel yöntemlerde ise, enzimin desteğe daha zayıf bağlanması veya hapsedilmesi söz konusudur (Telefoncu 1997, Karaca 2006).



Şekil 1.8. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilize edilirken aktif merkezin bu işlemden kesinlikle etkilenmemesi gerekir. Aktif merkezde farklı fonksiyonlara sahip iki bölge bulunmaktadır. Bunlardan biri katalitik merkez diğeri ise substrata spesifikliği sağlayan merkezdir. Aktif merkezdeki aminoasitler veya merkezin üç boyutlu yapısı değişirse katalitik aktivite azalır ve substrat spesifikliği değişir. İmmobilizasyon işlemi ılıman koşullarda gerçekleştirilmelidir. Yüksek sıcaklık, kuvvetli asidik veya bazik ortam, organik çözücüler ve yüksek tuz konsantrasyonu ile muamele denatürasyona dolayısı ile aktivite kaybına neden olur (Sökmen 2005). Enzim immobilizasyon yöntemleri Şekil 1.8.'de sınıflandırılmıştır.

1.4.2.1. Taşıyıcıya bağlama yöntemleri

Taşıyıcıya bağlama enzim immobilizasyonu için en basit metodudur. Fiziksel adsorpsiyon, kovalent bağlama ve iyonik bağlama gibi üç farklı metotla taşıyıcıya bağlama, uygulama ve desteğin tipine bağlı uygulanır (Sheldon 2007).

1.4.2.1.1. Fiziksel adsorpsiyon

Adsorpsiyon bazlı enzim immobilizasyonu, enzim immobilizasyon metotları arasında ilktir. Adsorpsiyon metodu ile immobilize enzimleri ilk hazırlayan 1916 tarihinde Nelson ve Griffin (1916) olarak rapor edilmiştir. İnvertaz katalitik olarak aktif olan kömür üzerine fiziksel adsorpsiyon ile immobilize edilmiştir. İlk endüstriyel olarak immobilize enzim kullanımı DEAE-selüloz üzerine amino asit açilazın adsorpsiyonudur (Tosa ve ark. 1967).

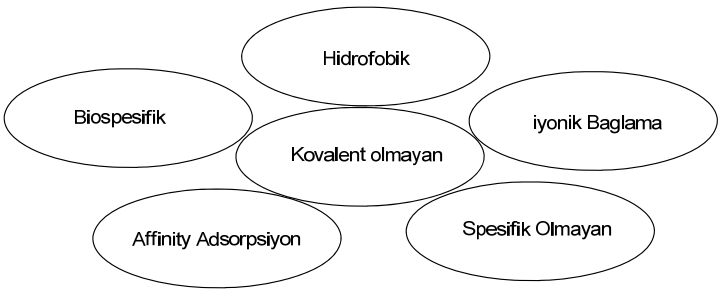
Katı bir destek üzerine fiziksel adsorpsiyon yöntemi immobilize enzimleri hazırlamak için en basit, hızlı bir metotdur ve enzim ile taşıyıcı arasında tersinir ve yüzey etkileşimleri ile olur.

Adsorpsiyon ile immobilizasyonda hidrofobik etkileşimler de söz konusu olsa da en çok Van der Waals, iyonik ve hidrojen bağı etkileşimleri gibi elektrostatik

güçler etkindir. Aktif bölgesi genelde etkilenmez ve enzim yüksek bir aktivite gösterir.

Yöntem suda çözünmeyen, adsorpsiyon özelliklerine sahip bir yüzey aktif taşıyıcı ile enzim çözeltisinin uygun koşullarda (pH, iyonik güç vb.) bir süre inkübasyonu ve sonrasında adsorplanmış enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması şeklinde uygulanır. Çok sayıda enzim bu metoda göre immobilize edililirler. Fiziksel immobilizasyon işleminde yeniden kullanım, aktivasyon verimi oldukça düşüktür. Sonuç olarak adsorpsiyon hızlı, ucuz, kolaylıkla gerçekleştirebilen ve kimyasal bağlanmadan daha az enzim proteinini bozmaya eğilimlidir. Yöntemin sakıncaları ise; optimum koşulları belirlemenin zorluğudur. Enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa enzim serbest halde reaksiyon ortamına geçerek ürünleri kirletebilir. Diğer bir dezavantajıda substrat ve diğer proteinlerin spesifik olmayan adsorpsiyonudur. (Chibata 1978, Mesing 1975, Taylor 1991).

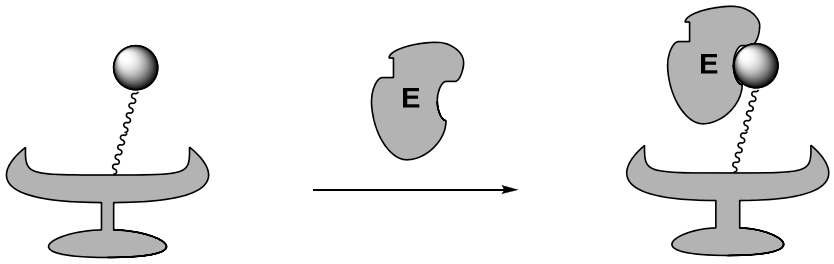
Bazen enzimler uygun taşıyıcılara güçlü adsorbe olabilirler ve adsorpsiyon uygulama şartları altında yeterince dayanıklıdırlar (Rexova-Benkova ve ark., 1982). Son yıllarda adsorpsiyon yönteminin dezavantajlarını gidermek için çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin; adorpsiyon-çapraz bağlama, adsorpsiyon modifikasyonu, seçici adsorpsiyon-kovalent bağlama ve adsorpsiyon-kaplama gibi. Enzim immobilizasyonun birçok sınıflandırması vardır. Bunlar, spesifik olmayan adsorpsiyon (Wallace ve Lovenberg 1974, Yoshioka ve Shimamura 1986), iyonik bağlı (Maxim 1986, 1987), koordinasyon (metal şelatlama) (Moriya ve ark.,1989) ve affiniti adsorpsiyon (Ahmad ve ark., 1973) kovalent olmayan taşıyıcı bağlı enzim immobilizasyonlarıdır (Şema 1.2.).



Şema 1.2. Kovalent olmayan adsorpsiyon ile taşıyıcılara enzimleri bağlama sınıflandırılması

- Spesifik olmayan fiziksel adsorpsiyon, hidrofilik etkileşim, hidrojen bağları, Van der Walls güçleri gibi spesifik olmayan güçler vasıtasıyla enzim adsorbe edilir.
- Bio-spesifik adsorpsiyon; enzimlerin adsorpsiyonu için immobilize olmuş ligantlar kullanılır.
- Affiniti adsorpsiyon; ya immobilize olmuş lipazlar yada immobilize olmuş boyalar ile olur (Lowe ve ark., 1980, Porath ve ark., 1975)
- Elektrostatik etkileşim (iyonik bağ dahil); enzim ile taşıyıcı arasında yük transferine dayanır (Maxim ve ark., 1986, 1987, 1989, 1992).
- Hidrofobik etkileşim; taşıyıcı ve enzimin hidrofobik bölgelerinin etkileşimine dayanır.

Temel olarak taşıyıcının tipi (sentetik, doğal veya çözünmeyen organik veya inorganik) spesifik olmayan bağlanma ile enzimleri adsorbe etmede kullanılır (fiziksel adsorpsiyon). Spesifik olmayan fiziksel adsorpsiyondan başka adsorpsiyon için uygun işlevsellik, örneğin; iyonik adsorpsiyon için yüklü gruplar, hidrofobik etkileşim için hidrofobik kuyruk, affiniti adsorpsiyon için immobilize olmuş ligantlar taşıyıcılara tanıtılmalıdır.

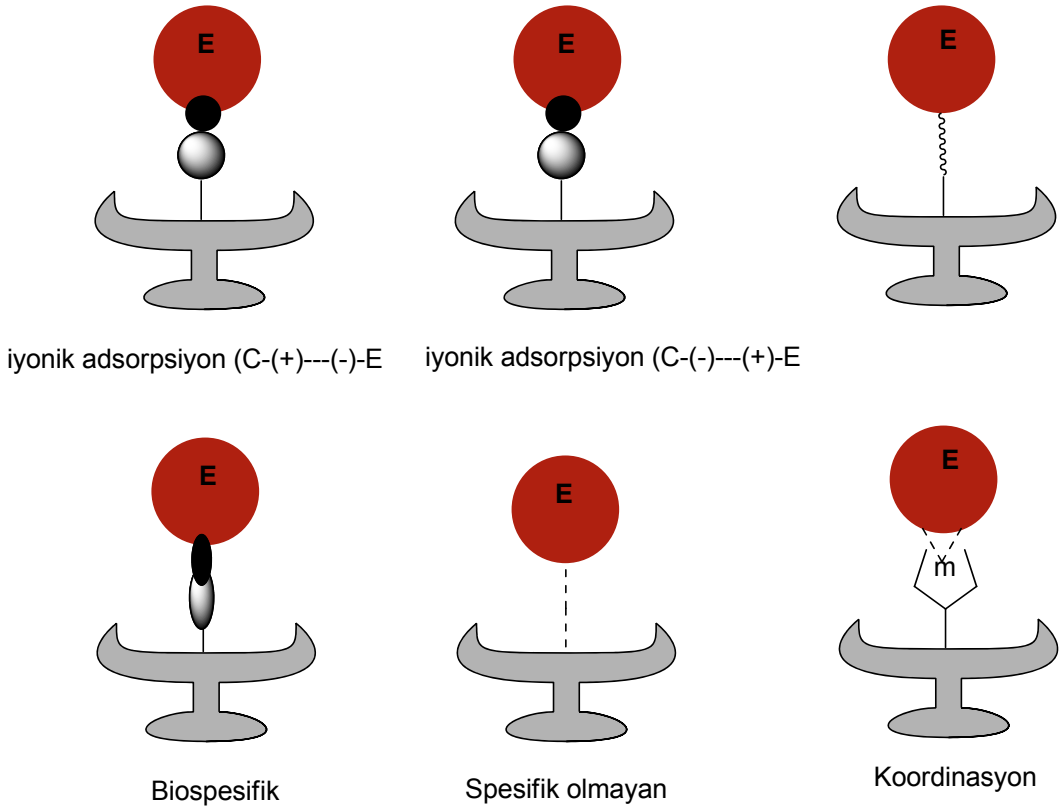


Şema 1.3. Bir taşıyıcıda bir enzimin kovalent olmayan immobilizasyonu

Şema 1.3.'de görüldüğü gibi kovalent olmayan enzim immobilizasyonu çoğunlukla spesifik bir bağlayıcı ligant varlığında bağlanır. Örneğin; Gözenekli iki farklı affiniti ligantla (iminodiasetik asit-Cu(II) ve konkanavalin A) modifiye edilmiş çinko bazlı partiküller enzim immobilizasyonu için kullanılmıştır. Bu, sadece bir tip

etkileşimi bulmaya yardımcı olur ve destek yüzeyinde spesifik olmayan etkileşimleri gösterir (Moriya ve ark., 1989).

Şema 1.4.'de gösterildiği gibi, spesifik olmayan bağlama hariç, diğer bağlama çeşitleri genellikle taşıyıcıların yüzeyi için bağlanmış uygun bağ grubu olması gerekir.



Şema 1.4. Enzimlerin adsorplayıcı immobilizasyonunun çeşitli ifadelerdeki örnekleri

Diğer taraftan, spesifik olmayan bir taşıyıcının türevlendirilmesi spesifik bir adsorbentin oluşumuna yol açar. Örneğin, silikajel enzim immobilizasyonu için (başlıca hidrofilik etkileşim ile) spesifik olmayan adsorbent olarak kullanılabilir buna karşın uzun alkil zincire sahip silikajel hidrofobik etkileşimlerle enzim adsorpsiyonu için spesifik adsorbent olarak kullanılabilir. Bu şartlar altında yapısının hidrofilik özelliği korumuşlar (Nemat-Gorgani ve Karimian, 1986). Spesifik bağ gruplarının tanıtımı adsorpsiyon kapasitesini genellikle artırır. Örneğin, poli (HMA-co-MMA) mikroküreler üzerinde enzimlerin spesifik adsorpsiyon kapasitesi taşıyıcı için

affinite boyalar bağlanmasıyla yolun boyu artırılmış (Denizli ve ark., 2000). Spesifik olmayan fiziksel ve spesifik etkileşim arasındaki diğer yöntemlerin farklılıkları spesifik olmayan etkileşimde olan güçlerin spesifik adsorpsiyon ile karşılaştırıldığında genellikle çok zayıf etkileşim olmasıdır.

Bu alandaki araştırmalar enzim taşıyıcı olarak yeni gözenekli materyaller araştırılmıştır. İnorganik materyaller, örneğin; zeolitler (Knezevic ve ark., 1998; Liu ve ark., 1997), cam boncuklar (Scharer ve ark., 1992; Bosley ve Claytom 1993), selit (Kermasha ve Bisakowski 1998, Castro ve ark., 1999; Fadıloglu ve Soylemez 1998), silikajeller (Sonnet ve ark., 1994; Maeda ve ark., 1997) ve $CaCO_3$ (Rosu ve ark., 1998) ve organik polimerler : polipropilen (Pencreac'h ve Baratti 1997), polietilen (Huang ve Ju 1994), polistiren divinilbenzen ve türevleri (Xu ve ark., 1995) ve polivinil alkol (Carbone ve ark., 1999) enzim taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Tipik bir prosedür olarak, öncelikle enzim bir çözücüde çözünür ardından gözenekli destek maddesi ile bir süre boyunca ıslatılır. Bu immobilizasyon ıslatılmış gözenekli destek maddesinin kurutulması ve yıkanmasıyla tamamlanır. Enzimler ve gözenekli destek maddesi arasında birliği artırmak için daha sonra arasıra fonksiyonel grupların eklenmesiyle termal kararlılık aktarılır. Enzim ve destek maddesi arasında zayıf etkileşimden dolayı bu immobilize olmuş enzim normalde uzun süre dayanıksızdır.

Adsorpsiyon immobilizasyonuna bir örnek olarak Knezevic ve ark. (1998) verilebilir. Enzim taşıyıcı olarak Zeolit Y kullanmışlardır. *Candida rugosa* lipaz immobilize edilmiş ve bu immobilize enzim hurma yağının hidrolizinde kullanılmıştır.

1.4.2.1.2. Kovalent bağlama

Uygun bir destek maddesi ile enzimleri kovalent bağlama metoduyla enzim immobilizasyon için ikinci metot olarak geliştirilmiştir. Enzimlerin kovalent immobilizasyonu 1950'lerden beri gelişmektedir ve günümüzde enzim immobilizasyonu için önemli bir metot olmuştur. Çünkü kovalent bağlar diğer kovalent olmayan adsorpsiyon bazlı enzim immobilizasyon metotları ile

karşılaştıracak olursa genellikle enzim ve taşıyıcı arasında en güçlü bağları sağlar (Zarbosky 1973). Bundan dolayı kullanılan matriksten enzimin sızıntısı kovalent bağlanmış immobilize enzimler ile sıklıkla minimuma indirilmiş olunur.

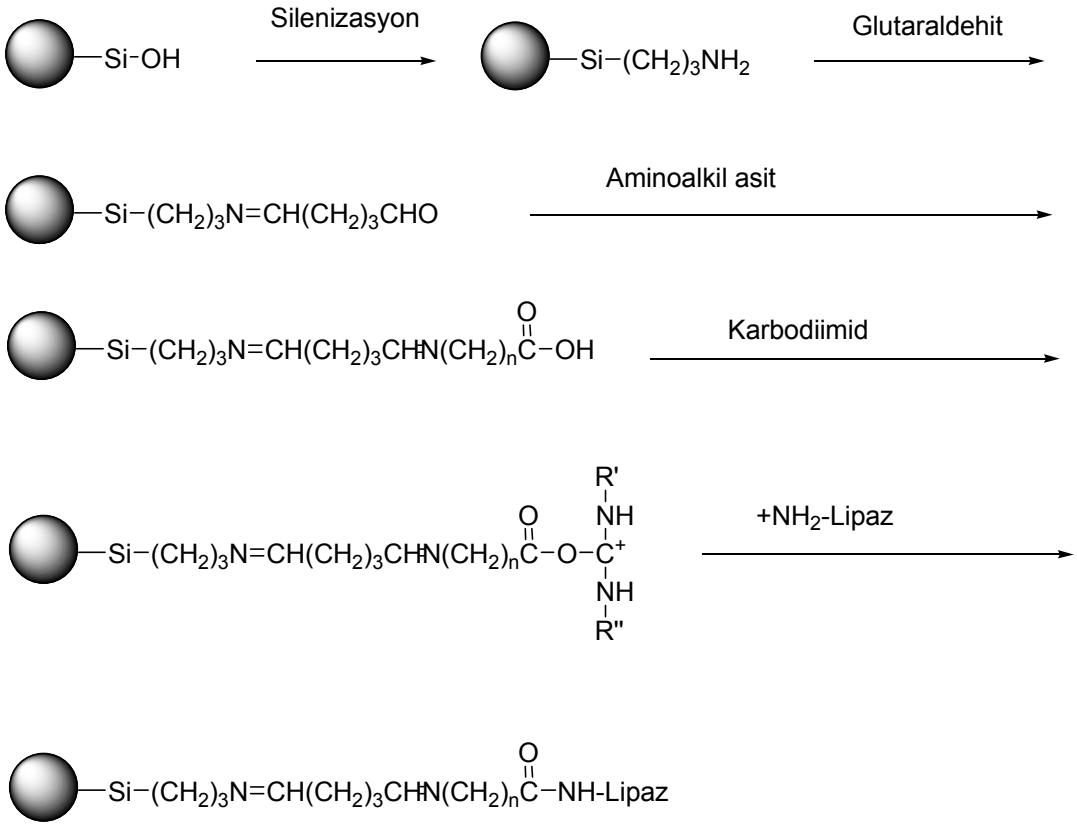
Bu metot enzim immobilizasyonu için birçok kimyasal reaksiyonları içerir. Genelde gözenekli taşıyıcı immobilizasyon basamağından önce aktivite edilmelidir. Ardından çapraz bağlayıcı bir ajan, enzimin fonksiyonel bir grubuyla aktivite edilmiş taşıyıcıyı bağlamak için kullanılır. Bu araştırma alanında gözenekli taşıyıcılar ve enzimler için çapraz bağlayıcı ajanlar ve uygun aktivasyon araştırılarak birçok çalışmalar yapılmıştır (Bhatia ve ark., 1998)

Çok basamaklı enzim immobilizasyon tekniği süresince enzimin deaktivasyonuyla sonuçlanır. Buna rağmen eğer gerekli kimyasallar enzimle uyumlu olurlarsa enzim ile destek maddesi arasında kovalent bağdan dolayı immobilize enzim iyi aktivite gösterebilir (Gao 2004).

Fonksiyonel grup ve desteğin seçimi enzim ve desteğin davranışı ve enzimin dayanıklılığına bağlıdır. Desteğin fonksiyonel gruplara kovalent bağlanması katalitik hareket için enzimin yapısında gerekli olmayan bölgeden yapılır. Burada enzim dayanıklılığını artırmak için kullanılan bir kaç koruyucu metotlar vardır (Cao ve ark., 2003).

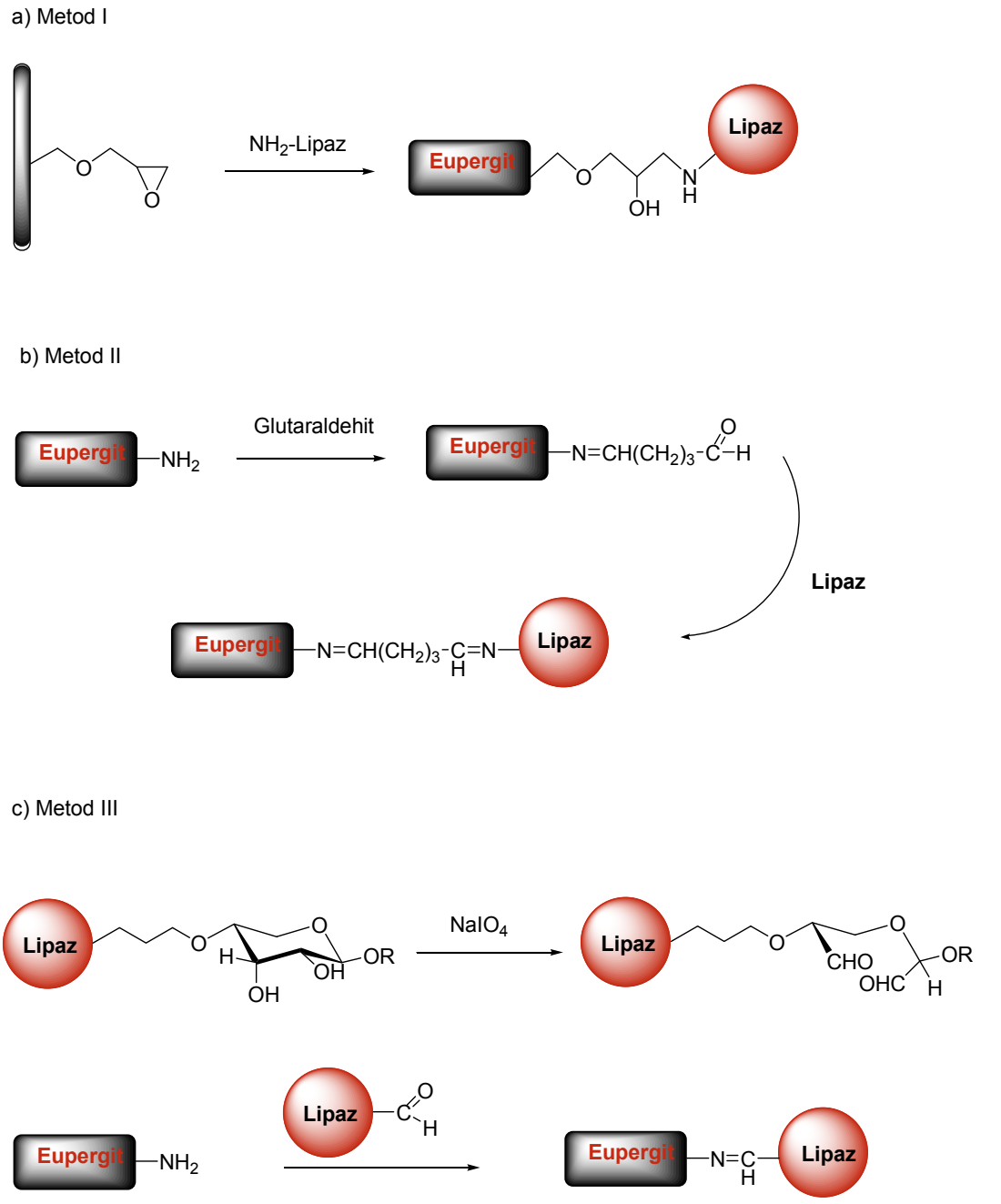
- İnhibitör veya substratın varlığında enzimin bağlanması
- Tersinir enzim-inhibitör kompleksi
- Çapraz bağlayıcı ile kimyasal olarak modifiye edilmiş enzim

Kovalent immobilizasyona bir örnek olarak Cho ve Rhee (1993) tarafından gerçekleştirilen silika bazlı immobilizasyonu verebiliriz (Şekil 1.9). Bu immobilizasyon şeması Şekil 1.9'da verilmiştir. *Mucor miehei* lipaz kovalent olarak beş aminoalkil asit çapraz bağlayıcılarla (3-aminopropiyonik asit, 5-aminovalerik asit, 6-aminohekzanoik asit, 7-aminoheptanoik asit ve 8-aminooktanoik asit) ve florisil aktivasyon aracı olarak glutaraldehitinde yardımıyla florisil üzerine (bir inorganik matriks: magnezyum silikat) immobilize etmişlerdir. Bu immobilize lipazı zeytin yağın hidrolizinde kullanmışlardır (Gao 2004).



Şekil 1.9. Silika-bazlı bir materyale enzimin kovalent bağlaması

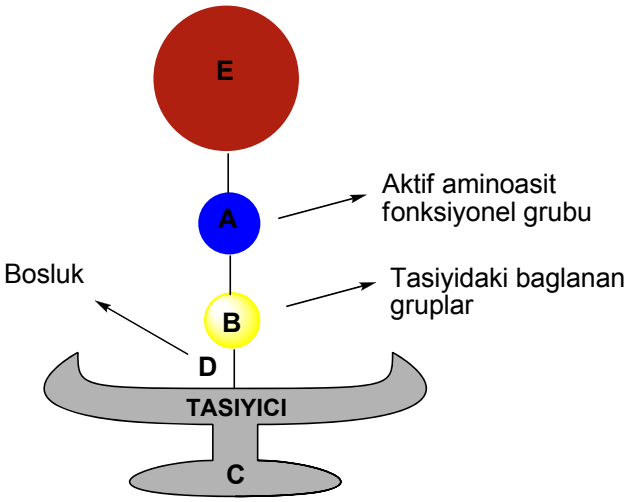
Knezevic ve ark. (2006), Eupergit C destek maddelerine *Candida rugosa* lipazın immobilizasyon için üç farklı kovalent immobilizasyon metodu uygulaşmışlardır. Enzim yüklemeleri, aktiviteleri ve bağlama verimleri karşılaştırmışlardır. Geliştirilmiş bu immobilizasyon prosedürü sulu sistemde oldukça kolay ve kolaylıkla tekrar kullanılabilir ve lipaz uygulamaları için umut verici bir çözüm sağladığını savunmuşlardır (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. Eupergit üzerinde lipaz immobilizasyonunun üç farklı kovalent metodunun şematik gösterimi

Genelde bir taşıyıcıya enzimin kovalent bağlanması enzim yüzeyine yerleşmiş amino asitlerin $–NH_2$, -SH, -COOH gibi fonksiyonellerinden bağlanır. Taşıyıcı yüzeyine bağlanan aktif fonksiyonlaştırıcıların arasında bir kimyasal

reaksiyona dayanır. Şema 1.5'de gösterilmiştir. Etkili bağlantıyı elde etmek için enzim ve taşıyıcının işlevselliği immobilizasyondan önce aktive edilmelidir. Sık sık taşıyıcılar enzim bağlamak için kullanılmadan önce aktivite edilir. Bağların sayısı veya bağlanma modelinin kontrolü olan bir çok durumda gereklidir (Gemeiner 1992), Enzimler taşıyıcıya bağlamadan önce aktivite edilmelidir (Glazer ve ark. 1962).



Şema 1.5. Taşıyıcılarda enzimlerin kovalent immobilizasyonu : (A) Aktif amino asit fonksiyonel grubu; (B) taşıyıcıların bağlama özelliği; (C) taşıyıcı; (D) boşluk

Şema 1.5.'de kovalent bağlanmış bir immobilize enzim, enzim, bağlantı, çapraz bağlama ajanı ve taşıyıcıların bileşenlerininin bir çok parçadan oluşmuş şekil verilmiştir (Cao 2006). Böylece kovalent bağla bağlanmış bir immobilize enzimin performansını etkileyen faktörler sırasıyla :

- Taşıyıcının fiziksel özelliği (gözenek büyüklüğü, partikül büyüklüğü, gözenekliliği, şekli)
- Taşıyıcının kimyasal tipi (yapının kimyasal kompozisyonu, aktif işlevselliği, diğer aktif olmayan işlevsellikler)
- Zincirin kimyasal yapısı veya bağlanma özelliği
- İmmobilize olduktan sonra veya immobilize edilirken enzimin konformasyonu
- Enzim yönlendirmesi

- Çapraz bağlama ajanın uzunluğu ve özelliği
- Enzimleri bağlamak için kullanılan ortamın özellikleri
- Taşıyıcı ve enzim arasında oluşan bağların sayısı
- Taşıyıcıların içinde veya üzerindeki enzim dağılımı

Kovalent bağlanma yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları:

AVANTAJLARI

- Biyokatalizör ve taşıyıcı arasındaki güçlü etkileşimden dolayı biyokatalizör kararlılığı genellikle artar.
- Reaktif taşıyıcıya enzim bağlanması kolaydır ve bağlı olmayan enzim yıkama ile uzaklaştırılabilir.
- Enzim ve taşıyıcı arasında bağlar kuvvetli olduğundan enzim çözeltiye sızmaz veya ayrılmaz.
- Reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılabilir.
- Taşıyıcını yapısına bağımlı olarak yeni spesifikler kazanabilir.
- Sürekli sistemlere uygundur.
- Değişik fiziksel formlarda (tabaka, partikül, fiber vb.) imal edilebilirler.

DEZAVANTAJLARI

- Bağlanma aktivite için zorunlu aminoasit fonksiyonel grupları üzerinden gerçekleştiği için aktivite düşebilir.
- Enzimin taşıyıcıya bağlanması özel ve masraflı hazırlıklar gerekli kılabilir.
- Biyokatalizörün toksik ajanlara ve sert reaksiyon koşullarına maruz kalmasından dolayı ürün verimindeki düşüş gözlenir.
- Taşıyıcının yenilenmesi ve biyokatalizörün taşıyıcıdan geri kazanılmasının imkansız olması.

Kovalent bağların oluşumuna dayanan metotlarla proteinlerin immobilizasyonu yaygın olarak kullanılır. Bu metodun avantajı enzim ile matriks arasında oluşan bağların dayanıklı olmasından enzim çözelti ortamına salınmaz. Buna karşın bağlanan aktivitenin çok yüksek olması için temel amino asit fonksiyonel grupları katalitik aktivite için destek maddesine kovalent bağlanma gerektirmemelidir. Bu bazı durumlarda zorluk yaratabilir.

Reaksiyon genellikle sulu ortamda gerçekleşir. Bu yöntemde kullanılan taşıyıcılar reaktif değillerse yardımcı bir reaktif ile aktive edilmeleri gerekir. Yöntemin gerçekleştirilmesi zordur. Enzim ile taşıyıcı arasındaki bağlanma yüksek olduğundan bazen enzimatik aktivitenin arttığı da görülmektedir. (Mattiasson ve Kaul 1991). Fonksiyonel gruplar içeren taşıyıcıya bağlı çok çeşitli reaksiyonlar geliştirilmiştir (Scouten 1987). Bağlama metotları genelde iki kısma ayrılır : (1) bir polimere bir reaktif fonksiyonel ekleyerek taşıyıcının aktivasyonu (2) aktivite edilmiş bir grup üretmek için polimerin ana yapısının modifikasyonu (Çizelge 1.9). Bu aktivasyon prosesleri genellikle, bağlama kısmında proteinlerdeki güçlü nükleofillerle reaksiyona girerek destek maddesindeki elektrofilik grupları üretmek için tasarlanılırlar. Taşıcıya kovalent bağlama yolunun temel prensipleri proteinlerin kimyasal modifikasyonu için kullanılmasıyla benzerdir. Reaksiyonlarda, aminoasitlerin yan zincirlerinde lisin (ε-amino grup), sistein (tiyol grup), aspartik asit ve glutamik asit (karboksilli asit) bulunanlar çok sık kullanılırlar.

Çizelge 1.9.A Enzimlerin Kovalent Bağlama Metotları: Hidroksil fonksiyonlu matriksin aktivasyonu

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

Çizelge 1.9.B Aktivite edilmiş bir grup oluşturmak için polimerin modifikasyonu

Polimer	**Reaktantların grubu**	**Reaktif**	**Üretilen aktive edilmiş grup**	**Reaktantların grubu (aktive edilmiş matriks ile)**	**Referans**
Selüloz agoroz	Diol	Periodat	Aldehit	Amin	Parikh ve ark. (1974)
Poliakrilamit	Amit	Hidrazin	Hidrazit	Amin	Inman ve Dintzis (1969)
Poliakrilamit	Amit	Asit pH	Karbosilik asit	Amin	Inman ve Dintzis (1969)
Polyester	Ester	Asit pH	Karbosilik asit + alkol	Amin	Rozprimova ve ark. (1978)
Polietilen	CH_2	Nitrik asit	Karboksilik asit	Amin	Ngo ve ark. (1979)
Polistiren		Nitrik asit	Nitratlı aromatik halka	Histidin, Tirozin	Grubhofer ve Schleith (1954); Beitz ve ark. (1980)
Naylon	Amit	Hidrazin	Hidrazit	Amin	Hornby ve Goldstein (1976)

1.4.2.1.3. İyonik bağlama ile immobilizasyon

İyonik bağlama metodu iyon-değiştirme kalıntıları içeren suda çözünmeyen taşıyıcılar için enzim proteinin iyonik bağlanmasına bağlıdır. İyon değiştirme merkezine sahip olan polisakkaritler ve sentetik polimerler genellikle taşıyıcılar için kullanılır. İyonik bağlanma kovalent bağlamadan daha ılıman koşullarda gerçekleşir,

bundan dolayı iyonik bağlanma sırasında konformasyonal değişikliklerin derecesi kovalent bağlamadan daha azdır. Aktif merkezde değişikliğe uğramaz. Enzim aktivitesi kovalent bağlama ve fiziksel adsorpsiyona kıyasla daha yüksek olduğu için, iyonik bağlama bir enzimi immobilize etmek için çok daha uygun bir metottur (Cao ve ark, 2003). Ancak enzim ile taşıyıcı arsındaki bağ, kovalent bağ kadar güçlü değildir. Bu nedenle enzim kaçışı söz konusudur.

1.4.2.1.4. Şelatlama veya Metal bağlama

Organik taşıyıcıların yüzeyde depolanmış hidroksitler veya metal tuz geçişleri matrikste nükleofilik gruplarla koordinasyonu ile bağ yapar. Başlıca titanyum ve çinko tuzları kullanılır ve bu metod "metal bağ immobilizasyonu" olarak bilinir (Cabral ve Kennedy,1991; Cabral ve ark., 1986; Kennedy ve Cabral, 1985). Metal tuz veya hidroksit nötürleştirme veya ısıtma ile destek maddeleride (selüloz, kitin, aljinik asit ve silika bazlı taşıyıcılar gibi) çöktürülür. Sterik faktörler yüzünden, metalin tüm koordinasyon pozisyonlarını işgal etmek matriks için mümkün değildir. Bundan dolayı bazı pozisyonlar enzimlerden gruplar ile koordine için serbest kalır. Bu metod oldukça kolay ve bu yolla enzimlerle elde edilen immobilize spesifik aktiviteleri oldukça yüksek (%30-80) olur. Bununla birlikte elde edilen kullanıma hazır stabiliteler oldukça değişken ve bu sonuçlar kolaylıkla tekrar üretilemez. Tekrar üretilememesinin nedeni muhtemelen düzenli olmayan adsorpsiyon olmasından ve destek maddesinden önemli metal iyon sızıntısı olmasından kaynaklanır. Adsorpsiyon bölgelerinin oluşumunun kontrolünü artırmak için, şelatlayıcı ligantlar dayanıklı kovalent bağlar vasıtasıyla katı destek maddelerinde immobilize edilebilirler. Metal iyonlar ardından koordinasyon ile bağlanır ve oluşan dayanıklı kompleksler proteinlerin tutma için kullanılabilir. Bağlanan proteinlerin elüsyonu pH'ın azaltılmasıyla veya çözünür ligantların rekabetiyle kolaylıkla elde edilebilir. Destek maddesi daha sonra etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) gibi güçlü bir şelatlayıcı ile yıkanarak rejenere edilir. Metal şelatlanmış destek maddeleri immobilize metal-iyon affiniti (IMA) olarak isimlendirilir ve protein kromatografisinde yaygın olarak kullanılır (Porath 1992, Kågedal 1998). Enzim

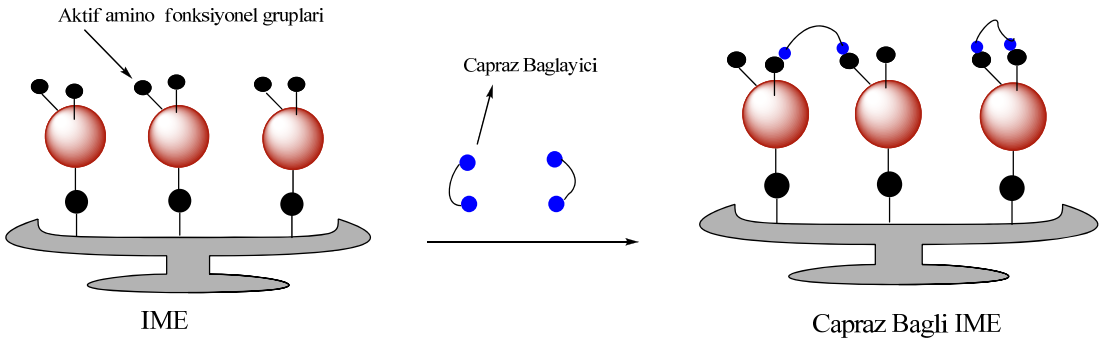
immobilizasyonu için destek maddesi olarak farklı IMA-jelleri kullanılmasıyla bir model olarak *Eschericia coli* β-galaktosidaz kullanılarak çalışılmıştır (Brena ve ark. 1994).

1.4.2.2. Çapraz bağlama ile immobilizasyon

Kovalent bağlama metodundaki gibi kimyasal bağların oluşumuna dayanan ve bifonksiyonel veya multifonksiyonel reaktif ile enzimlerin moleküller arası çapraz bağlama olarak tanımlanabilir fakat suda çözünmeyen taşıyıcılar kullanılmaz (Sheldon 2007) (Şema 1.6). Bu immobilizasyon iki veya multifonksiyonel reaktiflerle enzim molekülleri arasında moleküller arası çapraz bağların oluşumuyla gerçekleştirilir. En yaygın reaktif glutaraldehittir. Ayrıca hekzametilendiizosiyanat, heterosiklik halojenürler, divinilsülfonlar, epiklorhidrin, diazobenzidin gibi maddeler kullanılır. Çapraz bağlama reaksiyonları oldukça sert şartlarda gerçekleştirilir. Bu sert şartlar enzimin aktif bölgesinin oluşumunu değiştirebilir ve böylece büyük aktivite kaybına sebep olabilir.

Bu metod üç farklı durumda uygulanabilir:

- Yakın ultraviyole radyasyona maruz kalmasıyla jelleşme ve bir enzim çözeltisi ile karıştırarak erime, bir fotosentez yapıcı (benzoin etil eter gibi) ile ön polimerlerin karışımı
- Küçük boncukların oluşumunda enzim içeren bir monomer çözeltisini karıştırmak. Polimerizasyon ondan sonra gamma radyasyonu kullanarak başlatılır.
- Bir çapraz bağlayıcı ajan ve akrilamit monomerinin tamponlu sulu çözeltide enzim karıştırılır. Polimerizasyon bazı kimyasallar eklenerek başlatılılabilir.

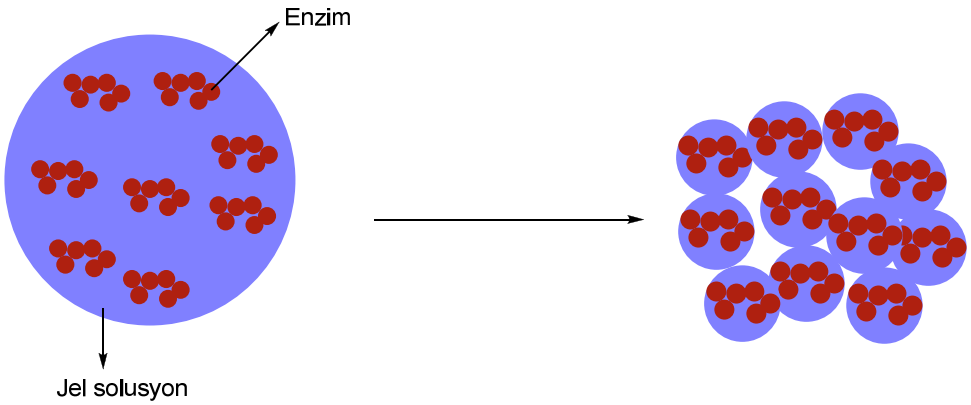


Şema 1.6. İmmobilize enzimlerin çapraz bağlanması

1.4.2.3. Tutuklama Yöntemleri

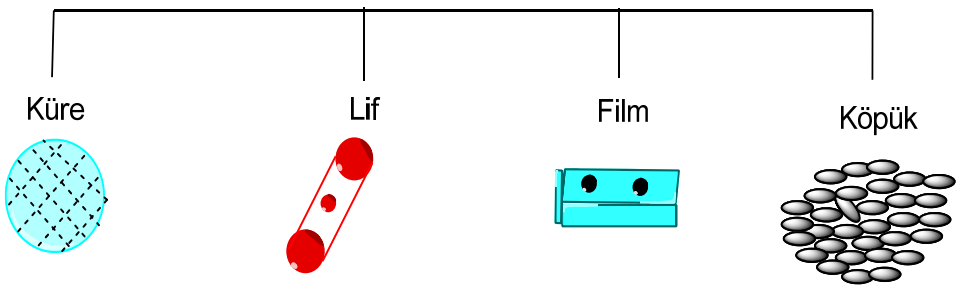
Tutuklama enzimi küçük bir hacimde durmaya zorlamaktır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebildiği gibi yarı geçirgen membranlar içinde de gerçekleştirilebilir (Karaca 2006) (Şema 1.7). Bu yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır (Kartal 2004). Tutuklama metodu, enzimi immobilize etmek için etkili ve kolay bir metotdur.

Taşıyıcının fiziksel özellikleri, şekli ve mekanik stabilitesini, morfolojisini, gözenek yapısını (açık veya kapalı), partikül büyüklüğünü ve gözenek boyutunu kapsar.



Şema 1.7. Biyokatalizörlerin tutuklanması

İstisnasız bir immobilize enzimin şekli/büyüklüğünün seçimi sadece metoda ve taşıyıcıya bağlı değil aynı zamanda uygulamanın özelliklerine de bağlıdır. Genelde tutuklanmış enzimlerin geometrisi kürecikli taşıyıcılar, lifli taşıyıcılar, film, köpük ve disk gibi sınıflandırılabilir (Cao 2006).



Şema 1.8. Geometrilerine göre taşıyıcıların sınıflandırılması

Hidrofobik ve hidrofilik birçok enzimler çeşitli jel matrikste tutuklanırlar. Örneğin aljinat ve kitosanda *Candida rugosa* lipaz (Alsarra ve ark. 2002); Betigeri ve Neau, 2002), jelatinde veya poliakrilamit jellerde penisilin G açilaz aktiviteli tam hücreler (Bajpai ve Margaritis, 1985), selülöz kürecik tutuklanmış tam hücre glikoz izomeraz (Linko ve ark. 1978).

1.4.2.4. Sol-Jel tutuklama yöntemi

İmmobilize enzimleri hazırlamak için inorganik sol-jel tutuklama tekniğinin kullanımı 1990'ların başından beri enzim immobilizasyonunun çok önemli bir alanı olmuştur (Braun ve ark., 1990). Metot 1950'lerin ortalarında bilinmesine rağmen Dickey (1955) bazı enzimlerin silisilik asit türevli camlarda tutuklanabileceğini ilk kez göstermiştir. İlerleyen otuz yılda tutuklanmış protein ve enzimlerin hazırlanması için bu metodun kullanımı ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır (Venton ve ark., 1984; Janczarski ve ark., 1976; Glad ve ark. 1985; Johnson ve Whateley 1971; Livage 1996; Avnir 1995; Gill, 2001; Reetz ve ark., 2003).

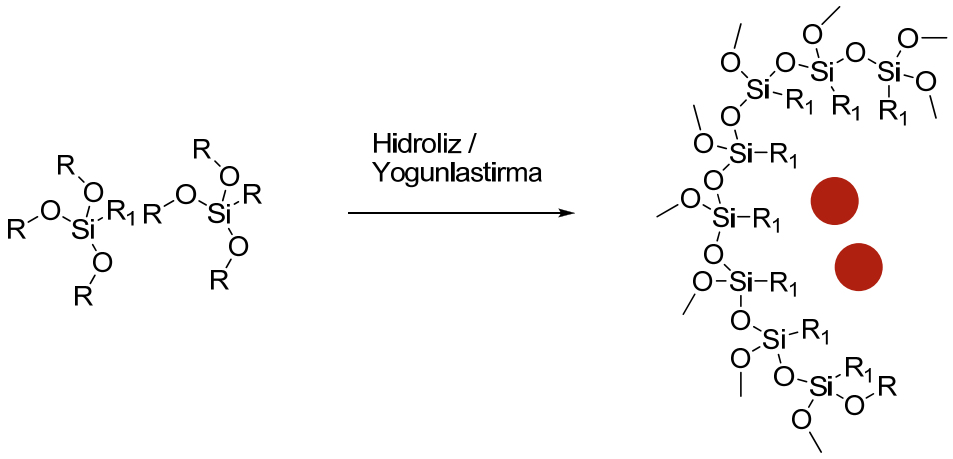
Sol-jel enkapsülasyon immobilize enzimler için özellikle etkili ve kolay olduğu ispatlanmıştır. Avnir ve ark. (1994) bu tekniğe öncülük etmişlerdir. Destek maddesinin inertliği, mükemmel termal dayanıklılığı ılıman işlem şartları ile bu metodun ayırıcı karakterisittik özellikleri arasındadır.

Bu proses de bağlayıcı silan bileşikleri olarak alkil ve alkoksi silan bileşikleri kullanılmaktadır. Sol-jel teknikleri, enzim varlığında alkoksi silanların asit veya baz katalizi ile yapılır (Hench ve West, 1990; Brinker ve Scherer, 1990). Başka bir ifadeyle bağlayıcı silan bileşiklerinin alkoksi grupları hidroliz olur ve çapraz bağlı kondenzasyon reaksiyonu ile enzimin enkapsüle olduğu SiO_2 yapısı meydana gelir. Oluşan sağlam yapıdaki sol-jel polimeri enzimin daha kararlı olmasını sağladığı gibi enzimin enkapsüle olduğu bölgeden uzaklaşmasını engeller. Yapılan bu tür sol –jel enkapsülasyon çalışmaların da enzimin aktivitesine ilave maddelerin (taç eterler, tuzlar, selit, siklodekstrin türevleri gibi) etkisi araştırılmıştır (Reetz ve ark., 2003; Ghanema ve Schurig 2003; Arica ve ark. 1996; Shtelzer ve ark., 1992; Uo ve ark., 1992).

Buna rağmen, sol-jel metotlarında aktivite kazanımıyla açığa çıkan gözlemler diğer enzim immobilizasyon metodlarıyla karşılaştırılabilir. Buna göre enzim stabilize edilebilir, matriks yüksek molekül ağırlıklı substratlar için geçirgen olmayabilir (Johnson ve Whateley, 1971) ve enzimler moleküler hapsetme yüzünden etkilenebilir (Glad ve ark., 1985).

Sol jellerde enzimlerin tutuklanması sert jel ağlarla proteinin tersiyer yapısını stabilize etmesiyle enzim dayanıklılığını artırmak için potansiyel ve kolaylığından dolayı çok caziptir (Avnir ve ark. 1994).

Sol-jel tutuklanmış enzimin dayanıklılığı, enzim konsantrasyonu, pH, iyonik güç ve diğer immobilizasyon şartlarına bağlı olduğu bulunmuştur (Arica ve ark. 1996). Matrikste tutuklanmış enzimin konsantrasyonunun artmasıyla enzim termostabilitesi artmasını sağlar. Klasik tutuklamanın dezavantajları tutuklanmış enzim moleküllerinin hepsi muhtemelen katalitik olarak aktif değildir (Jin ve Brennan 2002). Matriks içersindeki bazı enzim molekülleri tutuklama prosesi boyunca deaktivite olabilirler. Doğal yapılarına rağmen, bazı enzim molekülleri fiziksel olarak substrat moleküllerine ulaşamayabilir.



Şema 1.9. Sol-jel matrikste enzim tutuklanması

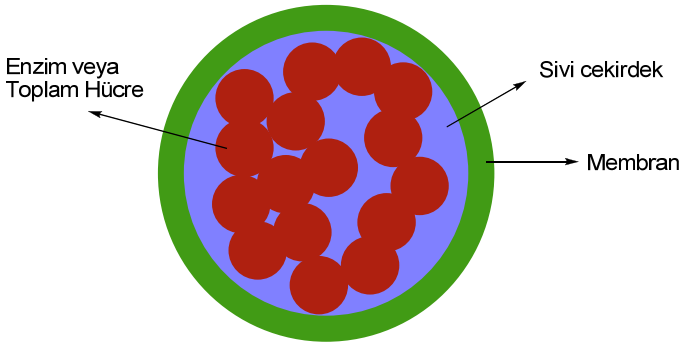
1.4.2.4.1. Polimer matrikste tutuklama

Enzim hapsetme işlemi için Ca-aljinat, agar, poliakrilamit gibi polimerler matriks olarak kullanılır. Matriks tanecik, membran veya ipliksi yapıda olabilir. Polimer matriks içinde immobilizasyon için, enzim çözeltisi polimer çözeltisiyle polimerleşmeden önce karıştırılır. Polimerleşme esnasında enzim molekülleri

polimere bağlanmaz ama fiziksel olarak polimerin içinde kalır. Sıvı polimer-enzim karışımı ya uygun kalıplar kullanılarak, ya da uygun çaptaki deliklerden akıtılarak şekilli tanecikler haline getirilir. Molekül kütlesi 15000'den fazla olan enzimler bu amaçla kullanılır (Karaca 2006).

1.4.2.4.2. Membranda tutuklama

Bu yöntemde enzim membranla sarılmıştır. Enzim kimyasal bir bağlanma yapmaz. Naylon, selüloz, polisülfon, poliakrilat yaygın olarak kullanılan membranlardır. Membran hapsetmenin özel bir şekli mikrokapsüllemedir. Bu yöntemde çapı 1-100 μm olan yarı geçirgen küresel zarlar kullanılır. Bu zarların gözenekleri substrat ve ürünün geçişine izin verecek ancak hapsedilmiş enzimin giriş çıkısına izin vermeyecek büyüklüktedir. Mekanik dayanıklılığı azdır. Substratla enzimin bu yöntemde etkileşme oranı büyüktür. Yöntemin uygulanması sırasında enzim inaktive olabilir. Ayrıca enzimin zarın içinden kaçma olasılığı fazladır; dolayısıyla enzim sarfiyatı fazladır. Bu yöntemin en büyük avantajı oldukça küçük bir hacimde enzim ile substratın etkileşme alanının göreceli olarak yüksek olmasıdır (Karaca 2006) (Şema 1.10).



Şema 1.10. Yarı-geçirgen bir membranda fiziksel olarak kuşatılan enzimler olarak bilinen enkapsüle olmuş enzimler

Tutuklama yönteminin avantajları:

- Yöntemin çok kolay uygulanması
- Gerçek bir fiziksel yöntem olması
- Çok az miktar enzimle gerçekleştirilebilmesi
- Nötral, suda çözünmeyen destek materyalleri kullanılması

Dezavantajları:

- Enzimlerin hapsedildiği kafeslerin çaplarından daha büyük substrat molekülünün enzim aktif merkezine ulaşmasının olanaksız olması
- Önemli difüzyon kısıtlamalarının olması (Bu kısıtlamalar kapsüllerin tanecik boyutları küçültülerek azaltılabilir).
- Enzimin zamanla çözeltiye sızması
- Enzimin hapsedildiği mikro çevredeki koşulların kontrol edilememesi nedeniyle enzimin aktiflik ve kararlılığının azalması.

1.4.3. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması

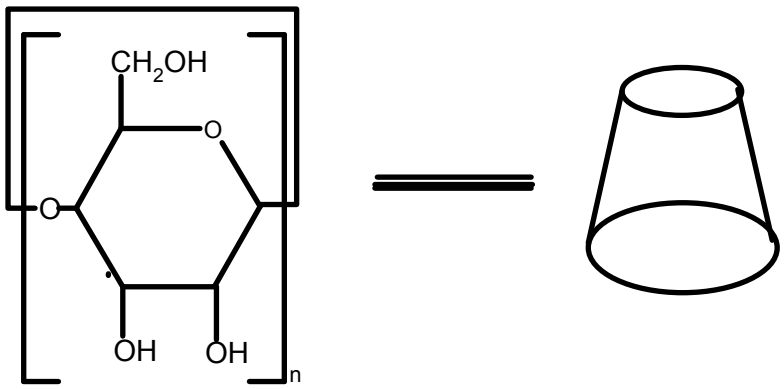
Günümüze kadar birçok enzim için birçok farklı immobilizasyon yöntemi uygulanmış ve önerilmiştir. Ancak enzimlerin birbirlerinden çok farklı kimyasal karakteristikleri ve bileşenleri olması, ayrıca kullanılan substrat ve ürünün farklı kimyasal özellikleri olması nedeniyle bütün enzimler için ve bütün şartlarda uygulanabilecek kesin bir yöntem belirlemek mümkün değildir. Ayrıca her immobilizasyon yönteminin uygulama şartlarına göre avantajları ve dezavantajları vardır. Bu nedenle immobilizasyonu düşünülen farklı enzimler için farklı durumda bir veya birkaç değişik yöntem önerilebilir. Çizelge 1.10'da immobilizasyon yöntemlerinin birbirlerine karşı kıyaslanması gösterilmiştir (Telefoncu 1997, Karaca 2006).

Çizelge 1.10. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması

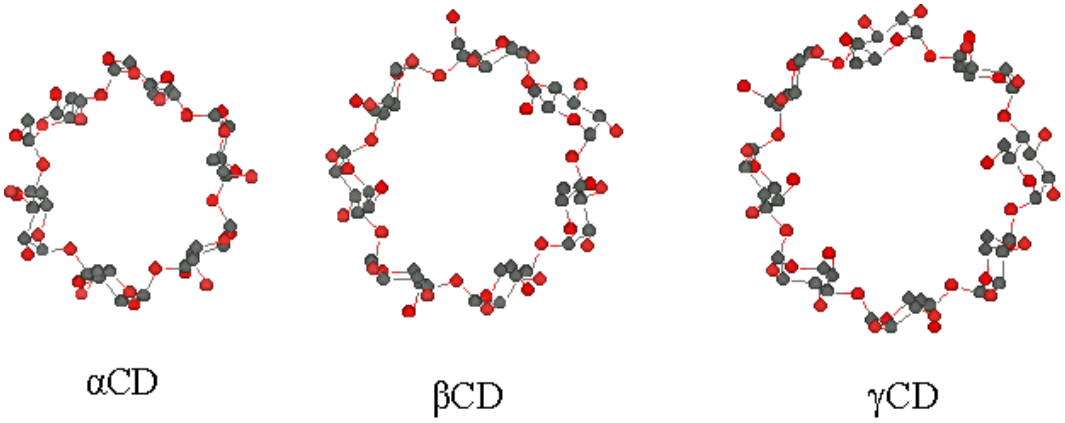
Özellik	**Fiziksel adsorpsiyon**	**İyonik bağlama**	**Çapraz bağlama**	**Kovalent bağlama**	**Tutuklama**
Hazırlama	Kolay	Kolay	Zor	Zor	Zor
Bağlama gücü	Zayıf	Orta	Kuvvetli	Kuvvetli	Kuvvetli
Enzim aktivitesi	Düşük	Yüksek	Orta	Yüksek	Yüksek
Desteğin tekrar kullanılabilirliği	Mümkün	Mümkün	İmkansız	Nadiren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

1.5. Siklodekstrinler

Siklodekstrinler ilk 1891 yılında nişastanın *Basilus macerans* bakterisi ile enzimatik parçalanmasından elde edilmişlerdir. Siklodekstrinler α-(1,4) glukopiranoz bağlı halkalı oligosakkaritlerdir (Şekil 1.9 ve 1.10). Siklodekstrinler halkadaki glikopiranoz sayısına göre 3 tiptedir, α-siklodekstrin, β-siklodekstrin ve γ-siklodekstrin. α-, β- ve γ-siklodekstrin sırayla 6, 7, 8 glukopiranoz halkalarının α-(1,4) glikozid bağlarıyla bağlanmasından oluşurlar (Szejtli ve Osa 1996, Szejtli 1998, Bender ve Momiyama1978).



Şekil 1.9. Siklodekstrinin yapısı **:** n=6(α -CD), n=7(β-CD), n=8(γ-CD)



Şekil 1.10. Siklodekstrinin uzaydaki diziliş şekilleri

1.5.1. Siklodekstrinlerin Özellikleri

β-Siklodekstrin en ucuz, kullanışlı ve en çok elde edilen türevidir (Helena 2006).

Çizelge 1.11. Siklodekstrinlerin özellikleri

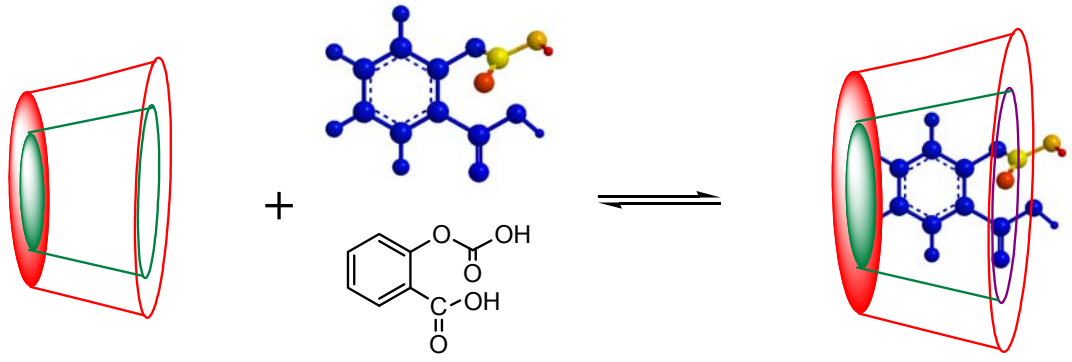
Siklodekstrinin özellikleri	**α-siklodekstrin**	**β-siklodekstrin**	**γ-siklodekstrin**
Halkadaki glukopiranoz sayısı	6	7	8
Moleküler ağırlık (g/mol)	972	1135	1297
25^{o}C'deki sudaki çözünürlük	14.5	1.85	23.2
Dış çapı (A˚)	14.6	15.4	17.5
Boşluk çapı (A˚)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Kafes uzunluğu (A˚)	7.9	7.9	7.9
Boşluk hacmi (A^{3})	174	262	427

β-Siklodekstrinler hidrofilik dış yüzeyi ve merkezde bir hidrofob boşluğu olan bir koni yapısındadır. Siklodekstrin konisinin yüksekliği her üç tiptede de aynı olmasına rağmen glikoz birimlerinin sayısı iç boşluk çapını ve hacmini belirler. α-siklodekstrin genellikle düşük molekül ağırlıklı moleküller ile veya alifatik düz zincirli moleküller ile kompleks yapabilir. Siklodekstrinlerin primer hidroksil grubu sepetin dar yanına yerleşmiştir. Halbuki sekonder glukopiranozun hidroksil grubu sepetin daha geniş kısmına yerleşmiştir. Polar hidrofilik dış kabuğu ve hidrofobik boşluğu yüzünden uygun hidrofobik moleküllerle konak-konuk (host-guest) tipi kompleksler yapabilirler. β-siklodekstrinler heterosiklik ve aromatik bileşikler ile kompleks yapabilir. γ-siklodekstrinler ise makrosiklik ve steroidler gibi daha büyük molekülleri ile kompleksleşebilir (Szejtli 1988) .

Siklodekstrinler toksik değillerdir, maliyetleri düşük, kompleks oluşturma kapasiteleri yüksek, bazı spesifik uygulamalar için çok uygun bileşiklerdir. Yüksek saflıkta elde edilebilirler, farmakolojik reaksiyonlarda inerttirler. Biyolojik olarak kolay parçalanırlar, kullanılan cihazlarda da kirlilik yaratmazlar.

Moleküler kompleks oluşturma, kozmetik ve bakım maddelerinin hazırlanmasında (Buschmann ve Schollmeyer 2002; Hara ve ark., 2002), tekstil endüstrisinde (Szejtli 2003; Buschmann 2001) ve farmokolojide kullanılmaktadırlar. (Del Valle, 2004; Szejtli, 1998; Hedges, 1998; Singh, 2002).

Siklodekstrinlerin en önemli özelliği, çok geniş çapta katı, sıvı, gaz molekülleri ile (host-guest tipi) moleküler kompleksler yapmaktır (Şekil 1.11). Uygun bir molekül siklodekstirinin molekül boşluğuna tutunarak suda çözünen kompleksler elde edilebilir (Szejtli 1982; Crini, 2003; Lee ve ark.;1999; Bhaskar ve ark., 2004; Yu ve ark., 2003; Gaffar ve ark., 2004).



ß-siklodekstrin Aspirin Aspirin ß-siklodekstrin Kompleksi

Şekil 1.11. Siklodekstrinin ile aspirin moleküler kompleksi (Frömming ve Szejtli, 1994)

Kompleks oluşum süresi boyunca kovalent bağlar kırılmaz veya oluşmazlar. Kompleks oluşumunun ana gücü boşluktaki su moleküllerinin çıkarılmasıdır. Böylece daha apolar moleküllerin geçmesi ve apolar apolar etkileşmesinin sağlanmasıyla daha kararlı bir yapı meydana gelir.

Siklodekstrinin polar hidrofilik dış yüzeyi ve hidrofobik boşluğu sayesinde uygun hidrofobik moleküllerle, moleküler (host-guest) kompleksler oluşturabilirler. Ritter ve Tabatabai (2002), siklodekstrin ile toluenin sulu çözeltide moleküler

kompleksini hazırlamışlardır. Böyle komplekslerin guest moleküllerin çözünürlüğünü ve aktifliğini artırdığını bulmuşlardır.

Siklodekstrinlerle kompleks yapan molekül türü oldukça fazladır. Bunlar düz veya dallanmış zincirli alifatikler, aldehitler, ketonlar, alkoller, organik asitler, yağ asitleri, aromatikler, gazlar ve polar bileşikler, örneğin halojenler, oksiasitler ve aminlerdir. Bundan dolayı siklodekstrinlerin kullanım alanı oldukça genişletilebilir. Fonksiyonlandırılmış siklodekstrinler enzim mimik gibi çalışmalarda sıkça kullanılır. Çünkü eklenen fonksiyonel gruplar molekülü tanımada yardımcı olurlar.

Siklodekstrinin bir molekül ile kompleks yapması iki anahtar faktöre bağlıdır.

- Sterik engel, burada kompleksleşen molekülün siklodekstrinin boşluk büyüklüğüne uyumluluğu önemlidir. Eğer bu molekül uygun büyüklükte değilse siklodekstrin ile kompleks yapamaz.
- Farklı bileşen sistemler (siklodekstrin, konuk (guest), çözücü) arasındaki termodinamik etkileşimdir. Siklodekstrin guest molekülüyle kompleks yapması için bir enerji gerektiğini açıklar.

Liu ve Guo (2002), siklodekstrinin moleküler kompleks yapmasını etkileyen faktörleri incelemiştir. Bunlar elektrostatik etkileşim, Van der Walls etkileşimi, hidrofobik etkileşim, hidrojen bağı ve yük transfer etkileşimidir. Junco ve ark., (2002), Naproxen adlı ilacın çözünürlüğünü β-siklodekstrinle kompleks yaparak artırmışlardır.

1.6. Sporopollenin

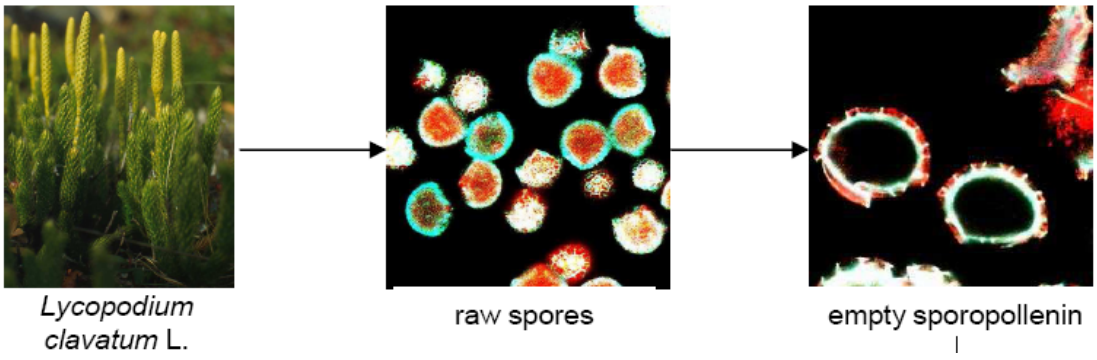
Sporopollenin doğal bir madde olup dış etkilere karşı büyük bir dirence sahiptir. Sporopolleninler, spor kaynaklarının dış kısmında kalan zarar görmemiş hücre zarlarında olduğu gibi 500 milyon yıldan beri eskimiş tortular ve kayalar üzerinde yaşayan canlılardan meydana gelen fiziksel ve kimyasal kararlılığa sahip maddelerdir. Bu canlıların selülozdan meydana gelen intine ismi verilen iç katmanları boşalmıştır (Pehlivan 2001).

Sporopollenin doğal olarak bitki duvarlarında bulunmaktadır. Spor duvarları hücrenin iç kısımlarını çevreleyen iç içe geçmiş iki ana duvardan oluşmuştur. Hücrenin iç duvarları selülözden oluşan protein polisakkaritlerden meydana gelmiştir. Daha dıştaki duvarlar ise exine adı verilen sporopollenini oluşturan maddelerdir (Pehlivan 2001). Sporopolleninin belli bir özelliği spor büyüklüğünün tanecikten taneciğe değişmemesidir. *Lycopodium clavatum* sporları 25 mikronluk bir çapa sahip olup düzgün bir yapıdadır (Pehlivan, 1991).

Sporopollenin polen veya sporların organik çözücüler, alkali ve %80 sıcak fosforik asit içeren kuvvetli asitlerle bir hafta boyunca etkileştirmek suretiyle bitki intinelerinden çıkarılabilir. Bu işlemden sonra orijinal sporların değişmeden kalan dış yapıları *Lycopodium clavatum* sporlarıdır (Şekil 1.12, Barrier ve ark., 2010).

Yapılan çalışmalarda sporopollenin karotenoitlerin oksidatif polimerizasyonunun enzimatik olarak kontrol edilmesiyle üretildiğini ve aromatik çapraz bağlı kararlı bir yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. Sporopollenin hidrojen, oksijen ve karbon içeren bir madde olup organik ve sulu çözücüler içerisinde şişmeyen organik bir maddedir. $C_{90}H_{144}O_{27}$ şeklinde bir stokiyometriye sahiptir.

Sporopollenin üzerinde John (1814) ve Braconot (1829) yıllarında çalışmalarda bulunmuşlar ve hücre duvarı bileşenlerinin kimyasal reaktiflere karşı dirençleri konularını incelenmiştir. 1928 yıllarında Zetzsche bitki duvarlarını oluşturan *Lycopodium clavatum* sporları üzerinde çalışmış ve sporopolleninin polen ve hücre duvarlarında mevcut olan kimyasal maddelerden meydana geldiğini açıklamıştır. Daha sonraları Brooks 1971 yılında sporopollenin çok yüksek bir dirence sahip kimyasal madde olduğunu ve spor duvarlarını teşkil eden *exosproim* içerisinde olduğunu ileri sürmüştür (Pehlivan 1991)



Şekil 1.12. Konfokal mikroskopu ile enkapsülasyon prosesinin şekli

Sporopolleninin belli özelliği spor büyüklüğünün tanecikten taneciğe değişmemesidir. Sporopollenin kimyasal parçalanmalara karşı koruyucu özelliğe sahiptir.

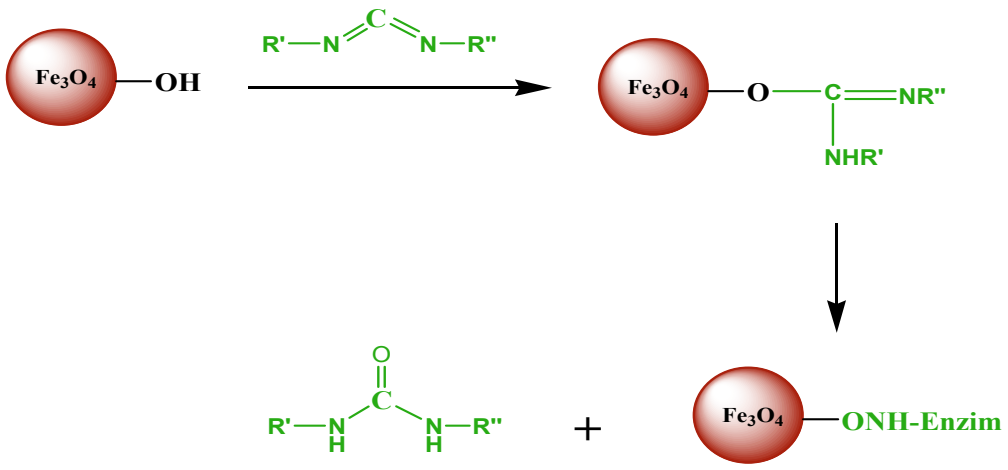
Sporopollenin kullanım avantajları:

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 denendiğinde 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. Magnetik Partiküllere Enzim İmmobilizasyonu

Magnetik partiküller proteinleri, enzimleri ve ilaçları bağlamada, taşıyıcı olarak gün geçtikçe artmaktadır. Proteinler, enzimler, antikorlar ve diğer biyolojik aktif bileşikler için immobilizasyon metotları biyoteknoloji ve biyoilaçların farklı

alanlarında önemli bir etkiye sahiptirler. İmmmobilize biyomoleküller hedef molekülleri veya hücreleri modifiye etmek veya tutmak için ya direk bir biyolojik denemede veya affinity ligantlar olarak kullanılabilirler. Örneğin, Abudiab ve Beitle (1998) karışım kompleksinden proteinleri izole etmek için bir manyetik immobilize olmuş metal affinity ayırma ortamı geliştirilmiştir. Benzer olarak Qiagen Inc. Almanya uygun farklı uygulamalar için nitriloastik asit bağlı magnetik agoroz küreciklerinde protein saflaştırılması ve deneme protokolleri geliştirmişlerdir (Sinclair 2000). Çeşitli proteinlerin magnetik affinity ayırmaları için son zamanlarda özetlenmiştir (Safarik ve Safarikova, 2000). Mehta ve ark. (1997), karbodiimit varlığında hazırlanan magnetitlere kovalent olarak bağlanabilen enzimleri ve proteinleri göstermişlerdir. Bovin serum albumin, streptokinaz, kemotripsin ve glikozoksidaz içeren birçok klinik olarak önemli enzim ve proteinler bu metodla immobilize etmişlerdir (Şekil 1.13, Mehta ve ark., 1997).

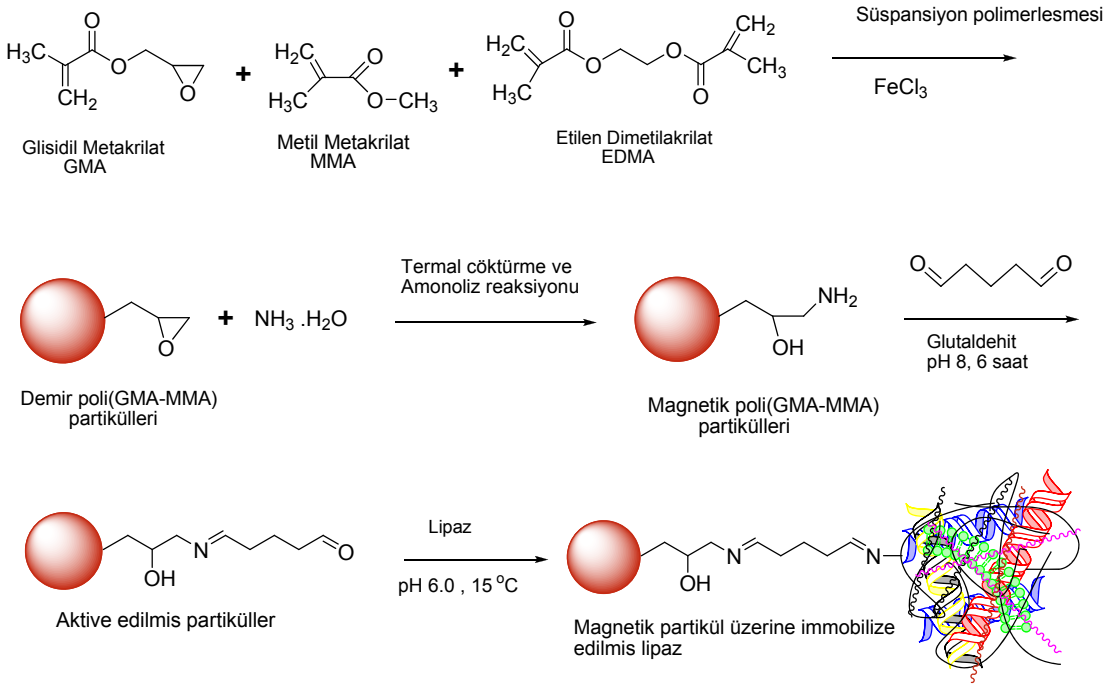


Şekil 1.13. Karbodiimit birleştirici ajan ile magnetik destek maddesine enzim proteinin immobilizasyon şeması (Karbodiimit metodu)

Son yıllarda birçok magnetik ayırma prosedürleri biyomolekülleri saflaştırmak ve izole etmek için geliştirilmiştir (Saiyed ve ark. 2003). Bu tekniklerin avantajları bir biyomolekülü geri almanın kolay, hızlı ve son derece spesifik olarak bir karışım

kompleksinden izole edilebilmesidir. Son on yılın üzerinde, bir uygun stabilize edici ile kaplanmış mikrometre veya mikrometreden daha küçük büyüklükteki magnetik partikülleri içeren sistemler ilaçlar, enzimler ve proteinleri bağlamada taşıyıcı olarak kullanılmaktadırlar. Örneğin, heparin stabilize edilmiş kolloidal magnetit tam kandan hücreleri bağlamak için, Dekstran-kaplanmış magnetit bir ilaç taşıyıcı olarak, silan kaplı femir partikülleri radyoimmmunolojik yöntem için kullanılmaktadırlar. Magnetik partikül bazlı sistemler enzimleri ayırmak için bir affinity matriks olarak kullanılmaktadırlar. 5'-AMP bağlı magnetit sepharoz cam kürecikleri ile, at karaciğer alkol dehidrojenazın bir adımda saflaştırılması başarılı bir şekilde yapılmıştır (Mosbach Andersson 1977). Magnetit aljinat mikro kürecikler α-amilazın affinity saflaştırılması için kullanılmıştır (Safarikova ve ark., 2003).

Bayramoğlu ve Arıca (2008), magnetik kürecikleri demir iyonları varlığında süspansiyon kopolimerizasyon ile glisidilmetakrilat (GMA) ve metilmetakrialt (MMA) monomerlerinden hazırlamışlardır. Bu magnetik kürecikleri SEM, FT-IR ve titreşimli magnet ölçer ile karakterize etmişlerdir. Epoksi gruplarının reaktif karakteri termal çöktürme reaksiyonu boyunca amino gruplarının bağlanmasını sağlar. Bu manyetik küreciklere glutaraldehit ile aktive edildikten sonra *Candida rugosa* lipazın kovalent immobilizasyonu için kullanmışlardır (Şekil 1.14).



Şekil 1.14. Magnetik küreciklerde lipazın immobilizasyonu için reaksiyon şeması

1.8. Naproksen

1.8.1 Naproksen ve özellikleri

(*S*)-(+)-2-(6-metoksi-2-naftil)-propiyonik asit (Naproksen) 2-aril propiyonik asit türevlerinin grubuna ait steroidal olmayan iltihap giderici bir ilaçtır.

Naproksen insan bağ dokusu hastalıkları için yaygın bir şekilde kullanılır ve steroidal olmayan iltihap giderici ilaçlardan profenler türlerinden olup en uzun etkili olanıdır. Profenler, aspirin ve asetaminofenden sonra en fazla kullanılan ağrı kesici ilaçlardır. Profenlerin, moleküllerinde bir kiral merkez bulunduğu için, (R) ve (S) enantiyomerleri vardır. Naproksen hariç diğer profenler rasemat (R ve S karışımı) şeklinde piyasada bulunmaktadır.

Naproksenin (S) enantiyomerinin fizyolojik etkisi (R) enantiyomerinden 28 kat fazladır (Margolin 1993). Bundan dolayı sadece (S) enantiyomeri insanlar için ilaç olarak kullanılır (Harrison ve ark., 1970).

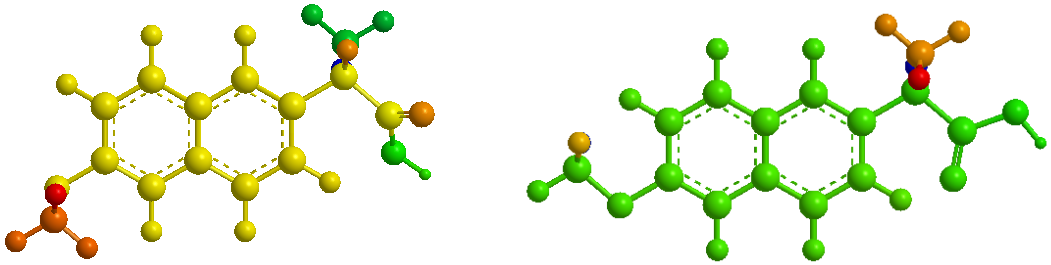
Literatürde Naproksenin birçok esterifikasyon ve hidroliz reaksiyonları incelenmiştir (Gu ve ark., 1986; Tsai ve ark., 1996; Takaç ve Bakkal 2007; Salgın ve Takaç 2007).

Naproksenin kinetik rezulasyonu için geleneksel metot sulu ortamda hidrolizidir. Reaksiyonlar çoğunlukla hızlı olmasına rağmen, bu reaksiyonların birkaç dezavantajı vardır (Akita ve ark., 1998; Kise ve Tamiuchi 1991; Caron ve Kazlauskas 1993). Birincisi, substrat çözünürlüğü genellikle düşüktür ve düşük enzimatik reaksiyon hızıyla sonuçlanır. İkincisi, esterin seçici olmayan kimyasal hidrolizi sulu ortamda meydana gelebilir ve reaksiyon ürünlerinin daha düşük enantiyometrik saflığa neden olur. Üçüncüsü, çözücü olarak suyun dezavantajı bazı durumlarda bir sulu sistemden reaksiyon ürününü izole etme gibi zorluk olabilir (Xin ve ark. 2000).

Naproksen ester hidrolizi için alternatif bir ortam sulu-organik iki fazlı bir sistemdir. Böyle bir sistem, yağ-su ara yüzeyi varlığı sayesinde ester çözünür ve ürün geri dönüşümsüz kalır .

(S)-Naproksenin endüstriyel üretimi Syntex ile geliştirilmiş klasik rezulasyon prosesi ile gerçekleştirilmiştir (Harrington ve Lodewijk 1997). Türkiye ilaç pazarında Naproksen ve Naproksen sodyum tablet, ya da bölgesel iltihap giderici tedavi için kullanılmak üzere jel şekli bulunur. Müstahzarları: Apranax, Apranax Fort (A.İbrahim), Naprosyn (Tablet, süpozituvar, jel) (A.İbrahim), Naprodol (Abfar), Aprol, Aprol Fort (Bilim), Apraljin (Deva)'dir (Kayaalp 2000, Bakkal 2006).

Naproksenin (S) ve (R) enantiyomerlerinin 3 boyutlu molekül dizilimi Şekil 1.15'de verilmiştir.



(S)- Naproxen *(R)-Naproxen*

Şekil 1.15. Naproksenin üç boyutlu molekül dizilimi

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

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

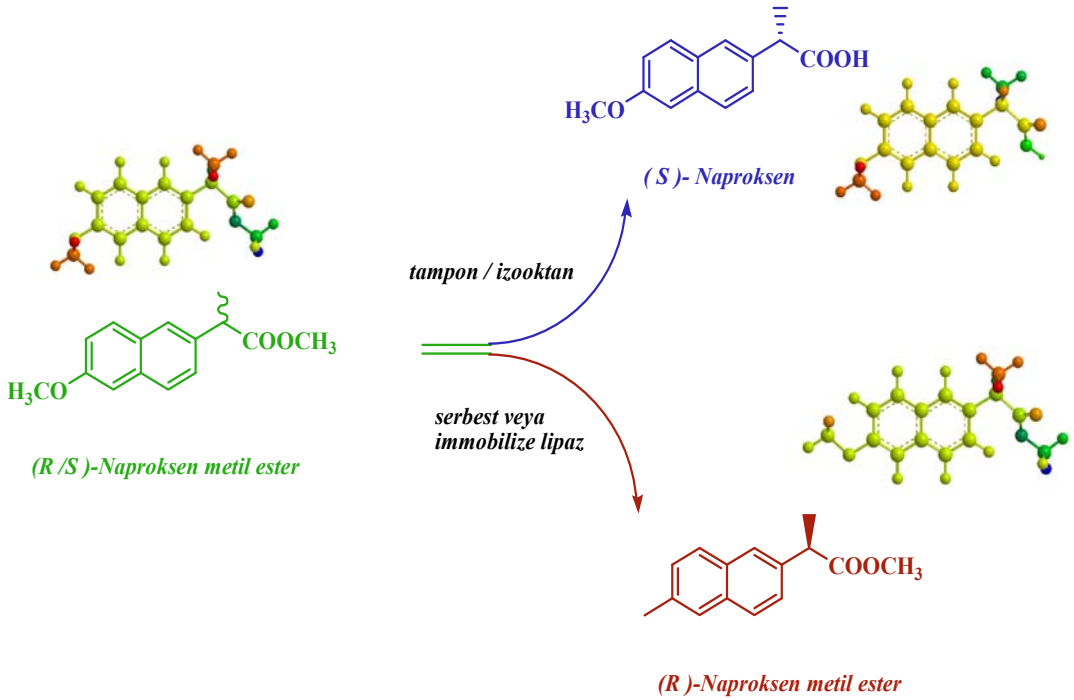
$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \qquad ee_s = \frac{C_R - C_S}{C_R + C_S} \qquad ee_p = \frac{C_S - C_R}{C_S + C_R}$$

ee_s ; Kalan substratın enantiyomerik fazlalığı

ee_p ; Oluşan ürünün enantiyomerik fazlalığı

C_R ; R enantiyomerinin konsantrasyonu

C_S ; S enantiyomerinin konsantrasyonu



Şema 1.11. *(R,S)*-Naproksenin metil esterin enantiyoselektif hidrolizi

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

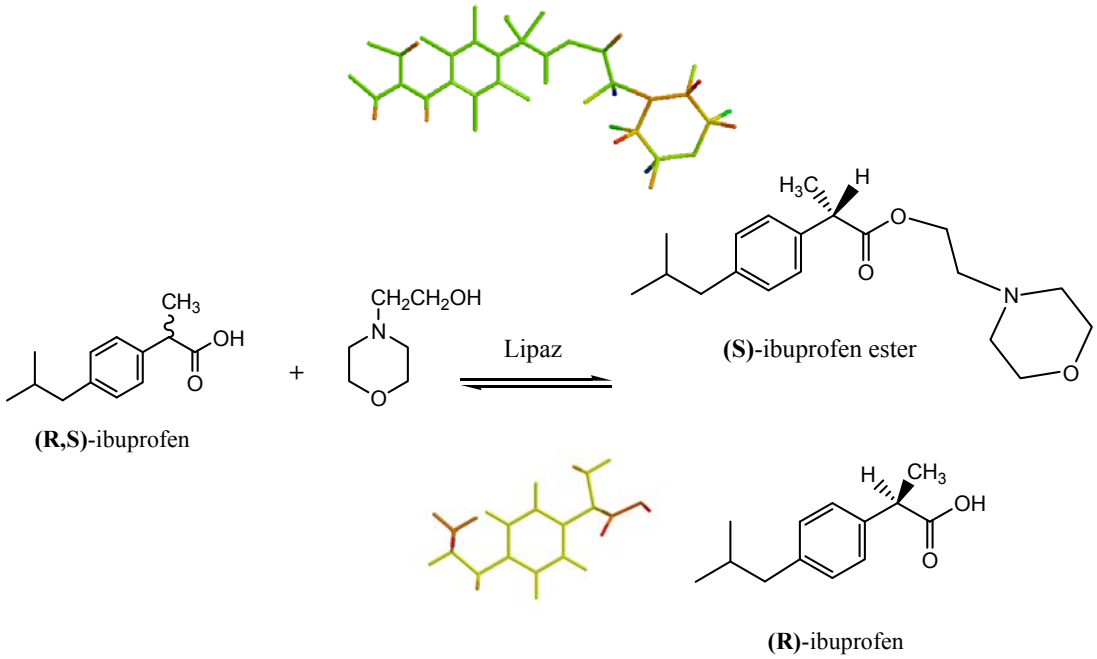
İmmobilize lipazların, serbest enzimlere göre biyokatalitik proseslerde kullanımı daha kolay, dayanıklı ve ekonomiktir. Bundan dolayı günümüzde araştırmacılar mevcut immobilizasyon tekniklerinin geliştirilmesi ve daha kullanışlı değişik taşıyıcılara immobilizasyon üzerine çalışmalarını yoğunlaştırmışlardır. (Matsuma ve ark., 1998; Persson ve ark., 2000; Plieva ve ark. 2000; Kamori ve ark. 2000; Basri ve ark., 1994; Telefoncu ve ark., 1990; Bouwer ve ark., 1997; Zaidi ve ark., 1995; Battinelli ve ark., 1996; Shibasaki ve Yamane 2000; Montero ve ark. 1993; Khurana ve Ho 1990; Hertzberg ve ark., 1992; Knezevic ve ark., 1998; Tutar ve ark., 2009).

Lipaz enzimi ilk olarak 1956 yılında H. Brandenberger tarafından kovalent bağlama yöntemi ile iyon değiştirici reçine üzerine immobilize edilmiş (Iwai ve ark. 1964), ancak lipazın ester hidrolizinde veya ester sentezinde kullanılması ile ilgili uygulamaya yönelik çalışmalar Iwai ve arkadaşlarının (1964) çalışmalarıyla başlamıştır (Sökmen 2005).

Lipazların immobilizasyonu hidrofilik ve hidrofobik destek maddelerinde çalışılmıştır (Maury ve ark., 2002): magnetik küreler (Guo ve ark., 2003), kontrollü gözenekli camlar (Moreno ve Sinisterra 1994), kitosan (Ye ve ark., 2005; Chiou ve Wu 2004), polimerik filmler (Atia ve ark., 2003), gözenekli silikon yüzeyler (Létant ve ark., 2004) ve aljinat jeller (Matsumoto ve Ohashi 2003).

Xin ve ark. (2000), su-organik çözücü iki fazlı sürekli reaktör sistemi ile *S*-Naproksenin enzimatik rezulasyonunu incelemişler ve çeşitli reaksiyon şartları çalışmışlar.

Chen ve ark. (2000), bir enatiyoselektif esterifikasyon prosesi siklohekzanda accurel MP1000'de *Candida rugosa* lipaz kullanarak rasemik ibuprofenden 2-*N*morpholinoetil (*S*)-ibuprofen ester ilacın sentezi için geliştirmişler.



Kim ve ark. (2000), yeni iki adımlı aseton muameleli metod (*R,S*)-ketoprofen etil ester'in hidrolizine karşı *Candida rugosa* lipaz (CRL)'ın enantiyoseçiciliğini artırmak için geliştirmişler. Ham CRL'ın iki adımlı aseton muamlesi çökeltiler olarak toplamışlar ve optik olarak saf (*S*)-ketoprofen'in üretimi için kullanmışlar. Mu metodla ham CRL'a kıyasla spesifik aktivitesi 2 kat artmış ve daha fazla enantiyoseçicilik göstermiştir (% eep:100 ve enantiyometrik oran (E >100)).

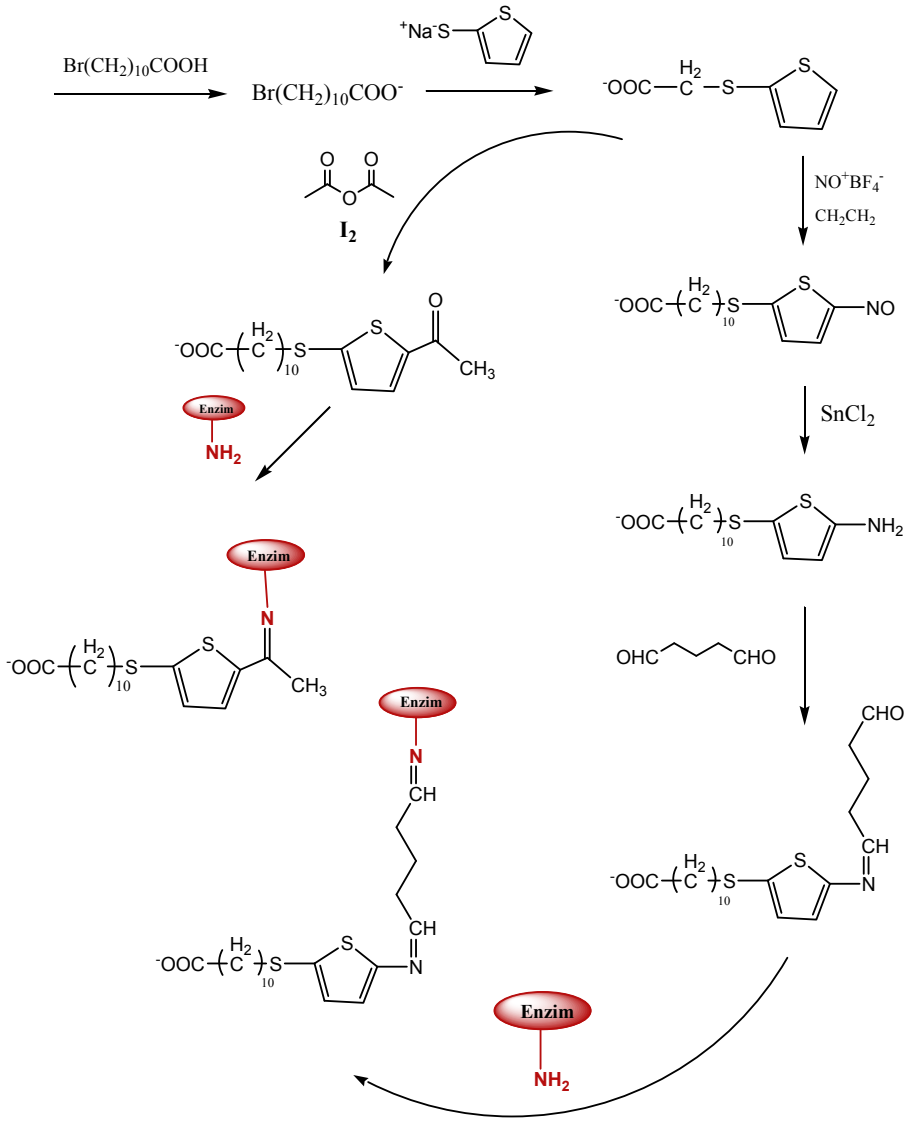
Fuentes ve ark. (2001), *Rhizomucor miehei* lipaz ve *Candida cylindracea* lipaz üç farklı polisilikata (sepiolite, palygorskite ve montmorillonite) adsoprsiyon tekniği ile immobilize ederek aktivitelerini incelemişler ve yaygın kullanılan reçine Duolite A-568 üzerine benzer immobilizasyon tekniğini izleyerek aktivitelerini karşılaştırmışlar ve etil format esteraz hidrolizinde kullanmışlardır.

Palomo ve arkadaşları (2002), *Candida rugosa* lipazı saflaştırmışlar ve farklı immobilizasyon teknikleri kullanarak hidrofobik destek materyallerine immobilize etmişler (kovalent immobilizasyon, iyonik adsorpsiyon gibi). Katalitik özelliklerini (aktivite, spesifiklik, enantiyoselektivite) incelemişlerdir.

Kamori ve ark. (2002), gözenekli seramik destek maddesi kullanarak lipaz immobilizasyonunu gerçekleştirerek kiral sentezlerde kullanmışlar.

Kılınç ve ark. (2002), domuz pankreatik lipazı immobilize ederek, katalitik özeliklerini ve stabilitisini incelemişlerdir. Lipazı adipoil klorür ile çapraz bağlayarak polivinil alkole immobilize etmişler ve immobilize lipaz hazırlamanın aktivitede birçok parametrelerin etkisini çalışmışlar. İmmobilize lipazın iyi stabilite (pH, termal, depolama) gösterdiğini bulmuşlar ve pratik uygulamalar için iyi bir potansiyele sahip olduğunu göstermişler.

Dyal ve ark. (2003), *Candida rugosa* lipazı magnetik Fe_2O_3 nano partiküllerine immobilize ederek reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılması, depolanması ve tekrar kullanabilirliği gibi avantajlarını gözlemişler (Şekil 2.1).



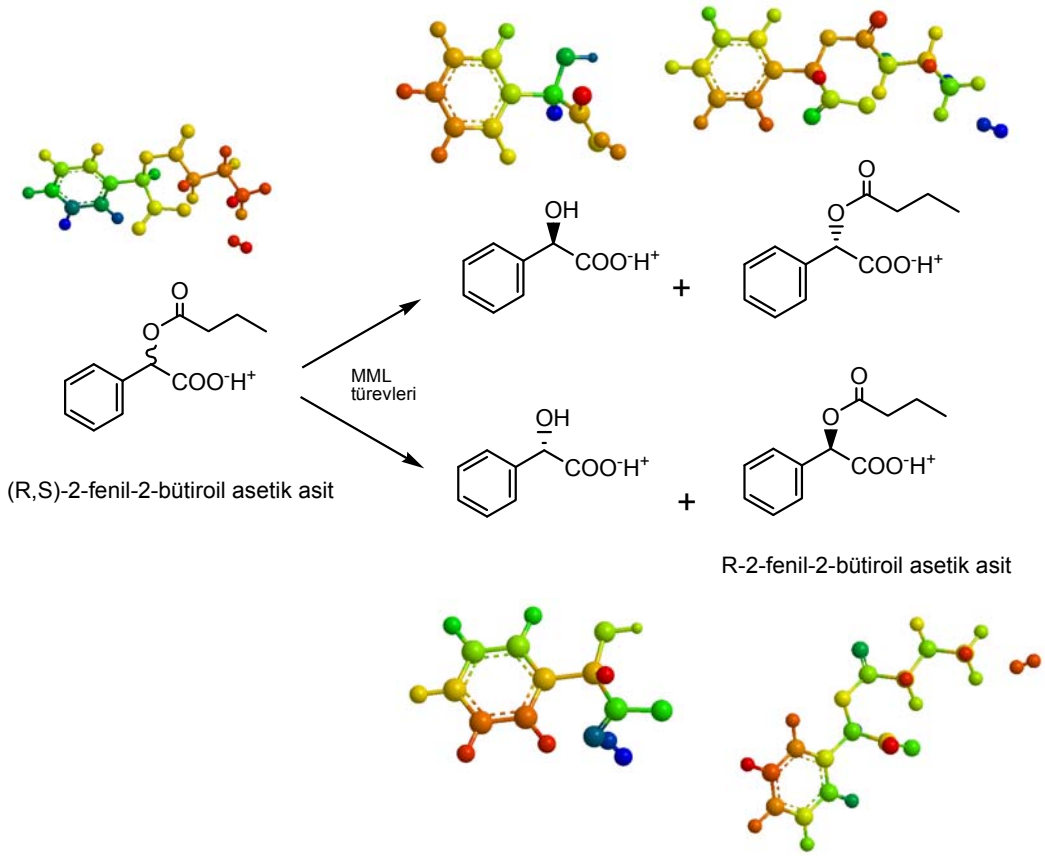
Şekil 2.1. Fe_2O_3 nanopartiküllerinde *Candida rugosa* lipazı immobilize etmek için kullanılan yollar

Matsumoto ve Ohashi (2003), *Candida Rugosa* bazlı immobilize lipazların ısıya dayanıklılığını araştırmışlar. Makro gözenekli akrilik küreciklere, kalsiyum silikat inorganik mikrokapsüllere ve kalsiyum aljinat jeline immobilize etmişler. Kullanılan immobilizasyon tipine göre lipazların ısıya dayanıklılığını artırıldığını bulmuşlar.

Bir başka kitosanla çalışmada, Hung ve ark. (2003), lipazı kitosan küreciklerine hidroksil ve amino gruplarından yararlanarak immobilize etmişlerdir ve

araştırıcılar bunu “binary immobilization” olarak adlandırmışlardır. Lipaz ilk defa kitosan kürecikleri kullanarak glutaraldehit ile lipazın amino grupları çapraz bağlanarak daha sonra kitosanın hidroksil grupları karbodiimit ile aktivite ederek *Candida rugosa* lipazı immobilize etmişlerdir.

Palomo ve ark. (2003), *Mucor miehei* lipaz (MML) farklı epoksi reçinelerine (standart hidrofobik epoksi reçineleri, epoksi-etilendiamin, epoksi-iminodiasetik asit, epoksi-bakır şelatları) kovalent olarak immobilize etmişler ve oktadesil-Sepa kürecik destek maddelerinde yüzeysel aktivasyon ile adsorbe edilmiş. Hazırlanan immobilize enzimler farklı şartlar altında (*R,S*)-2-bütirol-2-fenilasetik asitin hidrolitik rezulasyonunda kullanmışlar. Enantiyometrik oran genellikle immobilize enzimlerin hazırlanmasına ve şartlarına bağlıdır. Bundan dolayı oktadesil-MML hazırlanması *R* isomerine karşı enantiyoselektivite gösteren tek immobilize enzim türevi olduğunu bulmuşlar. Diğer hazırlanan immobilize enzimler bunun aksine *S*’ye karşı seçicidir. İminoasetik asit-sepa küreciklerinde immobilizasyon en yüksek enantiyoselektivite göstermiş (Şekil 2.2).

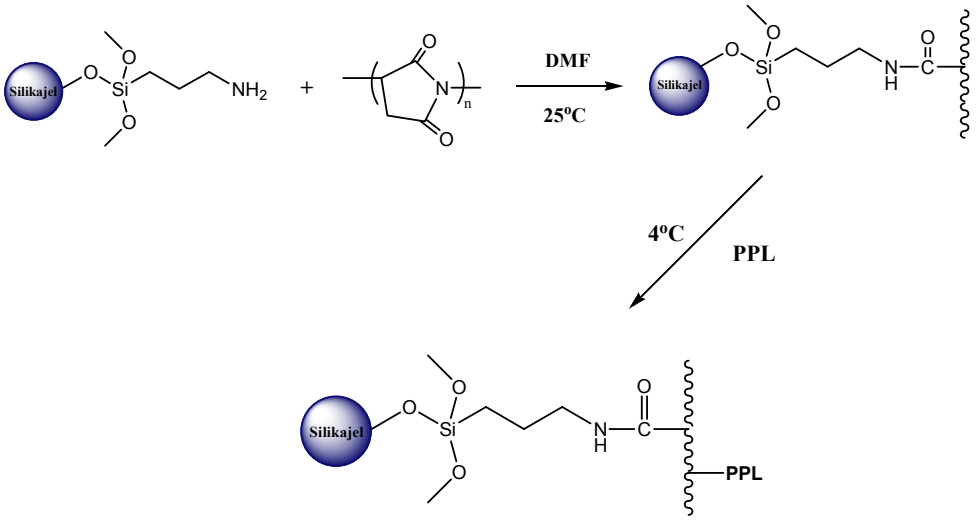


Şekil 2.2. MML'ın farklı immobilize edilmiş türevleri ile (*R,S*)-2-bütirol-2-fenilasetik rezülasyonu

Sağıroğlu ve ark. (2004), domuz pankreatik lipazını ve *Candida cylindracea* lipazın Celite ve Amberlite IRA 938'e immobilize etmişlerdir. İmmobilize lipaz türevlerinin aktivitesinde immobilizayona etkisi çalışılmıştır. İmmobilize lipazlar pentil izovaleratlar sentezinde kullanmışlardır. Pentil isovaleratların sentezine etkileyen çeşitli reaksiyon parametreleri incelenmiştir. Reaksiyon hızı serbest lipazla esterifikasyon hızını karşılaştırmışlardır. İmmobilize lipazların esterifikasyon reaksiyonda çok etkili olduğunu bulmuşlardır.

Bai ve ark. (2004), yeni bir enzim taşıyıcı silikajel bağlı amin ve polisükkinamit arasında reaksiyonla hazırlanıp *Porcine pancreatic* lipaz (PPL) immobilize etmişlerdir. Elde edilen immobilize lipazın yüksek aktivite göstermiş ve

bu yüksek aktivitesini tekrar kullanılabilirlikte koruyabilmiş ve termal ile pH kararlılığı artırdığını gözlenmişler. İmmobilize lipaz 37°C'de fosfat tamponunda depolandığı zaman uzun süre aktivitesini korumuş ve 4°C'deki depolandığından daha yüksek aktivite göstermiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Destek maddesinin hazırlanması ve PPL'nin immobilizasyon şeması

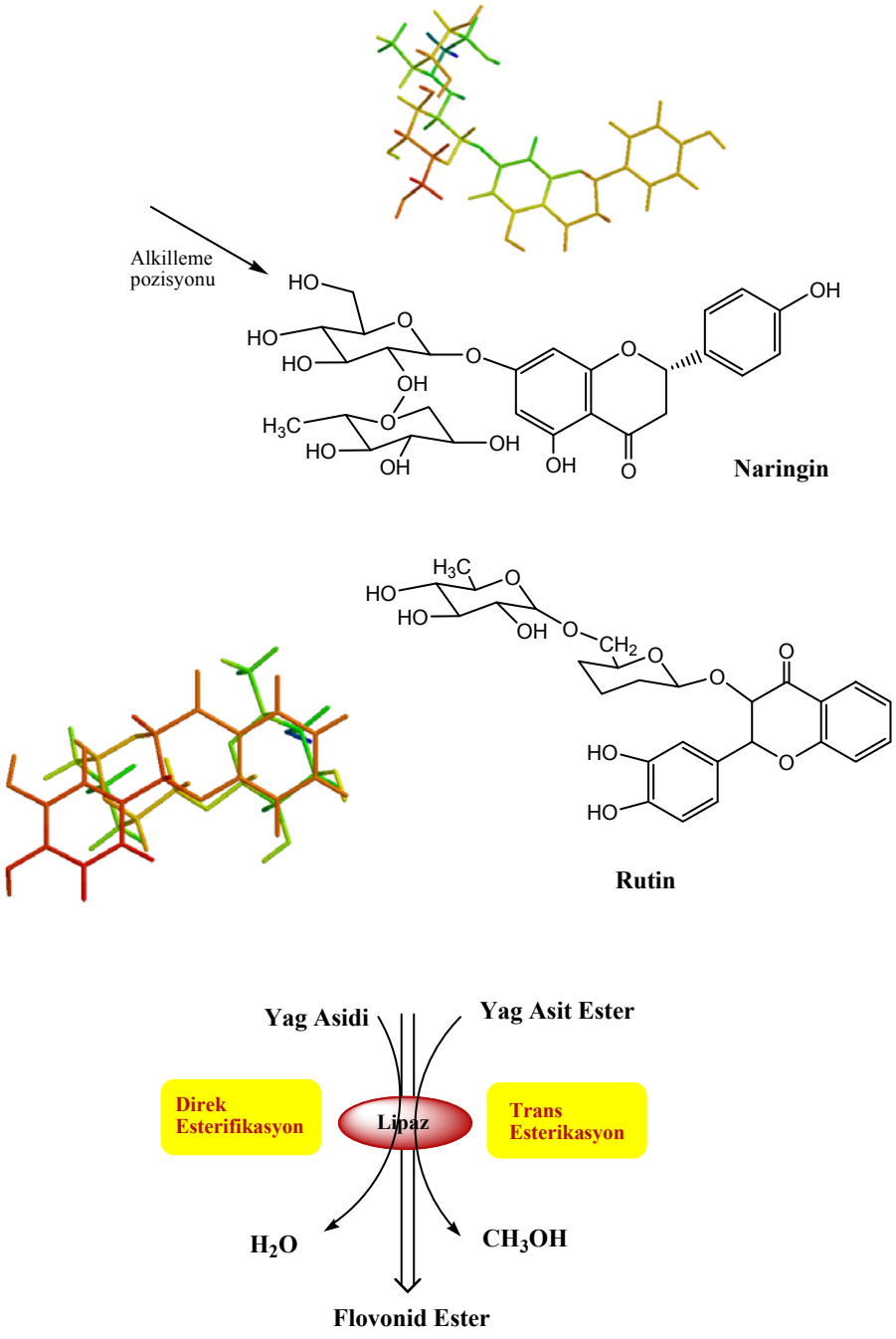
Desai ve ark. (2004), *Porcine pancrease* lipaz K-carrageenan küreciklerine tutuklama yöntemi ile immobilize etmişler. Aktivitesi, tekrar kullanılabilirliği, inceleyip serbest enzimle karşılaştırmışlar. İmmobilize lipazları su-organik iki fazlı sistemde zeytinyağın hidrolizini gerçekleştirmişler.

Chiou ve Wu (2004), ilk defa karbodiimit kullanarak kitosanın hidroksil gruplarını aktivite ederek iki tip *Candida rugosa* lipazı immobilizasyon yapmışlar. Elektron spektroskopisi kullanarak kimyasal analiz (ESCA) tekniğiyle kanıtlamışlar. İmmobilizasyon parametrelerini incelemişler.

Yu ve arkadaşları (2004), immobilize *Candida rugosa* lipazı rasemik ibuprofen'in kinetik resolüsyonunda kullanılmıştır. İmmobilize lipazın serbest lipaza göre 2,2 kat daha seçimli olduğu gözlenmiş.

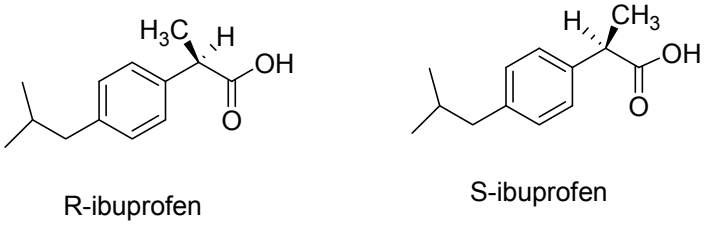
Shukla ve Kumar (2004), immobilize lipaz kullanarak iki fazlı zeolit-membran reaktöründe zeytinyağı hidroliziyle deneysel kütle transfer analizleri ve çalışmaları yapmışlar.

Passicos ve ark. (2004), doğal antioksidantlar olarak bilinen flavonoidlerin organik çözücülerdeki çözünürlüğünü artırmak amacı ile immobilize edilmiş *Candida antartica* lipaz kullanılarak metil-2-butanol ile naringin ve rutin'in asetillasyonunu gerçekleştirmişler (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Naringin veya rutin'nin direk esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyon şeması

Yu ve ark. (2004), immobilize *Candida rugosa* lipaz rasemik ibuprofen'in (Şekil 2.5.) kinetik resolüsyonunda kullanılmıştır. İmmobilize lipazın serbest lipaza göre 2.2 kat daha seçimli olduğu gözlemişler.



R-ibuprofen S-ibuprofen

Şekil 2.5. *R*-ibuprofen ve *S*-ibuprofen formülleri

Deng ve ark. (2005), polipropilen delikli fiber mikrofiltrasyon membranları (PPHFMM) biyouyumluluk yüzeyi ve hidrofilliği artırarak α-Allil glikozitin plazma tarafından indirgenmiş aşı polimerizasyonu ile hazırlamışlar ve adsorpsiyon tekniği ile *Candida* rugosa lipaz immobilize edilmiştir ve katalitik etkisi incelenmişler.

Noureddini ve Gao (2005), soya fasülyesinin enzimatik transesterifikasyonu metanol ve etanol ile çalışmışlar. Alkil esterlerin hidrolizini lipazlarla test edilmiş. İmmobilize enzimi, iso-butiltrimetoksisilan ve tetrametoksisilan hidrolizde polikondansasyon ile hazırlamışlar.

Liu ve arkadaşları (2005), magnetik mikro kürelere *Candida cylindracea* lipazı immobilize etmişlerdir. Magnetik destek maddelerinde lipazın kovalent immobilizasyonu yeni ve ekonomik bir metod olarak bulmuşlar. Hazırlanan magnetik enzim partiküllerin birçok avantajlara sahip olduğunu bulmuşlardır. Magnetik destek maddelerinin partikül büyüklüğü (<8μm) azaltılmış ve bazı yüksek protein yüklemeyi sağlamışlar. Ayrıca yüksek magnetik özelliklere sahip magnetik enzim partikülleri bir manyetik alanda kolaylıkla ve nazikçe ayrılabilmiş. Manyetik destek maddeleri herhangi partikül aktivasyon prosesine ihtiyaç olmadan enzim immobilizasyonu için aktif gruplara sahiptir. Buna ilaveten immobilize lipaz yüksek aktivite verimi (% 72.4), enzim yüklemesi (34 mg/g) ve tekrar kullanım süresince iyi

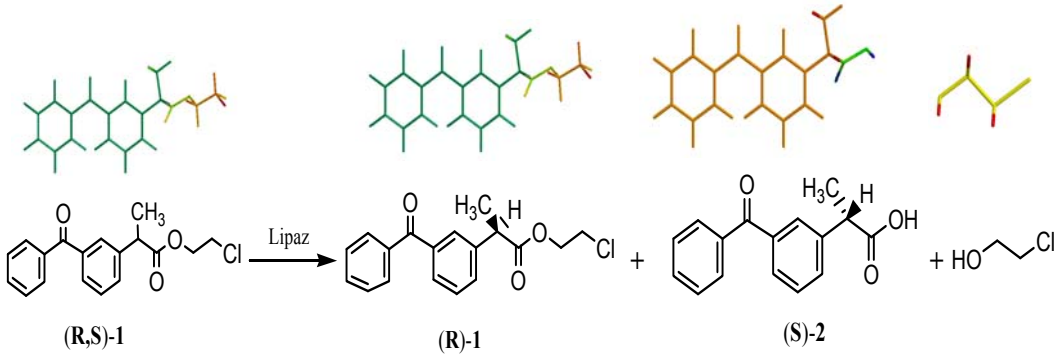
stabilite göstermişler. Mikron büyüklüğündeki magnetik polimerik destek maddeleri enzim immobilizasyonu için ekonomik, etkili ve seçici sistem sağladığını bulmuşlardır.

Ye ve ark. (2005), yeni bir destek maddesi poli(akrilonitril-ko-maleik asit)(PANCMA) reaktif karboksilli grupları içeren içi boş lif membrana ultrafiltrasyon yapmak için kullanmışlardır. Doğal bir molekül olan kitosana enzim immobilizasyonu için bir çift tabakalı biyomimetik membran yapmak için EDC/NHS (karbodiimit hidrokolorür/N-hidroksil süksiniimit) varlığında PANCMA memranda bağlamışlardır. Lipaz çift-tabakalı membranda ve sırasıyla bağlayıcı olarak EDC/NHS ve GA ile PANCMA ve çift-tabakalı membranda immobilize etmişler. Enzimlerin tekrar kullanılabilirliği, kinetik parametreleri, pH ve termal dayanıklılığı üzerine çalışmışlar.

Won ve ark. (2005), tutuklanmış *Candida rugosa* lipazın sızıntısı önlemek için silika veya kitosanlı aljinat jel yüzeyi kaplayarak denemişler. İmmobilizasyon şartlarını ve kaplı aljinat küreciklerin kaplama metodunu etkileyen faktörleri incelemişlerdir. Kaplanmamış küreciklerle karşılaştırmışlardır.

Yeşiloğlu (2005), *Candida rugosa* lipaz Edirne bölgesinden çıkarılan bentonit adsorpsiyon metoduyla immobilize etmişlerdir ve aktivite ve stabilitesini incelemişlerdir.

Xi ve Xu (2005), farklı immobilizasyon taşıyıcılarına *Candida rugosa* lipazı immobilize ederek (S)-ketoprofen'in devamlı üretimi için paketlenmiş yatak reaktörü yaparak kullanmışlar (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. 2-kloroetilester Ketoprofen'nin enantiyoselektif hidrolizi

Desai ve ark. (2006), *Porcine pancreatic* lipazı kovalent bağlama yöntemi ile kitosana immobilize etmişlerdir. Optimum şartları bulduktan sonra, Salicornia yağının alkolizini serbest ve immmobilize lipaz kullanarak gerçekleştirmişlerdir.

Queiroz ve ark. (2006), sodyum alginat (AlgNa)/poli-(vinil alkol) (PVA) mikroküreciklere enkapsülasyon gerçekleştirmiş. Bu mikroküreciklerin su taşıma özelliği, infrared spektroskopisi ve diferansiyel taramalı kalorimetri ile çalışılmış. Mikroküreciklerdeki camsı geçiş sıcaklığının yükselmesi polimerlerin bileşiklerinin (AlgNa/PVA) spesifik çapraz bağlı reaksiyonları gösterilmiş. Bu AlgNa/PVA mikroküreciklerini Michaelis sabiti (Km) ve maksimum reaksiyon hız Vmax ile karakterize edilmiştir ve serbest lipazla kıyaslamışlar.

Lee ve arkadaşları (2006), lipazı immobilizasyon etmeden önce soya yağı ile enzimin aktif bölgesi korumuşlar ve soya yağı kullanmadan yapılan immobilizasyonla enzimin aktivitesini ve tekrar kullanabilirliğini karşılaştırmışlar ve bu teknikle enzimin aktif bölgelerinin korunduğunu ileri sürmüşler.

Bai ve arkadaşları (2006), kolay proses şartlarında yeni gözenekli silika destek materyali sentezlemişlerdir. Domuz pankreatik lipazı bu destek materyallerine immobilize edip optimum şartları belirleyip kinetik parametreleri incelemişlerdir.

Kılınç ve arkadaşları (2006), Domuz pankreatik lipazı kitin ve kitosana önce adsorpsiyon ile ardından çapraz bağlayıcı glutaraldehit ile bağladıktan sonra veya bağlamadan önce eklenerek immobilize etmişler. Serbest ve immobilize lipazların özellikleri araştırılmış ve karşılaştırılmış. İmmobilize enzimlerin her ikiside optimum pH'ı 9.0'dan 8.5'e kaydırmış. Ayrıca optimum sıcaklığı 30°C'den kitin enzim için 40°C'e, kitosan bağlı enzim için ise 45°C'e kaydırmış. Bu immobilizasyon etkisi düşük fakat immobilize enzimler iyi tekrar kullanılabilirlik ve kararlılığa (depolama ve operasyon) sahiptir. Bu özelliklerin yanında immobilize lipazlar orta zincir uzunluğuna sahip yağ asit ve alkollerin esterifikasyon reaksiyonlarını katalizlemek için uygun olduğunu ifade etmişler. Bu sonuçlara göre, immobilize lipazların Esterifikasyon aktiviteleri sırasıyla kitosan ve kitin-enzim için iki ve dört kat daha yüksek olduğunu bulmuşlar. Bu immobilizasyon prosedürü immobilize lipazların ticari uygulamaları için büyük bir potansiyele sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Ye ve arkadaşları (2006), lipaz immobilizasyonunda kullanılmak üzere geliştirilen kitosan bağlı poli (akrilonitril-coimaleik asit) hollow fiber membranlarını hazırlamışlar. Bu çalışmada biyomimetrik membran destek materyali hazırlamış ve lipaz bağlama oranı 66.5 mg/m^2 olarak saptanmış.

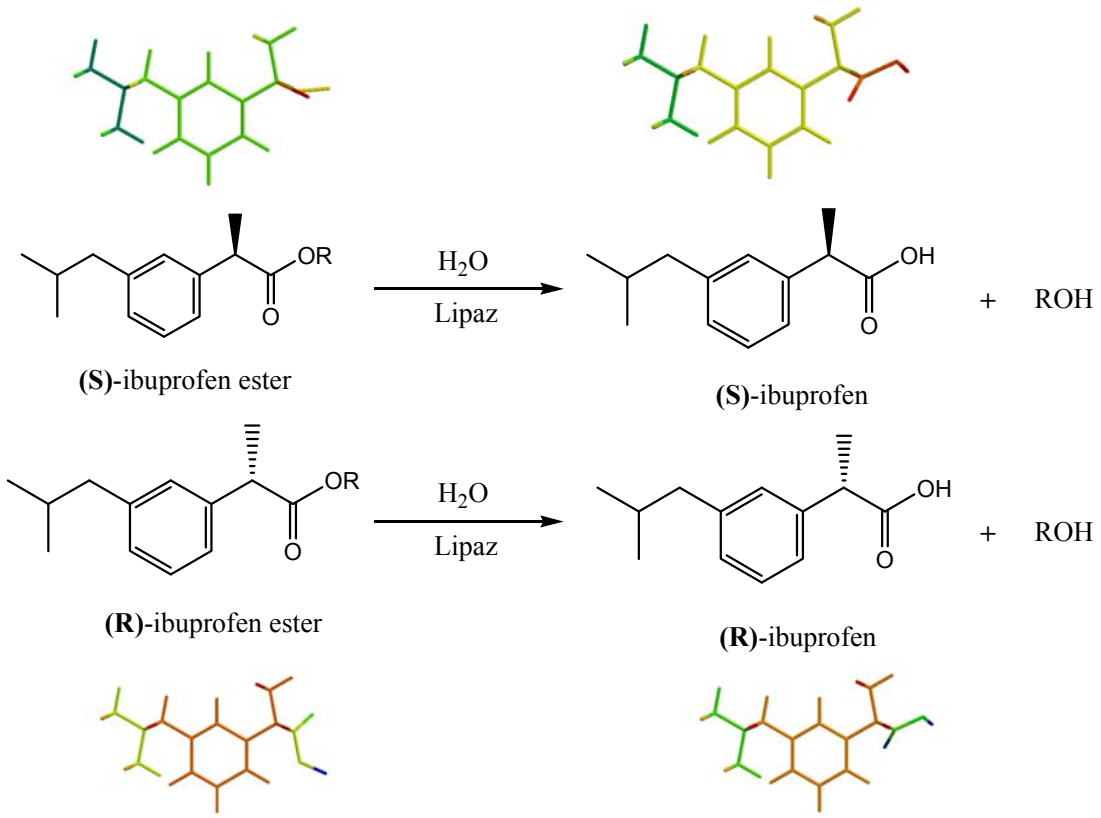
Chunhua ve ark. (2006), Vitamin A esteri organik çözücülerde *Candida* türlerinden immobilize lipazlar ile sentezlemişler. Lipazların türü, çözücülerin etkisi, substratların molar oranı, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyondaki su aktivitesi Vitamin A palmitat sentezi için optimum şartlar elde etmek için detaylı araştırmışlar.

Orçaire ve ark. (2006), *Burkholderia cepacia* lipaz ve *Candida antartica* lipazı CO_2 süperkrıtik tekniği ile silika aerojellere tutuklama metoduyla immobilize etmişlerdir. Bu immobilize olmuş biyokatakizörler metil asetat ile ayçiçek tohum

yağının transesterifikasyonu ile biyodizelde uygulamışlar ve bazı ticari enzimlerlede karşılaştırmışlar.

Takaç ve Bakkal (2007), *Candida rugosa* lipazın *S*-Naproksen üretiminde enantiyoselektivitenin ve katalitik etkinin immobilizasyon şartlarına etkisini incelemişlerdir.

Wang ve arkadaşları (2007), hidrofilik ve hidrofobik membranlara rasemik ibuprofenin kiral ayırımı için özel mikro yapıda bir komposit oluşturarak lipazı immobilize etmişler (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Rasemik ibuprofen ester'in lipaz katalizli asimetrik hidrolizi

Perez ve arkadaşları (2007), kimyasal olarak modifiye edilmiş sellulignine *Candida* rugosa lipazı immobilize ederek kinetik ve biyokimyasal özelliklerini incelemişler.

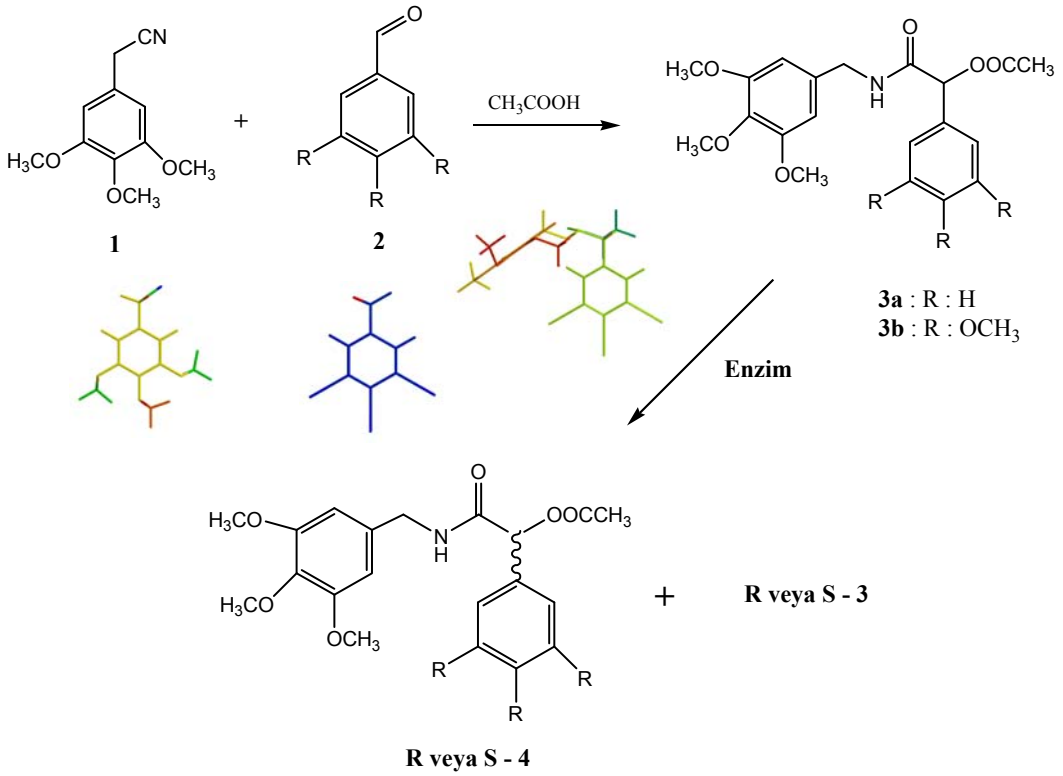
Blanco ve arkadaşları (2007), hidrofobik bir destekte lipaz immobilizasyonuna etanol etkisini incelemişler. Çözücülerle iç gözenek yüzeyindeki hidrofobikliği azaltmak sulu enzim çözeltisine ulaşmayı sağlamışlar. Böylece etanol sistemin polar (enzim çözeltisi) ve apolar (hidrofobik destek maddesi) arasındaki ara madde olarak kullanmışlar. Hidrofobik destek maddesinin lipaz immobilizasyonu için monolayer kapasitesi %10 etanol kullandığında 2 kat artırılmış. Enzim etanolun olmadığı zaman hidrofobik gözeneklerinin sadece dış uç kısmına ulaştığını bulmuşlar.

Tang ve ark. (2007), kitosan nano-partiküllerine lipazı immobilize ederek karakterize etmiş ve kinetik bağıntıları incelemiştir.

Öztürk ve ark. (2007), bir hidrofobik grup içeren poli 2-hdiroksietil metakrilat bazlı matriks 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve *N*-methacryloyl-(l)-fenilalanin metil ester (MAPA) in polimerizasyon ile nanoküre formunda hazırlamışlar ve bu nanokürecikleri adsorpsiyon metodu ile *Candida rugosa* lipazın adsorpsiyonun da kullanmışlar ve adsorpsiyon şartlarını etkileyen faktörleri incelemişler.

Giorno ve ark. (2007), yeni bir multifaz enzim membran reaktörünü dayanıklı ve muntazam yağ-su emülsiyonunun varlığında bir polimerik membranda *Candida rugosa* lipazı immobilize ederek geliştirmişler. Reaktörü farklı Naproksen esterleri ve trigliseritlerle test etmişler. Yaptıkları çalışmanın immobilizasyonun hem enzim stabilitesini artırdığını hem de doğal selektivitesinin koruduğunu bulmuşlar.

Koszelewski ve ark. (2007), *Pseudomonas cepacia* ve porcine pankreas lipazları farklı immobilizasyon protokolleri ile farklı destek maddelerine immobilize ederek α-asetoksiamitlerin kinetik rezulasyonunda kullanmışlar (Şekil 2.8).

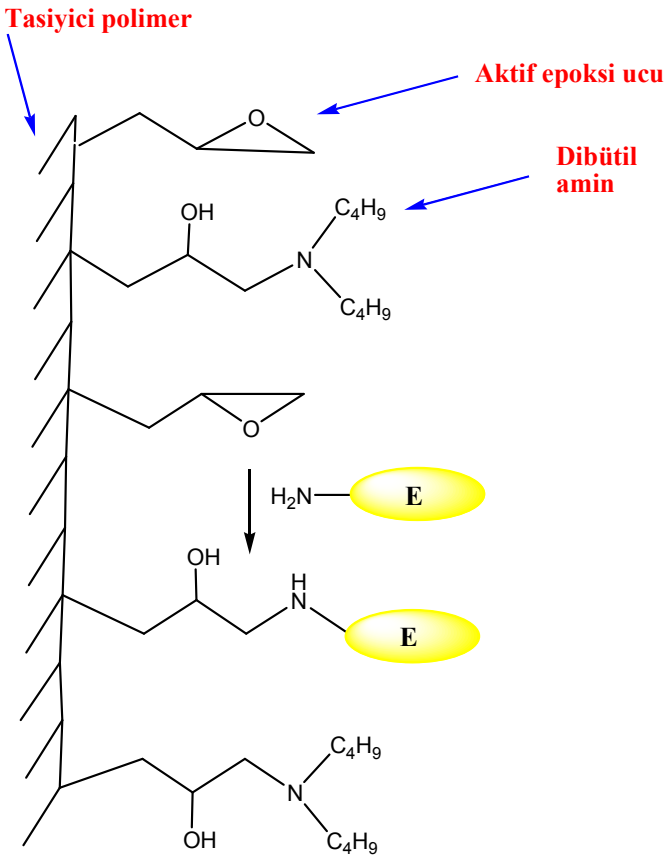


Şekil 2.8. Aril-(3,4,5-trimeoksibenzilkarbonil)metil ester 3a ve 3b'nin enzimatik kinetik rezulasyonu

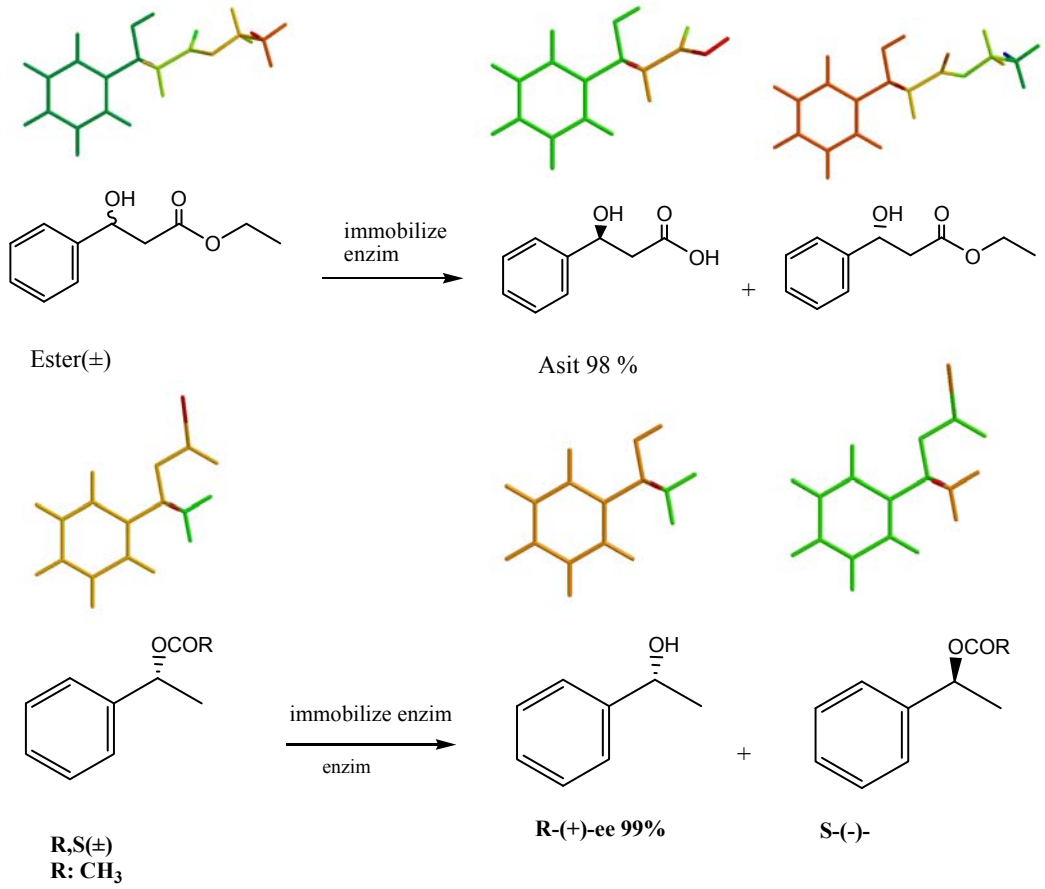
Zhang ve ark. (2008), oktil grupları ile fonksiyonlandırılmış magnetik silisli mesohücreli köpük lipaz adsorpsiyonu için destek maddesi olarak kullanmışlar. Sekonder alkollerin kinetik rezulasyonunu incelemişler. Bu magnetik olarak ayrılabilen lipazların kinetik rezulasyonunda çok yüksek aktivite verdiğini bulmuşlar.

Bhushan ve ark. (2008), Jammu'da *Arthrobacter* sp. lipazı izole ettikten sonra rasemik ilaç ara ürünleri veya diğer rasematları çözmek için çalışmışlar. Lipaz sentetik makro gözenekli epoksi kopolimer küreciklerine immobilize etmişler. Aktivite, stabilite ve kinetik parametrelerini inceledikten sonra immobilize lipazların tekrar tekrar kullanarak fluoxitin ara ürününün (rasemik etil-3-hidroksi-3-fenil-propionat)'ın enantiyoselektif rezulasyonunu incelemişler. Yeni sentezlenmiş epoksi polimerlerdeki ABL immobilizasyonun rezulasyon reaksiyon süresi azaltılmış ve serbest enzime kıyasla daha yüksek dönüşüm, daha yüksek enantiyoseçicilik, daha

iyi kararlılık sağlanmış ve bir çok kez kullanmışlar. Bu immobilize lipazlar proses geliştirmede kolaylıkla uygulanabilirliğini bulmuşlar (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. GMA-EGDM 75-20 Sentetik polimerde enzim (ABL) bağlama mekanizması

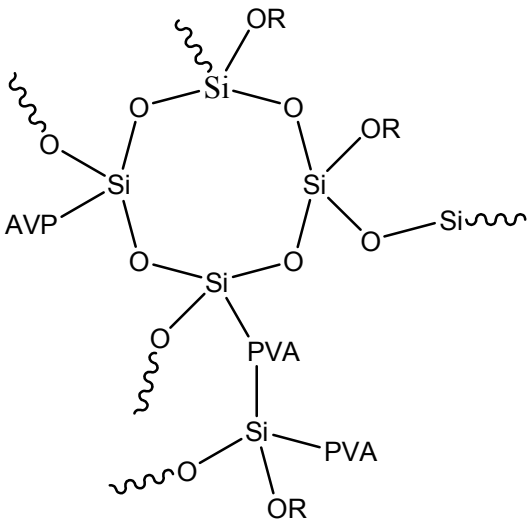


Şekil 2.10. Fluoxitin ara ürününün (rasemik etil-3-hidroksi-3-fenil-propionat)'ın enantiyoselektif rezulasyonunu

Karra-Châabouni ve ark. (2008), *Rhizopus oryzae* lipazı fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile immobilize etmişlerdir, öncelikle laboratuvarlarında selüloz fiberlere, karboksilik grupları oluşturmak için oksidasyon yaparak saflaştırmışlar. İmmobilize enzimlerin dayanıklılığını incelemişler ve esterlerin sentezinde kullanmışlar.

Santos ve ark., (2008), polisiloksan-polivinil alkolün (POS-PVA) hibrit matriksleri sentez ortamında organik bileşenlerin (polivinil alkol) farklı konsantrasyonlarını kullanarak sol-jel tekniği ile hazırlamışlar. İmmobilize lipaz için destek maddesi olarak kullanılan bu matrikslerin potansiyel ve fiziksel özelliklerini (gözeneklilik, kuvvetlilik, yüzey alanı) değerlendirmişler. Matriksler *Candida rugosa*

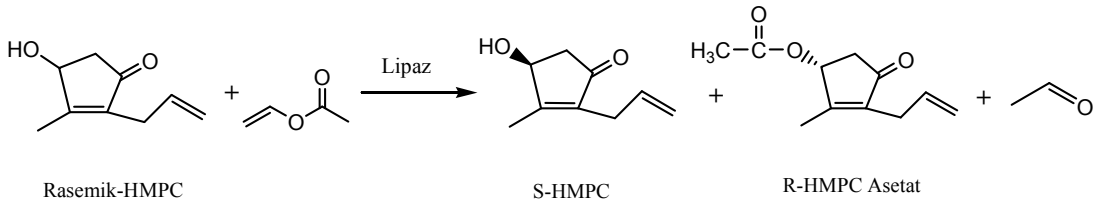
lipaz bağlamak için fonksiyonel grup elde etmek için sodyum metaperiodat ile aktive edilmiş ve bir çalışma modeli olarak kullanmışlar (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Sol-jel tekniği ile (R : bir etil grubu) hazırlanan POS-PVA matriksinin yapısı

Hoyos ve ark. (2008), *Pseudomonas stutzeri* lipazı üç farklı tutuklama metoduyla immobilize edip serbest enzimle aktivite ve stabilitesini karşılaştırmışlar. Çok yaygın olmayan ticari lipazı benzoinlerin kinetik rezulasyonunda kullanmışlar.

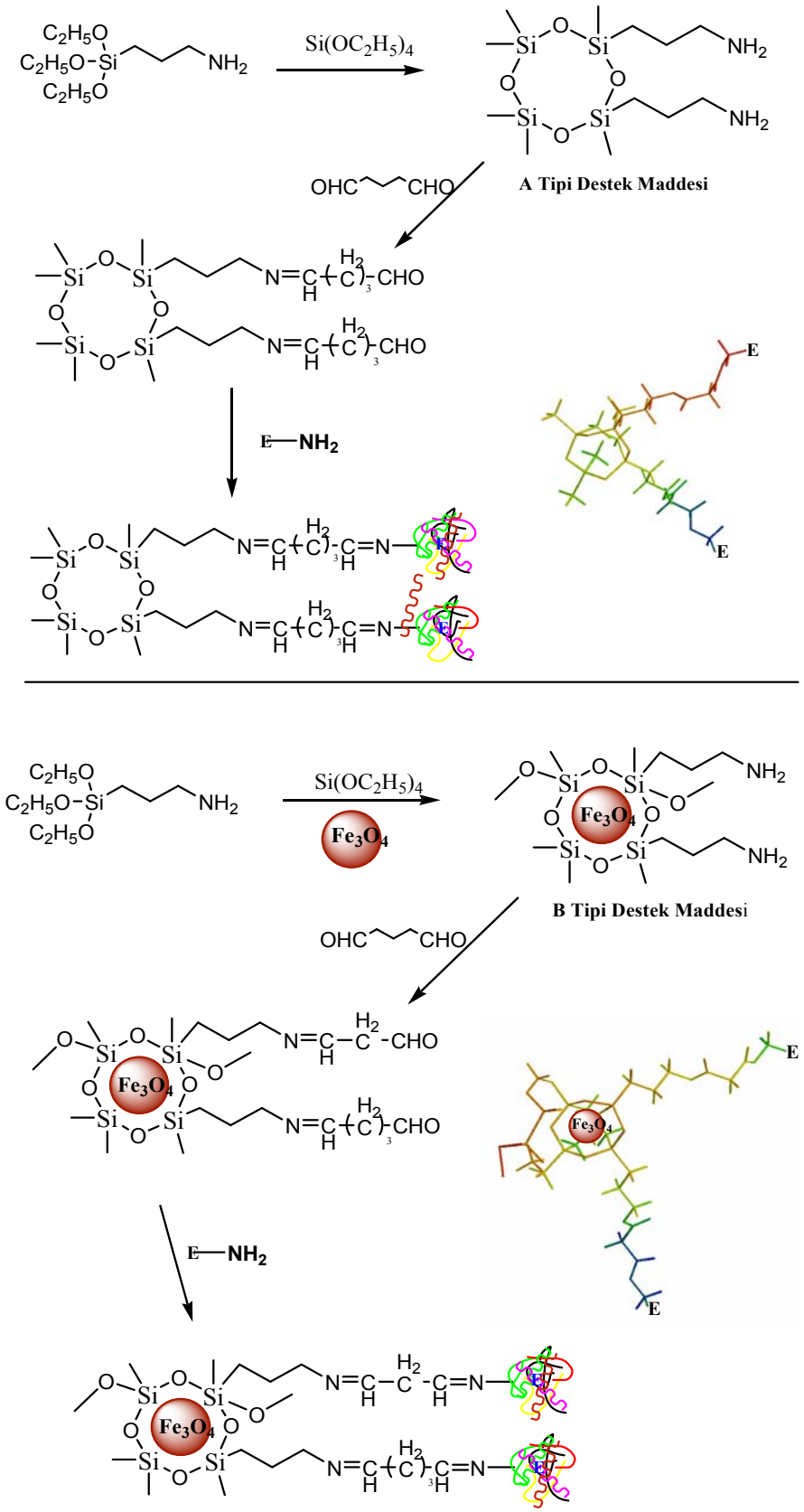
Yang ve ark. (2009), immobilize *Arthrobacter sp.* lipaz için destek maddesi olarak ucuz ve inorganik matriks olarak diomit kullanmışlardır. Enzimin aktivitesini, stabilitesini ve enantiyoselektivitesini artırmak için çeşitli immobilizasyon metotları denemişlerdir. Farklı metotlarla immobilize lipazların katalitik özellikleri 4-hidroksi-3-metil-2-(2-propenil)-2-siklopenten-1-one (HMPC)'in asimetrik asilasyonunu incelemişler (Şekil 2.11).



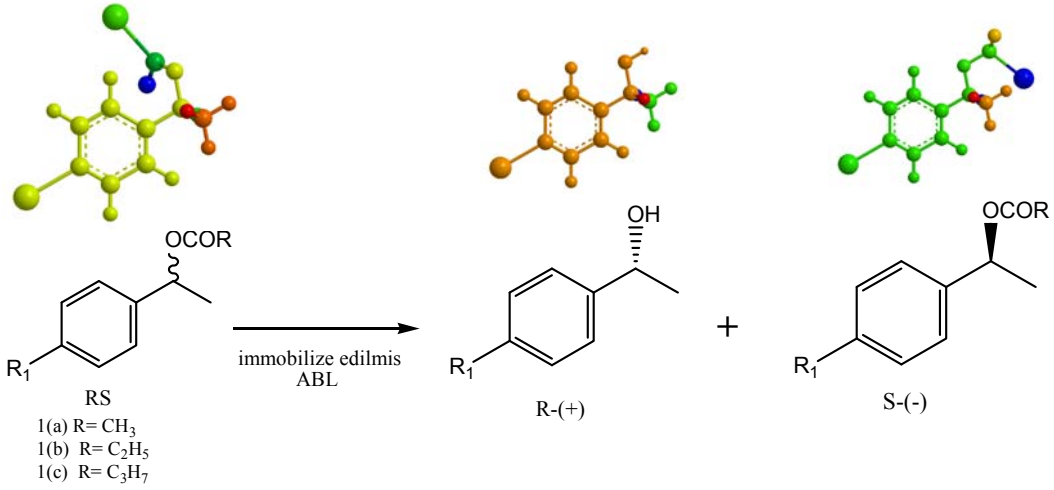
Şekil 2.11 Lipaz ile HMPC'nin kinetik rezulasyonu

Kawakami ve ark. (2009), trigliseritlerin metanolosis yoluyla yağ asitmetil esterlerinin üretimi için bir silika monolit biyoreaktör tasarlamışlar. *Rhizopus oryzae* lipaz ile değişik ortamlarda test etmişler ve bu önemli reaksiyon için immobilize edilmiş lipaz silika monolit reaktörünü uygulanmasının yapılır olduğunu göstermişler.

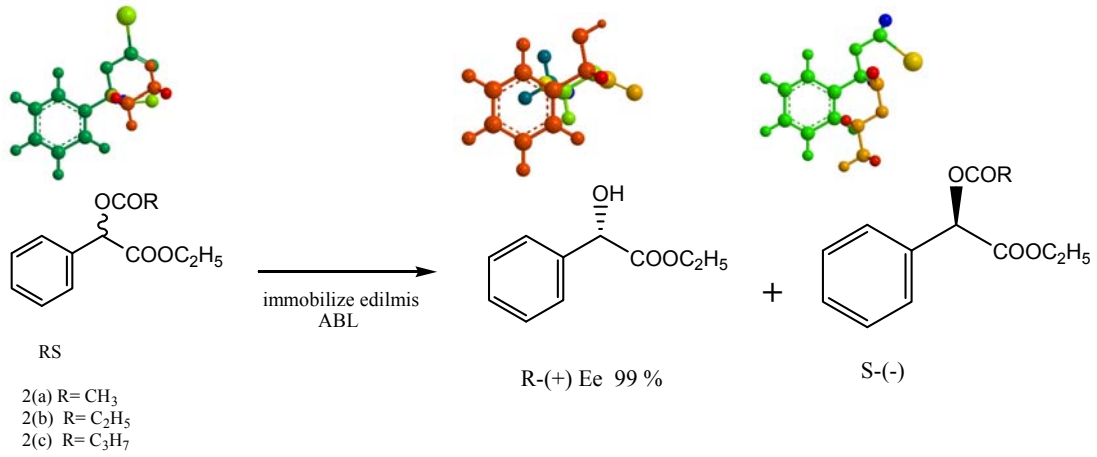
Chaubey ve ark. (2009), Arthrobacter sp. lipaz magnetik ve magnetik olmayan destek maddelerine sol-jel tekniği ile immobilize etmişlerdir (Şekil 2.12). Destek maddesindeki magnetik partiküllerin birleşmesiyle magnetik alanda çok hızlı immobilize olmuş enzim destek maddelerinin geri kazanılmasının kolay olduğunu gözlemişler. Hazırlanan destek maddeleri rasemik 1-fenil etanol alkil açilat/fluoxetine ilaç ara ürününün rezulasyonu için 15 kez ve önemli bir aktivite ve selektivite kaybı olmadan kullanmışlar ve başka ilaç ve ilaç ara ürünleri içinde test etmişlerdir (Şekil 2.13a-b).



Şekil 2.12. Nanomagnetik Tip A (A_1, A_2, A_3) ve magnetik Tip (B1, B2, B3) sol-jel kompozit taşıcılarda ABL enzim immobilizasyonu



Şekil 2.13a. Serbest ve immobilize enzim ABL kullanarak 1-fenil etanol'ün kinetik rezulasyonu



Şekil 2.13b. Serbest ve immobilize enzim ABL kullanarak fluoxetin ilaç ara maddesi: etil 3-hidroksi-3-fenilpropionat alkil açilatların kinetik rezulasyonu

Pirozzi ve ark. (2009), çinko bazlı sol-jeller asit veya baz katalizörlerin kullanımını birleştirerek biyokatalizörlerin aktifsizliğini önlemek için lipaz tutuklama metodunu kullanmışlar. Çinko-tutuklanmış lipazın termal aktifsizliği bir matematik model ile karakterize etmişler ve serbest enzimim aktifsizliğine kıyasla önemli derecede azaltttığını bulmuşlar.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Aletler

- UV-Visible spektrofotometre (Shimadzu 160A)
- FTIR spektrometresi (Perkin Elmer 1605)
- Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) (Agilent 1200)
- Termal gravimetrik analiz cihazı (TGA, Seteram)
- Soğutmalı santifüj (Sigma)
- Soğutmalı inkübatör (Zhicheng)
- pH metre (Thermo)
- Liyofilizatör (Labconco)
- Vakumlu etüv (Binder)
- Taramalı elektron mikroskopu (SEM, Jeol, JSM 5310, Japan)

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), *β*-siklodekstrin (Fluka), Cam boncuk (9-13 µm) (Aldrich), Bradford reaktifi (Sigma) , Bovine Serum Albumin 99 % (BSA) (Sigma), Sodyum karbonat (Sigma), Tetraetoksisilan (TEOS) (Sigma), Oktiltrietoksisilan (OTES) (Sigma), polivinilalkol (PVA, 4% W/V), *o*-fosforik asit (85%) (Merck), Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Merck), Hekzametilendiizosiyanat (HMDI), glutaraldehit (GA, Merck) temin edildi . Optikçe saf *S*-Naproksen (Sigma), Rasemik Naproksen ve metil esteri ticari olarak sağlanamadığı için laboratuvarda sentezlendi.

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

3.3. METOD

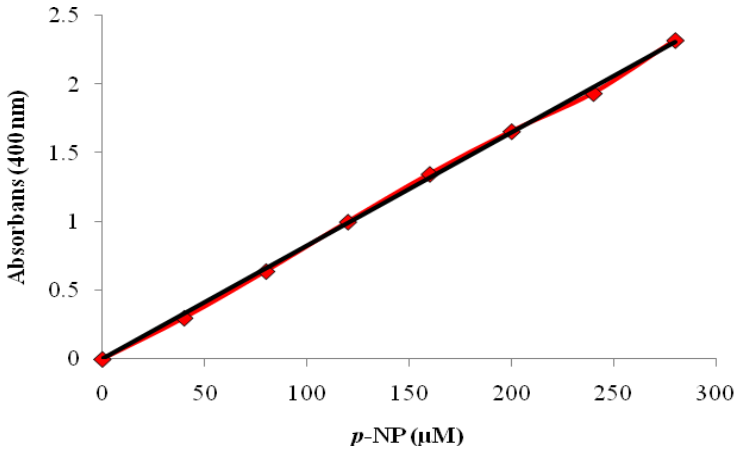
3.3.1. Lipaz Aktivitesinin Tayini *(Hung ve ark., 2003; Chiou ve Wu 2004)*

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 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.

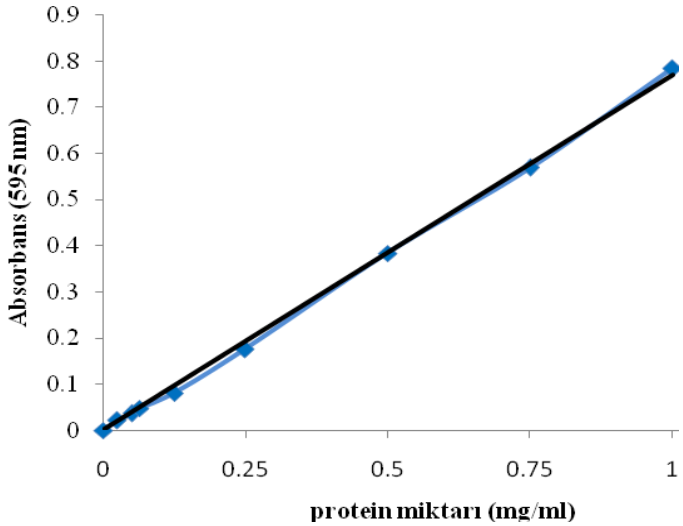
3.3.2. Protein miktarı *(Bradford 1976)*

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 bütün protein çalışmalarında bu grafik referans alınır.



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 4,0–9,0) 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. pH kararlılığı

Protein yapısına sahip olan enzimlerin 3 boyutlu yapısına etki eden tüm faktörler, enzimlerin kararlılıkları üzerine etkilidir. Ortamın pH'ı da enzimin 3 boyutlu yapısı üzerine etkin bir faktördür. Çoğu enzim aşırı asidik ya da bazik koşullarda tersinmez denatürasyona uğrar.

Serbest ve immobilize enzim pH 4,0–9,0 aralığında değişen 50 mM sodyum fosfat tamponunda 1 saat inkübe edildikten sonra standart ölçüm koşullarında (pH 7, 30^{o}C), aktivite ölçümleri gerçekleştirilir.

3.4.2. 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.

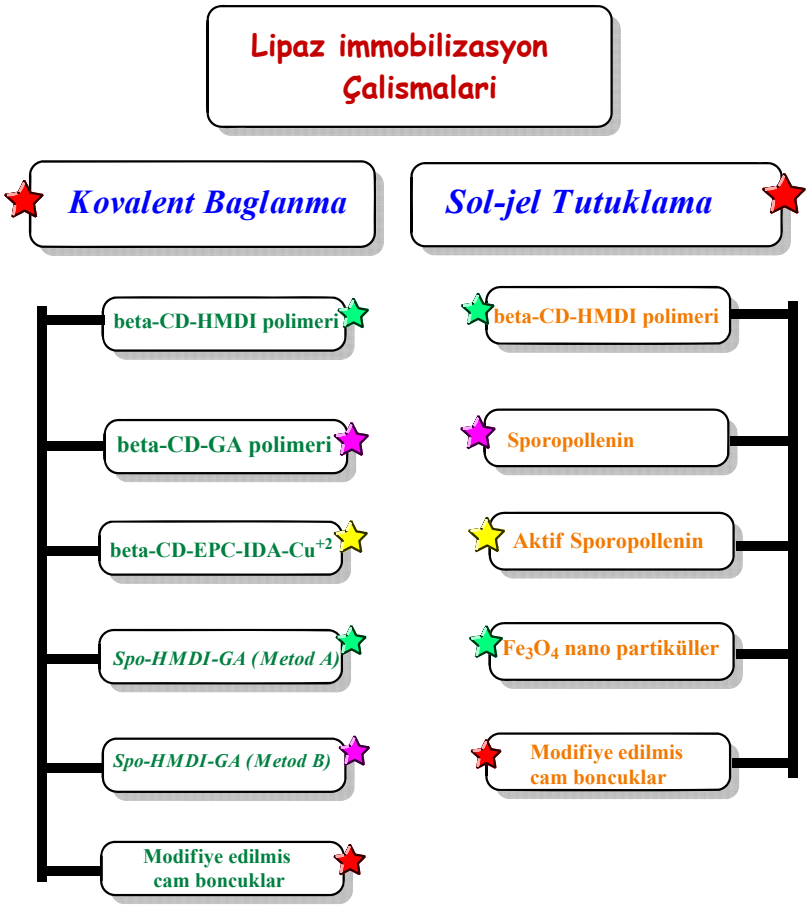
3.4.3. Depo kararlılığı

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.

3.4.4. Tekrar kullanılabilirlik

İmmobilize lipazın tekrar kullanım sayısını ölçmek amacı ile belli bir miktar alınan immobilize enzim örneğinin kısım 3.3'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 İmmobilizasyon Çalışmaları



3.5.1. Beta-Siklodekstrin-hekzametilendiizosiyanat polimerinin sentezi

100 mL'lik balon içerisine, 2 g (1,76 mmol) β-siklodekstrin (CD) ve kuru DMF (10 mL) oda sıcaklığında yarım saat karıştırılır. Daha sonra karışıma damla damla hekzametlendiizosiyanat (HMDI) (17,6 mmol) eklenir. Reaksiyon 70 ^{o}C'de termostatlı bir ısıtıcıda 4 saat süreyle etkileştirilir. Reaksiyon süresi 2 saate yaklaştığında çökelme başlar ve 4 saat sonra tamamlanır. Çökelek trompta süzülür n-hekzan ve aseton ile birkaç kez yıkanır. Daha sonra ürün 80 ^{o}C'lik vakumlu etüvde 24 saat kurutulur. Verim: % 87, IR (KBr) 2278 cm^{-1} (–N=C=O) ve 1733 cm^{-1} (C=O).

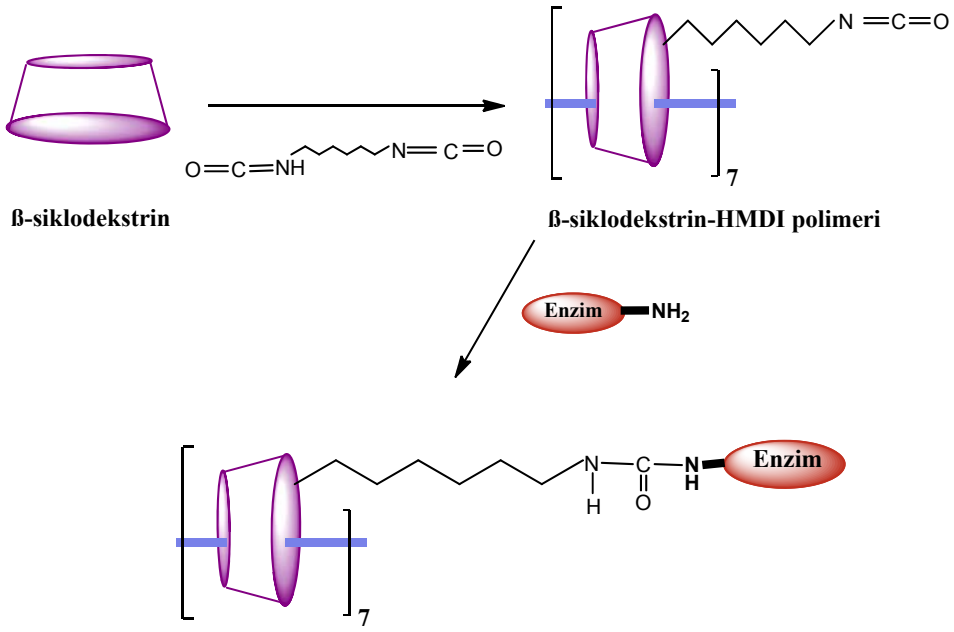
3.5.2. Beta-Siklodekstrin-glutaraldehit polimerinin sentezi

Yukarıda elde edilen polimerden 2 g alınır ve üzerine 25 ml kuru asetonitril ilave edilir ve oda sıcaklığında yarım saat karıştırılır. Daha sonra 5 mL etilendiamin damla damla ilave edilir. Oda sıcaklığında azot atmosferinde 3 saat kadar karıştırılır. Elde edilen polimer trompta süzülür, su ile birkaç kez yıkanır 80 ^{o}C'lik vakumlu etüvde 24 saat kurutulur. Verim: % 85, IR (KBr) 1626 cm^{-1} (C=O amid).

Sentezlenen amino grubu taşıyan polimerden (polimer 2) 2 g alınarak, üzerine % 50 ye kadar seyreltilmiş % 25 lik glutaraldehit (GA) çözeltisinden 10 ml ilave edilir ve oda sıcaklığında 24 saat bir manyetik karıştırıcı üzerinde etkileştirilir. Elde edilen kahve renkli polimer çökeleği trompta süzülür ve fosfat tamponu (pH 7,0) ile yıkanır.

3.5.3. Beta-Siklodekstrin-hekzametilendiizosiyanat polimerine lipaz immobilizasyonu

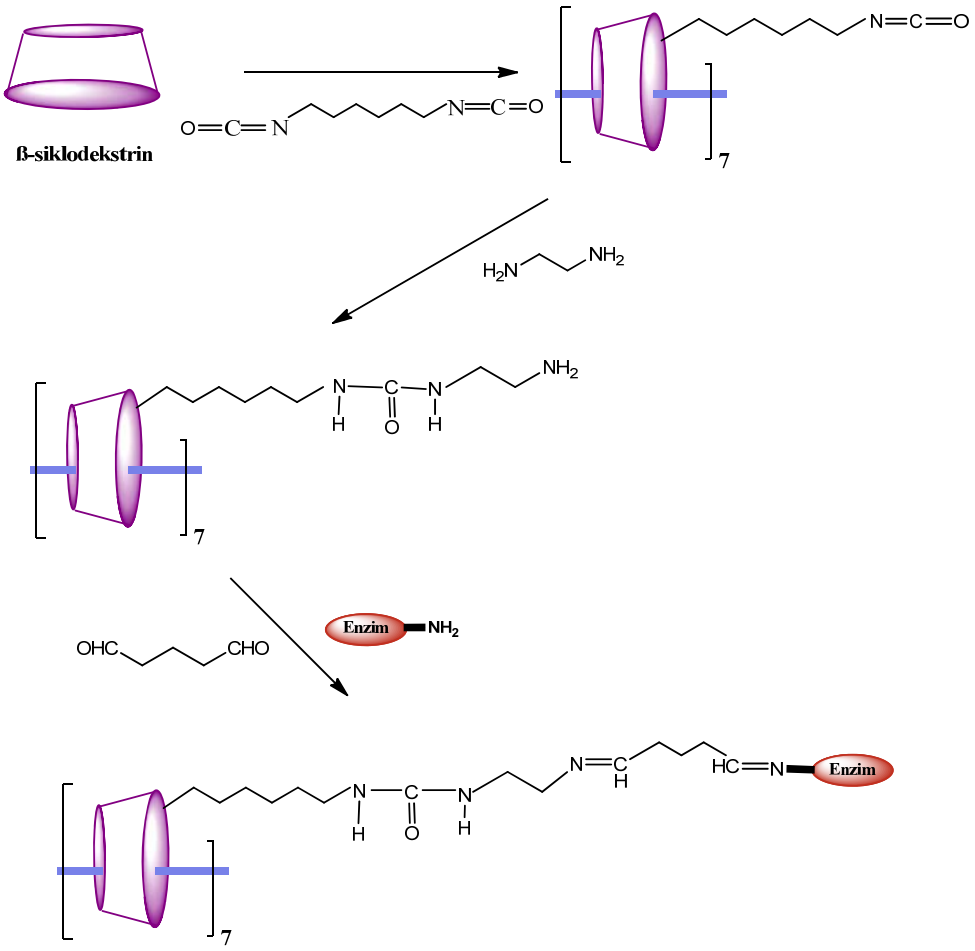
1/3,72 oranında beta-siklodekstrin hekzametilendiisosiyanat kullanılarak sentezlenen polimer izosiyanat uçları taşımadığından kovalent bağlama metodu ile enzim immobilizasyonu işlemi gerçekleştirilemedi. Bunun yerine 1/10 oranında beta-siklodekstrin hekzametilendiisosiyanat kullanılarak elde edilen polimer, doğrudan Şema 3.1'e göre enzim immobilizasyonunda kullanıldı. Bunun için 0,87 g polimer üzerine 0,25 g enzimin 10 mL fosfat tamponundaki çözeltisi ilave edilir ve oda sıcaklığında 6 saat immobilize işlemi gerçekleştirilir. Trompta süzülen immobilize enzim fosfat tamponu ile yıkanır ve yıkama suları protein tayini için ayrılır. İmmobilize enzim liyofilizatörde -50^{o}C'de 1 saat kurutulur ve buzdolabında (+4 °C) saklanır (Şema 3.1).



Şema 3.1. Beta-Siklodekstrin-hekzametilendiizosiyanat polimerine lipaz immobilizasyonu

3.5.4. Beta-Siklodekstrin-glutaraldehit polimerine lipaz immobilizasyonu

2 g glutaraldehit immobilize edilmiş polimer üzerine 0,5 g enzimin 15 mL fosfat tamponundaki çözeltisi ilave edilir. Oda sıcaklığında 6 saat süre ile immobilize işlemi gerçekleştirilir. İmmobilize lipaz trompta süzülür ve fosfat tamponu ile yıkanır ve yıkama sularında immobilize olmayan protein tayini yapılır. İmmobilize enzim liyofilizatörde -50'de 1 saat süre ile kurutulur ve buzdolabında (+4°C) saklanır (Şema 3.2).

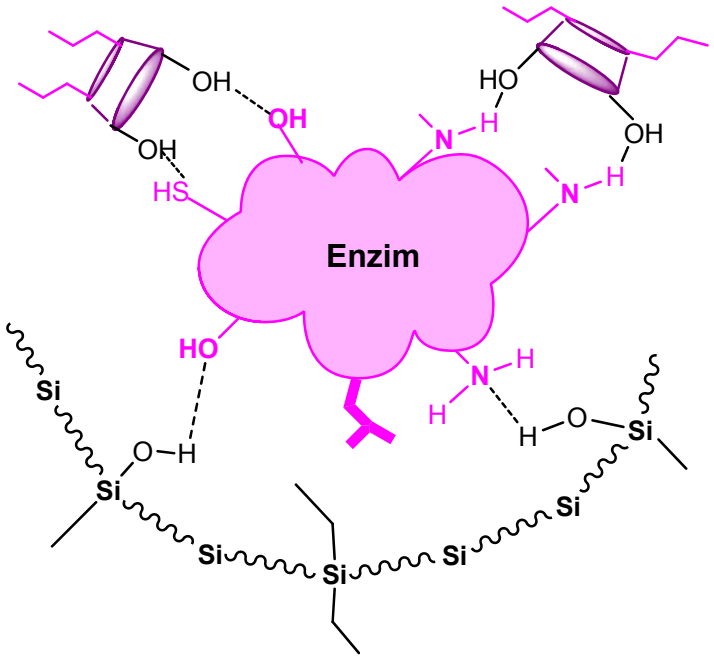


Şema 3.2. Beta-Siklodekstrin-glutaraldehit polimerine lipaz immobilizasyonu

3.5.5. Beta-Siklodekstrin-hekzametilendiizoiyanat polimerine sol-jel tutuklama metoduna göre lipaz immobilizasyonu (*Reetz ve ark., 2003)*

Candida rugosa lipazı (60 mg), fosfat tamponu içerisinde (390 µL, 0,05 M, pH 7,0) karıştırılır. Karışım üzerine siklodekstrin bazlı polimer (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 izopropil alkol ile yıkanır. Daha sonra karışım

liyofilizatörde kurutulur. Yıkama çözeltilerinin protein içeriği ve immobilizasyon yüzdeleri Bradford metodu ile belirlendi (Şema 3.3).



Şema 3.3. Sol-jel tutuklama metodu ile siklodekstrin bazlı polimerine lipaz immobilizasyonu

3.5.6. Beta-Siklodekstrin-epiklorhidrin polimeri (β-EP-CD)

β-siklodekstrin epiklorhidrin kopolimeri ((β-EP-CD) Komiyama ve Hirai (1987) metoduna göre sentezlendi. Bu prosedüre göre, 2 g, β-siklodekstrin, 0,5 g nişasta ve % 20'lik NaOH (5 mL) bir balona konur. Karışım çözünene kadar uygun bir periotta 60 °C'de karıştırılır. Çözeltiye damla damla epiklorhidrin (2,8 mL) ilave edilir ve 30 dak sonra β-EP-CD polimeri oluşur. 5-6 kez distile su ile yıkanır ve polimer 100 °C'de vakumlu etüvde 24 saat kurutulur. Polimer kullanılmak üzere desikatörde muhafaza edilir.

3.5.6.1. β-EP-CD destek maddesinin iminoasetik asit (IDA) ile etkileştirilmesi

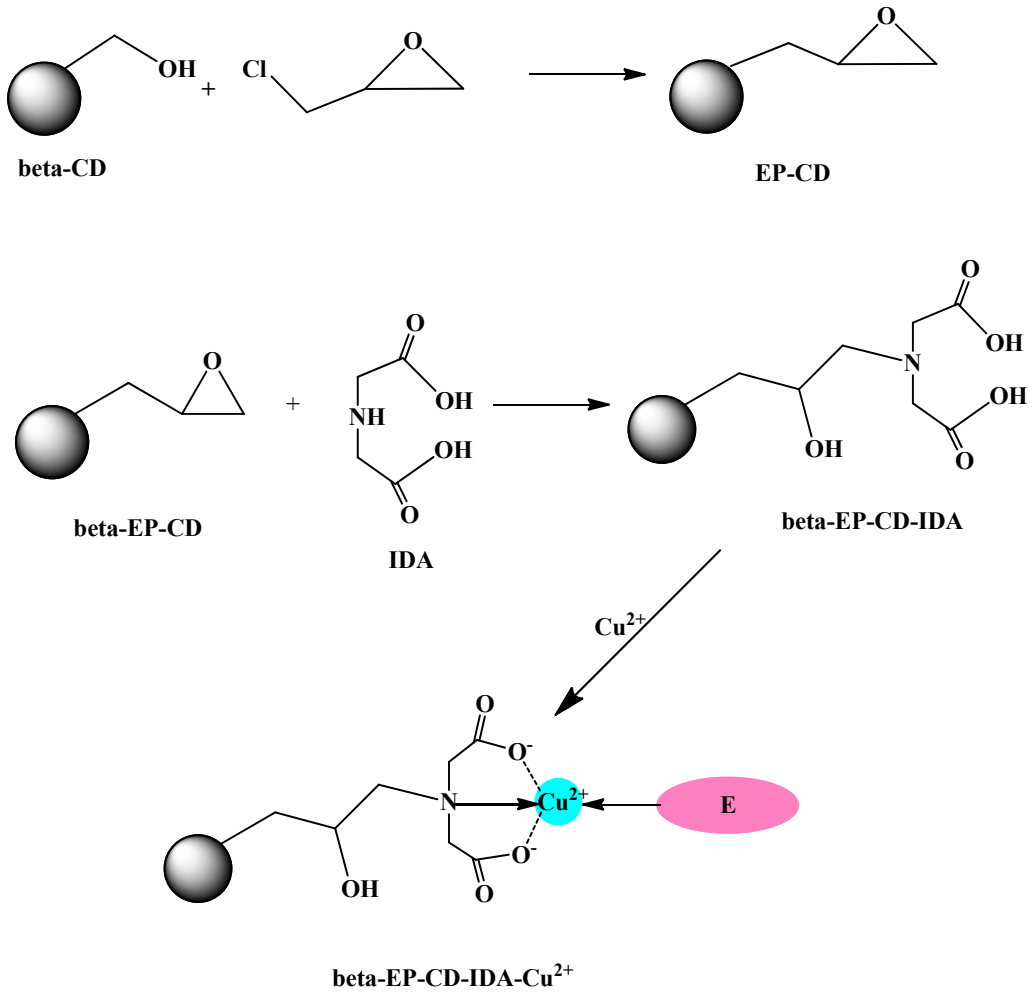
β-EP-CD–IDA, Armisen ve ark. (1999) metoduna göre sentezlendi. 3.5 g β-EP-CD, 0.1 M sodyum borat/2 M iminoasetik asit (6.96 mL), pH 9 olacak şekilde yavaş bir şekilde 25 °C'de 24 saat karıştırılır. Destek maddesi su ile iyice yıkanır ve 4 °C'de muhafaza edilir.

3.5.6.2. β-EP-CD–IDA destek maddesine bakır (II) yükleme

β-EP-CD-IDA-Cu^{2+} Armisen ve ark. (1999)'a göre sentezlendi. 3.15 g β-EP-CD-IDA 0.63 g $CuSO_4$ içeren distile su (20 mL) içerisine ilave edilir ve yavaş bir şekilde karıştırılır. 2 saat sonra destek maddesi distile su ile iyice yıkanır ve 4 °C'de muhafaza edilir. Bu muamele destek maddesindeki IDA grupların %100'ünü modifiye eder. β-EP-CD–IDA-Cu^{2+}'nin sentezi Şema 3.4'de verilmiştir.

3.5.6.3. β-EP-CD–IDA-Cu^{2+}destek maddesine lipaz immobilizasyonu

3 g β-CD-EPC-IDA-Cu^{2+} destek maddesi üzerine 27 mL lipaz çözeltisi (1 mg/mL) ilave edilir. Karışım 25 °C'de 3 saat etkileştirilir. İmmobilize lipaz trompta süzülür ve fosfat tamponu ile yıkanır ve yıkama sularında immobilize olmayan protein tayini yapılır. İmmobilize enzim liyofilizatörde -50'de 1 saat süre ile kurutulur ve buzdolabında (4°C) saklanır.



Şema 3.4. β-CD-EP–IDA-Cu^{2+}destek maddesine lipaz immobilizasyonu

3.6. Sporopollenin aktifleştirilmesi

Lycopodium clavatum'dan elde edilen sporopollenin (50 g) 150 mL asetonla birlikte 6 saat geri soğutucu altında karıştırılarak kaynatılır. Yağı çıkarılan sporlar vakumda süzülür. Ardından % 8'lik sulu potasyum hidroksit çözeltisi (150 mL) eklenir ve karışım 15 saat reflaks edilir. 15 saatin sonunda çözelti süzülür ve 6 saat sonra çözelti yenilenir. Bu bazla hidrolizlenmiş sporopollenin süzülür ve sıcak su ve sıcak etanolla yıkanır ve % 85 o-fosforik asitle karıştırılarak 7 gün süreyle soğutucu altında karıştırılarak kaynatılır. Bu süre sonunda sporopollenin süzülür, sırasıyla su, aseton, 2 M HCl, 2 M NaOH, su, aseton ve etonol ile yıkanır. Son olarak sabit ağırlığa gelene kadar 60 °C'de kurutulur (Şema 3.5).



Şema 3.5. Sporopollenin aktifleştirilmesi

3.6.1. Sporopollenin-HMDI ile etkileştirilmesi

100 mL'lik balon içerisine, 2 g sporopollenin ve 20 mL kuru asetonitril oda sıcaklığında yarım saat karıştırılır. Daha sonra karışıma damla damla 5 mL hekzametilendiizosiyanat eklenir. Reaksiyon 70 ^{o}C'de termostatlı bir ısıtıcıda 1.5 saat süreyle gerçekleştirilir. Çökelek süzülür, aseton ile birkaç kez yıkanır. Daha sonra ürün 60 ^{o}C'lik vakumlu etüvde 24 saat kurutulur. Verim: % 87, IR (KBr) 2270 cm^{-1} (–N=C=O) ve 1746 cm^{-1} (C=O).

3.6.1.1. Sporopollenin-HMDI'nın GA ile etkileştirilmesi (Metot A)

1 g Spo-HMDI üzerine 10 mL distile su ve 2 mL asetonitril ilave edilir. Oda sıcaklığında 150 dak karıştırılır. Süzülür ve su ile iyice yıkanır. Daha sonra ürün 60^{o}C'lik vakumlu etüvde 24 saat kurutulur. IR (KBr) 1646 cm^{-1} (-NH_2).

Amin uçlu elde edilen polimer üzerine % 5'lik glutaraldehit (10 mL) ilave edilir ve oda sıcaklığında 20 saat karıştırılır. Süzülür ve su ile iyice yıkanır. Vakumlu etüvde 24 saat kurutulur. IR (KBr) 1711 cm^{-1} (–C=O)

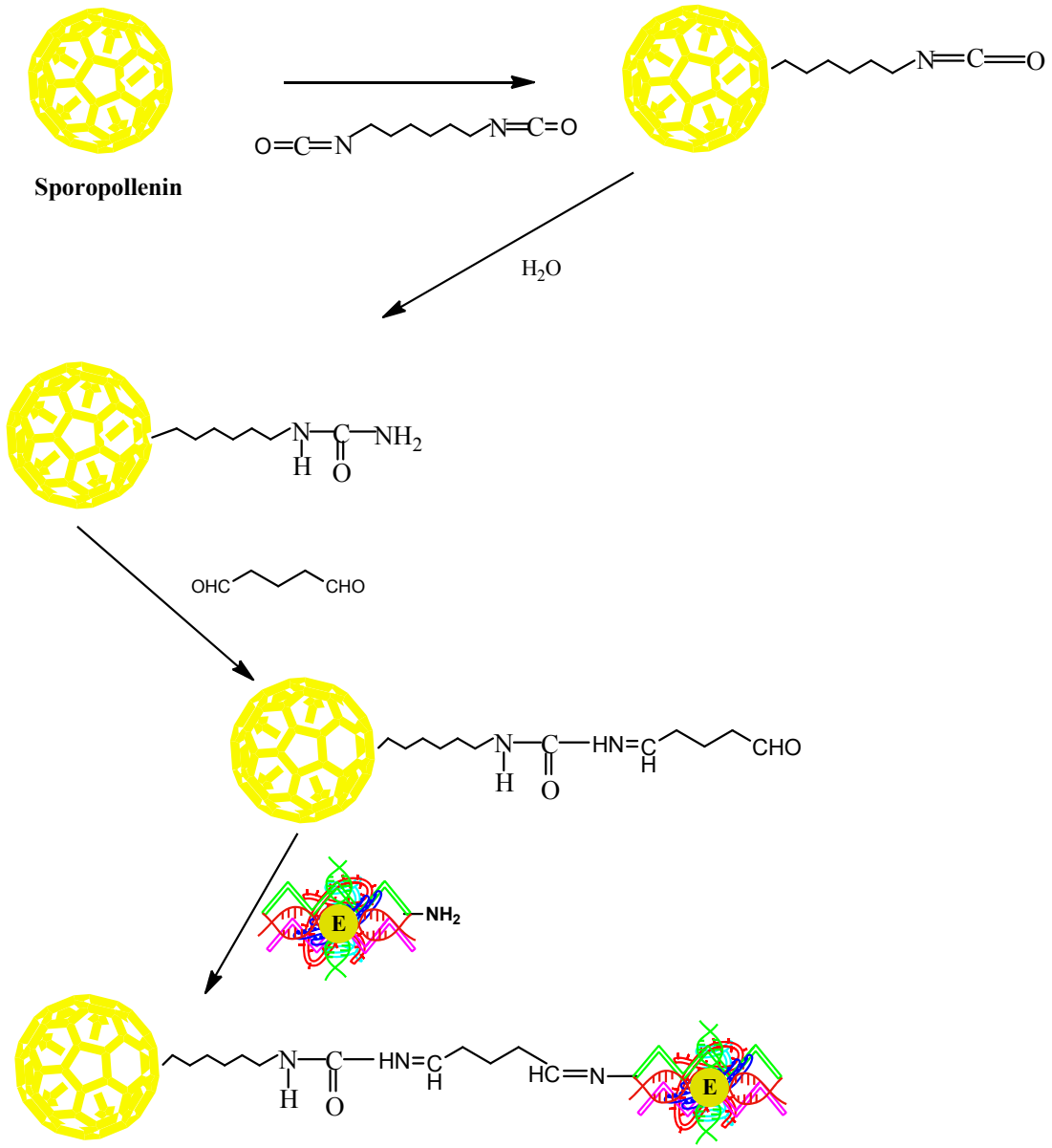
3.6.1.2. Sporopollenin-HMDI'nın GA ile etkileştirilmesi (Metot B)

100 mL'lik balon içerisine, 1 g Spo-HMDI ve 10 mL kuru asetonitril oda sıcaklığında yarım saat karıştırılır. Daha sonra karışıma 2,5 mL etilendiamin eklenir. Reaksiyon oda sıcaklığında 1 saat süreyle karıştırılır. Daha sonra süzülür ve su ile iyice yıkanır. Ürün 60 ^{o}C'lik vakumlu etüvde 24 saat kurutulur. IR (KBr) 1653 cm^{-1} ($-NH_2$).

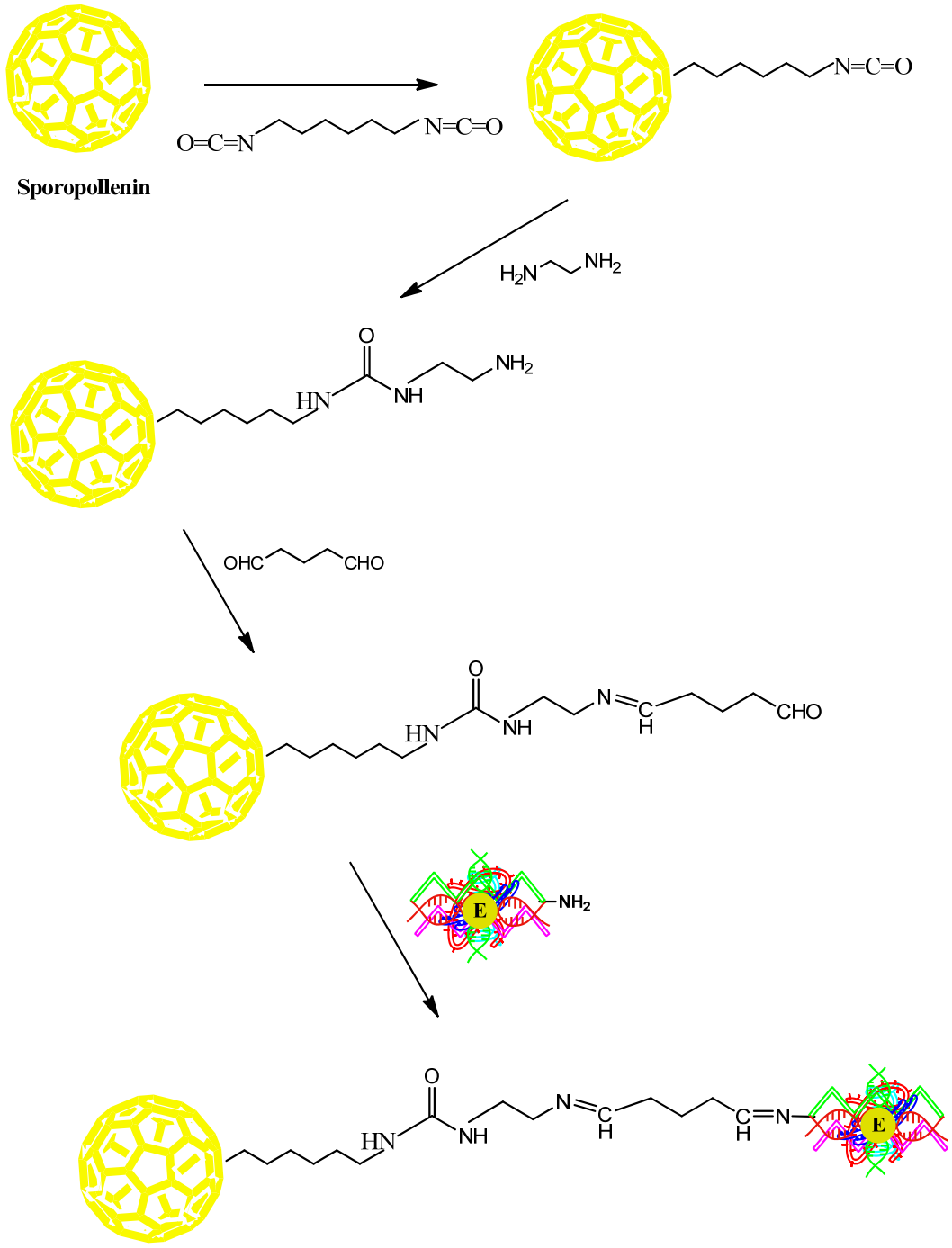
Amin uçlu elde edilen bileşik üzerine % 5'lik glutaraldehit (10 mL) ilave edilir ve oda sıcaklığında 20 saat karıştırılır. Süzülür ve su ile iyice yıkanır. Vakumlu etüvde 24 saat kurutulur. IR (KBr) 1746 cm^{-1} (–C=O)

3.6.2. Spo-HMDI-GA destek materyallerine lipaz immobilizasyonu (kovalent bağlanma)

146 mg *Candida rugosa* Lipaz 10 ml fosfat tamponunda (pH 7) hazırlanır. 0.487 g metot A ve metot B'ye göre elde edilen destek materyallerine üzerine ilave edilir. 6 saat 30^{o}C'de immobilize işlemi gerçekleştirilir. Vakumda süzülür ve birkaç defa tamponla yıkanır. Yıkama suları protein tayini için ayrılır. İmmobilize enzim liyofilizatörde -50^{o}C'de 1 saat kurutulur ve buzdolabında (4 °C) saklanır (Şema 3.5 ve 3.6).



Şema 3.5.1. Sporopollenin'e Lipaz İmmobilizasyonu (Metot A)



Şema 3.5.2. Sporopollenin'e Lipaz İmmobilizasyonu (Metot B)

3.6.3. Sporopollenin ve aktif sporopollenine sol-jel tutuklama metoduna göre lipaz immobilizasyonu

3.5.5.'e göre yapıldı.

3.7. Cam boncukların yüzey aktivasyonu

Silanlanmadan önce cam substratların yüzeyi (10 g) 4 M NaOH (40 mL) ile ön temizleme yapıldı. Daha sonra cam boncuklar yavaş yavaş 15 dk reflaks edilir. Süspansiyon oda sıcaklığında deyonize su (160 mL) üzerine dökülür ve cam boncuklar süzülür, deyonize su ile nötralleştirilir ve 120 ^{o}C'lik vakumlu etüvde 24 saat kurutulur.

3.7.1. Cam boncukların silanlanması

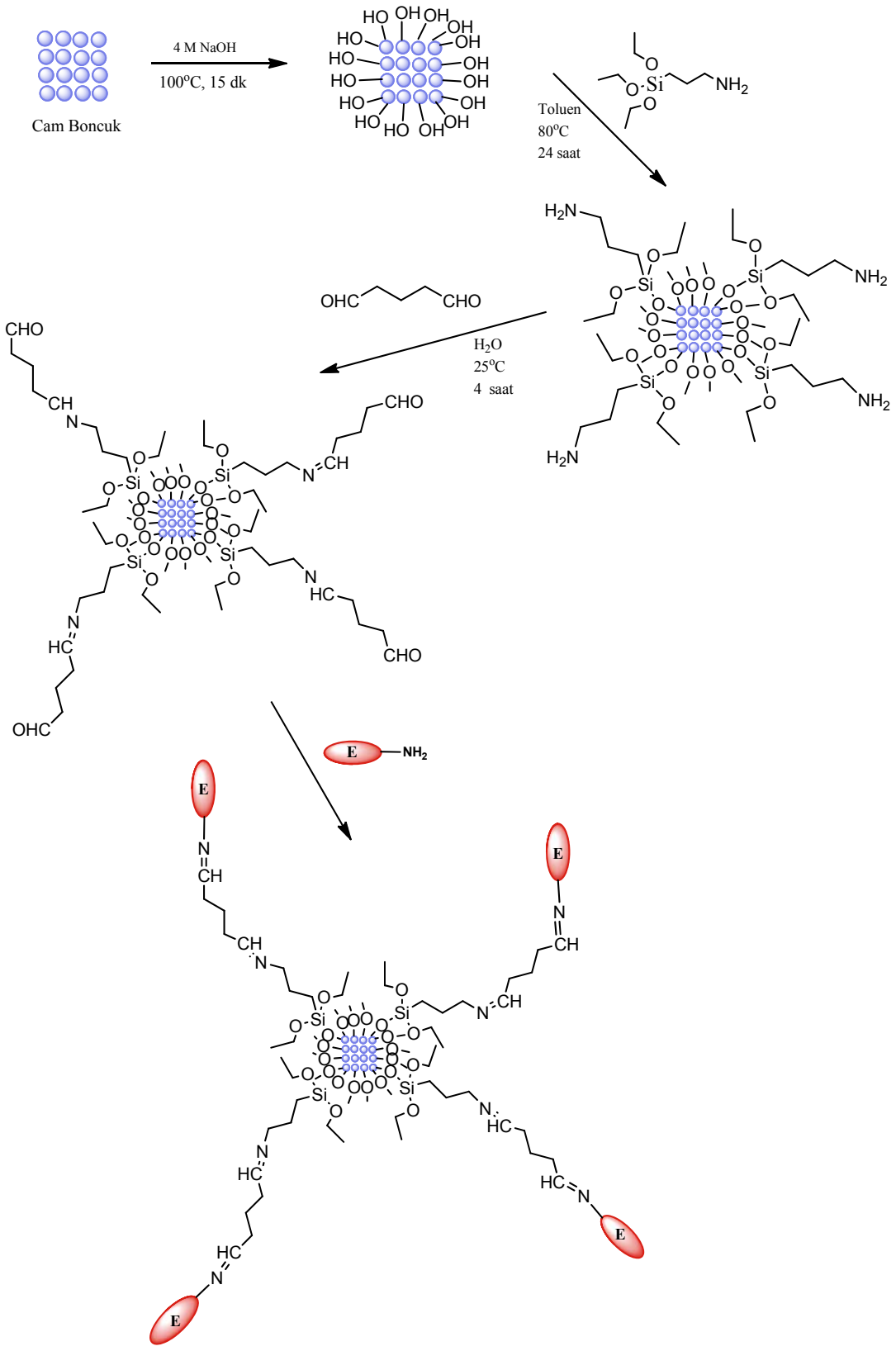
Aktive edilmiş cam boncuklar (10 g) üzerine, kuru toluen (20 mL) ilave edilir ve karışımdan azot geçirilir. 6 mL 3-aminopropil-trietoksisilan (APTES) karışıma eklenir ve 80 ^{o}C'de 24 saat azot atmosferinde karıştırılır. Cam boncuklar süzülür ve sırasıyla toluen (40 mL), diklormetan (40 mL) ve aseton (40 mL) ile iyice yıkanır. Oda sıcaklığında 24 saat kurutulur (Arslan ve ark., 2006).

3.7.2. Modifiye edilmiş cam boncukların GA ile etkileştirilmesi

Modifiye edilmiş cam boncuklar (10 g) % 25'lik GA (33 mL) ile 4 saat oda sıcaklığında karıştırılır ve süzülür, metanol (40 mL) ile yıkanır ve 80 ^{o}C'lik vakumlu etüvde 24 saat kurutulur (Ozmen ve ark 2009).

3.7.3. Cam boncuklara lipaz immobilizasyonu (Kovalent bağlama)

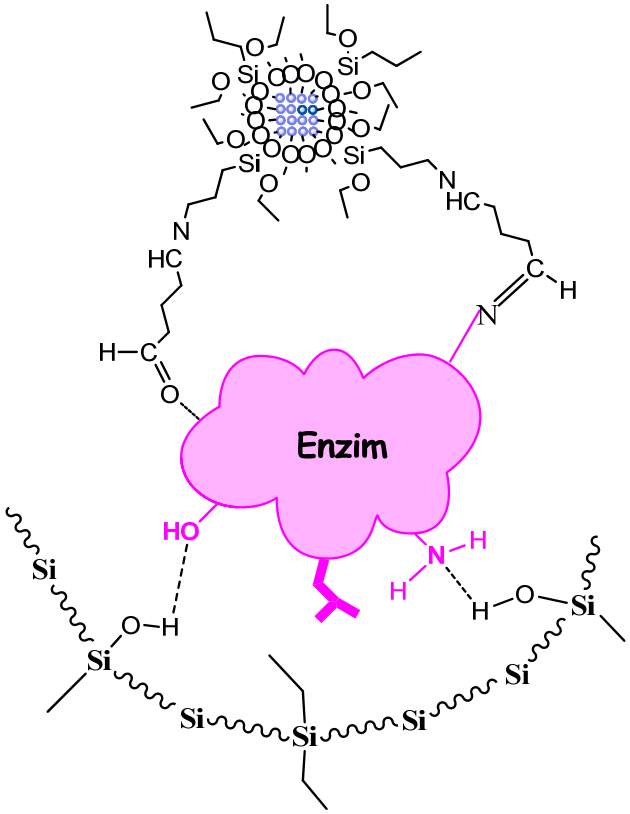
1.5 g GA ile etkileştirilmiş cam boncuklar, 10 mL fosfat tamponu içerisinde (pH 7.0) çözünmüş 450 mg lipaz üzerine ilave edilir. 30 ^{0}C'de 6 saat karıştırılır ve vakumda süzülür fosfat tamponu ile iyice yıkanır. Yıkama suları protein tayini için ayrılır. İmmobilize enzim liyofilizatörde -50^{o}C'de 1 saat kurutulur ve buzdolabında (4 °C) saklanır (Şema 3.6).



Şema 3.6. Cam boncuklara lipaz immobilizasyonu (Kovalent bağlama)

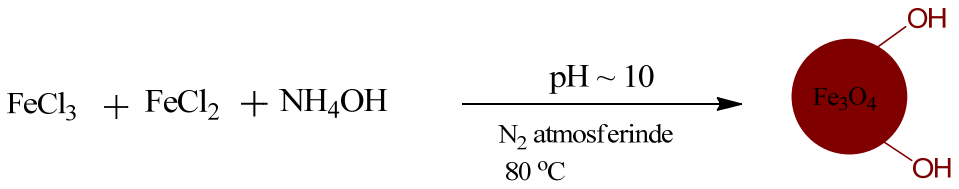
3.7.4. Cam boncuklara sol-jel tutuklama metoduna lipaz immobilizasyonu

3.5.5.'e göre yapıldı.



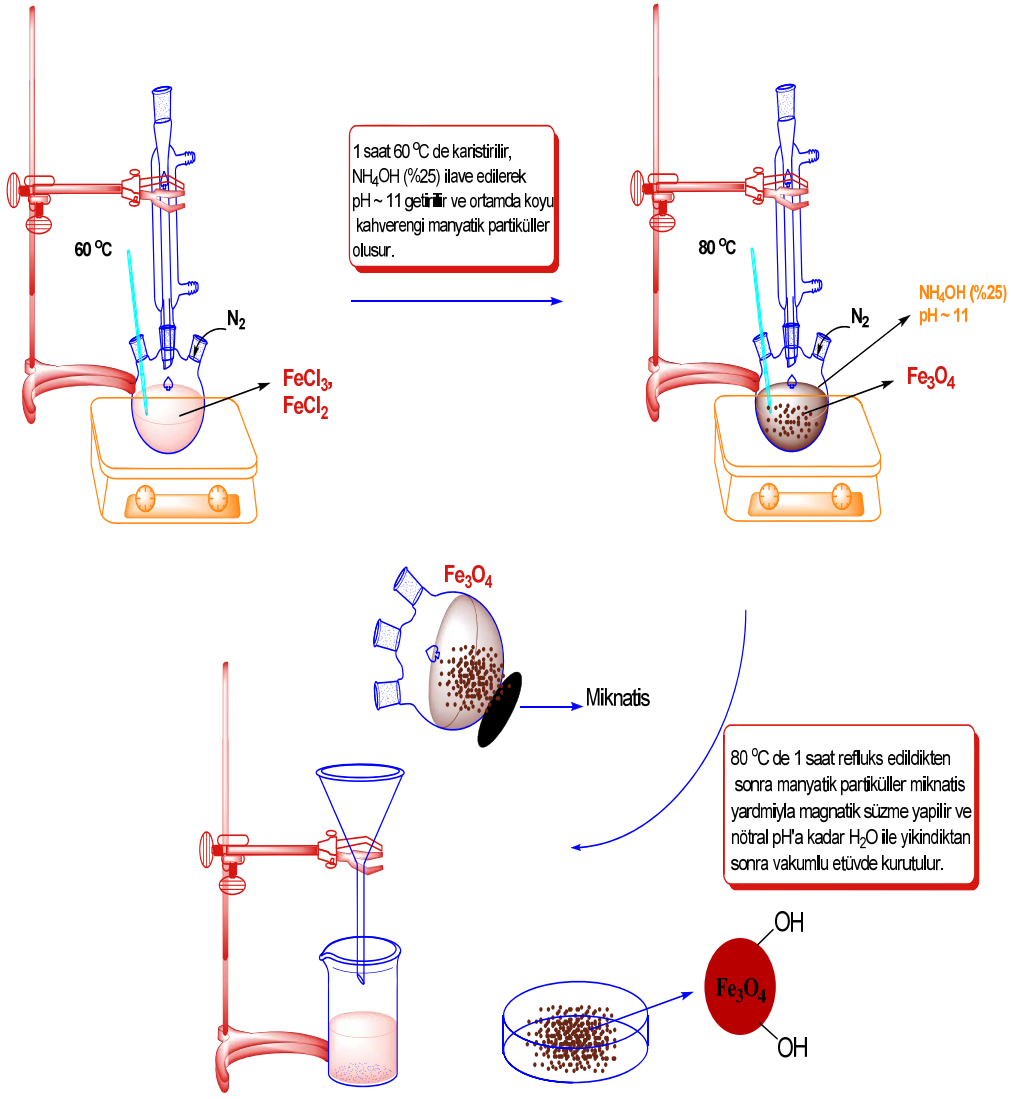
Şema 3.7. Sol-jel metodu ile cam boncuklara lipaz immobilizasyonu

3.8. Fe_3O_4 nanopartiküllerinin sentezi



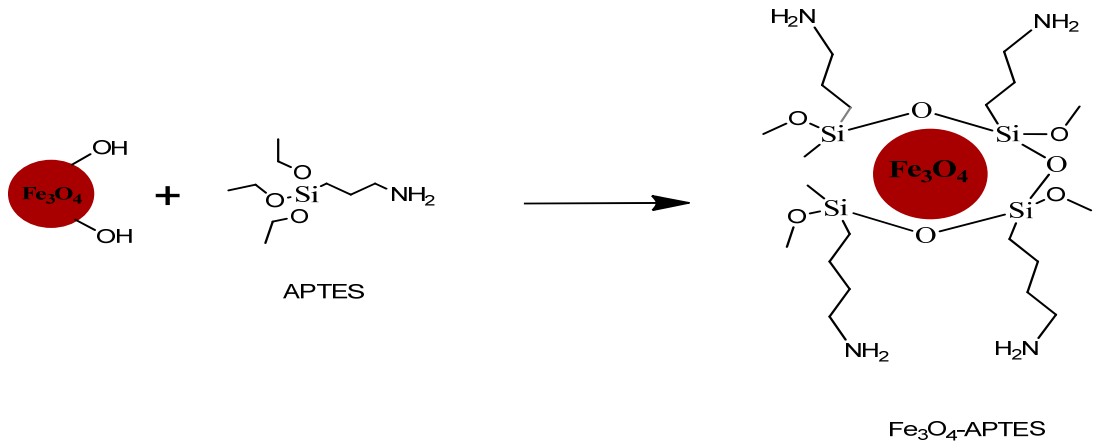
Şema 3.8. Fe_3O_4 nanopartiküllerinin sentezi

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. FTIR : (Fe_3O_4) Fe-O bandı 576 cm^{-1} ve 638 cm^{-1}'de gözlemlenir (Şema 3.8 ve 3.8.1).



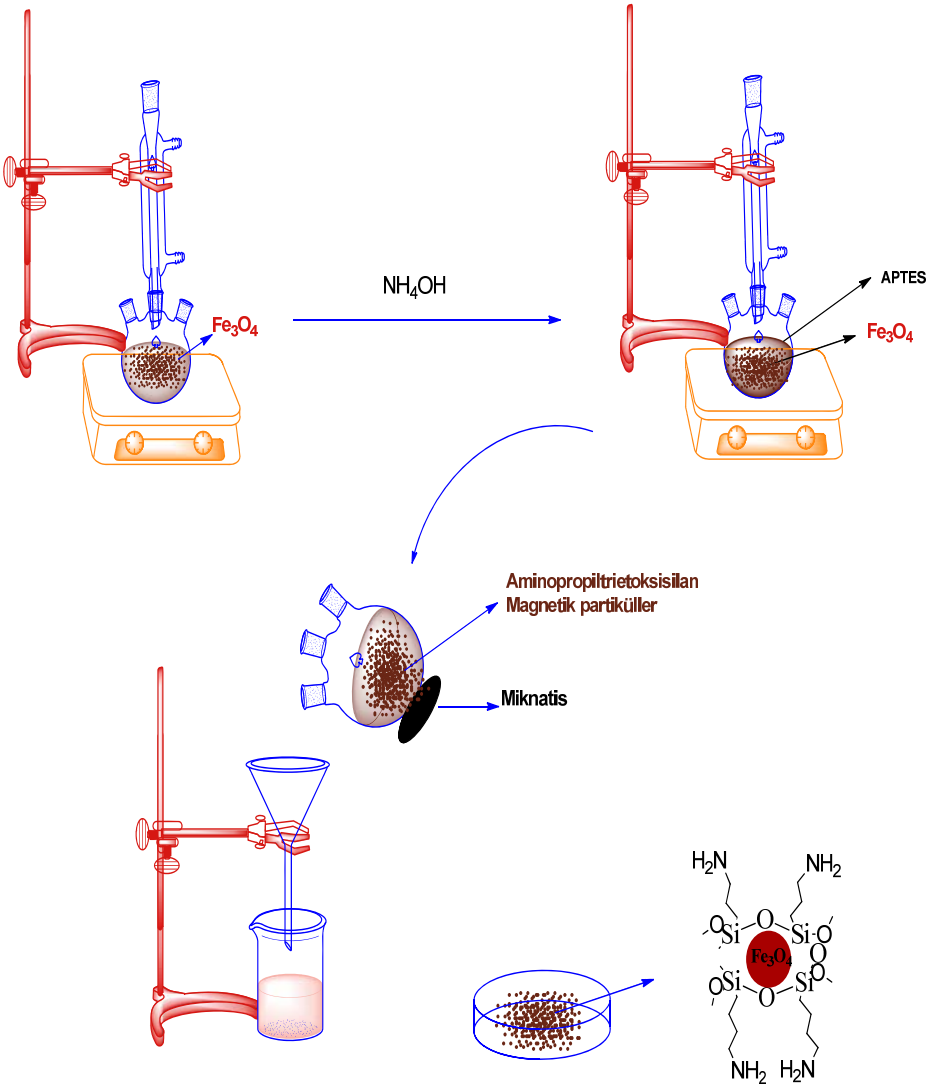
Şema 3.8.1. Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerin sentez düzeneği

3.8.1. APTES modifiye edilmiş Fe_3O_4 nano partiküllerinin hazırlanması



Şema 3.9. APTES modifiye edilmiş Fe_3O_4 nano partiküllerinin hazırlanması

APTES modifiye olmuş manyetik nano partiküller, magnetik nano partiküllerin yüzeydeki hidroksil grupları ve APTES arasındaki reaksiyon ile elde edilir. 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 (Şema 3.9).



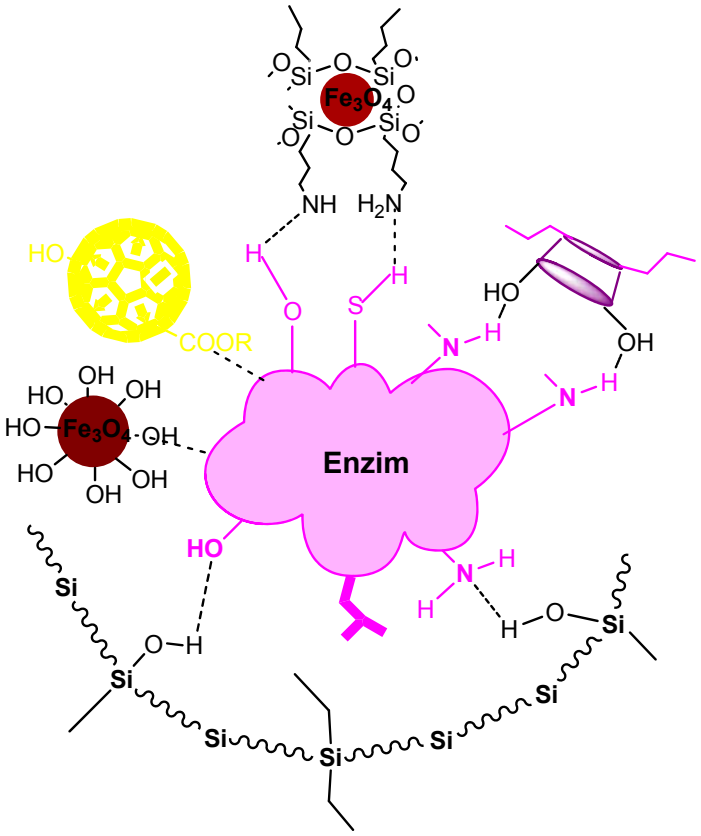
Şema 3.9.1. APTES modifiye edilmiş Fe_3O_4 manyetik partiküllerinin sentez düzeneği

3.8.2. Fe_3O_4 nanopartikülününe sol-jel tutuklama metoduna göre lipaz immobilizasyonu

3.5.5.'e göre yapıldı.

60 mg *Candida rugosa* lipazı fosfat tamponu içerisinde (390 µL, 0.05 M, pH; 7.0) karıştırılır. Karışım üzerine istenilen destek maddesinden (Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES,

Fe_3O_4-Spo veya Fe_3O_4-β-CD-HMDI) 0.05 g ilave edilir. Daha sonra 100 µL polivinil alkol (% 4 w/v), 50 µL NaF çözeltisi (0.1 M) ve 100 µL isopropil alkol ilave edilerek karıştırılır ve 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°C de bekletilerek 10 mL distile su ve 10 mL izopropil alkol ile yıkanır. Ürün liyofilizatörde kurutulur. Yıkama çözeltilerinin protein içeriği ve immobilizasyon yüzdeleri Bradford metodu ile belirlenir.



Şema 3.10. Sol-jel metodu ile manyetik nanopartikül ve fonksiyonlandırılmış manyetik nanopartiküller üzerine lipaz immobilizasyonu

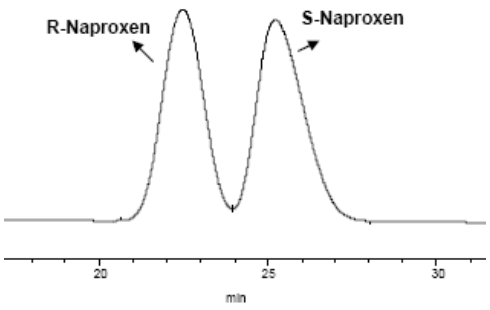
3.9. HPLC Çalışmaları

3.9.1. 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.

3.9.2. (*S*)-Naproksen'in Rasemleştirilmesi (*Wu ve Liu 2000)*

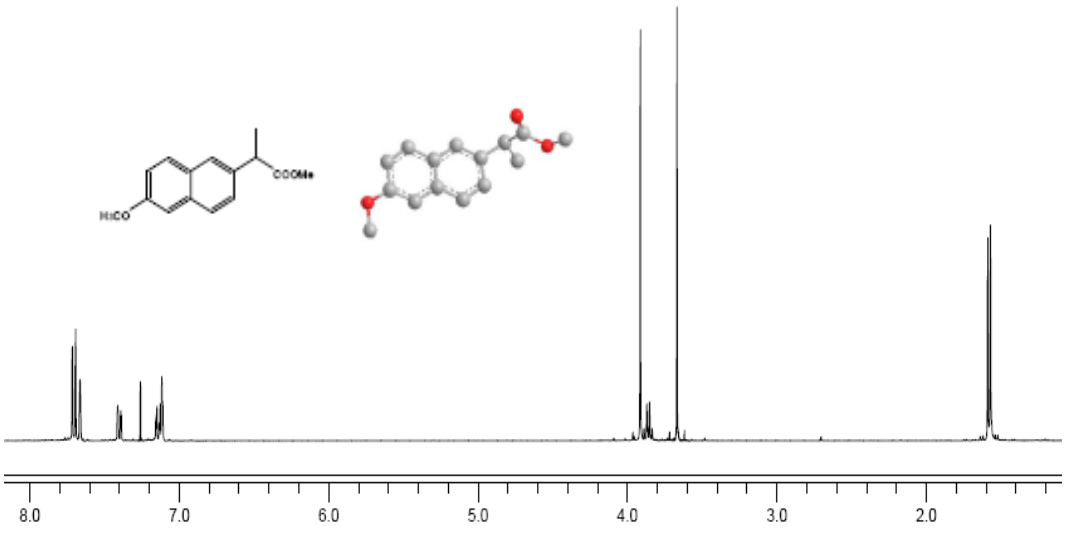
2 g (*S*)-Naproksen ve 1.78 g sodyum hidroksit (NaOH) 15 mL etilenglikol içerisinde 175 ^{o}C'de 6 saat karıştırılarak kaynatılır. Reaksiyon sonrasında karışım üzerine distile su ilave edilir ve pH 4.0'e ayarlanır. Oluşan ürün süzülerek su ile yıkanır ve vakum altında kurutulur. Rasemleşme HPLC sisteminde, yaklaşık olarak aynı alana sahip piklerin varlığı ile doğrulanır (Şekil 3.3.).



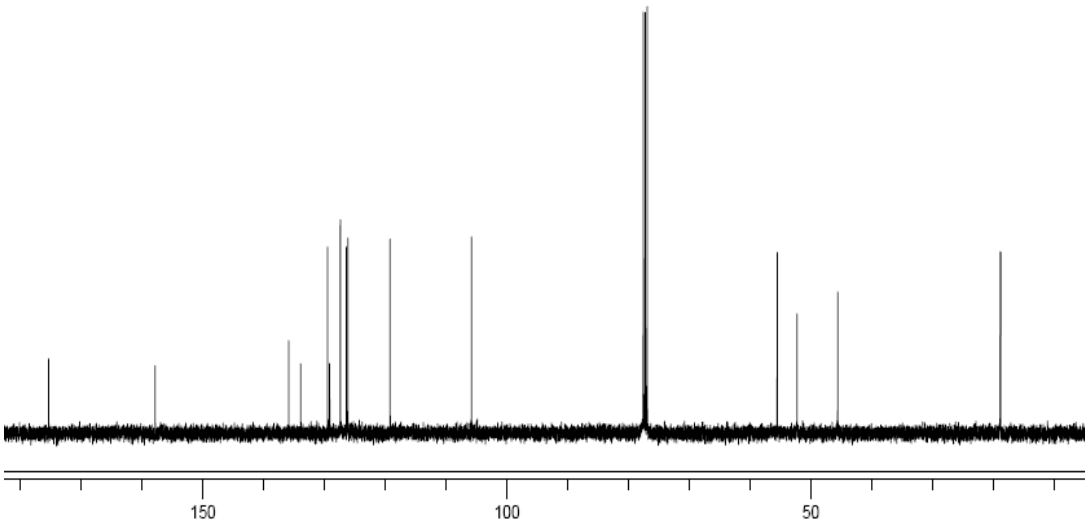
Şekil 3.3. Rasemik Naproksen'in HPLC kromatogramı

3.9.3. (*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 fazın 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) (Şekil 4.48), ^{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 (Şekil 4.49).



Şekil 3.4. (R/S)- Naproksen metil ester türevinin ^{1}H-NMR spektrumu



Şekil 3.5. (R/S)- Naproksen metil ester türevinin ^{13}C-NMR spektrumu

3.9.4. İmmobilize Lipazlar ile (R/S)-Naproksen Metil Ester'in Enantiyoseçimli Hidrolizi

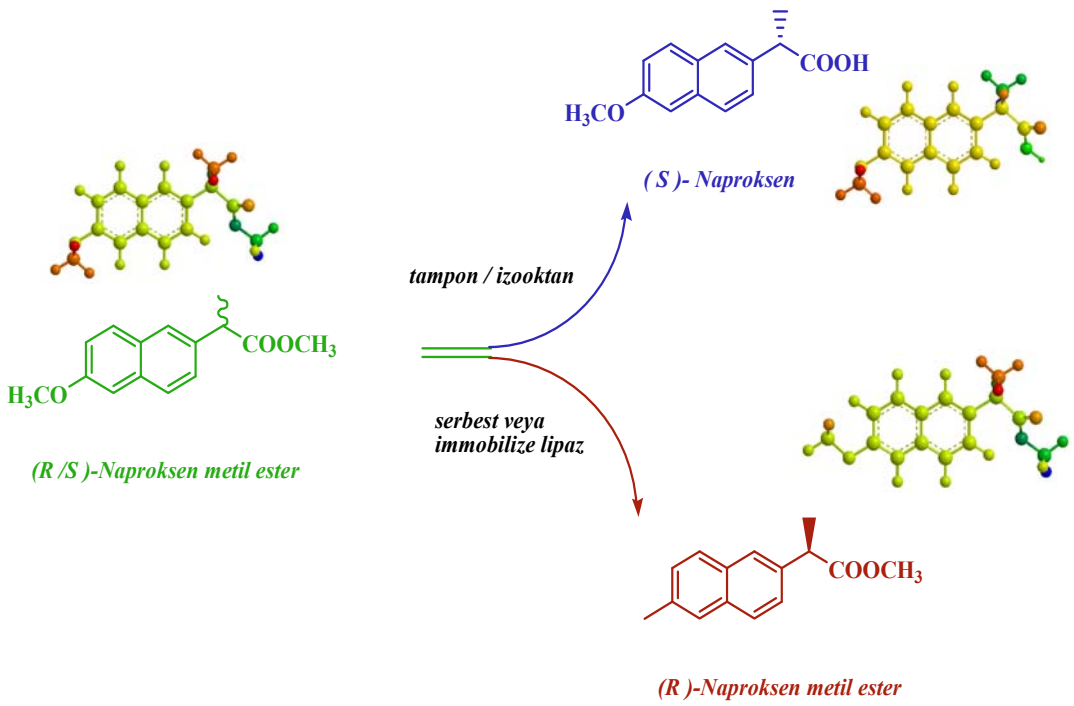
Serbest lipaz ile yapılan Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz çalışmalarında 0,781 mg/mL (0,05 M fosfat tamponu pH 7,0 içerisinde) enzim çözeltisi kullanıldı. Bu çözelti, immobilize lipazları serbest lipaz'a göre kıyaslamak amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda bulundu. Naproksen metil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

3.9.5. Genel Prosedür

5 mL'lik vial şişe 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 ^{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)-Naproksen metil esterinin (R)-Naproksen ya da (S)-Naproksen'e enantiyomerik olarak dönüşümü belirlenir (Şekil 3.6).

Bunun için kiral bir kolon olan Chiracel ODH kolon, hekzan / 2-propanol /trifloroasetikasit 100/1/0,1 oranında taşıyıcı fazında 1 ml/ dk akış hızında gerçekleştirilmiş ve UV dedektörde (Waters 2487) λ = 254 nm'de okunur (Cernia ve ark., 2002).



Şekil 3.6. (R/S)-Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi

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. SONUÇ VE TARTIŞMA

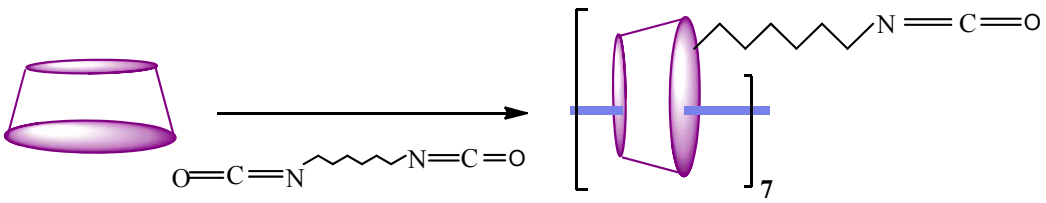
İmmobilize enzimler endüstriyel olarak oldukça geniş uygulama alanına sahiptirler. Çözünür formdaki enzime göre tekrar kullanılabilirlik, geri kazanım, operasyon basitliği gibi birçok avantaja sahiptirler. Ayrıca immobilizasyon, çoğu enzime denatürasyona karşı kararlılık kazandırmaktadır. Enzimin kazandığı bu kararlılığın ölçüsü enzimin üç boyutlu yapısına, immobilizasyon tekniğine ve taşıyıcı tipine bağlı olarak değişmektedir. Kovalent bağlama ve tutuklama teknikleri ile enzimlerin farklı tip taşıyıcılara immobilizasyonları gerçekleştirilmektedir.

Bu çalışma üç bölümden oluşmaktadır. Birincisi lipaz immobilizasyonu için gerekli destek maddelerinin hazırlanışı, ikincisi farklı tekniklerle lipaz immobilizasyonu, üçüncüsüde bir anti-inflammator olan *S*-Naproksenin oluşumunda kullanılmasıdır.

4.1. Lipaz immobilizasyonu için farklı destek maddelerinin hazırlanışı ve karekterizasyonu

4.1.1. Beta-Siklodekstrin-hekzametilendiizosiyanat polimerinin sentezi

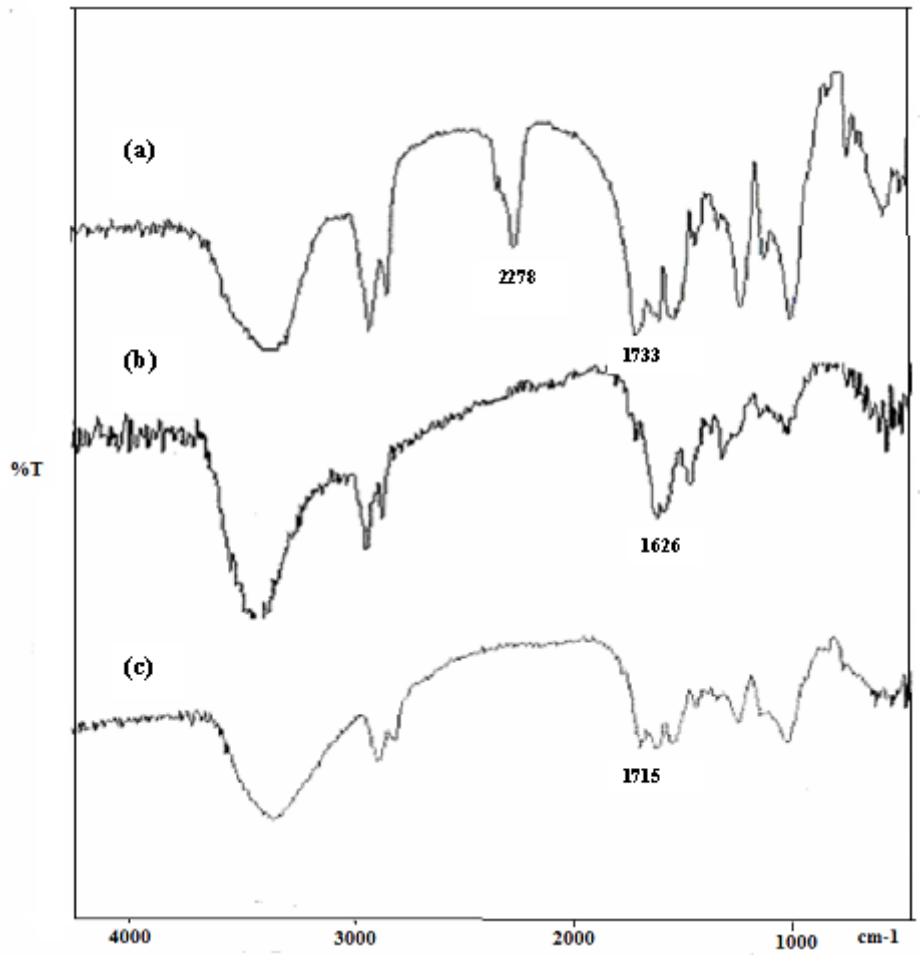
Bu çalışmada *Candida rugosa* lipaz immobilizasyonu için çapraz bağlı β-siklodekstrin polimerleri hazırlandı. β-siklodekstrin birimlerini birbirine bağlayıcı reaktif olarak hekzametilendiizosiyanat ve glutaraldehit kullanıldı.



ß-siklodekstrin **ß-siklodekstrin-HMDI polimeri**

Şema 4.1. Beta-Siklodekstrin-hekzametilendiizosiyanat polimerinin sentezi (*Metot A*)

Çapraz bağlı β-siklodekstrin/hekzametilendiisosiyanat bazlı bir polimer (β-CD-HMDI) β-CD ile HMDI'nin reaksiyonundan hazırlandı (Şema 4.1). Reaktantların oranı 1:10 (β-CD-HMDI) olduğu zaman polimer çok kısa sürede çöktürüldü. Bu çapraz bağlı polimer organik çözücülerde çözünmediği gibi suda da çözünmedi. Polimerin karekterizasyonu FTIR ve TGA'nın kombinasyonu ile doğrulandı. Polimerin FTIR spekturumu iki kuvvetli absorpsiyon bandının varlığı ile gösterildi. Hem karakteristik –N=C=O grubu (2278 cm^{-1}) hem de 1733 cm^{-1}'deki (N-C=O) karbonil grubuna ait band gözlendi (Şekil 4.1). 3350 cm^{-1}'deki geniş absorpsiyon bandı üretan grupları için OH ve serbest NH gerilme absorpsiyon varlığını gösterdi.

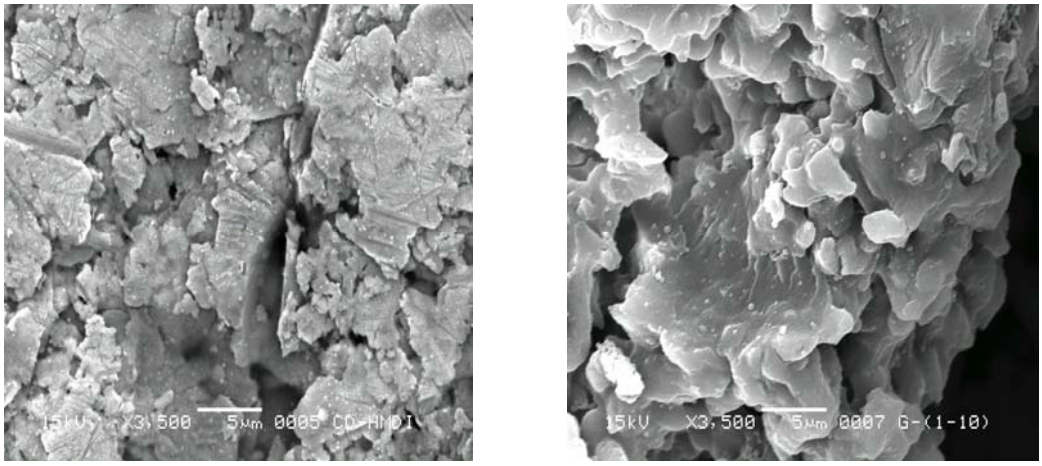


Şekil 4.1. FT-IR spektrumu (a) β-CD-HMDI polimer, (b) β-CD-NH_2 polimer, (c) β CD-GA polimer.

Polimerin termal kararlılığı Termal Gravimetrik Analiz (TGA) ile değerlendirildi. Polimer iki kademeli bozunmaya uğradığı gözlendi. İlk kademe β-CD'in bozunmasından kaynaklanırken ikincisi polimerden kaynaklanır. Literatüre göre (Li ve ark., 2004) siklodekstrinler 290-300 ^{o}C sıcaklık aralıklarında bozunmaya başlarlar. CD polimeri için ilk bozunma 350 ^{o}C olduğu gözlendi. Genellikle 200-220 ^{o}C civarında bozunmaya başlayan geleneksel poliüretanlar ile karşılaştırıldığında bu değer oldukça yüksektir. β-CD bazlı polimerin artırılmış termal kararlılığı çapraz bağlı yapısından kaynaklanmaktadır. Çünkü iyi bilinirki çapraz bağ termal kararlılığı artırmayı sağlamaktadır.

4.1.1.2. Beta-Siklodekstrin-glutaraldehit polimerinin sentezi

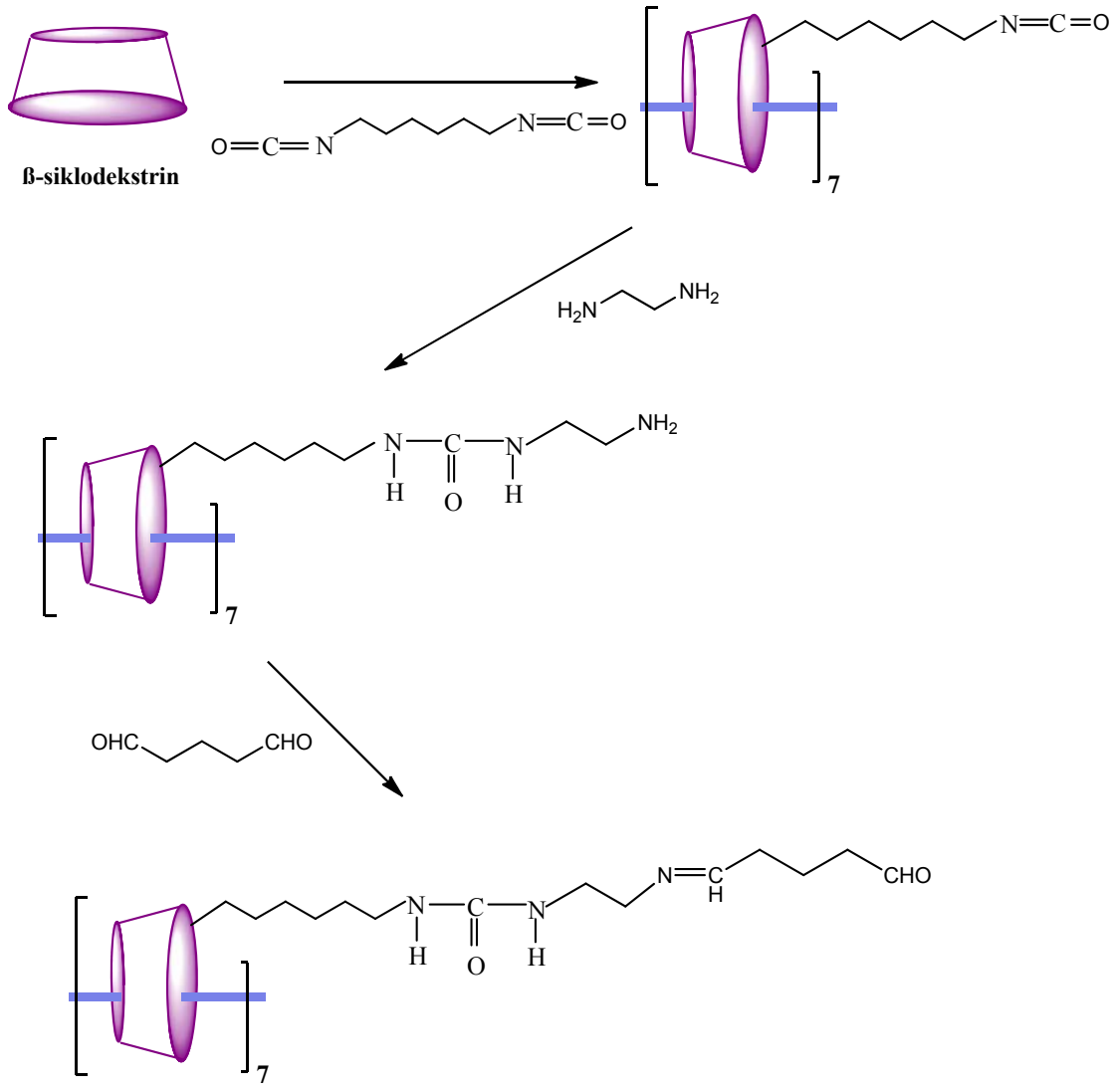
β-CD-HMDI polimerinden amino uçlu bir polimer sentezlemek için (β-CD-NH_2) bu polimer asetonitrilde etilendiamin ile reaksiyona sokuldu ve bu bileşiğin IR spektrumu 1626 cm^{-1}'daki amin bandının oluşumu ve 2278 cm^{-1}'deki izosiyanat bandının kayboluşundan anlaşıldı (Şekil 4.1b). Böylece bu polimer (β-CD-NH_2) glutaraldehitle tepkimeye sokularak aldehit grubu bulunduran polimere dönüştürüldü (β-CD-GA). Aktive edilmiş polimer (β-CD-GA) lipaz ile tepkimeye sokulduğunda bu bağ –CH=N– imin grubuna dönüşür (Şekil 4.2). Bu polimerin IR spektrumunun 1715 cm^{-1}'deki aldehit karboniline ait pikin ortaya çıkması bu grubun bağlandığını gösterir (Şekil 4.1c).



(a) **(b)**

Şekil 4.2. β-CD-HMDI polimeri (a) ve β-CD-GA polimerinin (b) SEM fotoğrafları

Hazırlanan β-CD-HMDI polimeri ve β-CD-GA polimerinin yüzey yapısını incelemek amacıyla SEM fotoğrafı alındı (Şekil 4.2.). Şekil 4.2'de görüldüğü gibi morfolojik farklılıkları açıkca görülmektedir.



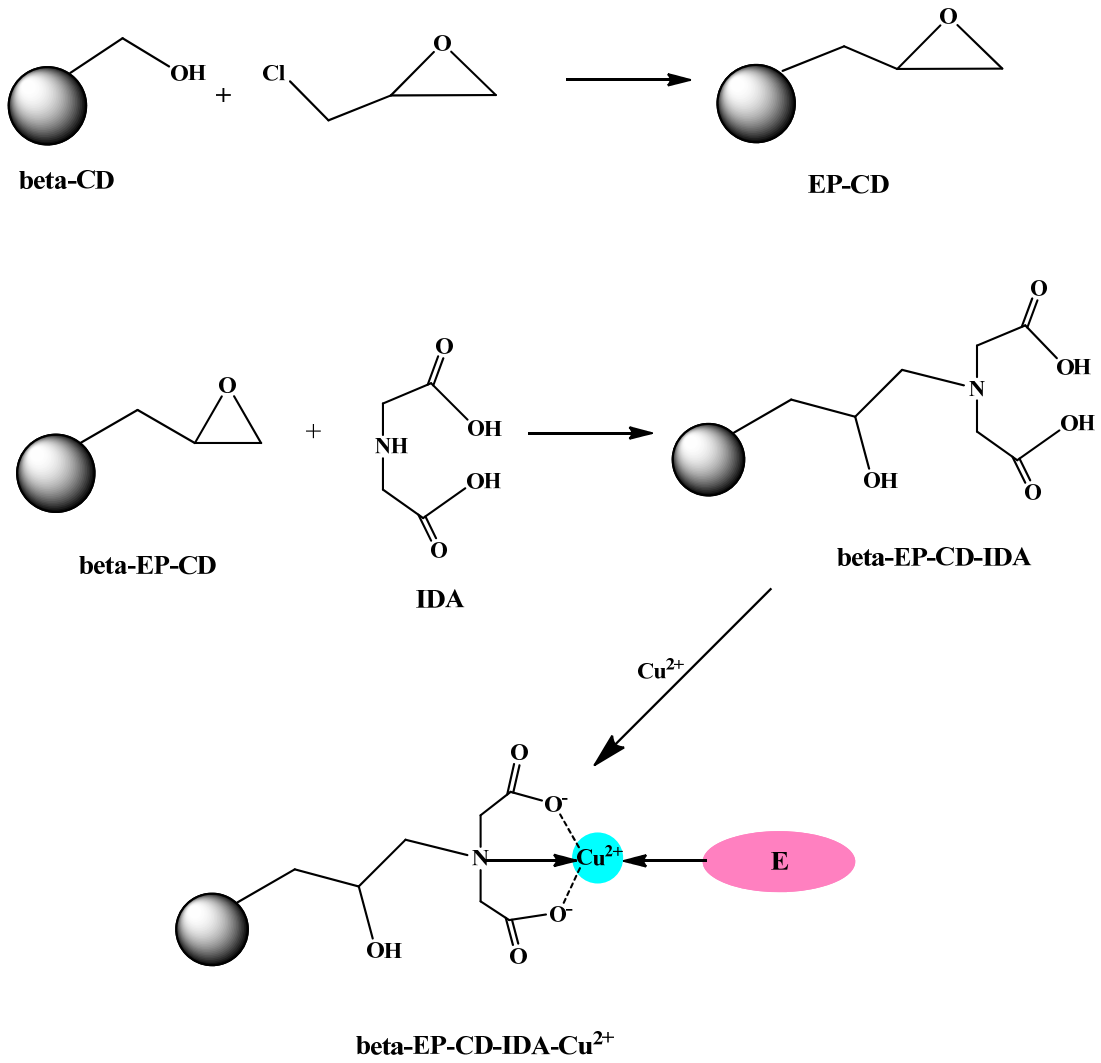
ß-Siklodekstrin-glutaraldehit polimeri

Şema 4.2. Beta-Siklodekstrin-glutaraldehit polimerinin sentezi (*Metot B*)

4.1.2. Bakır yüklü Beta-Siklodekstrin-Epiklorhidrin polimerinin sentezi (beta-EP-CD-IDA-Cu^{+2})

Literatürde (Liao ve Syu, 2005) ligant olarak iminodiasetik asit (IDA) ile çapraz bağlı *β*-CD-epiklorhidrin polimerinin *α*-amilazın affinite performansını

değerlendirmek için iminoasit grubu ile farklı metal iyonları kompleksleştirilmiş ve bu metal katyonlarından Cu^{+2}, α-amilazı yüksek kapasite ile adsorbe ettiği gözlenmiş.



Şema 4.3. Beta-Siklodekstrin bazlı polimerin sentezi ve lipaz immobilizasyonu

Bu çalışmada iminoasetikasit (IDA) ile tepkimeye sokulmuş, epiklorhidrin ile çapraz bağlı β-CD polimeri (EP-CD) Armisen ve ark., (1999)'ın metoduna göre

hazırlandı. Çünkü EP-CD tek başına CRL'a karşı zayıf affinite göstermektedir. CRL'ın bağlama affinitesini artırma amacıyla bu ağır metal iyonu affinite adsorbentini hazırlamak için tanıtıldı. Daha sonra bu polimer (EP-CD-IDA) Cu^{2+} iyonları ile kompleksleştirildi (Şema 4.3).

4.1.3. Sporopollenin destek maddesi

Bu çalışmada *Lycopodium clavatum*'dan elde edilen sporopollenin kovalent bağlama ve sol-jel tutuklama metotlarıyla lipaz immobilizasyonu işlemlerinde kullanıldı. Bölüm 1.6'da ayrıntılı anlatıldı.

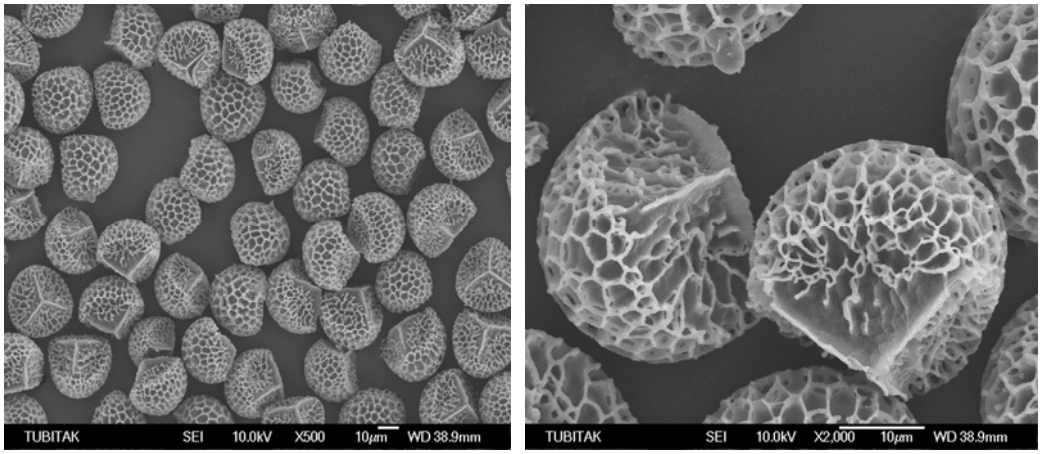
Sporopollenin genellikle bir biyopolimer olarak bilinmekte ve detaylı kimyasal yapısı henüz bilinmemektedir. Ampirik formülü $C_{90}H_{144}O_{27}$ (Brooks ve ark. 1971) olarak bulunmuştur. Glioksim, epoksi ve karboksil grubu taşıyan sporopolleninin yapıları oluşturularak ligant değiştirici olarak incelenmiştir. Sporopollenin güçlü asitlerin varlığında ve yüksek sıcaklıklar altında dayanıklı olduğundan çok yüksek sıcaklıklarda kolaylıkla kullanılabilir (Ayar ve Mercimek, 2006; Ersoz ve ark. 1995; Gode ve Pehlivan 2007). *Pteridophyta* ve *spermatophyta*'dan oluşan sporopollenin de IR ve ^{13}C NMR çalışmaları polimerik yapısında çeşitli fonksiyonel gruplar (karbonil/karboksil, hidroksil, aromatik, alifatik ve eter) gözlenmiştir (Wilmesmeier ve ark., 1993). Gerek gözenekli yapısından gerekse içerdiği fonksiyonel gruplarından dolayı bu çalışmada sporopollenin *Candida rugosa* lipaz için uygun bir adsorbent olarak seçildi.

Çalışmanın bir başka bölümünde sporopollenin Paunov ve ark. (2007)'nin metoduna göre aktive edildi. Güçlü asit ve baz kullanılarak yapılan ekstraksiyon prosedürüdür. Ekstraksiyondan sonra eksinler sporlar olarak aynı şekilde kalırlar ve gözenek yapısı daha genişler hatta boşluklar arası bölmeler kırılabilir (Şema 4.4).



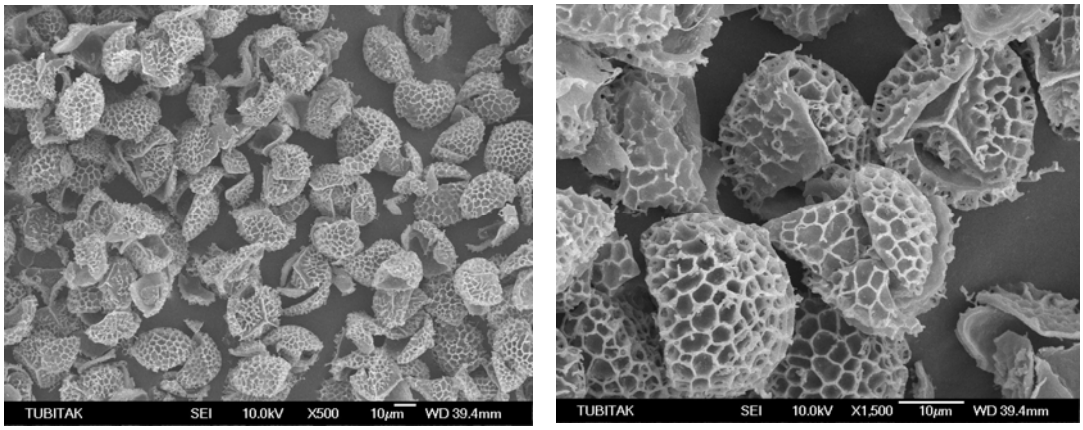
Şema 4.4. Sporopollenin aktifleştirilmesi

Hazırlanan sporopollenin ve aktive edilmiş sporopollenin (Spo_{act}) yüzey yapısını incelemek amacıyla SEM fotoğrafı alındı (Şekil 4.3 ve 4.4) .



(a) **(b)**

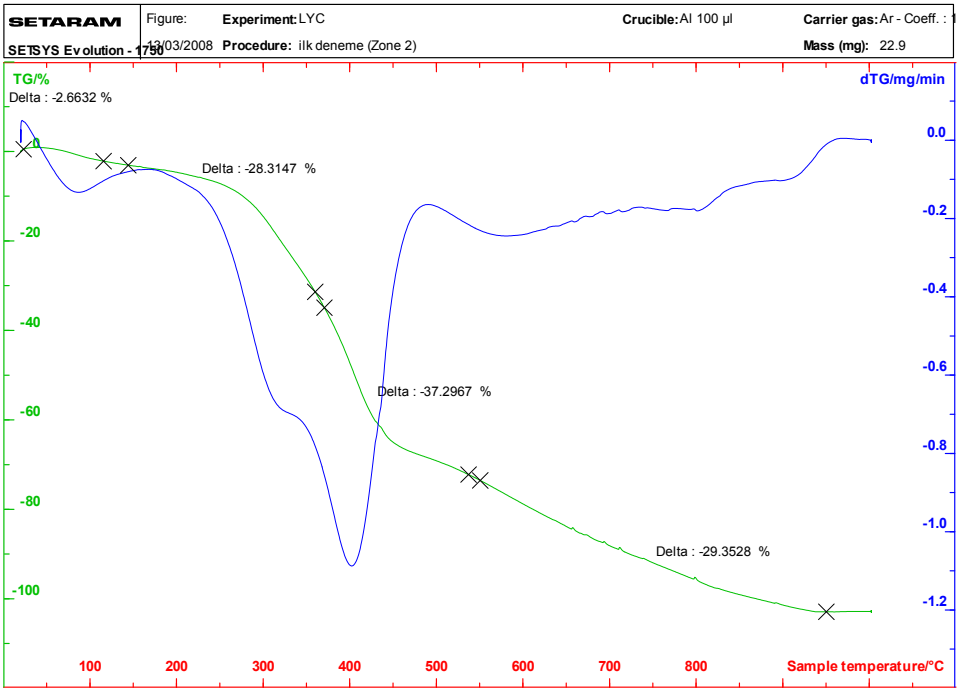
Şekil 4.3. Sporopollenin SEM fotoğrafları (a): x500 (b): x2000



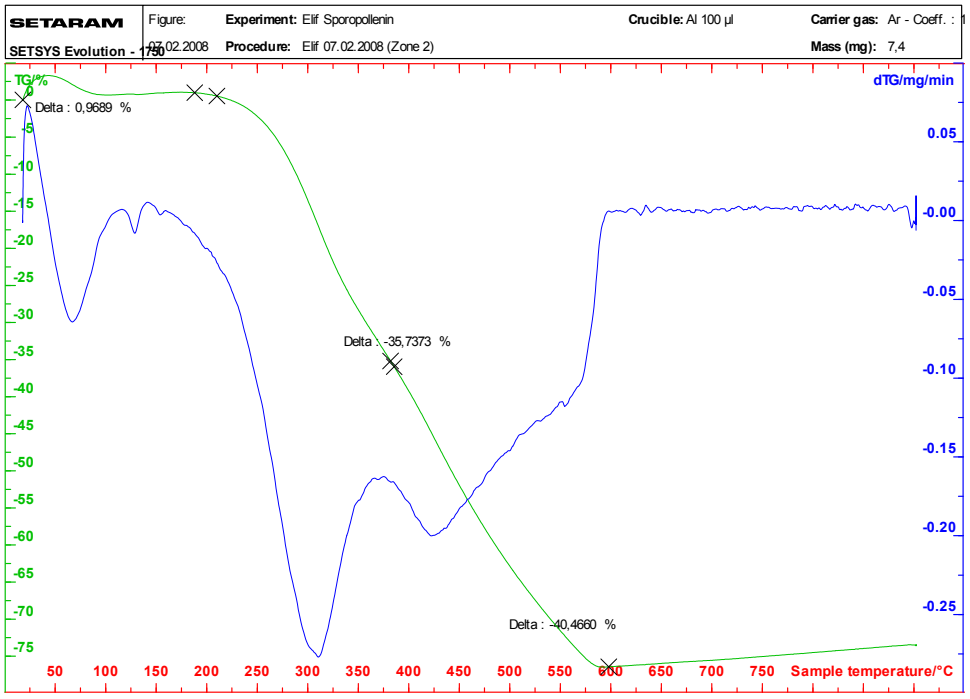
(a) **(b)**

Şekil 4.4. Aktive edilmiş Sporopollenin SEM fotoğrafları (a): x500 (b): x1500

Şekil 4.3'e baktığımızda resimlerden sporopollenin'nin çok miktarda gözenek içerdiği ve düzenli bir yüzeye sahip olduğu görülmektedir. Şekil 4.4'de aktive edilmiş sporopollenin'nin yapısını görmektedir. Ekstraksiyon prosedüründen sonra gözeneklerin içi boşaltılmış ve düzenli yapı bozulmuştur.



Şekil 4.5. Sporopollenin'in TGA ve DTG termogramı



Şekil 4.6. Aktive edilmiş sporopollenin'in TGA ve DTG termogramı

Sporopollenin ve aktive edilmiş sporopollenin'nin TGA termogramı ise Şekil 4.5 ve 4.6'da görülmektedir. Termograma göre sporopollenin iki bölgede daha geniş bir aralıkta ağırlık kaybı olurken, aktive edilmiş sporopollenin iki bölgede ağırlık kaybı görüldü. İlk ağırlık kaybı başlangıçtan 150 °C'e kadar devam eden bölgede sırasıyla % 2.6 ve 0.97'dir. Bu bölgedeki ağırlık kaybı bilindiği gibi polimerin ihtiva ettiği suyun yapıdan ayrılmasından kaynaklanmaktadır. Sporopollenin 200-900 °C aralığında toplam ağırlık kaybı % 94.9 olurken, aktive edilmiş sporopolleninin termal kararlılığının daha yüksek olduğu gözlendi. 200-600 °C aralığında % 76.2'lik ağırlık kaybından sonra 600-900 °C aralığında herhangi bir ağırlık kaybı gözlenmedi.

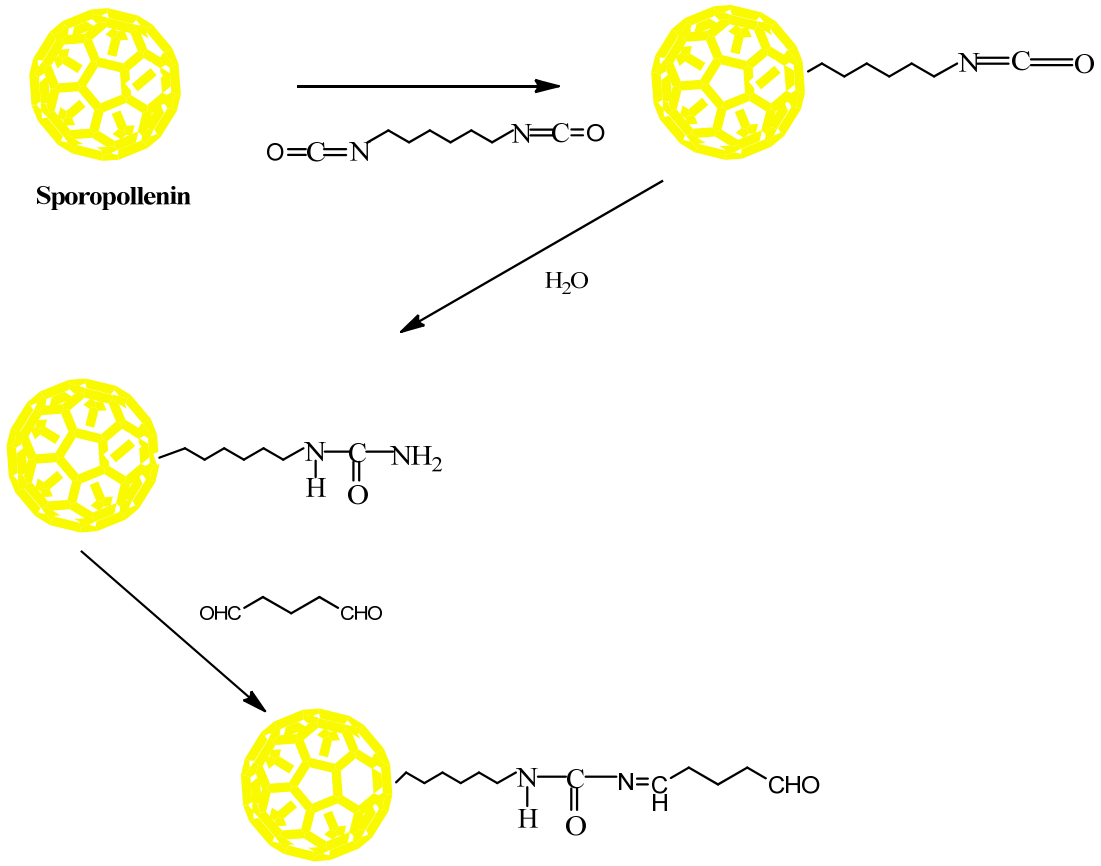
4.1.4. Sporopollenin destek maddesinin HMDI ile etkileştirilmesi (Spo-HMDI)

Sporopollenin asetonitril içersinde oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra hekzametilendiizosiyanat ile etkileştirilerek Spo-HMDI polimeri elde edildi. Spo-

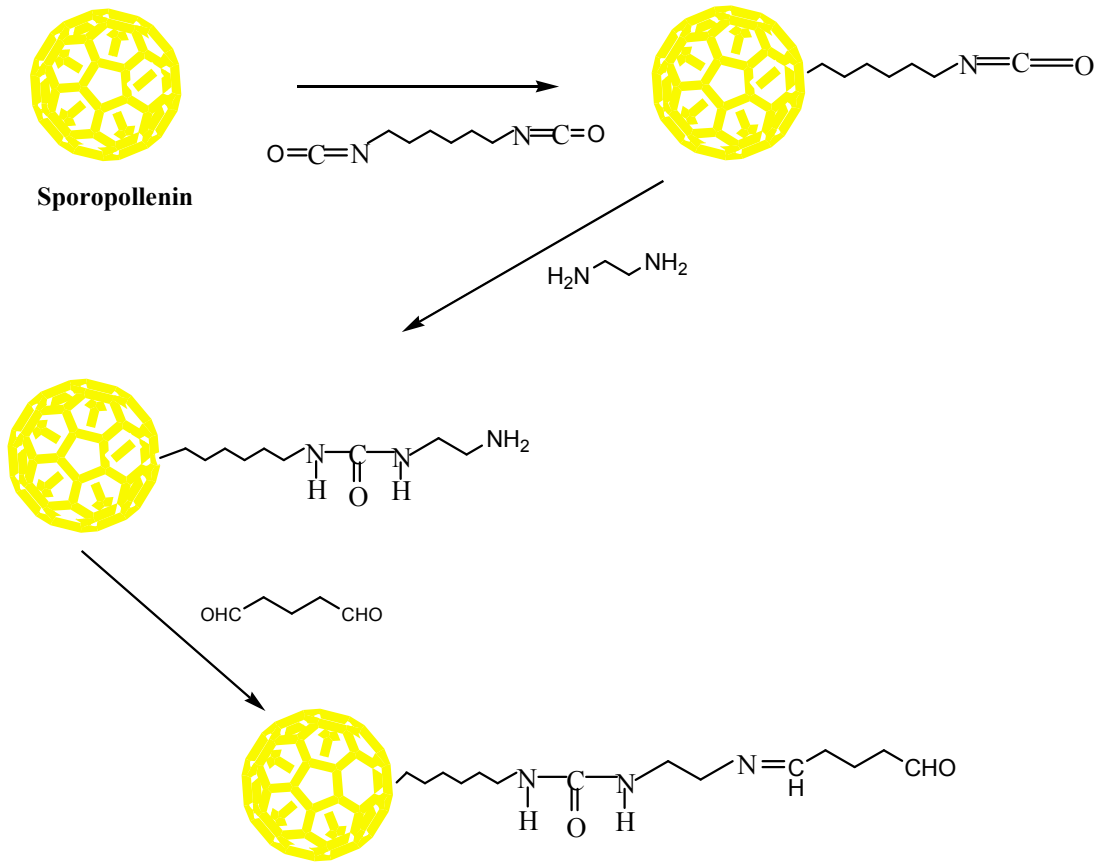
HMDI'nin karekterizasyonu FTIR ile doğrulandı. Polimerin FTIR spekturumu iki kuvvetli absorpsiyon bandının varlığı ile gözlendi. Bunlar karakteristik izosiyanat (–N=C=O) grubu (2270 cm^{-1}) ve 1746 $cm^{-1'}$deki (N-C=O) karbonil grubu ait band gözlendi (Şekil 4.7).

4.1.4.1. Sporopollenin destek maddesinin GA ile etkileştirilmesi (Spo-HMDI-GA)

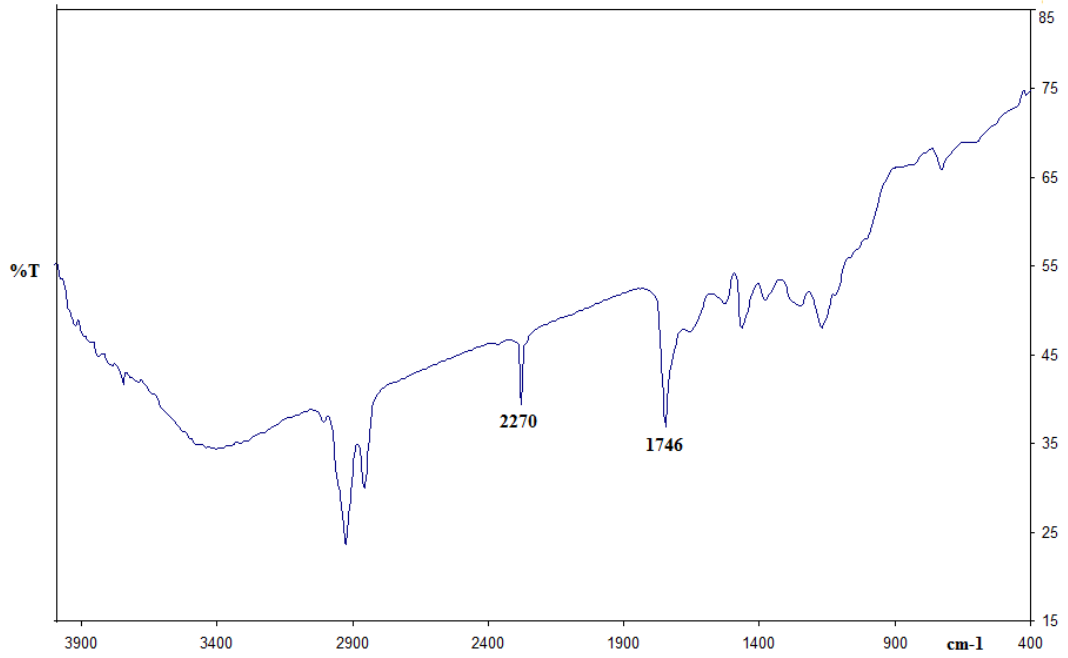
Spo-HMDI polimerinden amin uçlu polimer sentezlemek için iki farklı metod kullanıldı. Metot A'da Spo-HMDI su ve asetonitril ile etkileştirildi. Metot B'de ise Spo-HMDI asetonitril içerisinde etilendiamin ile etkileştirildi. Şekil 4.8'de FTIR spektrumuna baktığımızda 1653 $cm^{-1'}$deki kuvvetli amin bandının oluşumu ve 2270 cm^{-1}'deki izosiyanat bandının kayboluşundan Spo-HMDI'nin etilendiamin ile etkileştiğini gösterir. Böylece bu polimer (Spo-NH_2) glutaraldehitle tepkimeye sokularak aldehit grubu bulunduran polimerlere dönüştürüldü (Spo-HMDI-GA). Şekil 4.9'da 1717 cm^{-1}'deki aldehit karboniline ait pikin ortaya çıkması bu grubun bağlandığını gösterir. Şekil 4.10'da Spo-HMDI-su'yun glutaraldehitle etkileştiği 1711 cm^{-1}'deki kuvvetli aldehit karboniline ait banttan anlaşıldı. (Şema 4.5 ve 4.6).



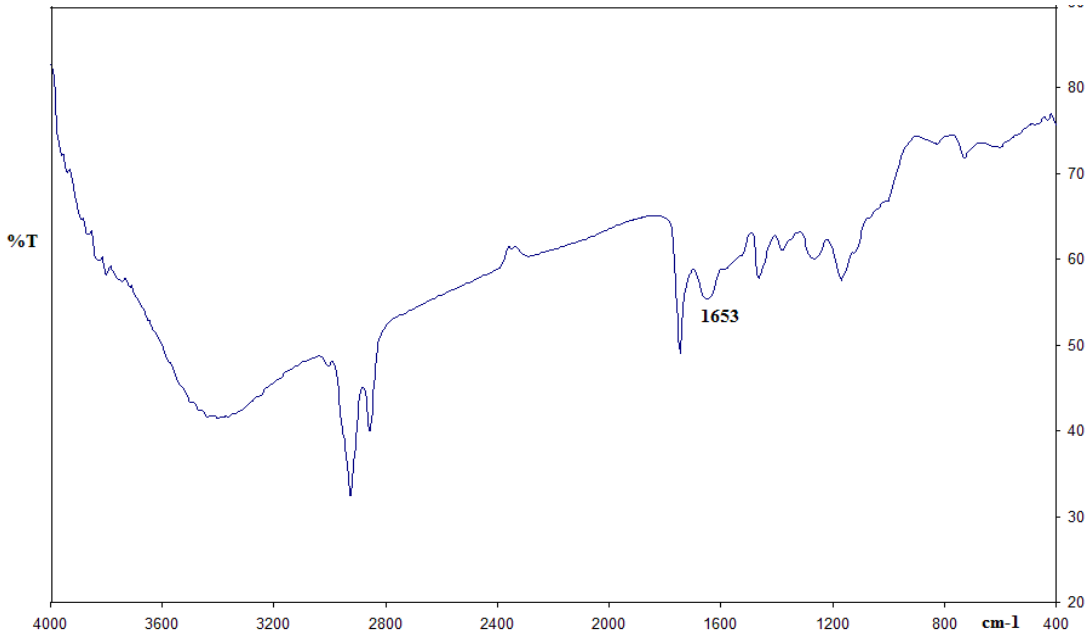
Şema 4.5. Sporopollenin destek maddesinin hazırlanış şeması (Metot A, Kovalent bağlama)



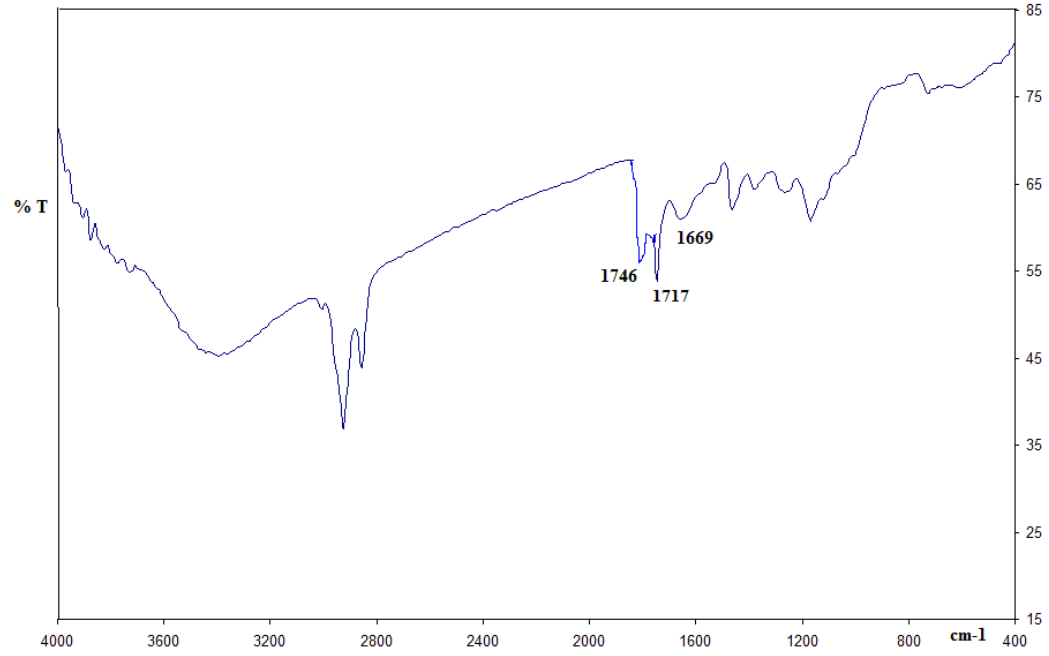
Şema 4.6. Sporopollenin destek maddesinin hazırlanış şeması (Metot B, Kovalent bağlama)



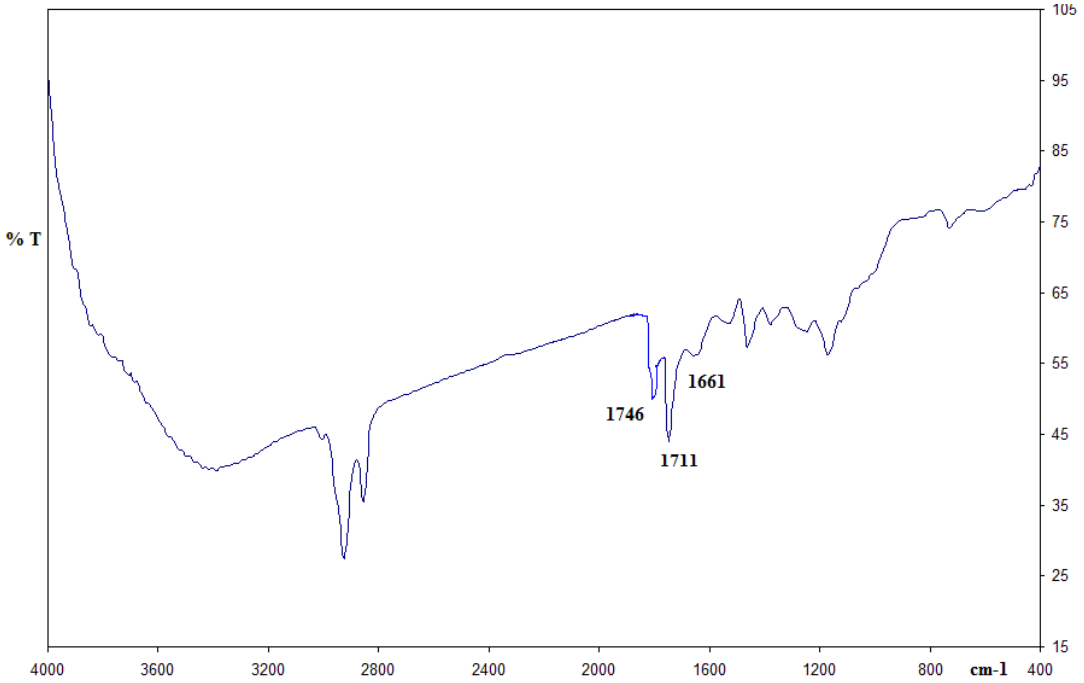
Şekil 4.7. Spo-HMDI'nin FT-IR spekturumu



Şekil 4.8. Spo-HMDI-ed'nin FT-IR spekturumu



Şekil 4.9. Spo-HMDI-ed-GA'in FT-IR spektrumu



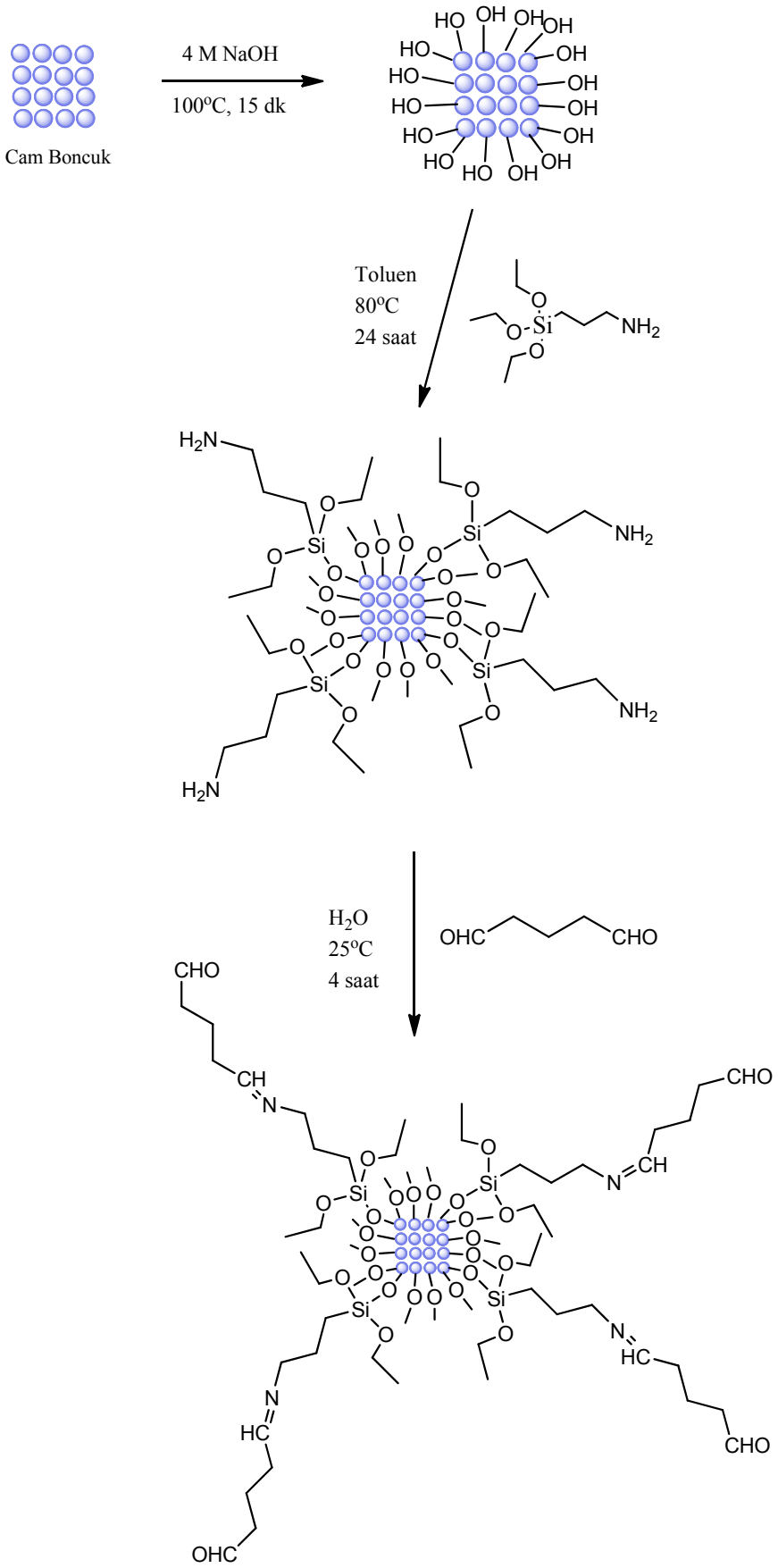
Şekil 4.10. Spo-HMDI-su-GA'in FT-IR spektrumu

4.1.5. Cam boncukların hazırlanması

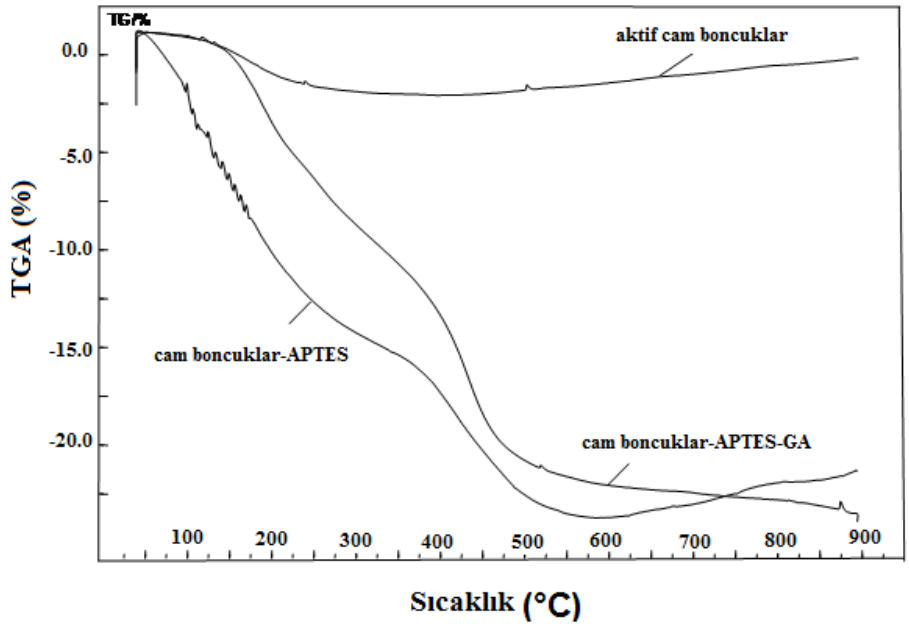
4.1.5.1. Cam boncuk-APTES-GA'in karekterizasyonu

Silanlamadan önce cam substratların yüzeyi NaOH ile ön temizleme yapıldı. Daha sonra cam boncuklar geri soğutucu altında karıştırılarak kaynatıldı ve oda sıcaklığında deyonize su ile yıkandıktan sonra cam boncukların yüzeyi aktive edilmiş oldu. Aktive edilmiş cam boncuklar toluen içerisinden azot geçirilerek ve 3-aminopropil-trietoksisilan (APTES) ile etkileştirerek silanlanmış oldu. Daha sonra modifiye edilmiş bu cam boncuklar GA ile etkileştirildi (Ozmen ve ark., 2009).

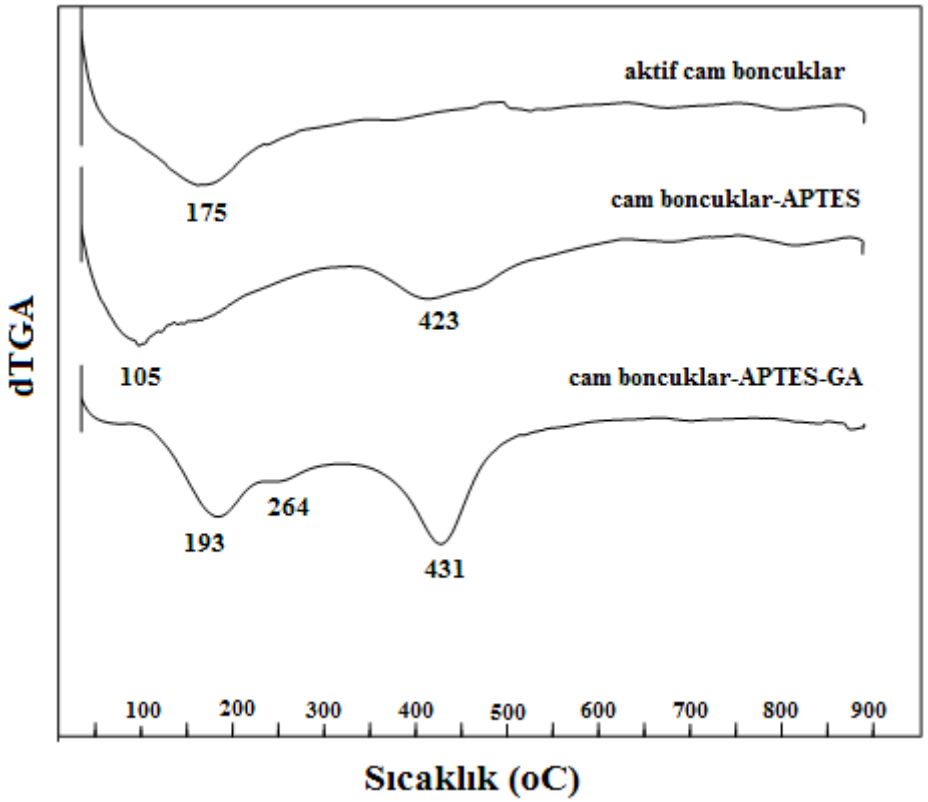
Cam boncuk-APTES-GA destek maddesinin hazırlanış Şeması 4.7'de verildi.



Şema 4.7. Cam boncuk-APTES-GA'nin sentezi



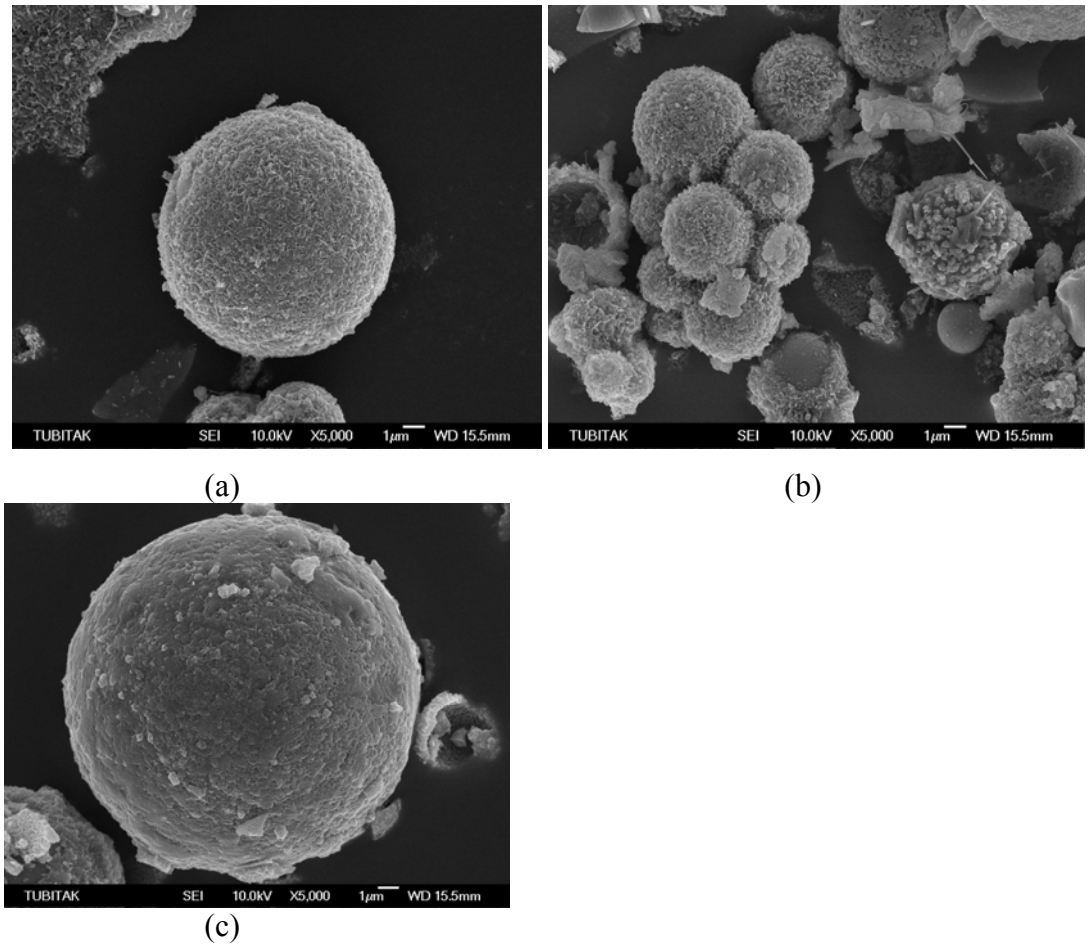
(a)



(b)

Şekil 4.13. TGA (a) ve birinci türevleri (dTGA) (b)

Cam boncukların termal kararlılığı, cam boncuk-APTES ve cam boncuk-APTES-GA TGA ve birinci türevi (dTGA) ile değerlendirildi (Şekil 4.13. (a) ve (b)). Cam boncuklar materyaldeki fiziksel olarak adsorbe olmuş suyun kaybından dolayı 50'den 250 ^{o}C aralıklarındaki sıcaklıklarda % 3.07 civarında bir ağırlık kaybı gösterilmiştir. Cam boncuk-APTES'in ağırlık kaybı 50-250 ^{o}C'in geniş sıcaklık aralığında % 4.65 dir. Benzer şekilde bu sıcaklıklar arasında cam boncuk-APTES-GA'in ağırlık kaybı % 11.14 dür. Cam boncuk-APTES'in bu ağırlık kaybı (yaklaşık % 2.57) 325-625 ^{o}C sıcaklık aralıklarında başlamıştır. Cam boncuk-APTES'in ana bozunması 423 ^{o}C'de olmaktadır. Cam boncuk-APTES-GA cam boncuk-APTES'den termal olarak daha dayanıklıdır ve 264 ve 431 ^{o}C'de iki bozunma geçişi göstermiştir. Buma ilaveten GA modifiye olmuş cam boncukların en önemli ağırlık kaybı 300-600 ^{o}C'in sıcaklık araklıkları içerisinde % 12.73 civarındadır.



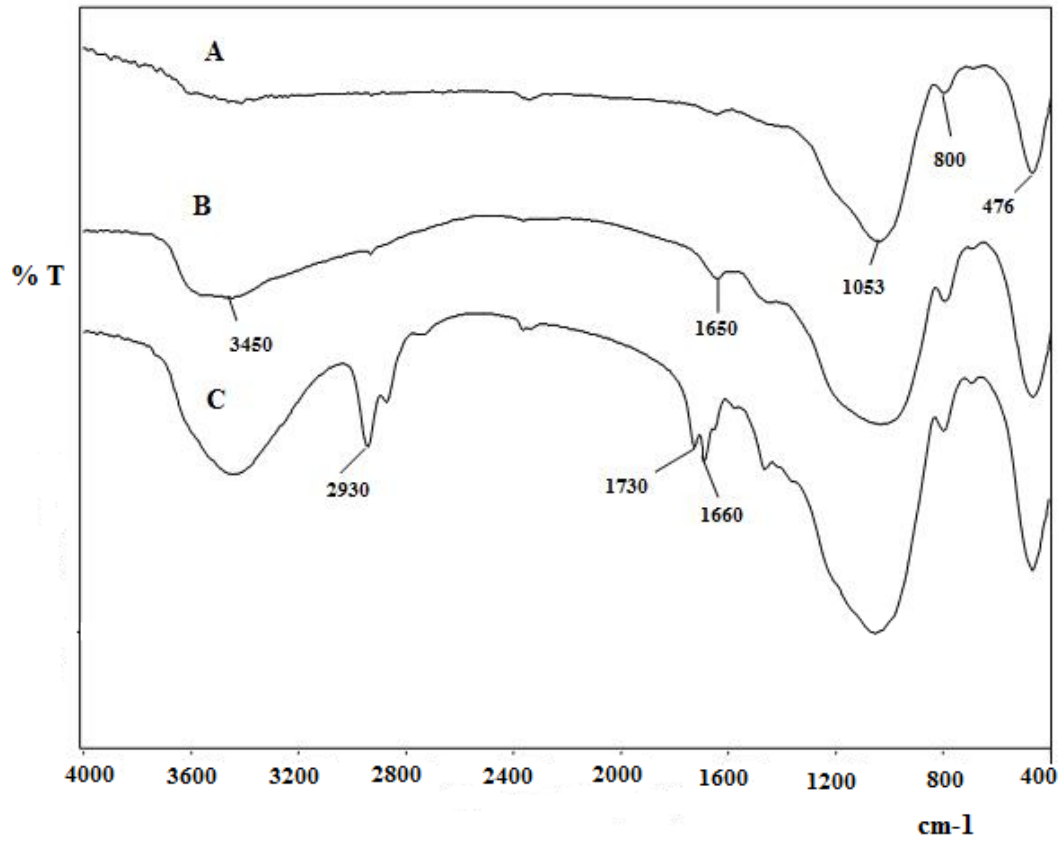
(a) (b)

(c)

Şekil 4.14. Aktive edilmiş cam boncuklar (a), cam boncuk-APTES (b) ve cam

boncuk-APTES-GA'in (c) SEM fotoğrafları

Sırasıyla aktive edilmiş cam boncuklar, cam boncuk-APTES ve cam boncuk-APTES-GA Şekil 4.14. (a)-(c)'de gösterilmiştir. Yüzey modifikasyonu başarıyla gerçekleştiği görülmektedir. Cam boncuk-APTES'in yüzeyinde GA'in bağlanmasından sonra pürüzlük (roughness) indirgenmiştir.



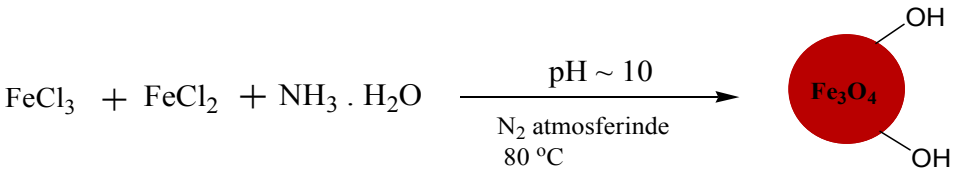
Şekil 4.15. Cam boncukların FT-IR spektrumu (A), cam boncuklar-APTES (B) ve cam boncuklar-APTES-GA (C)

Cam boncukların FT-IR spektrumları (Şekil 4.15) silika ağı için saptanan 900 ve 1170 cm^{-1} arasında bir Si-O-Si absorpsiyon bandı ve Si-O-Si eğilme titreşim bandı yüzünden 476 cm^{-1}'de güçlü bir band gözlendi. FT-IR spektrumu 1650 cm^{-1} (N-H eğilme) ve 3450 cm^{-1}'de (N-H gerilme) amit gruplarının varlığını açıkca göstermektedir. Sıkıca bağlanan propil grubu olmasından 2930 cm^{-1}'de C-H gerilme titreşimler bulunmasıyla doğrulandı. APTES-cam boncuklarda GA'in bağlanmasıyla aldehit grubunun C=O gerilmesi sayesinde 1730 cm^{-1}'de belirgin bir pik ile

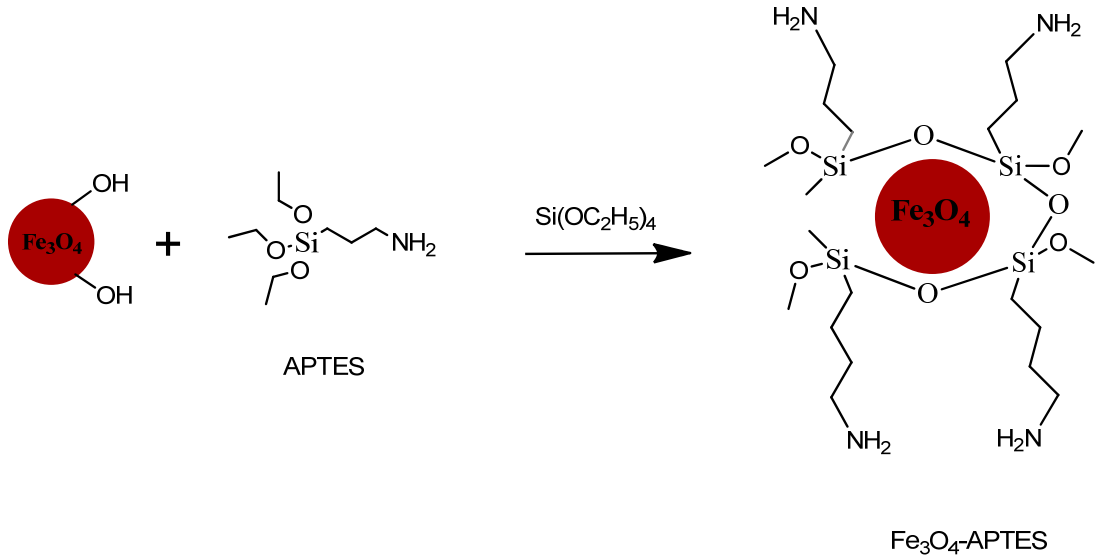
doğrulandı (Şekil 4.15c). –CO ve –NH grupları sırasıyla Şekil 4.15'de görüldüğü gibi 1660 cm^{-1} ve 1469 cm^{-1} civarında görülmektedir.

4.1.6. Manyetik nano partiküllerin sentezi

Bu çalışmanın amacı manyetik nano partiküllü destek maddeleri sentezlemek ve lipaz immobilizasyonunda kullanmaktır. Bunun için manyetik Fe_3O_4 nano partikülleri Fe(III) ve Fe(II) iyonlarının birlikte kimyasal çöktürülmesiyle hazırlandı (Şema 4.8). Daha sonra nano partiküller yüzeyinde bulunan –OH gruplar 3-aminopropiltrietoksisilan (APTES) ile uygun koşullarda tepkime sonucunda amino grubu taşıyan manyetik nanopartiküller elde edildi (Şema 4.9).



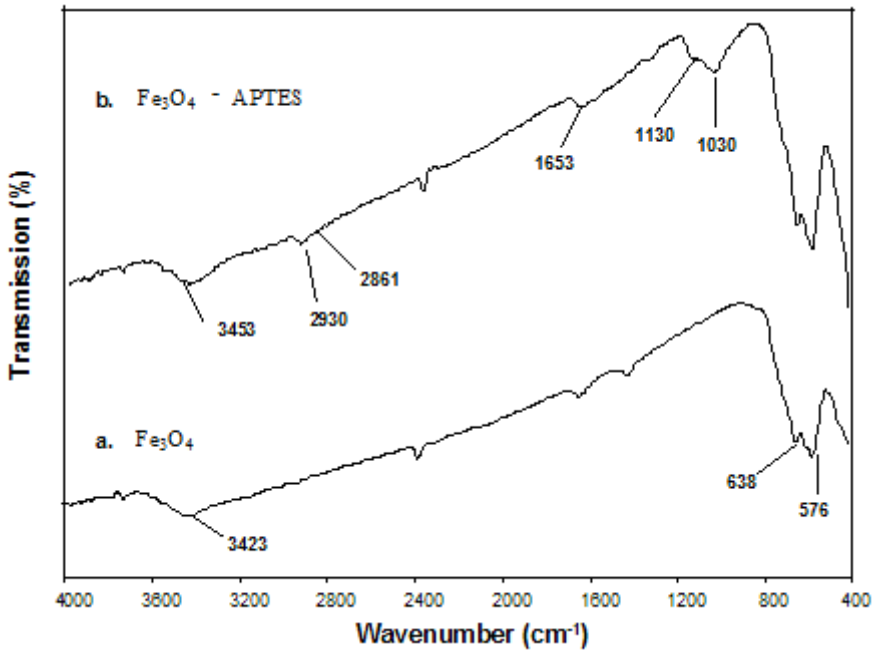
Şema 4.8. Fe_3O_4 nanopartiküllerinin sentezi



Şema 4.9. APTES modifiye edilmiş Fe_3O_4 nano partiküllerinin hazırlanması

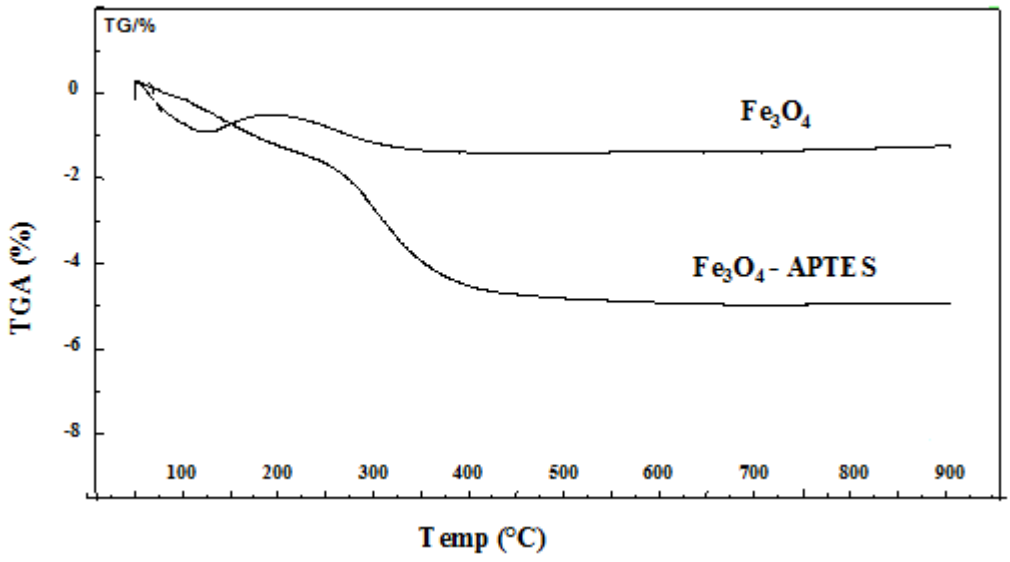
Bu işlemde Fe(II)/Fe(III)'ün konsantrasyon oranı 1:2'in stokiyometrik oranından ziyade 1:1.75 olarak seçildi. Çünkü Fe(II) oksidasyona eğilimli ve böylece çözeltide Fe(III)'e dönüşür. Bu metotla hazırlanan Fe_3O_4 nano partikülleri su ile etkileşmesinden yüzeyde birçok hidroksil grupları taşımaktadır. APTES modifiye olmuş Fe_3O_4 nanopartikülleri manyetik yüzeydeki hidroksil grupları ve APTES arasındaki reaksiyonla elde edildi. Bu işlemde iki temel reaksiyon gözlenir. İlki, APTES alkali şartlar altında sulu fazda çok reaktif silanol türleri için hidroliz olur ve Si-O-CH_3 bağları –OH grupları dönüşür. Ardından dayanıklı Fe–O–Si bağları elde etmek için manyetitini yüzeydeki serbest OH grupları ile kondensasyonu olur. Çözeltide de silanollerin oligomerizasyonu yüzeyi kovalent bağlanması ile yarışmalı bir reaksiyon olur. Manyetik nano partiküller bu silan oligomerlerinden bir mıknatıs yardımı ile ayrılarak saflaştırıldı.

Elde edilen partiküllerin karekterizasyonu FTIR, TGA ile aydınlatıldı ve partikül büyüklüğü ve morfolojiside daha çok bilgi edinmek için TEM fotoğrafları alındı.

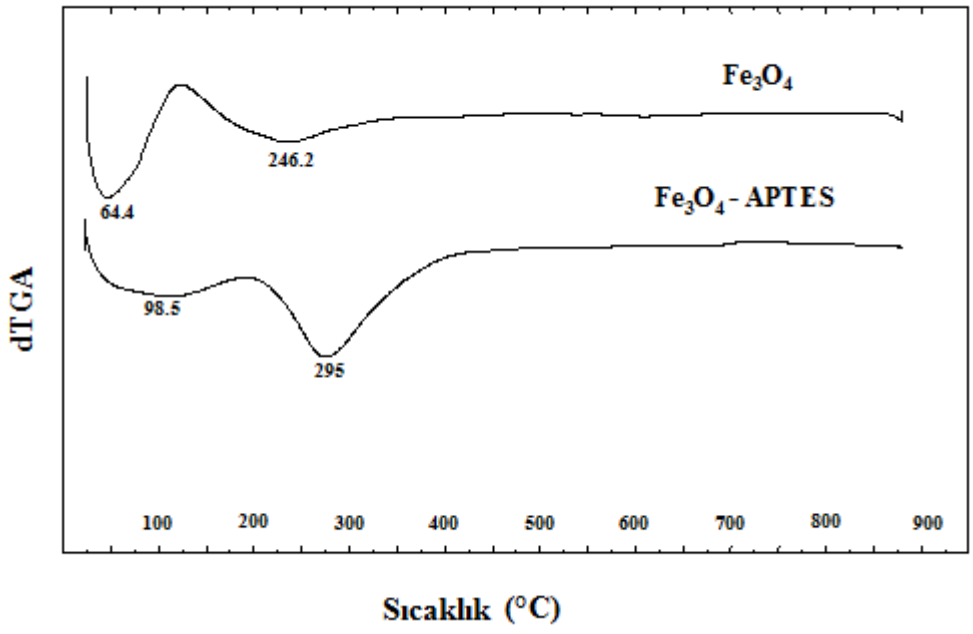


Şekil 4.16. Fe_3O_4 ve Fe_3O_4-APTES'nin FT-IR spektrumları

Düşük dalga (≤700 cm^{-1}) sayılarındaki FTIR bantları demir oksitin Fe-O bantlarının titreşimlerinden dolayı olmaktadır. Manyetik nanopartiküllerin varlığı 638 ve 576 cm^{-1} civarında iki güçlü absorpsiyon bandı ile görülebilmektedir (Waldron 1955; Ma ve ark., 2003). APTES modifiye olmuş manyetik nanopartiküller 1030 ve 1130 cm^{-1}'de Si-O grupları olarak belirlenen bantlar ile doğrulandı. 3453 ve 1653 cm^{-1}'de iki geniş band sırasıyla N-H gerilme titreşimi ve serbest NH_2 grubunun NH_2 eğilme bandını temsil eder. Bağlanmış propil grubunun varlığında C-H gerilme titreşimleri 2930 ve 2861 cm^{-1}'de görülmesiyle doğrulandı (Şekil 4.16) (Özcan ve ark., 2009).



(a)

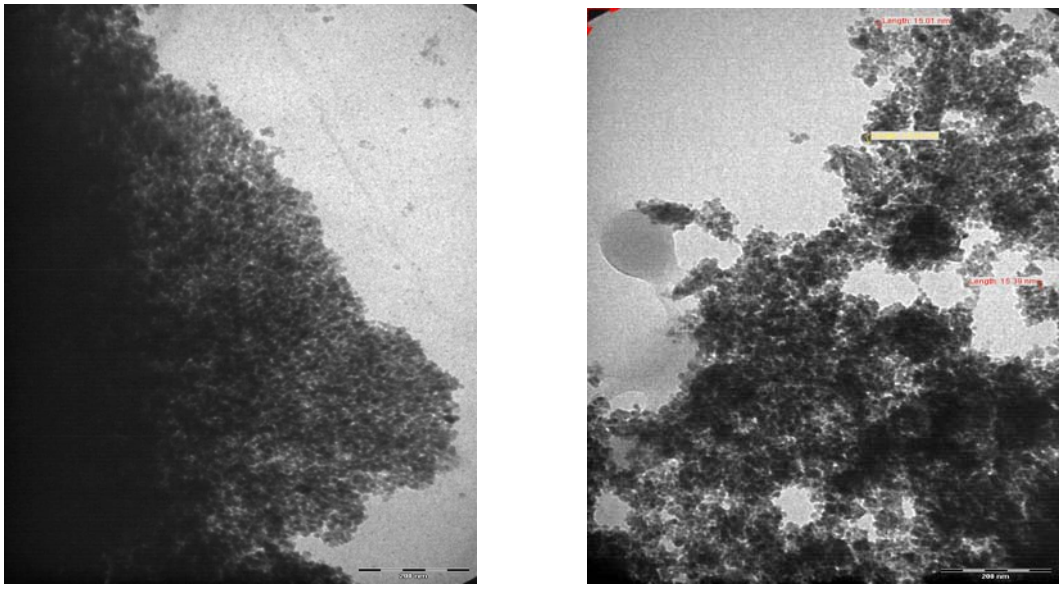


(b)

Şekil 4.17. Fe_3O_4 nanopartiküllerinin TGA (a) ve birinci türevleri (dTGA) (b)

Şekil 4.17 (a-b)'de Fe_3O_4 ve APTES modifiye Fe_3O_4 nanopartiküllerin termogravimetrik analizi (TGA) ve birinci türevi (dTGA) verildi. TGA'daki sıcaklıklar üzerinde, manyetik nanopartiküller başlıca materyaldeki fiziksel olarak

adsorbe olmuş su kaybından kaynaklanan 65'den 120 ^{o}C aralığındaki sıcaklıklarda % 0.8 civarında bir kütle kaybı gösterdi. APTES modifiye olmuş nanopartiküllerin ağırlık kaybı 250-500 ^{o}C'de % 3.5 geniş bir sıcaklık aralığı civarında gözlendi (Can ve ark. 2009).



(a) (b)

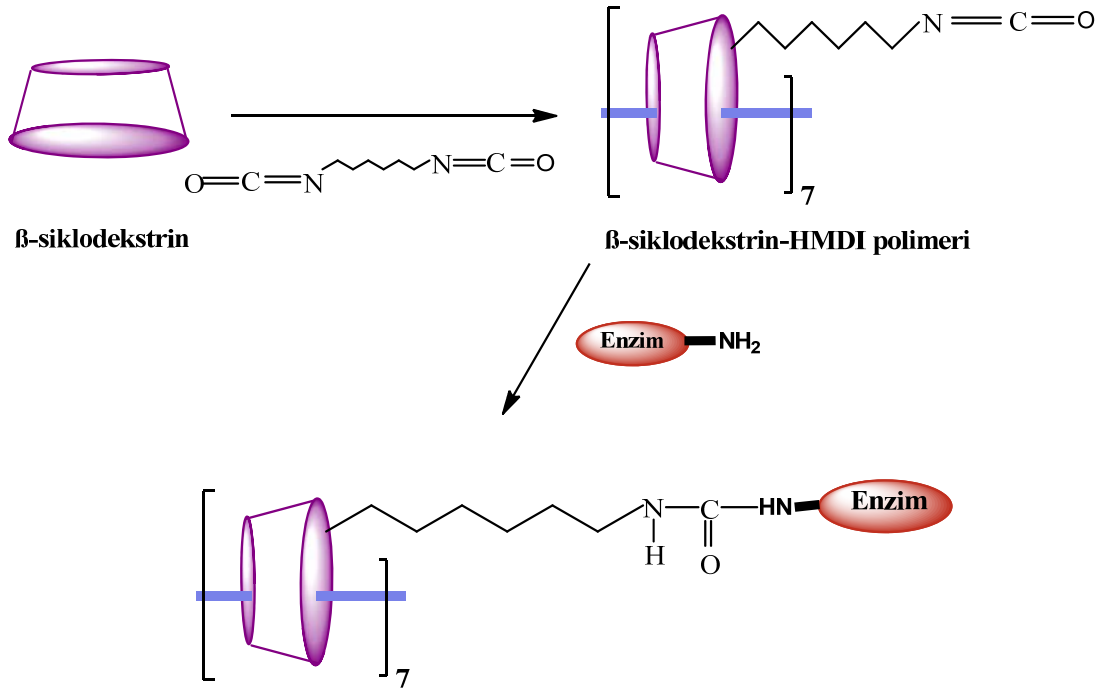
Şekil 4.18. Manyetik Fe_3O_4 ve Fe_3O_4-APTES nanopartiküllerin TEM fotoğrafları (200 nm)

Şekil 4.18'de hazırlanan manyetik Fe_3O_4 ve Fe_3O_4-APTES nanopartiküllerinin yapılarını incelemek amacıyla TEM görüntüsü alındı. Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülleri Fe_3O_4'ün nano büyüklüğünden dolayı kümeleşmiş halde görülmektedir (a), silanlandıktan sonra manyetik nanopartiküllerin düzensiz dağılımı görüldü.

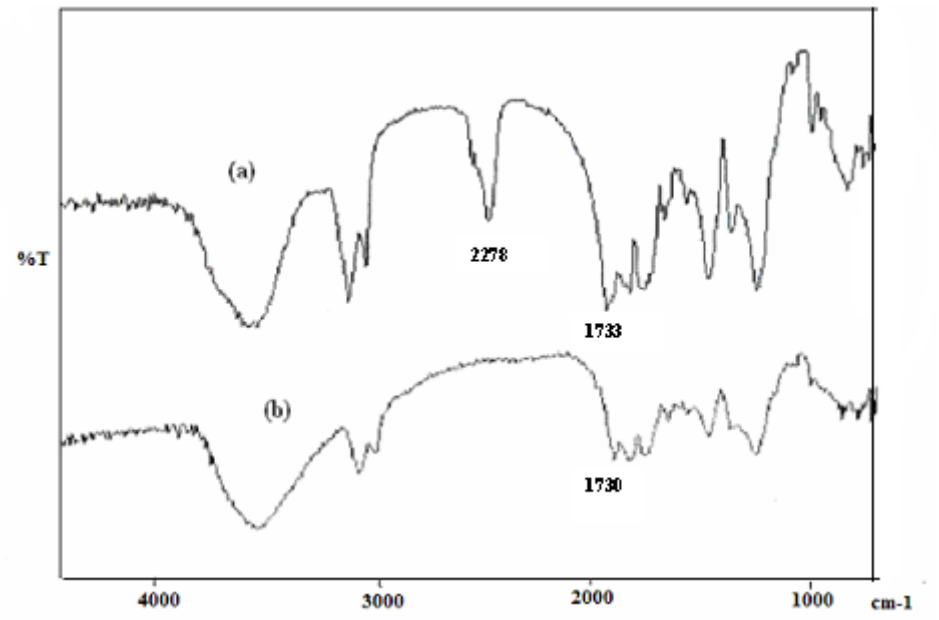
4.2. Farklı Tekniklerle Lipaz İmmobilizasyon Çalışmaları

4.2.1. Siklodekstrin bazlı polimerlere lipaz immobilizasyonu (kovalent bağlanma)

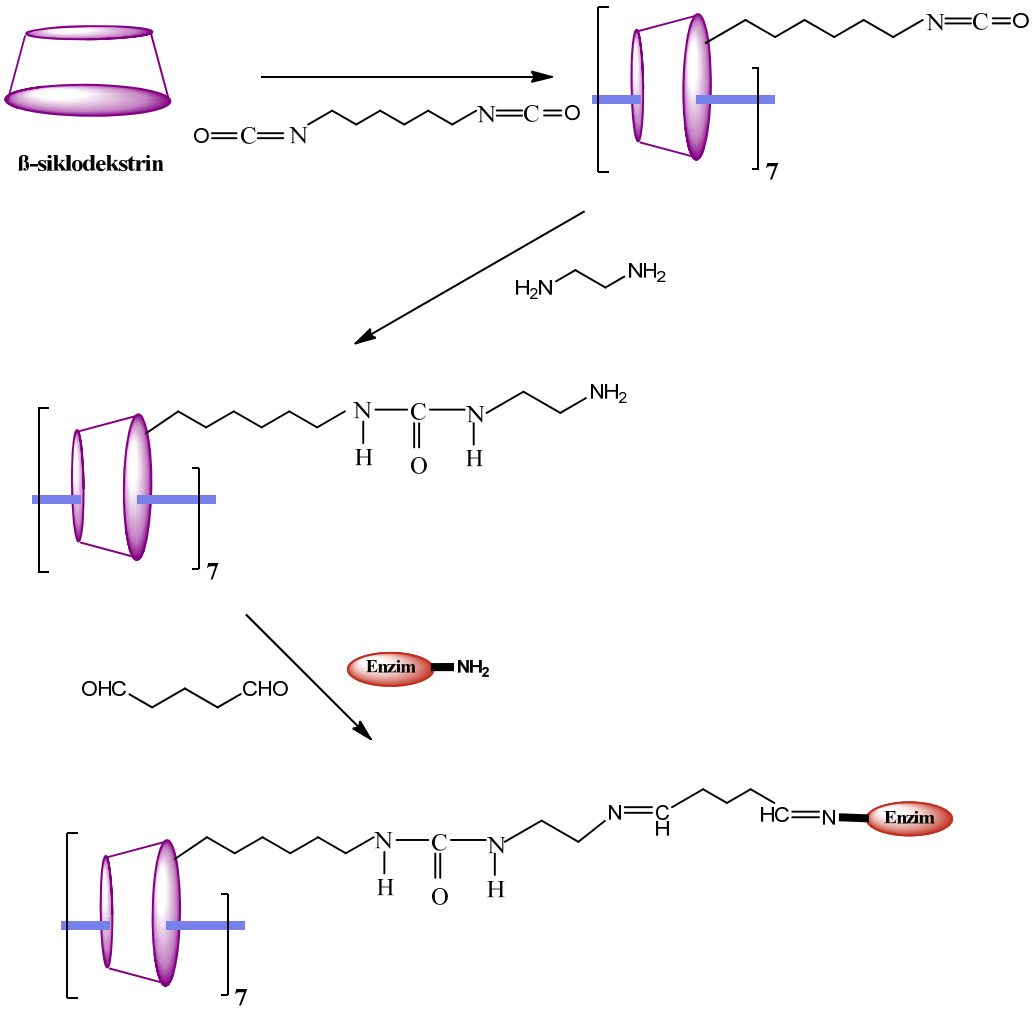
β-CD-HMDI polimeri hazırlanırken HMDI'nin mol oranı fazla alındı ve çapraz bağlı bir polimer ile izosiyanat (-N=C=O) fonksiyonel grupları elde edildi (Şekil 4.10). Bu gruplar lipazın $-NH_2$ fonksiyonel grupları ile kolayca reaksiyona girebilecek aktif uçlardır. Reaksiyonunun gerçekleştiği FTIR spektrumunda aktivasyon süresince izosiyanata ait 2278 cm^{-1}'deki –N=C=O anti asimetrik gerilme bandının absorbansının takibi ile izlendi (Şekil 4.19 a). Bu bileşiğin IR spektrumuna bakıldığında (Şekil 4.19 b) reaksiyonunun tamamlanmasıyla destek maddesinin izosiyanat gruplarının 1730 cm^{-1}'deki bir bandın varlığı ile doğrulanan ürethan (-N-C=O) grubu oluşması enzimin amino grubuyla reaksiyon olduğunu doğrulamaktadır.



Şema 4.10. Beta-Siklodekstrin-hekzametilendiizosiyanat polimerine lipaz immobilizasyonu (Metot A)



Şekil 4.19. FT-IR spektrumu (a) β-CD-HMDI ve (b) immobilizasyon sonrası



Şema 4.11. Beta-Siklodekstrin-glutaraldehit polimerine lipaz immobilizasyonu (Metot B)

β-CD-HMDI destek maddesindeki N=C=O grupları etilendiaminle etkileştirilerek amino uçlu polimere dönüştürüldü. Şekil 4.1'deki IR spektrumuna bakıldığında, β-CD-HMDI destek maddesinin 2278 cm^{-1} izosiyanat bandının yok olması ve 1626 cm^{-1}'de bir amin bandının ortaya çıkması ile β-CD-NH_2 hazırlanan bu polimer glutaraldehitle reaksiyona sokularak lipazın –NH_2 grupları ile reaksiyona girebilecek aldehit gruplarına dönüştürüldü. Bu polimerin 1715 cm^{-1}'deki bandın görülmesi aldehit gruplarının varlığını göstermektedir (Şekil 4.1c). Lipazla reaksiyona sokularak aldehit grupları imin grubuna dönüştürüldü.

Aktive edilmiş destek maddelerinde (β-CD-HMDI veya β-CD-GA) lipazın immobilizasyonu standart tamponda (50 mM fosfat tamponu pH 7.0) yavaş

karıştırılmasıyla 6 saat için 30 ^{o}C'de yapıldı. İki farklı immobilizasyon protokolü ile immobilize lipazın protein yüklenmesi, aktivite ve spesifik aktivitesi Çizelge 4.1'de gösterildi. Çizelgeye baktığımız β-CD-GA destek maddesi β-CD-HMDI destek maddesine kıyasla daha iyi bir destek materyali olduğunu gösterdi. β-CD-HMDI destekli lipazın aktivite verimi % 6.28, aktivitesi 8.82 U/g iken β-CD-GA'nın aktive verimi % 176.7, aktivitesi 16.16 U/g bulundu.

Çizelge 4.1. Optimum reaksiyon şartlarında serbest ve immobilize lipazların aktivitesi

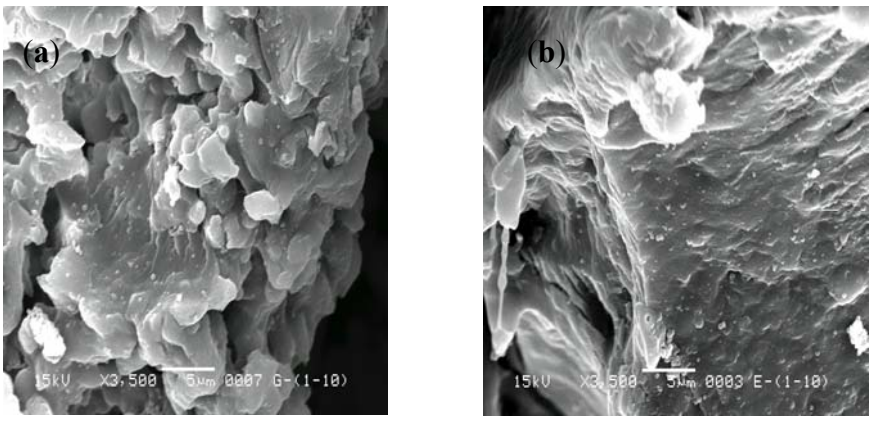
	Bağlanan Protein (µg/g)	Bağlanan Protein Yüzdesi (%)	İmmobilizasyon Verimi (%)	Lipaz Aktivitesi (U/g destek maddesi)	Spesifik Aktivitesi (U/mg protein)	Aktivite Verimi (%)
Serbest Lipaz	-	-	-	2.49[a]	35.60	100
Metot A (β-CD-HMDI)	3.94	45	55	8.82	2.23	6.28
Metot B (β-CD-GA)	257.5	9.8	90	16.16	62.75	176.70

[a]Serbest lipazın aktivitesi mL'de (1mg/mL) alındı.

β-CD-HMDI ve β-CD-GA destekli immobilize enzimlerin hidrolitik aktivitesi ve immobilizasyon veriminin en iyi sonuçları glutaraldehit aktive edici ajan olarak kullanıldığı zaman ulaşıldı. Bu sonuç şaşırtıcı değildir. Çünkü literatürde glutaraldehit immobilize enzimler için en iyi aktive edici ajan olarak iyi bilinir (Betancor ve ark., 2006; Lopez-Gallego ve ark., 2005; Alonso ve ark., 2005). Ayrıca izosiyanat gruplarının aldehit gruplarına göre daha aktif olması ve enzimin aktif bölgeleri ile etkileşerek aktivitesini azalttığı sonucuna varıldı.

Bu reaksiyon süresince değişikleri doğrulamak için GA ile reaksiyona sokulmuş destek maddesinin ve lipaz immobilize edildikten sonraki halinin SEM görüntüleri karşılaştırıldı (Şekil 4.20). GA ile etkileştirilmiş polimerin yüzey boşluğu,

lipaz immobilizasyondan sonra yuvarlağımsı yapısıyla muhtemelen protein topluluğu ile doldurulmuştur.

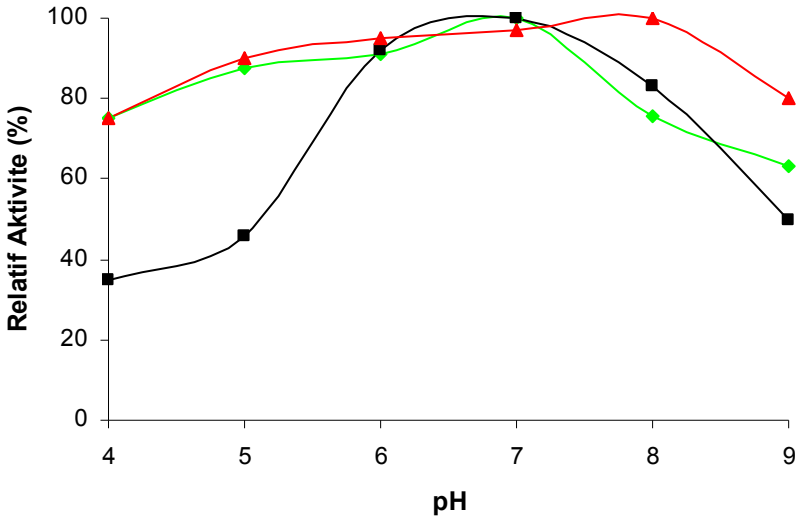


Şekil 4.20. GA etkileştirilmiş destek maddesi (a) ve immobilize lipazın (b) SEM görüntüleri

4.2.1.1. Aktiviteye pH ve sıcaklığın etkisi

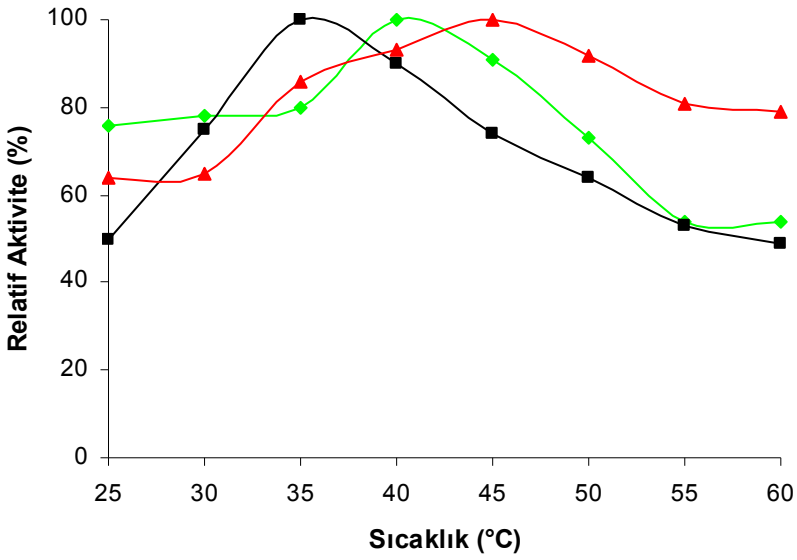
Serbest ve immobilize lipazların aktivitesinde pH'ın etkisi Şekil 4.21'de gösterilmiştir. pH sulu çözeltide enzimatik aktiviteyi değiştiren en önemli faktörlerden biridir. Enzimin immobilizasyonunun optimum pH'ın değişmesiyle enzimin konformasyonu da değişikliğe uğrar. Şekil 4.21'de maksimum enzim aktivitesi serbest ve immobilize enzimin (β-CD-HMDI) pH'ı 7 olduğu bulundu. Bu durum kovalent bağlama süresince enzimde ya konformasyonal değişiklerin olmadığını ya da destek materyalinin asidik ya da bazik karakterli olmadığını göstermektedir. Ayrıca immobilize lipazların pH profilleri serbest enziminden daha geniş aralıktadır. İmmobilizasyon metotlarının enzim aktivitesini daha geniş pH aralığı üzerinde korumakta olduğu anlamına gelir. Bununla birlikte immobilize enzimin (β-CD-GA) optimum pH değeri bir miktar alkali bölge civarına kaydığı

gözlendi. Bu kaydırma matriksin yükü ve yapısına bağlı olmasının yanında immobilizasyon metoduna da bağlıdır. Desteğin imino fonksiyonlaştırılmış yüzeyinin temeli bu sonuca bağlı olabilir. Destek maddesinin yüzeyindeki imino grupları esas çözelti ve yüzey arasındaki hidrojen bağlarının düzenli yayılmasını önlemektedir (Wang ve ark., 2006; Yadav ve Jadhav 2005; Matsuno ve ark., 2007). Castro ve ark. (2008) aktive edilmiş glutaraldehit ile polivinil alkolde immobilize lipazın optimum pH'sını 8.8 olarak bulmuşlardır. Son zamanlardaki bir çalışmada da *Candida rugosa* lipaz glutaraldehitle kitosan küreciklerine immobilize edildiği zaman optimum pH 9 ile pH 5-8 aralığında dayanıklı oluğunu bulmuşlardır (Hung ve ark., 2003).



Şekil 4.21. Aktiviteye pH'ın etkisi (serbest lipaz (■), immobilize lipaz (β-CD-HMDI (♦) ve immobilize lipaz (β-CD-GA) (▲))

Buna ilaveten, kovalent immobilizasyonda stabilitenin artması optimum pH'ın kaymasını da açıklayabilir. Bu sonuçlar β-siklodekstrin bazlı polimerin yüzeyinde enzim moleküllerinin çoklu nokta bağlanmasıyla sonuçlanan lipaz moleküllerinin stabilizasyonuna bağlanabilir (Bayramoglu ve Arıca 2008; Bayramoglu ve ark. 2005). Böyle bir durumu birçok araştırmacı da gözlemiştir (Arıca ve ark. 1997; Bryjak ve ark., 1997). Kovalent bağların oluşumuna pH'ın değişmesine karşın enzim konformasyonunun geçişi olarak yorumlanabilir. Diğer yandan bu sonuçlar immobilize lipazların serbest lipazdan daha iyi pH stabilitesine sahip olduğu göstermektedir.



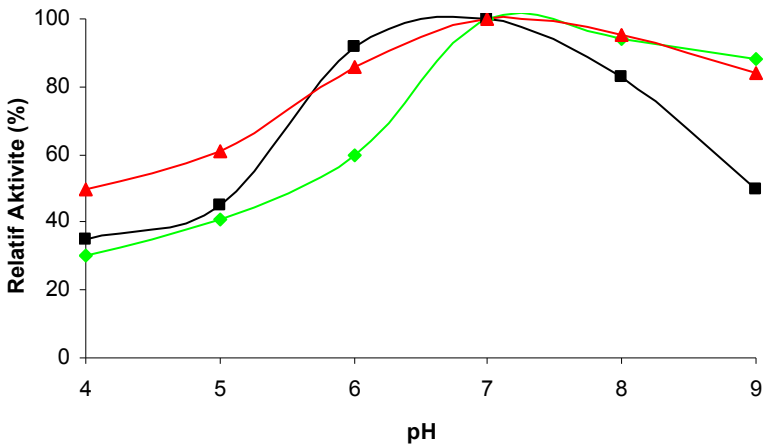
Şekil 4.22. Aktiviteye sıcaklığın etkisi (serbest lipaz (■), immobilize lipaz (β-CD HMDI) (♦) ve immobilize lipaz (β-CD-GA) (▲))

p-NPP hidrolizi için pH 7'de 25–60 °C sıcaklık aralıklarında serbest ve immobilize lipazların aktivitesinde sıcaklığın etkisi Şekil 4.22'de görülmektedir. Serbest enzim için optimum sıcaklık yaklaşık olarak 35 °C iken immobilize lipaz (β-CD-GA) için 45 °C ve immobilize lipaz (β-CD-HMDI) için 40 °C'de olduğu bulundu. Enzim immobilizasyonu için temel nedenlerden biri izlenen immobilizasyon tekniği, moleküllerin konformasyonal hareketliliği sınırlandığından

dolayı değişik deaktivasyon güçlerine karşı stabilite de artış beklenmiştir (Arıca 2000; Arıca, ve Bayramoglu 2004; Phadtare ve ark., 2004). Bu durum ya yüksek sıcaklıklarda substratın difüzyonunda düşük sınırlama veya enzim ve destek maddeleri arasında oluşan kovalent bağın bir sonucu olarak enzim hareketinde konformasyonal sınırlamanın yaratılmasından kaynaklanmaktadır. Böylece immobilize enzimler daha yüksek sıcaklıklarda katalitik aktive göstermişlerdir (Ye ve ark., 2005). Yüksek sıcaklıklarda serbest lipaz kolaylıkla denatürasyona uğrar fakat immobilize lipaz muhtemelen rijit konformasyonuna dayanarak korunur ve bundan dolayı katalitik aktivitesini devam ettirir.

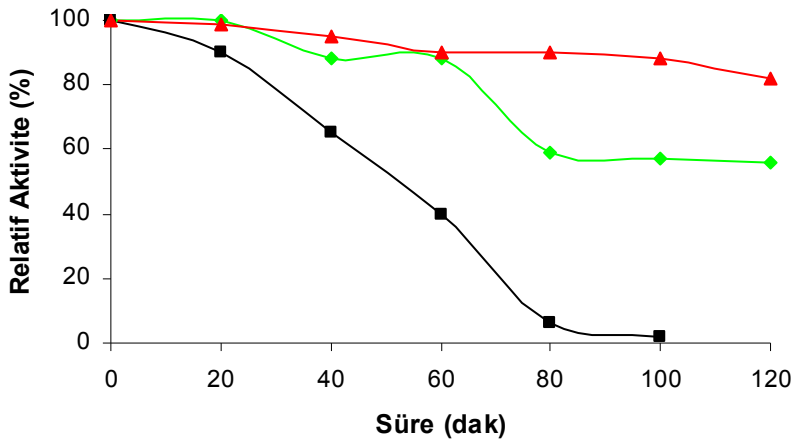
4.2.1.2. İmmobilize lipazın kararlılığı

pH ile serbest ve immobilize lipazların aktivitelerinin değişmesi Şekil 4.23'de gösterildi. İmmobilize lipazlar pH 7 ile 9 arlığında dayanıklıdırlar. Serbest lipaz ise pH 6 ile 7 arasında dayanaklıdır. İmmobilizasyon alkali bölgede lipazın stabilitesini kaydedeğer şekilde artırdı. İmmobilize enzimler pH (4-9) aralığında serbest formundan daha dayanaklıdırlar.



Şekil 4.23. pH kararlılığı (serbest lipaz (■), immobilize lipaz (β-CD-HMDI) (♦) ve immobilize lipaz (β-CD-GA) (▲))

Serbest ve immobilize lipazların termal stabilitesi Şekil 4.24'de gösterildi. Serbest ve immobilize enzimler 60 °C'de 2 saat süre ile inkübe edildi ve önceden tanımlanan prosedür takip edilerek enzim aktivitesi 30 °C'de enzim soğutulduktan sonra çeşitli zaman aralıklarında ölçüldü. Serbest lipaz 60 °C'de 80 dakika civarında başlangıç aktivitesini kaybederken immobilize lipazlar 60 °C'de sıcaklık muamelesi 120 dak. sonra GA'li % 82 ve HMDI'li % 56 civarında başlangıç aktivitelerini yitirmedikleri gözlendi. GA ile olan immobilize lipaz aynı periyotta ve aynı sıcaklıkta daha iyi termal stabilite gösterdi.

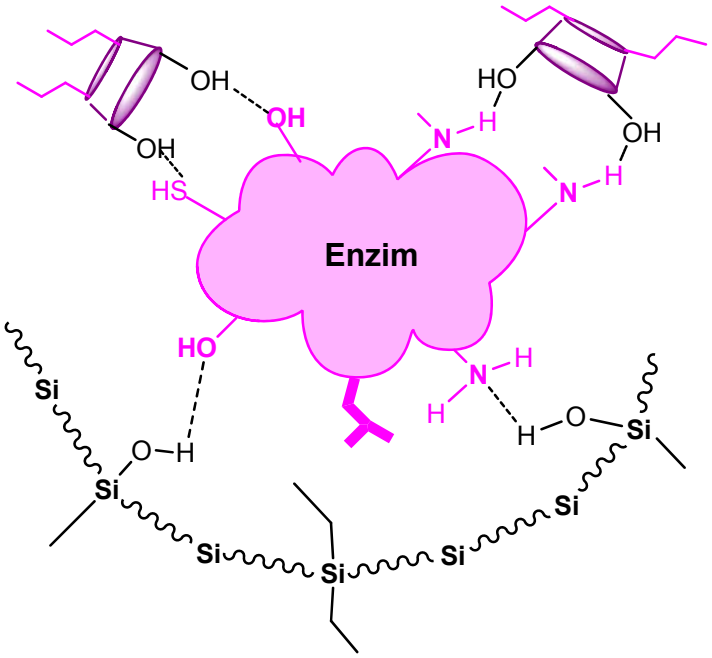


Şekil 4.24. Termal kararlılık (serbest lipaz (■), immobilize lipaz (β-CD-HMDI) (♦) ve immobilize lipaz (β-CD-GA) (▲))

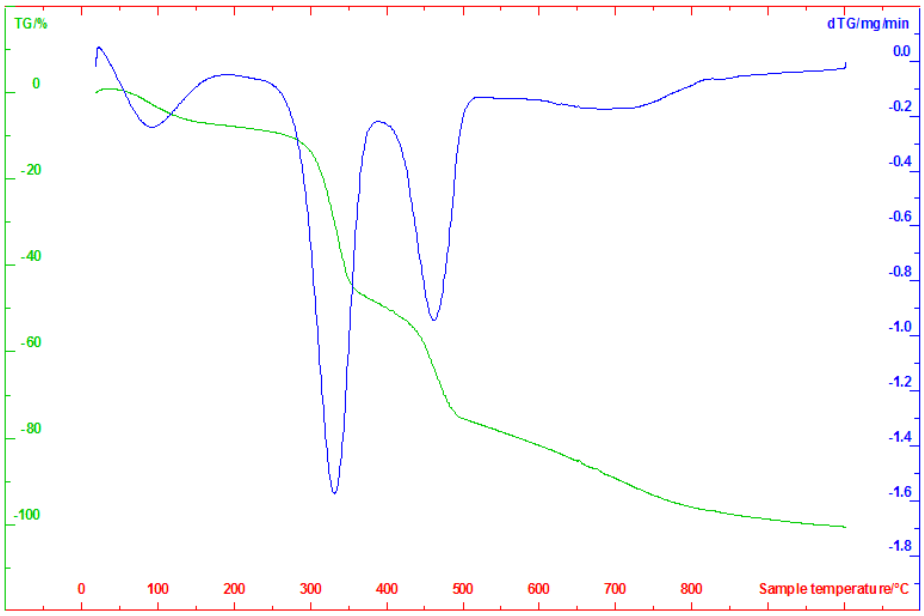
Bu sonuçlar göstermiştir ki immobilize lipazların termal stabilitesi serbest lipazdan çok daha iyidir, çünkü enzim ve destek maddesi arasındaki etkileşim yüksek sıcaklıklarda enzimin konformasyonal geçişini önleyebilmektedir. Çapraz bağlı bu polimerde enzim destek materyaline çoklu noktadan tutunabildiğinden termal stabilitesi korunabilmiştir.

4.2.2. Siklodekstrin bazlı polimerine lipaz immobilizasyonu (sol-jel tutuklama)

Kovalent bağlama tekniğine göre yapılan immobilizasyonda β-CD-HMDI destek materyali kullanıldığında enzimin aktivitesinin hayli düşmesi göz önüne tutularak β-CD-HMDI polimeri sol-jel tutuklama metoduna göre *Candida rugosa* lipaz immobilize edildi (Şema 4.12). Sonuçlar serbest enzimle karşılaştırıldı.



Şema 4.12. Sol-jel tutuklama metodu ile siklodekstrin bazlı polimerine lipaz immobilizasyonu



Şekil 4.25. β-CD-HMDI polimerinin sol-jel tutuklama metoduna göre immobilizasyondan sonraki TGA'sı

Bu çalışmada kullanılan β-CD-HMDI polimerinin lipaz immobilize olmuş yapısının TGA analizi yapıldı (Şekil 4.25). Bu yapının TGA eğrisinde üç sıcaklık aralığında ağırlık kayıpları gözlendi. Bunlardan 30-180 ^{o}C aralığı enzimin ve polimerin dehidratasyonunu gösteren bölgedir ve % 7.5 dolaylarındadır. İkinci ağırlık kaybının olduğu bölge 180-390 ^{o}C sıcaklık aralığıdır. Burada polimerin taşıdığı fonksiyonel gruplar termal olarak ayrılır ve ağırlık kaybı % 41.6'dır. Üçüncü ağırlık kaybı ise 380-550 ^{o}C aralığında % 29.5 civarındadır.

Çizelge 4.2. Optimum reaksiyon şartlarında sol-jel tekniği ile tutuklanmış lipazların aktivitesi

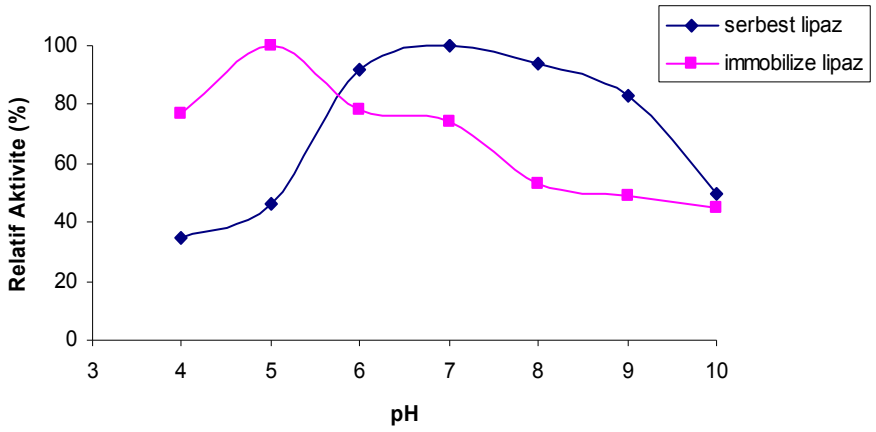
	Tutuklanan Protein (mg/g)	Tutuklanan Protein yüzdesi (%)	Lipaz Aktivitesi (U/g destek maddesi)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Aktivite Verimi (%)
Tutuklanmış lipaz[a]	28.56	58.4	95.1	3.32	100[b]
β-CD-HMDI Tutuklanmış lipaz	38	91.57	65	1.71	51.5

a) β-CD-HMDI polimeri kullanmadan tutuklanmış lipaz
b) tutuklanmış lipaz için aktivite verimi % 100 olarak alındı.

Sol-jel tutuklama işleminde, siklodekstrin bazlı polimer kullanıldığı immobilizasyonda protein miktarı, yüzdesi ve aktiviteleri Çizelge 4.2'de özetlendi. Sol jel tutuklamada lipaz sol-jel polimerinin yanı sıra siklodekstrin molekületriyle de etkileştiği için bağlanan protein miktarları tutuklanmış lipaza göre daha fazladır. Ancak aktivite bakımından β-CD-HMDI tutuklanmış lipaz tutuklanmış lipaza göre daha düşüktür. Tutuklanmış lipazın aktivitesi 95.1 U/g iken β-CD-HMDI tutuklanmış lipazın aktivitesi 65 U/g'dır.

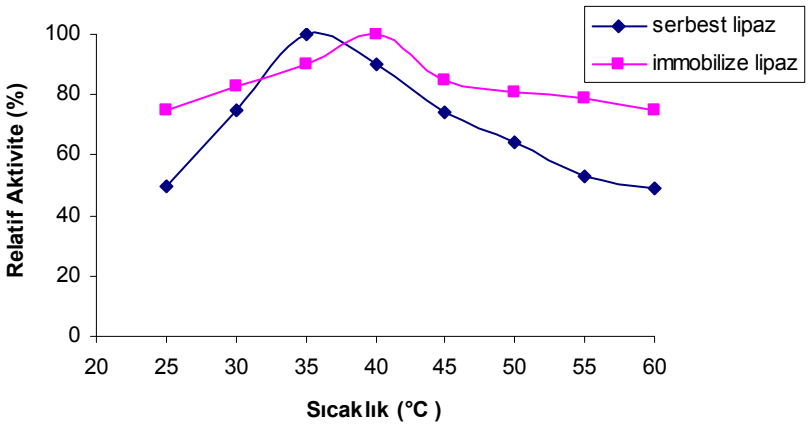
4.2.2.1. Aktiviye pH ve sıcaklığın etkisi

Tutuklanmış lipazların aktivitesine pH'ın etkisi Şekil 4.26'de gösterilmiştir. Tutuklanmış lipazın optimum pH'ı 7 iken β-CD-HMDI tutuklanmış lipazın ise pH'ı 5'dir. β-CD-HMDI tutuklanmış lipazın pH'ı asidik bölgeye doğru kaydırmıştır. Enzimler elektrolit karakterli oldukları için enzim aktifliği pH ile değişim gösterebilir. pH değişikliği ile enzim yapısındaki aminoasit zincirinin iyonik özelliği değişti ve polikatyonik bir görünüm kazandı.



Şekil 4.26. Lipaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

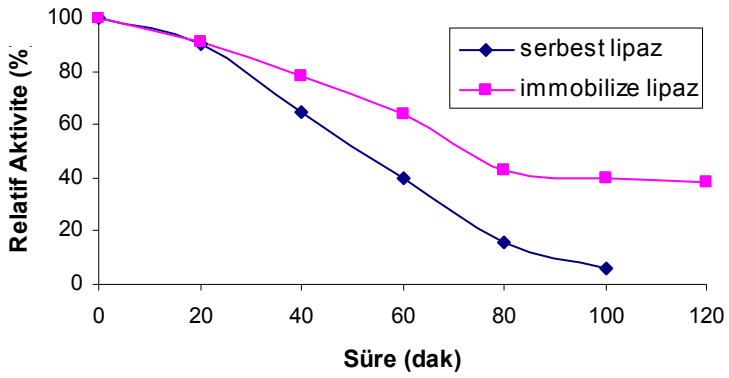
Tutuklanmış lipazların aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile yukarda belirtilen yönteme göre çeşitli sıcaklıklarda gerçekleştirilen reaksiyonlara ait relatif aktivite değerlerinin sıcaklık ile değişimi Şekil 4.27'de verildi. Tutuklanmış enzim için optimum sıcaklık 35°C olarak bulundu. Bilindiği 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. Grafikten de görüldüğü gibi (Şekil 4.27) sol-jel tutuklama yöntemine göre immobilize edilen lipazın optimum sıcaklığı 35°C'den 40°C'ye kaydığı görüldü.



Şekil 4.27. Lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

4.2.2.2. Termal kararlılık

Tutuklanmış lipazların termal kararlılığını incelemek amacı ile enzim çözeltileri 60°C'de ve farklı zaman aralıklarında (20-120 dakika) tutularak yukarda belirtilen yönteme göre aktiflikleri tayin edildi. Relatif aktivite değerlerinin zamanla değişimi Şekil 4.28'de gösterildi. Tutuklanmış lipaz 60 dakika tutulduğunda aktifliğini % 40, β-CD-HMDI tutuklanmış lipaz ise çalışmalarda aktifliğini % 64' ünü koruduğu görüldü.



Şekil 4.28. Serbest ve immobilize enzimin termal kararlılığı

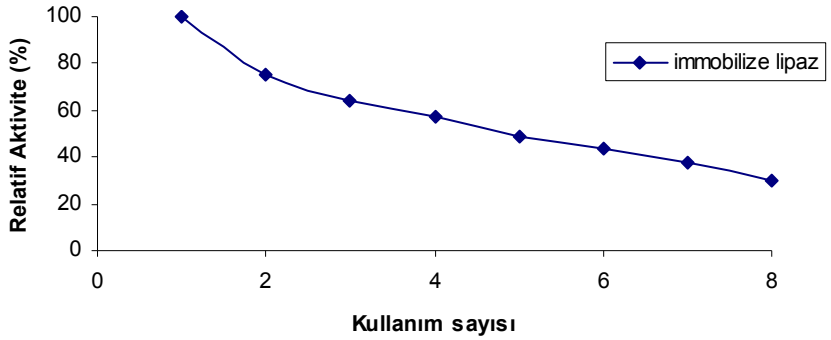
Enzimler, sıcaklık ve süre değerleri arttıkça konformasyonel değişime uğrarlar ve buna bağlı olarak da aktifliklerinde azalma veya tümüyle yok olma gözlenebilir. Şekil 4.28'de görüldüğü gibi sıcaklık arttıkça β-CD-HMDI tutuklanmış enzim daha yavaş inaktive olduğu görüldü.

4.2.2.3. Tekrar kullanılabilirlik

β-CD-HMDI tutuklanmış lipazın tekrar kullanım sayısını ölçmek amacıyla yukarda belirtilen metot kullanılarak aktiflikler tayin edildi. 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.

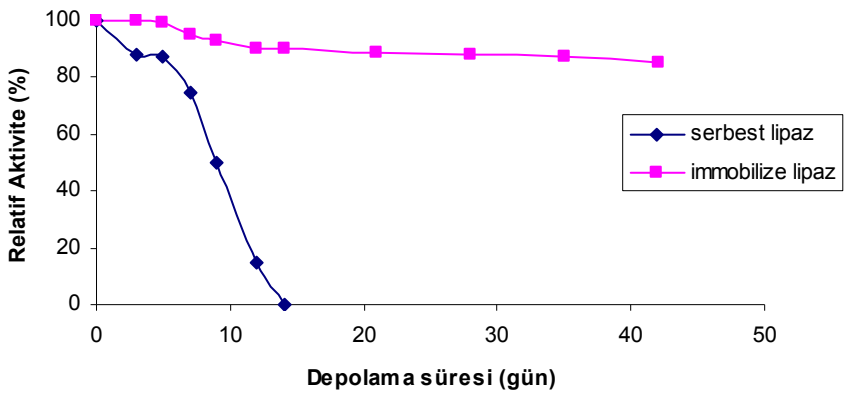
Şekil 4.29'da gösterildiği gibi tutuklanmış lipazın aktivitesi 8 kullanımdan sonra orjinal aktivitesinin % 30 seviyelerinde sürdürdüğü gözlendi. Bu teknik kullanılarak immobilize lipazın uzun süreli reaksiyon kararlılığı gerektiren endüstriyel uygulamalar için başarılı olarak kullanılabileceği anlaşıldı.



Şekil 4.29. İmmobilize lipazın tekrar kullanılabilirliği

4.2.2.4. Depolama kararlılığı

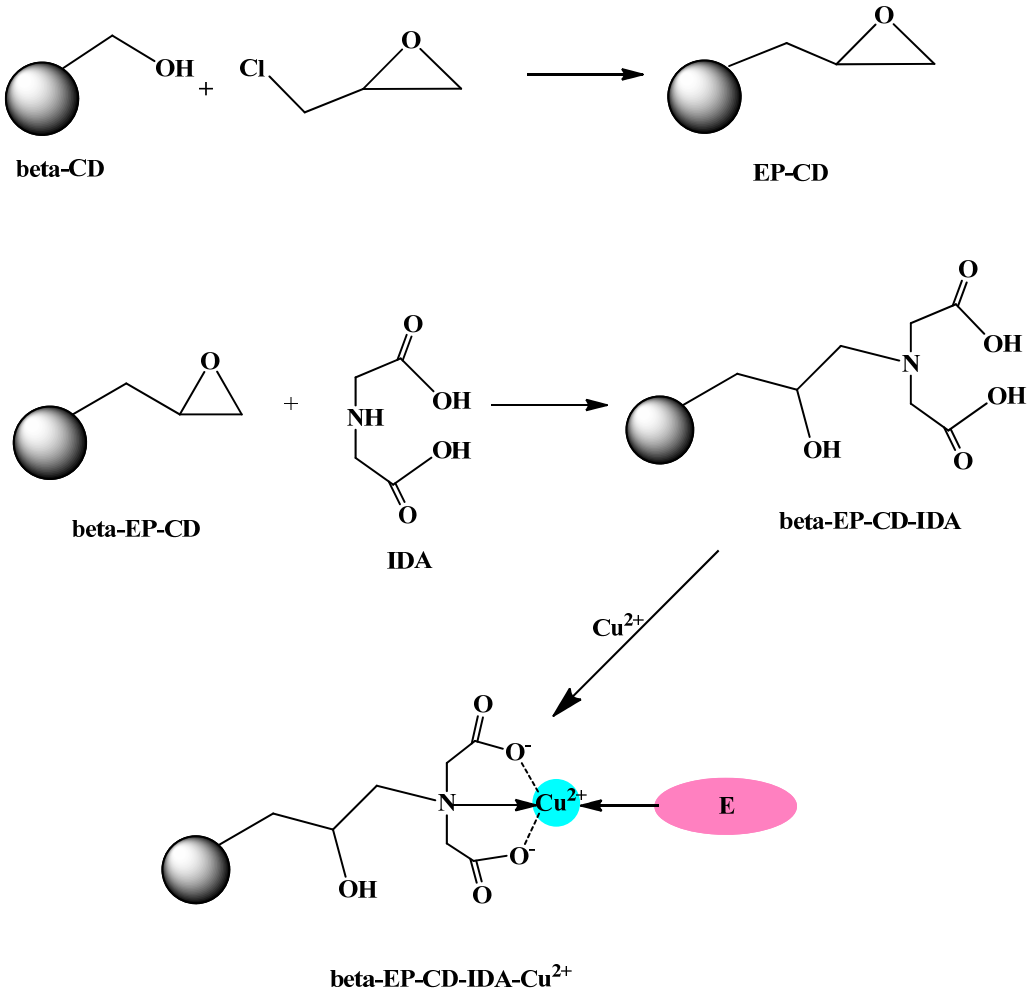
Şekil 4.30'de gösterildiği gibi β-CD-HMDI tutuklanmış lipazın aktivitesi 4 °C'de fosfat tamponunda (50 mM, pH 7.0) depolandığı zaman 28 gün sonra % 88 olduğu, fakat tutuklanmış lipaz ise 9 gün sonra aktivitesinin % 50'sini yitirdiği ve 2 hafta sonrasında da başlangıç aktivitesinin tamamını kaybettiği görüldü. Depolama kararlılığı immobilize lipazı serbest lipazdan daha çok avantajlı yapar.



Şekil 4.30. Lipaz aktivitesinin depolama kararlılığı

4.2.3. Siklodekstrin-epiklorhidrin polimerlerine lipaz immobilizasyonu

EP-CD-IDA-Cu^{+2}'de CRL'ın adsorpsiyon deneyleri önceki bölümde bahsedildiği gibi CRL'ın 1 mg/mL ve 70 mg protein/mL olan ve 2.49 U/mL başlangıç aktiviteye sahip serbest lipaz kullanıldı.



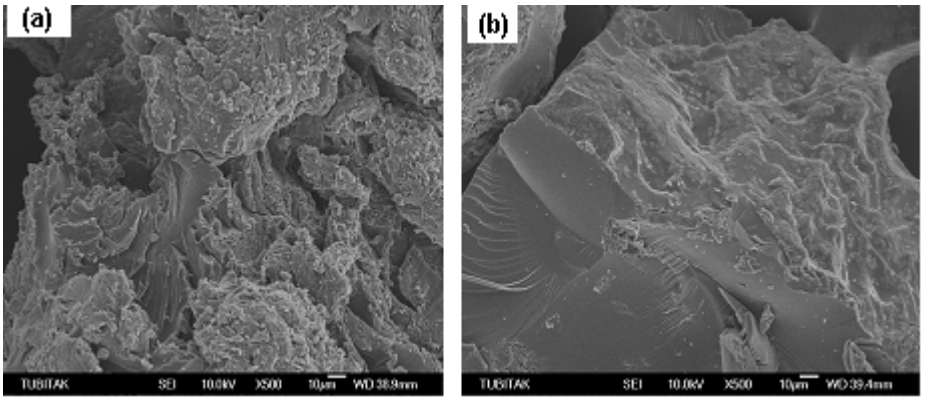
Şema 4.13. β-CD-EPC–IDA-Cu^{2+}destek maddesine lipaz immobilizasyonu

Çizelge 4.3'de optimum reaksiyon şartlarında serbest ve immobilize lipazın aktiviteleri gösterilmiştir. EP-CD–IDA-Cu^{2}'de bağlanan protein miktarı 0.266 mg/g ve aktivitesi 17.85 U/g'dir.

Çizelge 4.3. Optimum reaksiyon şartlarında serbest ve immobilize lipazların aktivitesi

	Yüklenen Protein (mg/g destek maddesi)	Bağlanan Protein (mg/g destek maddesi)	Lipaz Aktivitesi (U/g destek maddesi)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Kazanılan Aktivite (%)[a]
Serbest lipaz	-	-	2.49[b]	35.6[c]	-
İmmobilize lipaz	0.63	0.266	17.85	67.1	79.7

[a]Kazanılan Aktivite (%): (immobilize lipazın toplam aktivitesi/immobilizasyon için kullanılan serbest lipazın toplam aktivitesi) x 100.
[b]Serbest lipazın aktivitesi mL'de (1 mg/mL) alındı.
[c]Bradford metoduna göre ticari toz lipazın protein yüzdesi % 7'dir.

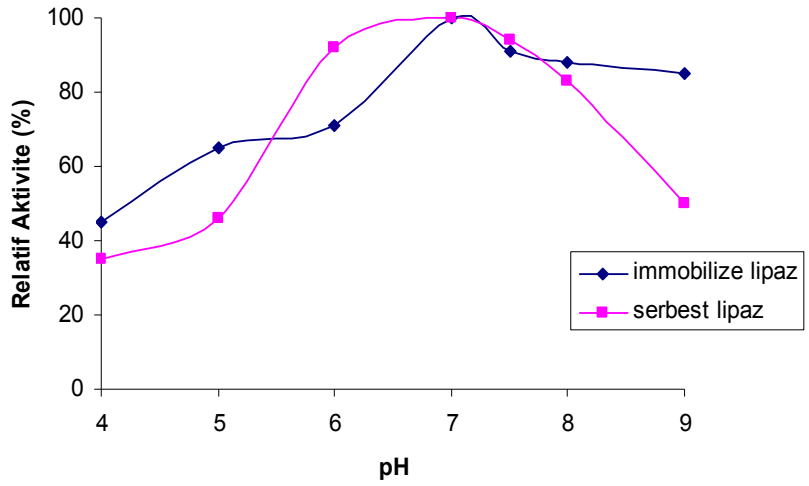


Şekil 4.31. SEM fotoğrafları (IDA etkileştirilmiş destek maddesi (a) ve immobilize lipaz (b)) (x 500)

İmmobilize lipaz ile IDA etkileştirilmiş destek maddesinin SEM görüntüleri karşılaştırıldığında (Şekil 4.31), IDA ile etkileştirilmiş destek maddesinin düzensiz yüzey boşlukları, enzim immobilizasyonundan sonra daha çok düzgün yüzeye sahip olduğu görüldü.

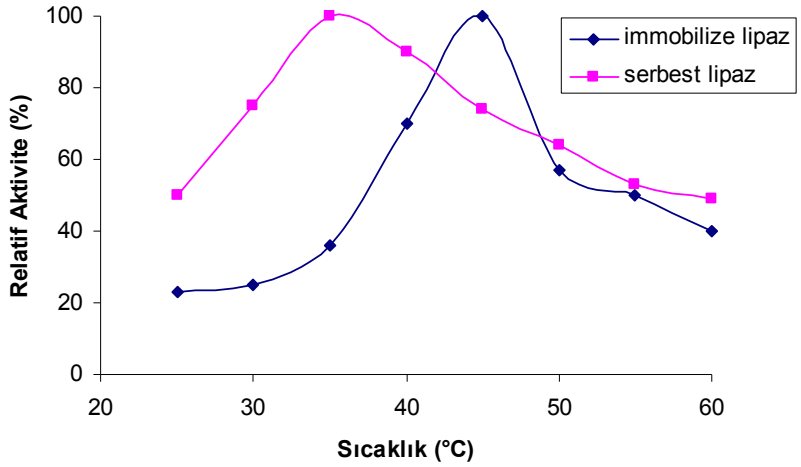
4.2.3.1. Aktiviteye pH ve sıcaklığın etkisi

İmmobilize lipazın katalitik aktivitesi farklı pH değerlerinde incelendi. pH sulu çözeltide enzim aktivitesini değiştiren en önemli faktörlerden biridir. İmmobilizasyon katalitik aktiviteyi değiştirebilen enzimin konformasyonal değişikliğiyle sonuçlanırken matriksin optimum pH gibi özelliklerde etkiler (Cao 2006).



Şekil 4.32. Lipaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Şekil 4.32'de görüldüğü gibi serbest ve immobilize enzimde pH 7'de maksimum enzim aktivite gözlendi. Bu sonuç bize adsorpsiyon süresince enzim üzerinde çok fazla bir değişikliğin olmadığını gösterdi (Öztürk ve ark. 2007). Bu bağlama metodunun prensibi protein yüzeyindeki aspartik asit (Asp), glutamik asit (Glu), histidin (His), sistein (Cys) veya lisin (Lys) gibi amino asitlerin fonksiyonel grupların koordinasyonu sağlaması esasına dayanır. Özellikle His'nin imidazol grubu, Cys'in tiyol grubu ve triptofan (Trp)'ın indol grubunun metal iyonları koordine bağ yapması immobilizasyona en büyük katkıyı sağladığı bulunmuştur (Hemdan et al. 1989; Jiang & Hearn 1996; Tishchenko et al. 2003).



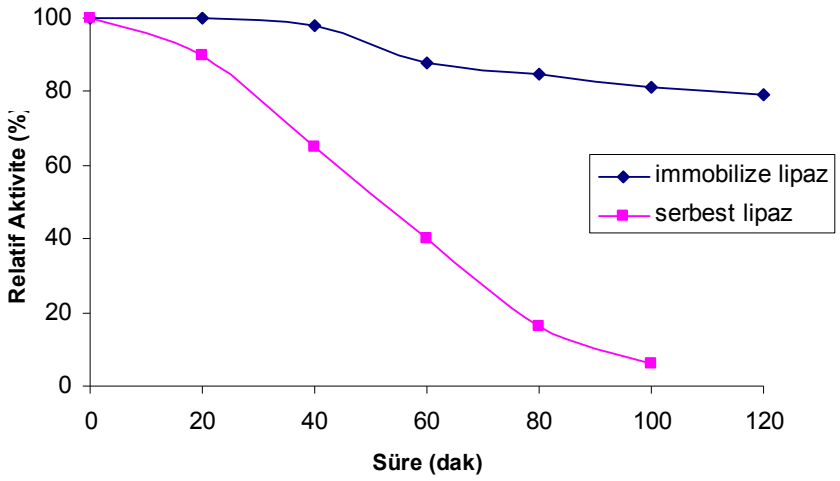
Şekil 4.33. Lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

pH 7'de serbest ve immobilize lipazların aktivitesi 25-60 °C aralığındaki sıcaklıklarda test edildi (Şekil 4.33). İmmobilizasyon lipaz aktivitesini serbest enzim için olan 35 °C'den 45 °C'e kaydırdığı gözlendi. Destek maddesi ve enzim arasındaki çoklu noktadan etkileşimin sonucu olarak ya enzim hareketinde konformasyonal sınırlamalar ya da yüksek sıcaklıklarda substrat difüzyonunu artırmaktadır. Enzim immobilizasyonunda benzer bir yorum Ye ve ark. (2005, 2007) tarafından yapılmıştır.

4.2.3.2. Termal kararlılık

60 °C'de serbest ve immobilize lipazın termal kararlılığı Şekil 4.34'de gösterildi. Serbest veya immobilize lipaz 60 °C'de 2 saat inkübe edildi ve enzim aktivitesi çeşitli zaman aralıklarında ölçüldü. Bu ölçme enzim çözeltisi 30 °C'e getirildikten sonra yapıldı. Serbest lipaz 60 °C'de 80 dak civarında başlangıç aktivitesini kaybederken, immobilize lipaz 60 °C'de sıcaklıkta 120 dk sonra başlangıç aktivesini % 79 civarında koruduğu gözlendi. İmmobilize bir enzimin termal kararlılığında yapılan iyileşmeler yüksek sıcaklıklarda enzimin

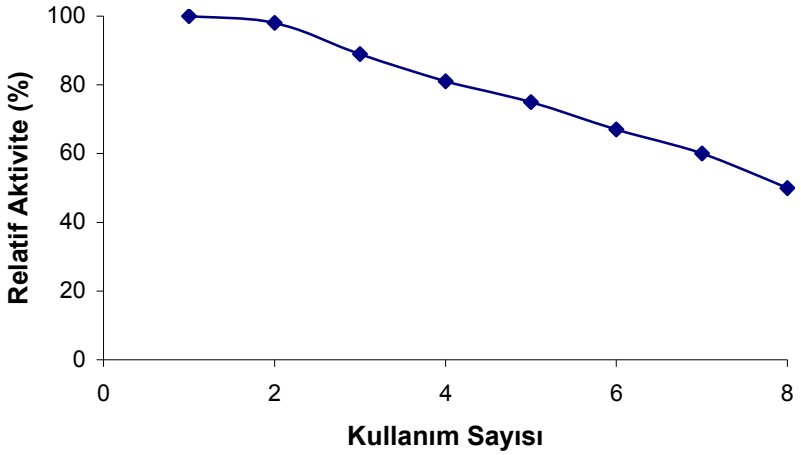
konformasyonal geçişini önleyerek destek maddesi ve enzim arasında etkileşimi yansıtır.



Şekil 4.34. Serbest ve immobilize lipazın termal kararlılığı

4.2.3.3. Tekrar Kullanılabilirlik

İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği ekonomik açıdan çok önemlidir. Kararlılığı artırmak immobilize enzimin serbest enzimden daha çok fazla avantajlar sağlayabilir. Tekrar kullanımı incelemek için, immobilize enzim standart ölçüm koşullarında arka arkaya 8 kez *p*-NPP'ın hidrolizinde kullanıldı ve aktivesindeki değişim gözlendi. Şekil 4.35'de 8 kez tekrar kullanımdan sonra immobilize lipaz aktivitesinin % 50'sinden daha fazlasını sürdürüldüğü gözlendi. İmmobilize enzimin reaksiyon kararlılığının ve tekrar kullanılabilirliğinin artırılması endüstriyel uygulamalarda başarılı sonuçların ortaya çıkabileceğini gösterir.



Şekil 4.35. İmmobilize lipazın tekrar kullanılabilirliği

Çizelge 4.4. CRL bağlı EP-CD-IDA-Cu^{+2} adsorbentinde desorpsiyon performansının değerlendirilmesi

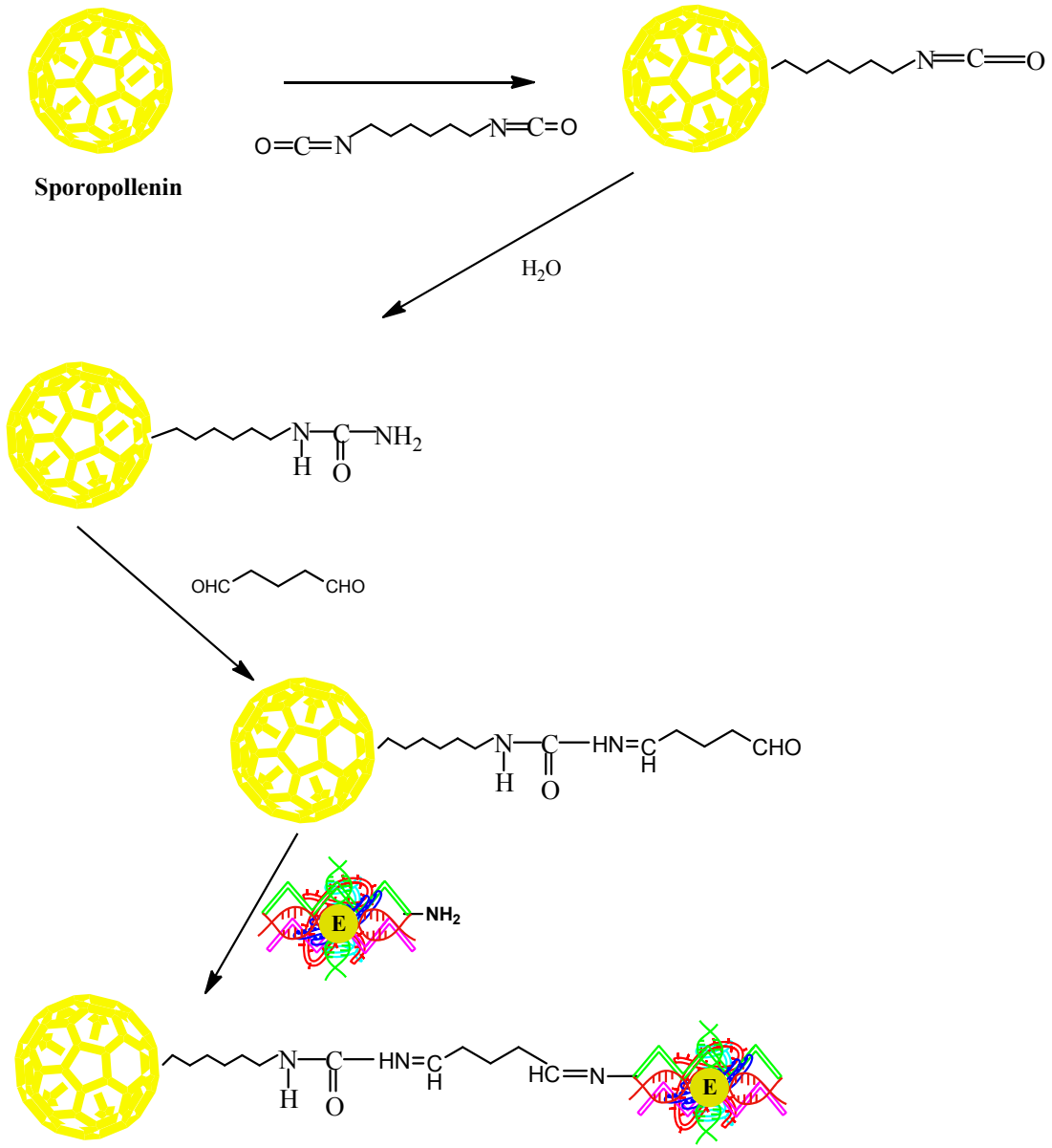
Lipaz aktivitesi (U/g destek maddesi)	İmidazol ile desorpsiyondan sonra, lipaz aktivitesi (U/g destek maddesi)	Desorpsion (%)
17.85	1.26 ± 0.20^{a}	93

[a]Üç ölçümün standart sapması anlamına gelir (±)

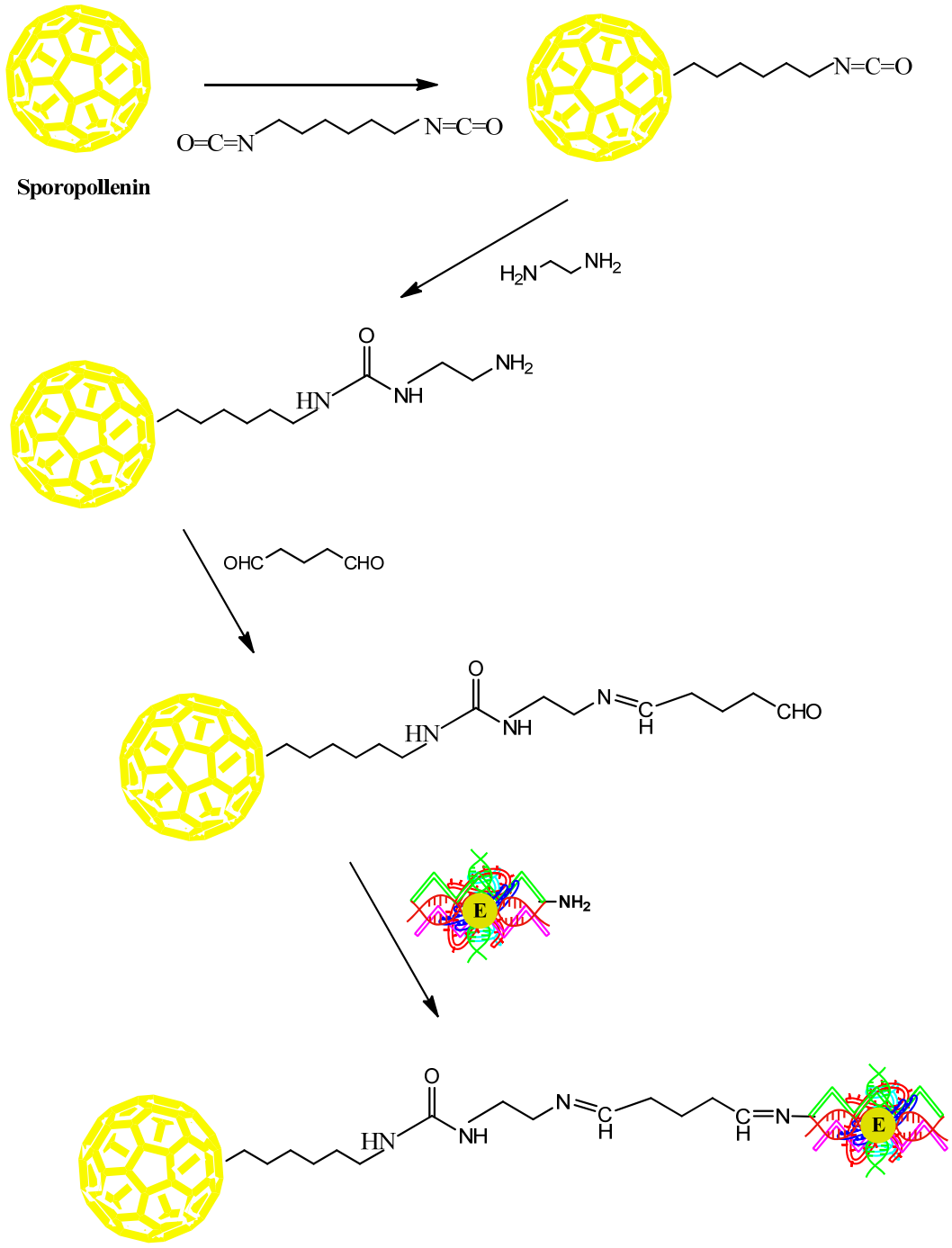
Bu çalışmada destek materyaline adsorbe edilen lipazın desorpsiyonu incelendi (Çizelge 4.4). Bu destek maddesi yıkama çözeltileri olarak imidazol kullanılarak kolaylıkla rejenere edildi. Cu^{+2} ile koordinasyon için imidazol ile CRL yarışır, sonunda tersinir bir yolda enzimin yerine geçmektedir. Bu sonuçlar göstermiştir ki CRL'ın başarılı bir şekilde EP-CD-IDA-Cu^{+2} destek materyaline adsorbe edilir ve bir imidazol çözeltisi ile yıkanarak desorbe edilir. Böylece aktivitesini kaybetmiş enzim destek materyalinden giderilir ve yeniden kullanılabilir duruma getirilir.

4.2.4. Sporopollenin destek maddesine lipaz immobilizasyonu (kovalent bağlanma)

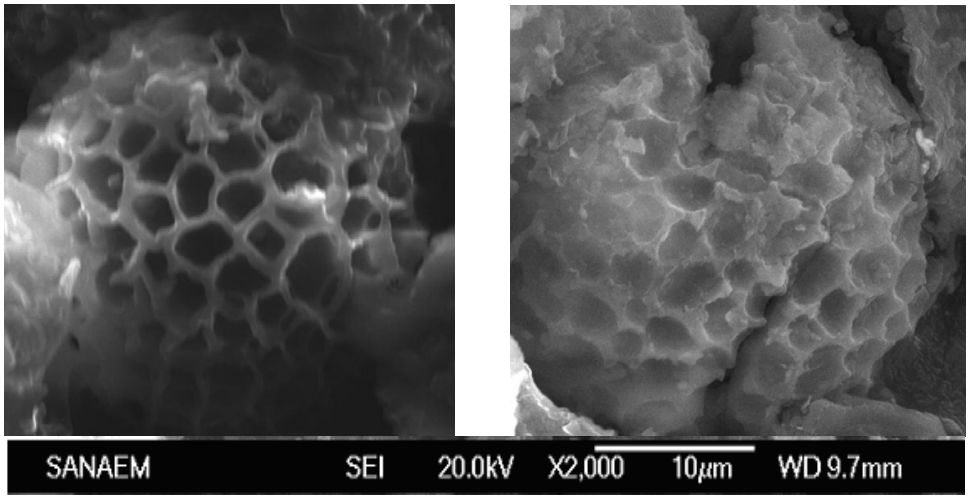
Daha önceki bölümde hazırlama prosedürü anlatılan bir biyopolimer olan sporopollenin uygun şekilde A ve B metoduna göre glutaraldehit ile fonksiyonlandırıldıktan sonra lipaz immobilize edilip, aktiviteleri belirlenerek, serbest lipaza göre termal kararlılık, tekrar kullanılabilirlik, optimum pH ve optimum sıcaklık gibi parametreler incelendi (Şema 4.14-4.15) .



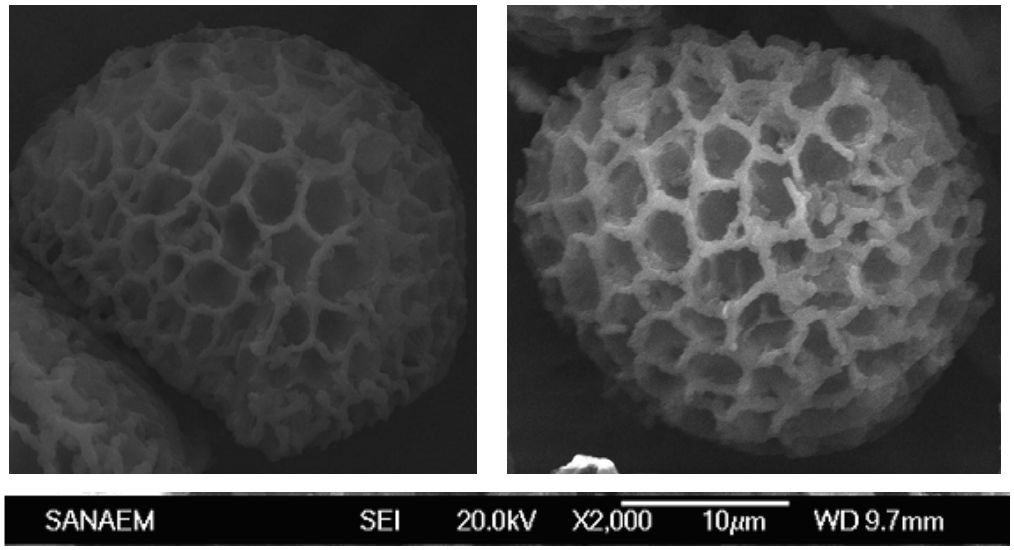
Şema 4.14. Sporopollenin'e Lipaz İmmobilizasyonu (Metot A)



Şema 4.15. Sporopollenin'e Lipaz İmmobilizasyonu (Metot B)



Spo-HMDI-su-GA (a) Spo-HMDI-su-GA-E



Spo-HMDI-ed-GA (b) Spo-HMDI-ed-GA-E

Şekil 4.36. Sporopollenin destek maddelerinin immobilizasyondan önceki ve sonraki SEM görüntüleri (a-b)

Polimerlerin lipaz immobilizasyonunda önce ve sonraki yüzey yapılarını incelemek için SEM analizleri yapıldı. Metot A'ya göre glutaraldehit ile immobilize edilen ve metot B'ye göre glutaraldehit ile immobilize edilen (Spo-HMDI-su-GA ve Spo-HMDI-ed-GA) polimerlerinin ve lipaz immobilizasyonundan sonraki Spo-HMDI-su-GA-E ve Spo-HMDI-ed-GA-E polimerlerinin SEM görüntüleri Şekil 4.36

(a-b)'de verildi. Lipaz immobilizasyonundan sonra polimerdeki gözenek yapısının bir miktar değiştiği gözeneklerin bir miktar dolgulu hale geldiği gözlendi.

Çizelge 4.5. Optimum reaksiyon şartlarında serbest ve immobilize lipazların aktivitesi

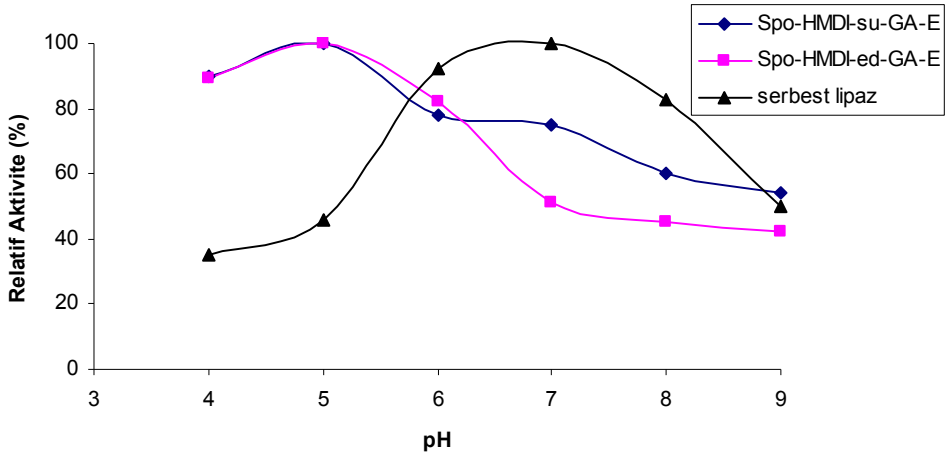
	Bağlanan Protein (µg/g)	Bağlanan Protein Yüzdesi (%)	Lipaz Aktivitesi (U/g destek maddesi)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Aktivite Verimi (%)
Serbest lipaz	-	-	2.49[a]	35.60	100
Metot A Spo-HMDI-su-GA-E	6.8	64	75	11	30.9
Metot B Spo-HMDI-ed-GA-E	7.5	72	105.4	14	39.3

[a]Serbest lipazın aktivitesi mL'de (1 mg/mL) alındı.

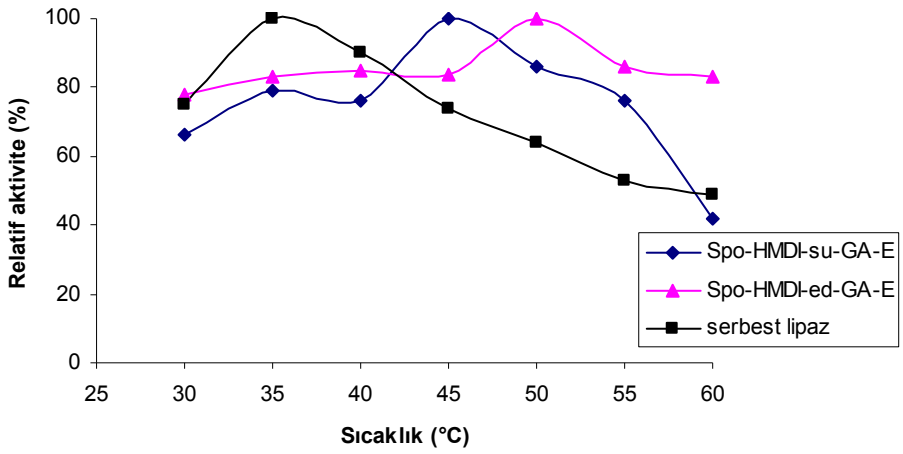
İmmobilize lipazların serbest lipaza göre aktiviteleri Çizelge 4.5'de özetlendi. Spo-HMDI-ed-GA-E destek maddesi immobilize lipaz aktivitesi Spo-HMDI-su-GA-E destek maddesiyle karşılaştırıldığında çok daha etkili olduğu bulundu. Spo-HMDI-su-GA-E'nin aktivite verimi % 30.9, aktivitesi 75 U/g iken Spo-HMDI-ed-GA-E'nin aktive verimi % 39.3 aktivitesi 105.4 U/g bulundu. Çizelge 4.5'e baktığımızda sporopollenin destek maddesine hekzametilendiizosiyanat bağlandıktan sonra etilendiaminle etkileştirildi (Metot B). Daha sonra glutaraldehit bağlandığında daha uzun bir zincire dönüştürülmüş bu ise enzim ile destek maddesi arasındaki sterik engeli azaltmıştır.

4.2.4.1. Aktiviteye pH ve sıcaklığın etkisi

Enzimatik reaksiyonlardaki önemli optimum şartlardan bir diğeri de pH'dır. İmmobilize lipazların optimum pH'ı, farklı pH'larda fosfat tamponu kullanılarak belirlendi ve serbest lipaz ile kıyaslandı. Şekil 4.37'de görüldüğü gibi serbest lipaz için optimum pH 7.0 iken immobilize lipazlar için optimum pH 5.0 olarak gözlendi. Daha öncede belirtildiği gibi pH enzimin aktivitesini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Bu pH farklılığı ise lipazın konformasyonu, kullanılan bileşiklerin yapısı, immobilizasyon metodu ve lipaz yüzeyindeki yük yoğunluğu ile ilgilidir. İmmobilizasyondan sonra enzimdeki asidik grupların sayısı bir miktar artmış ve polikatyonik bir görünüm kazanmıştır. Bu da lipazın pH'ını 7'den 5'e kaydırdığı gözlendi (Liu ve ark 2005).



Şekil 4.37. Lipaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

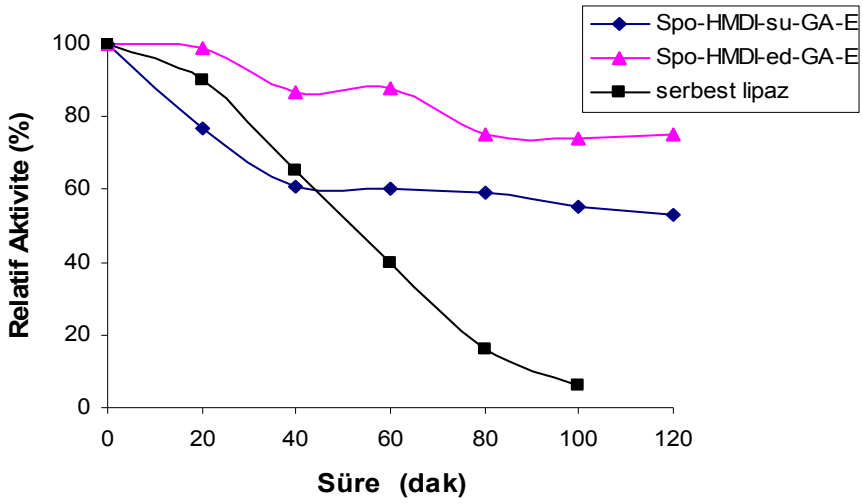


Şekil 4.38. Lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Enzimatik reaksiyonlarda optimum şartlar oldukça önemlidir. Serbest ve immobilize lipazlar için optimum sıcaklıklar belirlendi. Serbest lipaz ile enzimatik aktivite Şekil 4.38'de görüldüğü gibi maksimum 35 ^{o}C'de görüldü. Sporopollenin immobilize edilmesi durumunda ise optimum sıcaklık değişmiş ve Spo-HMDI-su-GA-E için 45 ^{o}C, Spo-HMDI-ed-GA-E için 50 ^{o}C olarak bulundu. Bu sıcaklık değişimi Spo-HMDI-ed-GA-E'nin lipaz ile etkileşim derecelerine, kullanılan bileşiklerin hidrofobikliğine ve lipazın konformasyonuna bağlıdır (Ting ve ark. 2006, Huang ve ark. 2007).

4.2.4.2. Termal kararlılık

Şekil 4.39 serbest ve immobilize lipazların sıcaklığa karşı dayanıklılığını yani termal kararlılığını göstermektedir.

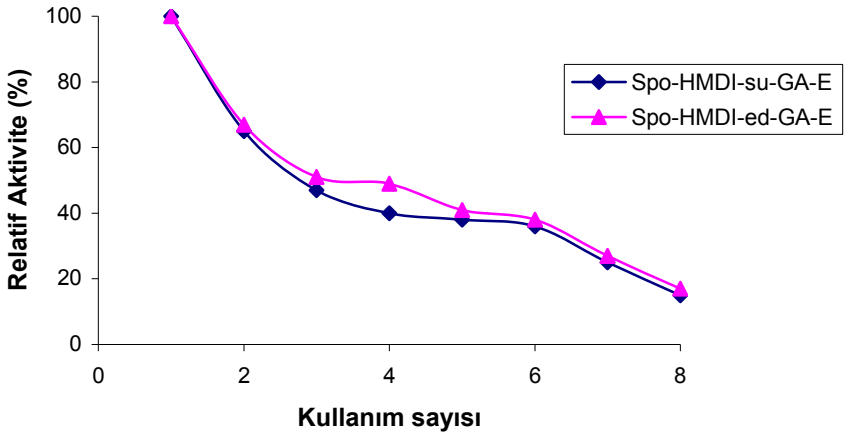


Şekil 4.39. Serbest ve immobilize lipazların termal kararlılığı

Serbest lipaz 100 dk. sonra yüksek sıcaklıkta (60 ^{o}C) bekletildiğinde aktivitesini yitirmektedir. Çünkü sıcaklığın artmasıyla enzimde konformasyon değişikliği olmakta (denatüre olmakta) ve enzimin aktif bölgesi zarar görmektedir. Ancak sporopollenin immobilize edilmesi durumunda lipaz moleküllü için sağlam bir yüzey oluşturmaktadır Bu yüzden grafikte de görüldüğü gibi sporopollenin'e immobilize lipazların termal kararlılığı serbest lipaza göre daha iyidir. İmmobilize lipazlar arasında Spo-HMDI-ed-GA-E'nin sıcaklığa karşı daha iyi kararlılık gösterdiği tespit edildi. Bu durum sporopollenin gözenekli yapısının ve enzimin çok noktadan bu destek materyaline tutunması ile konformasyonunu koruduğu şeklinde yorumlanabilir.

4.2.4.3. Tekrar kullanılabilirlik

İmmobilize edilen lipazın tekrar kullanım sayısını ölçmek amacıyla yukarda belirtilen metot kullanıldı. Serbest enzime göre immobilize enzimler birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.



Şekil 4.40. İmmobilize lipazların tekrar kullanılabilirliği

İmmobilize enzimin bu özelliği endüstriyel uygulamalarda çok önemlidir. Çünkü üretim maliyeti sürekli kullanıma bağlı olarak düşer. Sürekli kullanım ile enzim aktifliğinde bir değişim gözlendi. Şekil 4.40'da görüldüğü gibi kovalent bağlanma yöntemine göre immobilize edilen lipazlar sırasıyla (Spo-HMDI-su-GA-E ve Spo-HMDI-ed-GA-E) ise 8 kez kullanım sonunda aktiflikleri sırası ile % 15 ve % 17 düştüğü görüldü.

4.2.5. Sporopollenin destek maddesine lipaz immobilizasyonu (sol-jel tutuklama)

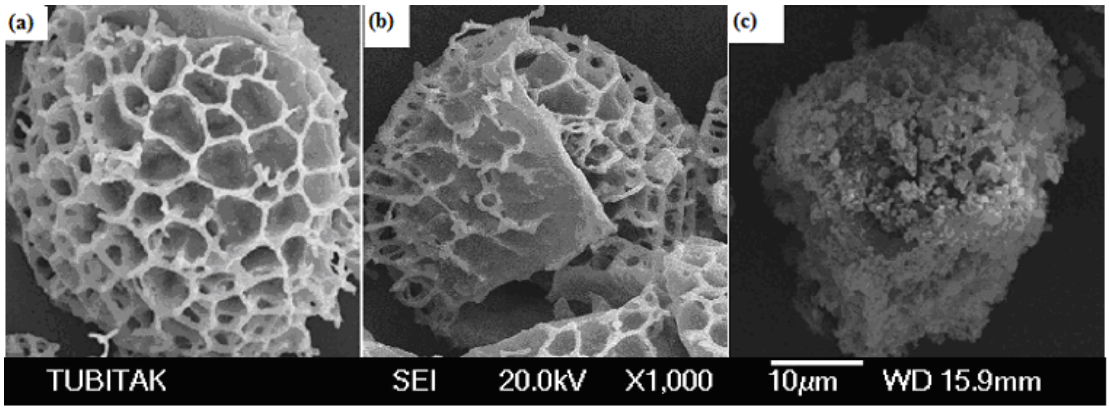
Sporopollenin gözenekli yapısı enzim tutuklama için uygun olacağı düşünülerek bu çalışmada sporopollenin sol-jel tutuklama metoduna göre enzim tutuklamada kullanıldı. Önceki yıllarda Paunov ve ark. (2007) moleküler kütlesi 1-116 kDa aralığındaki oligonükleotitler veya anti-AIDS, beta-laktaz, alfa-amilazın sporopollenin eksin partiküllerinde etkili bir şekilde enkapsüle yapılabileceğini göstermişlerdir.

Sol-jel tutuklama çalışmasında, genellikle katkı maddeler ile enzimin etkileşimi önemlidir. Denemeler göstermiştir ki sol-jel prosesinde isopropil alkol

varlığının önemli etkenlerdendir (Reetz ve ark., 2003). İsopropil alkol ve PVA bütün deneylerde genellikle kullanılmıştır.

Pteridophyta and spermatophyta'dan türeyen sporopolleninde IR ve ^{13}C NMR spektroskopik çalışmalar polimerik yapısında çeşitli kısımlarda alifatik, aromatik, hidroksil, karbonil/karboksil ve eter fonksiyonları gözlenmiştir (Faber ve ark., 1993). Bu çalışmada sporopollenin ve aktive edilmiş sporopollenin *Candida rugosa* lipaz için uygun adsorbentler olarak seçildi. Sporopollenin Paunov ve ark.'ın (2007) metoduna göre aktive edildi. Bu metod güçlü asit ve baz kullanarak yapılan ekstraksiyon prosedürüdür. Ekstraksiyondan sonra eksinler sporlar olarak aynı şekilde kalırlar ve enkapsülasyon için kullanılabilen boş bir kabuk oluştururlar.

Kullanılan sporopollenin gözenekli enzim için çok büyük olduğundan (25 μm) tutuklama metodu ile daha yoğun enzim bu gözeneklere tutuklanır diye düşünüldü. Buna göre *Candida rugosa* lipaz katkı maddesi olarak sporopollenin veya aktive edilmiş sporopollenin varlığında ve yokluğunda oktiltrietoksisilan (OTES) ve tetraetoksisilan (TEOS) ile polikondansasyonla hazırlanarak kimyasal olarak inert sol-jel prosedürüne göre immobilize edildi.



Şekil 4.41. SEM fotoğrafları: sporopollenin (a), aktive olmuş sporopollenin (b) ve tutuklanmış lipaz (c)

SEM fotoğrafı, sporopollenin, aktive edilmiş sporopollenin ve tutuklanmış lipaz arasındaki morfolojik farklılıkların doğrulamaktadır (Şekil 4.41). Destek maddesi için mikrokapsül çok büyük bir iç boşluğu sahiptir. Aktive edilmiş prosesten

sonra sporopolleninin gözenek yapısı bozulmaktadır (Şekil 4.41b). Tutuklamadan sonra sporopollenin'nin yüzey boşluğu lipaz ile ve diğer materyaller ile doldurulmuş olduğu görülmektedir (Şekil 4.41(c)).

Çizelge 4.6. Optimum reaksiyon şartlarında serbest ve immobilize lipazların aktivitesi

	Tutuklanmış protein (mg/g)	Tutuklanmış protein yüzdesi (%)	Lipaz aktivitesi (U/g support)	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Aktivite verimi (%)
Tutuklanmış lipaz[a]	28.56	58.4	95.1	3.32	100[b]
Tutuklanmış lipaz (Spo-E)	24.0	57.14	71.0	2.95	88.8
Tutuklanmış lipaz (Spo_{act}-E)	33.3	79.33	68.4	2.05	61.74

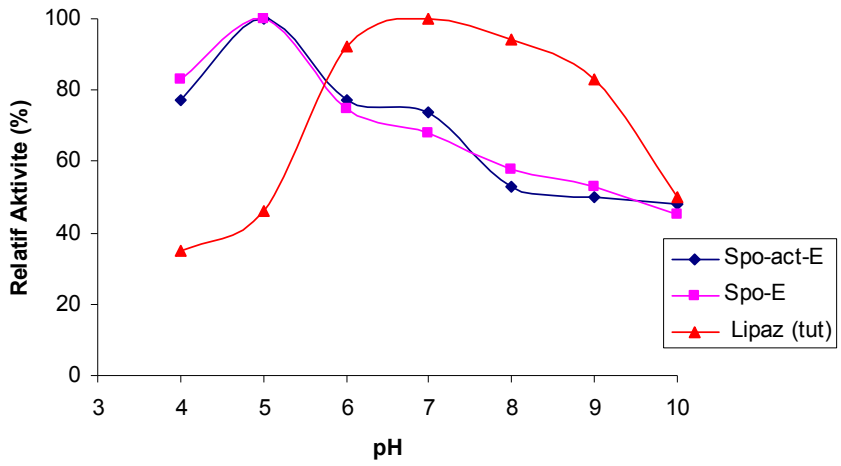
a) Sporopollenin kullanmadan tutuklanmış lipaz
b) Serbest lipaz için aktivite verimi % 100 olarak alındı.

Çizelge 4.6'da tutuklanmış lipazların aktivitesi görülmektedir. Bununla birlikte sporopollenin ile tutuklanmış lipaz (Spo-E) aktive edilmiş sporopollenin tutuklanmış lipaza (Spo_{act}-E) kıyasla daha çok etkili olduğu bulundu. Spo-E'nin aktivite verimi % 88.8 ile aktivitesi 71 (U/g destek maddesi) iken Spo_{act}-E'nin aktivite verimi % 61.74 ile aktivitesi 68.4 (U/g destek maddesi) olarak bulundu.

4.2.5.1. Aktiviteye pH'ın etkisi

Tutuklanmış lipazların katalitik aktivitesi farklı pH'larda (4.0-10.0) *p*-NPP'ın hidrolizinde incelendi. Sporopollenin kullanılarak sol-jel metoduna göre immobilize lipazlar ile katalizlenmiş reaksiyonların optimum pH bir miktar asidik bölgeye

kaydığı gözlendi. Genellikle optimum pH'da bir asidik kayma immobilize enzimin polikatyonik bir yapıya geçmesinden kaynaklanır (Faber ve ark. 1993).



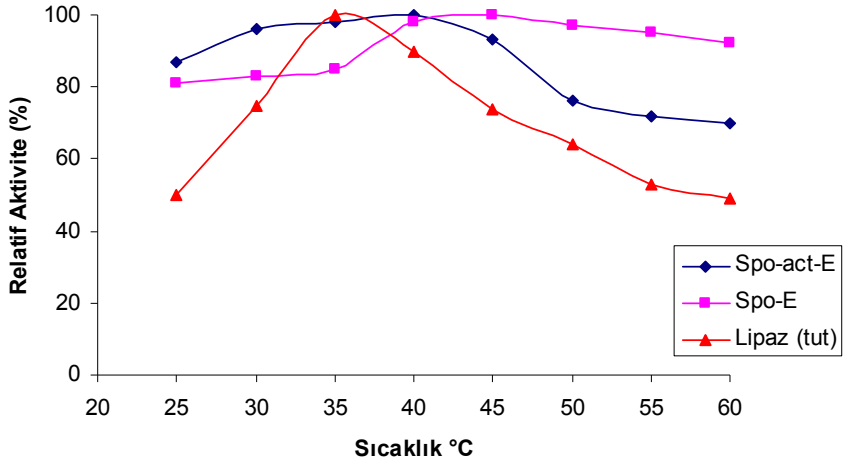
Şekil 4.42. Lipaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Şekil 4.42'de görüldüğü gibi tutuklanmış lipazların (Spo-E ve Spo_{act}-E) optimum pH'ı 5.0'dır. İmmobilizasyondan sonra enzimdeki asidik gruplarının sayısı bir miktar artmış ve polikatyonik bir görünüm kazanmıştır. Spo-E ve Spo_{act}-E tutuklanmış lipazlar iyi pH kararlılığı ve asidik çevrelere karşı daha dirençlilik gösterdi. Pereira ve ark. (2001) Sırasıyla immobilize lipaz ve serbest lipazın optimum pH'ın 6.0 ve 7.0 olarak bulmuşlardır. pH kayması başlıca enzim ve destek maddesinin etkileşimine ve immobilizasyona bağlıdır. Polivinil alkol mikroküreciklerinde immobilize edilen *Candida rugosa* lipaz için optimum pH'ın bir değişikliğide Oh ve ark. (2007) tarafından gözlenmiştir.

4.2.5.2. Aktiviteye sıcaklığın etkisi

Tutuklanmış lipazların sıcaklığa etkisi Şekil 4.43'de verildi. pH 7'de 25–60 ◦C sıcaklık aralıklarında *p*-NPP hidrolizi için tutuklanmış lipazların aktivitesinin

sıcaklığa karşı etkisi Şekil 4.43'de gösterildi. Tutuklanmış lipaz için optimum sıcaklık yaklaşık olarak 35 °C iken Spo-E tutuklanmış lipaz için 40 °C ve Spo_{act} -E tutuklanmış diğer lipaz için de 45 °C olduğu bulundu.

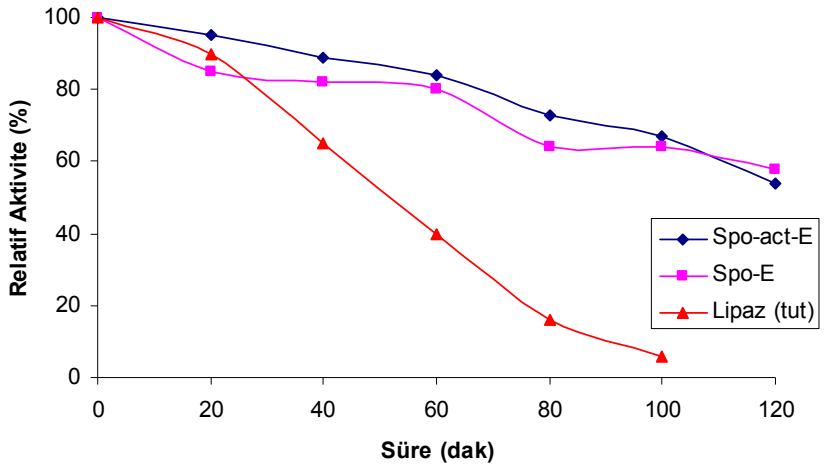


Şekil 4.43. Lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Buna ilaveten tutuklanmış lipazların sıcaklık profilleri sporopollenin olmadan tutuklanmış enzimden daha geniş aralıktadır. İmmobilizasyon metotlarının daha geniş bir sıcaklık aralığının üzerinde enzim aktivitesini koruduğu anlamına gelmektedir. Enzim immobilizasyonu için temel sebeplerden biri immobilizasyon izlenerek moleküllerin sınırlı konformasyonal hareketliliğinden dolayı çeşitli deaktive edici güçlere karşı stabilitede artış beklenmektedir (Arıca 2000; Arıca ve Bayramoğlu 2004; Phadtare ve ark. 2004). Bu durum ya destek maddesi ve enzim arasındaki hidrojen bağ oluşumu ve elektrostatik etkileşimin sonucu olarak enzim hareketinde konformasyonal sınırlamanın yaratılmasından ya da yüksek sıcaklıklarda substratın difüzyonunda düşük bir sınırlamadan kaynaklanır. Böylece immobilize enzimler daha yüksek sıcaklıklarda katalitik aktivite gösterirler (Ye ve ark., 2005). Literatürde optimum sıcaklıktaki benzer değişikler gözlenmiştir (Ye ve ark., 2007).

4.2.5.3. Termal kararlılık ve tekrar kullanılabilirlik

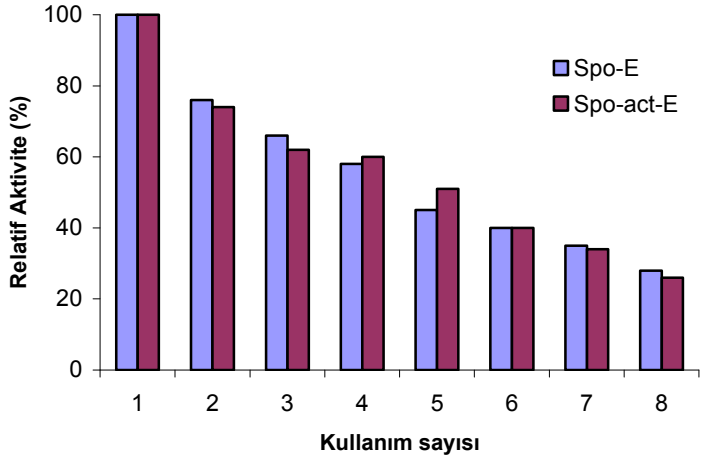
Şekil 4.44'de tutuklanmış lipazların termal kararlılığı görülmektedir. Tutuklanmış lipazlar 60 °C'de 2 saat inkübe edildi ve enzim aktivitesi çeşitli zaman aralıklarında ölçüldü. Sporopollenin kulllanılmadan tutuklanmış lipaz başlangıç aktivitesini 60 °C'de 80 dk civarında kaybederken, tutuklanmış lipazlar 60 °C'de 120 dk sonra başlangıç aktivitesinin % 54 (Spo-E) ve % 58 (Spo_{act}) civarında korumuşlardır.



Şekil 4.44. Tutuklanmış lipazların termal kararlılığı

Enzimlerin kullanım proseslerinde sık sık enzimin termal bozunmasının problemiyle karşılaşılır. Yüksek sıcaklıklarda, enzim kovalent olmayan etkileşimlerin sıcaklığın neden olan yıkımı ile kısmen bozunurlar (Dave ve Madamwar 2006; Luckarift ve ark. 2004). İmmobilize lipazın sıcaklığa karşı direnci enzimin pratik uygulamaları için önemli bir potansiyel avantajdır. Lipazın termal kararlılığı açıkca yapısı ile ilgilidir (Zhu ve ark. 2001). Bu çalışmanın yüksek sıcaklıklarda enzimin konformasyonal geçişini önleyebilen enzim ve destek maddesi arasındaki etkileşimden dolayı immobilize lipazın termal kararlılığı serbest enzimden daha yüksektir.

İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği ekonomik olarak çok önemlidir ve kararlılıktaki bir artış immobilize enzimi serbest olandan daha çok avantajlar sağlayabilir. Tekrar kullanılabilirliği araştırmak için immobilize enzimler her kullanımdan sonra PBS içerisinde (50 mM, pH 7.0) yıkandıktan sonra diğer hidroliz işlemleri için *p*-NPP çözeltisi içerisinde tekrar alındı. Şekil 4.45'de gösterildiği gibi tutuklanmış lipazların aktiviteleri 8 kullanımdan sonra orjinal aktivitelerinin % 28 (Spo-E) ve % 26 (Spo_{act}-E) seviyelerinde olduğu gözlendi. Bu teknik kullanılarak immobilize lipazın uzun süreli reaksiyon kararlılığı gerektiren endüstriyel uygulamalar için kullanılabileceği anlaşılmaktadır. İmmobilize enzimlerin aktivitesi tekrar kullanım sayısında artış ile azaldı. Bu sonuçlar kullanımdaki destek maddesinden proteinin sızıntısı ve proteinin denatürasyonu ile enzimin aktifsizliği ile açıklanabilir.

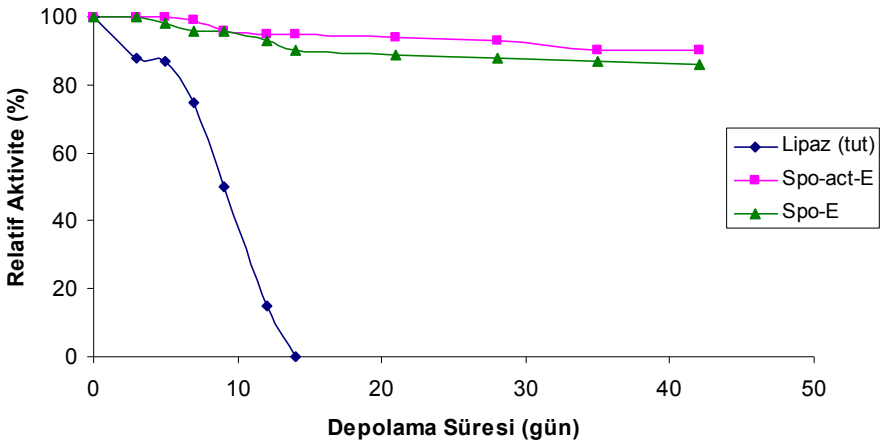


Şekil 4.45. İmmobilize lipazların tekrar kullanılabilirliği

4.2.5.4. Depolama Kararlılığı

Şekil 4.46'a baktığımızda sporopollenin tutuklanmış enzimlerin depolama kararlılığının tutuklanmış lipaza göre açıkca daha iyi olduğu görülür. Böylece destek maddesi ve immobilizasyon tekniği tutuklanmış lipazdan daha uzun raf ömrü

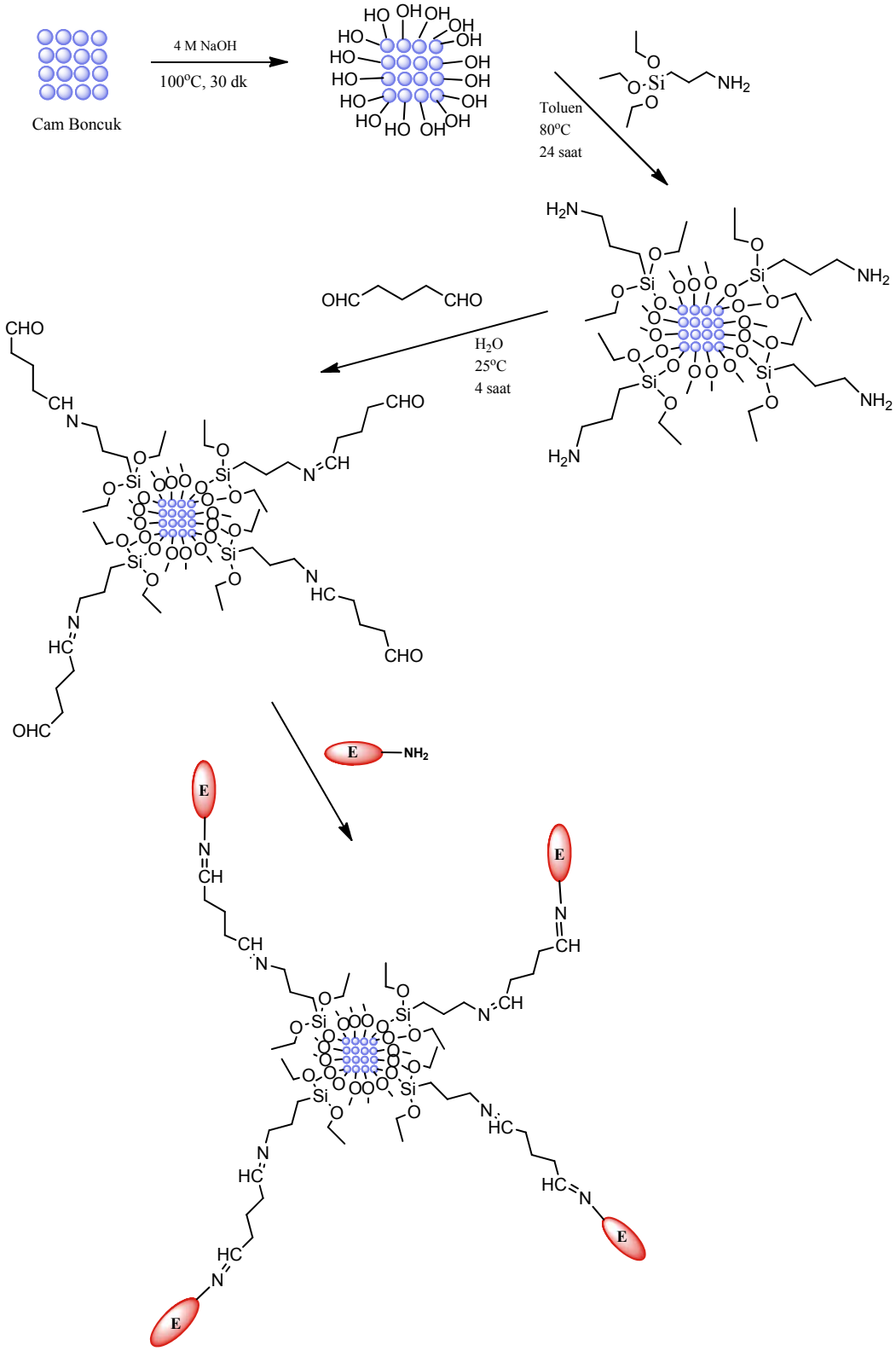
sağlamaktadır (Abrol ve ark. 2007). Aktif merkezin konformasyon değişikliğine yol açan enzimin üç boyutlu yapısındaki değişikler ile açıklanabilir. Enzimin aktif merkezi için substratın ulaşılabilirliği ve enzimin aktif bölgesinden veya ürün ve substratın kütle transferinin sınırlanmasından da sorumlu olabilir. Bu açıklamalar ile ilgili sonuçlar araştırılmıştır (Li ve ark., 2007). Belirli sıcaklıktaki bir zaman periyodu için depolama yeteneği immobilize lipazlar kullanıldığı zaman düşünülebilen anahtar faktörlerden biridir. Her iki lipazda 4 °C'de depolandığı zaman % 100 aktivite gösterdi. Genellikle enzimler muhtemelen düşük sıcaklıklarda tutulduğu zaman aktivitelerini daha çok korurlar. Çünkü katalitik olarak aktif olan orjinal konformasyonu için kilitlemeye eğilimlidir. Sporopollenin olmadan tutuklanmış enzim hızla 12 gün sonra % 15 kalan bir değerle aktivitesini kaybederken, aktivitedeki bu düşüş tutuklanmış lipazlar ile daha yavaş olmaktadır ve aynı zaman sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık %95 (Spo-E) ve % 93 (Spo_{act}-E)'ünü geride kaldığı gözlendi. Geride kalan kararlılık destek maddesi için enzimin çoklu bağlanması ile ilgilidir.



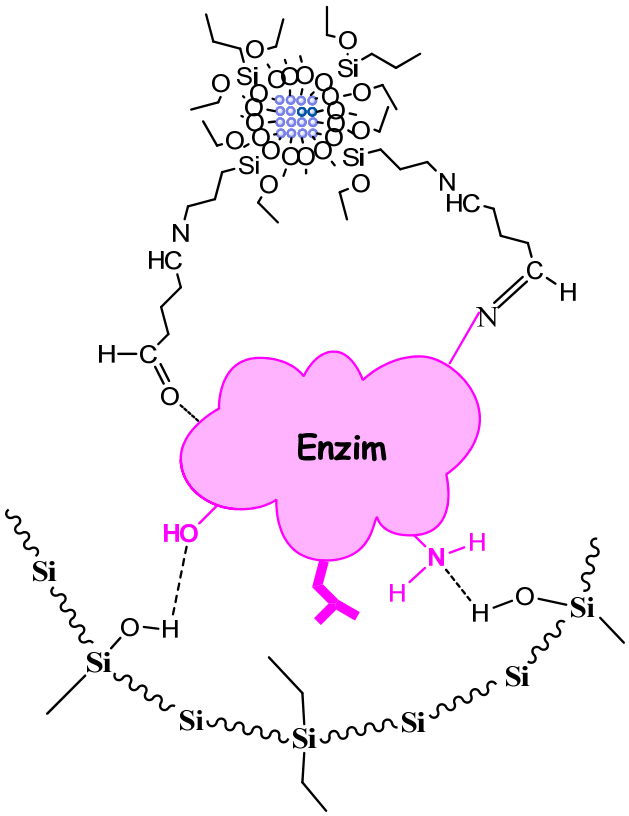
Şekil 4.46. Lipaz Aktivitesinin Depolama Kararlılığı

4.2.6. Cam boncuklara lipaz immobilizasyonu (kovalent bağlama ve sol-jel tutuklama)

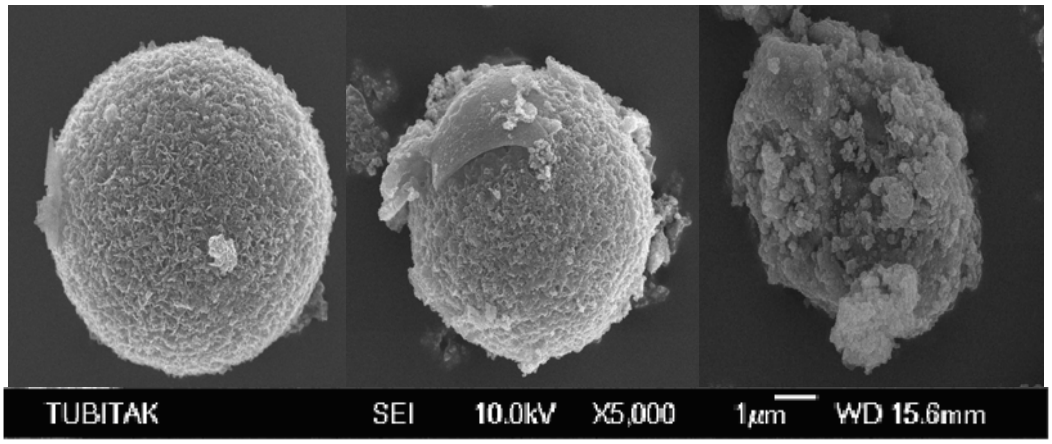
Bu çalışmada *Candida rugosa* lipaz başarılı bir şekilde fonksiyonlandırılmış cam boncuklara hem kovalent hemde sol-jel tutuklama metoduyla immobilize edildi (Şema 4.16-4.17). Cam boncuklardaki immobilize lipaz karakterizasyonu incelendi. İki metodun avantaj ve dezavantajları karşılaştırıldı. Birçok araştırmacı cam boncuklar ile ilgili çok sayıda çalışma yapmışlardır (Ikediobi ve ark. 1998; Desai ve ark. 2004; Wu ve ark. 2006; Queiroz ve ark. 2006; Bhushan ve ark. 2007; Bhushan ve ark. 2008; Yong ve ark. 2008; Karakuş ve ark 2009).



Şema 4.16. Cam boncuklara lipaz immobilizasyonu (Kovalent bağlama)

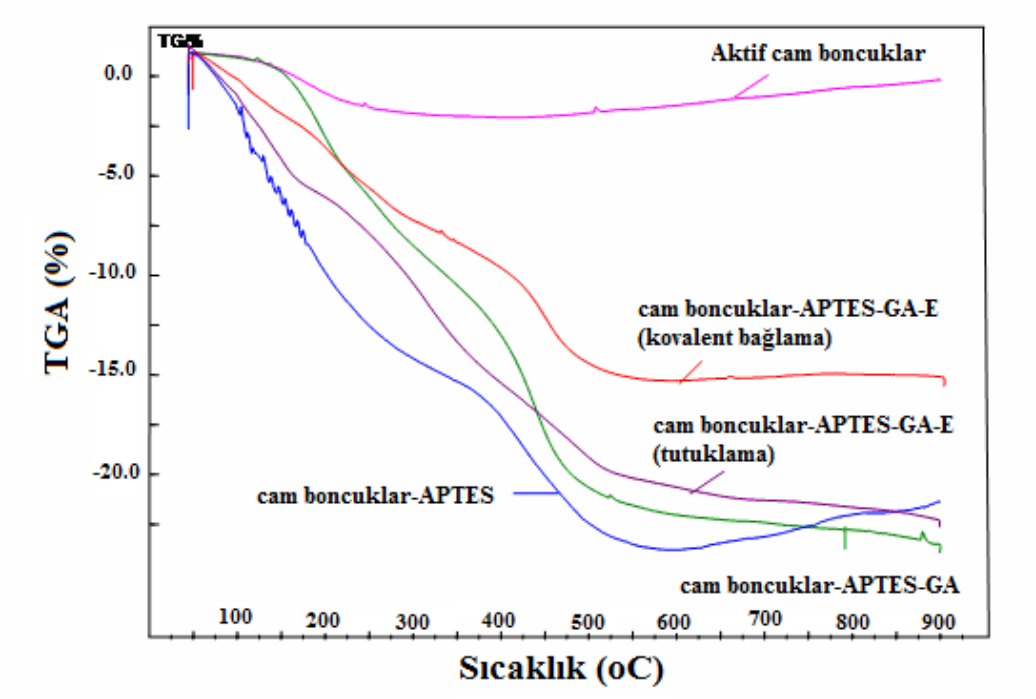


Şema 4.17. Sol-jel metodu ile cam boncuklara lipaz immobilizasyonu

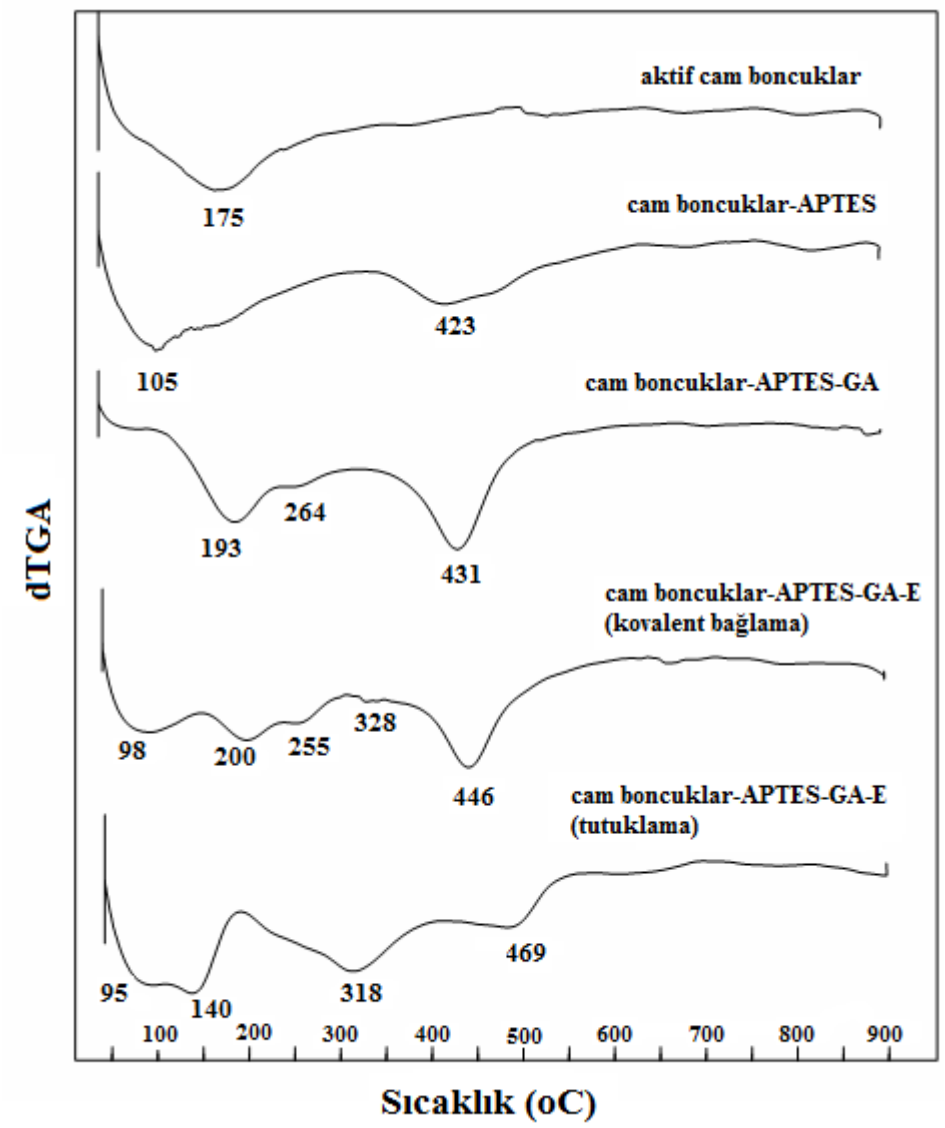


Şekil 4.47. SEM fotoğrafları (Cam boncuk, Cam boncuk-APTES-GA-E_{kov} ve Cam boncuk-APTES-GA-E_{tut})

Sırasıyla aktive edilmiş cam boncuklar, Cam boncuk-APTES-GA-E_{kov} ve Cam boncuk-APTES-GA-E_{tut} Şekil 4.47'de sırasıyla gösterilmiştir. Yüzey modifikasyonu başarıyla olduğu bu küreciklerin SEM fotoğrafından anlaşılmaktadır. Cam boncuk-APTES-GA'in yüzeyine enzim immobilize edildikten sonra yuvarlağımsı yüzey değişmiştir ve homojenlik azalmıştır.



(a)



(b)

Şekil 4.48. Aktive edilmiş cam boncukların ve immobilize lipazların TGA (a) ve DTG (b) termogramı

Şekil 4.48'de aktive edilmiş cam boncukların ve immobilize lipazların TGA ve DTG'sı gösterilmiştir. Enzim bağlanmadan önceki kısım bölüm 4.1.6.1'de anlatıldı. Kovalent yöntemine göre Cam boncuk-APTES-GA-E'in en önemli ağırlık kayıpları 98 ^{o}C, 200 ^{o}C ve 446 ^{o}C'de olmaktadır. Tutuklama metoduna göre yapılan Cam boncuk-APTES-GA-E'in ise 95 ^{o}C, 140 ^{o}C, 318 ^{o}C ve 469 ^{o}C'dir. Buradan

anlaşılıyor ki tutuklama metoduna göre yapılan Cam boncuk-APTES-GA-E'in termal olarak daha dayanıklıdır.

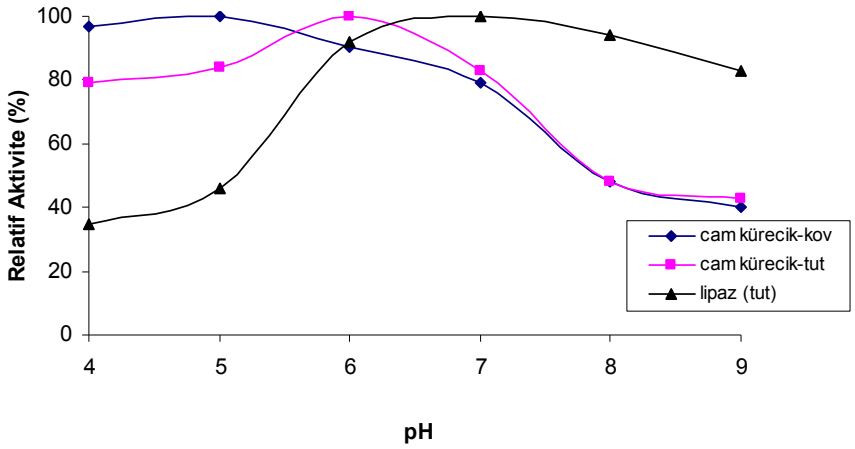
Çizelge 4.7. Optimum reaksiyon şartlarında immobilize lipazların aktiviteleri

	Bağlanan Protein (mg protein/g-destek maddesi)	Bağlanan Protein yüzdesi (%)	Lipaz Aktivitesi (U/g-im destek maddesi)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Aktivite Verimi (%)
$Lipaz_{tut}$	28.56	58.4	95.1	3.32	100
Cam boncuk-APTES-GA-E_{kov}	7.0	66.73	74.97	10.71	30
Cam boncuk-APTES-GA-E_{tut}	16.68	79.42	92.53	5.54	166.86

İki farklı immobilizasyon protokolü ile immobilize lipazın protein yüklenmesi, aktivite ve spesifik aktivitesi Çizelge 4.7'de gösterildi. Cam boncuk-APTES-GA-E_{tut} Cam boncuk-APTES-GA-E_{kov}'e kıyaslandığından hem aktivitesi hem de aktivite veriminin farklı olduğu bulundu. Cam boncuk-APTES-GA-E_{kov} aktivite verimi % 30.0 ile aktivitesi 74.97 (U/g destek maddesi) iken Cam boncuk-APTES-GA-E_{tut}'nin aktive verimi % 166.86 ve aktivitesi 92.53 (U/g destek maddesi) bulundu.

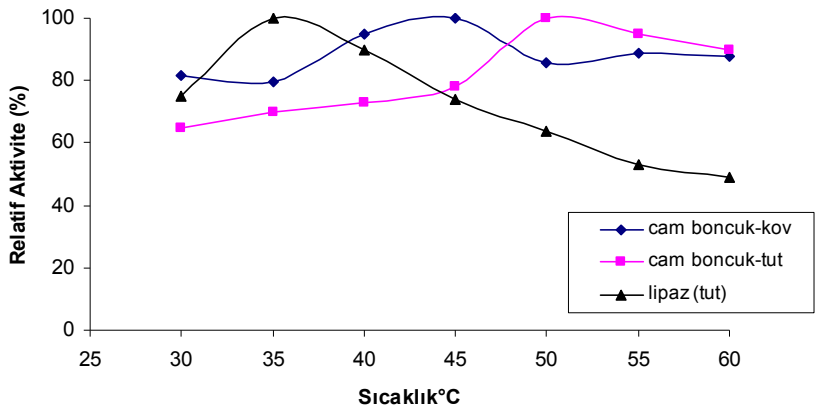
Sol-jel tutuklama metoduna göre yapılan immobilizasyon metodunda enzimin konformasyonal yapısı çok fazla zarar görmediği için serbest enzime göre aktivitede çok fazla düşüş gözlenmedi. Bu sonuçlara göre cam boncuklara immobilizasyon metotlarından sol-jel tutuklama metodu daha üstün olduğu görülmektedir.

4.2.6.1. Aktiviteye pH ve sıcaklığın etkisi



Şekil 4.49. Lipaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

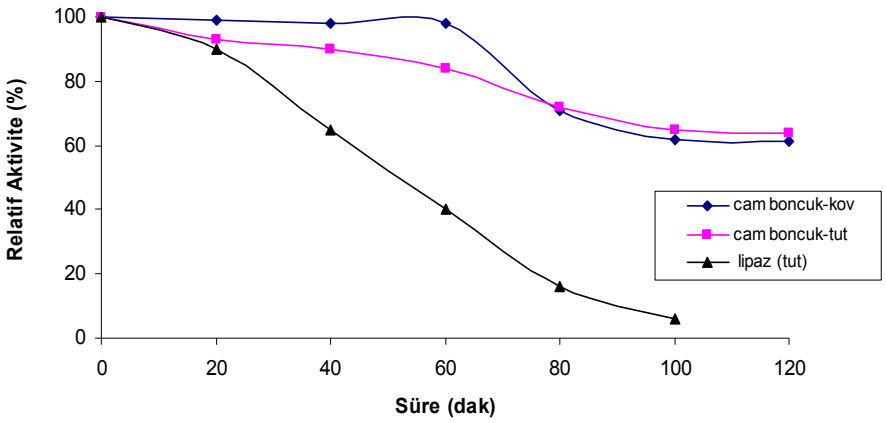
Enzimler elektrolit karakterli oldukları için enzim aktifliği pH ile değişim gösterebilir. pH değişikliği ile enzim yapısındaki amino asit zincirinin iyonik özelliği değişir ve denatüre olan enzimin katalitik aktifliği kaybolur. Şekil 4.49'da görüldüğü gibi lipazın aktifliği asidik ve bazik bölgelere kaydıkça azalmıştır. Enzimlerin üç boyutlu yapısı immobilizasyon sürecinden etkilenmeyebilir. Bu nedenle immobilize enzimin optimum parametreleri serbest enzimin parametreleri ile aynı gözlenebilir. Grafikten de görüldüğü gibi tutuklama yöntemine göre immobilize edilen lipazın optimum pH'nında az bir değişiklik görüldü. Lipaz (tut.) için optimum pH 7 iken tutuklanmış lipaz (cam boncuk) için pH 6 bulundu. Tutuklama yönteminde enzim ile destek materyali arasında bir etkileşim söz konusu değildir. Bu nedenle pH'nın az değişmesi beklenen bir durumdur. Kovalent bağlanma yöntemine göre immobilize edilen lipazın pH'ın da bir değişim görüldü ve immobilize lipaz için pH 5 bulundu. Bu da enzim yapısında immobilizasyon süresince konformasyonel bir değişim olduğu seklinde yorumlanabilir.



Şekil 4.50. Lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Lipaz (tut.) için optimum sıcaklık 35°C bulundu. 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. Grafikden de görüldüğü gibi (Şekil 4.50) tutuklama yöntemine göre immobilize edilen lipazın optimum sıcaklığı 35°C'den 50°C'ye kayarken Cam boncuk-APTES-GA-E_{kov}'nın optimum sıcaklığı 35°C'den 45°C'ye kaydığı gözlendi. Tutuklama yönteminde enzim ile destek materyali arasında bir etkileşim söz konusu değildir. Bu metod da enzim, polimerik matrikse kimyasal olarak bağ yapmaz. Böylece immobilizasyon prosedürü ile enzimin üç boyutlu yapısı fazla etkilenmez (Tümtürk ve ark. 2006) . Kovalent bağlanma sürecinde ise enzim ile destek materyali arasında iyonik etkileşimler ve enzim molekülünün kimyasal modifikasyonu söz konusudur. Ayrıca enzim ile destek materyali arasında kovalent bağlanma enzim hareketlerinde konformasyonel sınırlamaların dogmasına neden olabilir. Sonuç olarak Cam boncuk-APTES-GA-E_{tut} optimum sıcaklığı Cam boncuk-APTES-GA-E_{kov}'den daha yüksektir. Böylece Cam boncuk-APTES-GA-E_{tut} ile yüksek sıcaklıklarda çalışılabileceğini göstermektedir.

4.2.6.2. Termal kararlılık



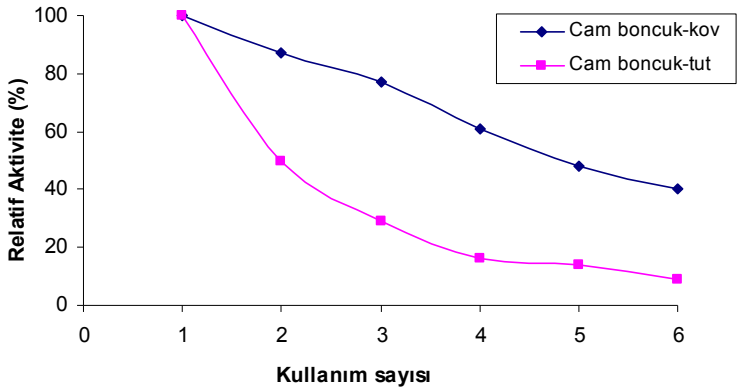
Şekil 4.51. İmmobilize enzimlerin termal kararlılığı

Şekil 4.51'de serbest ve immobilize lipazların termal kararlılığı görülmektedir. Serbest ve immobilize lipazlar 60 ^{o}C'de 2 saat inkübe edildi ve enzim aktivitesi çeşitli zaman aralıklarında ölçüldü. Serbest lipaz başlangıç aktivitesini 60 ^{o}C'de 80 dk civarında kaybederken, tutuklanmış lipaz 60 ^{o}C'de 120 dk sonra başlangıç aktivitesinin % 64, diğeri ise % 62 civarında korumuşlardır. Yüksek sıcaklıklarda enzimin konformasyonal geçişini önleyebilen enzim ve destek maddesi arasındaki etkileşimden dolayı immobilize lipazın termal kararlılığı serbest lipazdan çok daha iyi duruma getirildi.

4.2.6.3. Tekrar kullanılabilirlik

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. Tutuklama yöntemine göre immobilize edilen

lipaz 6 kez kullanım sonunda aktivitesi % 10, kovalent yöntemine göre immobilize edilen lipaz ise % 40'a düştüğü gözlendi.

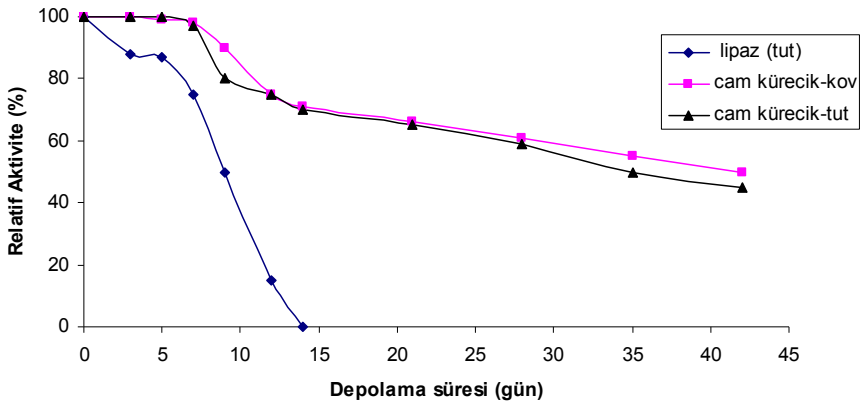


Şekil 4.52. İmmobilize lipazların tekrar kullanılabilirliği

4.2.6.4. Depolama Kararlılığı

İmmobilize edilen lipazın aktifliğine depolanma süresinin etkisini incelemek amacı ile immobilize enzimler tampon içerisinde 4 °C'de buzdolabında saklandı (Şekil 4.53). 14 günün sonunda serbest enzim, aktifliğinin % 100'ünü kaybederken, tutuklama yöntemine göre immobilize edilen enzim 42 günün sonunda % 45, kovalent bağlanma yöntemine göre immobilize edilen enzimin % 50 aktifliğini koruduğu görüldü.

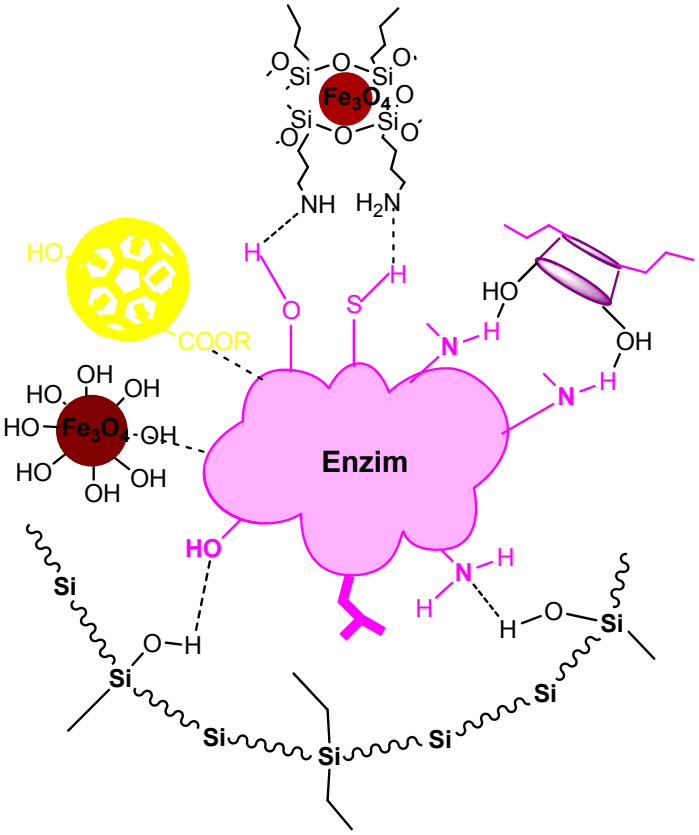
Enzimler çözelti içinde saklandıkları zaman yapısal değişime uğrarlar. Buna bağlı olarak da aktivitelerinde azalma veya tümüyle yok olma gözlenebilir. İmmobilizasyon işlemi ile enzim aktifliği iyileştirilebilir. Şekil 4.53'de görüldüğü gibi immobilize enzimin aktifliği serbest enzimin aktifliğine göre daha fazla korunduğu gözlendi.



Şekil 4.53. Serbest ve immobilize lipazların depolama süresi

4.2.7. Manyetik nanopartikül ve fonksiyonlandırılmış manyetik nanopartiküller üzerine lipaz immobilizasyonu (sol-jel tutuklama)

Literatürden manyetik partiküllere immobilize olan lipazların ayırma işlemlerindeki pratiklik göz önüne alınarak bu çalışmada *Candida rugosa* lipaz sol-jel tutuklama metoduna göre manyetik nanopartiküller (Fe_3O_4) ya da fonksiyonlandırılmış nanopartiküller (Fe_3O_4-APTES) immobilize edildi (Şema 4.18). Ayrıca bu çalışmaya ilaveten fonksiyonlandırılmış manyetik nanopartiküller sporopollenin ya da β-CD-HMDI ile beraber lipaz immobilizasyonunda kullanıldı.



Şema 4.18. Sol-jel metodu ile manyetik nanopartikül ve fonksiyonlandırılmış manyetik nanopartiküller üzerine lipaz immobilizasyonu

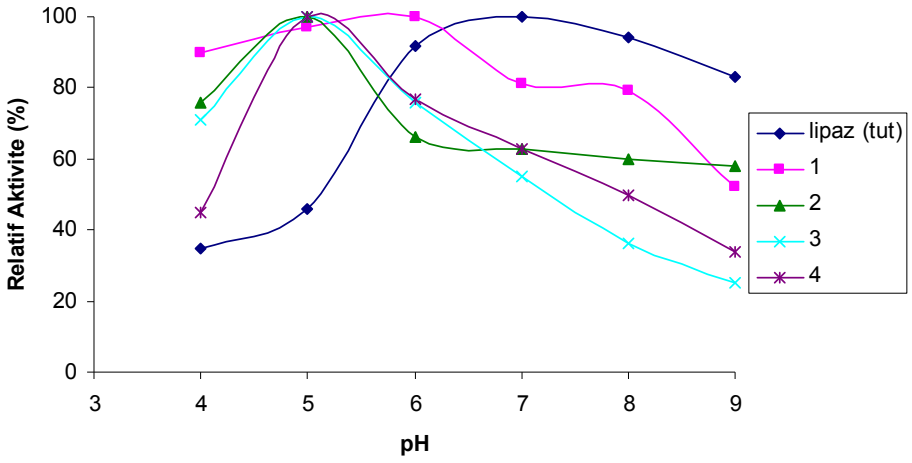
Çizelge 4.8'de tutuklanmış lipazların aktiviteleri görülmektedir. Tutuklanmış lipazlar arasında en iyi aktive verimi Fe_3O_4-APTES-β-CD-HMDI-E_{tut}'*de* gözlendi. Diğer tutuklanmış lipazlara kıyasla daha çok etkili olduğu bulundu. Sırasıyla aktiveleri Fe_3O_4-E_{tut}, Fe_3O_4-APTES-E_{tut}, Fe_3O_4-APTES-Spo-E_{tut} ve Fe_3O_4-APTES-β-CD-HMDI-E_{tut}'nin 101.85; 70.43; 212,92 ve 179,75 U/g olarak bulundu. Ayrıca bu immobilize lipazlar arasında spesifik aktivitesi en yüksek Fe_3O_4-APTES-β-CD-HMDI-E_{tut} olduğu gözlendi.

Çizelge 4.8. 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 (%)
Tutuklanmış lipaz[a]	28.56	58.4	95.1	3.32	100[b]
Fe_3O_4-E_{tut} **(1)**	33	78,57	101,85	3,086	92.95
Fe_3O_4-APTES-E_{tut} **(2)**	34,94	83,19	70,43	2,01	60,54
Fe_3O_4-APTES-Spo-E_{tut} **(3)**	32	76,19	212,92	6.65	200
Fe_3O_4-APTES-β-CD-HMDI-E_{tut} **(4)**	20,34	48,42	179,75	8,83	265,96

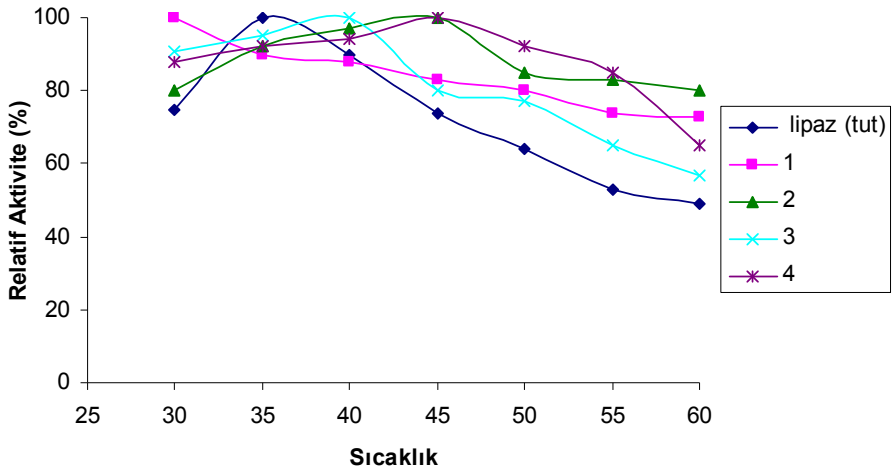
[a] destek maddeleri kullanmadan tutuklanmış serbest lipaz
[b] tutuklanmış lipaz için aktivite verimi % 100 olarak alındı.

4.2.7.1. Aktiviteye pH ve sıcaklığın etkisi



Şekil 4.54. Lipaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi
(1: Fe_3O_4-E_{tut} , **2:** Fe-APTES-E_{tut}, **3:** Fe-APTES-Spo-E_{tut}, **4:** Fe-APTES-β-CD-HMDI-E_{tut})

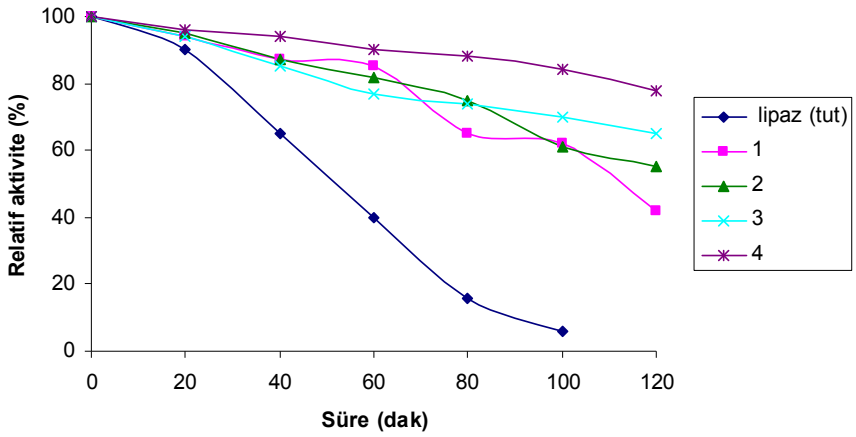
p-NPP'ın hidrolizinde tutuklanmış lipazların katalitik aktivitesi farklı pH'larda (4.0-9.0) incelendi. Şekil 4.54'de görüldüğü gibi tutuklanmış lipazın optimum pH'ı 7.0 iken, manyetik nanopartikül tutuklanmış lipazların (1, 2, 3, 4) optimum pH'ı sırasıyla 6.0, 5.0, 5.0 ve 5.0'dir. İmmobilize lipazlar manyetik nanopartikül olmadan tutklanmış lipazdan daha iyi pH kararlılığı ve asidik çevrelere karşı daha dirençlilik gösterdiler. pH kayması başlıca enzim ve destek maddesinin etkileşimine ve immobilizasyona bağlıdır.



Şekil 4.55. Lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi
(1: Fe_3O_4-E_{tut} , **2:** Fe-APTES-E_{tut}, **3:** Fe-APTES-Spo-E_{tut}, **4:** Fe-APTES-β-CD-HMDI-E_{tut})

Serbest ve immobilize edilen lipazların aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacı çeşitli sıcaklıklarda gerçekleştirilen reaksiyonlara ait relatif aktivite değerlerinin sıcaklık ile değişimi Şekil 4.55'de verilmiştir. Şekilden serbest lipazın optimum sıcaklığının 35°C, sırasıyla immobilize lipazların (1, 2, 3, 4) optimum sıcaklığı 30°C, 45°C, 40°C ve 45°C olduğu görülmektedir. Demir destekli immobilize lipazlar için immobilizasyon yöntemi, optimum sıcaklık değerlerini daha yüksek değerlere doğru çekilmesini sağladı.

4.2.7.2. Termal kararlılık



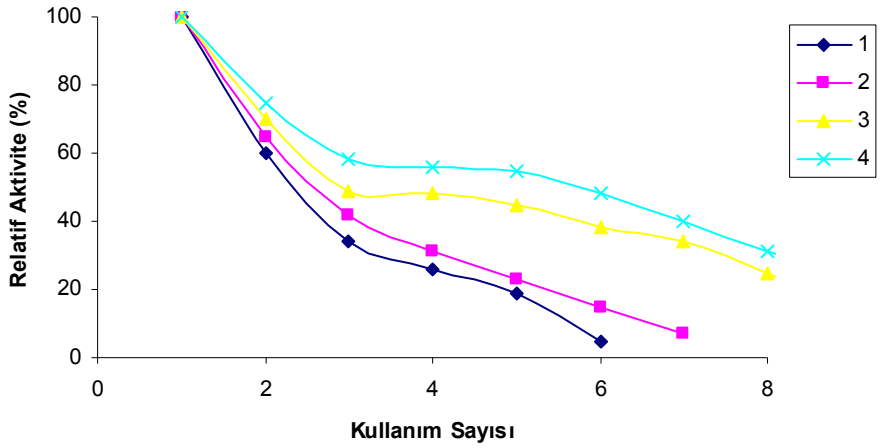
Şekil 4.56. Tutuklanmış lipazların termal kararlılığı

(1: Fe_3O_4-E_{tut} , **2:** Fe-APTES-E_{tut}, **3:** Fe-APTES-Spo-E_{tut}, **4:** Fe-APTES-β-CD-HMDI-E_{tut})

Çalışılan bir sıcaklıkta enzimin kararlı olduğu biliniyorsa, göreceli olarak yüksek sıcaklıklarda yapılan çalışmalar tepkime verimini oldukça arttırılabilir. Sonuç olarak, termal kararlılık enzimler için istenilen bir özelliktir (Janssen ve ark., 1994).

Şekil 4.56'da ise tutuklanmış lipazların aktivitesinin 60°C'de zamanla değişim grafiğidir. Tutuklanmış lipaz 60°C'de 80 dakikanın sonunda başlangıç aktivitesinin tümünü yitirirken, immobilize lipazlar (1, 2, 3, 4) sırasıyla 120 dakika sonunda hala başlangıç aktivitelerinin % 42, % 55, % 65 ve % 78'ünü koruyabilmişlerdir. Eğer enzimlerin ısıl kararlılıkları immobilizasyon ile artıyorsa, bu enzimlerin potansiyel uygulama alanları genişletilebilir. Bu anlamda termal kararlılık geliştirilen bir immobilizasyon yöntemi için oldukça önemlidir (Öztürk, 2006).

4.2.7.3. Tekrar kullanılabilirlik

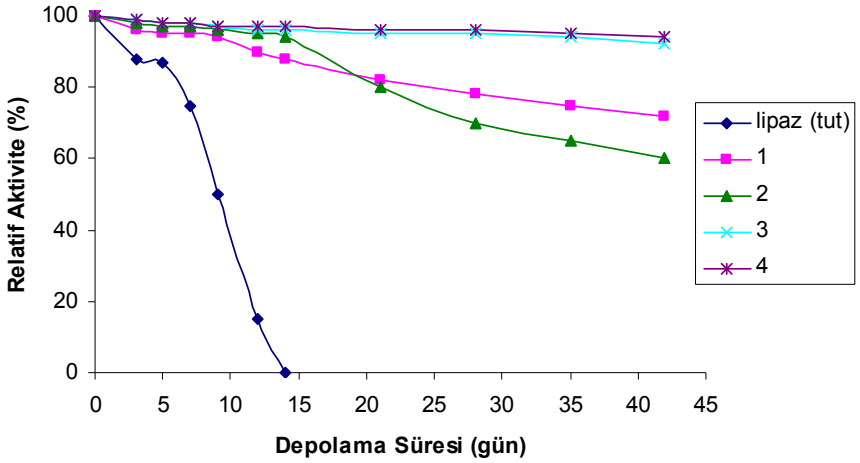


Şekil 4.57. İmmobilize lipazların tekrar kullanılabilirliği
(1: Fe_3O_4-E_{tut} , **2:** Fe-APTES-E_{tut}, **3:** Fe-APTES-Spo-E_{tut}, **4:** Fe-APTES-β-CD-HMDI-E_{tut})

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. Şekil 4.57'de immobilize lipazların tekrar kullanılabilirliği görülmektedir. 6. kullanım sonunda sırasıyla immobilize lipazlar (1, 2, 3, 4) % 5, % 15, % 38 ve % 48'dir. Tutuklama yönteminde enzim ile destek materyali arasında bir etkileşim minimum olduğu için immobilize enzimler kovalent yönteminden daha az aktivite gösterdiler.

4.2.7.4. Depolama kararlılığı

Şekil 4.58'den görüldüğü üzere manyetik nanopartikül tutuklanmış enzimlerin depo kararlılığı tutuklanmış enzime oranla oldukça iyidir.



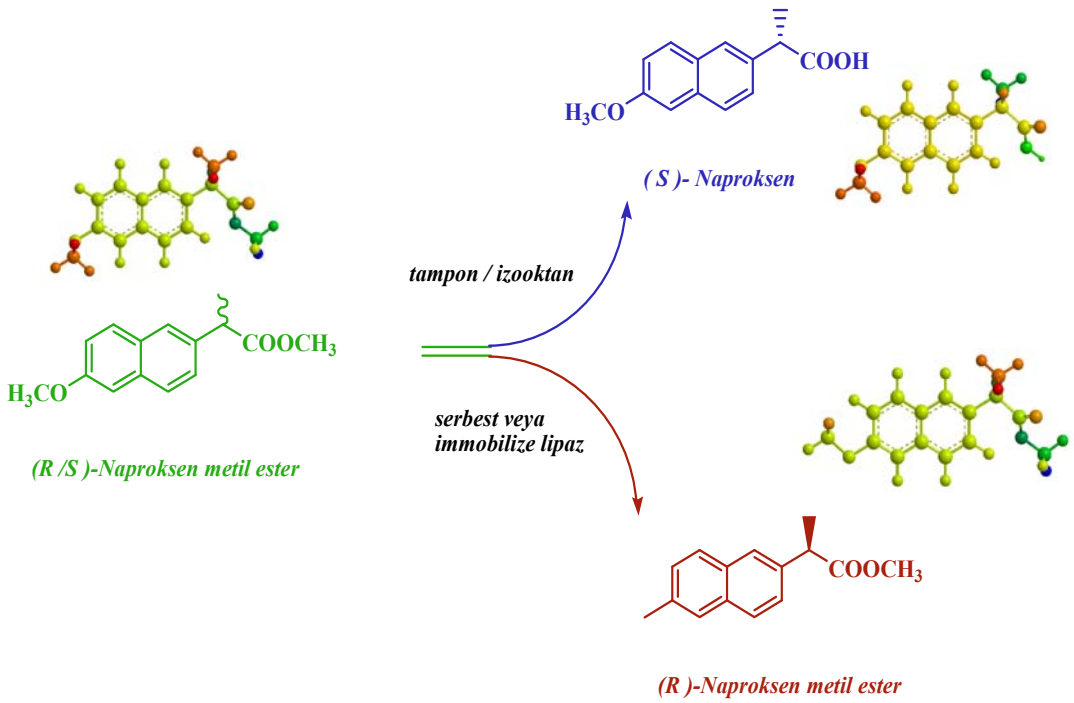
Şekil 4.58. Tutuklanmış lipazların depolama kararlılığı
(1: Fe_3O_4-E_{tut} , **2:** Fe-APTES-E_{tut}, **3:** Fe-APTES-Spo-E_{tut}, **4:** Fe-APTES-β-CD-HMDI-E_{tut})

42 günlük bir depolama süresi (+4 °C) sonunda immobilize enzim (1) aktivitesini % 72, immobilize enzim (2) % 60, immobilize enzim (3) % 92, immobilize enzim (4) ise % 94 aktivitelerini oranından korurken, tutuklamış enzim aktivitesini 14 günde tamamen kaybettiği gözlendi. Serbest enzimle karsılaştırıldığında immobilizasyonun, enzimin kararlılığını daha uzun bir süre korumasını sağladığı gözlendi.

4.3. İmmobilize Lipazların Enantiyoseçimli Tepkimelerde Kullanılması

Farklı destek maddelerine kovalent ve sol-jel tutuklama metoduna göre lipaz immobilize ettikten sonra rasemik (R,S)-Naproksen metil esteri üzerinde enantiyoseçimli hidroliz reaksiyonları gerçekleştirildi.

Naproksen metil esteri sentezinde, öncelikle piyasada tek enantiyomeri bulunan *S*-Naproksen rasemleştirilerek (R,S)-Naproksen rasematına dönüştürüldü. Daha sonra Fischer esterleşme metoduna göre metanol ile asidik ortamda etkileştirilerek (R,S)-Naproksen metil ester türevi elde edildi. Sonuçlar HPLC'de, hekzan/2-propanol/trifloroasetik asit (100/1/0.1) mobil fazı kullanılarak 254 nm'de 1 mL/dk akış hızında incelendi (Şema 4.19).



Şema 4.19. *(R,S)*-Naproksenin metil esterin enantiyoseçimli hidrolizi

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. β-siklodekstrin bazlı immobilize lipazlar ile (R,S)-Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi

Kovalent bağlanma metoduna göre immobilize edilen siklodekstrin bazlı polimerler kullanılarak (R,S)-Naproksen'in metil esteri üzerinde enantiyoseçimli hidroliz reaksiyonları gerçekleştirildi. Çizelge 4.9'dan da görüleceği gibi bu metotla yapılan immobilize siklodekstrin bazlı bileşikler düşük enatiyoseçimlilik gösterdi. Yukarıdaki bölümlerde bahsedildiği gibi kovalent bağlanma metodunda enzimin konformasyonu önemli ölçüde değiştiğinden enantiyoseçimliliğini önemli oranda kaybetmektedir. Bu sonuçlar immobilizasyon metodunun çok önemli olduğunu göstermektedir.

Bir başka immobilizasyon metodu olan sol jel tutuklama tekniği ile sentezlenen siklodekstrin bazlı polimerlere de uygulandı. Sol-jel tutuklama metodunda, siklodekstrin türevlerinin HPLC sisteminde (R,S)-Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi reaksiyonu ile incelendi (Şema 4.19).

Bu metotla yapılan immobilize enzimlerin kovalent bağlama metodundan daha yüksek enantiyoseçimlilik gösterdi (E: 382.5, % c: 46). Kovalent bağlı immobilize lipazların daha az etkin olması kovalent bağlanma ile yapılan immobilizasyonda, siklodekstrin bazlı polimer ile lipazın arasındaki bağlanmalar sonucu lipazın konformasyonunda meydana gelen değişiklerden kaynaklanabilir. Bu konformasyonel değişim, lipazın kiral olan aktif merkezine enantiyomerlerin yaklaşmasını etkiler. Bu da enantiyomerler arasındaki dönüşüm oranını ve enantiyoseçimliliği değiştirir. Kovalent bağlı siklodekstrin bazlı immobilize lipazlar tutuklanmış lipaz'a göre daha az dönüşüm (% 14) ve enantiyoseçimlilik (135.5) göstermişlerdir (Çizelge 4.9).

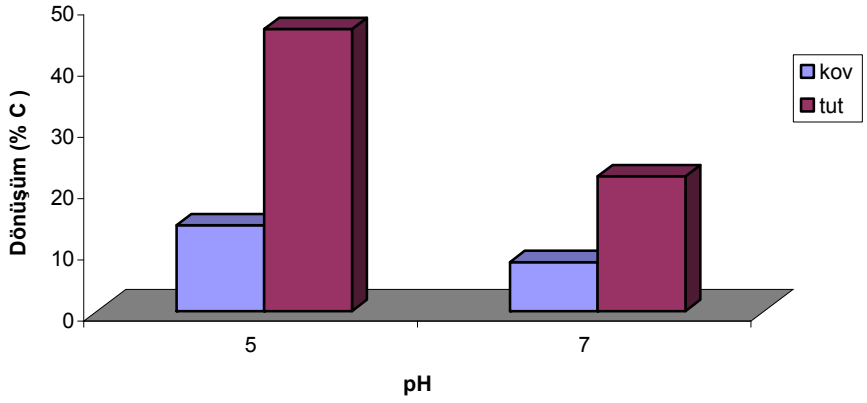
Çizelge 4.9. Kovalent bağlama ve sol-jel tutuklama metodu ile immobilize edilen siklodekstrin bazlı polimerler ile (R,S)-Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi

	***c* (%)**	***ee*$_s$ (%)**	***ee*$_p$ (%)**	***E***
Lipaz$_{tut}$[a]	37.9	60.2	>98	166.0
β-CD-HMDI-E$_{kov}$	14.0	16.0	>98	135.5
β-CD-HMDI-E$_{tut}$	46.0	84.0	>98	382.5

[a)] Siklodekstrin kullanmadan tutuklanmış serbest lipaz

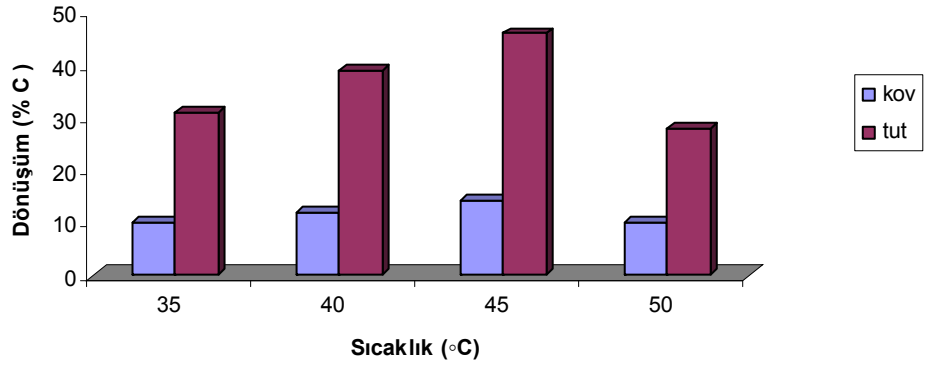
İmmobilize lipazlar ile (R,S)-Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidroliz reaksiyonundaki optimum koşullarda (pH, sıcaklık) incelendi. Bunun için hidroliz reaksiyonunda kullanılan tampon çözeltinin pH'ı ve ortamın sıcaklığı

değiştirildi. Şekil 4.59'da farklı pH'lardaki immobilize lipazların (R,S)-Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli olarak hidrolizindeki etkisi gösterildi. En iyi dönüşümüm pH 5.0'de olduğu gözlendi.



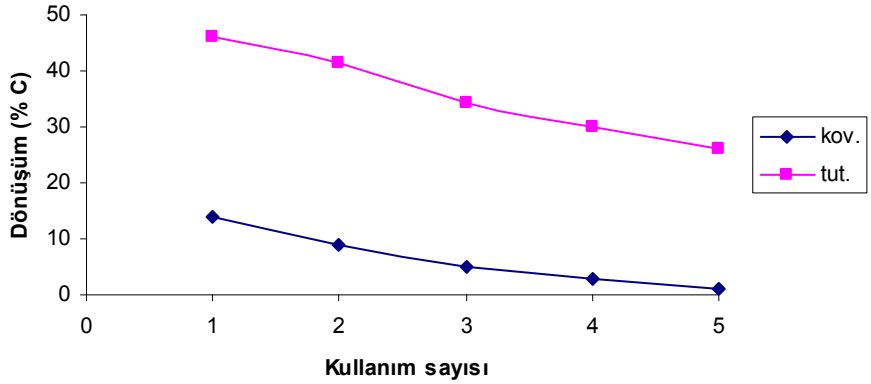
Şekil 4.59. Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde dönüşüme karşı pH'ın etkisi (sıcaklık 45 °C)

İmmobilize lipazlar ile (R,S)-Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidroliz tepkimesinde sıcaklığın etkisi 35, 40, 45 ve 50 ^{o}C'de incelendi (Şekil 4.60). En iyi dönüşümüm sıcaklık 45 °C'de olduğu gözlendi. Sıcaklığın 35 °C'den 45 °C'ye kadar yükseltilmesi (R,S)-Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidroliz tepkimesinin hızını artırdığı gözlendi. Enantiyomerik oran değeri sıcaklıkla dönüşümün önemli ölçüde artması nedeniyle sıcaklık 45 ^{o}C'ye yükseldiğinde önemli ölçüde artış göstermektedir. Sıcaklığı 50 ^{o}C'ye yükseltildiğinde tepkime hızında düşme gözlendi, aynı zamanda tutuklanmış enzimin enantiyoseçiciliğinde de bir miktar azalma olduğu gözlendi.



Şekil 4.60. Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde dönüşüme karşı sıcaklığın etkisi (pH: 5.0)

İmmobilize lipazların tekrar kullanılabilirliği (R,S)-Naproksen metil esterinin hidroliz reaksiyonu ile HPLC'de belirlendi. Şekil 4.61'dan görüldüğü gibi β-CD-HMDI-E_{tut} 5. kullanımdan sonra bile dönüşüm oranı % 26.1 oranında kaldığı gözlendi.



Şekil 4.61. Rasemik metil esterin hidrolizinde dönüşüme karşı tekrar kullanılabilirliğin etkisi

4.3.2. Lipaz immobilize sporopollenin'in (R,S)-Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli reaksiyonunda kullanılması

Endüstriyel alanda, bir kinetik rezulasyon verme kalitesi sadece enantiyoseçimliliğin derecesine bağlı değildir. Aktivitede ve geri dönüşümün sağlanması ve lipazın tekrar kullanımına da bağlıdır. Bundan dolayı (*R,S*)-Naproksen metil esterin kinetik rezulasyonu için bütün faktörler çalışıldı.

Çizelge 4.10'da 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 (Şema 4.16).

Çizelge 4.10'a baktığımızda tutuklanmış lipaz (Spo-E) ile rasemik Naproksenin çok yüksek enantiyoseçimlilikte (E>400) ve yüksek dönüşümle (% 44,3), 24 saat süre sonunda ürüne dönüştüğü gözlendi. Buna karşın tutuklanmış lipaz ile enantiyoseçimli reaksiyonda, enantiyoseçimliliği (E) 166 ve dönüşümü ise % 37,9 gözlendi. Reaksiyona girmeyen Naproksen metilat (R)-esteri ve oluşan asidin enantiyofazlalılığı (ee_p) % 98 olarak bulundu. Bu sonuçlar şaşırtıcı değildir. Çünkü literatürdeki Tsai ve ark. (2006)'nın *Candida rugosa*'dan elde edilen MY lipazı kullanmışlar ve bir model sistem olarak su ile doymuş izooktanda (R,S)-Naproksen'in hidrolizini katalizlemişler. E değerini 510 olarak bulmuşlar. Kovalent bağlanma metoduna göre immobilize edilen glutaraldehit fonksiyonlu sporopollenin destek maddeleri optimum şartlarda yüksek enantiyoseçicilik ancak düşük dönüşüm gösterdi (Çizelge 4.10).

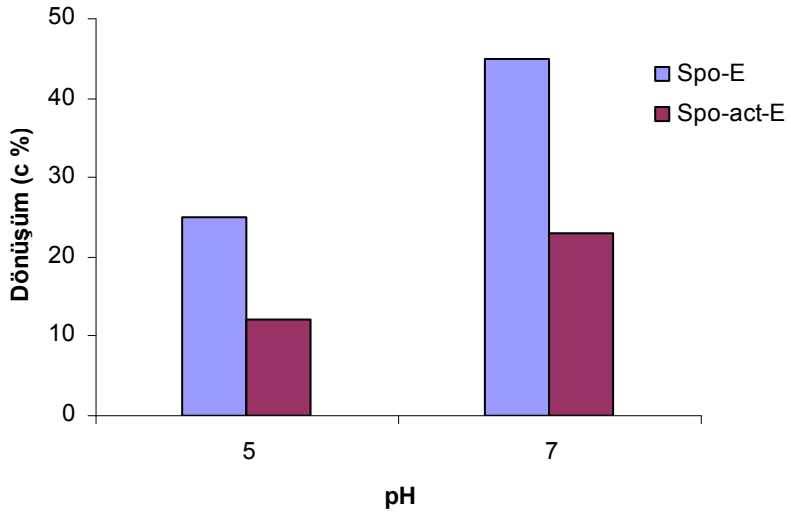
Çizelge 4.10. Serbest ve immobilize lipazlar kullanarak rasemik Naproksen metil esterin kinetik rezulasyonu

	***X* (%)**	***ee*$_s$ (%)**	***ee*$_p$ (%)**	***E***
Lipaz$_{tut}$[a]	37.9	60.2	>98	166.0
Tutuklanmış lipaz (Spo-E)	44.3	78.71	>98	>400
Tutuklanmış lipaz (Spo$_{act}$-E)	23.0	29.0	>98	89.7
Spo-HMDI-su-GA-E	18.8	23.0	>98	378
Spo-HMDI-ed-GA-E	16.45	19.5	>98	250

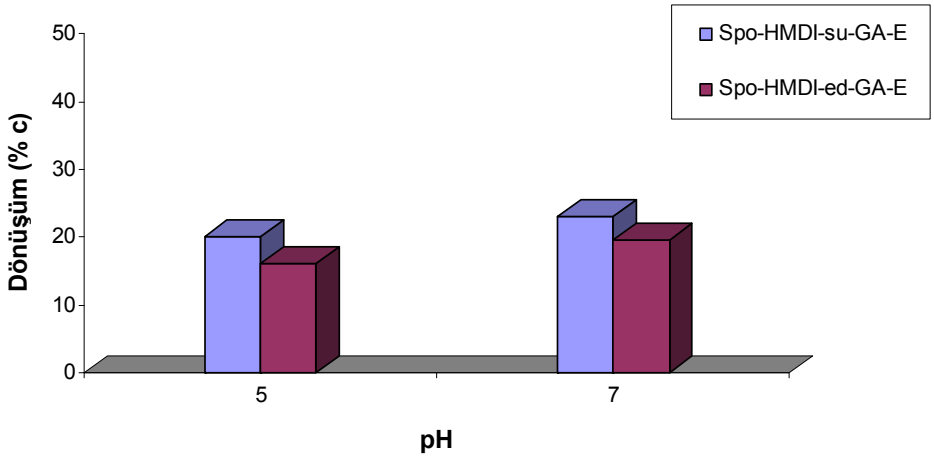
[a)] Sporopollenin kullanmadan tutuklanmış serbest lipaz

Bu sonuçlara göre özelikle sporopollenin tutuklanmış lipazlar sol-jel serbest lipaza göre daha yüksek enantiyoseçimlilik ve dönüşüm gösterdi. Aktive edilmiş sporopollenin ile tutuklanmış lipazdan istenilen enantiyoseçimlilik ve dönüşüm elde edilemedi. Bunun nedeni aktivasyon prosesi boyunca aktive edilmiş sporopollenin gözenek yapısının bozulmasıdır. Bundan dolayı aktivitesi ve enantiyoseçimliliği aktive olmamış sporopolleninden daha düşük gözlendi.

Kiral rezulasyonunda bir katalizör olarak enzim kullanıldığı zaman, bir enzimin konformasyonu iyonlaşmaya bağlı olduğu için pH'ın değişmesi kiral seçiciliği etkiler (Pereira ve ark., 2001). Tutuklanmış ve kovalent bağlı lipazların enantiyoseçimliliğine etkisi farklı pH'larda (5.0 ve 7.0) inkübe ederek belirlendi. İnkübasyon süresinin sonunda enzim reaksiyonunun hızı ve enantiyomerik aşırılık (ee) 25 ^{o}C'de Chiralcel OD-H kolonu ile HPLC (Agilent 1200 Serisi) kullanarak belirlendi. Optimum pH değerleri yüzde dönüşüm (c) karşı çizilen pH'ın grafiğinden belirlendi (Şekil 4.62). En iyi dönüşüm tutuklanmış lipazlar için ve kovalent bağlı lipazlar içinde pH 7 olarak gözlendi.



(a)

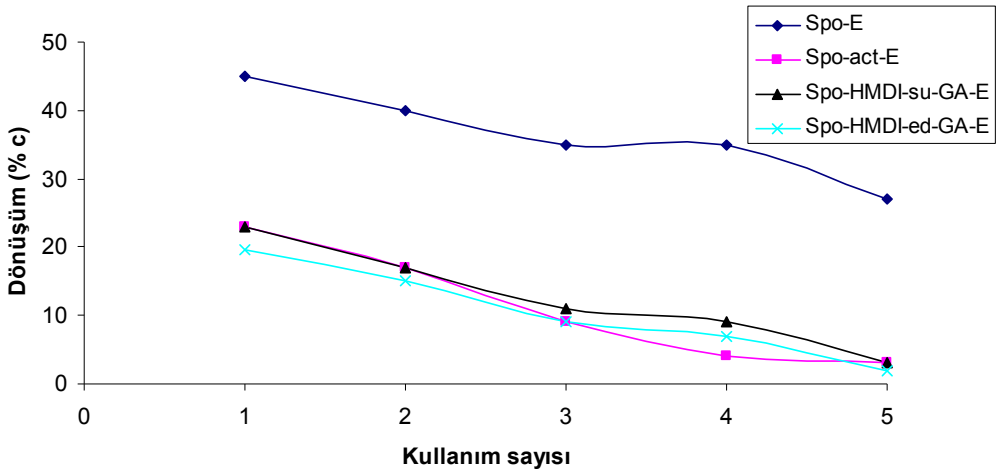


(b)

Şekil 4.62. Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde dönüşüme karşı pH'ın etkisi (a ve b)

Sporopollenin ve aktive edilmiş sporopollenin'in varlığında CRL'ın tutuklanmasından sonra, enzimler arasında ve destek materyali arasında çapraz bağ oranında artış yüzünden tutuklanmış lipazlar suda çözünmezler. Bundan dolayı tekrar kullanılabilirlik çalışmalarında kullanılabilir. 4. kullanımdan sonra tutuklanmış

lipazın enantiyoseçimli reaksiyonlarının dönüşüm oranlarının düştüğü bulundu. Şekil 4.63'de gösterildiği gibi tutuklanmış lipazlar sırasıyla 5. kullanımdan sonra sporopollenin ve aktive edilmiş sporopollenin dönüşüm oranlarının % 27 ve % 3 düştüğü gözlendi. Buna karşın Şekil 4.64'de kovalent bağlı immobilize lipazların (Spo-HMDI-su-GA-E ve Spo-HMDI-ed-GA-E) 5. kullanımdan sonra dönüşüm oranları sırasıyla % 3 ve % 2 olduğu bulundu.



Şekil 4.63. Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde dönüşüme karşı tekrar kullanılabilirliğin etkisi

4.3.3. Cam kürecik immobilize lipazlar ile (R,S)-Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi

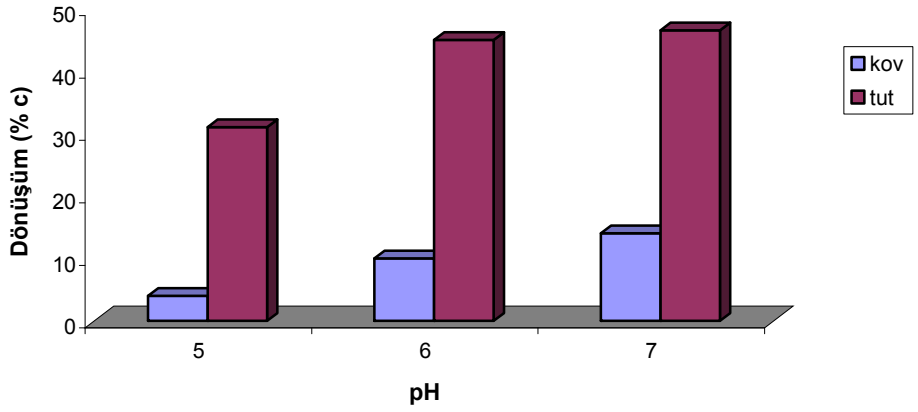
Bu çalışmada *Candida rugosa* lipaz başarılı bir şekilde fonksiyonlandırılmış cam küreciklere hem kovalent hem de sol-jel tutuklama metoduyla immobilize edildikten sonra rasemik (R,S)-Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz reaksiyonunda kullanıldı.

Çizelge 4.11. Kovalent bağlama ve sol-jel tutuklama metodu ile immobilize edilen cam boncuk bazlı polimerler ile (R,S)-Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi

	***c* (%)**	***ee*$_s$ (%)**	***ee*$_p$ (%)**	***E***
Lipaz$_{tut}$[a]	37.9	60.2	>98	166.0
Cam boncuk-APTES-GA-E$_{kov}$	14.0	16.0	>98	135.5
Cam boncuk-APTES-GA-E$_{tut}$	46.5	86	>98	>400

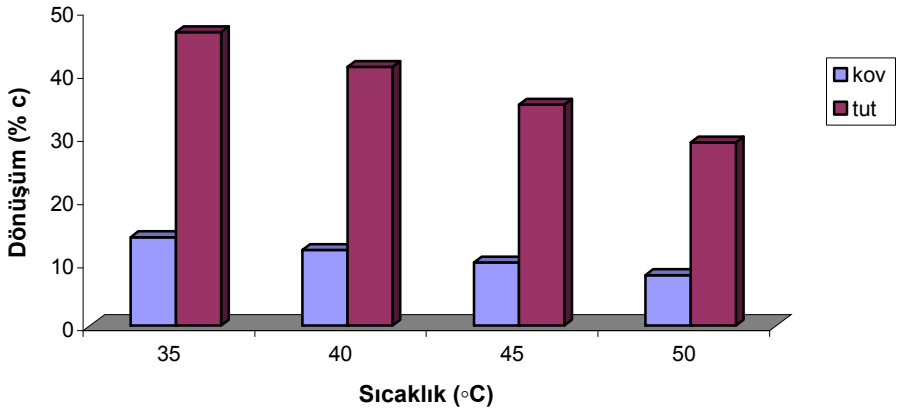
[a)] cam kürecik kullanmadan tutuklanmış lipaz

Çizelge 4.11'de immobilize enzimlerin optimum pH değerinde 24 saatte % ee$_p$, % ee$_s$ % c ve E değerleri verildi. Cam boncuk-APTES-GA-E$_{kov}$ 24 saat sonunda % 14.0 dönüşüme ulaşırken, Cam boncuk-APTES-GA-E$_{tut}$ aynı zaman sonunda pH 7.0'de, 35 °C'de % 46.5 dönüşüme ve yüksek enantiyoseçimliliğe (E >400) ulaştığı görüldü.



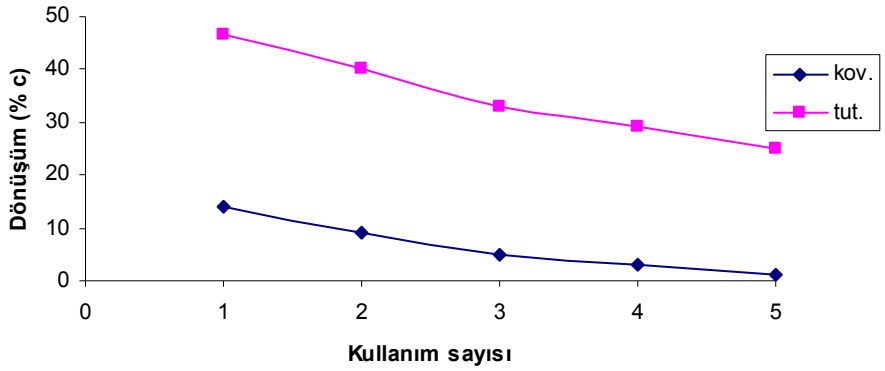
Şekil 4.64. Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde dönüşüme karşı pH'ın etkisi

Yapılan deneyler sonucu pH 7'nin dönüşüm ve enantiyoseçimlilik için optimum değer olduğu belirlendi (Şekil 4.64). pH 5'de hidroliz tepkimesi için dönüşüm oldukça düşük değerlerde kaldığı gözlendi. pH 6'da ve pH 5'e göre oldukça yüksek bir dönüşüm gözlendi. Sonuç olarak hem Cam boncuk-APTES-GA-E_{kov} hem de Cam boncuk-APTES-GA-E_{tut} ile (R,S)-Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizinde en yüksek dönüşüme pH 7'de ulaşıldı.



Şekil 4.65. Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde dönüşüme karşı sıcaklığın etkisi (pH: 7.0)

(R,S)-Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidroliz tepkimesinde sıcaklığın etkisi 35, 40, 45 ve 50 ^{o}C'de incelendi. Yapılan optimum sıcaklık çalışmalarında immobilize lipazlar için optimum sıcaklık 35 ^{o}C olarak tespit edildi (Şekil 4.65). Sıcaklığın artmasıyla dönüşüm oranının azaldığı görüldü.



Şekil 4.66. Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde dönüşüme karşı tekrar kullanılabilirliğin etkisi

Cam küreciklere 35 ^{o}C, pH 7'de immobilize enzimlerin, belirlenen optimum hidroliz koşullarında tekrar kullanılabilirliği incelendi. Bu şekilde gerçekleştirilen ardışık beş kullanımda tepkime süresince % c ile değişimleri Şekil 4.66'de gösterilmiştir. 5. kullanımdan sonra Cam boncuk-APTES-GA-E_{tut}'nin dönüşümü % 25'e düştüğü gözlendi.

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

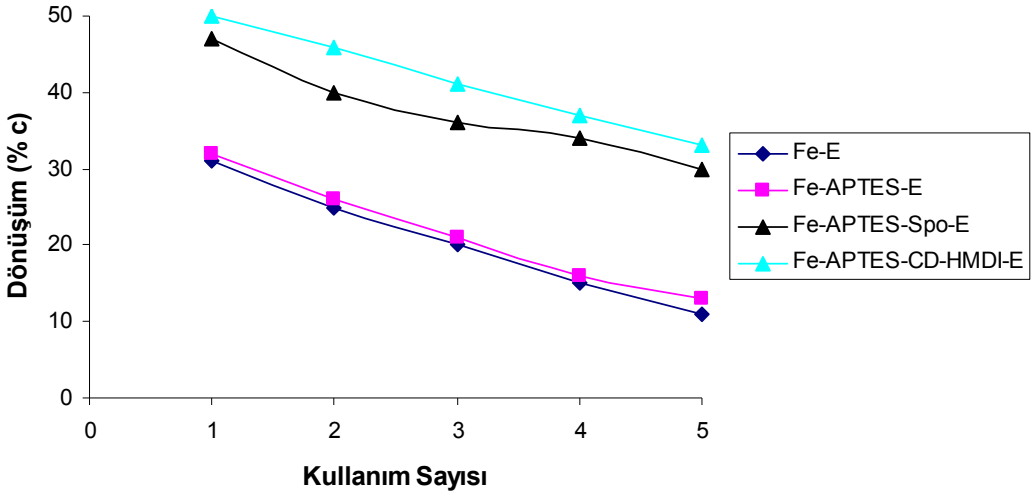
Bu çalışmada *Candida rugosa* lipaz prosedüre göre manyetik nanopartikül destekli sol-jel tutuklama yapılarak (R,S)-Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidroliz reaksiyonunda kullanıldı. Bunun için sol-jel tutuklama prosedürüne göre amino grubu ile fonksiyonlandırılmış manyetik nanopartiküller (Fe-APTES-E_{tut}), sporopollenin ilave edilmiş hali (Fe-APTES-Spo-E_{tut}) ve β-CD-HMDI polimeri ilave edilmiş yapılar (Fe-APTES-β-CD-HMDI-E_{tut}) kullanıldı.

Çizelge 4.12. 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	60.2	>98	166.0
Fe-E$_{tut}$	30.7	44.0	>98	170.47
Fe-APTES-E$_{tut}$	32.2	47.0	>98	301.05
Fe-APTES-Spo-E$_{tut}$	47	88	>98	>400
Fe-APTES-β-CD-HMDI-E$_{tut}$	51	92	>98	>400

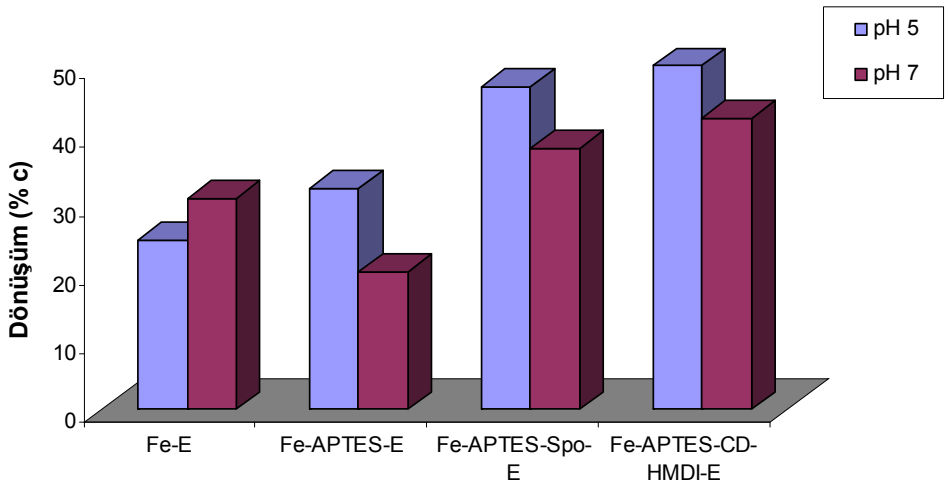
[a)] manyetik kullanmadan tutuklanmış serbest lipaz

Çizelge 4.12'de immobilize enzimlerin optimum pH değerlerinde 24 saatte % ee$_p$, % ee$_s$ % c ve E değerleri verildi. Fe-E$_{tut}$ ve Fe-APTES-E$_{tut}$ 24 saat sonunda sırasıyla % 30.7 ve % 32.2 dönüşüme ulaşırken, Fe-APTES-Spo-E$_{tut}$ ve Fe-APTES-β-CD-HMDI-E$_{tut}$ aynı zaman sonunda, 35 °C'de % 47 ve % 51 dönüşüme ve yüksek enantiyoseçimliliğe (E >400) ulaştığı görüldü. Çizelge 4.12'de sonuçlardan manyetik amino grubu taşıyan manyetik nanopartiküllere sporopollenin ya da β-CD-HMDI katılması lipazın enantiyoseçimliliğini ve dönüşümünü büyük oranda artırdığı gözlendi.



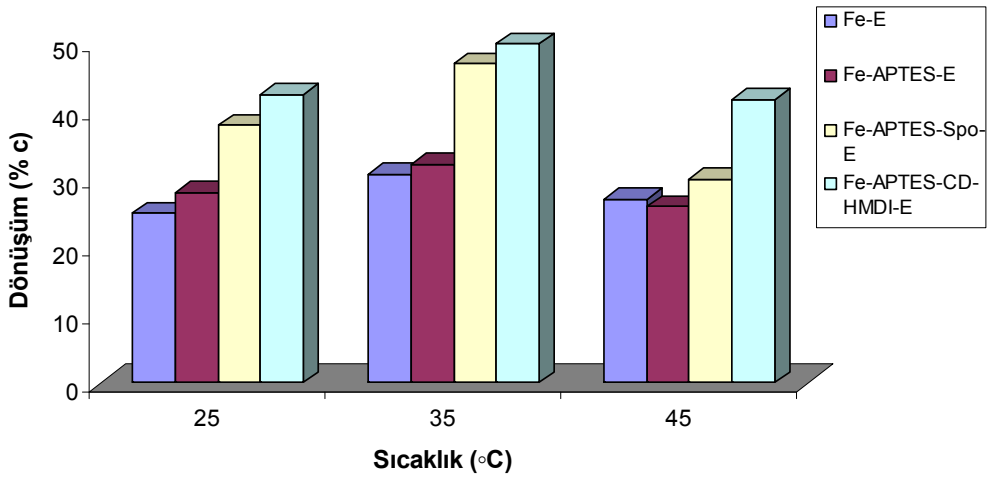
Şekil 4.67. Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde dönüşüme karşı tekrar kullanılabilirliğin etkisi

İmmobilize lipazların tekrar kullanılabilirliği (R,S)-Naproksen metil esterinin hidroliz reaksiyonu ile HPLC tekniğine göre belirlendi. Şekil 4.67'den görüldüğü gibi sırasıyla Fe-E_{tut}, Fe-APTES-E_{tut}, Fe- APTES-Spo-E_{tut} ve Fe-APTES-β-CD-HMDI-E_{tut}'nun 5. kullanımdan sonra dönüşüm oranları % 11, % 13, % 30 ve % 33'e düştüğü gözlendi. İmmobilize enzimler arasında 5. kullanımdan sonra aktivitesini en yüksek oranda koruyan β-CD-HMDI katkılı manyetik nanopartiküle immobilize lipaz olduğu gözlendi.



Şekil 4.68. Rasemik Naproksen 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 4.68). Fe-E_{tut}'nin optimum pH'ı 7.0 iken Fe-APTES-E_{tut} , Fe-APTES-Spo-E_{tut} ve Fe-APTES-β-CD-HMDI-E_{tut}'nin optimum pH'ı 5.0 olarak gözlendi.



Şekil 4.69. Rasemik Naproksen metil esterin hidrolizinde dönüşüme karşı sıcaklığın etkisi

(R,S)-Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidroliz tepkimesinde sıcaklık etkisi 25, 35 ve 45 ^{o}C'de incelendi. Yapılan optimum sıcaklık çalışmalarında immobilize lipazlar için optimum sıcaklık 35 ^{o}C olarak tespit edildi (Şekil 4.69). Sıcaklığın artmasıyla ya da azalmasıyla dönüşüm oranının azalma gözlendi.

5. KAYNAKLAR

Abrol, K., Qazi, G.N.,. Ghos, A.K. 2007, Characterization of an Anion-Exchange Porouspolypropylene Hollow Fiber Membrane for Immobilization of ABL Lipase. J. Biotechnol. 128: 838–848.

Abudiab, T., Beitle, R.R., Jr. 1998, Preparation of Magnetic Immobilized Metal Affinity Separation Media and Its Use In The Isolation of Proteins. J. Chromatogr. A. 795:211–217.

Ahmad, A., Bishayee, S., Bachhawat, B. 1973, Novel Method for Immobilisation of Chicken Brain Arylsulfatase a Using Concanavalin A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 53: 730–736.

Akita, H., Enoki, Y., Yamada, H., et al. 1998, Enzymatic Hydrolysis in Organic Solvents for Kinetic Resolution of Water-Insoluble a-Acyloxy Esters With Immobilized Lipases. Chem. Pharm. Bull. 37: 2876–2878.

Akkuş, P. 2006. Lipaz Kullanılarak Şeker Esteri Sentezi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.

Akoh, C.C., Min, D.B. 1998, Microbial Lipases and Enzymatic Interesterification In Food Lipids-Chemistry, Nutrition and Biotechnology, Marcel Deccer, Inc, New York, 641-698.

Aksoy, C. 2003, Lipaz ve Üreaz Enzimlerinin Çeşitli Taşıyıcılar İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Aktaş, D. 2004, Sığır Karbonik Anhidraz Enzimin Alginat Üzerine İmmobilizasyon Koşullarının İncelenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Aydın.

Alberghina, L., Gnandori, R., Longhi, S., Lotti, M., Fusetti, F., Vanoni, M. 1991. Molecular Cloning of a Lipase and of a Lipase Related Gene from *Candida cylindricea*. In Alberghina, L., Schmid, R. D. and Verger, R. (Eds), Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering. GBF Monographs 16**:** 231–235.

Alonso, N., Lopez-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Mateo, C., Guisan, J.M.,

Lafuente, R.F., 2005. Immobilization and Stabilization of Glutaryl Acylase on Aminated Sepabeads Supports by the Glutaraldehyde Crosslinking Method. J. Mol. Catal. B: Enz. 35: 57–61.

Alsarra Ibrahim, A., Betigeri, S.S., Zhang, H., Evans, B.A., Neau, S.H. 2002, Molecular Weight and Degree of Deacetylation Effects on Lipase-loaded Chitosan Bead Characteristics. Biomaterials, 23: 3637–3644.

Antonian, E. 1988, Recent Advances in The Purification, Characterization and Structure Determination of Lipases. Lipids, 23: 1101-1106.

Arıca, M.Y. 2000, Epoxy-derived pHEMA Membrane for Use Bioactive Macromolecules Immobilization: Covalently Bound Urease in a Continuous Model System J. Appl. Polym. Sci. 77: 2000–2008.

Arıca, M.Y. Bayramoglu G. 2004, Reversible Immobilization of Tyrosinase Onto Polyethyleneimine-grafted and Cu(II) Chelated poly(HEMA-co-GMA) Reactive Membranes J. Mol. Catal. B: Enz. 27: 255–265.

Arıca, M.Y., Denizli, A., Salih, B., Piksin, E., Hasırcı, V. 1997, Catalase Adsorption onto Cibacron Blue F3GA and Fe(III) Derivatized Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Membranes and Application to a Continuous System, J. Membr. Sci. 129: 65–76.

Arica, O., Suzuki, T., Sano, Y., Murakami, Y. 1996, Immobilization of a Thermostable Enzyme Using a Sol–gel Preparation Method. J. Ferment Bioeng. 82: 341–345.

Armisen, P., Mateo, C., Cortes, E., Barredo, J.L., Salto, F., Diez, B., Rodes, L., Garcia, J.L., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. 1999, Selective Adsorption of poly-His Tagged Glutarayl Acylase on Tailor-made Metal Chelate Support. J. Chromatogr. A. 848: 61-70.

Arslan, G., Ozmen, M., Gunduz, B., Zhang, X., Ersoz, M. 2006, Surface Modification of Glass Beads with an Aminosilane Monolayer. Turk. J. Chem. 30: 203-210.

Atia, K.S., El-Arnaouty, M.B., Ismail, S.A., Dessouki, A.M. 2003, Characterization and application of immobilized lipase enzyme on different radiation grafted polymeric films: Assessment of the Immobilization Process Using Spectroscopic Analysis. J. Appl. Polym. Sci. 90: 155-167.

Avnir, D. 1995, Organic Chemistry within Ceramic Matrixes: Doped Sol-gel Materials. Acc. Chem. Res. 28: 328–334.

Avnir, D., Braun, S., Lev, O., Ottolenghi, M. 1994, Enzymes and Other Proteins Entrapped in Sol-gel Materials. Chem. Mater. 6: 1605–1614.

Axén, R., Porath, J., Ernback, S. 1967, Chemical Coupling of Peptides and Proteins to Polysaccharides by Means of Cyanogen Halides. Nature, 214: 1302–1304.

Ayar, A., Mercimek, B. 2006, Interaction of Nucleic Acid Bases and Nucleosides with Cobalt Ions Immobilized in a Column System. Process Biochem. 41: 1553.

Aydoğmus Öztürk, F. 2006. *Pseudomonas* Türlerinde Lipaz Üretimi ve Bazı Kültürel Parametrelerin Optimizasyonu Yüksek Lisans Tezi, Muğla.

Bai Y.X., Li Y.F., Yang Y., Yi L.X. 2006. Covalent Immobilization of Triacylglycerol Lipase onto Functionalized Novel Mesoporus Silica Supports. Journal of Biotechnology. 125: 574-582.

Bai, Z.W., Zhou, Y.K. 2004. A Novel Enzyme Support Derived From Aminated Slica Gel and Polysuccinimide: Preparation and Application For The Immobilization Of *Porcine Pancreatic* Lipase. Reactive Functional Polymers, 59: 93-98.

Bajpai, P., Margaritis, A. 1985. Immobilization of *Kluyveromyces marxianus* Cells Containing Inulinase Activity in Open Pore Gelatin matrix 1. Preparation and Enzymic Properties. Enzym. Microb. Technol. 7: 373–376.

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

Balcao, V.M., Malcata, F.X. 1998. Lipase Catalyzed Modification of Milkfat, Biotechnology Advances, 16: 309-341.

Baldessari, A., Bruttomesso, A.C., Gros, E.G. 1996. Lipase-catalyzed Region Selective Deacylation of Androstane Derivatives. Helv. Chim. Acta 79: 999–1004.

Barrier, S., Rigby, A.S, Diego-Taboada, A., Thomasson, M.J., Mackenzie, G., Atkin,

S.L. 2010. Sporopollenin Exines: A Novel Natural Taste Masking Material. Food Science and Technology, 43: 73-76.

Basri, M., Ampon, K., Yunus, W.M.Z., Razak, C.N.A, Salleh, A.B., 1994, Immobilization of Hydrophobic Lipase Derivatives on the Organic Polymer Beads. J. Chem. Technol. Biotechnol. 59: 37–44.

Basri, M., Yunus, W. M.Z.W., Yoong, W.S., Ampon, K., Razak, C.N.A., Salleh, A.B. 1996, Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Synthetic Polymer Beads for Use in The Synthesis of Fatty Esters. J. Chem. Technol. Biotechnol. 66: 169–173.

Battinelli, L., Cernia, E., Delbo, M., Ortaggi, G., Pala, A., Soro, S. 1996, New Class of Poly (vinyl Alcohol) Polymers as Column-Chromatography Stationary Phases for *Candida rugosa* Lipase Isoforms Seperation. J. Chromatogr. A., 753: 47-55.

Bayramoglu, G., Arıca, M.Y. 2008, Preparation of poly(glycidylmethacrylate–methylmethacrylate) Magnetic Beads: Application in Lipase Immobilization, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 55: 76–83.

Bayramoglu, G., Kaya, B., Arıca, M.Y. 2005, Immobilization of *Candida rugosa* Lipase onto Spacer-arm Attached poly(GMA-HEMA-EGDMA) Microspheres. Food Chem. 92: 261–268.

Beisson, F., Tiss A., Riviere, C., Verger, R. 2000, Methods for Lipases Etection and Assay: A Critical Review. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 102; 133-153.

Beitz, J., Schellemberger, A., Lasch, J., Fischer, J. 1980, Catalytic Properties and Electrostatic Potential of Charged Immobilized Enzyme Derivatives. Pyruvate Decarboxylase Attached to Cationic Polystyrene Beads of Different Charge Densities. Biochim. Biophys. Acta 612: 451–454.

Bender, M.L., Momiyama, M. 1978. Cyclodextrin Chemistry; Springer: Berlin.

Benjamin, S., Pandey, A. 1995, Lipase Production by *Candida rugosa* in Both Solid and Liquid Fermentation-a Comparative. Proc. Louis Pasteur's Cent. Symp. Trivandrum, India, p. 11.

Benjamin, S., Pandey, A. 1996, Optimization of Liquid Media for Lipase Production by *Candida rugosa*. Bioresource Technol. 55: 167–170.

Benjamin, S., Pandey, A. 1996b, Packed-bed Bioreactor System for

Overproduction of Lipase by Immobilized *Candida rugosa*. Proc. 37th Annual Conference, AMI, Madras, India, p. 83.

Benjamin, S., Pandey, A. 1996c, Lipase Production by *Candida rugosa* on Copra Waste Extract. Indian J. Macrobiol. 36: 201-204.

Benjamin, S., Pandey, A. 1997, Enhancement of Lipase Production During Repeated Batch Culture Using Immobilized *Candida rugosa*. Process Biochem. 32: 257-260.

Benjamin S., Pandey A. 1998a, *Candida rugosa* Lipases: Molecular Biology and Versatility in Biotechnology, Yeast 14: 1069–1087.

Benjamin, S., Pandey, A. 1998. *Candida rugosa* and its Lipases-a Retrospect. J. Sci. Ind. Res. 57: 1-9.

Betancor, L., Lopez-Gallego, F., Hidalgo A., Alonso-Morales N., Dellamora-Ortiz G., Guis´san J.M., et al., 2006, Preparation of a Very Stable Immobilized Biocatalyst of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*, J. Biotechnol. 121: 284–289.

Betigeri, S.S., Neau, S.H. 2002, Immobilization of Lipase Using Hydrophilic Polymers in the Form of Hydrogel Beads. Biomaterials 23: 3627–3636.

Bhaskar, M., Aruna, P., Jeevan, R.J.G., Radhakrishnan, G. 2004. β-Cyclodextrin-Polyurethane Polymer as Solid Phase Extraction Material for The Analysis of Carcinogenic Aromatic Amines. Analytica Chimica Acta, 509: 39.

Bhatia, R.B., Brinker, C.J., Ashley, C.S., Haris, T.M., 1998, Synthesis of Sol-gel Matrices for Encapsulation of Enzymes Using an Aqueous Routes, Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 519: 183-190.

Bhushan I., Parshad R., Qazi G.N. 2007. Macroporous Beads For Lipase Immobilization: Kinetic Resolution of A Racemic Drug Intermediate, *Journal of* Bioactive and Compatible, Polymers, Vol. March 22.

Bhushan I., Parshad R., Qazi G. N., Ingavle G., Rajan C.R., Ponrathnam S., Gupta V.K. 2008, Lipase Enzyme Immobilization on Synthetic Beaded Macroporous Copolymers for Kinetic Resolution of Chiral Drugs Intermediates, Process Biochemistry, 43: 321-330.

Bianchi, D., Cesti, P., Golini, P., Spezia, S., Garavaglia, C. and Mirenna, L. 1992,

Enzymatic Preparation of Optically Active Fungicide Intermediates in Aqueous and in Organic Media. Pure Appl. Chem. 64: 1073–1078.

Bickerstaff, G.F. 1984, Application of Immobilised Enzymes to Fundamental Studies on Enzyme Structure and Function. In: Wiseman A. (Ed.) Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology. Ellis Horwood, pp 162–201, Chichester, UK.

Bjokling, F., Godtfredsen, S.E., Kirk, O. 1991, The future Impact of Industrial Lipases. Trends in Biotechnology, 9: 360-363.

Blanco, R.M., Terreros, P., Munoz, N., Sera, E. 2007, Ethanol Improves Lipase Immobilization on a Hydrophobic Support J. Mol. Catal. B. Enzym 47: 13-20.

Bornscheuer, U.T., Kazlauskas, R.J. 1999, Hydrolases in organic synthesis. Weinheim: Wiley-VCH.

Bosetti, A., Bianchi, O., La-Porta, P., Bettarini, F. and Massimini, S. 1994, Chemo-enzymatic Synthesis of Optically Pure 1,3,4-oxadiazol-2(3H)-ones with Acaricidal Activity. J. Agric. Food. Chem. 42: 2596–2599.

Bosley, J.A., Claytom, J.C. 1993, Blueprint for a Lipase Support: Use of Hydrophobic Controlled-pore Glasses as Model Systems, Biotech. Bioeng. 43: 934-938.

Bouwer, S.T., Cuperus, F.P., Derksen, J.T.P. 1997, The Performance of Enzyme-Membrane Reactors with Immobilized Lipase. Enzyme and Microbial Technology, 21: 291-296.

Bradford, M.M. 1976, A rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Jensen, B.H., Norskov, L., Thim, L., Merge, U. 1990, A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Center of a Triacylglcerol Lipase, Letter to Nature 343: 767-770.

Brahim, S., Narinesingh, D., Guiseppi- Elie, A. 2002, Kinetics of Glucose Oxidase Immobilized in p(HEMA)-hydrogel Microspheres in a Packed-bed Bioreactor. J. Mol. Catal. B. Enzym. 18: 69–80.

Brandenberger, H. 1955, Methods for linking enzymes to insoluble carriers. Angew. Chem. 67: 661.

Braun, S., Rappoport, S., Zumsan, R., Avnir, D., Ottolenghi, M. 1990, Biochemically Active Sol–gel Glasses, The Trapping of Enzymes. Mater Lett. 10: 1-5.

Brena, B., Rydén, L., Porath, J. 1994, Immobilization of β-galactosidase on metal-chelated-substituted gels. Biotechnol. Appl. Biochem. 19: 217-231.

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

Brooks J., P.R. Grant, M. Muir, P. Van Gijzel. in Sporopollenin, G. Shaw, Eds., Academic Press, London 1971, pp. 305-348.

Bryjak J., Bachmann P.B., Melizewska I., Trochimczuk A., Kolarz M.N. 1997, Chem. Eng. J. 65 :249–256.

Buschmann, H:J:, Knıttel, D., Schollmeyer, E. 2001, New Textile Applications of Cyclodextrins. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 40: 169.

Buschmann, H-J., Schollmeyer, E. 2002. Applications of Cyclodextrinsin Cosmetic Products, J. Cosmet Sci. 53: 185-191.

Cabral, J.M.S., Kennedy, J. F 1991, Covalent and Coordination Immobilization of Proteins. In: Protein immobilization. Fundamentals and Applications (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, pp. 73–138, New York, N.Y.

Cabral, J. M. S., Novais, J. M., Kennedy J. F. 1986, Immobilization Studies of Whole Microbial Cells on Transition Metal Activated Inorganic Supports. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23, 157-162.

Campbell, D.H., Luescher, F.L., Lerman, L.S. 1951, Immologic Adsorbents. I. Isolation of Antibody by Means of a Cellulose-protein Antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 37: 575-578.

Can, K., Ozmen, M., Ersoz, M. 2009, Immobilization of Albumin on Aminosilane Modified Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles and Its Characterization. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 71: 154-159.

Candenas, F., Sde Castro, M., Sanchez-Mantero, J. M., Sinister, V. 2001, Novel Microbial Lipases, Catalytic Activity in Reactions in Organic Enzyme and Microbial Technology, 28:145-154.

Cao, L., 2006, Carrier-bound Immobilized Enzymes Principles, Applications, and Design, Wiley-VCH, The Netherlands.

Cao, L.Q., Van Langen, L., Sheldon, R.A. 2003, Immobilised enzymes carrier-bound or carrier free?, Curr. Opin. Biotechnol. 14: 387-394.

Carbone, K., Casarci M., Varrone M., 1999, Crosslinked poly(vinyl alcohol) Supports for The Immobilization of a Lipolytic Enzyme, J. of Appl. Polymer Science, 74: 1881-1889.

Caron, G., Kazlauskas, R. J. 1993. Sequential Resolution of (2,3)-butanediol in Organic Solvent Using Lipase. Tetrahedron: Asymmetry. 4: 1995–2000.

Castro, H.F., Oliveira, P.C., Soares, C.M.F. Zanin, G.M. 1999, Immobilization of Porcine Pancreatic Lipase on Celite for Application in the Synthesis of Butyl Butyrate in a Nonaqueous System, JAOCS, 76: 147-152.

Châabouni, M.K., Bouaziz, I., Boufi, S., Rego, A.M.B, Gargouri Y. 2008, Physical Immobilization of *Rhizopus oryzae* Lipase onto Cellulose Substrate: Activity and Stability Studies, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 66: 168–177.

Chang, T.M.S. 1977, Medical application of immobilised enzymes and proteins, Vols I and II, Plenum Press, New York.

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 J. Am. Chem. Soc. 104: 7294–7299.

Chen, J.C., Tsai S.W. 2000. Enantioselective Synthesis of (S)-Ibuprofen Ester Prodrug in Cyclohexane by Candida rugosa Lipase Immobilized on Accurel MP1000. Biotechnol. Prog. 16: 986-992.

Chibata, I. 1978, Immobilized Enzyme. Kodansha Ltd., Halsted Press, Tokyo, Japan.

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

Cho S.W. Rhee J.S. 1993, Immobilization of Lipase for Effective Interesterification of Fats and Oils in Organic Solvent, Biotech. Bioeng. 41: 204-210.

Chunhua Y., Tao L., Tianwe T. 2006, Synthesis of Vitamin A Esters by

Immobilized *Candida* sp. Lipase in Organic Media, Chinese J. Chem. Eng. 14: 81-86.

Cipiciani, A., Bellezza, F. 2002, Primary Allenic Alcohols of High Optical Purity via Lipase Catalyzed Resolution. J. Mol. Catal. B: Enzyme 17: 261–266.

Cipiciani, A., Fringuelli, F., Scappini, A.M. 1996. Enzymatic Hydrolysis of acetoxy- and phenethyl Benzoates by *Candida cylindracea* Lipase. Tetrahedron 52: 9869–9876.

Clark, L.C. Jr, Lyons, C. 1962, Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. Ann. N.Y. Acad. Sci. 102: 29-45.

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. J. Org. Chem. 60: 212–217.

Crini, G. 2003. Studies on Adsorption of Dyes on beta-Cyclodextrin Polymer. Bioresour. Technology. 90, 193–198.

Cristallini, C.L.L., Cascone, M.G., Polacco, G., Lupinacci, D., Barbani, N. 1997, Enzyme-based Bioartificial Polymeric Materials: the α- amylase–poly(vinyl alcohol) System. Polym. Int. 44: 510–516.

Dave, R., Madamwar, D., 2006, Esterification in Organic Solvents by Lipase Immobilized in Polymer of PVA-alginate-boric Acid**.** Process Biochem. 41: 951-955.

Del Valle, E.M.M. 2004. Cyclodextrin and Their Uses: a review. Process Biochemistry, 39: 1033-1046.

Deng, H.T., Xu, Z.K.*,* Dai, Z.W., Wu, J., Seta, P., 2005, Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase on Polypropylene Microfiltration Membrane Modified by Glycopolymer: Hydrolysis of Olive Oil in Biphasic Bioreactor, Enzyme and Microbial Technology 36: 996-1002.

Denizli, A, Yavuz, H, Garipcan, B, Arica, M.Y. 2000, Non-porous Monosize Polymeric Sorbents: Dye and Metal Chelate Affinity Separation of Lysozyme. J. Appl. Polym. Sci. 76: 115–124.

Desai, P.D., Dave, A.M., Devi, S. 2006, Alcoholysis of Salicornia Oil Using Free and Covalently Bound Lipase onto Chitosan Beads, Food Chemistry 95: 193-199.

Desai, P.D., Dave, A.M., Devi S. 2004, Entrapment of Lipase into K-carrageenan Beads and Its Use in Hydrolysis of Olive Oil in Biphasic System, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 31: 143-150.

Dickey, F.H. 1955, Specific Adsorption. J. Phys. Chem. 59: 695-707.

Dodziuk, H. 2006, Cyclodextrins and Their Complexes Chemistry, Analytical Methods, Applications, WILEY-VCH, Weinheim.

Drobník, J., Labsky, W., Kudlvasrová, H., Saudek, V., Svec, F. 1982, The Activation of Hydroxy Groups of Carriers with 4-nitrophenyl and *N* Hydroxysuccinimidyl Chloroformates. Biotechnol. Bioeng. 24: 487–493.

Dunlap, B.R. 1974. Immobilised Chemicals and Affinity Ahromatography, Plenum Press, New York.

Dyal, A., Loos, K., Noto, M., Chang, S.W., Spagnoli, C., Kurikka, V. P.M. Shafi, Abraham Ulman, Cowman M., ve Gross R.A. 2003, Activity of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on *ç*-Fe_2O_3 Magnetic Nanoparticles, J. Am. Chem. Soc. 125: 1684-1685.

Ersoz, M., Pehlivan, E., Duncan, H.J., Yıldız, S., Pehlivan, M. 1995, Ion Exchange Equilibria of Heavy Metals in Aqueous Solution on New Chelating Resins of Sporopollenin, React. Polym. 24: 195-202.

Faber, K., Ottolina, G., Riva, S. 1993, Selectivity-enhancement of Hydrolase Reactions, Biocatalysis 8: 91-132.

Fadıloğlu, S. 1996. Kinetics of Olive Oil Hydrolysis by Free and Immobilised *Candida rugosa* Lipase, Ph.D. Thesis, University of Gaziantep.

Fadiloglu S., Soylemez Z. 1998, Olive Oil Hydrolysis by Celite-immobilized *Candida rugosa* Lipase, J. Agric. Food Chem. 46: 3411-3414.

Fernandez-Lafuente, R., Armise´n, P., Sabuquillo, P., Ferna´ndez-Lorente, G., Guisan, J.M. 1998, Immobilization of Lipases by Selective Adsorption on Hydrophobic Supports, Chemistry and Physics of Lipids, 93: 185–197.

Fleming, H.P. 1991. Mixed Cultures in Vegetable Fermentation. In Zeikus, J. G. and Johnson, E. A. (Eds), Mixed Cultures in Biotechnology, McGraw- Hill, pp. 69–103.

Franssen, M.C.R., Jongejan, H., Kooijmau, H., *et al*. 1996. Resolution of a

Tetrahydrofuran Ester by *Candida rugosa* Lipase and an Examination of CRL's Stereochemical Preference in Organic Media. Tetrahedron Asymmetry, 7: 497–510.

Frömming, K.H., Szejtli, J. 1994. Cyclodextrins in Pharmacy, Kluwer: Dordrecht, Boston, London.

Fuentes, I.E., Viseras, C.A., Ubiali, D., Terreni, M., Alca´ntara, A.R. 2001, Different Phyllosilicates as Supports for Lipase Immobilisation, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 11: 657-663.

Gaffar, M.A.**,** El-Rafie, S.M., El-Tahlawy, K.F. 2004. Preparation and utilization of ionic exchange resin via graft copolymerization of β-CD itaconate with chitosan, Carbohydrate Polym., 56, 387-396.

Gao, X. 2004, Immobilization of Lipases via Sol-Gel Procedures and Application of the Immobilized Lipases in Oleochemical Reactions, pHD Thesis, University of Nebraska, Lincoln.

Gao, X.G., Cao, S.G., Zhang, K.C. 2000. Production, Properties and Application to Nonaqueous Enzymatic Catalysis of Lipase from a Newly Isolated *Pseudomonas* strain. Enzyme and Microbial Technology, 27: 74-82.

Garrett, R., Grisham, C. 1999, Biochemistry, 2nd edition, edited by S. Kiselica, Saunder College Publishing, pp 426-435, Orlando, Florida.

Gemeiner, P. 1992, Materials for enzyme engineering. In: Gemeiner P (Ed) Enzyme Engineering. Ellis Horwood, pp 13-119, New York.

Ghanem, A., Aboul-Enein, H.Y. 2005, Application of Lipases in Kinetic Resolution of Racemates, Chirality, 17:1-15.

Ghanema, A, Schurig, V. 2003, Entrapment of *Pseudomonas cepacia* Lipase with Peracetylated â-cyclodextrin in sol-gel: Application to the Kinetic Resolution of Secondary Alcohols. Tetrahedron Asymmetry*,* 14: 2547–2555.

Ghosh, P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P., Davidson, S. 1996, Microbial Lipases: Production and Applications. Science Progress. 79: 119-157.

Gill, I. 2001, Bio-doped Nanocomposite Polymers: Sol-gel Bioencapsulates. Chem Mater. 13: 3404–3421.

Giorno, L., Amore, E.D., Mazzei, R., Piacentini, E., Zhang, J., Drioli, E., Cassano, R.,

Picci, N. 2007, An Innovative Approach to Improve the Performance of a two Separate Phase Enzyme Membrane Reactor by Immobilizing Lipase in Presence of Emulsion, Journal of Membrane Science, 295: 95-101.

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, J. Chromatogr. 347: 11-23.

Glazer, A.N., Bar-Eli, A., Katchaski, E. 1962, Preparation and Characterization of Polystyrosyl Trypsin, J. Biol. Chem. 237: 1832–1838.

Gode, F., Pehlivan, E. 2007, Sorption of Cr(III) onto Chelating b-DAEG-Sporopollenin and CEP-poropollenin Resins, Bioresource Technol. 98: 904.

Goto, M., Noda, S., Kamiya, N., Nakashio, F. 1996, Enzymatic Resolution of Racemic Ibuprofen by Surfactant Coated Lipase in Organic Media. Biotechnol. Lett. 18: 839-844.

Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., *et al.* 1993, Insights into Interfacial Activation from an Open Structure of *Candida rugosa* Lipase. J. Biol. Chem. 268: 12843-12847.

Grubhofer, N., Schleith, L. 1953, Modifizierte Ionenaustauscher als Spezifische Adsorbentien, Naturwis, 40: 508.

Grubhofer, N., Schleith L. 1954. Protein Coupling with Diazotized Polyaminostyrene, Hoppe Seylers Z Physiol. Chem. 297: 108-112.

Gu, Q.M., Chen, C.S., Sih, C.J. 1986, A facile Enzymatic Resolution Process for The Preparation of Naproxen, Tetrahedron Lett. 27: 1763-1766.

Guisán, J.M. 1988, Agarose-aldehyde Gels as Supports for Immobilization-Stabilization of Enzymes, Enzyme Microb. Technol. 10: 375–382.

Guisan, J.M. 2006. Immobilization of Enzymes and Cells. Humana Press, Totowa, New Jersey.

Guiseppi-Elie, A., Sheppard, N.F. Jr, Brahim, S., Narinesingh, D. 2001, Enzyme microgels in packed-bed bioreactors with downstream amperometric detection using microfabricated interdigitated microsensor electrode arrays, Biotechnol. Bioeng. 75: 475–484.

Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. 2004, Bacterial lipases: an Overview of Production,

Purification and Biochemical Properties. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64: 763-781.

Guo, Z., Bai, S., Sun, Y. 2003, Preparation and Characterization of Immobilized Lipase on Magnetic Hydrophobic Microspheres Enzyme Microb. Technol. 32: 776-782.

Ha, K.J., Lindsay, R.C. 1993, Release of Volatile Branched-chain and Other Fatty Acid from Ruminant Milk Fats by Various Lipases. J. Dairy Sci. 76, 677-690.

Haalck, L., Kallabis, B., Schoemaker, M., Cammann, K., Spener, F. 1991, Lipases for Biosensors. Fat. Sci. Technol. 93: 415-416.

Hara, K., MikunI, K., Hara K., Hashimoto, H. 2002. Effects of Cyclodextrins on Deodoration of Aging Odor. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 44: 241–245.

Haraldsson, G. 1992, The Application of Lipases in Organic Synthesis. In: Patai S, editor. The Chemistry of Acid Derivatives. New York: John Wiley & Sons 2: 1396 -1467.

Harrington, P.J., Lodewijk E. 1997, Twenty Years of Naproxen Technology, Org. Process Res. Dev. 1: 72–76.

Harrison, I.T., Lewis, B., Nelson, P., Rooks, W., Rosszowski, A., Tomolonis, A., Fried, J.H. 1970, Nonsteroidal anti-inflammatory Agents. I. 6-Substituted 2-Naphthylacetic Acids, J. Med. Chem. 13: 203–205.

Hartmeier, W. 1988, Immobilized Biocatalysts, Springer-Verlag, Berlin.

Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A. 2006, Industrial Applications of Lipases. Enzyme Microb. Technol. 39: 235-251.

Hedges, R.A. 1998. Industrial Applications of Cyclodextrins. Chem Rev. 98: 2035–44.

Hench, L.L., West, J.K. 1990, The Sol-del Process. Chem. Rev. 90: 33–72.

Hertzberg, S., Kvittingen, L., Anthonsen, T., Skjak-Braek, G., 1992, Alginate as Immobilization Matriks and Stabilizing Agent in a Two-Phase System: Application in Lipase-Catalysed Reactions. Enzyme Microb. Technol. 14: 42-47.

Hornby, W.E., Goldstein, L. 1976, Immobilization of Enzymes on Nylon. In:

Methods in Enzymology, volume XXXIV**,** (Jacoby, W.B. and Wilchek, M., eds.), Academic Press, pp. 118–134, New York, N.Y.

Hoyos, P., Buthe, A.*,* Ansorge-Schumacher, M.B.*,* Sinisterra, J.V., Alc´antara, A.R. 2008, Highly Efficient One Pot Dynamic Kinetic Resolution of Benzoins with Entrapped *Pseudomonas stutzeri* Lipase, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 52–53: 133–139.

Huang, F.C., Ju Y.H. 1994, Improved Activity of a Lipase by Vacuum Drying on a Hydrophobic Microporous Support, Biotechnol. Tech. 8: 827-830.

Huang, X.J., Ge D., Xu Z.K. 2007, Preparation and Characterization of Stable Chitosan Nanofibrous Membrane for Lipase Immobilization, Eur. Polym. J. 43: 3710-3718.

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.

Ihara, M., Suzuki, M., Hirahayashi, A., Tokunaga, Y., Fukumoto, K. 1995, Preparation of Chiral Building Blocks for Synthesis of Aconitium Alkalids. Tetrahedron Asymmetry, 8: 1829-1832.

http://.iisc.ernet.in/~currsci/july10/articles18.htm.

Ikediobi, C.O, Stevens, M., Latinwo, L. 1998, Immobilization of Linamarase on Non-porous Glass Beads, Process Biochemistry, 33: 491-494.

Illanes, A. 2008, Enzyme Biocatalysis Principles and Applications, Springer, Chile.

Imamura, S., Takahashi, M., Misaki, H., Matsuura, K. 1989, Method and Reagent Containing Lipases for Enzymatic Determination of Triglycerides, West Germany Patent 3,912,226.

Inman, J. K., Dintzis, H. M. 1969, The Derivatization of Cross-linked Polyacrylamide Beads. Controlled Introduction of Functional Groups for The Preparation of Special-purpose, Biochemical Adsorbents. Biochemistry 8: 4074-4082.

Iwai, M. 1990, Fundamentals and Use of Enzyme Lipase 7. Application of lipase. Yushi, 43: 66-72.

Iwai, M., Tsuyisaka, M., Fukumoto, J. 1964, Lipase II. Hydrolytic and

Esterifying Actions of Crystalline Lipase of *Aspergillus niger*, Genetic Applied Microbiololgy, 10: 13-22.

Jachamanian, I., Schulte, E., Mukherjee, K.D. 1996, Substrate Selectivity in Esterification of Less Common Fatty Acids Catalysed by Lipases From Different Sources. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44: 563–567.

Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T. 1999, Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Threedimensional Structures and Biotechnological Applications of Lipases. Annu. Rev. Microbiol. 53: 315-351.

Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Van Heuvel, M., Misset, O. 1994. Bacterial lipases. FEMS Microbiol. Rev. 5: 29–63.

Jaeger, K.E., Reetz, M.T. 1998, Microbial Lipases form Versatile Tools for Biotechnology. TIBTECH, 16: 396-403.

Janczarski, I., Mazur, A., Witkowski. K., Lubaszka, E. 1976, Activity of Cholinesterase Included on Silica Gel. Acta. Physiol. Pol. 27: 301–306

Janssen, P.H., Monk, C.R., Morgan, H.W., 1994. A thermophilic, Lipolytic Bacillus sp., and Continuous Assay of Its p-nitrophenyl-palmitate Esterase Activity, FEMS Microbiol. Lett. 120: 195–200.

Jensen, R.G. 1983, Detection and Determination of Lipase (acylglycerol hydrolase) Activity from Various Sources. Lipids 18: 650–657.

Jin, O.F. 1995, Pack Base Agent Utilizing Extraction Residue of Plant Ash and Its Preparation. PN: J.P. 07082136.

Jin, W., Brennan, J.D. 2002, Properties and Applications of Proteins Encapsulated within Sol–gel Derived Materials. Analytica Chimica Acta, 461: 1–36.

Johnson, P., Whateley, T.L. 1971, Use of Polymerizing Silica Gel Systems for Immobilization of Trypsin. J. Colloid Interface Sci. 37: 557-563.

Junco, S., Casimiro, T.', Ribeiro, N.; Cabral Marques H. 2002. A Comparative Study of Naproxen Beta Cyclodextrin Complexes Prepared by Conventional Methods and Using Supercritical Carbon Dioxide. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 44: 117-121.

Kågedal, L. 1998, Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. In: Protein Purification (Janson, J. C. and Rydén, L., eds.), Wiley-VCH, pp. 311–342, New York, NY.

Kamal, A., Rao, M.V. 1994, Enzyme Catalyzed Synthesis of (S) Propanolamines. Tetrahedron Asymmetry, 5: 1881–1882.

Kamori M., Horit T., Yamashita Y., Hirose Y., Naoshima Y. 2000, Immobilization of Lipase on a New Inorganic Ceramics Support, Toyonite and The Reactivity and Enantiyoselectivity of the Immobilized Lipase. J. Mol. Catal. B. Enzymatic, 9: 269-274.

Kamori, M., Yamashita, Y., Naoshima, Y. 2002, Enzyme Immobilization Utilizing a Porous Ceramics Support for Chiral Synthesis, Chirality 14: 558-61.

Karaca, N. 2006, Poli (N,N-Dimetilakrilamit-Ko-Akrilamit) ve Poli(N-İzopropilakrilam_T-Ko-Akrilamit)/Karragenan Polimerler Kullanılarak Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Karakus, E., Pekyardımcı, S. 2009, Immobilization of Apricot Pectinesterase (*Prunus armeniaca* L.) on Porous Glass Beads and Its Characterization 56: 13-19.

Kartal, F. 2004, Pankreatik Lipazın Siyanurik Klorür ile Aktive Edilmiş Polivinil Alkol (PVA) Üzerine İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu, Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornava, İzmir.

Karube, I., Sode, K. 1988, Biosensors for lipids. In: Applewhite TH, editor. Proceedings of the World Conference on Biotechnology in the Fats and Oils industry. Campaign, USA: American Oil Chemists Society, p. 215–8.

Kato, K., Katayama, M., Fugii, S., Fukaya, H. and Kimoto, H. 1996, Optical Resolution of 2,2,2-trifluoro-1-(9-phenanthryl) Ethanol *via* Enzymatic Hydrolysis of Its Activated Ester. J. Ferment. Bioeng. 81: 206–211.

Kawakami, K., Takahashi, R., Shakeri, M., Sakai, S. 2009, Application of a Lipase-immobilized Silica Monolith Bioreactor to the Production of Fatty Acid Methyl Esters. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 57: 194-197.

Kawashima, J., Izumida, H., Hirama, T. 1998, Adjustment of specific gravity of granules for enzyme or microorganism immobilization. Jpn Kokai Tokkyo Koho, JP 10,139,803.

Kayaalp O. 2000. Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe Taş, 2: 1026-1059, Ankara.

Kazlauskas, R.J., Bornscheuer, U.T. 1998, in Biotechnology: Biotranformations with

Lipases (Vol. 8), pp 37-191, VCH.

Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S. 1985, Immobilization of Biocatalysts by Metallink/ Chelation Processes. In: Immobilized Cells and Enzymes, (Woodward, J., ed.), IRL, pp 19–37, Oxford, UK.

Kermasha, S., Bisakowski B., 1998, The effect of Immobilization on the Hydrolytic/Interesterification Activity of Lipase from *Rhizopus niveus.* Journal of the American Oil Chemists' Society, 75: 1791-1799.

Khurana, A.L., Ho, C.T. 1990, Immobilization of Pancreatic Lipase on Silica Support to Study Lipolysis and Reverse Hydrolysis Reaction, Journal of Liquid Chromatography, 13: 715-725.

Kilinc, A., Onal, S., Telefoncu, A. 2002, Chemical Attachment of *Porcine Pancreatic* Lipase to Crosslinked Poly(vinyl alcohol) by Means of Adipoyldichloride. Process Biochemistry, 38: 641-647.

Kim, M.G., Lee, E.G., Chung, B.H. 2000, Improved Enantioselectivity of *Candida rugosa* Lipase towards Ketoprofen Ethyl Ester by a Simple two-step Treatment. Process Biochemistry, 35: 977–982.

Kircka, L.J., Thorpe, G.H.G. 1986, Immobilised Enzymes in Analysis. Trends Biotechnol, 4: 253-258.

Kise, H., Tomiuchi, Y. 1991. Unusual Solvent Effect on Protease Activity and Effective Optical Resolution of Amino Acids by Hydrolytic Reactions in Organic Solvents. Biotechnol Lett. 13: 317-322.

Klein, M.D., Langer, R. 1986, Immobilised Enzymes in Clinical Medicines: an Emerging Approaches to New Drug Therapies. Trends Biotechnol, 4: 179–186.

Klibanov, A.M. 1989, Enzymatic Catalysis in Anhydrous Organic Solvents. Trends Biochem. Sci. 14: 141-144.

Klibanov, A.M. 1990, Asymetric Trasformations Catalyzed by Enzymes in Organic Solvents. Accounts of Chemical Research, 23: 114-120.

Knezevic, Z., Milosavic, N., Bezbradica, D., Jakovljevic, Z., Prodanovi, R. 2006, Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Eupergit C supports by Covalent Attachment. Biochemical Engineering Journal, 30: 269–278.

Knezevic, Z., Mojovic, L., Adnadjevic, B. 1998, Palm Oil Hydrolysis by Lipase from

Candida cylindrecea Immobilized on Zeolite Type Y. Enzyme and Micro. Tech. 22: 275-280.

Kojima, Y., Shimizu, S., 2003. Purifi Cation and Characterization of the Lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. J. Bioscience and Bioengineering, 96: 219-226.

Koszelewski, D., Redzej, A., Ostaszewski, R. 2007, The Study on Efficient Hydrolases Immobilization for the Kinetic Resolution of the α-acetoxyamides. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 47: 51–57.

Krajewska, B. 2004, Application of Chitin- and Chitosan-based Materials for Enzyme Immobilizations: a review. Enzyme and Microbial Technology 35: 126–139.

Krause, J., Rohen, A., Winter, B. 1990, Biosensors hit or flop. Chem. Ind. 113: 74–75.

Kreger-van Rig, N. J. M. (Ed.) (1984). The Yeasts-A Taxonomic Study. Elsevier, 785 pp 70.

Lalonde, J. 1995, The Preparation of Homochiral Drugs and Peptides Using cross-linked Enzyme Crystals. Chim. Oggi. 13: 33–37.

Lange, C.R. 1993, Fermentation Industry. Water Environ. Res. 65: 400–402.

Langrand, G., Rondot, N., Triantaphilides, C. And Baratti, S. 1990, Short Chain Flavour Esters Synthesis by Microbial Lipases. Biotechnol. Lett. 12: 581–586.

Laurinavicins, V., Kurtinaitiene, B., Gureviciene, V., Boguslavsky, L., Geng, L., Skotheim, T. 1996, Amperometric Glyceride Biosenser. Anal. Chim. Acta 330: 159-166.

Lawson, T.G., Regnier, F.E.,Wieth, H.L. 1983, Separation of Synthetic Oligo-nucleotides on Columns of Microparticulate Silica Coated with Crosslinked Polyethylene-imine. Anal. Biochem. 133: 85-93.

Lee, C.K, Low, K.S., Gan, P.Y. 1999. Removal of Some Organic Dyes by Acid-Treated Spend Bleaching Earth. Process Biochem. 34: 451-465.

Lee, D.H., Kim, J.M., Kang, S.W., Lee, J.W., Kim, S.W. 2006. Pretreatment of Lipase with Soybean oil Before Immobilization to Prevent Loss of Activity. Biotechnol. Lett. 28: 1965.

Lee, K.Y., Lee, S. T. 1996, Continuous Process for Yeast Biomass Production from Sugar Beet a Stillage by a Novel Strain of *Candida rugosa* and Protein Profile of the Yeast. J. Chem. Technol. Biotechnol. 66: 349-354.

Létant, S.E., Hart, B.R., Kane, S.R., Hadi, M.Z., Shields, S.J., Reynolds J.G. 2004, Enzyme. Immobilization on Porous Silicon Surfaces. Adv. Mater. 16: 689-693.

Li, J., Chen, B., Wang, X., Goh, S.H. 2004, Preparation and Characterization of Inclusion Complexes Formed by Biodegradable Poly(ε -caprolactone)–poly(tetrahydrofuran)–poly(ε -caprolactone) Triblock Copolymer and Cyclodextrins, Polymer 45: 1777-85.

Li S.F., Chen J.P., Wu W.T. 2007, Electrospun Polyacrylonitrile Nanofibrous Membranes for Lipase Immobilization. J. Mol. Catal. B: Enzyme 47: 117-127.

Liao, Y.C., Mei-Jywan, S. 2005, Novel Immobilized Metal Ion Affinity Adsorbent Based on Cross-linked β-cyclodextrin Matrix for Repeated Adsorption of α-amylase. Biochem. Eng. J. 23: 17–24.

Linko, Y.Y., Viskari, R., Pohjola, L., Linko, P. 1978, Cellulose Bead Entrapped Whole Cell Glucose Isomerase in Fructose Syrup Production. Enzym. Eng. 4: 345–347.

Liu, B., Hu, R., Deng, J. 1997, Characterization of Immobilization of an Enzyme in a Modified Y zeolite Matrix and its Application to an Amperometric Glucose Biosensor. Anal. Chem. 69: 2343-2348.

Liu L., Guo, Q-X. 2002. The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins, Jounal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 42: 1-14.

Livage, J. 1996, Bioactivity in Sol-gel Glasses. C. R. Acad. Sci., Ser. IIb: Mec. Phys. Chim. Astron. 322: 417-427.

Lopez-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Alonso, N., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Lafuente, R.F. 2005, Preparation of a robust biocatalyst of d-amino acid oxidase on sepabeads supports using the glutaraldehyde crosslinking method, Enzyme Microb. Technol. 37: 750-756.

Lotti, M., Tramontano, A., Longhi, S., *et al*. 1994. Variability within the *Candida*

rugosa Lipase Family. Protein Eng. 7: 531–535.

Lowe, C.R., Hans, M., Spibey, N., Drabble, W.T. 1980, The Purification of Inosine 5′-monophosphate Dehydrogenase from *Escherichia coli* by Affinity Chromatography on Immobilised Procion Dyes. Anal. Biochem. 104: 23–28.

Lowrier, A., Drtina, G.J., Klibanov, A.M. 1996, On the Issue of Interfacial Activation of Lipase in Nonaqueous Media. Biotechnol Bioeng. 50: 1–5.

Luckarift, H.R., Spain, J.C., Naik, J.C., Stone, M.O. 2004, Enzyme immobilization in a biomimetic silica support, Nat. Biotechnol. 22: 211–223.

Ma, M., Zhang, Y., Yu, W., Shen, H.Y., Zhang, H.G., Gu, N. 2003, Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. Colloids Surf. A, 212: 219-226.

MacRae, A.R., Hammond, R.C. 1985, Present and Future Application of Lipases. Biotechnol. Genetic Eng. Reviews 3: 193–217.

MacRae, A.R., Staines, H. 1994, Evaluation of Microbial Lipases as Fat Splitting Catalysts. Fat. Sci. Technol. 96: 430.

Maeda R., Tomida H., Matsumoto M., Kondo K. 1997, Novel Immobilization of Enzyme in Molecular Assembly of Nonionic Surfactant Adsorbed on Silica gel. J. Chem. Eng. Japan, 30: 910-915.

Malcata, F. X., Reyes, H. R., Garcia, H. S., Hill, C. G., Jr, Amundson, C.H. 1992, Kinetics and Mechanisms of Reactions Catalysed by Immobilized Lipases. Enzyme Microb. Technol. 14: 426–446.

Manecke, G., Singer, G. 1960, Chemical Transformation of Polystyrene. Makromol. Chem. 37: 119-122.

Margolin, A. L. 1993. Enzymes in the Synthesis of Chiral Drugs. Enzyme Microb. Technol. 15: 266-279.

Martinek, K., Mozhaev, V.V. 1985, Immobilization of Enzymes: an Approach to Fundamental Studies in Biochemistry. Adv. Enzymol. 57: 179–249.

Matsuma M., Sumi N., Ohmori K., Kondo K. 1998. Immobilization of Lipase in Microcapsules Prepared by Organic and Inorganic Materials. Process Biochemistry, 33: 535-540.

Matsumoto, M., Sumi, N., Ohmori, K., Kondo, K. 1998, Immobilization of Lipase in

Microcapsules Prepared by Organic and Inorganic Materials. Process Biochemistry, 33: 535, 540.

Matsumoto, M., Ohashi, K. 2003, Effect of Immobilization on Thermostability of Lipase from *Candida rugosa*. Biochemical Engineering Journal 14: 75–77.

Matsuno, H., Nagasaka, Y., Kurita, K., Serizawa, T. 2007, Superior Activities of Enzymes Physically Immobilized on Structurally Regular Poly(methyl methacrylate) Surfaces Chem. Mater. 19: 2174–2179.

Mattiasson, B., Kaul, R. 1991, Determination of Coupling Yields and Handling of Labile Proteins in Immobilization Technology. In: Protein immobilization. Fundamentals and Applications (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, pp 161–179, New York, NY.

Maury, S., Buisson, P., Pierre, A.C. 2002, Catalytic Activity of *Burkholderia (Pseudomonas)cepacia* Encapsulated in Silica Aerogels in Esterification and Hydrolysis as a Function of the Gel and Solvent Hydrophobicities J. Mol. Catal.B: Enz. 19: 279-278.

Maxim, S., Flondor, A. 1989, New Crosslinked Functionalized Acrylic Copolymers for Biotechnological Applications. Rev. Roum. Chim. 34: 1389–1395.

Maxim, S., Flondor, A., Carpov, A. 1987, Ionicbinding of Biologically Active Proteins on Cross-linked Acrylic Macromolecular Supports. Biotechnol. Bioeng. 30: 593–597.

Maxim, S., Flondor, A., Carpov, A., Rugina, V., Cojocaru, D., Bontas, I., Topala, N. 1986, Functionalized Crosslinked Acrylic Crosslinkings as Supports for Biologically Active Proteins. Biotechnol. Bioeng. 28: 294–296.

Maxim, S., Flondor, A., Pasa, R., Popa, M. 1992, Immobilised Pectolytic Enzymes on Acrylic Supports. Acta Biotechnol. 12: 497-507.

McArdle, R.N., Culver, C.A. 1994, Enzyme Infusion: a Developing Technology. Food Technol. 48: 85-89.

McCrae, A., Roehl, E.L., Brand, H.M. 1990, Bioesters. Seifen. Oele. Fette. Wachse, 116: 201-205.

McGee, H. 1986, On Food and Cooking: the Science and the Lore of the Kitchen. Unwin Hyman Ltd., 3 pp 89.

Mehta, R.V., Upadhyay, R.V., Charles, S. W., Ramchand, C.N. 1997, Direct

Binding of Protein to Magnetic Particles. Biotechnol. Tech. 11, 493-496.

Mesing, R. 1975. Immobilized Enzymes for Industrial Reactors. Academic Press, New York, NY.

Misset, O., Gerritse, G., Jaeger, K.E. et al. 1994, The Structure–function Relationship of the Lipases from *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. Protein Eng. 7: 523–529.

Misset, O., Lenting, H.B.M., Labout, J.J.M., Bolle, R., Oomen, A. J. A. M., Mulleners, L.J.S.M. 1994, Applications of Lipase in Household Detergents. Fat Sci. Technol. 96: 421.

Mitsubishi Elec. 1990, Blood analysis using enzyme electrode biosenser. PN: JP; J02145968.

Miyamoto, A., Shigeta, A., Tanaka, Y., *et al.* 1995, PN: EP; 65 8629.

Mohamed, M.A., Mohamed, T.M., Mohamed, S.A., Fahmy, A.S. 2000, Distribution of Lipases in the Geraminae. Partial Purification and Characterization of Esterase from Avena Fatua. Bioresource Technology, 73: 227-234.

Montero, S., Blanco, A., Virto, M.D., Landeta, L.C., Agud, I., Solazobal, R., Lascaray, J.M., De Renobales, M., Lioma, M.J., Sera, J.L. 1993, Immobilization of *Candida rugosa* Lipase and Some Properties of the Immobilized Enzyme. Enzyme Microb. Technol. 15: 239-247.

Moreno J.M., Sinisterra J.V. 1994, Immobilization of Lipase from *Candida Cylindracea* in Inorganic Supports. J. Mol. Catal. 93: 357-369.

Moriya, K., Tanizawa, K., Kanaoka, Y. 1989, Immobilised Chymotrypsin by Means of Schiff base Copper(II) Chelate. Biochem. Biophys. Res. Commun. 162: 408-414.

Mosbach, K., Andersson, L. 1977, Magnetic Ferrofluids for Preparation of Magnetic Polymers and Their Application in Affinity Chromatography. Nature, 270: 259–261.

Mosbach, K. 1971, Enzymes Bound to Artificial Matrixes. Sci. Amer. 224: 26-33.

Nagooi, T.K., Guo, Z.W., Sih, C.J. 1990, Enantioselective Biocatalysis-Optically Active Intermediates for Venturicidin Synthesis. Biocatalysis, 3: 119-128.

Nakano, H., Okuyama, Y., Iwasa, K., Hongo, H. 1994, A facile Lipase Catalyzed Resolution of 2-azabicyclo(2.2.1)hept-5-en-3-ones. Tetrahedron Asymmetry, 5: 1155-1156.

Nelson, J.M., Griffin, E.G. 1916, Adsorption of Invertase. J. Am. Chem. Soc. 38: 1109–1916.

Nemat-Gorgani, M., Karimian, K. 1986, Use of Hexadecyl Fractosil as a Hydrophobic Carrier for Adsorptive Immobilisation of Proteins. Biotechnol Bioeng. 28: 1037-1043.

Ngo, T.T., Laidler, K.J., Yam, C.F. 1979, Kinetics of Acetylcholinesterase Immobilized on Polyethylene Tubing. Can. J. Biochemistry 57: 1200-1203.

Nie, K., Xie, F., Wang, F., Tan, T. 2006. Lipase Catalyzed Methanolysis to Produce Biodiesel: Optimization of the Biodiesel Production. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 43: 142-147.

Noureddini, H., Gao, X. 2005, Philkana R.S., Immobilized *Pseudomonas cepacia* Lipase for Biodiesel Fuel Production from Soybean Oil. Bioresource Technology 96: 769–777.

Noya, F.C., Ferorelli, S., Franchini, C., Scilimati, A., Sinicropi, M. S., Tortorella, P. 1996, *Candida cylindracea* Lipase-mediated Kinetic Resolution of alpha-substituted alpha Aryloxy Acetic Acid Methyl Esters. Farmaco. 51: 293-296.

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 J. Ind. Eng. Chem. 13: 429–433.

Oguntimein, G.B. 1994, Lipase-catalysed Synthesis of Flavour Compounds in a Solvent-free Medium. Meded. Fac. Landbouwwet, Rijksuniv. Gent. 59: 2377.

Ollis, D.L., Shea, E., Cygler, M. et al. 1992, The α/βhydrolase fold. Protein Eng. 5: 197-211.

Orçaire, O., Buisson P., Pierre A.C. 2006, Application of Silica Aerogel Encapsulated Lipases in the Synthesis of Biodiesel by Transesterification Reactions. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 42: 106-113.

Ozcan, F., Ersoz, M., Yilmaz, M. 2009, Preparation and Application of Calix[4]arene-Grafted Magnetite Nanoparticles for Removal of Dichromate Anions, 29: 2378-2383.

Ozmen, M., Can, K., Akin, I., Arslan, G., Tor, A., Cengeloglu, Y., Ersoz, M. 2009,

Surface Modification of Glass Beads with Glutaraldehyde: Characterization and Their Adsorption Property for Metal Ions. J. Hazard. Mater. 171: 594-600.

Ozturk, N., Akgol, S., Arısoy, M., Denizli, A. 2007, Reversible Adsorption of Lipase on Novel Hydrophobic Nanospheres. Separation and Purification Technology, 58: 83-90.

Öztürk, B. 2001, Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports, Yüksek Lisans Tezi, İzmir Institute of Technology, İzmir, Turkey.

Öztürk, N. 2006, Hidrofobok Nanoyapılarda *Candida Rugosa* Lipaz İmmobolizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Paiva, A.L., Balcao, V.M., Malcata, F.X. 2000, Kinetics and Mechanisms of Reactions Catalyzed by Immobilized Lipases. Enzyme and Microbial Technology, 27: 187-204.

Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Fuentes, M., Fernandez-Lafuente R.,Guisan, J.M. 2002. Modulation of The Enantioselectivity of *Candida antartica B* Lipase via Conformational Engineering: Kinetic Resolutions of (±)-α-Hydroxy-phenylacetic Acid Derivatives. Tetrahedron Asymmetry, 13: 1337-1345.

Palomo, J.M., Munoz, G., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Fuentes, M., Guisan, J.M. Fernandez-Lafuente, R. 2003. Modulation of *Mucor miehei* Lipase Properties via Directed Immobilization on Different Hetero-functional Epoxy Resins Hydrolytic Resolutions of (R,S)-2-butyroly-2-phenylacetic acid. J. Mol. Catal B Enzym. 21: 201-210.

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V.T. 1999, The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology. Biotechnology and Applied Biochemistry, 29: 119-131.

Parikh, I., March, S., Cuatrecasas, P. 1974, Topics in the Methodology of Substitution Reactions with Agarose. In: Methods in Enzymology, volume XXXIV, Academic Press, pp 77–102, New York. NY.

Park, O.J., Park, H.G., Yang, J.W. 1996, Enzymatic Transesterification of

Monosaccharides and Amino Acid Esters in Organic Solvents. Biotechnol. Lett. 18: 473-478.

Passicos, E., Santarelli X., and Coulon D. 2004, Regioselective Acylation of Flavonoids Catalyzed by Immobilized *Candida antarctica* Lipase Under Reduced Pressure. Biotechnology Letters, 26: 1073–1076.

Paunov V.N., Mackenzie G., Stoyanov S.D. 2007, Sporopollenin micro-reactors for in-situ preparation, encapsulation and targeted delivery of active components. J. Mater. Chem. 17: 609–612.

Pehlivan, E. 1991, *Lycopodium clavatum*'dan Elde Edilen Ligant Değiştirici Reçinelerin Hazırlanması ve Sıvı Kolon Kromatografisinde Kullanılarak Nükleosid, Nükleik Asit Bazları, Aminlerin Ayrılması ve Kinetiğinin İncelenmesi, Doktora Tezi, S.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Pehlivan, E., Gode F. 2007, Sorption of Cr(III) onto chelating b-DAEG-sporopollenin and CEP-sporopollenin resins. Bioresource Technology 98: 904-911.

Penchreac'h, G., Baratti, J.C. 1996, Hydrolysis of *p*-nitrophenyl Palmitate in *n*-heptane by the *Pseudomanas cepacia* lipase: a Simple Test for The Determination of Lipase Activity in Organic Media. Enzyme Microb. Technol. 18: 417-422.

Pencreac'h, G., Baratti, J.C. 1997, Activity of *Pseudomonas cepacia* Lipase in Organic Media is Greatly Enhanced After Immobilized on a Polypropylene Support. Appl. Microbiol Biotechnol. 47: 630-635.

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, Appl. Biochem. Biotechnol. 91: 739–752.

Perez, V.H., Silva, G.S., Gomes, F.M., Castro H.F. 2007, Influence of the functional activating agent on the biochemical and kinetic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on chemically modified cellulignin. Biochemical Engineering Journal 34: 13-19.

Persson, B.A., Larsson, A.L.E., Le Ray, M., Ba¨ckvall, J.E. 1999, Ruthenium and

Enzyme-catalyzed Dynamic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols. J. Am. Chem. Soc. 121: 1645-1650.

Persson, M., Wehtje, E., Adlercreutz, P. 2000, Immobilization of Lipases by Adsorption and Deposition: High Protein Loading Gives Lower Water Activity Optimum. Biotechnology Letters, 22: 1571-1575.

Petersen, M.T.N., Fojan, P., Petersen, S.B. 2001. How do Lipases and Esterases Work: the Electrostatiic Contribution, Journal of Biotechnology. 85: 115-147.

Petkar, M., Lali, A., Caimi, P., Daimati, M. 2006, Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis.J. Mol. Catal. B. Enzym. 39: 83-90.

Phadtare, S., Britto, D.V., Pundle, A., Prabhune, A., Sastry, M. 2004, Invertase-Lipid Biocomposite Films: Preparation, Characterization, and Enzymatic Activity. Biotechnol. Progr. 20: 156–161.

Pirozzi, D., Fanelli, E., Aronne, A., Pernice, P., Mingione, A. 2009. Lipase Entrapment in a Zirconia Matrix: Sol-gel Synthesis and Catalytic Properties. J. Mol. Catal. B Enzym. 59: 116-120.

Pittner, F. 1990, Immobilization of Enzymes etc. PN: WO, 9012092.

Pittner, F., Kynclova, E., Schalkhammer, T., Ecker, B. and Wakolbinger, W. 1995, Enzymelabelled Probes and Assay Reagents. PN: AT; 9302071.

Pleiss, J., Fisher, M., Peiker, M. et al. 2000, Lipase Engineering Database. Understanding and Exploiting Sequence–Structure–Function relationships. J. Mol. Catal. B: Enzym. 10: 491–508.

Plieva, F.M., Kochetkov, K.A., Singh, I., Parmar, V.S., Belokonyu, N. Lozinsky, V. 2000, Immobilization of Hog Pancreas Lipase in Macroporous Poly (Vinyl Alcohol)-Cryogel Carrier for the Biocatalysis in Water-Poor media. Biotechnology Letters, 22: 551-554.

Porath, J. 1992, Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. Protein Expr. Purif. 3: 263–281.

Porath, J., Axén, R. 1976, Immobilization of Enzymes to Agar, Agarose, and Sephadex Supports. In: Methods in Enzymology, volume XLIV, (Mosbach, K., ed.), Academic Press, pp 19-45, New York, NY.

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I, Belfrage, G. 1975, Metal Chelate Affinity

Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation. Nature, 258: 598–599.

Queiroz, A.A.A., Passos, E.D., Alves, S.B., Silva, G.S., Higa O.Z., Vı´tolo M. 2006. Alginate–Poly(vinyl alcohol) Core–Shell Microspheres for Lipase Immobilization. Journal of Applied Polymer Science, 102: 1553–1560.

Rakhimov, M.M. 1986, Biological Microdevices with Enzymatic Intensification. Biofizika, 31: 704-710.

Reetz, M.T., Tielman, P., Wiesenhoefer, W., Koenen, W., Zonta, A. 2003, Second Generation Sol–gel Encapsulated lipases: Robust Heterogeneous Biocatalyst, Adv. Synthesis, 345: 717–728.

Reetz, M.T., Zonta A, Simpelkamp, J. 1995, Efficient Heterogeneous Biocatalyst by Entrapment of Lipases in Hydrophobic Sol–gel Materials. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 34: 301–303.

Rexova-Benkova, L., Omelkova, J., Kubanek, V. 1982, *endo-d*-Galacturonanase Immobilised by Adsorption on Porous Poly(ethylene terephthalate). Collect Czech. Chem. Commun, 47: 2716–2723.

Ritter, H., Tabatabai, M. 2002. Cyclodextrin in Polymer Synthesis: a Green Way to Polymers. Progress in Polymer Science, 27: 1713-1720.

Rombouts, F.M., Nout, M.J.R. 1995, Microbial Fermentation in the Production of Plant Foods. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. 79: 1085-1175.

Rosu R., Iwasaki Y., Shimizu N., Doisaki N., Yamane T. 1998, Intensification of Lipase Performance in a Transesterification Reaction by Immobilization on $CaCO_3$ powder. J. Biotech. 66: 51-59.

Rozprimova, L., Franek, F., Kubanek, V. 1978, Utilization of Powder Polyester in Making Insoluble Antigens and Pure antibodies. Cesk. Epidemiol. Mikrobiol. Immunol. 27: 335–341.

Safarik, I., Safarikova, M. 2000, Biologically Active Compounds and Xenobiotics: Magnetic Affinity Separations. In: Encyclopedia of Separation Science *(*Wilson, I. D., Adlard, T. R., Poole, C. F., andCool, M., eds.) Academic Press, pp 2163–2170, London.

Safarikova, M., Roy, I., Gupta, M. N., and Safarik, I. 2003, Magnetic Alginate Microparticles for Purification of α-amylases. J. Biotechnol. 105: 255–260.

Saiyed, Z.M., Telang, S.D., Ramchand, C.N. 2003, Application of Magnetic Techniques in the Field of Drug Discovery and Biomedicine. BioMagn. Res. Technol. 1: 2.

Salgin, S., Takac, S. 2007, Effects of Additives on the Activity and Enantioselectivity of *Candida rugosa* Lipase in a Biphasic MediumChem. Eng. Technol. 30: 1739-1743.

Sağiroğlu, A., Kilinc, A., Telefoncu, A. 2004. Preparation and Properties of Lipases Ommobilized on Different Supports. Artifical Cells Blood Substitutes and Biotechnology, 32: 625-636.

Salis, A., Sanjust, E., Solinas, V., Monduzzi M. 2005, Commercial lipase immobilization on Accurel MP1004 porous Polypropylene, Biocatalysis and Biotransformation, 23: 381-386.

Sankyo, A. 1995, Preparation of Optically Active 2,5-pyrolidine dione Derivative with Very High Optical Purity. PN: JP; 07322889.

Santos, J.C., Mijone P.D., Nunes G.F.M., Perez V.H., Castro H.F. 2008, Covalent Attachment of *Candida rugosa* Lipase on Chemically Modified Hybrid Matrix of polysiloxane–polyvinyl Alcohol with Different Activating Compounds. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 61: 229–236.

Santos, J.C., Paula A.V., Nunes G.F.M., Castro H.F. de, 2008, *Pseudomonas fluorescens* Lipase Immobilization on Polysiloxane–polyvinyl Alcohol Composite Chemically Modified with Epichlorohydrin. J. Mol. Catal. B: Enz. 52: 49–57.

Saraç, N., Boran, R., Ökmen, G., Uğur, A. 2008, Toprak ve Süt Kökenli Gram Pozitif Bakterilerde Lipaz Üretimi, Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi 1: 23-28.

Saxena, R.K., Sheoran, A., Giri, B. et al. 2003, Purification Strategies for Microbial Lipases. J. Microbiol. Meth. 52: 1-18.

Scharer, R., Hossain, M.M., Do, D.D. 1992, Determination of Total and Active Immobilized Enzyme Distribution in Porous Solid Supports. Biotech. Bioeng. 39: 679-687.

Schmid, R.D., Verger, R. 1998, Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. Angew**.** Chem. Int. Ed. 37: 1608-1633.

Schoemaker, M., Feldbruegge, R., Trau, D., Gruendig, B., Spencer, F. 1994, Enzyme Sensors for Triglycerides and Essential Fatty Acids. Fat. Sci. Technol. 96: 420–421.

Scouten, W.H. 1987, A Survey of Enzyme Coupling Techniques. In: Methods in Enzymology, volume 135, (Mosbach, K., ed.), Academic Press, pp 30–65, London.

Schulze, B., Wubbolts, M.G. 1999, Biocatalysis for Industrial Production of Fine Chemicals. Curr Opin Biotechnol, 10: 609–615.

Secundo, F., Carrea, G., Tarabiono, C. et al. 2006, The Lid is a Structural and Functional Determinant of Lipase Activity and Selectivity. J. Mol. Catal. B: Enzym. 39: 166-170.

Seufer-Wasserthal, P., Mayrhofer, H., Wirth, I., Poechlauer, P. 1995, Enzymatic Resolution of Asymmetric Alcohol. PN: EP, 675205.

Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. 2001. Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases. Biotechnology Advances, 19: 627-662.

Sheldon, R.A. 2007, Enzyme Immobilization: the Quest for Optimum Performance, Adv. Synth. Catal. 349: 1289-1307.

Shibasaki, H., Yamane, T. 2000, Avoidance of Soldification of Sesame Oil at Low Temperature by Self-Interesterifacation with Immobilized Lipase. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64: 1011-1015.

Shtelzer, S., Rappoport, S., Avnir, D., Ottolenghi, M., Braun, S. 1992, Properties of Trypsin and Acid Phosphatase Immobilized in Sol–gel Matrices. Biotechnol. Appl. Biochem. 15: 227–235.

Shukla, A., Kumar, A. 2004, Experimental Studies and Mass-Transfer Analysis of the Hydrolysis of Olive Oil in a Biphasic Zeolite-Membrane Reactor Using Chemically Immobilized Lipase. Ind. Eng. Chem. Res. 43: 2017-2029.

Silman, I.H., Katchalski, E. 1966, Waterinsoluble Derivatives of Enzymes, Antigens and Antibodies. Ann. Rev. Biochem. 35: 837–877.

Sinclair, B. 2000, Honing Your Cloning: New Cloning Systems Give Protein Expression Studies a Boost. Scientist, 14: 29.

Smith, L.C., Faustinella, F., Chan, L. 1992, Lipases: Three Dimensional Structure

and Mechanism of Action. Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 490-496.

Soni, S., Desai, J.D., Devi, S. 2001, Immobilization of Yeast Alcohol Dehydrogenase by Entrapment and Covalent Binding to Polymeric Supports. J. Appl. Polym. Sci. 82: 1299–1305.

Sonnet, P.E., Mcneill, G.P., Jun, W. 1994, Lipase of *Geotrichum candidum* Immobilized on Silica Gel. JAOCS, 71: 1421-1423.

Sökmen, B. B. 2005, Kayısı (*Armeniaca Vulgaris* Lam.) Tohumlarından Lipazın Saflaştırılması ve Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilize Edilmesi, Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programı, İstanbul.

Stead, D. 1986, Microbial Lipases: Their Characteristics, Role in Food Spoilage and Industrial Uses. J. Dairy Res. 53: 431–505.

Stetter, H. 1951, Enzymatische Analyse, Verlag Chemie, Weinheim.

Stinson, S.C. 1995, Fine and Intermediate Chemicals Makers Emphasize New Products and Process. Chem. Eng. News 73: 10–26.

Svendsen, A. 1994, Sequence Comparison with the Lipase Family. In: Woolley P, Petersen SB, editor. Lipases, Their Structure Biochemistry and Application. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 1–21.

Szejtli, J., Osa T. 1996, Comprehensive Supramolecular Chemistry, Vol. 3 (Cyclodextrins), Pergamon: Oxford.

Szejtli J. 1998, Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. Chem. Rev. 98: 1743-1753.

Szejtli, J. 2003. Cyclodextrins in the Textile Industry. Starch, 55: 191-196.

Sztajer, H., Zboinska, E. 1988, Microbial Lipases in Biotechnology. Acta Biotechnol. 8: 169-175.

Taipa, M.A., Aires-Barros, M.R., Cabral, J.M.S. 1992, Purification of Lipases. J. Biotechnol. 26: 111-142.

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.

Takahashi, M., Koike, R., Ogasawara, K. 1995, Lipase Mediated Resolution of inden-1-ol. Chem. Pharm. Bull. 43: 1585–1587.

Takahata, H., Uchida, Y., Ohkawa, Y., Momose, T. 1993, Enzymatic Resolution of N,Ndialkyl- 3-hydroxy-4-pentanamides, Unsuccessful in Resolution by the Katsuki–Sharpless Asymmetric Epoxidation. Tetrahedron Asymmetry 4: 1041–1042.

Tang, Z.X., Qian, j.Q., Shi, L.E. 2007, Characterizations of Immobilized Neutral Lipase On Chitosan Nano-Particles. Materials Letters 61: 37-40.

Taylor, F.R. 1991, Protein Immobilization: Fundamentals and Applications *(*Taylor, F. R., ed.) Marcel Dekker, New York, NY.

Telefoncu, A. 1997, Enzimoloji, Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı, 21-27 Eylül 446p, Kuşadası, Aydın-Türkiye.

Telefoncu, A., Dinçkaya, E., Vorlop, K.D. 1990, Preparation and Characterization of Pancreatic Lipase Immobilized in Eudragit-Matrix. Applied Biochemistry and Biotechnology. 26, 311-318.

Thompson, C.A., Delaquis, P.J., Mazza, G. 1999, Detection and Measurement of Microbial Lipase Activity: a review. Critic. Rev. Food Sci. Nutr. 39: 165–187.

Ting, W.J., Tung, K.Y., Giridhar, R., Wu, W.T. 2006, Application of Binary Immobilized *Candida rugosa* Lipase for Hydrolysis of Soybean Oil. J. Mol. Catal. B: Enzym. 42: 32–38.

Tosa, T., Mori, T., Fuse, N., Chibata, I. 1967, Studies on Continuous Enzyme Reactions Part V Kinetics and Industrial Application of Aminoacylase Column for Continuous Optical Resolution of acyl-*dl* Amino Acids. Biotechnol. Bioeng. 9: 603–615.

Toshiba 1989, New Biosensor Construction. PN: JP; J01102352.

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.

Tsai, S.W., Liu, B.Y., Chang. C.S. 1996. Inhancement of (*S*)-Naproxen ester Productivity from Racemic Naproxen by Lipase in Organic Solvents. J. Chem. Technol. Biotechnol. 65: 156–162.

Tsai, S. W., Lu, C. C. and Chang, C. S. (1996). Surfactant enhancement of (S)-

naproxen ester productivity from racemic, naproxan by lipase in isooctane. Biotechnol. Bioeng. 51: 148–156.

Tutar, H., Yilmaz, E., Pehlivan, E., Yilmaz, M. 2009, Immobilization of *Candida rugosa* lipase on sporopollenin from *Lycopodium clavatum.* Int. J. Biol. Macromol. 45: 315–320.

Tümtürk, H., Karaca, N., Demirel, G., Sahin, F., 2006, Preparation and application of poly(*N*,*N*-dimethylacrylamide-*co*-acrylamide) and poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-acrylamide)/κ-Carrageenan hydrogels for immobilization of lipaseInt. J. Biol. Macromol. 40: 281–285.

Unlu, N., Ersoz, M. 2007, Removal of Heavy Metal Ions by Using Dithiocarbamated-Sporopollenin. Separation and Purification Technology, 52: 461-469.

Uo, M., Yamashita, K., Suzuki, M., Tamiya E, Karube I, Makishima A: Immobilization of Yeast Cells in Porous Silica Carrier with Sol–gel Process. J Ceram. Soc. Jpn. 1992, 100:426–429.

Uygun M. 2006, *Aspergillus niger* ATCC 9642'nin Alginat Küreleri Üzerine İmmobilizasyonu ve Bazı Tekstil Boyaları İle Zeytin Karasuyunun Renk Gideriminde Kullanımının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Vakhlu, J, Kour, A., 2006. Yeast Lipases: Enzyme Purification, Biochemical Properties and Gene Cloning. Electronic Journal of Biotechnology, 9: 69-85.

Vandamme, E.J. 1983, Peptide Antibiotic Production Through Immobilized Biocatalyst Technology. Enzyme Microb. Technol. 5: 403–415.

Vattiner, E., Kanerva, L.T. 1994. Lipase Catalyzed Transesterification in the Preparation of Optically Active Solketal. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 23: 3459–3463.

Venton, D.L., Cheeseman, K.L., Chatterton, R.T., Anderson, T.L. 1984, Entrapment of Highly Specific Antiprogesterone Antiserum Using Polysiloxane Copolymers. Biochim Biophys Acta, 797: 343-347.

Verger, R. 1997, Interfacial Activation of Lipases: Facts and Artifacts. TIBTECH 15: 32–38.

Villeneuve, P., Mudehwa, J.M., Haas, M.J. 2000, Customizing Lipases for

Biocatalysis a Survey of Chemical, Physical and molecular Biological Approaches. J. Molecular Catalysis B: Enzymatic, 9: 113-148.

Waldron R.D. 1955, Infrared Spectra of Ferrites Phys. Rev. 99: 1727-1735.

Wallace, E.F., Lovenberg, W. 1974, Carbohydrate Moiety of Dopamine â-Hydroxylase. Interaction of the Enzyme with Concanavalin A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71: 3217–3220.

Wang, Y., Hu, Y., Xu, Y., Luo, G., Dai, Y. 2007, Immobilization of lipase with a special microstructure in composite hydrophilic CA/hydrophobic PTFE membrane for the chiral separation of racemic ibuprofen, Journal of Membran Science, 293:133-141.

Wang, Z.G., Wang, J.Q., Xu, Z.K. 2006, Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Electrospun Polysulfone Nanofibrous Membranes by Adsorption. J. Mol. Catal. B: Enz. 42: 45–51.

Watanabe, S., Shimizu, Y., Teramatsu, T., Murachi, T., Hino, T. 1988, Application of Immobilized Enzymes for Biomaterials Used in Surgery. Methods Enzymol. 137: 545–551.

Whellcuright, S.M. 1991, Protein Characteristic In Protein Purification: Design and Scale up of Downstream Processing, 26-40, Oxford University Press, New York.

White, J.S., White D.C. 1997. Source Book of Enzymes. Boca Raton: CRC Press.

Wilchek, M., Miron, T. 1982, A Spectrophotometric Assay for Soluble and Immobilized *N*-hydroxysuccinimide Esters. Anal. Biochem. 126: 433–435.

Wille, H.J. 1996, Hydrolysis of polyunsaturated acid triglycerides. EP: EP; 714983.

Williams, J.M.J., Parker, R.J., Neri, C. 2002, Enzymatic Kinetic Resolution in Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, 2nd ed. New York, NY: Wiley-VCH, 1: 287-312.

Wilmesmeier S., Steuernagel S., Wiermann R, 1993, Comparative FTIR anf 13C CP/MAS NMR spectroscopic investigations on sporopollenin for different systematic origins. Z. Naturforsch, 48: 697–701.

Winkler, K.W., Ulrich, K., Stuckmann, M., 1979, Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysaccaharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by Serratia marcescens. J. Bact. 138: 663-670.

Wiseman, A. 1995, Introduction to principles. In: Wiseman A (ed). Handbook of Enzyme Biotechnology, 3rd edn. Ellis Horwood Ltd, Cornwall, pp 3–8.

Won, K., Kim, S., Kim, K.J., Park, H.W., Moon, S.J. 2005, Optimization of Lipase Entrapment in Ca-alginate Gel Beads. Process Biochemistry, 40: 2149–2154.

Wu, J.Y., Liu, S.W. 2000, Influence of Alcohol Concentration on Lipase-Catalyzed Enantioselective Esterification of Racemic Naproksen in Isooctane: Under Controlled Water Activity, Enzyme and Microbial Technology, 26: 124–130

Wu, J.C., Selvam, V., Teo, H.H., Chow, Y., Talukder, M.M.R., Cho, W.J. 2006, Immobilization Of *Candida Rugosa* Lipase By Cross-Linking With Glutaraldehyde Followed By Entrapment in Alginate Beads. Biocatalysis And Biotransformation, 24: 352-357.

www.au-kbc.org/beta/bioproj2/index.html.

Xi, W.W, Xu, J.H. 2005, Preparation of Enantiopure (*S*)-ketoprofen by Immobilized *Candida rugosa* Lipase in Packed Bed Reactor. Process Biochemistry, 40: 2161–2166.

Xin, J.Y., Li, S.B., Xu, Y., Wang, L.L. 2000, Enzymatic Resolution of (S)-(+)-Naproxen in a Trapped Aqueous–Organic Solvent Biphase Continuous Reactor. Biotechnology and Bioengineering, 68: 78-83.

Xu, H., Li, M., He, B. 1995, Immobilization of *Candida cyclindracea* Lipase on Methyl Acrylate-divinylbenzene Copolymer and Its Derivatives. Enzyme and Microbial Technology, 17: 194-199.

Yadav, G.D., Jadhav, S.R. 2005, **S**ynthesis of Reusable Lipases by Immobilization on Hexagonal Mesoporous Silica and Encapsulation in Calcium alginate: Transesterification in Non-aqueous Medium. Micropor. Mesopor. Mater. 86: 215–222.

Yang, G., Wu, J., Xu, G., Yang, L. 2009, Enhancement of the Activity and Enantioselectivity of Lipase in Organic Systems by Immobilization onto Low-Cost Support, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 57: 96-103.

Yasufuku, Y., Ueji, S. 1996, Improvement (5-fold) of Enantioselectivity for Lipase-catalyzed Esterification of a Bulky Substrate at 57 deg in Organic solvent. Biotechnol. Tech. 10, 625–628.

Ye P., Jianga J., Xu Z.K. 2007, Adsorption and activity of lipase from *Candida*

rugosa on the chitosan-modified poly(acrylonitrile-*co*-maleic acid) membrane surface Colloid Surf. B, 60: 62–67.

Ye P., Xu Z., Che A., Wu J., Seta P., 2005, Chitosan-tethered poly(acrylonitrile-*co*-maleic acid) Hollow Fiber Membrane for Lipase Immobilization. Biomaterials, 26: 6394-6403.

Yeşiloğlu, Y. 2005, Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase. Process Biochemistry, 40: 2155–2159.

Yissum Res. Dev. Hebrew Univ. 1991, Doped sol-gel glass. PN: EP, 439318

Yong, Y., Bai, Y., Li, Y., Lin, L., Cui, Y., Xia, C. 2008, Preparation and Application of Polymer-grafted Magnetic Nanoparticles for Lipase Immobilization. J. Magnetism and Magnetic Materials, 320: 2350-2355.

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.

Yoshioka, T., Shimamura, M. 1986. Studies of Polystyrene-Based Ion-Exchange Fibre. IV. A Novel Fibre-form Material for Adsorption and Immobilisation of Biologically-active Proteins. Bull Chem. Soc. Jpn. 59: 399-403.

Yu, H., Wu, J., Ching, C. B. 2004, Enhanced Activity and Enantioselectivity of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Macroporous Adsorptive Resins for Ibuprofen Resolution. Biotechnology Letters, 26, 629–633.

Yu J., C., Jiang Z., T., Liu H., Y., Yu Jiaguo, Zhang L., 2003, β-Cyclodextrin Epichlorohyrin Copolymer as a Solid-phase Extraction Adsorbent for Aromatic Compounds in Water Samples. Anal. Chem. Acta, 477: 93.

Yunus, W.M.Z.W., Salleh, A. B., Basri, M., Ampon, K., Razak, C.N.A. 1996, Preparation and Immobilization of Lipase on to Poly(methyl acrylate Methyl Methaecrylate-divinyl Benzene) Beads for Lipid Hydrolysis. Biotechnol. Appl. Biochem. 24: 19–23.

Zaidi, A., Ganier, J.L., Carta, G. 1995, Fatty Acid Esterification Using Nylon-Immobilized Lipase. Biotechnology and Bioengineering. 48: 601-605.

Zaitsev, S.Y., Gorokhova, I.V., Kashtigo, T.V., Zintchenko, A., Dautzenberg, H.

2003, General Approach for Lipases Immobilization in Polyelectrolyte Complexes. Colloids and Surfaces A: Physicochemmistry Engineering Aspects, 221: 209-220.

Zalacain, I., Zapelena, M. J., Astiasaran, I., Bello, J. 1995, Dry Fermented Sausages Elaborated with Lipase from *Candida cylindracea*, Comparison with Traditional Formulations. Meat Sci. 40: 55–61.

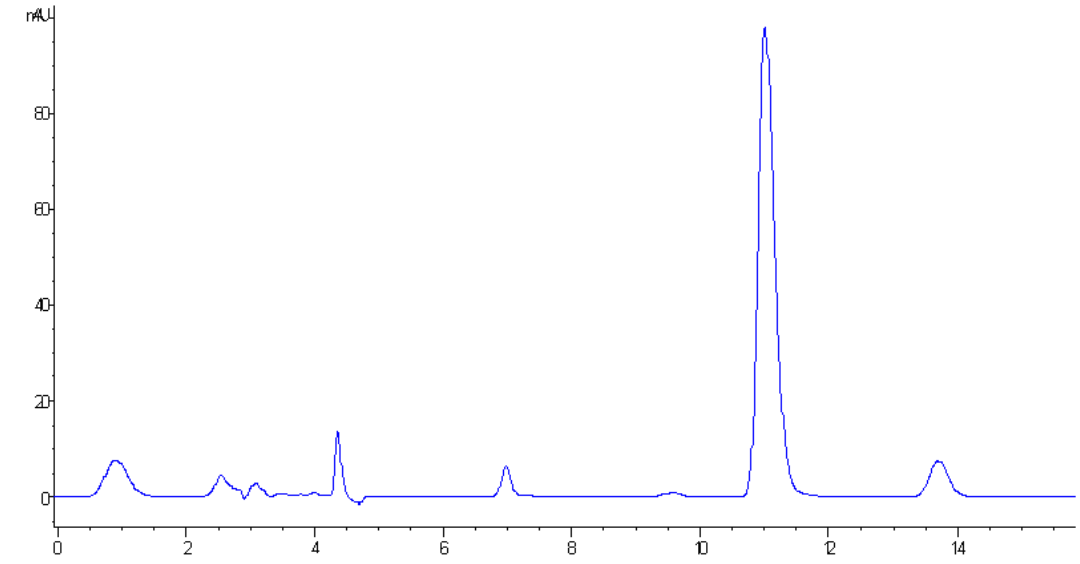
Zarbosky, O. 1973. Immobilised enzymes, CRC Press, Cleveland.

Zeng, L., Luo, K., Gong, Y. 2006, Preparation and Characterization of Dendritic Composite Magnetic Particles As A Novel Enzyme Immobilization Carrier. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 38: 24–30.

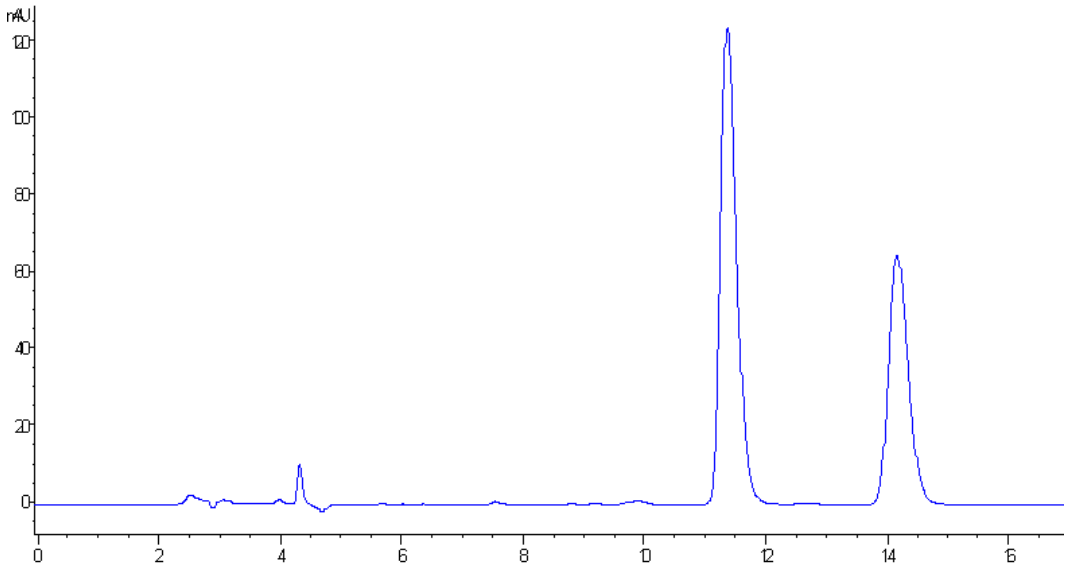
Zhang, Y., Li J., Han, D., Zhang, H., Liu, P., Li, C. 2008, An Efficient Resolution of Racemic Secondary Slcohols on Magnetically Separable Biocatalyst, Biochemical and Biophysical Research Communications, 365: 609–613.

Zhu, K., Jutila, A., Tuominen, E.K.J., Patkar, S.A., Svendsen, A., Kinnunen, P.K.J. 2001, Impact Of The Tryptophan Residues Of Humicola Lanuginosa Lipase On Its Thermal Stability. BBA-Protein Struct. Mol. Enzyme 1547: 329–338.

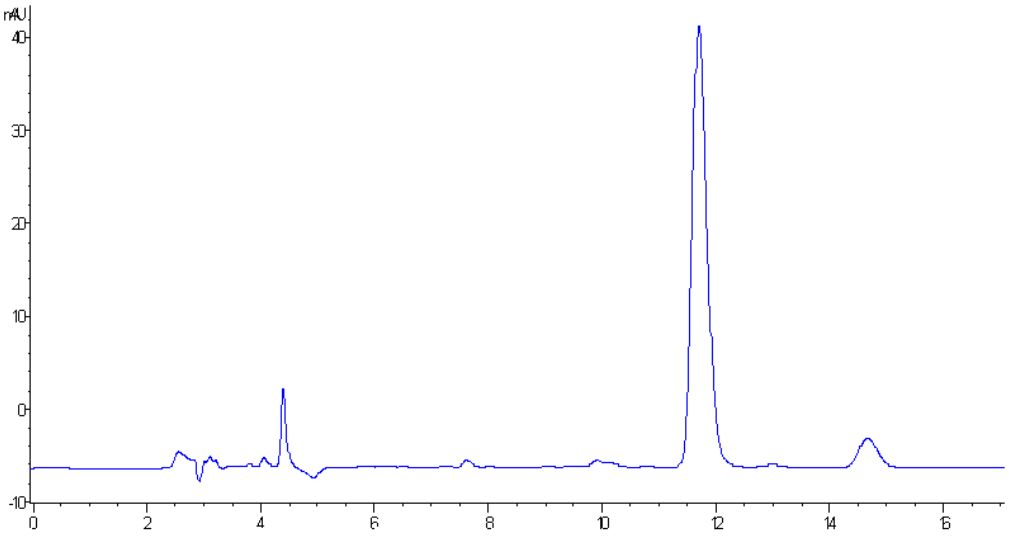
EK: HPLC Kromotogramları



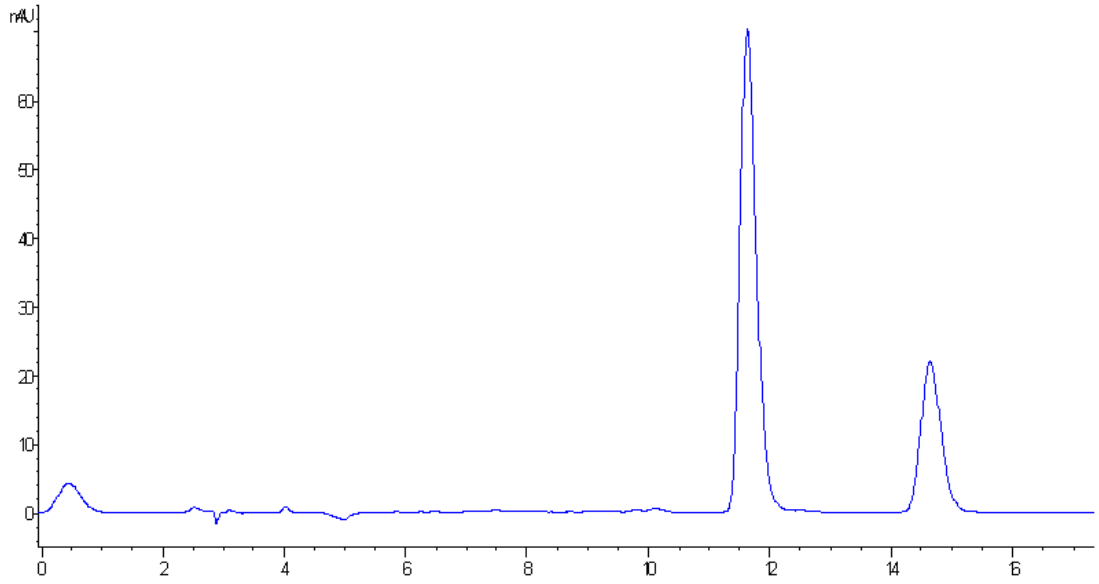
ANALİZ: Tutuklanmış BETA-CD-HMDI (pH :5 ,45 °C, 1. kullanım)



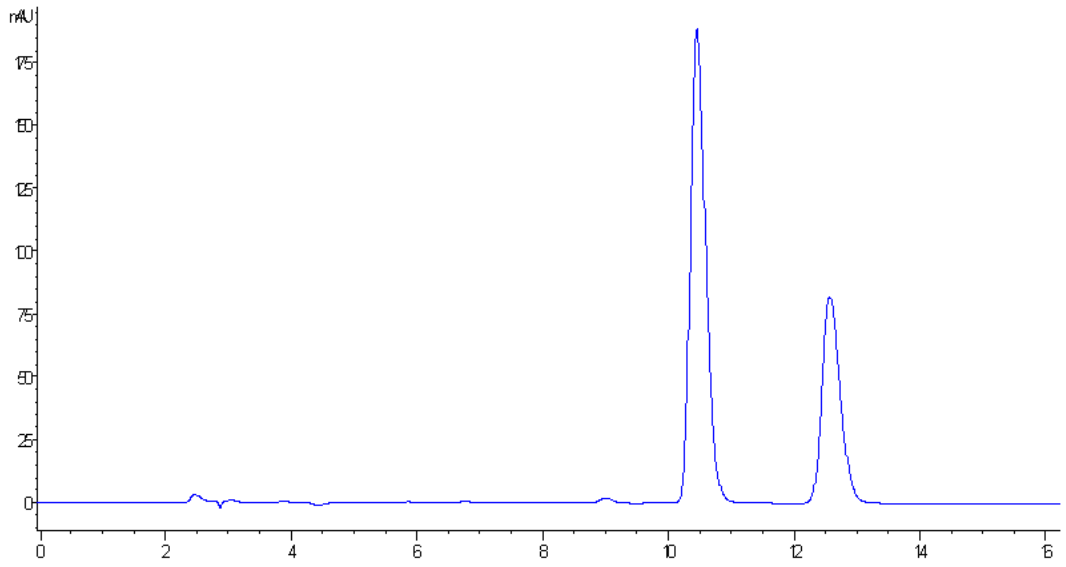
ANALİZ: BETA-CD-HMDI (kovalent bağlanma) (pH :5 ,45 °C, 1. kullanım)



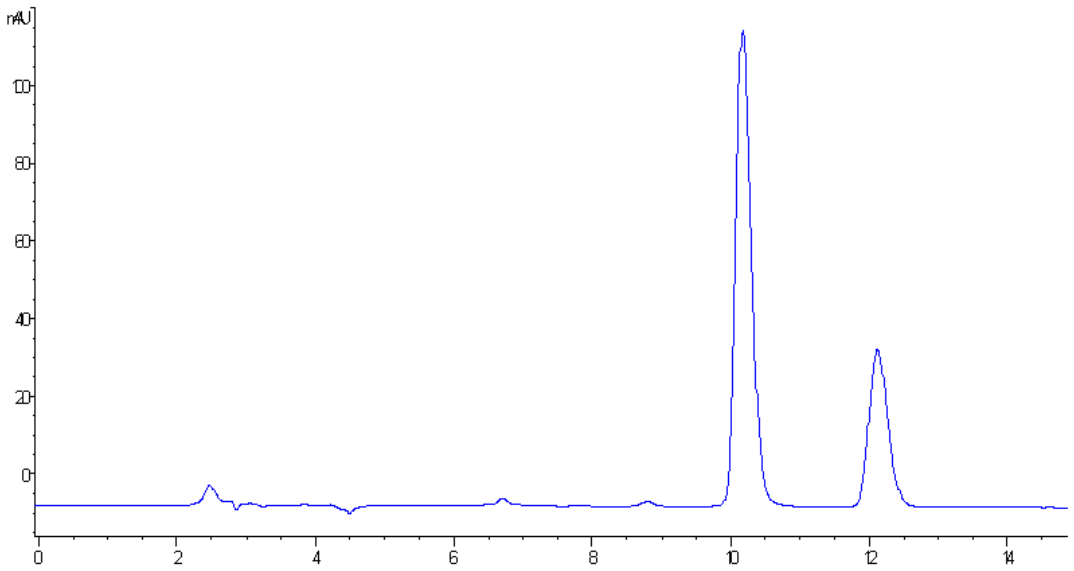
ANALİZ: Tutuklanmış cam boncuklar (pH: 7, 35 °C, 1. kullanım)



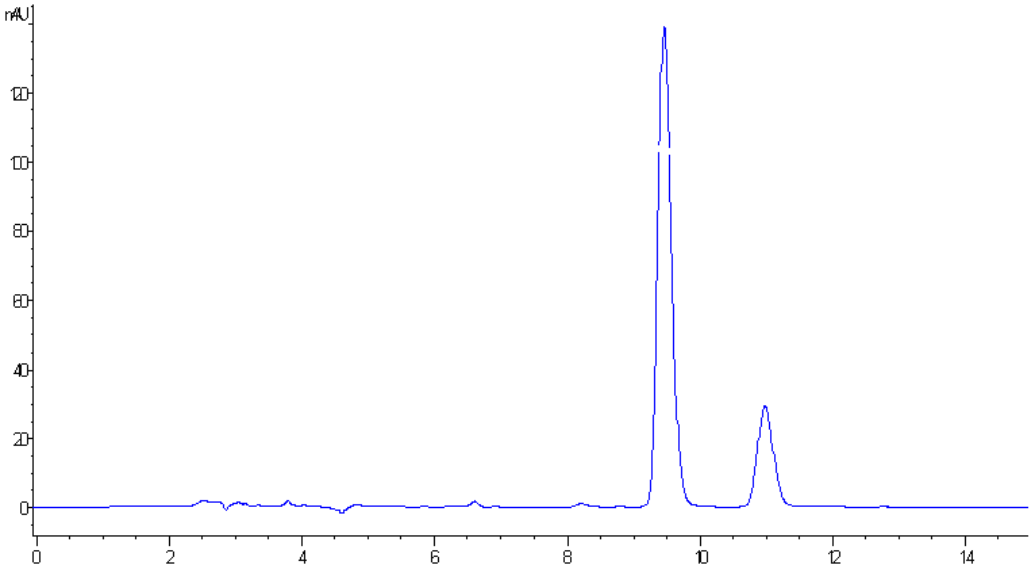
ANALİZ: Cam boncuk (kovalent bağlanma)(pH: 5, 35 °C, 1 kullanım)



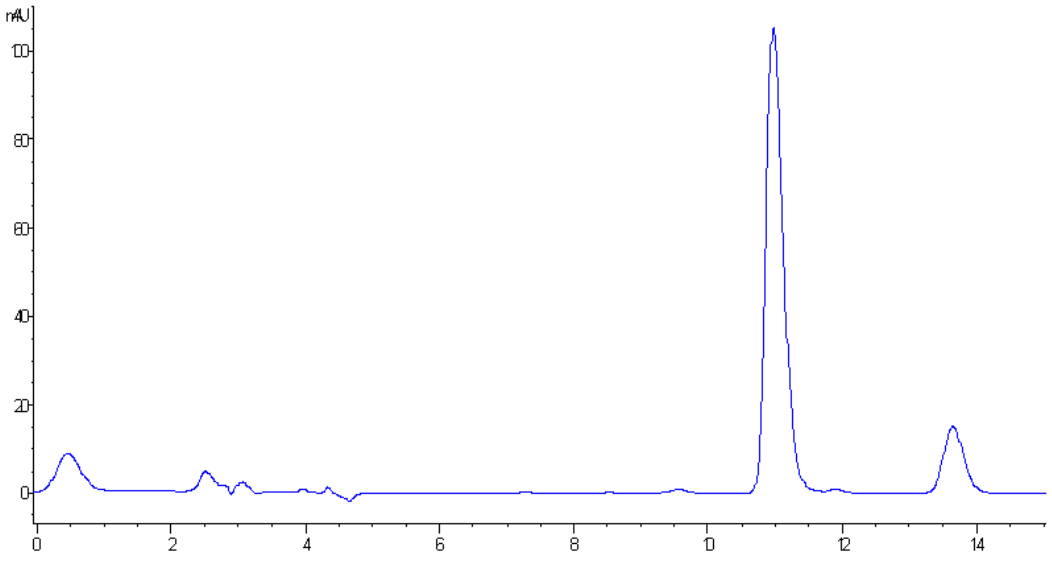
ANALİZ: Tutuklanmış Fe (pH: 7, 35 °C, 1. kullanım)



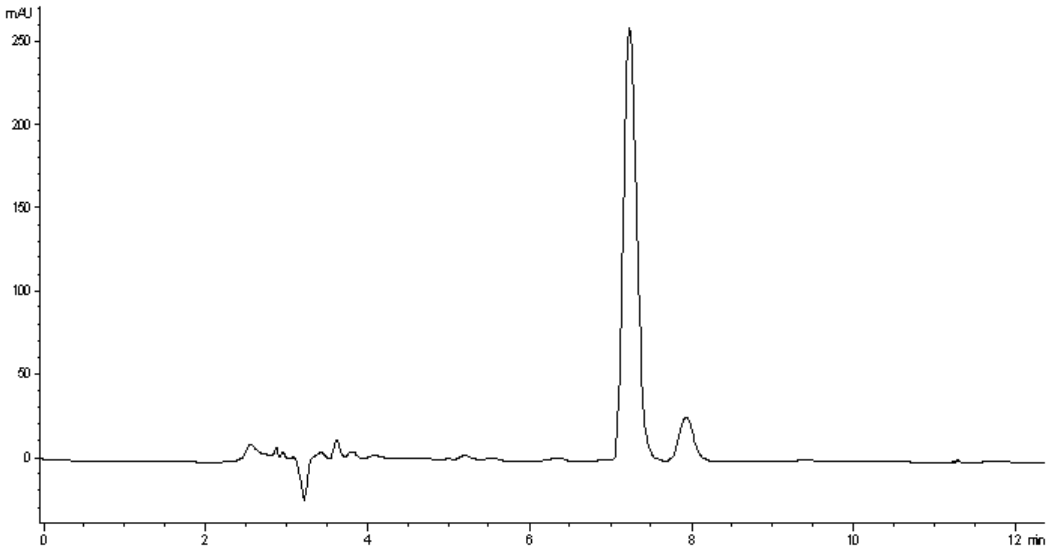
ANALİZ:Tutuklanmış Fe-APTES (pH 7, 35 °C, 1. kullanım)



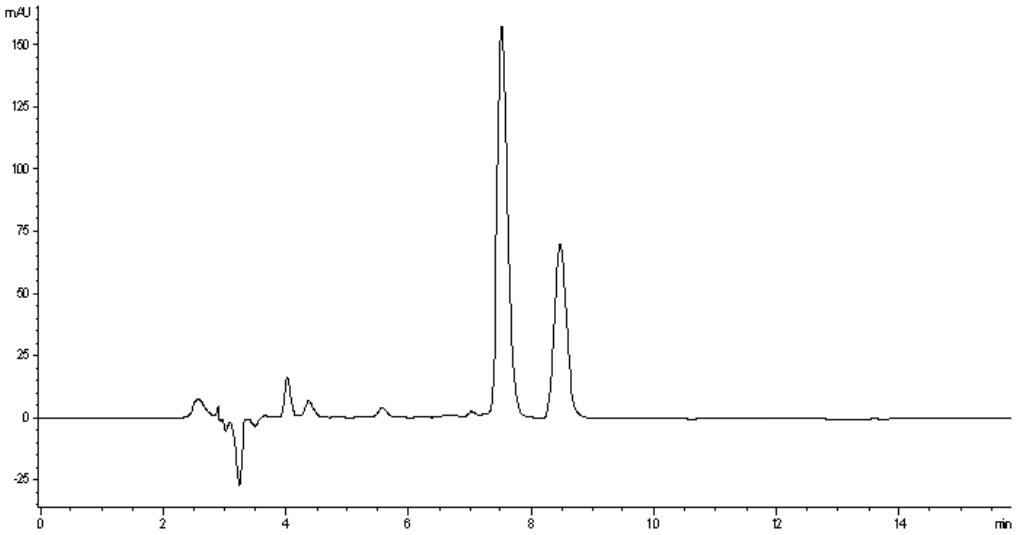
ANALİZ: Tutuklanmış Fe-APTES-Spo (pH 5, 35 °C, 1. kullanım)



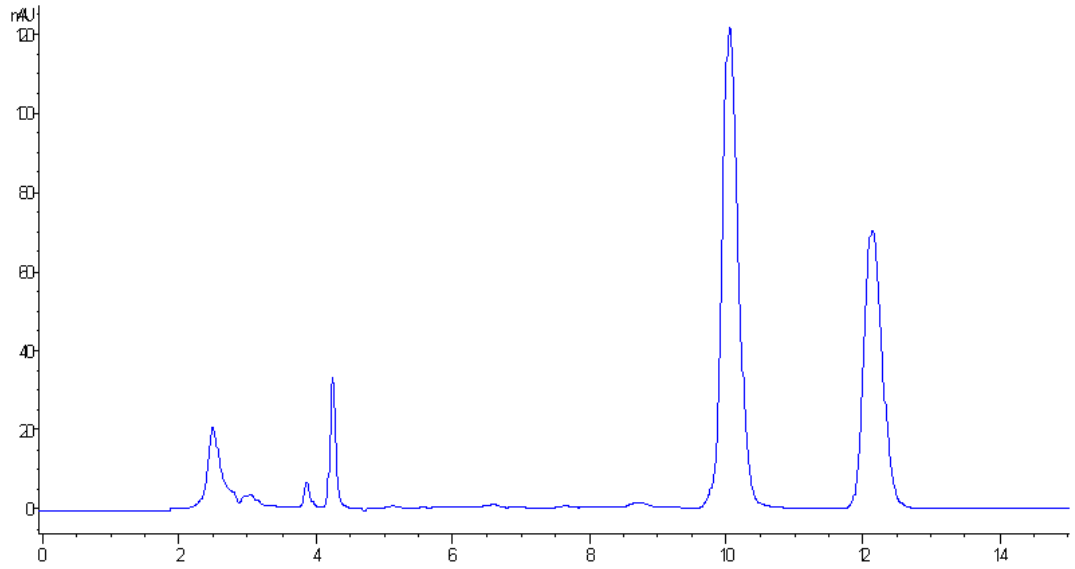
ANALİZ: Tutuklanmış Fe-APTES-CD-HMDI (45 °C, pH: 5, 1. kullanım)



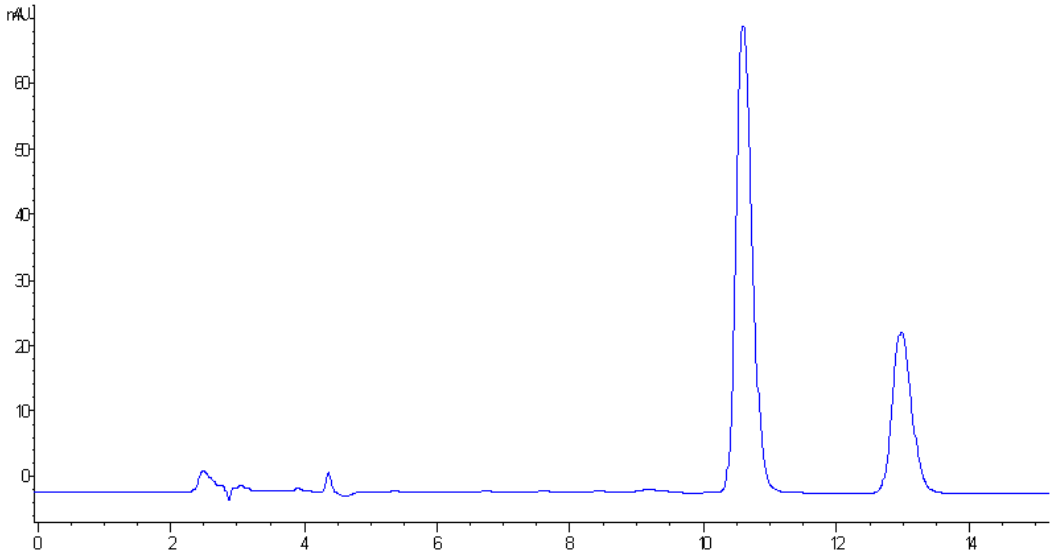
ANALİZ: Tutuklanmış Spo (pH: 7, 35 °C, 1. kullanım)



ANALİZ: Tutuklamış Spo_{act} (pH: 7, 35 °C, 1. kullanım)



ANALİZ: Spo-HMDI-ed-GA-E (pH: 7, 35 °C, 1. kullanım)



ANALİZ : Spo-HMDI-su-GA-E (pH : 7, 35 °C, 1. kullanım)

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Konya'da doğan Elif YILMAZ ilkokul, ortaokul ve liseyi Konya'da tamamladı. 1999 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazanarak 2003 yılında aynı fakülteden mezun oldu. Yine aynı yıl içerisinde Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans'a başlayıp 2005 yılında tamamladı. Aynı yıl içerisinde S.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında Doktora programına başladı. Araştırma Görevlisi olarak 2004 yılından bugüne kadar S.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında görev yapmaktadır.