

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**NANO YAPILI DESTEK MATERYALLERİ ÜZERİNE LİPAZ ENZİMİNİN  
TUTUKLANMASI VE TUTUKLANMIŞ ENZİMİN AKTİVİTE İLE  
ENANTİYOSEÇİMLİLİĞE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Gülcan COŞKUN**

**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2018**

**Her hakkı saklıdır**

## TEZ ONAYI

Gülcan Coşkun tarafından hazırlanan “Nano Yapılı Destek Materyalleri Üzerine Lipaz Enziminin Tutuklanması ve Tutuklanmış Enzimin Aktivite ile Enantiyoseçimliliğe Etkisinin İncelenmesi” adlı tez çalışması 14/03/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.



**Danışman** : Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU  
Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

### Jüri Üyeleri:

**Başkan:** Prof. Dr. Zümriye AKSU  
Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı



**Üye** : Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU  
Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı



**Üye** : Prof. Dr. Nuray YILDIZ  
Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı



**Yukarıdaki sonucu onaylarım.**

**Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN**  
Enstitü Müdürü

## ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

16/03/2018



Gülcan COŞKUN

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NANO YAPILI DESTEK MATERYALLERİ ÜZERİNE LİPAZ ENZİMİNİN TUTUKLANMASI VE TUTUKLANMIŞ ENZİMİN AKTİVİTE İLE ENANTİYOSEÇİMLİLİĞE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Gülcan COŞKUN

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU

Bu tez çalışmasında *Candida antarctica* lipazını nanoparçacıklara tutuklayarak lipaz aktivitesini ve enantiyoseçimliliğini arttırmak hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, öncelikle nanoparçacıklar üretilerek *Candida antarctica* lipazı kovalent bağlama yöntemi ile üretilen nanoparçacıklara tutuklanmıştır. Tutuklanmış enzimler (R,S)-1-feniletanolün enantiyoseçimli transesterleşme tepkimesinde biyokatalizör olarak kullanılmıştır. Çalışmanın birinci bölümünde, grafen oksit (GO), demir oksit ( $Fe_3O_4$ ), grafen oksit/demir oksit nanokompoziti (GO/ $Fe_3O_4$ ), manyetik kitosan ( $Fe_3O_4$ /KT) ve grafen oksit/demir oksit/kitosan nanokompoziti (GO/ $Fe_3O_4$ /KT) üretilmiştir. İkinci bölümde, üretilen nanoparçacıklar öncelikle çapraz bağlayıcılardan glutaraldehit (GA) veya epiklorohidrin (EPH) ile aktive edilmiş ve *Candida antarctica* lipazı kovalent bağlama yöntemi ile bu nanoparçacıklara tutuklanmıştır. Saf ve enzim yüklü nanoparçacıkların yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir. Tutuklanmış ve serbest enzim aktivitesinin sıcaklık, pH, tutuklama süresi, yüzey aktif madde derişimi ve çapraz bağlayıcı derişiminden nasıl etkilendiği incelenmiştir. Serbest enzimin 30 °C ve pH 6'da max. aktivitesi 35 U bulunmuştur. GO,  $Fe_3O_4$  ve GO/ $Fe_3O_4$  üzerine tutuklanmış enzimlerin sırasıyla uygun koşullardaki aktiviteleri 28.98 U (T=40°C, pH=6, tutuklama süresi=16 saat), 26.95 U (T=40°C, pH=7, tutuklama süresi=16 saat) ve 24.8 U (T=40°C, pH=8, tutuklama süresi=12 saat) bulunmuştur. Bu değerler tutuklama esnasında 250 mM GA kullanıldığında elde edilmiştir. Yapılan deneyler sonucu çapraz bağlayıcı GA'nın EPH'den daha iyi aktivite sonuçları verdiği görülmüş ve daha sonraki deneylerde GA ile çalışılmıştır. Tween 80 ve Triton X-100 yüzey aktif maddelerinin aktiviteye önemli bir katkıda bulunmadığı ve bazı durumlarda enzimin konformasyonel yapısını etkileyerek aktivite kaybına sebep olduğu görülmüştür. Son bölümde ise, uygun koşullarda üretilen tutuklanmış enzimler (R,S)-1-feniletanolün saf enantiyomerlerini elde etmek için kullanılmıştır. En iyi sonuçlar GO ve GO/ $Fe_3O_4$  üzerine tutuklanan enzimler ile elde edilmiştir. GO-GA-Lİ enzimi ile 4 saat sonunda % 50.73 dönüşüm, %>99 enantiyo aşırılık (ee) ve 507.74 enantiyomerik oran (E) değerleri elde edilmiştir. GO/ $Fe_3O_4$ -GA-Lİ enzimi ile 6 saat sonunda % 49.02 oranında dönüşüme ulaşılmış; sırasıyla %94.32 ee% ve 375.77 E değerleri bulunmuştur. Tutuklanmış enzimler enantiyoseçimli transesterleşme tepkimesinde 5 kez kullanılmış; enantiyoseçimlilik ve enantiyomerik oran değerinde azda olsa bir azalma görülmüştür.

**Mart 2018, 116 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Lipaz, tutuklama, nanoparçacıklar, enzimatik aktivite, kinetik rezolüsyon, enantiyoseçimlilik

## ABSTRACT

Master Thesis

### IMMOBILIZATION OF LIPASE ENZYME ON NANOSIZE MATERIALS AND INVESTIGATION OF THE EFFECT OF IMMOBILIZED ENZYME ON ENZYMATIC ACTIVITY AND ENANTIOSELECTIVITY

Gülcan COŞKUN

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU

In this thesis, it was aimed to immobilize *Candida antarctica* lipase onto nanoparticles and to increase enzymatic activity and enantioselectivity. For this purpose, firstly nanoparticles were produced; subsequently *Candida antarctica* lipase were immobilized onto produced nanoparticles by the covalent binding method and finally immobilized enzymes were used in the enantioselective transesterification reaction of (R, S)-1-phenylethanol. In the first part, graphene oxide (GO), iron oxide (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), graphene oxide/iron oxide nanocomposite (GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), magnetic chitosan (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT) and graphene oxide/iron oxide/chitosan nanocomposite (GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT) were produced. In the second part, produced nanoparticles were first activated with glutaraldehyde (GA) or epichlorohydrin (EPH) which are cross-linkers, then *Candida antarctica* lipase immobilized onto these activated nanoparticles by the covalent binding method. The structure of the produced nanoparticles was characterized using scanning electron microscopy (SEM). The influence of temperature, pH, immobilization time, surfactant concentration and cross linker concentration for immobilized and free enzyme was investigated. Free enzyme's max. activity was found 35 U (30 °C, pH=6). In the optimum conditions, the activities of the enzymes immobilized onto GO, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ve GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> were 28.98 U (T=40°C, pH=6, t<sub>immobilization</sub> =16 h), 26.95 U (T=40°C, pH=7, t<sub>immobilization</sub> =16 h) and 24.8 U (T=40°C, pH=8, t<sub>immobilization</sub> =12 h), respectively. These values were obtained when 250 mM GA was used during immobilization. The results showed that the cross-linker GA gave better activity than EPH and the experiment was run entirely with GA. Tween 80 and Triton X-100 did not make a significant contribution to the activity, but in some cases caused the loss of activity by affecting the conformational structure of the enzyme. In the latter part, the immobilized enzymes which produced in the optimum conditions were used to obtain pure enantiomers of (R, S)-1-phenylethanol. The best results were obtained by enzymes that immobilized onto GO and GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. After 4 and 6 hours of the reaction the values of enantiomeric excess (ee=99%, 94.32%), enantiomeric ratio (E=507.74, 375.77) and conversion (c=50.73%, 49.02%) were observed with the use of GO-GA-LI and GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-LI enzyme, respectively. The immobilized enzymes were used 5 times in the enantioselective transesterification reaction and a small decrease was observed in enantioselectivity and enantiomeric ratio.

March 2018, 116 pages

**Key Words:** Lipase, immobilization, nanomaterials, enzymatic activity, kinetic resolution, enantioselectivity

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince çalışmalarımda engin bilgi ve tecrübesi ile beni yönlendiren, manevi desteğiyle beni her konuda cesaretlendiren, Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı öğretim üyelerinden değerli danışman hocam Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Yürüttüğümüz çalışmada fikir ve önerilerini paylaşıp, gerekli materyalleri sağlayarak çalışmamızın tamamlanmasını sağlayan hocam Prof. Dr. Nuray YILDIZ'a (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) teşekkürlerimi sunarım.

Pozitif enerji ve güler yüzleriyle bana destek olan hocalarım Prof. Dr. Emine BAYRAKTAR ve Prof. Dr. Afife GÜVENÇ'e (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) çok teşekkür ederim.

Gerekli materyallerin sağlanmasında ve analizlerin yapılmasında yardımcı olup çalışmama yaptığı katkılarından dolayı Araş. Gör. Zafer ÇIPLAK'a (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) teşekkür ederim.

Hayatım boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan ve çalışmam süresince en büyük desteği gösteren canım annem Semiha ALADAĞ'a, manevi desteğiyle her zaman yanımda olan eşim Osman COŞKUN'a ve neşe kaynağım oğlum Sedat COŞKUN'a çok teşekkür ederim.

Gülcan COŞKUN  
Ankara, Mart 2018

## İÇİNDEKİLER

### TEZ ONAYI SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
SİMGELER DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
2. KURUMSAL TEMELLER.....	5
2.1 Enzimler ve Genel Özellikleri .....	5
2.1.1 Enzim kullanmanın avantajları .....	6
2.2 Lipazlar .....	6
2.2.1 Lipazların kaynakları .....	7
2.2.2 <i>Candida antarctica</i> lipazı.....	8
2.2.3 Lipazların yapısı.....	9
2.2.4 Lipazların ara yüzey aktivasyonu .....	10
2.2.5 Lipazların aktivasyonu ve inhibisyonu .....	11
2.2.6 Lipazların katalizlediği reaksiyonlar .....	11
2.2.7 Lipazların endüstride kullanım alanları.....	13
2.3 Enzimatik Aktivite .....	14
2.4 Stereokimya .....	14
2.4.1 Kirallik ve enantiyomerlik .....	14
2.4.2 Rasemik karışımlar .....	16
2.4.3 Enantiyoseçicilik.....	17
2.5 Enantiyomerik Safılıkta Ürün Elde Etme Yöntemleri .....	18
2.5.1 Tercihli kristalizasyon .....	19
2.5.2 Diastereoseçici kristalizasyon.....	20
2.5.3 Kinetik rezolüsyon .....	20
2.5.4 Dinamik kinetik rezolüsyon .....	21

2.6 Enzim Tutuklama .....	22
2.6.1 Tutuklanmış enzimin serbest enzime göre üstünlükleri.....	22
2.6.2 Enzim tutuklama yöntemleri .....	23
2.6.2.1 Fiziksel adsorpsiyon .....	23
2.6.2.2 İyonik bağlama .....	24
2.6.2.3 Kovalent bağlama.....	25
2.6.2.4 Çapraz bağlama .....	29
2.6.2.5 Katı bir desteğe hapsedme .....	30
2.7 1-Feniletanol .....	32
3. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	33
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	49
4.1 Materyal.....	49
4.1.1 Kullanılan aletler.....	49
4.1.2 Kullanılan kimyasallar .....	49
4.2 Yöntem .....	50
4.2.1 Manyetik Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanoparçacık sentezi .....	51
4.2.1.1 Manyetik Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanoparçacıkların aktiflenmesi.....	51
4.2.1.2 Aktif manyetik nanoparçacıklara lipaz enzimi tutuklama .....	52
4.2.2 Grafen oksit (GO) nanoparçacıkların sentezi .....	53
4.2.2.1 Grafen oksit nanoparçacıkların aktiflenmesi.....	53
4.2.2.2 Aktif grafen oksit nanoparçacıklara lipaz enzimi tutuklama .....	54
4.2.3 GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanokompozit sentezi .....	54
4.2.3.1 GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanokompozitin aktiflenmesi.....	55
4.2.3.2 Aktif GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanokompozite lipaz enzimi tutuklama.....	56
4.2.4 Manyetik kitosan nanoparçacık sentezi .....	56
4.2.4.1 Manyetik kitosan nanoparçacıkların aktiflenmesi .....	56
4.2.4.2 Manyetik kitosan nanoparçacıklara lipaz enzimi tutuklama .....	57
4.2.5 GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /Kitosan nanokompozit sentezi .....	57
4.2.5.1 GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /Kitosan nanokompozitin aktiflenmesi .....	58
4.2.5.2 Manyetik GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /Kitosan nanokompozite lipaz enzimi tutuklama .....	58
4.2.6 Lipaz aktivitesinin belirlenmesi .....	58
4.2.7 (R,S)-1-feniletanolün kinetik rezolüsyonu .....	59
4.2.7.1 (R,S)-1-feniletanolün tutuklanmış enzimler ile kinetik rezolüsyonu .....	59
4.2.7.2 Analiz yöntemi.....	61

<b>5. BULGULAR VE TARTIŞMA</b> .....	<b>62</b>
<b>5.1 Nanoparçacıkların Karakterizasyonu</b> .....	<b>62</b>
<b>5.2 FT-IR Analizi</b> .....	<b>64</b>
<b>5.3 pH'ın Serbest ve Tutuklanmış Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi</b> .....	<b>69</b>
<b>5.4 Sıcaklığın Serbest ve Tutuklanmış Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi</b> .....	<b>71</b>
<b>5.5 Tutuklama Süresinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi</b> .....	<b>74</b>
<b>5.6 Aktifleyici Madde Değişiminin Enzim Aktivitesine Etkisi</b> .....	<b>75</b>
<b>5.7 Katkı Maddelerinin Enzim Aktivitesine Etkisi</b> .....	<b>78</b>
<b>5.8 Sıvıda Kalan (Bağlanmamış Enzim) Aktivite Miktarı</b> .....	<b>82</b>
<b>5.9 (R,S)-1-Feniletanolün Tutuklanmış Enzimler ile Kinetik Rezolüsyonu</b> .....	<b>85</b>
<b>5.9.1 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ enzimi ile (R,S)-1-feniletanolün kinetik rezolüsyonu</b> .....	<b>86</b>
<b>5.9.2 GO-GA-Lİ enzimi ile (R,S)-1-feniletanolün kinetik rezolüsyonu</b> .....	<b>88</b>
<b>5.9.3 GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ enzimi ile (R,S)-1-feniletanolün kinetik rezolüsyonu</b> .....	<b>91</b>
<b>5.9.4 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ enzimi ile (R,S)-1-feniletanolün kinetik rezolüsyonu</b> .....	<b>92</b>
<b>5.9.5 GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ enzimi ile (R,S)-1-feniletanolün kinetik rezolüsyonu</b> .	<b>94</b>
<b>5.10 Tutuklanmış Enzimlerin Tekrar Kullanılabilirliği</b> .....	<b>95</b>
<b>6. SONUÇLAR</b> .....	<b>97</b>
<b>7. ÖNERİLER</b> .....	<b>101</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>102</b>
<b>EKLER</b> .....	<b>110</b>
<b>EK 1 (R,S)-1-Feniletanol'e Ait Kalibrasyon Grafiği</b> .....	<b>111</b>
<b>EK 2 (R,S)-1-Feniletanol'e Ait Fiziksel Özellikler</b> .....	<b>112</b>
<b>EK 3 (R)-1-Feniletanol Ve (S)-1-Feniletanol'e Ait HPLC Kromatogramı ve Enantiyoseçicilik Örnek Hesabı</b> .....	<b>113</b>
<b>EK 4 Titrimetrik Aktivite Örnek Hesabı</b> .....	<b>114</b>
<b>EK 5 Kullanılan Kimyasallara Ait Fiziksel Özellikler</b> .....	<b>115</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>116</b>

## SİMGELER DİZİNİ

c	Dönüşüm
C <sub>R</sub>	Konfigürasyonu R Olan Enantiyomerin Derişimi, mM
C <sub>S</sub>	Konfigürasyonu S Olan Enantiyomerin Derişimi, mM
C <sub>Ro</sub>	Konfigürasyonu R Olan Enantiyomerin Başlangıçtaki Derişimi, mM
C <sub>So</sub>	Konfigürasyonu S Olan Enantiyomerin Başlangıçtaki Derişimi, mM
°C	Santigrat
E	Enantiyomerik Oran
ee	Enantiyomerik Aşırılık
ee <sub>p</sub>	Ürünlerin Enantiyomerik Aşırılığı
ee <sub>s</sub>	Substratların Enantiyomerik Aşırılığı
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Demir Oksit
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ	Demir Oksit Üzerine Glutaraldehit ile Tutuklanmış Lipaz
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /KT	Manyetik Kitosan
k <sub>R</sub> , k <sub>S</sub> , k <sub>1</sub> , k <sub>2</sub>	Hız Sabitleri, mmol/Lh
GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /KT	Grafen Oksit/Demir Oksit/Kitosan Nanokompoziti
GO-GA-Lİ	Grafen Oksit Üzerine Glutaraldehit ile Tutuklanmış Lipaz
R	Konfigürasyonu R Olan Enantiyomer
S	Konfigürasyonu S Olan Enantiyomer
T	Sıcaklık, °C
t	Süre, saat
U	Enzim Aktivitesi, µmol /dak.ml veya mg

### Kısaltmalar

Cal-B	<i>Candida Antartica</i> Lipazı
EPH	Epiklorohidrin
FTIR	Fourier Transform Spektroskopisi
GA	Glutaraldehit
GO	Grafen Oksit
GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Grafen Oksit-Demir Oksit Nanokompoziti
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
KT	Kitosan
Lİ	Lipaz
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Grafen oksitin yapısı.....	3
Şekil 2.1 Lipazların katalitik aktivasyonu.....	7
Şekil 2.2 Lipaz Cal-B'nin kristal yapısı.....	9
Şekil 2.3 Candida rugosa lipazının üç boyutlu yapısı.....	10
Şekil 2.4 Bromokloroflorometanın enantiyomerleri .....	15
Şekil 2.5 Kiral bir ilacın enantiyomerlerinin etkileşimini ve bağlanma bölgesini gösteren basit bir model.....	16
Şekil 2.6 Enantiyomerik saflıkta ürün elde etme yöntemleri.....	18
Şekil 2.7 Stereoseçici sentez ve rasematların rezolüsyonu .....	19
Şekil 2.8 Katalitik kinetik rezolüsyon.....	20
Şekil 2.9 Dinamik kinetik rezolüsyon.....	21
Şekil 2.10 Fiziksel adsorpsiyon ile enzim tutuklama.....	24
Şekil 2.11 Fiziksel adsorpsiyon ve iyonik bağlama .....	25
Şekil 2.12 Kovalent bağlanma .....	25
Şekil 2.13 Mezaporlu silikanın APTES ile modifikasyonu .....	27
Şekil 2.14 Modifiye edilmiş silikanın GA ile aktivasyonu .....	27
Şekil 2.15 GA ile aktive edilen desteğin farklı etkileşim bölgeleri .....	28
Şekil 2.16 Modifiye edilmiş aktif silika üzerine Cal-B tutuklanması.....	28
Şekil 2.17 Çapraz bağlama ile enzim tutuklama.....	30
Şekil 2.18 Katı bir desteğe hapsederek enzim tutuklama .....	30
Şekil 2.19 Mikrokapsül örneklerinin taramalı elektron mikroskop görüntüsü.....	31
Şekil 2.20 Membranda enzim tutuklama .....	32
Şekil 2.21 1-feniletanolün molekül yapısı (R ve S formları).....	32
Şekil 3.1 Asetil 1-feniletanolün kinetik rezolüsyonu.....	34
Şekil 3.2 APTS ile modifiye edilmiş manyetik nanoparçacıklar (APTS-MagNP).....	35
Şekil 3.3 CAL-B/APTS-MagNP tutuklanmış enzimi ile 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesi.....	35
Şekil 3.4 Tutuklanmış enzimlerin tekrar kullanılabilirliği.....	36
Şekil 3.5.a. TEM görüntüsü Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanoparçacıklar, b. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Silika nanoparçacıklar.....	37
Şekil 3.6 SEM görüntüsü Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Silika-iyonik sıvı.....	37
Şekil 3.7 Lipaz konsantrasyonunun aktivite ve bağlanma verimi üzerine etkisi .....	38
Şekil 3.8 Sıcaklığın enzimatik aktiviteye etkisi .....	39
Şekil 3.9 Tutuklanmış enzimlerin tekrar kullanılabilirliği.....	40
Şekil 3.10 Propranololün kinetik rezolüsyonu .....	40
Şekil 3.11 Polianilin aktivasyonunda glutaraldehit derişiminin aktiviteye etkisi .....	42
Şekil 3.12 Polianilin üzerine Candida rugosa lipazı tutuklanmasında enzim miktarının aktiviteye etkisi.....	42
Şekil 3.13 Çapraz bağlayıcılar ve lipazın birbirine bağlanması .....	45
Şekil 3.14 Lipaz ve çapraz bağlayıcılar arasında amid bağı oluştuktan sonra manyetik kitosana tutuklanma işlemi.....	45
Şekil 3.15 Tutuklanmış enzim biyokatalizörlüğünde rasemik atenololün asetillenmesi .....	46
Şekil 3.16 (R,S)-Atenololün kinetik rezolüsyonunda tutuklanmış enzimlerin tekrar kullanılabilirliği.....	47
Şekil 3.17 Demir oksit manyetik nanoparçacıkların oluşumu ve HRP'nin manyetik destek materyallerine tutuklanması.....	48
Şekil 3.18 Tutuklanmış enzim dozunun fenolün uzaklaştırılmasına etkisi.....	48
Şekil 3.19 GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanokompozite tutuklanmış enzimlerin tekrar kullanılabilirliği .....	48
Şekil 4.1 Nanoparçacıkların aktive edilmesi.....	50
Şekil 4.2 Aktif nanoparçacıklara Novozyme Cal-B lipazı tutuklama aşamaları.....	51

Şekil 4.3 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ enziminin üretim mekanizması .....	52
Şekil 4.3 Glutaraldehit ve etilendiamin.....	53
Şekil 4.5 GO nanoparçacıkların etilendiamin ile modifikasyonu .....	54
Şekil 4.6 GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> kompoziti üretim şeması.....	55
Şekil 4.7 Kitosanın yapısı .....	57
Şekil 4.8 Manyetik kitosan nanoparçacıkların sentez şeması .....	58
Şekil 4.9 1-feniletanolün tutuklanmış enzimler ile kinetik rezolüsyonu.....	61
Şekil 5.1 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ve Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ enziminin SEM görüntüsü.....	62
Şekil 5.2 GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ve GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ'nin SEM görüntüsü.....	63
Şekil 5.3 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ve Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ enziminin EDX spektrumları, a. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , b. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ....	63
Şekil 5.4 GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ve GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ enziminin EDX spektrumları a. GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , b. GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ.....	64
Şekil 5.5 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> 'ün saf ve enzim yüklü formunun FT-IR spektrumu.....	65
Şekil 5.6 GO'nun saf ve enzim yüklü halinin FT-IR spektrumu .....	66
Şekil 5.7 GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> 'ün saf ve enzim yüklü halinin FT-IR spektrumu.....	67
Şekil 5.8 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /KT'nin saf ve enzim yüklü halinin FT-IR spektrumu .....	68
Şekil 5.9 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /GO/KT'nin saf ve enzim yüklü halinin FT-IR spektrum .....	68
Şekil 5.10 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ tutuklanmış enzim aktivitesi üzerine pH etkisi .....	70
Şekil 5.11 GO-GA-Lİ tutuklanmış enzim aktivitesi üzerine pH etkisi .....	71
Şekil 5.12 GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ tutuklanmış enzim aktivitesi üzerine pH etkisi .....	71
Şekil 5.13 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ tutuklanmış enzim aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi.....	72
Şekil 5.14 GO-GA-Lİ tutuklanmış enzim aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi .....	73
Şekil 5.15 GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ tutuklanmış enzim aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi .....	73
Şekil 5.16 Tutuklama süresinin aktiviteye etkisi .....	74
Şekil 5.17 Glutaraldehit ve epiklorohidrin derişiminin Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ ve Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -EPH-Lİ tutuklanmış enzim aktivitelere etkisi.....	76
Şekil 5.18 Glutaraldehit ve epiklorohidrin derişiminin GO-GA-Lİ ve GO-EPH-Lİ tutuklanmış enzim aktivitelere etkisi.....	77
Şekil 5.19 Glutaraldehit ve epiklorohidrin derişiminin GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ ve GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -EPH-Lİ tutuklanmış enzim aktivitelere etkisi.....	77
Şekil 5.20 Tween 80 ve Triton X-100 derişiminin Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ tutuklanmış enzim aktivitesine etkisi.....	79
Şekil 5.21 Tween 80 ve Triton X-100 derişiminin GO-GA-Lİ tutuklanmış enzim aktivitesine etkisi.....	80
Şekil 5.22 Tween 80 ve Triton X-100 derişiminin GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ tutuklanmış enzim aktivitesine etkisi.....	81
Şekil 5.23 Bağlanmamış ve tutuklanmış enzim aktivitesi (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ) .....	83
Şekil 5.24 Bağlanmamış (çözeltide kalan) ve tutuklanmış enzim aktivitesi (GO-GA-Lİ) .....	83
Şekil 5.25 Bağlanmamış ve tutuklanmış enzim aktivitesi (GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ) .....	84
Şekil 5.26 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm üzerine etkisi.....	86
Şekil 5.27 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik oran ve dönüşüm üzerine etkisi.....	87
Şekil 5.28 GO-GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm üzerine etkisi.....	88
Şekil 5.29 GO-GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik oran ve dönüşüm üzerine etkisi.....	88
Şekil 5.30 GO-GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm üzerine etkisi.....	90
Şekil 5.31 GO-GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik oran ve dönüşüm üzerine etkisi.....	90
Şekil 5.32 GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm üzerine etkisi.....	91

Şekil 5.33 GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik oran ve dönüşüm üzerine etkisi.....	91
Şekil 5.34 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /KT-GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm üzerine etkisi.....	93
Şekil 5.35 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /KT-GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik oran ve dönüşüm üzerine etkisi.....	93
Şekil 5.36 GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /KT-GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm üzerine etkisi.....	94
Şekil 5.37 GO/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /KT-GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik oran ve dönüşüm üzerine etkisi.....	94
Şekil 5.38 Tutuklanmış enzimlerin tekrar kullanılabilirliği .....	95



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Mikrobiyal lipazlar üzerine EDTA (etilendiamin tetraasetik asit) ve metal .....	11
Çizelge 2.2 Kullanımı en yaygın olan bazı ticari lipaz türleri .....	13
Çizelge 2.3 Enzim tutuklama yöntemleri.....	23
Çizelge 3.1 (RS)-1-feniletanolün kinetik rezolüsyonu.....	36
Çizelge 3.2 İyonik sıvıların enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	38
Çizelge 3.3 (R,S)-feniletil asetatın kinetik rezolüsyonu .....	43
Çizelge 3.4 Atenololün enantiyoseçimliliği.....	46



## 1. GİRİŞ

Açılglicerolaz, açilhidrolaz ve triaçilglicerol hidrolaz olarak tanımlanan lipaz enzimi, çok yönlü ve yaygın bir enzim türüdür. Lipazlar mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvanlarda yaygın olarak bulunurlar (Krishina ve Karanth 2002).

Endüstride oldukça geniş uygulama alanına sahip olan lipazlar başlıca, süt ve kozmetik endüstrisinde, katı-sıvı yağ ve zirai ilaç üretiminde kullanılırlar. Bunlara ek olarak, biodizel üretmek için petrol endüstrisinde ve atık yağ hidrolizinde de kullanılmaktadırlar (Gül 2013).

Yüksek stereoseçimlilik özelliklerinden dolayı lipazlar, organik kimyada çok kıymetli enzimlerdir. Rasemik karışımları enantiyomerlerine ayırmak için kinetik ve kinetik dinamik rezolüsyonda en çok tercih edilen enzimlerdir (Brem vd. 2011).

Son yıllarda, enantiyomerik saflıkta ürün elde etmek için bir çok çalışma yapılmıştır. Özellikle ilaç, gıda, zirai-kimyasallar ve parfüm endüstrisinde enantiyomerik olarak saf bileşikler elde etmek çok önemlidir. Çünkü, herhangi bir rasematın enantiyomerleri farklı biyolojik etki gösterebilmektedir. Bir enantiyomer istenen aktiviteyi verirken, diğer enantiyomer inaktif veya toksik olabilmektedir. Kullanıcılarda oluşabilecek ciddi yan etkileri ortadan kaldırmak için bazı rasematların enantiyomerlerine ayrılması şarttır (Sheldon vd. 1993).

Enantiyomerik açıdan saf ikincil alkoller, önemli sentetik ara ürünlerdir; bunun yanı sıra sentetik ve analitik uygulamalar için önemli kiral yardımcı kimyasallardır (Goswami ve Goswami 2005). İkincil alkollerden kiral feniletanol ve türevleri, farmasötikler, zirai ilaçlar ve doğal ürünler için önemli kiral yapı taşıdır (Habulin ve Knez 2009). Optikçe aktif 1-feniletanol, değerli kimyasalların üretiminde ve ilaç endüstrisinde kiral yapı taşı ve sentetik ara ürün olarak kullanılmaktadır (Hernandez-Fernandez vd. 2008). 1-feniletanolün saf R(+) ve S(-) formları, enantiyomerik saflığın belirlenmesinde ve halkalı anhidridler ile epoksidlerin asimetrik açılımında kiral ajan işlevi görmektedir

(Frings vd. 1999). R-1-feniletanol hafif çiçek kokusu sebebiyle özellikle kozmetik endüstrisinde yaygın olarak kullanılır. Bunun dışında, R-1-feniletanol solvatokromik boya, oftalmik koruyucu ve kolesterol bağırsak adsorpsiyon inhibitörü olarakta kullanılır. (S)-1-feniletanol ise Alzheimer ilaçlarının yapımında kullanılan bir öncü madde olmasıyla biyokimya alanında önemli bir üründür (Hernandez-Fernandez vd. 2008).

Geçmiş yıllarda, klasik yöntemler ile enantiyomerlerine ayıramayan bazı kiral ilaçlar, rasemat olarak piyasaya sürülmüş ve insan sağlığına ciddi zararlar vermiştir. Günümüzde, bu sorunu ortadan kaldırmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan biri, biyokatalizör olarak kullanılan enzimlerin aktivitesini ve enantiyoseçimliliğini arttırmak için tutuklanmasıdır. Birçok çalışmada serbest enzim ile başarı elde edilmezken tutuklanmış enzimler ile saf bileşenler elde edilebilmiştir (Sikora vd. 2016).

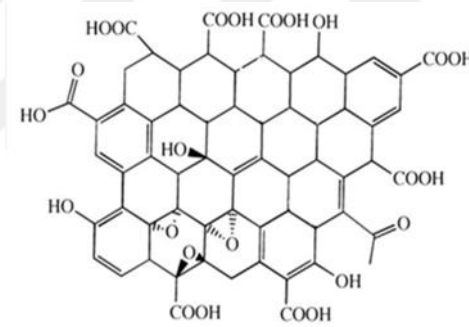
Tutuklanmış enzimlerin serbest enzimlere göre bir çok avantajı vardır. Tutuklanmış enzimleri reaksiyon ortamından ayırmak çok daha kolaydır ve ayrılan enzimleri tekrar tekrar kullanmak mümkündür. Enzimlerin tekrar tekrar kullanılması maliyeti düşüren önemli bir parametredir. Tutuklanmış enzimler ile daha saf ürünler elde etmek mümkündür. Tutuklanmış enzimler, serbest formlarına kıyasla daha dayanıklı bir yapıya sahip olurlar. Tutuklama yöntemine bağlı olarak, tutuklanmış enzimin aktivitesi, kararlılığı ve seçiciliği artabilir (Nelson ve Griffen 1916).

Tutuklama yönteminde; sıkça rastlanan difüzyon kısıtlamasını azalttıkları, geniş bir yüzey alanına sahip oldukları ve yüksek enzim tutma kapasiteleri sebebiyle nanoparçacıklar, son yıllarda enzim tutuklama işleminde ideal bir destek materyali olarak sıkça kullanılmaktadırlar (Chang ve Tang 2014). Aşağıda bu nano parçacıklardan bazılarının örnekler verilmiştir.

Manyetik materyal demir oksit veya demir oksit ile elde edilen kompozit nanoparçacıklar enzim tutuklamada çok sık kullanılmaktadır. Manyetik bir taşıyıcı elde etmek için demir oksit fonksiyonel gruplar veya inorganik bileşenler ile modifiye edilebilir. Demir oksit nanoparçacıklarının (yüzey alanı:hacim oranı)'nın yüksek olması daha fazla enzim yüklenmesini sağlar ve tutuklanmış enzimin katalitik verimini artırır.

Ayrıca tutuklanmış enzimin manyetik olması ortamdaki kolayca geri kazanımını sağlar. Manyetik bir alan yardımıyla tutuklanmış enzim ortamdaki kolayca ayrılır ve yıkama işleminden sonra tekrar tekrar kullanılabilir. Ayrıca ortamdaki kolayca ayrılması daha temiz ürünlerin elde edilmesini ve işletim maliyetinin azalmasını sağlar (Jiang vd. 2009).

Şekil 1.1’de yüzey yapısı görülen grafen oksit (GO), enzim tutuklamada çokça tercih edilen bir destek materyalidir. Geniş yüzey alanı, iki boyutlu yapısı ve yüzeyinde bolca reaktif oksijen grupları bulundurması başlıca tercih sebebidir. GO, hem istenen biyokatalizörün yüksek ölçüde yüklenmesini sağlar hemde substrat ve ürünlerin kütle transferini kolaylaştırır. GO bazlı enzimler özellikle atık su arıtımında başarılı sonuçlar vermektedir (Zhang vd. 2014).



Şekil 1.1 Grafen oksit yapısı (Kharrissova vd. 2016)

Enzim tutuklama çalışmalarında kullanılan diğer bir destek materyali de kitosan ve kitosan kompozitleridir. Kitosan, güçlü bazik bir ortamda ve çok yüksek sıcaklıkta kitinin deasetilasyonu ile elde edilen bir polimerdir. Kitosan suda çözünmez; çözeltiye bir alkali ilave edildiğinde kolayca yeniden şekillendirilebilir. Biyolojik olarak uyumlu olması, toksik olmaması, çeşitli formlarda bulunması ve yüksek mekanik mukavemete sahip olması gibi nedenlerden dolayı kitosan, tutuklama yöntemi için çok uygun bir materyaldir. Kitosan üzerine enzim tutuklamak, enzimin kararlılığını artırır ve enzimin aktivitesi kaybolmadan ya da destek materyali kirlenmeden enzimin destekten kolayca ayrılmasını sağlar. Buna ek olarak, kitosanın enzimlere benzer özellikleri mevcuttur. Çünkü yüksek miktarda enzim inorganik materyallere ya da sentetik reçinelere

bağlanamazken, kitosanın yüksek reaktif amino gruplarına kolayca bağlanabilir (Lau vd. 2014).

Grafen oksit kompozitler mükemmel mekanik ve termal özelliklere sahiptir. Benzer şekilde demir oksit kompozitleride, özellikle, enzimin geri kazanılması açısından önemli destek materyalleridir. Grafen oksit ve demir oksit kitosan ile birleştiğinde kitosanın fiziksel dayanıklılığı artmaktadır. Grafen oksit ve demir oksit, kitosan matrisi içerisinde mükemmel bir dağılım sergiler. Bu sebeple, grafen oksit/demir oksit/kitosan kompoziti enzim tutuklamak için oldukça ideal bir destek materyalidir. Üç bileşen de farklı kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip olduğundan, oluşan kompozit yeni ve çeşitli özellikler kazanır (Yadav vd. 2014).

Tüm bu anlatılanlar doğrultusunda, lipaz enzimini nanoparçacıklardan oluşan farklı destek materyallerine tutuklayarak enzim aktivitesini ve kararlılığını arttırmak mümkün olabilir. Enantiyoseçimliliği arttırmak ve enantiyomerik saflıkta bileşen elde etmek için enzim tutuklamak önemli bir yöntemdir. Tutuklanmış enzimin ortamdan kolayca geri alınması daha temiz ürünlerin elde edilmesini sağlar. Bunlara ek olarak, enzimin tutuklanmasıyla geri kazanımının kolay olması ve tekrar tekrar kullanılabilir olması ekonomik açıdan önemlidir.

Bu çalışmada, *Candida antarctica* lipazını nanoparçacıklara tutuklayarak enzimatik aktivitesini ve enantiyoseçimliliğini arttırmak amaçlanmıştır. Bu amaçla öncelikle çeşitli nanoparçacıklar sentezlenmiş; daha sonra sentezlenen nanoparçacıklara *Candida antarctica* lipazı kovalent bağlama yöntemi ile tutuklanmış ve son olarak tutuklanmış enzimler (R,S)-1-feniletanolün enantiyoseçimli transesterleşme tepkimesinde biyokatalizör olarak kullanılmıştır.

## 2. KURUMSAL TEMELLER

### 2.1 Enzimler ve Genel Özellikleri

Enzimler, yan ürün oluşturmaksızın canlı organizmalardaki tepkimeleri hızlandıran ve mükemmel bir ürün verimi sağlayan çok yönlü biyokatalizörlerdir.

Enzimlerde proteinden başka katalitik aktiviteyi sağlayan ve kofaktör denilen protein olmayan bir kısım vardır. Bu kısım, koenzimdeki bir organik bileşik veya bir metal iyonu olabilir. Kofaktörler enzimlere göre yüksek sıcaklığa daha dayanıklıdır. Holoenzim, aktif enzim-kofaktör kompleksi, apoenzim ise kofaktörsüz ve katalitik olarak aktif olmayan proteindir. Enzimlerin etkileyip değişikliğe uğrattığı moleküle substrat adı verilir.

Enzim molekülünün üzerinde aktif bir bölge mevcuttur ve bu bölgede kofaktör ve koenzimler yer almaktadır. Aktif merkezde ise substratın bağlanması için bir cep ve birden fazla katalitik aktivite bölgeleri yer almaktadır. Kendine özgü yapısı olan bu bölgeler aminoasit kalıntılarından oluşmuştur (Yılmaz 2010).

Hem sulu hem de organik ortamda aktif olan enzimler genelde çift yönlü reaksiyonları kontrol ederler. Substrat yüzeyinin artmasıyla enzim aktivitesi de artar (Aksoy 2003).

Aktivite tayinlerinde genellikle ya kaybolan substrat miktarı ya da oluşan ürün miktarı ölçülmektedir. Enzimin aktivitesini ölçerken pratik ve hassas bir yöntemin seçilmesi önemlidir. Bir mikromol substratı bir dakikada ve uygun koşullarda ürüne çeviren enzim miktarı bir ünite olarak adlandırılır. Enzim üniteleri U veya UI şeklinde gösterilmektedir. Bir miligram proteinde bulunan enzim ünite sayısı spesifik aktivite olarak tanımlanır. Enzim saflığının bir ölçüsü olan spesifik aktivite ünite/mg protein olarak gösterilir (Cernia 2002).

### 2.1.1 Enzim kullanmanın avantajları

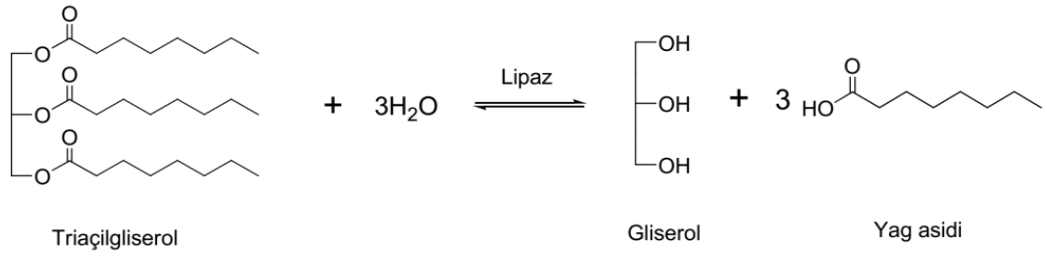
- Yan ürün oluşumu ya çok azdır ya da hiç gözlenmemektedir,
- Enzimlerin katalitik etkinliği kimyasal katalizörlerinkine göre çok daha fazladır,
- Reaksiyonlar ılıman şartlarda gerçekleşir,
- Enzimler doğal katalizör olduklarından çevreye zararlı değildirler,
- Daha az basamaklı tepkimeler gerçekleşir,
- Kimyasal seçicilik, bölge seçiciliği, diastomer seçiciliği ve enantiyomer seçiciliği gösterirler.
- Doğal substratlarla sınırlı değildirler ve organik bileşiklere de uygulanabilirler.

### 2.2 Lipazlar

Lipazlar (E.C.3.1.1.3), trigliseritleri su-yağ arayüzlerinde hidroliz etme kabiliyetine sahip olan bir enzim türüdür. Bu tepkime terisinir olduğundan, lipazlar aynı zamanda gliserol ve serbest yağ asitlerinden açilgliserollerin oluşumunu da katalizler (Alloue vd. 2007).

Lipazlar çok çeşitli reaksiyon ortamlarına dayanıklı olduklarından, hem endüstride hem de akademik ölçüde en çok kullanılan biyokatalizörlerdir. Lipazlar organik çözücüler, iyonik sıvılar ve süperkritik akışkanlara uygulanabilirler. Esterlerin hidrolizi, esterleşme ve transesterleşme gibi bir çok farklı tepkimeyi katalizleyen lipazlar, perhidroliz ve karbon-karbon bağı oluşumu gibi daha karışık tepkimeleri de katalizleyebilirler (Garcia-Galan vd. 2014). Şekil 2.1'de lipazların katalizlediği bir hidroliz tepkimesi gösterilmiştir.

Yüksek enantiyoseçicilik özelliğine sahip oldukları için, rasemik karışımların kinetik rezolüsyonu lipazların en çok uygulandığı tepkimlerdendir (Brem vd. 2011).



Şekil 2.1 Lipazların katalitik aktivasyonu (Yılmaz 2010)

Lipazların molekül kütlesi 19-60 kDa aralığında değişmektedir (Garrett ve Grisham 1999). Primer yapısına rağmen farklı orjinlere sahip lipazların aminoasit sıralarında farklılıklar gözlenmektedir. Tüm lipazlarda bir pentapeptid (GX SXG) mevcuttur; ve bu sırada, G:glisin, S:serin ve X:herhangi bir aminoasiti işaret etmektedir. (Gao 2004).

Endüstride oldukça geniş uygulama alanına sahip olan lipazlar başlıca, süt ve kozmetik endüstrisinde, katı-sıvı yağ ve zirai ilaç üretiminde kullanılırlar. Bunlara ek olarak, biodizel üretmek için petrol endüstrisinde ve atık yağ hidrolizinde de kullanılmaktadırlar (Gül 2013).

### 2.2.1 Lipazların kaynakları

Lipazlar bitki, hayvan veya mikroorganizma kökenli olabilirler. Genelde, organik kimya ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan lipazlar, mikroorganizmalardan başlıca bakteri ve mantardan elde edilirler (Gao vd.2000).

Biyoteknolojide sıkça kullanılan lipazların bazıları aşağıda gösterilmiştir (Jaeger ve Reetz 1998):

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

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

Mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar bitki ve hayvanlardan elde edilenlere göre daha kolay üretilirler, ucuzdurlar ve güvenlidirler (Wiseman 1995). Bunların dışında, mikroorganizma kökenli lipazlar kofaktöre gereksinim duymazlar, çözücülerde oldukça kararlıdır, geniş bir substrat özelliğine sahiptirler ve yüksek oranda enantioseçicilik gösterirler (Saraç vd. 2008).

Bakteri, mantar, bitki veya hayvan kaynaklı olmalarına göre lipazlar termal kararlılık, pH duyarlılığı, dayanıklılık, enantioseçicilik ve bölgesel seçicilik gibi özelliklerde farklı etkiler gösterirler (Yılmaz 2010).

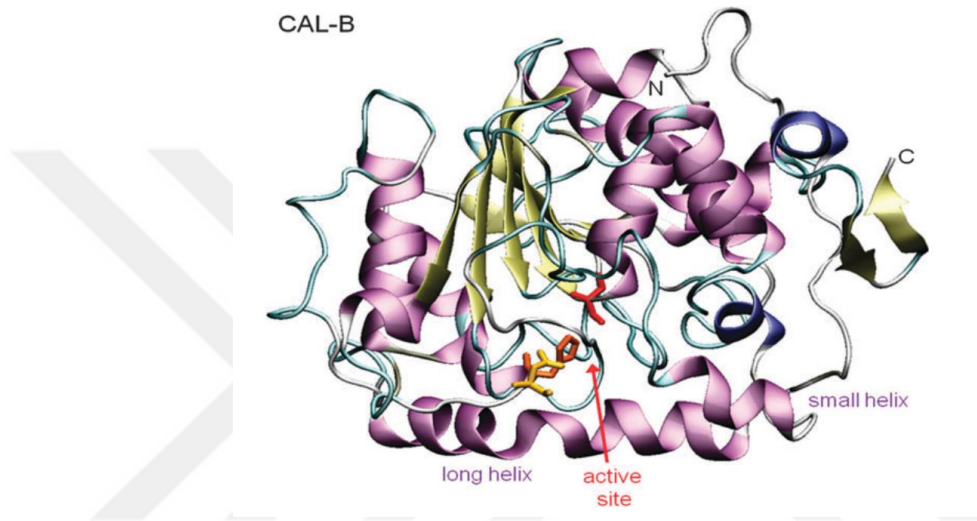
### **2.2.2 *Candida antarctica* lipazı**

*Candida* çeşitli ürünlerden elde edilmiş bir maya türüdür. Ticari olarak sağlanabilen, heterojen yapılı Novozyme 435 *Candida antarctica* lipazını (Cal-B) içermektedir. Novozyme 435, makro gözenekli akrilik reçineye tutuklanmış olarak ve serbest halde ticari olarak mevcuttur (Poojari ve Clarson 2013).

Cal-B, trigliseridlerin sentezi ve terpenik alkollerin esterleşmesi gibi bir çok endüstriyel proste biyokatalizör olarak kullanılmaktadır (Arroyo vd. 1998). Şekerlerin, nükleositlerin ve steroidlerin transesterleşme ve esterleşme reaksiyonlarında büyük ölçüde bölgesel seçici olduğu gözlenmiştir. Organik çözücü içerisindeki esterleşme tepkimelerinde büyük ölçüde başarılı bulunan Cal-B, ikincil alkollerin kinetik rezolüsyonunda ve hidroliz tepkimelerinde de yüksek enantioseçimlilik özelliği göstermektedir (Poojari ve Clarson 2013).

Klahn vd. (2011) X-ışınları difraksiyonu ile Cal-B'nin kristal yapısını incelemiştir (Şekil 2.2). Bu yapının aktif sitesi orta düzey bir asetilasyon tepkimesini göstermek için değiştirilmiştir. Asetilasyon tepkimeleri lipazların katalizlediği önemli tepkimelerdendir.

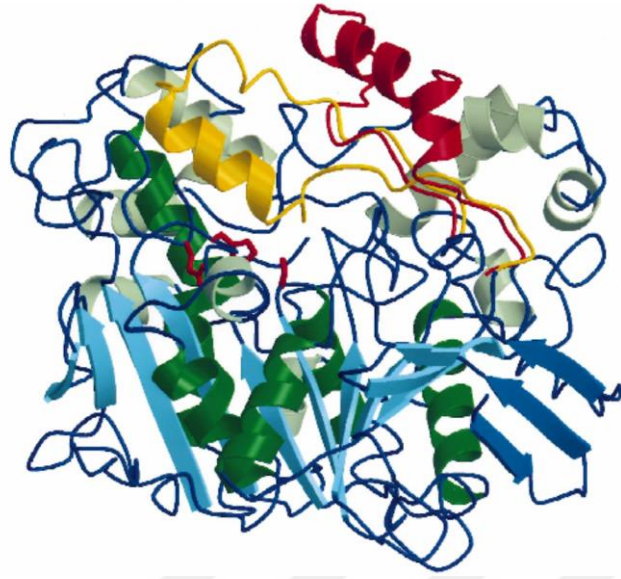
Lipazlar serin, histidin ve aspartik asit katalitik üçlüsünü içeren, serin hidrolazlar grubuna girmektedirler. Bu yapı Cal-B'nin yapısında da mevcuttur. Ser 105'in hidroksil grubundan 1 protonu, komşu olan His 224 zincirine transfer etmesiyle asetilasyon tepkimesi başlar. Aktive edilmiş Ser bir sonraki aşamada asetilasyona uğrar ve tetrahedral yapı oluşturur. Bu tetrahedral yapı içerisinde, aktive edilmiş Ser'in oksijen atomu asetil substrata kovalent bağlanma yöntemi ile bağlanır (Klahn 2011).



Şekil 2.2 Lipaz Cal-B'nin kristal yapısı (Klahn 2011)

### 2.2.3 Lipazların yapısı

Çoğunluğu hücre dışı olan ve asidik glikoprotein olarak bilinen lipazların moleküler ağırlığı 20 ve 60 kDa arasındadır. Saflaştırılmış lipazlar genelde % 2-15 oranında karbonhidrat içermektedir. Birincil yapıları araştırılan hayvan, bakteri veya mantar kökenli lipazların aminoasit sayılarının 270 ile 641 arasında değiştiği görülmüştür.  $\alpha/\beta$ -hidrolaz katlanması olarak bilinen bir yapı tüm lipazların ortak noktasıdır. Lipazların iç yapısında 8 çeşit  $\beta$  zincirinden meydana gelen bir tabaka ve bu tabakayı kapsayan 6 tane  $\alpha$ -heliks zinciri mevcuttur (Şekil 2.3). Lipazların aktif bölgesinde aspartik (glutamik) asit, histidin ve serin aminoasitlerini içeren bir katalitik üçlü vardır. Bu katalitik üçlü, serin ve aspartik asit aminoasitlerinin bir hidrojen bağı yardımı ile histidine bağlanmasıyla meydana gelmektedir (Jaeger ve Reetz 1999).



Şekil 2.3 *Candida rugosa* lipazının üç boyutlu yapısı (Jaeger ve Reetz 1999)

Şekil 2.3'teki açık mavi yapılar; her iki taraftan  $\alpha$ -heliksler ile kaplı olan hidrofobik  $\beta$ -düzlemini, koyu yeşil renk; merkez  $\beta$ -düzlemini kaplayan heliksleri, sarı renk; lipazın kapalı konformasyonunu, kırmızı renk; lipazın açık konformasyonunu göstermektedir.

#### 2.2.4 Lipazların ara yüzey aktivasyonu

Lipolitik enzimlerin çözünmeyen substratlar veya su-yağ arayüzleri ile etkileşimi sonucu, lipazın aktif bölgesi yeni bir yapı kazanır ve enzim aktivitesinde artış görülür. Ara yüzey katalizinin bu benzersiz özelliği, lipazları diğer hidrolitik enzimlerden ayırmaktadır. Estereazların tersine, lipazlar monomerik haldeki substartlarda hemen hemen hiç aktivite göstermezler (Martinelle vd. 1995).

Su-yağ arayüzey olmadığı durumda lipazların aktif merkezi "lid" olarak tanımlanan  $\alpha$ -helikal bir kapak ile örtülmüştür. Hidrofobik maddeler ile etkileşim sonucu bu kapak hareket ederek enzimi kapalı yapıdan açık yapıya dönüştürür. Sonuçta, hidrofobik bir yüzey oluşur ve aktif merkez çözücü içine ulaşabilir (Jaeger vd. 1999).

## 2.2.5 Lipazların aktivasyonu ve inhibisyonu

Lipazların aktivitesini etkileyen metal iyonları ve reaktifler gibi bir çok materyal bulunmaktadır. Örneğin, lipaz aktivitesini en çok arttıran iyonun  $Ca^{+2}$  olduğu bulunmuştur. Bunun dışında bir çok alkali metal katyonları da lipazların aktivitesini arttırmaktadır (Öztürk 2001).

Lipaz aktivitesini olumsuz yönde etkileyen maddeler de mevcuttur. Ağır metal katyonları ( $Ni^{+2}$ ,  $Sn^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$  vb. ), borik asit, anyonik yüzey aktif maddeler ve bazı fosfor içeren bileşikler (diizopropilfloro fosfat vb.) lipazları inhibe etmektedirler (Akoh ve Min 1998). Çizelge 2.1’de bazı mikrobiyal lipazları inhibe veya aktive eden materyaller gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Mikrobiyal lipazlar üzerine EDTA (etilendiamin tetraasetik asit) ve metal iyonları etkisi (Barbosa vd. 2012)

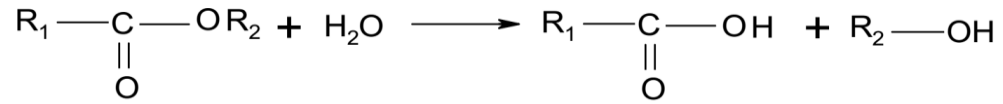
Mikroorganizma	Aktivatör	İnhibitör
<i>Burkholderia cepacia</i> <sup>1</sup>	$Mg^{2+}$ , $Ca^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Zn^{2+}$ , $Co^{2+}$	EDTA
<i>Metarhisiium anisopliae</i> <sup>36</sup>	$Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ , $Co^{2+}$	$Mn^{2+}$
<i>Spirulina platensis</i> <sup>2</sup>	$Ca^{+2}$ , $Mg^{+2}$ , $Zn^{+2}$	$Li^{+1}$ , $Fe^{+2}$ , $Mn^{+2}$ , EDTA
<i>Pseudomonas gessardii</i> <sup>32</sup>	$Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$	$K^{+}$ , $Zn^{2+}$ , $Mn^{2+}$ , $Fe^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , EDTA
<i>Bacillus</i> sp. ITP-001	$Ca^{2+}$ , $Co^{2+}$ , $Fe^{3+}$ , $Mg^{2+}$ , $Mn^{2+}$ , $Zn^{2+}$	$Cu^{2+}$ ,

## 2.2.6 Lipazların katalizlediği reaksiyonlar

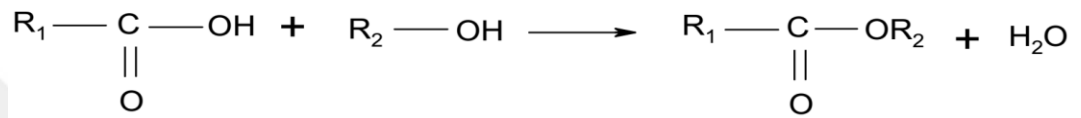
Farklı kaynaklardan elde edilen lipazların çoğu, hidrolitik enzimlere kıyasla polar olmayan organik çözücülerde çok daha kararlı bir yapı sergilemektedirler. Lipazlar, esterleşme, transesterleşme ve hidroliz tepkimeleri gibi farklı türlü bir çok tepkimede biyokatalizör olarak kullanılmaktadırlar. Tranesterleşme tepkimeleri esterdeki açıl grubuna göre farklı isimler almaktadır. Açıl grubu değişimi bir asit ile yapılmışsa

asidoliziz, alkol ile yapılmışsa alkoliziz, amin ile yapılmışsa aminoliziz veya bir başka ester ile yapılmışsa interesterleşme adlarını almaktadır (Yılmaz 2010).

### 1. Hidroliz

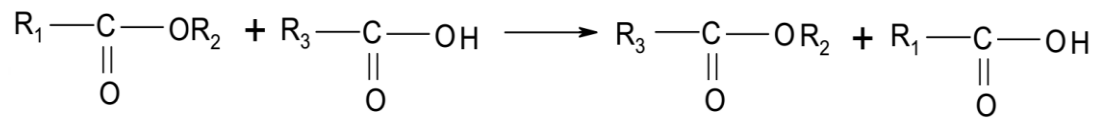


### 2. Esterleşme

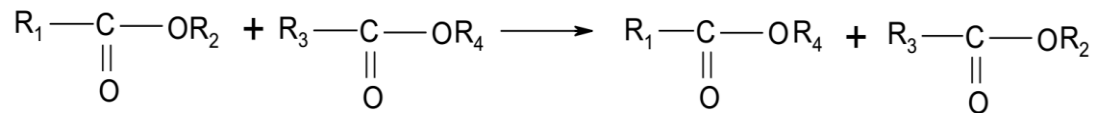


### 3. Transesterleşme

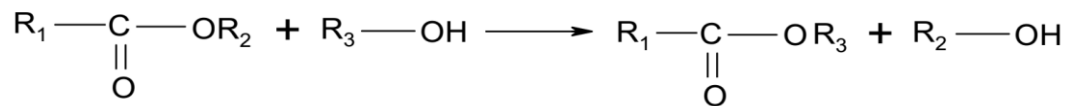
#### ✓ Asidoliziz



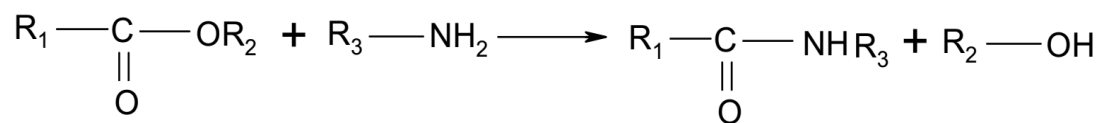
#### ✓ İnteresterleşme



#### ✓ Alkoliziz



#### ✓ Aminoliziz



## 2.2.7 Lipazların endüstride kullanım alanları

Lipazlar, sulu ve organik çözücülerde iyi bir aktivite gösterdikleri için, endüstrinin bir çok alanında, akademik alanda ve tıp alanında çok önemlidirler (Bjokling vd. 1991). Lipaz teknolojisindeki ilerlemeler ile yeni bileşiklerin sentezi mümkün olmaktadır (Ghosh vd. 1996). Lipazlar, süt, kağıt, kozmetik ve gıda endüstrilerinde en çok kullanılan enzim türlerindedir. Kimyasal analiz ve ilaç proseslerinde, lipazlar ile çok başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bunların dışında, organik sentezlerde ve yağ içeren atık suların enzimatik degradasyonunda da kullanılmaktadırlar (Vakhlu ve Kour 2006).

Çizelge 2.2 Kullanımı en yaygın olan bazı ticari lipaz türleri (Yılmaz 2010).

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

Tutuklanmış mikrobiyal kaynaklı lipazlar günümüzde triaçilgliserol tayininde biyosensör olarak kullanılmaktadırlar. Biyosensör olarak lipaz kullanmanın temeli, analitik bir örnek içerisindeki triaçilgliserolden gliserol üretmek ve salınan gliserol

miktarını enzimatik ya da kimyasal bir yöntem ile tayin etmeye dayanmaktadır (Choudhury ve Bhunia 2015). Lipazların endüstride kullanım alanları ve en çok kullanılan lipaz türlerinin uygulama alanları çizelge 2.2’de verilmiştir.

### 2.3 Enzimatik Aktivite

Enzimlerin katalitik aktivitesi, belirli şartlarda gerçekleşen tepkime hızındaki artışın, yani belli bir zaman aralığında katalizlenen ve katalizlenmeyen tepkimelerin turnover sayıları arasındaki farkın tespit edilmesine dayanmaktadır. Enzimlerin katalitik aktivitesi hacminden bağımsız olduğu için, birim zamandaki substrat dönüşümü, enzim katalizli tepkimelerde *katal* (kat, mol dönüşümü.s<sup>-1</sup>) ile ifade edilir. U,  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  ise uluslararası ve en çok kullanılan enzimatik aktivite birimidir. Enzimlerin spesifik aktivitesi 1 mg protein başına enzim ünitesi (U/mg protein) olarak tanımlanmaktadır (İşbakan 2006).

### 2.4 Stereokimya

Kimyanın, moleküllerdeki atomların dizilişini ve üç boyutlu yapılarını inceleyen kısmı stereokimya olarak tanımlanır.

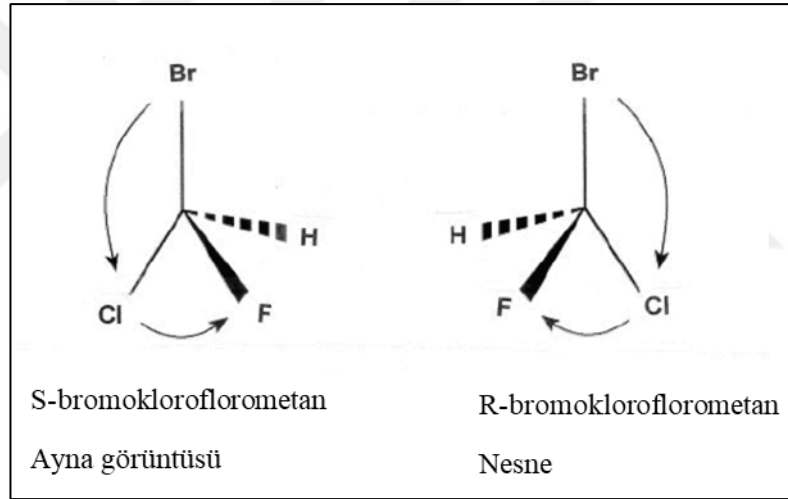
#### 2.4.1 Kirallik ve enantiyomerlik

Yunanca’da el anlamı taşıyan ve *chiro*s sözcüğünden gelen kiral kelimesi, bir molekül veya nesnenin ayna görüntüsü ile üst üste çakışmaması anlamına gelmektedir (Karadeniz 2007). Şekil 2.4’te kiral bir bileşiğin örneği görülmektedir.

Kimyada kirallik kavramı Fransız bir kimya ve biyoloji uzmanı olan Louis Pasteur tarafından bulunmuştur. Pasteur (1848) kiral bir bileşik olan sodyum amonyum tartaratın iki izomerini ilk kez ayıran kişidir. Bundan sonra, kiralitenin bitkiler ve hayvanlar alemi için önemli olduğu kadar farmasötik, tarım ve diğer kimya endüstrisinde de çok önemli olduğu anlaşılmıştır.

Tüm canlı organizmalar, amino asitler, proteinler, enzimler, nükleosidler, karbonhidratlar ve hormonlar kiral bileşik olarak tanımlanırlar. Farmasötik endüstrisinde ilaçların % 56'sı kiral ürün olarak, geriye kalan ilaçlar ise eşit oranda iki enantiyomeri de içeren rasematlar olarak kullanılmaktadır.

Yapay kiral ürünlerin yanı sıra, tüm doğal bileşikler tek bir enantiyomerik formda bulunmaktadır. Örneğin tüm doğal amino asitler l-izomer formda (levorotatory) ve tüm doğal şekerler d-izomer formdadır (dextrorotatory). İki enantiyomerin kimyasal yapısının aynı olmasına karşın, çoğu rasemik ilaçların farklı enantiyomerleri birbirinden ayrı biyolojik aktivite sergiler. Bir enantiyomer olumlu etkiye sahipken diğeri aktif olmayabilir ya da toksik etki gösterebilir (Nguyen vd. 2006).

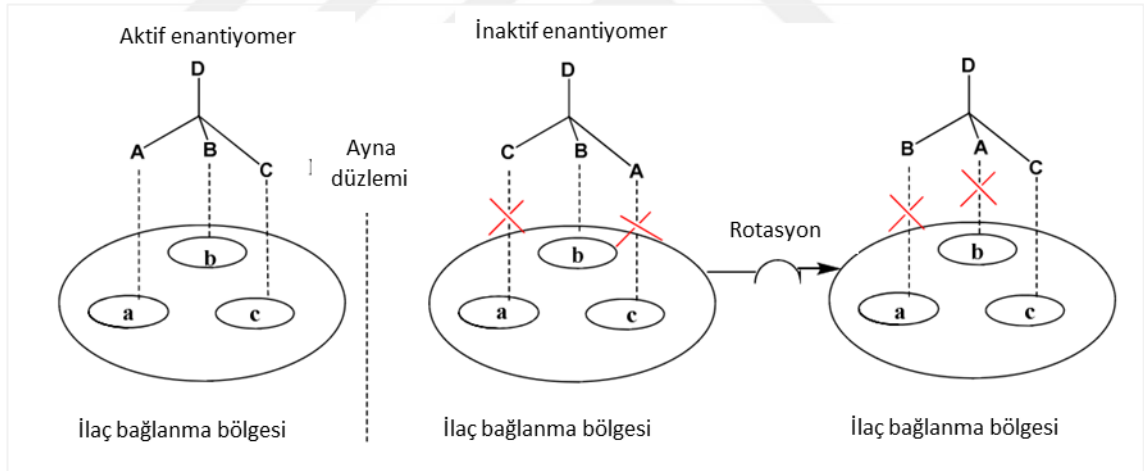


Şekil 2.4 Bromokloroflorometanın enantiyomerleri (Nguyen vd. 2006)

Kiralitenin kaynağı eksen etrafındaki kısıtlı dönüşler veya düzlemler olabileceği gibi asimetric merkez de kiralite kaynağıdır. Genellikle asimetric merkez, dört farklı yer değişimli atomu ile bir karbon atomu olmaktadır; fakat fosfor, sülfür, boron, silikon ve nadiren bir azot atomu da olabilmektedir. Eğer bir molekül birden fazla asimetric merkeze sahipse enantiyomer çiftlerinin sayısı artmaktadır. Bir çiftin enantiyomerleri polarize ışığı zıt yönde döndürme ve diğerkiral ortamlarla farklı etkileşim kurma becerisi hariç, aynı kimyasal ve fiziksel özelliklere sahiptirler. Enantiyomerlerin kiral

tanınması tüm biyoaktif maddeleri etkiler; örneğin farmasötikler, böcek ilaçları, tarım ilaçları, tatlandırıcılar, parfümler ve gıda katkı maddeleri (Turcu 2010).

Şekil 2.5'te asimetrik merkezde iki enantiyomer aynı A, B, C, D atomlarını farklı mekansal dağılımla yapısında bulundurmaktadır. Farmakolojik etkisini göstermek için, bir ilacın aktif enantiyomerinin üç atomunun (A, B ve C) reseptördeki bağlanma bölgesine karşılık gelen a, b ve c olarak etiketlenmiş bölgeler ile etkileşime girmeleri gerekir. İlacın hedefe bağlanması, bir eldivenin içine elin girmesi gibi paralel bir yapı ile tarif edilir. İstenen biyolojik etkinin başarılabilmesi için aktif enantiyomerin üç boyutlu yapısı Aa, Bb ve Cc diziliminde olmalıdır. İnaktif veya daha az aktif olan enantiyomer aktif enantiyomer ile aynı gruplara (A, B, C, D) sahip olsada, üç boyutlu yapısından dolayı reseptöre bağlanmasına ve uygun bir etkileşim gerçekleştirmesine izin verilmez (Turcu 2010).



Şekil 2.5 Kiral bir ilacın enantiyomerlerinin etkileşimini ve bağlanma bölgesini gösteren basit bir model (Turcu 2010).

#### 2.4.2 Rasemik karışımlar

Rasemik bir karışım iki enantiyomerin eşit oranda bulunduğu bir karışımdır. Rasematların enantiyomerleri, polarize ışık düzlemini eşit fakat zıt yönde değiştirdiklerinden polarize ışık düzlemindeki net etki sıfır olur ve optikçe aktif olmazlar. Farmakolojik aktif kirale maddeler genellikle rasemat şeklindedirler. İlaç

endüstrisinde büyük önem taşıyan kiral maddelerin enantiyomerleri birbirinden farklı etki gösterir. Enantiyomerlerden biri istenen olumlu etkiyi gösterirken, diğeri yan veya toksik bir etki gösterebilir. Bu sebeple, rasematları enantiyomerlerine ayırarak istenmeyen enantiyomerin % 0.1 oranına düşürülmesi gerekir (Tüzün 1994).

### 2.4.3 Enantiyoseçicilik

Enantiyomerik oran (E) ve enantiyomerik aşırılık (ee) enzim katalizli tepkimelerde kullanılan iki önemli terimdir. Enantiyomerik aşırılık, rasemik bir karışımdaki enantiyomerik saflığı ifade etmektedir. Enantiyomerik oran ise, enzim katalizli kinetik rezolüsyon tepkimelerinde enantiyoseçiciliği karakterize etmek için kullanılmaktadır. Eşitlik 2.1’de enantiyomerik aşırılığın nasıl hesaplandığı gösterilmiştir. Burada R-enantiyomerin ve S-enantiyomerin derişimleri R ve S olarak gösterilir. Rasemik bir karışımın ee değeri “0”, enantiyomerik saflıkta bir bileşiğın ee değeri ise “% 100” dır.

$$\%ee_R = \frac{R-S}{R+S} \times 100 \quad R>S \quad (2.1)$$

Lipazlar kiral yapılı olduklarından rasemik bir karışımın iki enantiyomerini ayırma kabiliyeti gösterirler. Lipaz katalizli tepkimelerin stereoseçimliliği veya enantiyoseçimliliği enantiyomerik oran (E) olarak tanımlanır. E değeri iki enantiyomerin spesifikklik sabitinin oranıdır (Ghanam ve Aboul-Enein 2004).

$$E_{RS} = \frac{(k_{cat}/k_M)_R}{(k_{cat}/k_M)_S} \quad (2.2)$$

Bu eşitlikte  $k_{cat}$  hız sabiti ya da turn over sayısı,  $k_M$  ise Michaelis–Menten sabitidir. Sih vd. (1989) bu denklemi ürünlerin enantiyomerik aşırılığı ( $ee_p$ ), reaksiyone girmeyen substratların enantiyomerik aşırılığı ( $ee_s$ ) ve dönüşüm (c) cinsinden geliştirmiştir. Tersinir bir enzimatik reaksiyon için E değeri aşağıdaki eşitlik ile ifade edilir:

$$E = \frac{\ln[1-(1+K)(c+ee_s(1-c))]}{\ln[1-(1+K)(c-ee_s(1-c))]} \quad (2.3)$$

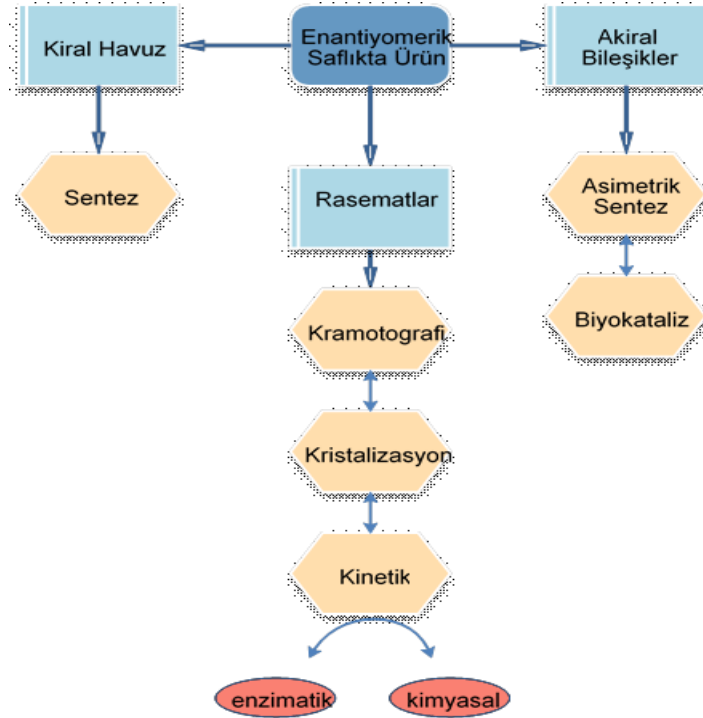
Bu eşitlikte K denge sabitini gösterir. Reaksiyon tersinmez olduğunda ya da tersinir reaksiyon için K değeri ihmal edildiğinde eşitlik aşağıdaki gibi kısaltılır:

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]} \quad (2.4)$$

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad (2.5)$$

## 2.5 Enantiyomerik Saflıkta Ürün Elde Etme Yöntemleri

Enantiyomerik saflıkta ürün elde etmek için, kullanılan başlangıç maddesinin çeşidine bağlı olarak, temelde üç çeşit yöntem vardır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Enantiyomerik saflıkta ürün elde etme yöntemleri

Enzim kullanılarak enantiyomerik saflıkta ürün elde etmek için stereoseçici sentez ve rasematların rezolüsyonu yöntemleri kullanılır. Bu çalışmada rasematların rezolüsyonu üzerinde durulacağı için, stereoseçici sentez sadece şematik olarak gösterilmiştir (Şekil 2.7). Rasematların rezolüsyonu ise detaylı şekilde anlatılmıştır.



Şekil 2.7 Stereoseçici sentez ve rasematların rezolüsyonu (Ghanam ve Aboul-Enein 2004)

Asimetrik sentez için etkili gelişmeler olmasına rağmen, rasematların rezolüsyonu endüstriyel sentez için baskın bir üretim yöntemidir. Enantiyomerlerin rezolüsyonu temelde dört kategoridir: (i) Doğrudan tercihli kristalizasyon, (ii) Diastreoseçici tuzların kristalleşmesi, (iii) kromatografi ve (iv) kinetik rezolüsyon (Ghanam ve Aboul-Enein 2004).

### 2.5.1 Tercihli kristalizasyon

Tercihli kristalizasyon yöntemi endüstriyel ölçekli bir çok maddenin üretiminde kullanılmaktadır. Bu maddelerden en çok karşılaşılanları ise kloramfenikol ve a-metil-L-dopa üretimidir. Bu yöntem sadece yığınlar oluşturabilen rasematlar için teknik olarak uygulanabilir. Yani iki enantiyomer kristalinin mekanik karışımını eşit miktarda içeren rasematlara uygulanabilir. Maalesef, sadece % 20 oranında rasemat konglomeradır, kalan gerçek rasemik bileşikler bu yöntemle ayrılamazlar. Bir konglomera için tercihli kristalizasyon tekniğinin başarısı, rasemik karışımın diğer iki enantiyomerden daha çözünebilir olmasına bağlıdır (Ghanam ve Aboul-Enein 2004).

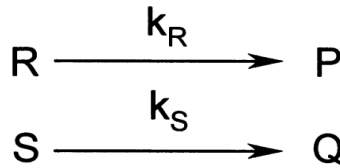
### 2.5.2 Diastereoseçici kristalizasyon

Rasemat gerçek bir rasemik karışım ise, tercihli kristalizasyon ile ayrılamaz ve bu durumda diastereoseçici kristalizasyon kullanılır. Su ya da metanol içerisindeki rasemik karışım çözeltisi saf enantiyomerlerden biri (çözücü ajan) ile tepkimeye girer; böylece diastereomerlerin bir karışımı oluşur. Oluşan bu karışımı diastereoseçici kristalizasyon ile ayırmak mümkündür (Ghanam ve Aboul-Enein 2004).

### 2.5.3 Kinetik rezolüsyon

Rasematların rezolüsyonunda kullanılan üçüncü metod kinetik rezolüsyondur. Bu yöntemin başarısı, iki enantiyomerin kiral bir madde ile farklı hızlarda tepkimeye girmesine bağlıdır. Kiral madde katalitik miktarda olmalıdır; bu enzim ya da mikroorganizma gibi bir biyokatalizör olabileceği gibi kiral asit-baz veya kiral metal kompleksi gibi bir kemokatalizör de olabilir. Rasemik bileşiklerin kinetik rezolüsyonu, lipazlar tarafından katalizlenen transformasyon çeşitlerinden en yaygın olanıdır. Enzim iki enantiyomer arasında hangisinin daha hızlı ürüne dönüşeceğine göre seçim yapmaktadır.

Kinetik rezolüsyon  $k_R$  ve  $k_S$  birbirine eşit olmadığı bir zamanda olur ve dönüşüm 0 ile % 100 arasında olduğu bir zamanda sonlanır. Enantiyomerlerden biri diğerinden daha hızlı tepkimeye girer; örneğin R reaksiyona giren tek bir enantiyomer ise  $k_S$  sıfır olur. Bu durumda, başlangıçtaki 50/50 karışım % 50 dönüşüm ile % 50 reaktan (S) ve % 50 ürün (P) meydana getirir. Bu yöntem tek bir enzim ile iki enantiyomeri ayırmanın en kolay yollarından biridir (Şekil 2.8).



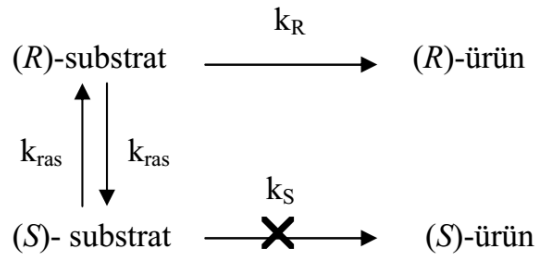
Şekil 2.8 Katalitik kinetik rezolüsyon (Ghanam ve Aboul-Enein 2004)

## 2.5.4 Dinamik kinetik rezolüsyon

Yukarıda anlatılan klasik kinetik rezolüsyon yöntemi saf enantiyomerler elde etmek için etkili bir yöntem olmasına karşın, maksimum %50 verim ile saf enantiyomerlerin üretilmesi yöntemin dezavantajıdır. Bu kısıtlamayı çözmek için bazı yöntemler geliştirilmiştir:

- i) Mezobileşimler ya da prokiral substratlar kullanmak,
- ii) İstenmeyen enantiyomerin stereodönüşümünü sağlamak,
- iii) Rasemizasyon ve istenmeyen enantiyomerin geri kazanılması,
- iv) Dinamik kinetik rezolüsyon yöntemi.

Dinamik kinetik rezolüsyon tepkimelerinde, rasemizasyon ve kinetik rezolüsyon birlikte olmaktadır. Sıklıkla kullanılan kinetik rezolüsyon ve dinamik kinetik rezolüsyonda (R)-enantiyomeri (S)-enantiyomerinden daha hızlı (R)-ürününe dönüşür ( $k_R > k_S$ ) (Şekil 2.9). Dinamik kinetik rezolüsyonun bir farkı ise (S)-enantiyomeri proses boyunca izomerleşir ve böylece başlangıç (R)-substratının tamamı (R)-ürününe dönüşür ve  $k_{ras} \geq k_R$  olması gerekir. Bu tepkimede maksimum verim olan %100'e ulaşmak mümkündür. Rasemizasyon tepkimelerinde biyokatalizör olarak rasemazlar ve kimyasal katalizör olarak baz ya da asit kullanılabilir (Babaarslan 2008).



Şekil 2.9 Dinamik kinetik rezolüsyon (Ghanam ve Aboul-Enein 2004)

## 2.6 Enzim Tutuklama

Canlı hücrelerdeki biyokimyasal reaksiyonların hızlarını arttıran protein moleküllerine enzim denir. Enzimler herhangi bir tepkime sonrası değişime uğramadıklarından aynı enzimi tekrar tekrar biyokatalizör olarak kullanmak mümkündür. Fakat sıvı haldeki enzimi bulunduğu ortamdan ayırabilmek kolay değildir. Bu durumda enzim katı bir desteğe tutuklanır ve ürünler ile enzimi ortamdan ayırmak kolaylaşır. Katı bir desteğe tutuklanan enzim, üzerinden geçen substratın ürüne çevrilmesini sağlar ve bu arada enzimin katalitik aktivitesi korunmaktadır (Kasavi 2006).

### 2.6.1 Tutuklanmış enzimin serbest enzime göre üstünlükleri

Tutuklama işlemiyle bir katıya bağlanan enzimin, çözelti içerisindeki bir enzime göre bir çok avantajı bulunmaktadır (Telefoncu 1997):

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme v.b.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz
- Çevre koşullarına ( pH, sıcaklık v.s.) karşı daha dayanıklıdır
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir
- Sürekli işlemlere uygulanabilir
- Sıvı formuna kıyasla daha kararlıdır
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir
- Çok basamaklı tepkimeler için uygundur
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir
- Enzimin kendi kendini parçalama olasılığı azalır
- Avantajları fazla olmasına karşın, tutuklanmış enzimlerin endüstriyel uygulamaları aşağıdaki nedenlerden dolayı sınırlıdır (Kasavi 2006):
- Serbest enzimlerin maliyetinin daha düşük olması
- Geleneksel yöntemlerin değiştirilmek istenmemesi
- Kurulmuş prosesleri değiştirmek için yeni yatırımlara gerek duyulması
- Tutuklama işleminde kullanılacak taşıyıcının maliyeti
- Sistemin performansı

## 2.6.2 Enzim tutuklama yöntemleri

Enzim tutuklamak için bir çok yöntem kullanılmaktadır; en sık kullanılan tutuklama yöntemleri temel olarak çizelge 2.3'te gösterilmiştir:

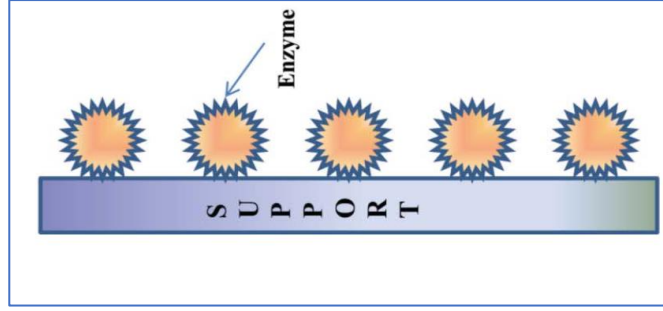
Çizelge 2.3 Enzim tutuklama yöntemleri

Enzim Tutuklama Yöntemleri	Fiziksel Adsorpsiyon
	İyonik Bağlama
	Kovalent Bağlama
	Çapraz Bağlama
	Katı Desteğe Hapsetme

### 2.6.2.1 Fiziksel adsorpsiyon

En eski ve basit enzim tutuklama yöntemi olan fiziksel adsorpsiyon, enzimin suda çözünmeyen bir taşıyıcı yüzeyine tersinir bir etkileşim ile tutuklanması esasına dayanmaktadır (Şekil 2.10). Uygun bir taşıyıcı materyalin seçilmesi durumunda, diğer tutuklama yöntemlerine göre daha az maliyetlidir. Fiziksel adsorpsiyon yöntemi ilk defa, beta-D-frukto-furanosidaz enziminin alüminyum hidroksit matrisi üzerine tutuklanması için kullanılmıştır.

Fiziksel adsorpsiyon yönteminde, van der Waals kuvvetleri, hidrojen ve iyonik bağ etkileşimleri gibi elektrostatik kuvvetlerin yanı sıra, hidrofobik bağlanma da oluşmaktadır. Tutuklama işlemi sırasında, enzimin konformasyonel yapısında veya aktif merkezinde değişim görülmemekte veya önemsiz ölçüde değişim görülmektedir. Enzim aktivitesini arttırmak için ya da enzimin inaktif olmasını engellemek için, sıcaklık, pH, enzim konsantrasyonu gibi parametrelerin uygun değerleri tespit edilmelidir. Ayrıca, uygun bir çözücü seçimi enzimatik aktiviteyi etkileyen önemli bir parametredir (Kasavi 2006).



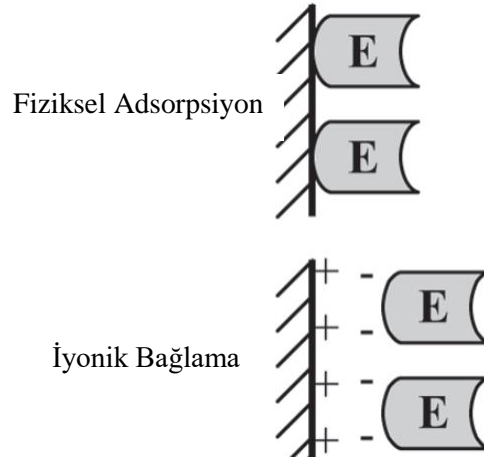
Şekil 2.10 Fiziksel adsorpsiyon ile enzim tutuklama (Mohamad vd. 2015)

Bu tutuklama yönteminin bir avantajı, destek materyelini aktiflemek için daha az basamaklı işlemlere ihtiyaç duyulmasıdır. Ayrıca bağlanma işlemi hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetleriyle olduğundan, kimyasal bağlanmaya göre enzim üzerindeki bozucu etki azalmış olur.

Avantajları yanında, adsorpsiyon ile enzim tutuklama yönteminin dezavantajları da bulunmaktadır. Taşıyıcı ve enzim arasında oluşan zayıf bağlardan dolayı enzimin çözeltiye sızması muhtemeldir. Ayrıca, ortamdaki diğer maddeler veya proteinler taşıyıcıya adsorplanarak kirlilik oluşturabilir ve tutuklanmış enzimin özelliklerini değiştirerek aktivitesini düşürebilir. Fiziksel adsorpsiyon yönteminde destek materyali olarak genellikle, kil, cam, alumina, aktif karbon ve kolojen kullanılmaktadır (Kasavi 2006).

#### 2.6.2.2 İyonik bağlama

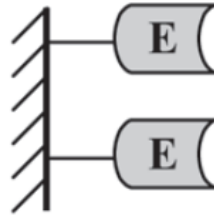
İyonik bağlama yönteminde (Şekil 2.11), enzim suda çözünmeyen bir taşıyıcıya iyonik bağlar ile bağlanır. Kovalent bağlanmaya göre daha ılıman şartlarda gerçekleşen iyonik bağlanma yöntemi, enzimde daha az konformasyonel değişikliklere sebep olur. Enzim aktif merkezi zayıf bağlardan dolayı değişime uğramaz, fakat zayıf bağlar enzimin çözeltiye sızmasına sebep olabilir. İyon değişim reçineleri, iyon değişim merkezine sahip polisakkaritler ve bazı sentetik polimerler iyonik bağlama yönteminde destek materyali olarak kullanılabilir (Yılmaz 2010).



Şekil 2.11 Fiziksel adsorpsiyon ve iyonik bağlama (Brena ve Batista-Viera 2006)

### 2.6.2.3 Kovalent bağlama

En sık kullanılan enzim tutuklama yöntemlerinden biri olan kovalent bağlamanın basit bir yapısı Şekil 2.12’de görülmektedir. Enzimlerdeki substrat bağlama bölgesinde veya aktif merkezde bulunmayan aminoasitler destek materyaline kovalent bağlar ile bağlanmaktadır (Uygun 2006).



Şekil 2.12 Kovalent bağlanma (Brena ve Batista-Viera 2006)

Kovalent bağlama yöntemi ile tutuklanmış enzim aktivitesi, destek materyalinin şekline, büyüklüğüne, bileşimine ve tutuklama koşullarına bağlıdır. Enzim ve taşıyıcı materyal arasındaki kovalent bağlanmada, enzimin bağlanma yönü enzimin kararlılığı açısından çok önemlidir. En yüksek enzim aktivitesini sağlamak için destek materyaline bağlanmada aminoasidin aktif merkezi bulunmamalıdır (Mohamad vd. 2015).

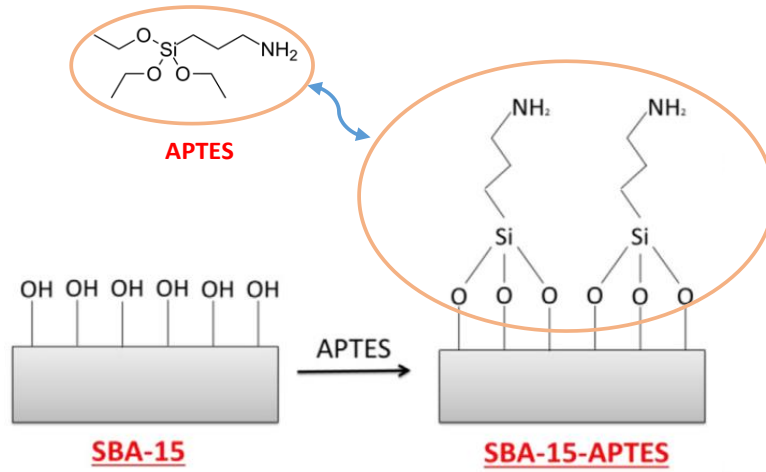
Kovalent bağlama yönteminde, enzim ve destek materyali arasındaki bağ, tutuklanacak molekülün üzerindeki aktif gruplara bağlı olarak, iki şekilde olmaktadır. Birincide reaktif fonksiyonel gruplar herhangi bir modifikasyona uğramamış desteğe doğrudan bağlanırlar, ikincide ise destek matrisi aktif gruplar oluşturmak için modifiye edilir. Her iki durumda da destek materyali üzerinde üretilen elektrofilik gruplar, protein üzerindeki güçlü nükleofiller ile reaksiyona girerler (Mohamad vd. 2015).

Kovalent bağlama yönteminde enzim ile destek matrisi arasında daha güçlü bağlar olduğundan, enzimin çözeltiliye sızması diğer yöntemlere göre daha azdır. Çok basamaklı bir yöntem olan kovalent bağlamada, öncelikle destek materyalinin aktiflenmesi, daha sonra enzim ile etkileşimi gerçekleştirilir. Çok basamaklı olması yöntemin dezavantajıdır ve genellikle enzimin inaktif olmasına sebep olabilir. Bunun dışında, enzimin uygun olmayan bir desteğe tutulmaya zorlanması veya uygun olmayan bir aktifleyici madde seçimi de enzimin inaktivasyonu ile sonuçlanabilmektedir. Enzimin inaktif olmasını engelleyecek bir kaç koruyucu yöntem mevcuttur: Substrat ya da inhibitör eşliğinde enzimin tutuklanması, çapraz bağlayıcılar ile modifiye edilmiş enzim kullanmak ve tersinir bir enzim-inhibitör kompleksi kullanmak (Yılmaz 2010).

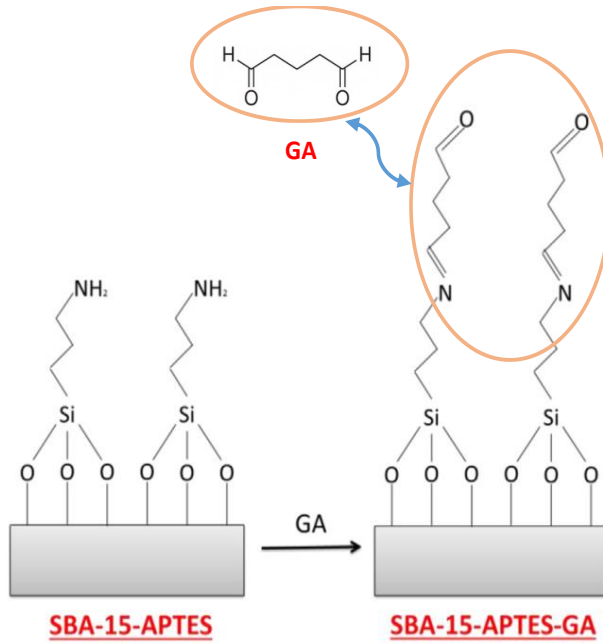
Bu tür bir bağlanma için taşıyıcı materyalin ve aktifleyici maddenin seçimi oldukça önemlidir. Genellikle, agaroz, selüloz, polivinil klorür, iyon değiştirici reçineler ve gözenekli cam destek matrisi olarak kullanılmaktadır (Mohamad vd. 2015).

Kovalent bağlama ile lipaz tutuklama çalışmalarından biri şekil 2.13-2.15'te detaylı olarak gösterilmiştir. Rios vd. (2016) mezaporlu silika olarak bilinen SBA-15'i 3-amino-propyltriethoxysilane (APTES) ile modifiye edip çapraz bağlayıcı glutaraldehit ile aktive etmişlerdir. Daha sonra oluşan aktif materyale *Candida antarctica* lipase B (Cal-B) kovalent bağlama metodu ile tutuklanmıştır. Öncelikle mezaporlu silikanın yüzeyine APTES ile amin gruplarının bağlanmasıyla silanlama yapılmıştır (Şekil 2.13). Daha sonra yüzeyde oluşan amin grupları GA ile tepkimeye girerek deteğin aktivasyonu sağlanmıştır. GA molekülleri oldukça büyük olduğundan bir çok grup ile bir uzatma kolunun oluşmasını sağlar ve bu gruplar, tutuklama koşullarına bağlı olarak, enzim ile çeşitli şekilde etkileşime girerler (Şekil 2.14). Bu etkileşim bölgelerinden birincisi

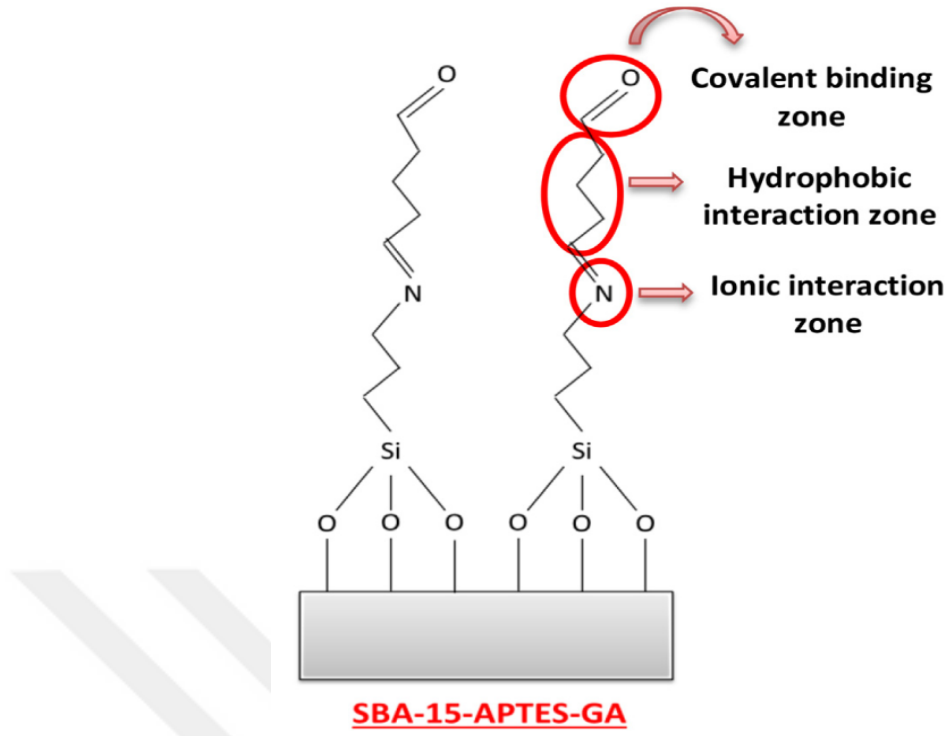
desteğin amin gruplarının oluşturduğu iyonik etkileşim bölgesi, ikincisi GA molekülünün karbon zinciri boyunca oluşan hidrofobik etkileşimleri barındıran bölge ve son bölge kovalent reaktif gruplar boyunca oluşan kovalent bağlanma bölgesidir (Şekil 2.15). Aktive edilmiş destek Cal-B lipazı ile etkileşime girmiş ve lipazın amin grupları desteğin kovalent bağlanma bölgesine bağlanmıştır. Bu aşamadan sonra kovalent bağlama ile tutuklama işlemi tamamlanmıştır (Şekil 2.16).



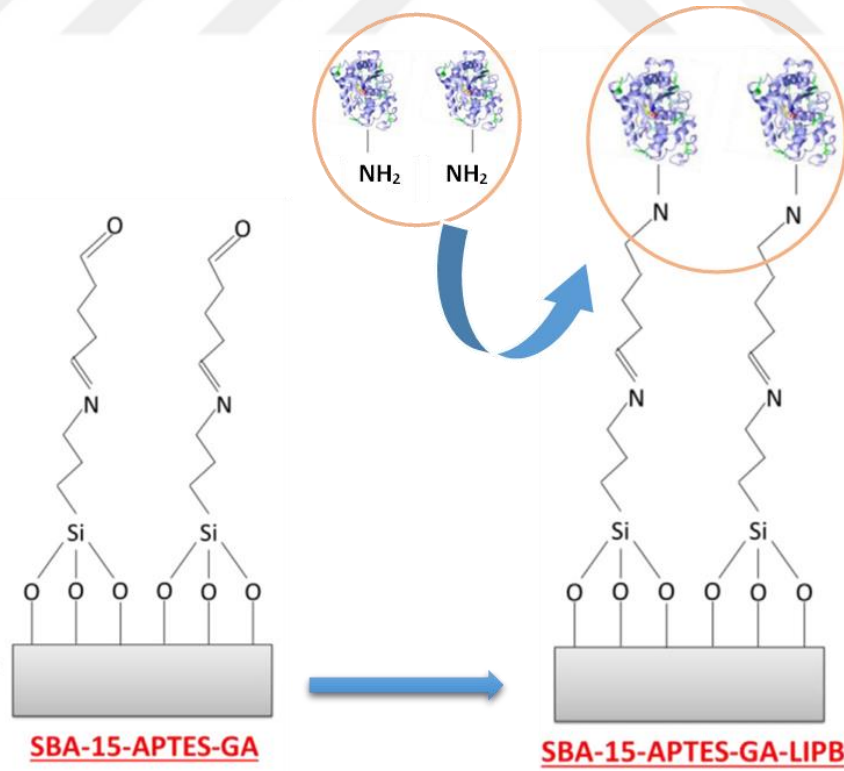
Şekil 2.13 Mezaporlu silikanın APTES ile modifikasyonu



Şekil 2.14 Modifiye edilmiş silikanın GA ile aktivasyonu



Şekil 2.15 GA ile aktive edilen desteğin farklı etkileşim bölgeleri



Şekil 2.16 Modifiye edilmiş aktif silika üzerine Cal-B tutuklanması

Kovalent bağlama aşağıdaki avantajlara sahiptir:

- Biyokatalizör taşıyıcıdan sızmaz,
- Biyokatalizör ve taşıyıcı arasındaki güçlü bağlardan dolayı biyokatalizörün karalılığı artar,
- Bağlanmamış enzim ortamdan kolayca uzaklaştırılır,
- Sürekli sistemler için uygundur.

Avantajları yanı sıra kovalent bağlamanın bazı istenmeyen özelleikleri vardır:

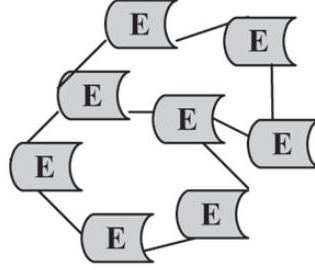
- Bağlanma aktivite için zorunlu aminoasit fonksiyonel grupları üzerinden gerçekleştiği için aktivite düşebilir,
- Biyokatalizörün toksik ajanlara ve sert reaksiyon koşullarına maruz kalmasından dolayı ürün verimindeki düşüş gözlenir,
- Enzimin taşıyıcıya bağlanması özel ve masraflı hazırlıklar gerekli kılabilir.

#### **2.6.2.4 Çapraz bağlama**

Çapraz bağlama yönteminde (Şekil 2.17), iki ya da ikiden fazla fonksiyonel reaktif grupları bulunan küçük moleküller enzim molekülleri arasında çapraz bağlar yaparak, suda çözünmeyen yapıları oluşturur. Tutuklama koşulları, protein ve reaktif derişimi, serbest enzim türü ve çapraz bağlayıcı türü bu yöntem için çok önemlidir. Glutaraldehit, kloroformat, epiklorohidrinler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, metal geçiş iyonları ve heterosiklik halojenürler sıklıkla kullanılan çapraz bağlayıcılardandır (Uygun 2006).

Çapraz bağlama yöntemi kovalent bağlama yöntemine benzemektedir, fakat kovalent bağlamada enzimin tutuklanması gereken aktif hale getirilmiş taşıyıcı destek materyali bu yöntemde yoktur. Bu yöntemde, enzim kendisinin bir taşıyıcısı görevindedir. Öncelikle aseton, amonyum sülfat ve etanol gibi çöktürücüler içerisinde enzim ve çapraz bağlayıcı tepkimeye girerek çapraz bağların oluşmasını sağlar (Mohamad 2015). Bu şekilde enzimin üçüncül yapısı değişime uğramadan kovalent olmayan, çapraz bağlı

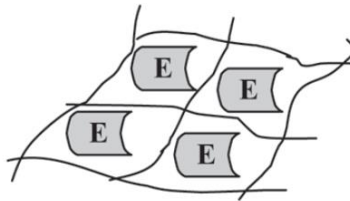
yapılar meydana getirilir. Çöktürme işlemi, enzim saflaştırmak amacıyla da kullanıldığı için bu yöntem ile aynı zamanda saf tutuklanmış enzimler de elde edilebilmektedir (Sheldon 2007).



Şekil 2.17 Çapraz bağlama ile enzim tutuklama (Brena ve Batista-Viera 2006)

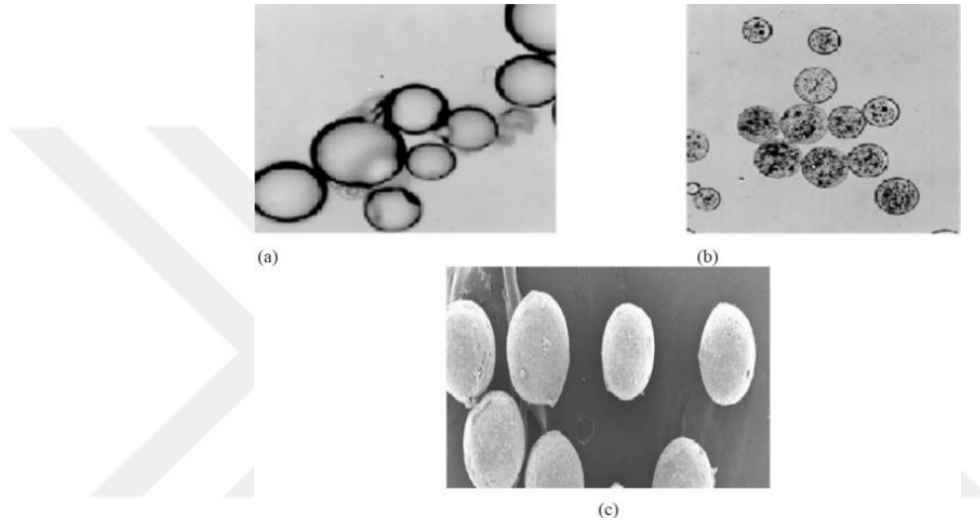
#### 2.6.2.5 Katı bir desteğe hapsedme

Katı bir desteğe hapsedme yönteminde (Şekil 2.18), enzim dışarıya çıkamayacağı belirli bir mekanda tutulmaya zorlanmaktadır. Kovalent bağlama veya çapraz bağlamada olduğu gibi fiziksel ya da kimyasal bir bağ ile enzim taşıyıcı materyale bağlanmaz. Bu yöntemde, kafes (polimer matris), mikrokapsül, lipozom, membran ve ters misel kullanılır. Kafes tipi yöntemde, enzim çözeltisi içerisinde büyük ölçüde çapraz bağ içeren bir polimer matrisi oluşturulur. Polimerleşme sonucunda enzim çapraz bağlar arasında kalarak çözeltiliye geçemez. Bu yöntem kolay uygulanabilir olması, az miktarda enzim ile gerçekleşmesi ve fiziksel bir yöntem olması açısından avantajlıdır. Bunun yanı sıra, fiziksel bir metod olması suda çözünmeyen, nötral taşıyıcıların da kullanılmasına imkan verir. Fakat bu yöntemde, enzimin aktivitesini koruması için küçük substratlar seçilmesi zorunluluğu ve aktivitenin tepkime koşullarına çok bağlı olması yöntemin dezavantajlarıdır (Uygun 2006).



Şekil 2.18 Katı bir desteğe hapsederek enzim tutuklama (Brena ve Batista-Viera 2006)

Mikrokapsülleme yöntemi, mikrokapsül adı verilen küre şeklinde taneciklerin oluşumuna ve biyokatalizörün sıvı veya süspansiyon halinin, yarı geçirgen polimerik bir membrana oluşan bu küreciklerin içerisinde tutuklanması esasına dayanmaktadır. Mikrokapsül parçacıklarının boyutu 50 nm ve 2 mm arasında değişmektedir. Şekil 2.19'da bazı mikrokapsüllere örnek verilmiştir. Bu proseste genel olarak, hidrofilik, hidrofobik veya ikisinin karışımından oluşan polimerler kullanılmaktadır (Singh vd. 2010).

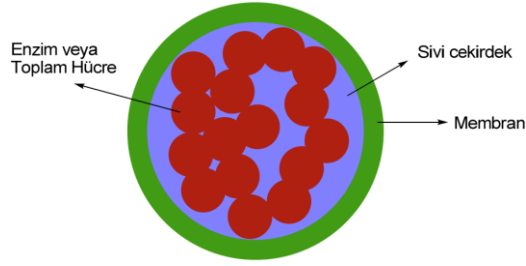


Şekil 2.19 Mikrokapsül örneklerinin taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri (Singh vd. 2010)

a.Mononükleer mikrokapsüller, b.Kümelenmiş mikrokapsüller, c.Mikrokapsül yüzeyi

Polimerik, seramik, metal veya sıvı membranlar enzim tutuklamada sıklıkla kullanılmaktadır (Şekil 2.20). Bu yöntem kimyasal bir etkileşim olmaksızın enzimin membran tarafından sarılması olayını kapsamaktadır. Küçük bir hacimde enzim ve substrat etkileşime geçebilir. Enzimin çözeltiliye sızma olasılığı vardır ve bu da enzim sarfiyatını arttıran bir dezavantajdır (Jochems vd. 2011).

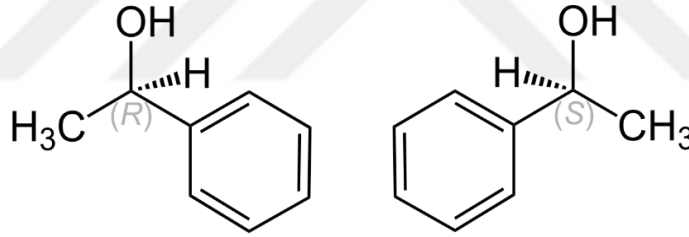
Ters misel yönteminde öncelikle yüzey aktif madde ve organik bir çözücü etkileşime geçerek ters miseller oluşturur. Oluşan bu ters miseller içerisinde biyokatalizörün tutuklanmasıyla işlem tamamlanır (Uygun 2006).



Şekil 2.20 Membranda enzim tutuklama (Yılmaz 2010)

## 2.7 1-Feniletanol

İkincil alkollerden kiral feniletanol ve türevleri, farmasötikler, zirai ilaçlar ve doğal ürünler için önemli kiral yapı taşıdır (Habulin ve Knez 2009). Optikçe aktif 1-feniletanol, değerli kimyasalların üretiminde ve ilaç endüstrisinde kiral yapı taşı ve sentetik ara ürün olarak kullanılmaktadır (Hernandez-Fernandez vd. 2008).



Şekil 2.21 1-feniletanolün molekül yapısı (R ve S formları)

Şekil 2.21’de görülen 1-feniletanolün saf R(+) ve S(-) formları, enantiyomerik saflığın belirlenmesinde ve halkalı anhidridler ile epoksidlerin asimetrik açılımında kiral ajan işlevi görmektedir (Frings vd. 1999). R-1-feniletanol hafif çiçek kokusu sebebiyle özellikle kozmetik endüstrisinde yaygın olarak kullanılır. Bunun dışında, R-1-feniletanol solvatokromik boya, oftalmik koruyucu ve kolesterol bağırsak adsorpsiyon inhibitörü olarakta kullanılır. (S)-1-feniletanol ise Alzheimer ilaçlarının yapımında kullanılan bir öncü madde olmasıyla biyokimya alanında önemli bir üründür (Hernandez-Fernandez vd. 2008).

### 3. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Enzim tutuklama ile ilgili geçmiş yıllarda ve günümüzde yapılan bir çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda farklı enzimler, farklı destek materyallerine çeşitli tutuklama yöntemleri ile tutuklanmıştır.

Kovalent bağlama metodu ile yapılan ilk çalışma H. Brandenberger (1956) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, lipaz enzimi iyon değıştirici reçine üzerine kovalent bağlarla tutuklanmıştır (Yılmaz 2010).

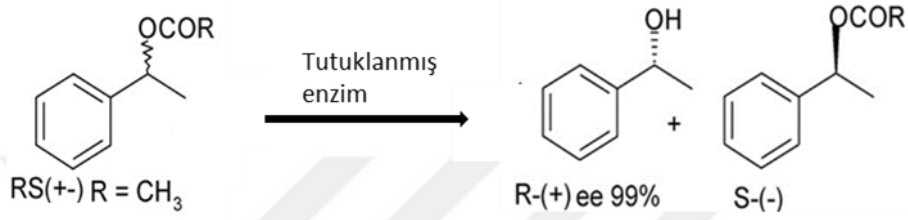
Enzimler hidrofobik ortamda kararlı bir yapı göstermediklerinden, hidrofilik materyaller enzim tutuklamak için çok daha iyi matrisler oluşturmaktadır. Kontrolsüz enzim destek etkileşimini engelledikleri için, inert destekler de tutuklama materyali olarak tercih edilebilir. Ayrıca organik ve inorganik destek materyalleri, enzim tutuklamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Silikalar, metal oksit bazlı matrisler, seramikler ve mezaporlu camlar inorganik destek materyallerine; poliamitler, polisakaritler ve poli(vinilalkol) organik destek materyallerine ait örneklerdir (Zucca vd. 2016).

Mojovik vd. (1998), *Candida rugosa* lipazını polimer destek üzerine tutuklamışlar ve tutuklama verimini % 62 bulmuşlardır. Tutuklanmış enzim palmiye yağının hidrolizi tepkimesinde katalizör olarak kullanılmıştır. Aynı koşullarda tepkime tekrarlanmış ve beşinci tepkime sonunda tutuklanmış enzimin aktivitesi, başlangıç aktivitesine göre % 56 bulunmuştur.

Liu vd. (2005), enzim tutuklamak için manyetik mikro boyutlu (<8µm) küreler üretmişlerdir. Kürelerin, yüksek manyetik özellikler gösterdiği ve manyetik bir alan yardımıyla ortamdaki kolayca ayrılabilirdikleri tespit edilmiştir. Üretilen manyetik mikro küreciklere *Candida cylindracea* lipazı kovalent bağlarla tutuklanmıştır. Tutuklanmış lipazın yüksek aktivite verimi (% 72.4), enzim yüklemesi (34 mg/g ) ve tekrar kullanım süresince çok iyi bir kararlılık gösterdiği tespit edilmiştir. Mikron büyüklüğündeki

manyetik destek maddelerinin enzim tutuklamak için ekonomik ve kararlı oldukları; ayrıca işletim kolaylığı sağladıkları tespit edilmiştir.

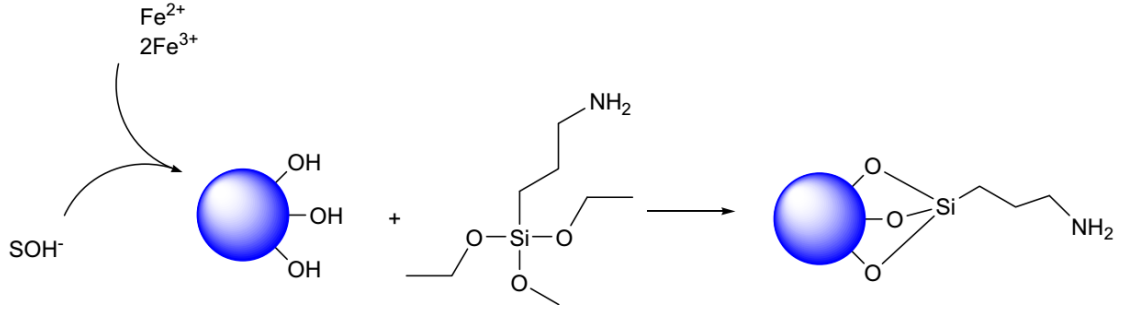
Bhushan vd. (2007), *Arthrobacter* sp. lipazını sentetik, makro gözenekli, alkilleştirilmiş epoksi kopolimerlere tutuklamışlardır. Tutuklanmış enzimler asetil 1-feniletanolün kinetik rezolüsyonunda kullanılmıştır.



Şekil 3.1 Asetil 1-feniletanolün kinetik rezolüsyonu

% 99 ee değerine serbest lipaz kullanılarak 24 saatte ulaşılırken, tutuklanmış lipaz ile 15 saatte ulaşılmıştır. Tutuklanmış lipazın tekrar kullanılabilirliği araştırıldığında, 15 kez tepkime sonunda bile aktivite kaybı olmadığı görülmüştür. Sonuç olarak, tekrar kullanılabilirliği, reaksiyon süresini kısaltması ve maliyeti düşürmesi açısından başarılı bir çalışma olmuştur.

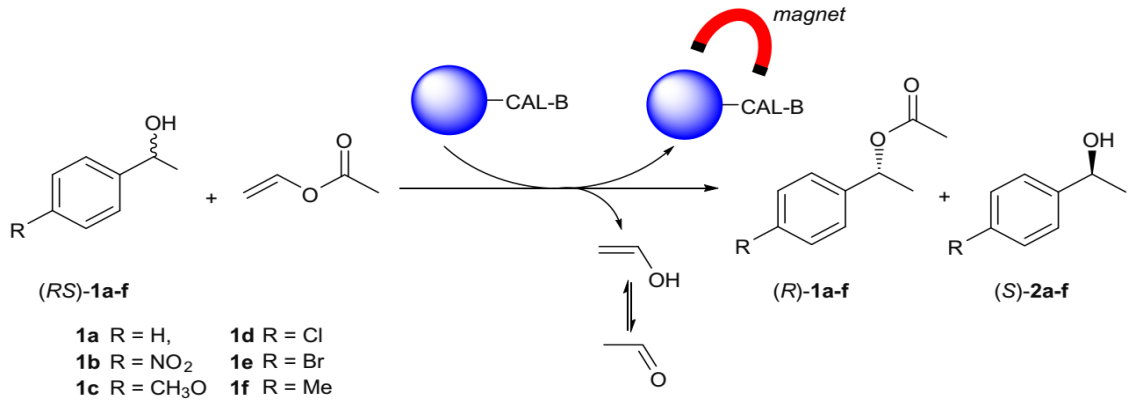
Netto vd. (2009), *C. antarctica* (Cal-B) lipazını manyetik nanoparçacıklara tutuklamışlar ve tutuklanmış enzimlerin katalitik aktivitesini ikincil alkollerin kinetik rezolüsyon tepkimesinde incelemişlerdir. Öncelikle ortak çöktürme metodu ile süperparamanyetik nanoparçacıklar (MagNP) üretilmiş ve bu parçacıklar c-aminopropiltrioksilan (APTS) ile silanlanarak modifiye edilmiştir. APTS ile nanoparçacıkların yüzeyi silika ile kaplanmış ve hava ile oksidasyonu engellenerek sağlam bir yapı meydana getirilmiştir. Bunun yanısıra, APTS içerisindeki amin grubu pH'ın 7 olduğu bir ortamda nanoparçacıkların topaklanmasına engel olmuş ve enzim ile etkileşimi arttırmıştır. Yüzey modifikasyonu sonrasında Cal-B lipazı kovalent bağlarla desteğe tutuklanmıştır (CAL-B/APTSMagNP).



Şekil 3.2 APTS ile modifiye edilmiş manyetik nanoparçacıklar (APTS-MagNP) (Netto vd. 2009)

Tutuklanmış lipazın karakteristik katalitik aktivitesini incelemek için aktivite tayini yapılmış; tutuklanmış enzimin aktivitesinin (0.8 U/mg) serbest enzime (0.4 U/mg) göre iki kat arttığı gözlenmiştir.

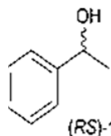
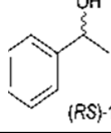
Tutuklanmış enzim biyokatalizör olarak 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde kullanılmıştır. Rasemik 1-feniletanol vinil asetat açıl vericisi ile tepkimeye girmiş ve R-1-feniletil asetat oluşmuştur (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 CAL-B/APTS-MagNP tutuklanmış enzimi ile 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesi (Netto vd. 2009)

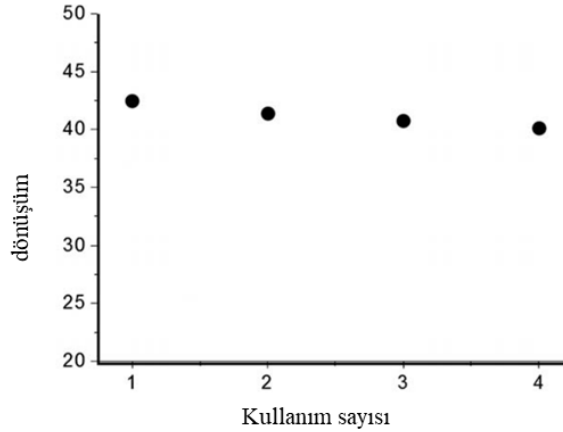
Rasemik karışımın R-enantiyomeri % 99 oranında bir enantiyoseçimlilik göstererek mükemmel şekilde asetillenmiştir. Enantiyomerik oran (226, 320, 458) tutuklanmış enzimin yüksek spesifikliğini göstermektedir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 (RS)-1-feniletanolün kinetik rezolüsyonu (Netto vd. 2009)

Substrat	Vinil a. (mmol)	t(h)	(S)-1a-f ee %	(R)-2a-f ee%	dön.%	E
 (RS)-1a	5	6	13	> 99	12	226
		24	48	> 99	32	320
 (RS)-1a	50	24	76	>99	43	458

- a. Substrat (1 mmol), VA (5 mmol), MTBE (1 ml), CAL-B/APTS-MagNP (30 mg), 32 °C, 6-24 saat  
 b. Substrat (10 mmol), VA (50 mmol), MTBE (1 ml), CAL-B/APTS-MagNP (300 mg), 32 °C, 24 saat  
 Dönüşüm (%) =  $ee_s / (ee_s + ee_p)$      $E = \ln\{(1 - ee_s) / (1 + ee_s/ee_p)\} / \ln\{(1 + ee_s) / (1 + ee_s/ee_p)\}$

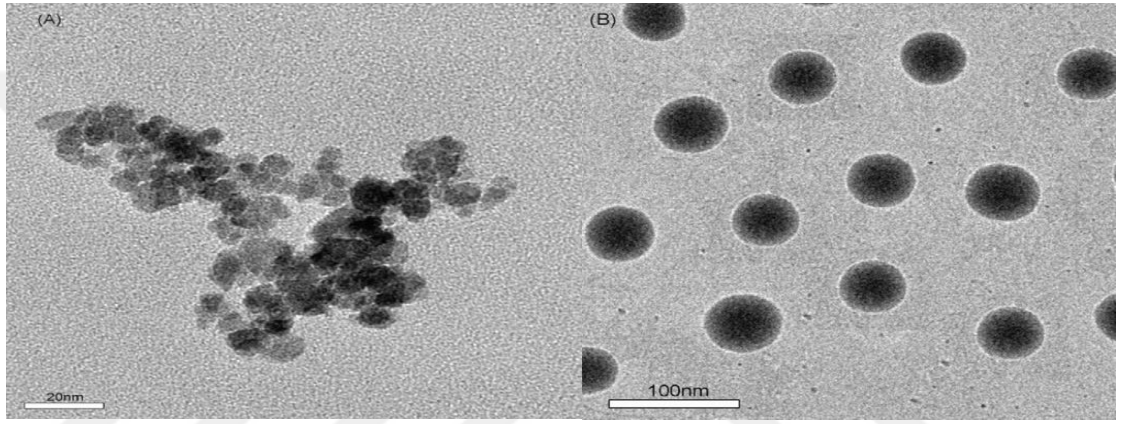
Tutuklanmış enzimin tekrar kullanılabilirliğini incelemek için 1-feniletanol ile transesterleşme tepkimesi dört kez denenmiştir. Dört tepkime sonrası, enzimlerin katalitik aktivitesini koruduğu ve sadece % 5 oranında aktivite kaybettiği gözlenmiştir. Enantiyomerik oran ve enantiyoseçimlilik, benzer şekilde, dört tepkime sonrası başlangıçtaki değerlerini korumuştur. Her döngü sonrası enantiyomerik oran % 300, enantiyoseçimlilik ise % 99 bulunmuştur.



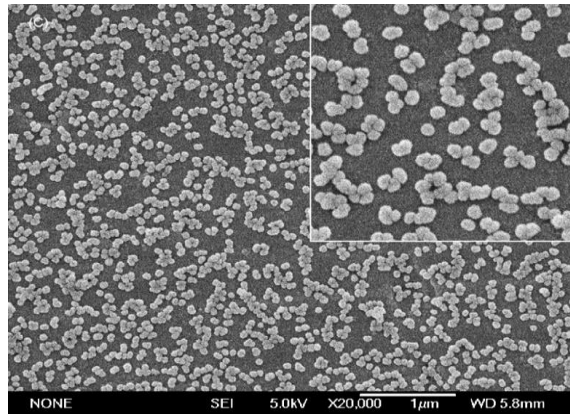
Şekil 3.4 Tutuklanmış enzimlerin tekrar kullanılabilirliği (Netto vd. 2009)

Jiang vd. (2009), tarafından manyetik nanoparçacıklar üzerine lipaz enzimi tutuklama çalışması yapılmıştır. Nanoparçacıkların yüzeyine tetraetil ortosilikat (TEOS) ile silika kaplanmıştır. Manyetik silika farklı iyonik sıvılar ( $[C_1C(S)Im]Cl$ ,  $[C_1C(S)Im]BF_4$ ,  $[C_1C(S)Im]PF_6$ ,  $[C_4C(S)Im]PF_6$ ,  $[C_8C(S)Im]PF_6$ ) ile tepkimeye sokularak yüzey

modifikasyonu gerekleŒmiŒtir. *Candida rugosa* lipazı modifiye edilmiŒ manyetik silika yüzeyine, Triton X-100 yüzey aktif maddesi varlığında ve yokluğunda iki Œekilde tutuklanmıŒtır. Demir oksit nanoparçacıkların TEM görüntüsünde 20 nm boyutunda nanoparçacıklar ve büyük oranda agregasyon olduğu grlmŒtr (Œekil 3.5.a). TEOS ile yüzeyi silika kaplanmış demir oksit nanoparçacıklarda ise agregasyon ortadan kalkmıŒ ve 100 nm boyutlu daha büyük parçacıklar elde edilmiŒtir (Œekil 3.5.b). İyonik sıvılar ile yüzey modifikasyonu yapılmıŒ nanoparçacıkların SEM görüntüsünde ise hafif bir agregasyon ve 55 nm boyutlu parçacıklar olduğu gzlenmiŒtir (Œekil 3.6).



Œekil 3.5.a. TEM görüntüsü  $Fe_3O_4$  nanoparçacıklar, b.  $Fe_3O_4$ -Silika nanoparçacıklar (Jiang vd. 2009)



Œekil 3.6 SEM görüntüsü  $Fe_3O_4$ -Silika- iyonik sıvı (Jiang vd. 2009)

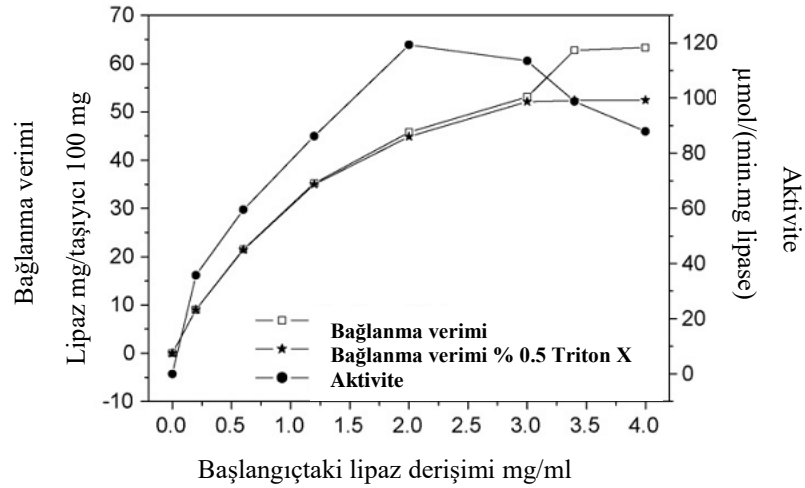
Serbest haldeki *Candida rugosa* lipazının aktivitesi 106.54 ünite olarak bulunmuŒtur. İyonik sıvılar olumlu etki yapmıŒ ve tutuklanmış enzimlerin aktivitesi artmıŒtır.

$C_8C(S)Im]PF_6$ 'nın 132.33 ünite enzim aktivitesi ile en iyi sonuç veren iyonik sıvı olduğu görülmüştür (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 İyonik sıvıların enzim aktivitesi üzerine etkisi (Jiang vd. 2009)

Katalizör	Aktivite, U	Katalizör	Aktivite, U
Native lipase	106.54	$[C_1C(S)Im]PF_6$	126.87
$[C_1C(S)Im]Cl$	119.27	$[C_4C(S)Im]PF_6$	130.70
$[C_1C(S)Im]BF_4$	125.10	$[C_8C(S)Im]PF_6$	132.33

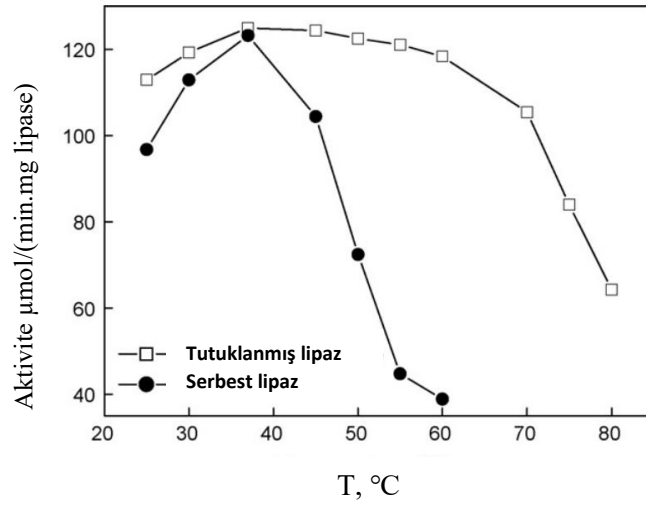
Lipaz derişiminin ve Triton X-100 aktifleyicisinin enzim bağlanma verimi (mg lipaz/100 mg taşıyıcı) üzerine etkisi incelenmiştir. 3 mg/ml lipaz derişimine kadar Triton X-100 varlığında bağlanma veriminde herhangi bir değişim olmamıştır. Lipaz derişimi 3 mg/ml nin üzerine çıktığında Triton X-100 varlığında verimde düşme görülmüştür. 4 mg/ml lipaz derişiminde Triton X-100 varlığında bağlanma verimi 50 mg lipaz/100 mg taşıyıcı iken Triton X-100 olmaksızın bu değer 65 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.7 Lipaz konsantrasyonunun aktivite ve bağlanma verimi üzerine etkisi

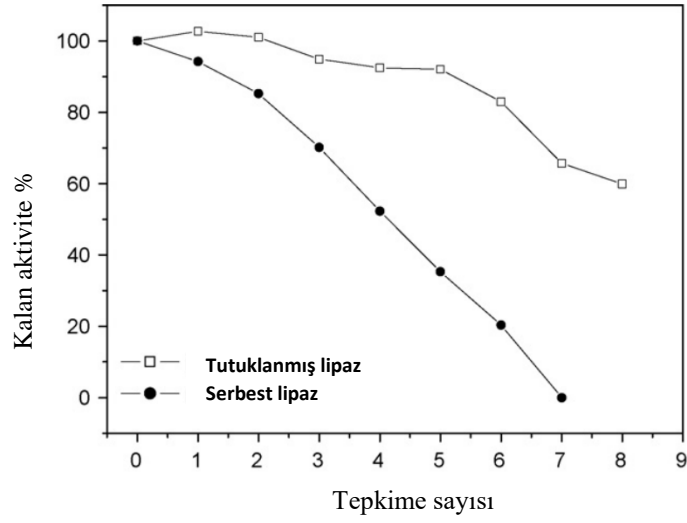
( $C_{lipaz}=0-0.4$  mg/ml, fosfat tamponu=50 ml, pH=7, T=25 °C, t=20-180 dk, Triton X 100 =% 0.5)

Enzim aktivitesinin sıcaklığa (25-80 °C) etkisi şekil 3.8’de gösterilmiştir. Tutuklanmış ve serbest enzim için uygun sıcaklık 37 °C bulunmuştur. Serbest enzimin aktivitesi artan sıcaklık ile önemli ölçüde azalmıştır. Sıcaklık 60 °C’ye vardığında başlangıç aktivite değerinin yalnızca %31.5’i kalmıştır. Tutuklanmış enzim ise artan sıcaklıkla azalmış; fakat serbest enzime göre değişimden daha az etkilenmiştir. 80 °C sıcaklıkta bile başlangıç aktivite değerinin % 60’ı kalmıştır. Bu çalışma ile iyonik sıvıların tutuklanmış enzimin termal karalılığını arttırdığı ve enzimin çok iyi bir ısıl direnç gösterdiği kanıtlanmıştır. İyonik sıvıların enzimin konformasyonunu koruduğu ve yüksek sıcaklıkta enzimin ikincil yapısının yıkım hızını azalttığı görülmüştür.



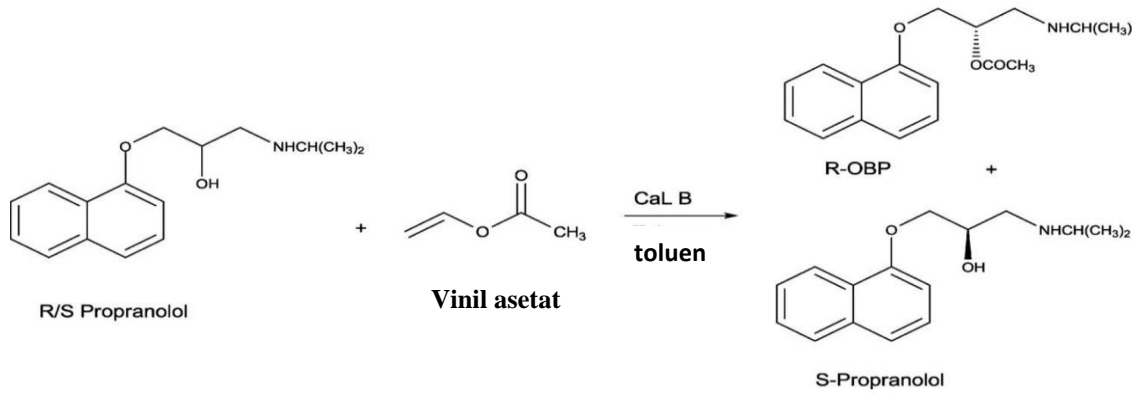
Şekil 3.8 Sıcaklığın enzimatik aktiviteye etkisi (Jiang vd. 2009)

Tutuklanmış enzimlerin önemli bir avantajı da işletim karalılığıdır. Tutuklanmış enzim beş döngü sonrasında bile başlangıçtaki aktivitenin % 92’sini korumuştur (Şekil 3.9). Bu kararlık, özellikle pahalı enzimlerin tutuklanmasını kullanışlı hale getirmektedir.



Şekil 3.9 Tutuklanmış enzimlerin tekrar kullanılabilirliği (Jiang vd. 2009)

Barbosa vd. (2010)'nin çalışmasında, serbest Cal-B lipazı Eupergit C desteklere tutuklanmış, tutuklama öncesinde Eupergit C (EC) desteklerin epoksi grupları etilendiamin (EDA), iminodiasetik asit (IDA) ve bakır- iminodiasetik asit (Cu-IDA) ile modifiye edilmiştir. Aktivite tayininde, tutuklanmış enzim aktivitesinde azalma görülmüştür. Tutuklanmış enzimler ile rasemik propranololün lipaz katalizli transesterifikasyonu gerçekleştirilmiştir.



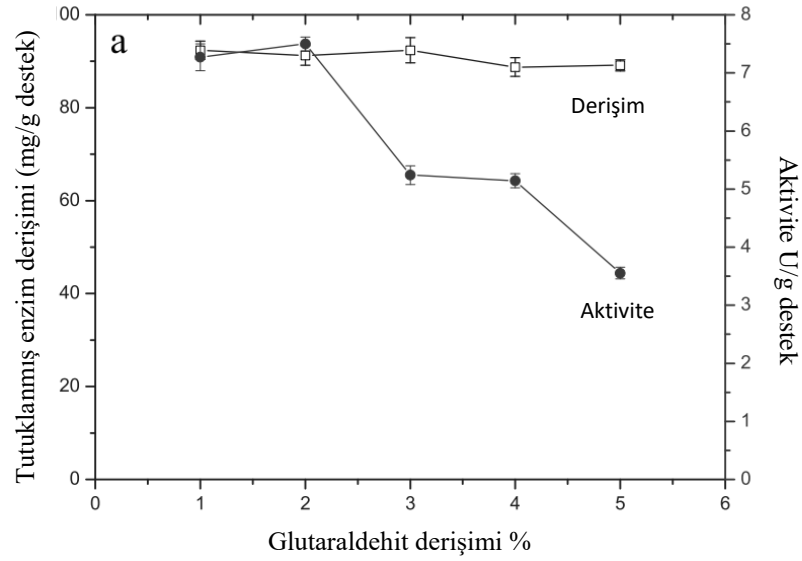
Şekil 3.10 Propranololün kinetik rezolüsyonu (Barbosa vd. 2010)

Tutuklama esnasında Cal-B lipazının farklı konformasyonel değişiklikler sergilediği, modifiye edilmiş desteklere tutuklanan lipazın farklı yönelimleri nedeniyle istenmeyen konformasyonların oluştuğu ve bu nedenle düşük enantioseçimlilik gösterdikleri

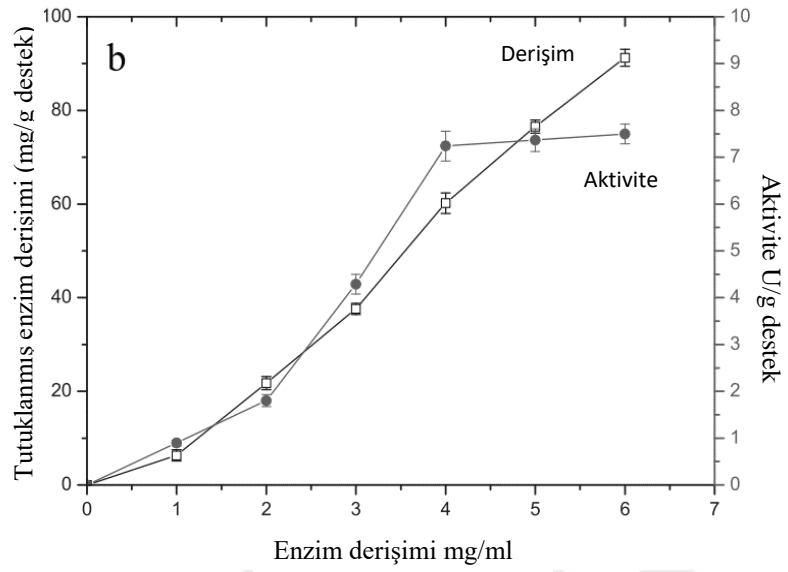
belirlenmiştir. Sonuç olarak, %30 dönüşüm,  $ee_s=96$ ,  $ee_p=73$  ve  $E=57$  değerleri elde edilmiştir. Enzimin işletim dayanımını belirlemek için tekrar kullanılması durumunda, her tekrarda enzimin aktivitesinde % 10 düşüş gözlenmiştir.

Gupta ve Salonki (2011), adsorpsiyon metodu ile *Candida rugosa* lipazını demir oksit nanoparçacıklara tutuklamışlardır. Bu çalışmada birlikte çöktürme yöntemi ile demir oksit nanoparçacıklar üretilmiştir. Daha sonra üretilen nanoparçacıklar yüzey aktif madde Tween 80 ve polietilenimin polimeri ile modifiye edilmiştir. Modifiye edilmiş nanoparçacıklara *Candida rugosa* lipazı adsorpsiyon yöntemi ile tutuklanmış ve üretilen enzim yüklü nanoparçacıklar 1-feniletanolün kinetik rezolüsyonunda kullanılmıştır. 1 mmol 1-feniletanol, 1 mmol vinilesat ile 1 ml hegzan içerisinde tepkimeye girmiştir. Daha sonra tutuklanmış enzim eklenmiş ve 30 °C'de, farklı sürelerde tepkime gerçekleşmiştir. Serbest enzimin spesifik aktivitesini 233 U/mg, modifiye edilmemiş demir oksitinkini ise 519 U/mg bulmuşlardır. Tween 80 ve polietilenimin polimeri ile modifiye edilmiş nanoparçacıklara tutuklu enzimlerin spesifik aktiviteleri sırasıyla 442 ve 663 U/mg bulunmuştur. Tüm modifiye çeşitleri başarılı olmuş ve spesifik aktivite serbest enzime göre 2-3 kat artmıştır. Tüm başarılı olsada spesifik aktivitenin artmasında en faydalı polietilenimin bulunmuştur. Yüklü polimerler, yüzey aktif maddeler ve ara yüzeyler moleküler kapak hareketine yol açarlar ve bu sebeple lipazların aktif bölgesinin açılmasına sebep olurlar. Sonuç olarak polietilenimin ile modifiye edilmiş nanoparçacıklara tutuklu enzimler eşzamanlı saflaştırmanın kümülatif etkisini ve kapak hareketi sebebiyle lipazın aktivasyonunu sağlamıştır. Polietilenimin ile modifiye edilmiş enzim biyokatalizörlüğünde yapılan 1-feniletanolün kinetik rezolüsyonundan elde edilen % dönüşüm, % ee ve E değerleri sırasıyla % 41, % 99 ve 412 bulunmuştur. Enantiyomerik oranın 100'ün üzerinde olması başarılı bir çalışma olduğunu gösterir. Polietilenimin lipazın arayüzey aktivasyonunu sağlamış ve başarılı bir sonuç elde edilmiştir. Çözelti içerisindeki *Candida rugosa* lipazı molekülleri ve  $Fe_3O_4$  nanoparçacıkları negatif yüklüdür. Enzimin negatif yüklü bu parçacıklara bağlanması doğal olarak elektrostatik olmadığını gösterir. Fakat pozitif yüklü polietilenimin kaplı demir oksit nanoparçacıkları anyon değiştirici görevi yaparak proteinleri kirletmez ve eşzamanlı saflaştırmayı sağlar (Gupta ve Salonki 2011).

Bezbradica vd. (2011), çalışmalarında elektrokimyasal sentez yöntemi ile polianilin destek materyalleri üretmişlerdir. Glutaraldehit ile aktive edilen polianilin yüzeyi karbodiimid ve etilendiamin ile modifiye edilerek yüzeydeki amin gruplarının sayısı artırılmış ve modifiye edilmiş destek materyaline *Candida rosgosa* lipazı tutuklanmıştır. Uygun glutaraldehit konsantrasyonu % 2 (w/v), enzim konsantrasyonu 4 mg/ml bulunmuş ve büyük ölçüde (93.7 mg protein/g destek) enzimin desteğe yüklendiği tespit edilmiştir (Şekil 3.11, 3.12). Desteğe yüzey modifikasyonu yapılmadan ve yapıldıktan sonraki durumlar için tutuklama sonuçları karşılaştırıldığında, yüzeydeki amin gruplarının artmasıyla daha yüksek spesifik aktivite ve termal kararlılık gösteren tutuklanmış enzimler elde edildiği görülmüştür. Ayrıca, tutuklanmış enzimin işletim kararlılığını arttırdığı, on beş kez kullanım sonunda başlangıç aktivitesine göre kalan aktivitenin %91 olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.11 Polianilin aktivasyonunda glutaraldehit derişiminin aktiviteye etkisi  
Bezbradica vd. (2011)



Şekil 3.12 Polianilin üzerine *Candida rugosa* lipazı tutuklanmasında enzim miktarının aktiviteye etkisi (Bezbradica vd. 2011)

Rios vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada, mezoporlu silika (SBA-15) üzerine Cal-B lipazı kovalent bağlama metodu ile tutuklanmıştır. Destek materyali yüzeyinde amin gruplarını arttırmak için SBA-15 APTES (3-amino-propyltriethoxysilane) ile yüzey modifikasyonu yapılmıştır. Daha sonra destek materyali divinilsülfon ve glutaraldehit çapraz bağlayıcıları ile aktive edilmiş ve aktif desteğe Cal-B kovalent bağlama ile tutuklanmıştır. İşletim kararlılığını değerlendirmek için tutuklanmış enzimler, hidroliz tepkimesi ile (R,S)-feniletil asetatın kinetik rezolüsyonunda kullanılmıştır. Ürünlerin enantiyomerik aşırılığı, substratların enantiyomerik aşırılığı, dönüşüm ve enantiyomerik oran sonuçları ile tutuklanmış enzimlerin verimi çizelge 3.3'te değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.3 (R,S)-feniletil asetatın kinetik rezolüsyonu (Bezbradica vd. 2011)

Biyokatalizör	ee <sub>s</sub>	ee <sub>p</sub>	C	E
<b>SBA-15-APTES-GA-LIPB</b>	99	99	50	1057
<b>SBA-15-APTES-DVS-LIPB</b>	96	99	49	789

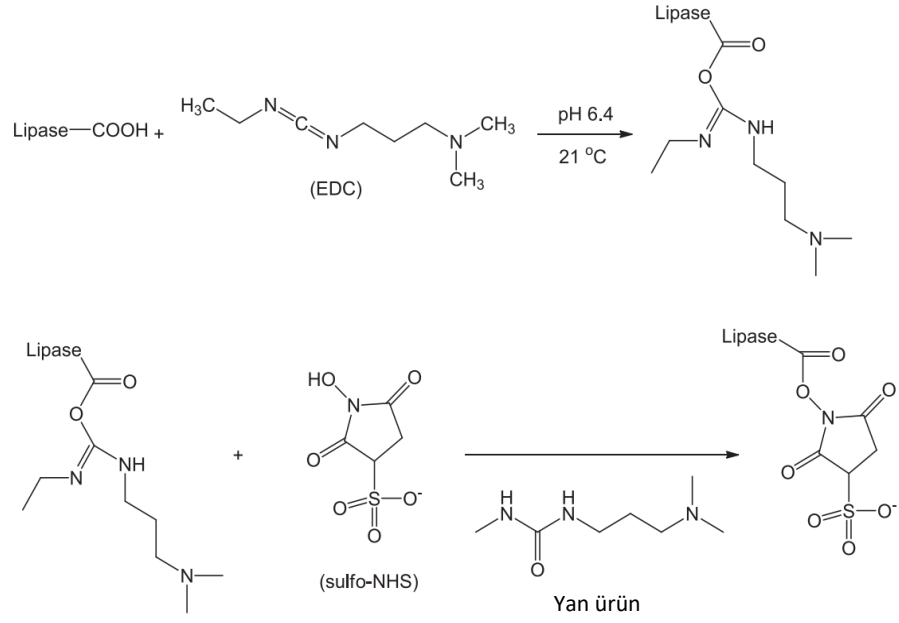
Reaksiyon koşulları: 30 °C, 24 saat, 250 rpm, fosfat tamponu: pH 7

Her iki enzimin tepkimeyi katalizlediği, büyük ölçüde seçici oldukları, yüksek enantiyomerik oran değerlerinden (> 700) anlaşılmaktadır. % 49-50 dönüşüm değerleri iki enzimin de oldukça aktif olduğunu göstermektedir.

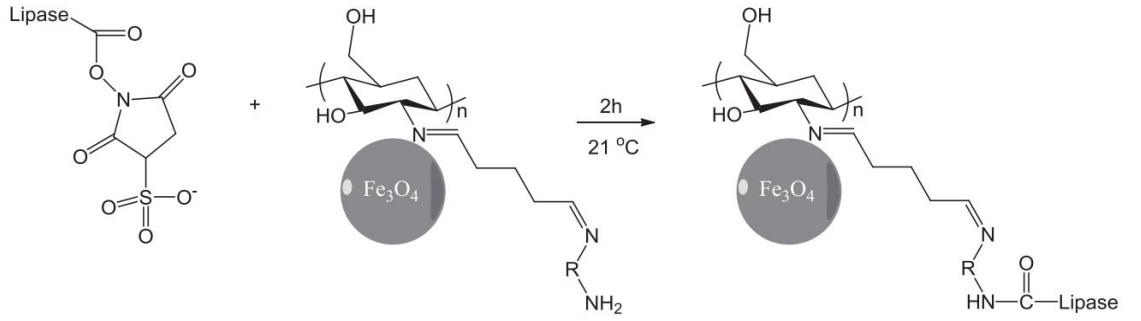
Aynı tepkime koşulları geçerli olmak üzere, tutuklanmış enzimlerin tekrar kullanılabilirliği, hidroliz tepkimeleri ile test edilmiştir. Yüksek enantiyoseçicilik göstermesine karşın, SBA-15-APTES-GA-LIPB enziminin enantiyomerik oran değeri beşinci tepkimede 1057'den 50'ye düşmüş ve sabitlenmiştir. SBA-15-APTES-DVS-LIPB enziminin E değeri ise beşinci tepkime sonrası 789'dan >400'e düşmüş ve sonrasında sabit kalmıştır.

Farklı aktifleyicilerin enzimin özelliklerini etkilediği; farklı aktivite, enantiyoseçicilik ve kararlılık gösterdiği gözlenmiştir. DVS ile kimyasal modifikasyonun enzim kararlılığını arttırdığı ve en az beş kez aynı enzimin tepkimelerde kullanılabileceği görülmüştür.

Sikora vd. (2016), manyetik kitosan nanoparçacıklara kovalent bağlanma yöntemi ile *Candida rugosa* lipazını tutuklamışlardır. Lipazın karboksil grubu ile nanoparçacıkların birincil amin grubu arasında bir amid bağının oluşmasıyla tutuklama gerçekleşmiştir. Kovalent bağlanma esnasında çapraz bağlayıcı olarak EDC (*N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide hydrochloride) ve sulfo-NHS (*N*-hydroxy-sulfosuccinimide sodium salt) aktifleyicileri kullanılmıştır (Şekil 3.13,3.14).

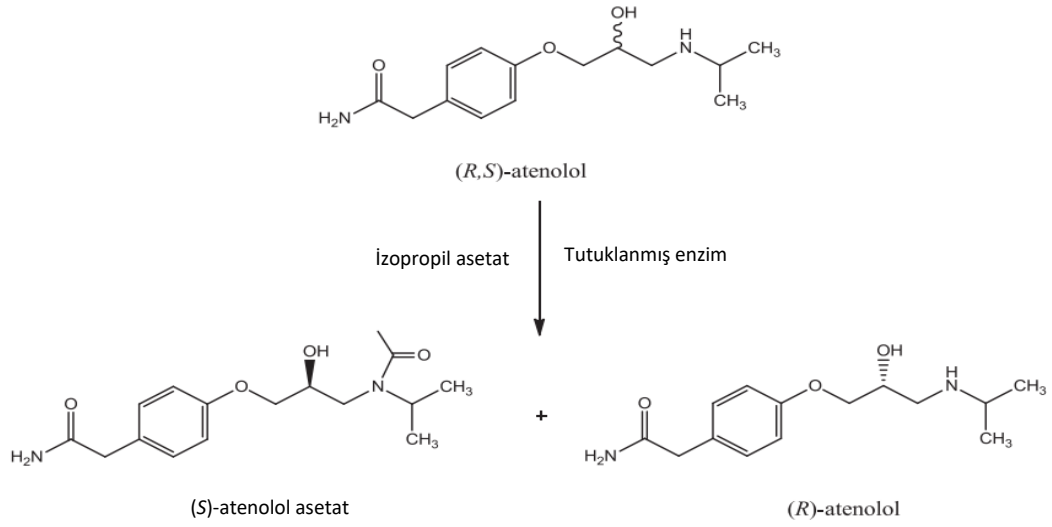


Şekil 3.13 Çapraz bağlayıcılar ve lipazın birbirine bağlanması (Sikora vd. 2016)



Şekil 3.14 Lipaz ve çapraz bağlayıcılar arasında amid bağı oluştuktan sonra manyetik kitosana tutuklanma işlemi (Sikora vd. 2016)

Elde edilen manyetik kitosan nanoparçacıklar atenololün kinetik rezolüsyonunda kullanılmıştır (Şekil 3.15). Enantiyoseçimlilik (ee) 24-240 saat süre aralığında % 99'un üzerinde elde edilmiştir. Enantiyomerik oran (E) ise artan süre ile artmış ve 240 saat sonunda 66.9 bulunmuştur. Tüm bu değerler doğrultusunda manyetik kitosan nanoparçacıklara tutuklanmış *Candida rugosa* lipazı atenolölü enantiyomerlerine ayırmayı başarmıştır. Sürenin çok uzun olması çalışmanın dez avantajıdır.

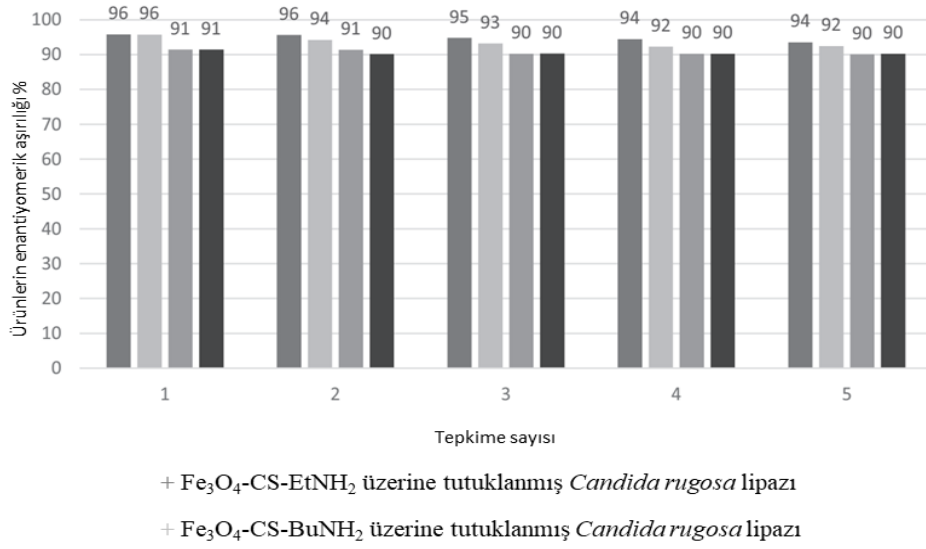


Şekil 3.15 Tutuklanmış enzim biyokatalizörlüğünde rasemik atenololün asetillenmesi (Sikora vd. 2016)

Çizelge 3.4 Atenololün enantiyoseçimliliği (Sikora vd. 2016)

		Reac time	Süre,saat	ee <sub>s</sub> %	ee <sub>p</sub> %	c%
<i>Candida</i> OF imn Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CS-EtNH <sub>2</sub> üzerine tutuklanmış <i>Candida</i> <i>rugosa</i> lipazı	24	48.76	18.14	95.22	16
		48	37.01	19.69	93.66	17.37
		72	34.78	23.54	93.02	20.2
		6	27.13	25.2	91	21.69
		20	45.48	30.64	94.24	24.54
		44	43.5	33.99	93.79	26.6
		68	58.51	39.74	95.07	29.48
		92	53.68	42.11	94.52	30.82
		216	65.17	52.41	94.95	35.57
		240	66.9	67.71	94.1	41.84
<i>Candida</i> OF imn Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CS-BuNH <sub>2</sub> üzerine tutuklanmış <i>Candida</i> <i>rugosa</i> lipazı	24	20.06	10.5	89.52	10.49
		48	22.84	10.87	90.71	10.7
		72	28.82	10.33	92.6	10.03
		6	36.32	10.66	94.07	10.18
		20	32.16	10.91	93.31	10.47
		44	30.46	11.09	92.94	10.66
		68	29.29	11.29	92.65	10.86
		92	27.96	11.53	92.3	11.11
		216	33.55	11.89	93.52	11.28
		240	34.04	13.39	93.52	12.53

Bir sonraki katalitik sistemde tekrar kullanılabilirliği ölçmek için, tutuklanmış enzimler beş kez aynı tepkimeyi katalizlemişlerdir. Elde edilen değerler şekil 3.16'da gösterilmiştir. Sonuçlar tutuklama prosedürünün etkili ve verimli olduğunu, tutuklanmış enzimlerin beş tepkime sonrası bile karalılığını ve katalitik aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir.

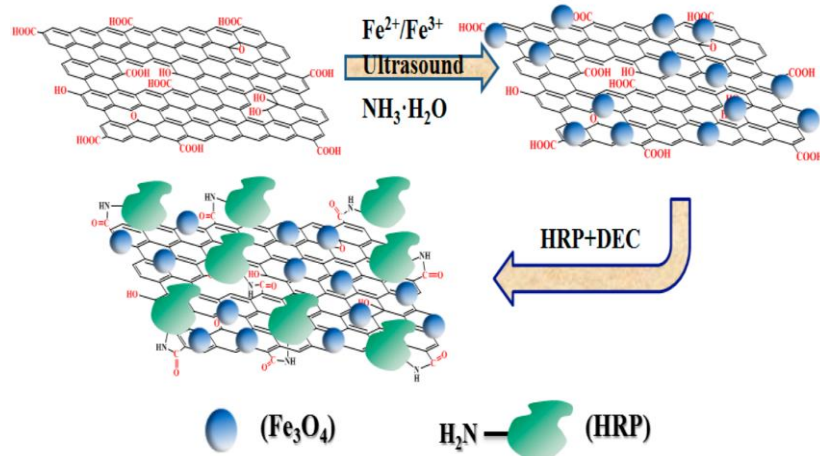


Şekil 3.16 (R,S)-Atenololün kinetik rezolüsyonunda tutuklanmış enzimlerin tekrar kullanılabilirliği (Sikora vd. 2016)

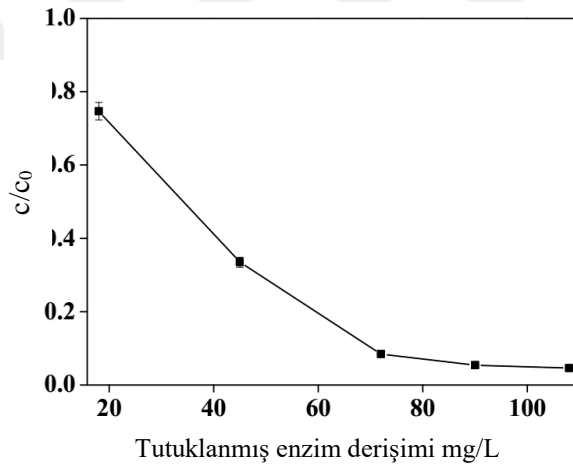
Chang vd. (2016) fenol ve 2,4-diklorofenolün katalitik oksidasyonu çalışmasında grafen oksit/demir oksit (GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) manyetik nanoparçacıkları sentezlemişler ve Horseradish peroksidase (HRP) “bayır turbu peroksidazı” enzimini bu nanoparçacıklar üzerine tutuklamışlardır (Şekil 3.17).

Tutuklanmış enzim dozunun katalizör etkisi şekil 3.18’de gösterilmiştir. Uygun HRP derişimi 90 mg/L bulunmuş; 90 mg/L’ye kadar tutuklanmış enzim miktarı arttıkça fenolün uzaklaşması önemli ölçüde artmıştır. 90 mg/L enzim miktarından sonra ise fenolün uzaklaşması yavaşlamıştır. HRP derişiminin artması, inaktivasyon şansını azaltan, inert-orta seviyeli ürünlerin, fenoksil radikallerin, daha fazla üretilmesine sebep olmuştur.

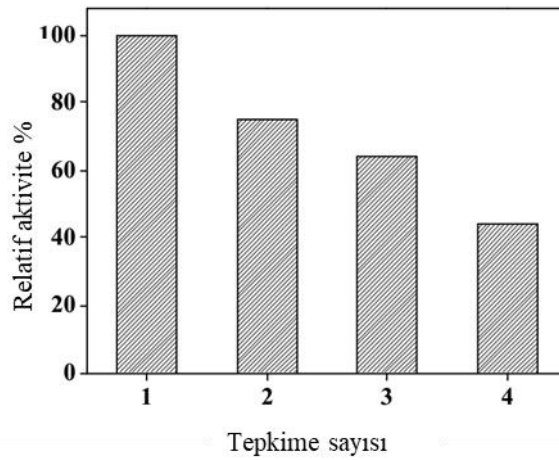
Fenolün uzaklaştırılması tepkimesinde tutuklanmış enzimin tekrar kullanılabilirliği incelenmiş ve 4 tepkime sonucunda % 40 aktivite kaybı olduğu görülmüştür. Reaksiyon ortamında oluşan polimerin enzimi kaplaması ve bir sonraki tepkimeyi etkilemesi bu duruma sebep olarak düşünülmüştür. Tutuklanmış enzimin aktivite kaybı olmadan ya da çok az bir kayıpla tekrar kullanılabilmesi için ileri araştırmalar geliştirilmesi önerilmiştir.



Şekil 3.17 Demir oksit manyetik nanoparçacıkların oluşumu ve HRP' nin manyetik destek materyallerine tutuklanması (Chang vd. 2016)



Şekil 3.18 Tutuklanmış enzim dozunun fenolün uzaklaştırılmasına etkisi (Chang vd. 2016)



Şekil 3.19 GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanokompozite tutuklanmış enzimlerin tekrar kullanılabilirliği

## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1 Materyal

#### 4.1.1 Kullanılan aletler

- ✓ Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)
- ✓ Santrifüj cihazı
- ✓ pH metre
- ✓ Ultrasonik banyo
- ✓ Vakumlu etüv
- ✓ Döner buharlaştırıcı
- ✓ Taramalı elektron mikroskobu (SEM)
- ✓ FT-IR Spektroskopisi

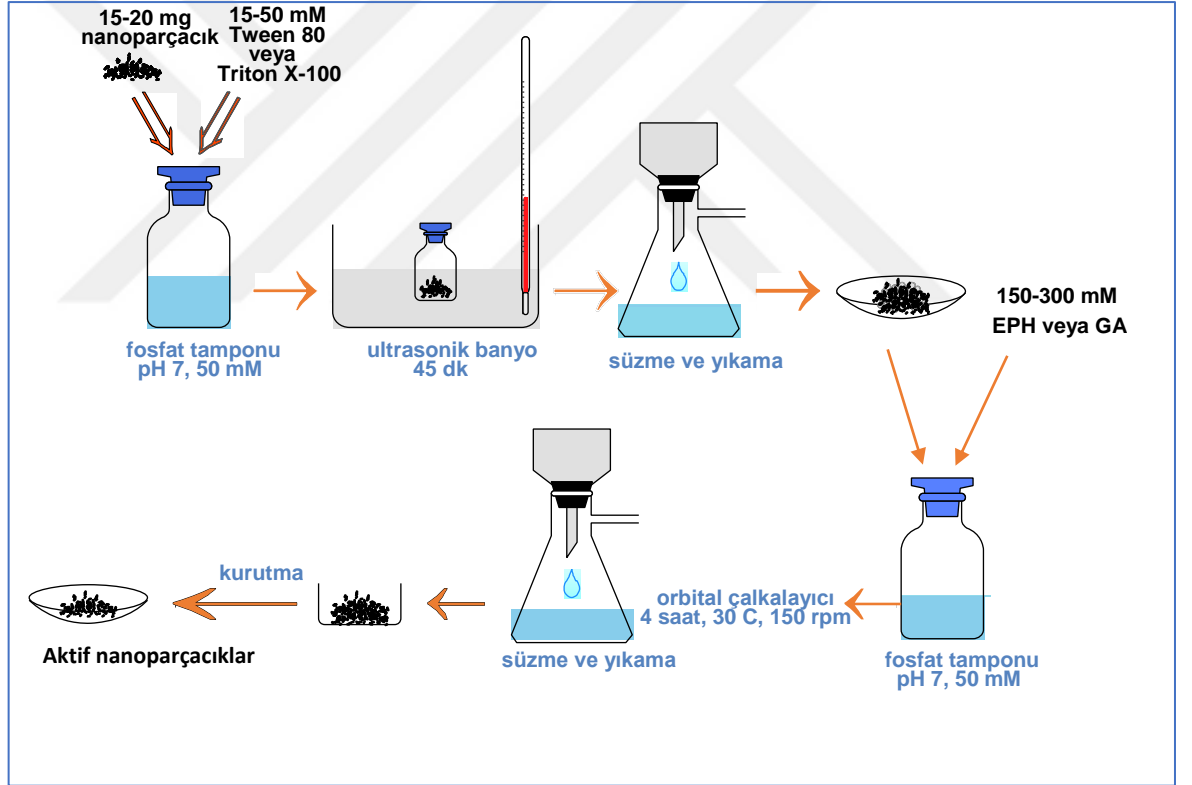
#### 4.1.2 Kullanılan kimyasallar

*Candida antarctica* lipazı (Cal-B, sıvı form), Glutaraldehit (GA, %50 wt. in H<sub>2</sub>O), Epiklorohidrin (EPH), Triton X-100 [C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>(n=9-10)], Tween 80 (C<sub>64</sub>H<sub>124</sub>O<sub>26</sub>), Demir (II) klorür heksahidrat (FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 99%) Demir (III) klorür heksahidrat (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, %97), Demir (II) sülfat heptahidrat (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, %99), kitosan [orta molekül ağırlıklı, MMW), Grafit oksit, Zeytin yağı (yüksek ölçüde rafine edilmiş, düşük asit), Kalsiyum klorür (CaCl<sub>2</sub>), Di sodyum hidrojen fosfat di hidrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O), Potasyum di hidrojen fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Sodyum hidroksit (NaOH), Hidroklorik asit (HCl), Fenolftalein (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>), Aseton (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O), Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O), R,S-1-feniletanol, Hekzan (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), Heptan (C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>), Toluen (C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>), 2-propanol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O).

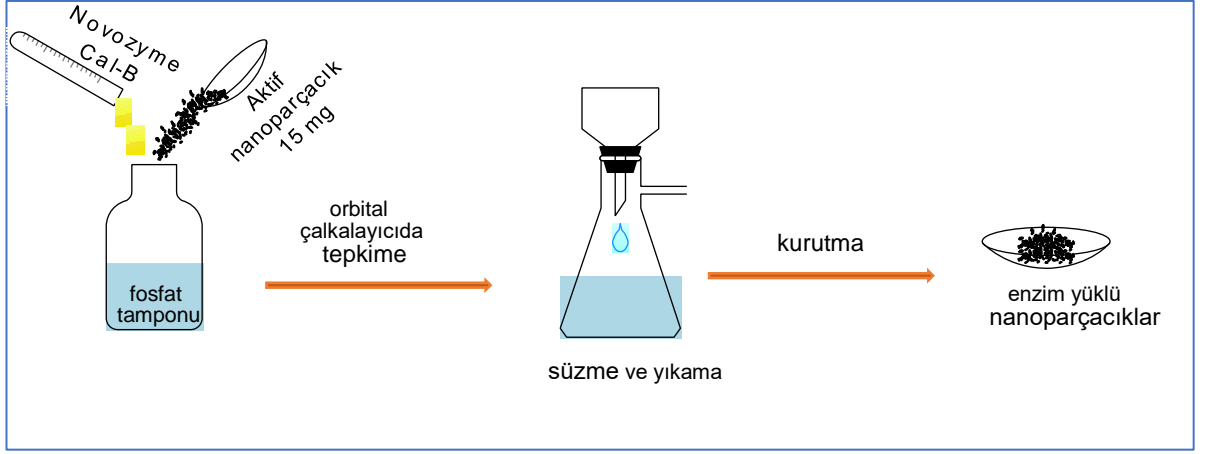
Deneylede kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma, Riedel, Novozymes, Grafen ve Merck'ten temin edilmiştir. Kullanılan kimyasalların isimleri ve bazı özellikleri EK 5'te verilmiştir.

## 4.2 Yöntem

Bu tez çalışmasında, deney düzeni temelde dört basamaktan oluşmaktadır. Birinci kısım nanoparçacıkların elde edilmesi, ikinci kısım elde edilen nanoparçacıkların çapraz bağlayıcılar ile aktive edilmesi, üçüncü kısım ise aktif nanoparçacıklara lipaz enzimi tutuklanmasıdır. Son kısım ise tutuklanmış enzim biyokatalizörlüğünde 1-feniletanolün kinetik rezolüsyonudur. Aşağıda farklı türden nanoparçacıkların nasıl üretildiği, aktive edilmesi ve tutuklama işlemi detaylı şekilde anlatılmıştır. Ayrıca nanoparçacıkların aktive edilmesi ve aktif nanoparçacıklara enzim tutuklama işlemi aşamaları şekil 4.1,4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Nanoparçacıkların aktive edilmesi



Şekil 4.2 Aktif nanoparçacıklara Novozyme Cal-B lipazı tutuklama aşamaları

#### 4.2.1 Manyetik Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacık sentezi

Manyetik nanoparçacıklar alkali ortamda, ortak çöktürme yöntemi ile sentezlenmiştir. Mol oranı 0.5 olarak ayarlanmış demir tuzları (FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O ve FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O), HCl çözeltisi (0.16 M) içerisinde çözünmüştür. Oluşan karışım 80 °C sıcaklıkta ve inert atmosfer altında NaOH (1M, 50 ml) çözeltisine eklenmiştir. Elde edilen çözelti 30 dk süre ile güçlü bir şekilde mekanik olarak karıştırılmış ve süre sonunda 10,000 rpm de, 15 dk santrifüj edilerek manyetik parçacıklar ortamdaki ortamdan ayrılmıştır. Parçacıklar üç kez deiyonize su ile yıkayıp 50 °C’de vakum altında kurutulmuştur (Atıla-Dinçer vd. 2014).

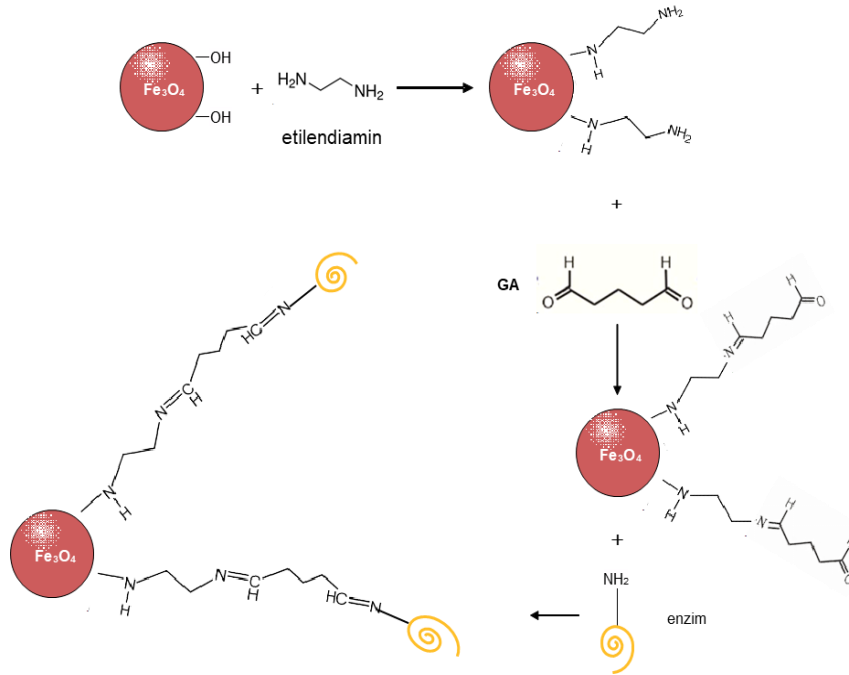
##### 4.2.1.1 Manyetik Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıkların aktiflenmesi

Yukarıda elde edilen nanoparçacıklardan 15-20 mg alınır ve 5 ml fosfat tamponu (50 mM, pH 7.0) içerisine eklenir. Bu karışıma yüzey aktif maddelerden Triton X-100 ve Tween 80 (10, 20, 30, 40, 50 mM) belli miktarda ilave edilir ve 45 dk süre ile ultrasonik banyoda tepkime gerçekleşir. Süre sonunda nanoparçacıklar mıknatıs yardımı ile ayrılır ve üç kez deiyonize su ile yıkanarak bağlanmamış yüzey aktif maddeler ortamdaki ortamdan uzaklaştırılır. Yüzeye amin grupları eklemek için nanoparçacıklar fosfat ortamında, 2 ml etilendiamin ile 2 saat oda sıcaklığında tepkimeye girer. Ayrılan nanoparçacıklar tekrar 5 ml fosfat tamponu (50 mM, pH 7.0) içerisine alınır ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılan glutaraldehit veya epiklorohidrin (150, 200, 250, 300 mM) belli miktarlarda

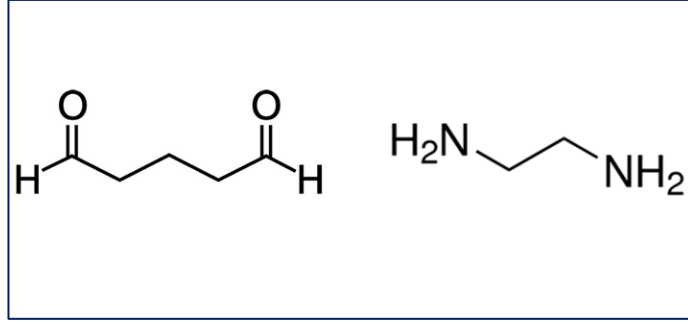
bu karışıma eklenir. Oluşan karışım orbital çalkalayıcıda 30 °C’de, 4 saat süre ile 150 rpm de karıştırılır. Süre sonunda mıknatıs ile ayrılan nanoparçacıklar üç kez deiyonize su ile yıkanır ve oda sıcaklığında kurutulur.

#### 4.2.1.2 Aktif manyetik nanoparçacıklara lipaz enzimi tutuklama

Novozyme Cal-B (*Candida antarctica* lipazı, sıvı form) lipazından 1.0 ml alınır ve 4 ml fosfat tamponu (pH 5, pH 6, pH 7, pH 8) içerisine eklenir. 15 mg aktif nanoparçacık tartılır ve enzimli tampon çözeltisine eklenir. Oluşan karışım orbital çalkalayıcıda farklı sürelerde (4, 8, 12, 16, 20 saat) ve farklı sıcaklıklarda (20, 30, 40, 50, 60 °C), 150 rpm de karıştırılır. Süre sonunda nanoparçacıklar mıknatıs ile ayrılır ve sıvı kısım bağlanmamış enzim aktivitesini ölçmek için saklanır. Nanoparçacıklar ise üç kez deiyonize su ile yıkanır ve oda sıcaklığında kurutulur. Kuruyan enzim yüklü parçacıklar +4 °C de saklanır. Elde edilen parçacıklar glutaraldehit ile aktive edilmişse Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ (parçacık-glutaraldehit-lipaz), epiklorohidrin ile aktive edilmişse Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-EPH-Lİ (paracık-epiklorohidrin-lipaz) adını alır.



Şekil 4.3 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ enziminin üretim mekanizması



Şekil 4.4 Glutaraldehit ve etilendiamin (Xue vd. 2015)

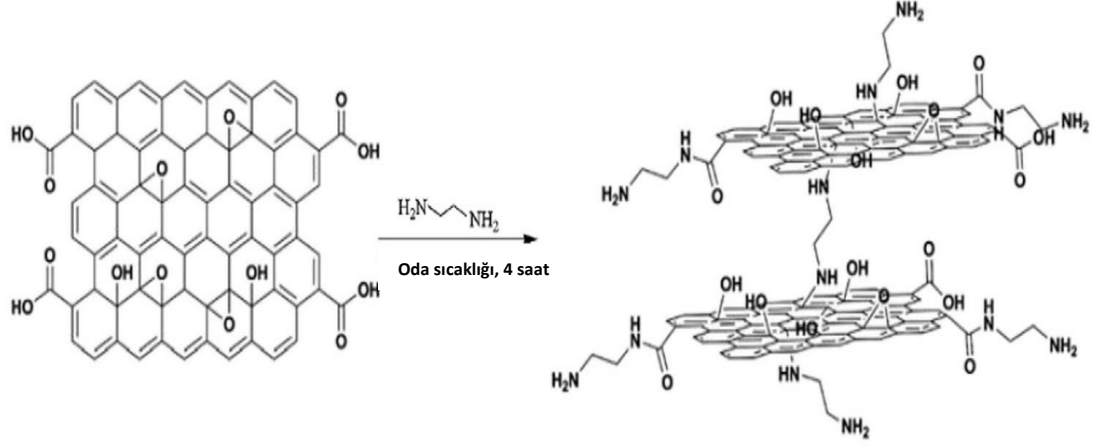
#### 4.2.2 Grafen oksit (GO) nanoparçacıkların sentezi

Grafen oksit (1 mg/ml), grafit oksit tozunun sulu çözeltisinden elde edilmektedir. 200 mg grafit oksit 200 ml deiyonize suya eklenir ve amonyak çözeltisi ile yaklaşık 3 civarında olan ortam pH'ı 10 a çıkartılır. Oluşan kahverengi çözelti ultrasonik banyoda oda sıcaklığında 1 saat bekletilir. Süre sonunda oluşan grafen oksiti süzerek ayırmak çok zordur. Bu sebeple çözelti petri kaplarına alınır ve vakumlu etüvde 40 °C'de kurutularak suyun tamamen buharlaşması sağlanır. Geriye kalan grafen oksit parçacıkları petri kabından spatül yardımıyla toplanır.

##### 4.2.2.1 Grafen oksit nanoparçacıkların aktiflenmesi

Yukarıda elde edilen nanoparçacıklardan 15-20 mg alınır ve 5 ml fosfat tamponu (50 mM, pH 7.0) içerisine eklenir. Bu karışıma yüzey aktif maddelerden Triton X-100 ve Tween 80 (10, 20, 30, 40, 50 mM) belli miktarda ilave edilir ve 45 dk süre ile ultrasonik banyoda tepkime gerçekleşir. Süre sonunda nanoparçacıklar vakumlu süzme cihazı ile ayrılır ve üç kez deiyonize su ile yıkanarak bağlanmamış yüzey aktif maddeler ortamdan uzaklaştırılır. Yüzeye amin grupları eklemek için nanoparçacıklar fosfat ortamında, 2 ml etilendiamin ile 2 saat oda sıcaklığında tepkimeye girer. Ayrılan nanoparçacıklar tekrar 5 ml fosfat tamponu (50 mM, pH 7.0) içerisine alınır ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılan glutaraldehit veya epiklorohidrin (150, 200, 250, 300 mM) belli miktarlarda bu karışıma eklenir. Oluşan karışım orbital çalkalayıcıda 30 °C'de, 4

saat süre ile 150 rpm de karıştırılır. Süre sonunda vakumlu süzme ile ayrılan nanoparçacıklar üç kez deiyonize su ile yıkanır ve oda sıcaklığında kurutulur.



Şekil 4.5 GO nanoparçacıkların etilendiamin ile modifikasyonu (Xue vd. 2015)

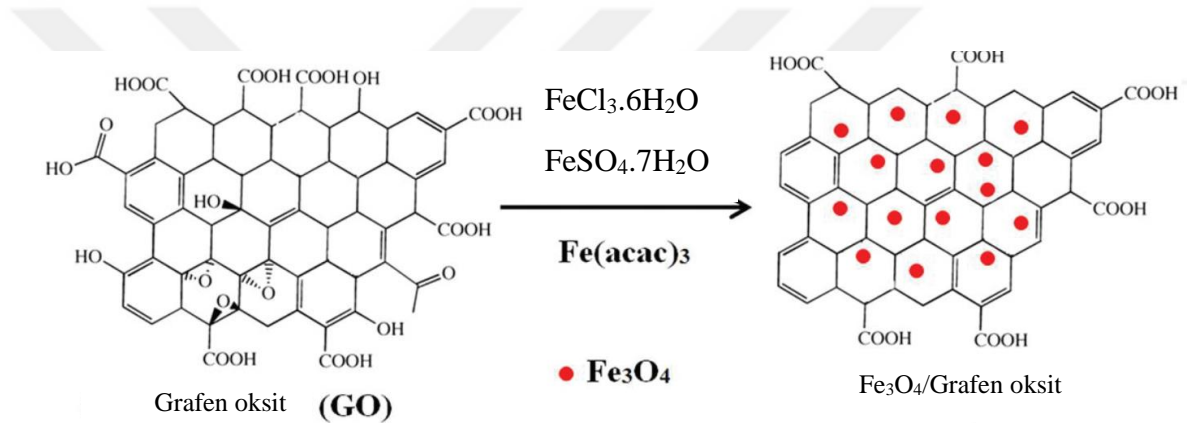
#### 4.2.2.2 Aktif grafen oksit nanoparçacıklara lipaz enzimi tutuklama

Novozyme Cal-B (*Candida antarctica* lipazı, sıvı form) lipazından 1.0 ml alınır ve 4 ml fosfat tamponu (pH 5, pH 6, pH 7, pH 8) içerisine eklenir. 15 mg aktif nanoparçacık tartılır ve enzimli tampon çözeltisine eklenir. Oluşan karışım orbital çalkalayıcıda farklı sürelerde (4, 8, 12, 16, 20 saat) ve farklı sıcaklıklarda (20, 30, 40, 50, 60 °C), 150 rpm de karıştırılır. Süre sonunda nanoparçacıklar vakumlu süzme ile ayrılır ve sıvı kısım bağlanmamış enzim aktivitesini ölçmek için saklanır. Nanoparçacıklar ise üç kez deiyonize su ile yıkanır ve oda sıcaklığında kurutulur. Kuruyan enzim yüklü parçacıklar +4 °C de saklanır. Elde edilen parçacıklar glutaraldehit ile aktive edilmişse GO-GA-Lİ (parçacık-glutaraldehit-lipaz), epiklorohidrin ile aktive edilmişse GO-EPH-Lİ (parçacık-epiklorohidrin-lipaz) adını alır.

#### 4.2.3 GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanokompozit sentezi

GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanokompozit üretimi ultrasonik destekli, ters ortak çöktürme metoduna göre yapılmıştır. Daha önce elde edilen grafen oksitten 0.2 gr tartılır ve 25 ml deiyonize suya eklenerek ultrasonik banyoda 30 dk bekletilir. Başka bir erlen içerisinde demir tuzları

hazırlanır. Demir tuzlarından  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.47 gr) ve  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.48 gr) 25 ml deiyonize su içerisinde çözünür. GO ve demir tuzları bu aşamada birbirleri ile karıştırılmaz çünkü ortam pH'ı 4 ten küçük ise GO yığın oluşturur ve yüzey alanındaki aktif bölge azalır. Demir tuzlarının bulunduğu 25 ml olan karışımın pH'ı ölçülür (pH=2.1) ve 1 M NaOH ekleyerek ortam pH'ı 4'e ayarlanır. pH 4 olduğunda GO sulu çözeltisi eklenir ve tekrar 1 M NaOH ile ortam pH'ı 10 yapılarak siyah manyetik çökeleklerin oluşması sağlanır. Oluşan bu karışım ultrasonik banyoya alınır ve 60 °C'de 45 dk boyunca etkileşim sağlanır. Süre sonunda elde edilen manyetik çökelekler mıknatıs yardımı ile ya da vakumlu süzme ile ayrılır ve üç kez deiyonize su ile yıkayıp oda sıcaklığında kurutulur (Chang vd. 2016).



Şekil 4.6 GO/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  kompoziti üretim şeması (Kharissova vd. 2016)

#### 4.2.3.1 GO/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ nanokompozitin aktiflenmesi

Elde edilen nanokompozitten 15-20 mg alınır ve 5 ml fosfat tamponu (50 mM, pH 7.0) içerisine eklenir. Bu karışıma yüzey aktif maddelerden Triton X-100 ve Tween 80 (10, 20, 30, 40, 50 mM) belli miktarda ilave edilir ve 45 dk süre ile ultrasonik banyoda tepkime gerçekleşir. Süre sonunda nanoparçacıklar vakumlu süzme cihazı ile ya da mıknatısla ayrılır ve üç kez deiyonize su ile yıkılarak bağlanmamış yüzey aktif maddeler ortamdaki uzaklaştırılır. Yüzeğe amin grupları eklemek için nanoparçacıklar fosfat ortamında, 2 ml etilendiamin ile 2 saat oda sıcaklığında tepkimeye girer. Ayrılan nanoparçacıklar tekrar 5 ml fosfat tamponu (50 mM, pH 7.0) içerisine alınır ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılan glutaraldehit veya epiklorohidrin (150, 200, 250, 300 mM)

belli miktarlarda bu karışıma eklenir. Oluşan karışım orbital çalkalayıcıda 30 °C’de, 4 saat süre ile 150 rpm de karıştırılır. Süre sonunda ayrılan nanoparçacıklar üç kez deiyonize su ile yıkanır ve oda sıcaklığında kurutulur.

#### **4.2.3.2 Aktif GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanokompozitine lipaz enzimi tutuklama**

Novozyme Cal-B (*Candida antarctica* lipazı, sıvı form) lipazından 1.0 ml alınır ve 4 ml fosfat tamponu (pH 5, pH 6, pH 7, pH 8) içerisine eklenir. 15 mg aktif nanokompozit tartılır ve enzimli tampon çözeltisine eklenir. Oluşan karışım orbital çalkalayıcıda farklı sürelerde (4, 8, 12, 16, 20 saat) ve farklı sıcaklıklarda (20, 30, 40, 50, 60 °C), 150 rpm de karıştırılır. Süre sonunda nanokompozitler vakumlu süzme ile ayrılır ve sıvı kısım bağlanmamış enzim aktivitesini ölçmek için saklanır. Nanokompozitler ise üç kez deiyonize su ile yıkanır ve oda sıcaklığında kurutulur. Kuruyan enzim yüklü parçacıklar +4 °C de saklanır. Elde edilen parçacıklar glutaraldehit ile aktive edilmişse GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ, epiklorohidrin ile aktive edilmişse GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-EPH-Lİ adını alır.

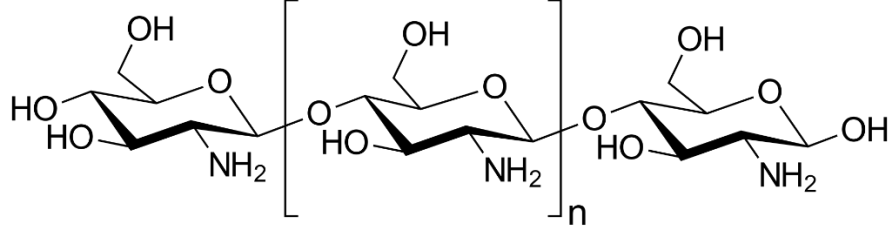
#### **4.2.4 Manyetik kitosan nanoparçacık sentezi**

Şekil 4.7’de yapısı gösterilen 0.2 gr kitosan % 1’lik 20 ml asetik asit çözeltisine eklenir ve oda sıcaklığında, orbital çalkalayıcıda (20 dk,150 rpm) karıştırılır. Demir tuzlarından FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (7 mmol) ve FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (3.5 mmol) bu karışıma eklenir ve 1 M NaOH ile ortam pH’ı 10 yapılarak siyah çökeleklerin oluşması sağlanır. Oluşan karışıma 2 ml etilendiamin eklenir ve 2 saat süre ile oda sıcaklığında karıştırılır. Elde edilen siyah manyetik çökelekler mıknatıs yardımı ile ortamdan ayrılır ve 3-5 kez deiyonize su ile yıkanır; oda sıcaklığında 24 saat kurtulur (Sikora vd. 2016). Şekil 4.8’de manyetik klitosanın üretim şeması ayrıca gösterilmiştir.

##### **4.2.4.1 Manyetik kitosan nanoparçacıkların aktiflenmesi**

Manyetik kitosan nanoparçacıklarından 15-20 mg alınır, 10 ml fosfat tamponu (50 mM, pH 7.0) içerisine eklenir ve 45 dk süre ile ultrasonik banyoda bekletilir. Süre sonunda

karışıma 800 mM glutaraldehit eklenir. Oluşan karışım orbital çalkalayıcıda 30 °C’de, 4 saat süre ile ve 150 rpm de karıştırılır. Süre sonunda ayrılan nanoparçacıklar üç kez deiyonize su ile yıkanır ve oda sıcaklığında kurutulur.



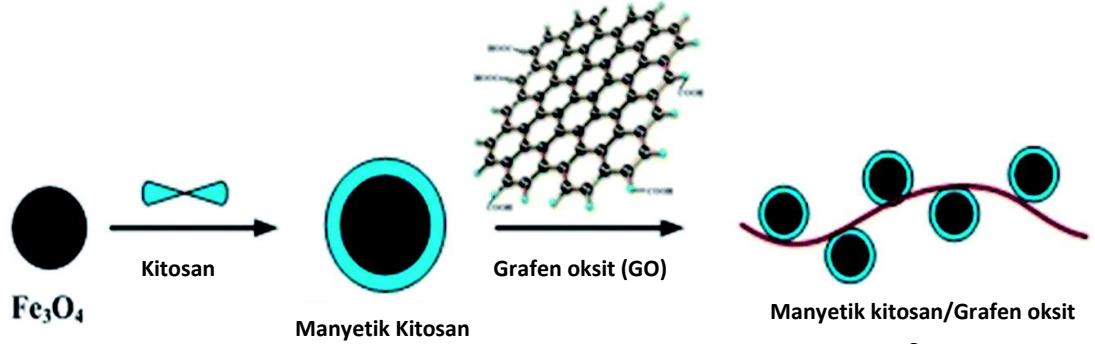
Şekil 4.7 Kitosanın yapısı (Li vd. 2014)

#### 4.2.4.2 Manyetik kitosan nanoparçacıklara lipaz enzimi tutuklama

Novozyme Cal-B (*Candida antarctica* lipazı, sıvı form) lipazından 1.0 ml alınır ve 4 ml fosfat tamponu (50 mM, pH 7.0) içerisine eklenir. 15 mg aktif nanomateryal tartılır ve enzimli tampon çözeltisine eklenir. Oluşan karışım orbital çalkalayıcıda 12 saat, 30°C’de ve 150 rpm de karıştırılır. Süre sonunda manyetik kitosan nanoparçacıklar mıknatıs ile ayrılır, üç kez deiyonize su ile yıkanır ve oda sıcaklığında kurutulur. Kuruyan enzim yüklü parçacıklar +4 °C’de saklanır. Elde edilen parçacıklar Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ (demiroksit/kitosan-glutaraldehit-lipaz) adını alır.

#### 4.2.5 GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Kitosan nanokompozit sentezi

Öncelikle 50 mg kitosan % 2’lik 25 ml asetik asit çözeltisinde çözünür ve jel şeklinde bir çözelti elde edilir. Yukarıda elde edilen GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanokompoziti 50 ml deiyonize su içine alınır ve 15 dk ultrasonik banyoda bekletilir. Süre sonunda içerisine kitosan-asetik asit çözeltisi ilave edilir. Bu karışım 1 saat orbital çalkalayıcıda karıştırılır (150 rpm, 30 °C). Daha sonra içerisine 2 ml glutaraldehit ilave edilir ve 1 M NaOH ile ortam pH’ı 9-10’a ayarlanır. Oluşan karışım orbital çalkalayıcıda 60 °C’de 2 saat karıştırılır. Süre dolduğunda, siyah parçacıklar mıknatıs yardımıyla toplanır; 3-5 kez deiyonize su ile yıkanır ve 30 °C’de bir gece kurutulur (Ye vd. 2014).



Şekil 4.8 Manyetik kitosan nanoparçacıkların sentez şeması (Li vd. 2014)

#### 4.2.5.1 GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Kitosan nanokompozitin aktiflenmesi

Elde edilen nanokompozitten 15-20 mg alınır, 10 ml fosfat tamponu (50 mM, pH 7.0) içerisine eklenir ve 45 dk süre ile ultrasonik banyoda bekletilir. Süre sonunda karışıma 800 mM glutaraldehit eklenir. Oluşan karışım orbital çalkalayıcıda 30 °C’de, 4 saat süre ile ve 150 rpm de karıştırılır. Süre sonunda mıknatıs yardımıyla ayrılan nanoparçacıklar üç kez deiyonize su ile yıkanır ve oda sıcaklığında kurutulur.

#### 4.2.5.2 Manyetik GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Kitosan nanokompozite lipaz enzimi tutuklama

Novozyme Cal-B (*Candida antarctica* lipazı, sıvı form) lipazından 1.0 ml alınır ve 4 ml fosfat tamponu (50 mM, pH 7.0) içerisine eklenir. 15 mg aktif nanokompozit tartılır ve enzimli tampon çözeltisine eklenir. Oluşan karışım orbital çalkalayıcıda 12 saat, 30 °C’de ve 150 rpm de karıştırılır. Süre sonunda manyetik kitosan nanoparçacıklar mıknatıs ile ayrılır, üç kez deiyonize su ile yıkanır ve oda sıcaklığında kurutulur. Kuruyan enzim yüklü parçacıklar +4 °C’de saklanır. Elde edilen parçacıklar GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ (grafen oksit/demir oksit/kitosan-glutaraldehit-lipaz) adını alır.

#### 4.2.6 Lipaz aktivitesinin belirlenmesi

Serbest ve tutuklanmış haldeki lipazların spesifik aktivitesi, 1 ml serbest lipaz veya 10 mg tutuklanmış enzim tozu tarafından 1 dakika içerisinde zeytinyağı trigliserollerinden açığa çıkarılan yağ asitlerinin µmol cinsinden miktarı olarak tarif edilmektedir. Aktivite

ölçümünde, trigliserol substratı olarak zeytinyağı kullanılmıştır. 2 ml zeytinyağı, 0.5 mL 0.1 M CaCl<sub>2</sub> , 3 ml fosfat tampon çözeltisi [41.3 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1/15 mol/L) + 58.7 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1/15 mol/L) pH=7] ve 5 ml deiyonize su orbital çalkalayıcıda (37 °C, 10 dk, 150 rpm) karıştırılmıştır. Elde edilen karışıma, 1 ml serbest enzim veya 10 mg tutuklanmış enzim tozu ilave edilmiş ve tekrar orbital çalkalayıcıya alınmıştır (37 °C, 20 dk, 150 rpm). Enzimi inaktive etmek için, 20 ml aseton-etil alkol karışımı (1:1 hacim) çözeltiye eklenmiştir. Hidroliz tepkimesi sonucu zeytinyağından açığa çıkan yağ asitlerinin miktarı ~0.2 M NaOH ile fenolftalein indikatörüne karşı pH 10'a kadar titrasyon yapılarak belirlenmiştir. Aynı koşullarda şahit denemeler de yapılmıştır. Reaksiyon sonunda enzimin 1 dakikalık zaman içerisinde açığa çıkardığı yağ asitleri miktarı, µmol olarak, aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Uozaki vd. 1997):

Spesifik Aktivite (U/ml veya mg)( µmol /dak.ml veya mg)= (V<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>)\*C\*1000/20\*E

V<sub>1</sub> = Numune için sarf edilen NaOH hacmi (ml)

V<sub>2</sub> = Şahit için sarf edilen NaOH hacmi (ml)

C = NaOH konsantrasyonu ( mol/l )

E = Numunenin miktarı (ml veya mg)'dir.

Toplam aktivite (U:ünite), spesifik aktivitesi saptanan örneğin miktarı (ml veya mg) ile spesifik aktivite değerinin çarpılmasıyla hesaplanır. (Her aktivite ölçüm işlemi iki kez yapıp ortalama değer esas alınmıştır).

#### **4.2.7 (R,S)-1-feniletanolün kinetik rezolüsyonu**

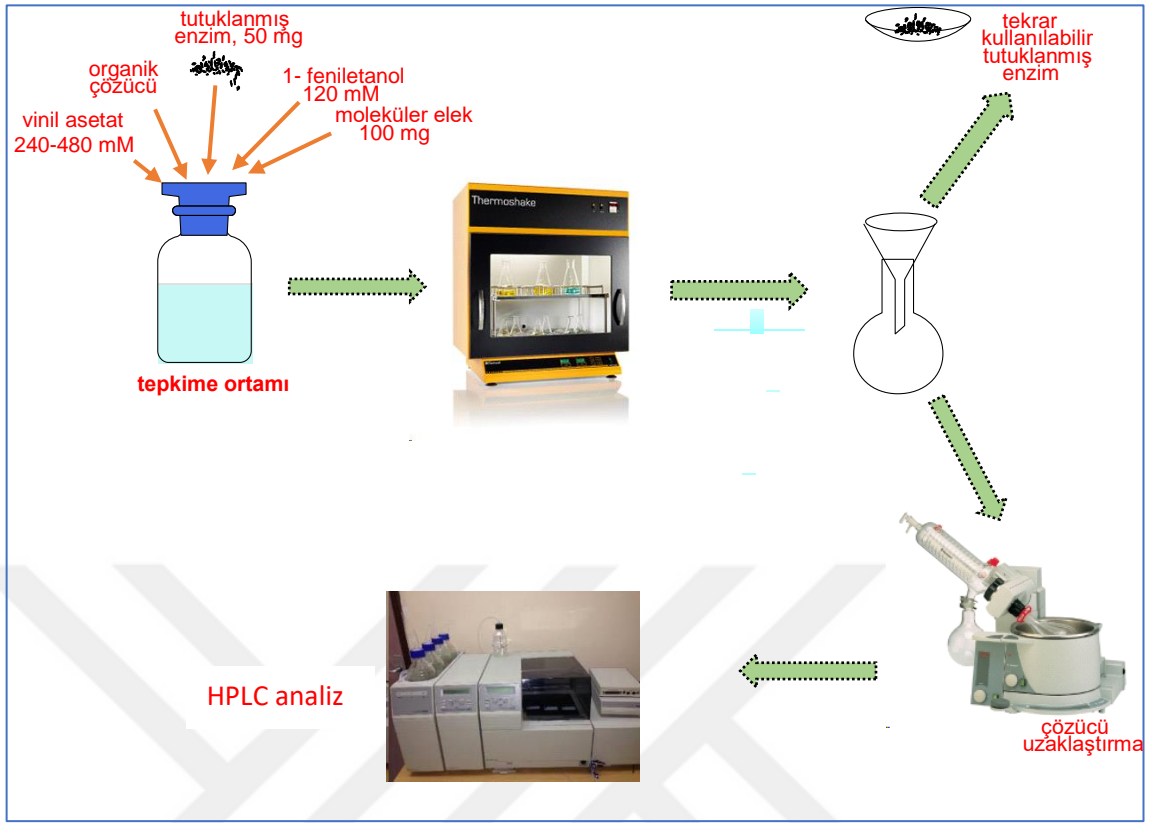
##### **4.2.7.1 (R,S)-1-feniletanolün tutuklanmış enzimler ile kinetik rezolüsyonu**

Rasemik 1-feniletanolün enantiyoseçimli esterleşme tepkimesinde enzim etkisini incelemek amacıyla biyokatalizör olarak *Candida antarctica* lipazı (Novazyme Cal-B, katı form) ve farklı tutuklanmış enzimler denenmiştir. Farklı lipazların katalizlediği tepkimeler toluen, hegzan ve heptan gibi organik çözücülerde gerçekleştirilmiştir.

Tepkimeler vida kapaklı şişelerde ve 3 ml hacimde gerçekleşmiştir. Açıl verici olarak kullanılan 240 mM ve 480 mM vinil asetat, organik çözücüde çözüldükten sonra tepkime ortamına 120 mM (R,S)-1-feniletanol ve 100 mg moleküler elek eklenmiştir. En son 50 mg enzim eklenerek tepkime başlatılmıştır. Tepkimeler 40 °C’de ve 150 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir. Genel olarak tüm tepkimeler yukarıda anlatıldığı gibi yapılmış fakat farklı biyokatalizörlerin tepkime koşulları aşağıda detaylandırılmıştır:

- Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ tutuklanmış enziminin biyokatalizör görevi yaptığı tepkimelerde 120 mM 1-feniletanol ve 480 mM vinil asetat kullanılmıştır. Organik çözücü olarak hegzanın seçildiği tepkimelerde 12, 15 ve 18 saat süre ile çalışılmıştır.
- GO-GA-Lİ tutuklanmış enzimin biyokatalizör olarak görev yaptığı tepkimeler hegzan ve heptan ortamında yapılmıştır. 120 mM 1-fenil etanol, 240 mM vinil asetat ile 6, 8 ve 10 saat sürelerde heptan içerisinde tepkimeye girmiştir. Hegzan içerisinde gerçekleşen tepkimede substrat:açıl verici oranı heptanda olduğu gibi 1:2 olarak seçilmiştir. 120 mM 1-fenil etanol, 240 mM vinil asetat ile 4, 6 ve 8 saat sürelerde hegzan içerisinde tepkimeye girmiştir.
- GO/ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ biyokatalizörünün katalizlediği tepkimeler 6 ve 8 saat sürmüş, tepkimelerde 120 mM 1-fenil etanol, 240 mM vinil asetat ile hegzan içerisinde tepkimeye girmiştir.
- Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ enzimi, organik çözücü olarak hegzanın kullanıldığı tepkimelerde görev yapmıştır. Substrat ve açıl verici oranı 1:2 olarak seçilmiş; 120 mM 1-fenil etanol, 240 mM vinil asetat ile hegzan içerisinde 12, 14 ve 16 saat tepkimeye girmiştir.
- GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ enzimi için toluen organik çözücü olarak seçilmiştir. Benzer şekilde substrat ve açıl verici oranı 1:2 olarak seçilmiş 9, 12, 15 ve 18 saat sürelerde tepkimeler yapılmıştır.

Tüm bu anlatılanlara ek olarak deney aşaması şekil 4.9’da özetlenmiştir.



Şekil 4.9 1-feniletanolün tutuklanmış enzimlerle kinetik rezolüsyonu

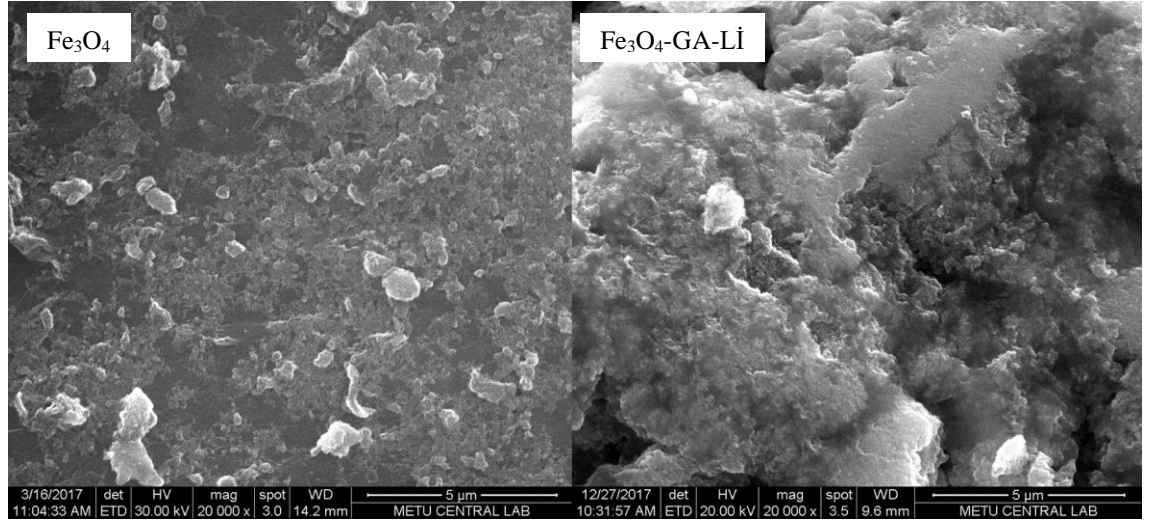
#### 4.2.7.2 Analiz yöntemi

Tepkime sonunda örnekler yüksek basınç sıvıkromatografisi ile analiz edilmiştir. Taşıyıcı faz olarak, hegzan/2-propanol (95/05), akış hızı 0.90 mL/dak, 10 µL enjeksiyon hacmi, 30 °C’de Chiralcell OB kolonu (4.6 mmx50 mm, Daicel Chemical Ind. Ltd. France) UV dedektör (254 nm) ile analizlenmiştir. Chiralcell OB kolonunda; (*R*)-1-feniletanol ve (*S*)-1-feniletanol farklı kalma sürelerinde kolonu terk etmektedir. Rasemik 1-feniletanol için kalibrasyon doğruları oluşturulmuştur (EK 1, Çizelge 1). Bu koşullarda gerçekleştirilen analize ait kromatogram EK 3’te verilmiştir.

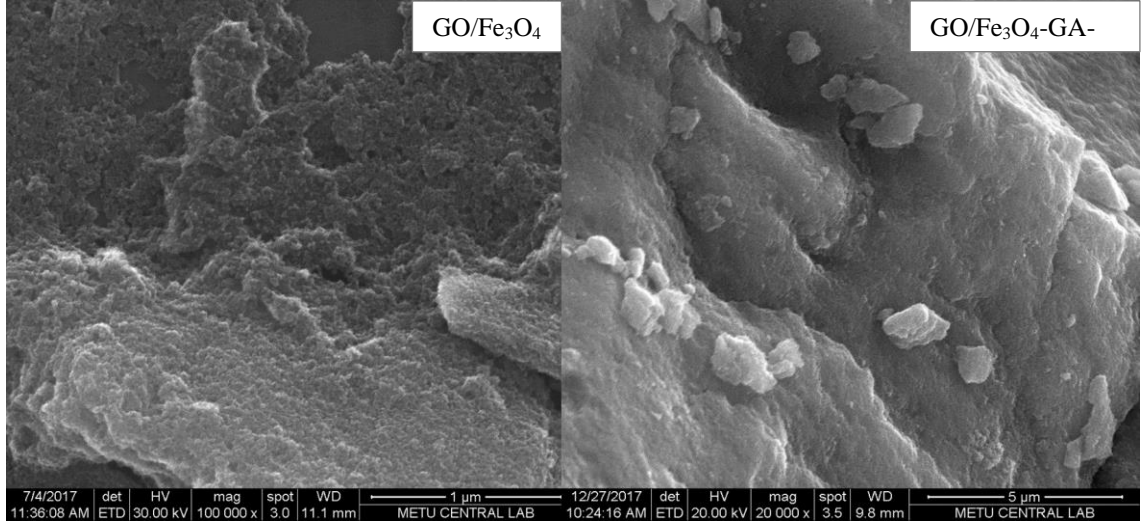
## 5. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tutuklanmış enzimlerin, endüstriyel olarak oldukça geniş uygulama alanları vardır. Çözünür formdaki enzime göre tekrar kullanılabilirlik, geri kazanım, işletim kolaylığı gibi birçok avantaja sahiptirler. Ayrıca tutuklama işlemi ile enzimler denatürasyona karşı daha kararlı bir yapıya sahip olurlar. Enzimin kazandığı bu kararlılığın ölçüsü enzimin üç boyutlu yapısına, tutuklama tekniğine ve taşıyıcı tipine bağlı olarak değişmektedir. Bu çalışmada tutuklama tekniklerinden kovalent bağlama metodu ile enzimlerin farklı tip taşıyıcılara tutuklanması gerçekleştirilmiştir. Çalışma temelde üç bölümden oluşmaktadır; birincisi lipazı tutuklamak için gerekli destek maddelerinin hazırlanması, ikincisi kovalent bağlama ile lipazın destek materyallerine tutuklanması ve son olarak tutuklanmış enzimin, 1-feniletanolün kinetik rezolüsyonunda biyokatalizör olarak kullanılmasıdır.

### 5.1 Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

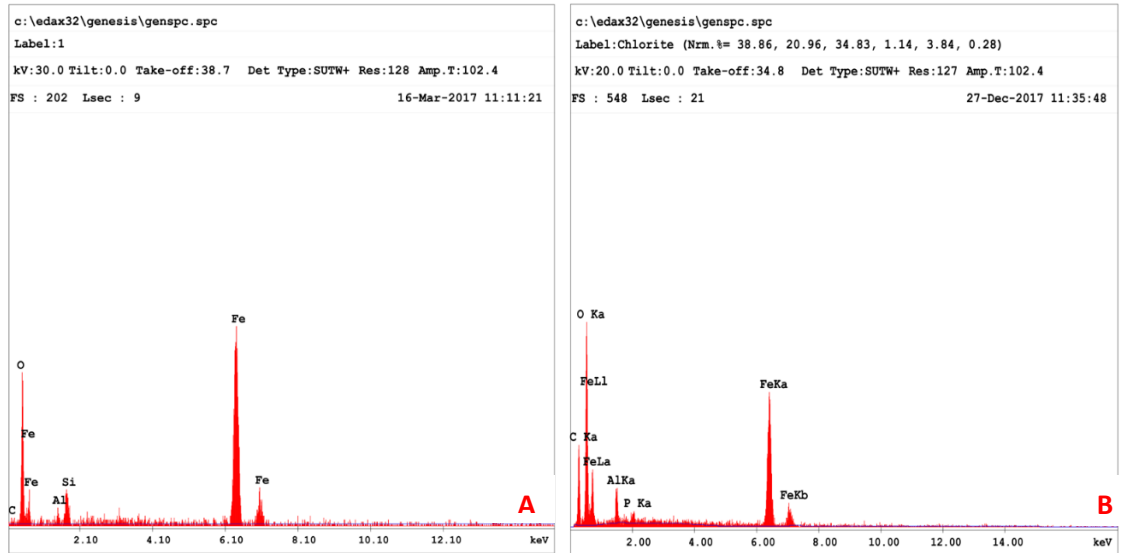


Şekil 5.1 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ enziminin SEM görüntüsü

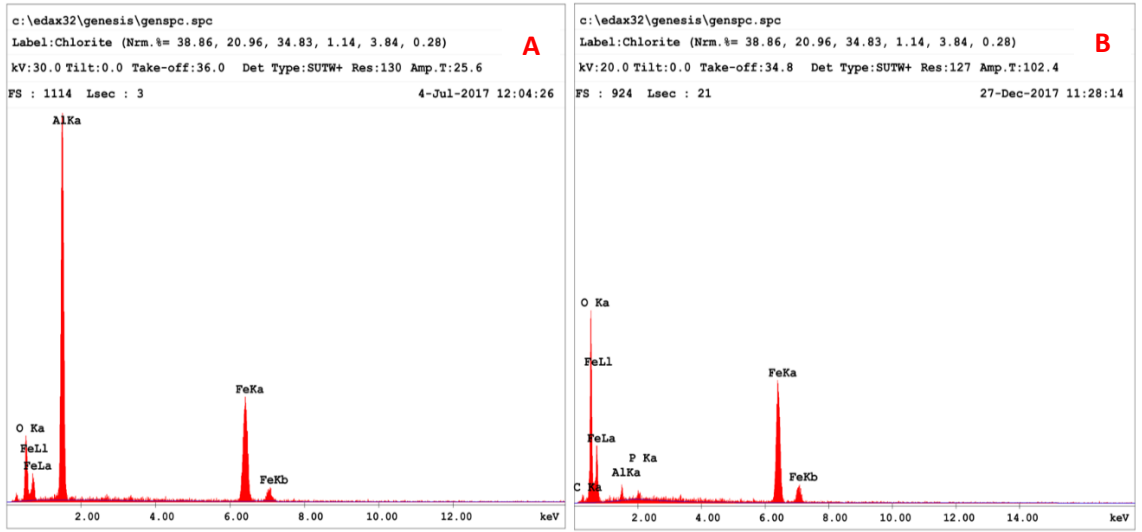


Şekil 5.2 GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ve GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ'nin SEM görüntüsü

Hazırlanan nanoparçacıkların ve tutuklanmış enzimlerin yüzey yapısını incelemek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analiz yapılmıştır. Demir oksit ve demir oksit/grafen oksit kompozitine ait görüntülerde, enzim bağlandıktan sonra daha düzensiz, pürüzlü bir yüzey ve proteinlerin bir küme oluşturduğu görülmektedir (Şekil 5.1,5.2). Ayrıca her iki tutuklanmış lipaza ait EDX spektrumlarında gözlenen P elementi lipazın bağlandığına dair bir kanıttır (Singh ve Mukhopadhyay 2014) (Şekil 5.3,5.4).



Şekil 5.3 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ enziminin EDX spektrumları, a. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, b. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ



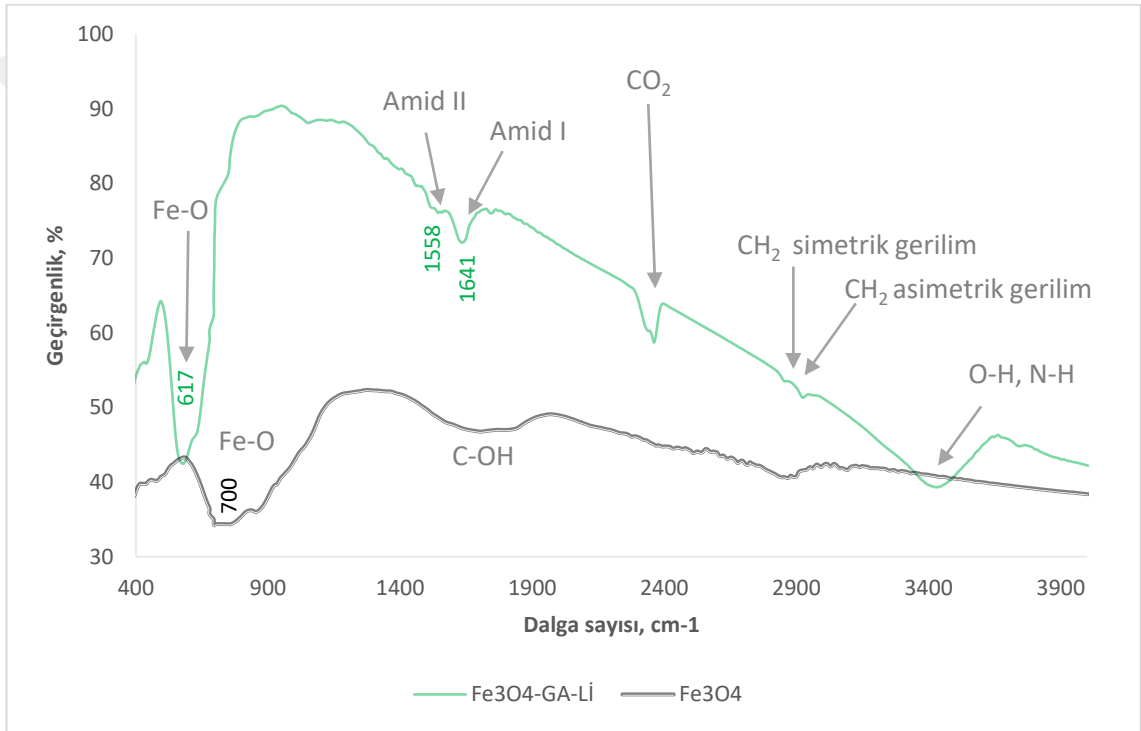
Şekil 5.4 GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ve GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ enziminin EDX spektrumları a. GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, b. GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ

## 5.2 FT-IR Analizi

Saf nanoparçacıklar ve enzim tutuklanmış formları için FT-IR spektrumları incelenerek enzimin bağlandığına dair kanıtlar elde edilmiştir. Literatüre göre, proteinlere özgü amid adı verilen 9 çeşit (amid A, B, I, II,...VII) band vardır. Bunlardan en önemli iki band amid I ( $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ ) ve amid II ( $1510-1570\text{ cm}^{-1}$ ) bandlarıdır. Katı ve sıvı formdaki saf Cal-B,  $\beta$ -agregat,  $\beta$ -şerit, düzensiz sıralanmış,  $\alpha$ -sarmal ve dönmeli yapısı göz önünde bulundurulduğunda sırasıyla  $1617$ ,  $1636$ ,  $1647$ ,  $1653$  ve  $1662-1669\text{ cm}^{-1}$  dalga sayılarında amid I bandını gösteren sinyaller vermektedir. Amid II bandı ise amid I bandına göre daha karmaşık olup, N-H eğilme (potansiyel enerjinin %40-60'ı) ve C-N (%18-40) ile C-C (~%10) gerilim titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Amid III bandı çok zayıf bir band olmakla birlikte  $1230-1350\text{ cm}^{-1}$  aralığında görülebilmektedir (Fanseco dos Reis vd. 2005). Ayrıca birincil amidler ( $\text{NH}_2$ )  $3350$  ve  $3180\text{ cm}^{-1}$  dalga boyları civarında iki bandkincil amidler ( $-\text{NH}$ ) ise  $3300\text{ cm}^{-1}$  civarında tek bir pik vermektedir (Mancilla 2015).

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>'in FT-IR spektrumunda (Şekil 5.5) gözlenen düşük dalga sayılarındaki ( $\leq 700\text{ cm}^{-1}$ ) bandlar demir oksitin Fe-O bandlarının titreşiminden kaynaklanmaktadır (Chiaradia vd. 2016). Lipazın bağlanmasıyla oluşan ve C=O gerilim titreşimlerinden

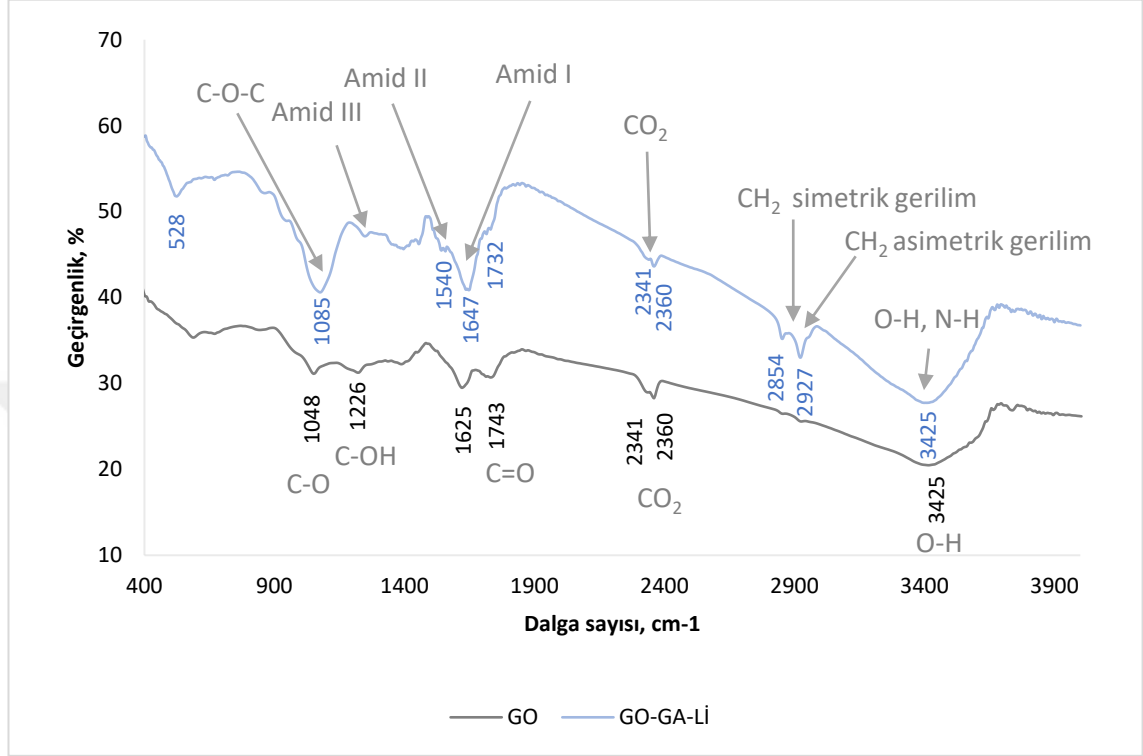
kaynaklanan amid I bandı  $1641\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısında görülmektedir.  $1570\text{-}1540\text{ cm}^{-1}$  civarında değişen sinyaller amino asitlerin  $\text{NH}^3$  grubunun simetrik eğilme ve C-N gerilim titreşiminden kaynaklanan amid II (N-H) bandını göstermektedir (Foresti vd. 2010).  $1558\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısındaki pik amid II bandının ve N-H bağının eğilim titreşimlerinin kanıtıdır. Ayrıca birincil aminler  $3400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ 'de pik vermektedirler. Bu sebeple  $3419\text{ cm}^{-1}$ 'deki geniş pik  $\text{NH}_2$ , O-H gerilimi ve hidrojen bağlarının birleşmiş pikidir. Bağlanmış propil grubunun varlığında C-H gerilme titreşimleri  $2924$  ve  $2893\text{ cm}^{-1}$ 'de görülmektedir.



Şekil 5.5 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>'ün saf ve enzim yüklü formunun FT-IR spektrumu

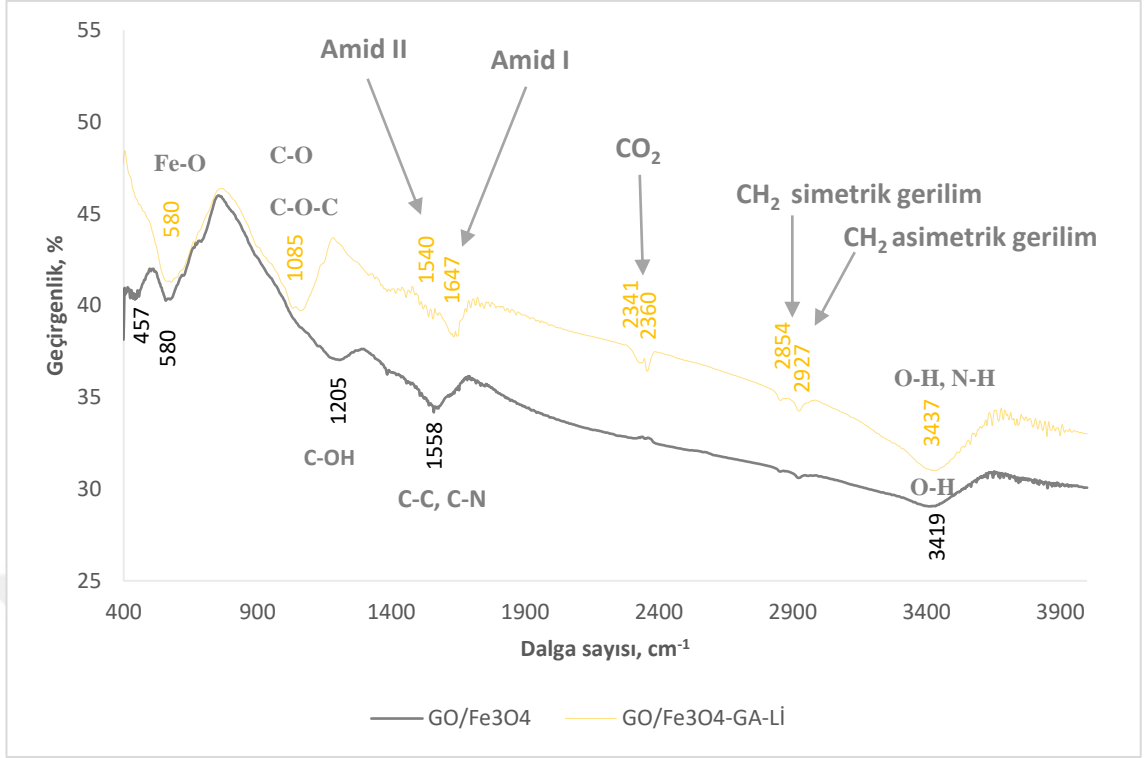
GO'nun karakteristik bandlarından olan ve enzimli, enzimsiz her iki formunda da gözlenen  $3425\text{ cm}^{-1}$  dalga boyundaki geniş ve yoğun pik C-OH gruplarının O-H gerilim titreşimini göstermektedir. GO'nun her iki formunda görülen, karbonil ve karboksilik asitlerin C=O gerilim titreşimini gösteren pik  $1743\text{ cm}^{-1}$  dalga boyunda ortaya çıkarken enzimin bağlanmasıyla  $1732\text{ cm}^{-1}$ 'e kaymıştır. GO'nun saf formunda ortaya çıkan  $1625\text{ cm}^{-1}$  dalga boyundaki pik oksitlenmemiş grafit veya adsorblanmış suyu,  $1048\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik C-O gerilim titreşimlerini ve  $1226\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik ise C-OH gerilim titreşimlerini

temsil etmektedir (Tolasz vd. 2014). Lipazın bağlandığına kanıt olan amid I ve amid II bandaları sırasıyla 1647 ve 1540  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülmektedir (Şekil 5.6).



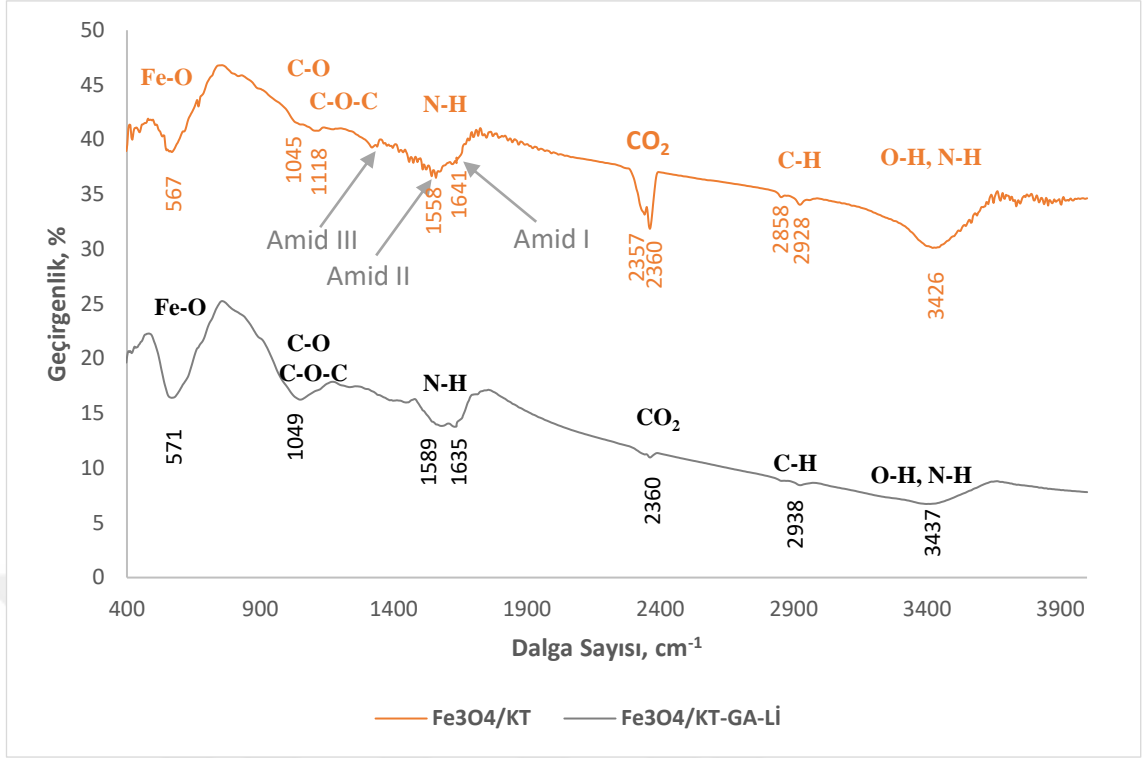
Şekil 5.6 GO'nun saf ve enzim yüklü halinin FT-IR spektrumu

GO/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 'ün her iki formunda gözlenen Fe-O piki ( $580 \text{ cm}^{-1}$ ), demir oksitin grafen oksite bağlandığına kanıttır. GO'nun karakteristik bandlarından olan ve  $3419 \text{ cm}^{-1}$  dalga boyunda gözlenen pik C-OH gruplarının O-H gerilim titreşimini göstermektedir. Enzimin bağlanmasıyla  $\text{NH}_2$ , O-H gerilimi ve hidrojen bağları birleşmiş ve bu pik daha belirgin hale gelerek  $3437 \text{ cm}^{-1}$ 'e kaymıştır. Ayrıca, lipazın bağlandığına kanıt olan amid I ve amid II bandaları sırasıyla  $1647$  ve  $1540 \text{ cm}^{-1}$ 'de görülmektedir (Şekil 5.7).

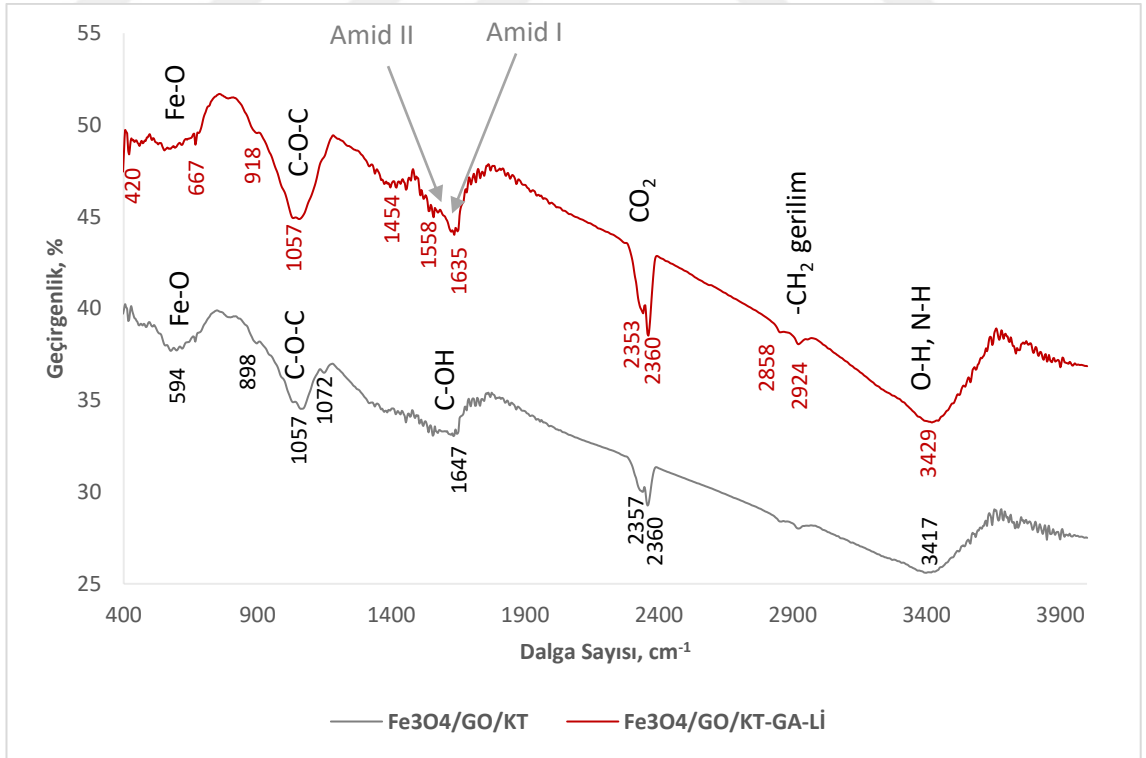


Şekil 5.7 GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>'ün saf ve enzim yüklü halinin FT-IR spektrumu

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT'nin enzim yüklü ve saf formunun FT-IR spektrumunda, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>'ün Fe-O bandı 567 ve 571 cm<sup>-1</sup>'de görülmektedir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT'nin iki formunda görülen kitosan için karakteristik O-H gerilim ve N-H gerilim titreşimleri, saf Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT için 3437 cm<sup>-1</sup> dalga boyunda ortaya çıkarken, enzimin bağlanmasıyla daha belirgin hale gelmiş ve aynı pik 3426 cm<sup>-1</sup>'e kaymıştır. Kitosana özgü diğer karakteristik gruplar olan C-H gerilim titreşimleri 2938 cm<sup>-1</sup>'de, C-O-C bağı titreşim gerilimi 1100 cm<sup>-1</sup>'de, C-O bağı titreşim gerilimi 1049 cm<sup>-1</sup>'de görülmektedir. Bu ortak pikler bir miktar kayma ile manyetik kitosanın enzim bağlı formunda da ortaya çıkmıştır (Lopez vd. 2013). Kitosana özgü diğer karakteristik bandlar ise lipazlarda olduğu gibi amid bandlarıdır. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT'nin enzimsiz formundaki amid I (C=O gerilme) ve amid II (N-H eğilme) bandları sırasıyla 1635 ve 1589 cm<sup>-1</sup>'de görülürken, aynı pikler enzim bağlandıktan sonra 1641 ve 1558 cm<sup>-1</sup>'e kaymıştır. Ayrıca amid III bandı olan zayıf band 1338 cm<sup>-1</sup>'de görülmektedir (Şekil 5.8).



Şekil 5.8 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT'nin saf ve enzim yüklü halinin FT-IR spektrumu



Şekil 5.9 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GO/KT'nin saf ve enzim yüklü halinin FT-IR spektrum

$Fe_3O_4/GO/KT$  ile  $Fe_3O_4/KT$ 'nin FT-IR spektrumu birbirine benzemektedir. Lipazın bağlandığına kanıt olan amid I ve amid II bandları  $1635$  ve  $1558\text{ cm}^{-1}$ 'de görülmektedir. GO'nun bağlanmasıyla ortaya çıkan C-O titreşimleri, lipaz tutuklandıktan sonra daha belirgin hale gelmiştir ( $1057\text{ cm}^{-1}$ ). Birincil aminler  $3400-3500\text{ cm}^{-1}$ 'de pik vermektedirler. Bu sebeple  $3417-3429\text{ cm}^{-1}$ 'deki geniş pik  $NH_2$ , O-H gerilimi ve hidrojen bağlarının birleşmesiyle oluşmuştur (Şekil 5.9).

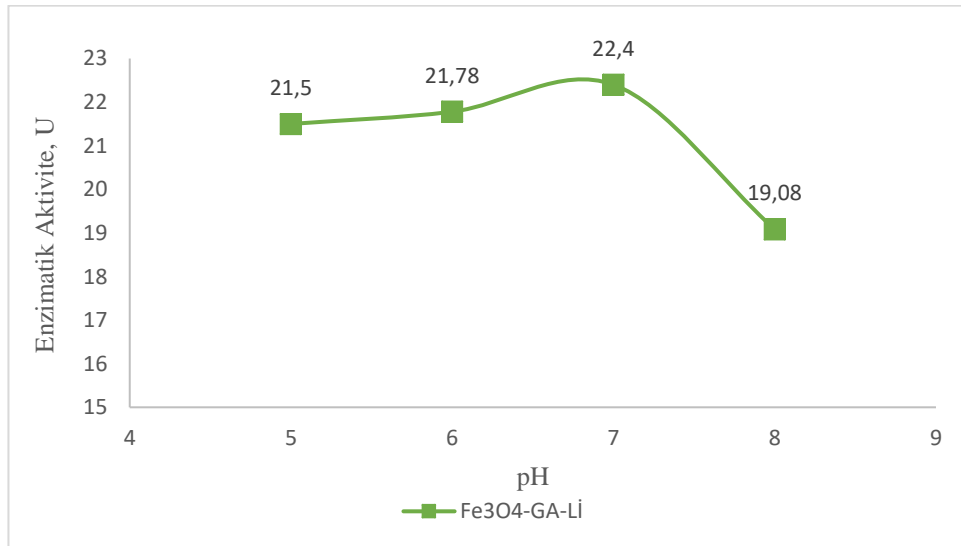
### 5.3 pH'ın Serbest ve Tutuklanmış Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

pH sulu çözeltilerde enzimatik aktiviteyi değiştiren en önemli faktörlerden biridir. Enzimin tutuklanmasıyla pH değişir ve bu nedenle enzimin konformasyonu da değişikliğe uğrar. Genellikle tutuklanmış lipazların pH profilleri serbest enziminkine göre daha geniş bir aralığa sahiptir ve böylece enzim aktivitesi geniş bir pH aralığında korunmaktadır. Çalışılan pH aralığında serbest lipazın uygun pH'ı 6 ve bu değerde enzimatik aktivitesi 35 U bulunmuştur. Çalışmada tutuklanmış lipazlardan bazılarının [ $(Fe_3O_4-GA-LI)=(Fe_3O_4$ 'ün glutaraldehit ile aktive edilmesiyle tutuklanmış lipaz),  $(GO-GA-LI)=(GO$ 'nun glutaraldehit ile aktive edilmesiyle tutuklanmış lipaz) ve  $(Fe_3O_4/GO-GA-LI)=(Fe_3O_4/GO$ 'nun glutaraldehit ile aktive edilmesiyle tutuklanmış lipaz)] aktivite üzerine etkisini incelemek için nanoparçacıklar öncelikle 250 mM GA ile 4 saat aktifleştirilmiş ve sonrasında 12 saat serbest Cal-B ile farklı pH larda (pH 5-8) tutuklama işlemine tabi tutulmuştur. Nanoparçacıkları aktifleme ve enzim tutuklama işlemi orbital çalkalayıcıda 150 rpm ve  $30\text{ }^\circ\text{C}$ ' de gerçekleştirilmiştir.

$Fe_3O_4-GA-LI$  tutuklanmış enzimin pH değişimine bakıldığında, uygun pH'ı 7 ve enzimatik aktivitesi 22.4 U'dur. Tutuklanmış enzimin pH'ının 7 olması, kovalent bağlama süresince enzimde önemli ölçüde konformasyonel değişikliklerin olmadığını ya da destek materyalinin asidik ya da bazik karakterli olmadığını göstermektedir. En uygun pH değerinde serbest enzimin sadece %68'i kazanılabilmektedir. Şekil 5.11'e bakıldığında ise GO üzerine tutuklanmış enzimin pH'nın serbest enziminkine eşit olduğu görülmektedir. Her ikisinde de en uygun pH 6 ve tutuklanmış enzim aktivitesi 25.12 U'dur. Serbest enzimin %72'si kazanılabilmektedir. Şekil 5.12'de  $GO/Fe_3O_4$  kompozitine tutuklanmış enzimin değişen pH'a göre enzim aktivitesi görülmektedir. Bu

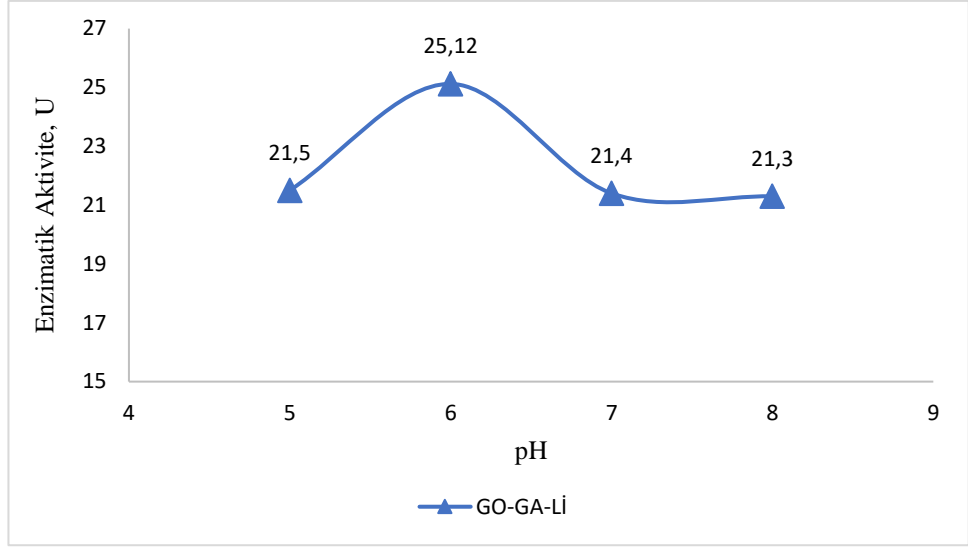
durumda ise uygun pH'ta enzim aktivitesi 24.5 U ve kazanılan aktivite %72'dir. GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> kompozitinde pH'ın 8 olması, uygun pH değerinin bir miktar alkali bölge civarına kaydığını göstermektedir. Bu kayma, matrisin yükü ve yapısına bağlı olmasının yanında tutuklama metoduna da bağlıdır. Desteğin imino fonksiyonlaştırılmış yüzeyinin temeli bu sonuca bağlı olabilir. Destek maddesinin yüzeyindeki imino grupları esas çözelti ve yüzey arasındaki hidrojen bağlarının düzenli yayılmasını önlemektedir (Yadav ve Jadhav 2005, Wang vd. 2006).

Chiaradia vd. (2016) manyetik poli(üre-üretan) nanoparçacıkları (manyetik PUU nanoparçacıkları) üretmişler ve bu parçacıkları *Candida antartica* lipazının tutuklanmasında destek materyali olarak kullanmışlardır. Tutuklanmış ve serbest enzimin pH kararlılığını ölçmek için, enzimler fosfat tamponu içerisinde (pH 4, 7 ve 10), 30 °C'de, 6 saat termal çalkalayıcıda (150 rpm) inkübe edilmiştir. Tepkime sonunda tutuklanmış enzimlerin kalan aktiviteleri hesaplanmış ve pH 4, 7 ve 10'da sırasıyla % 81, 76 ve 69 bulunmuştur. Serbest enzimin ise sırasıyla kalan aktivitesi %100, 100 ve 63 bulunmuştur. Tutuklanmış enzimin uygun pH'ının 4 olduğu ve yüksek pH'a (pH 10) tutuklanmış enzimin serbest enzime göre daha dirençli olduğu tespit edilmiştir.

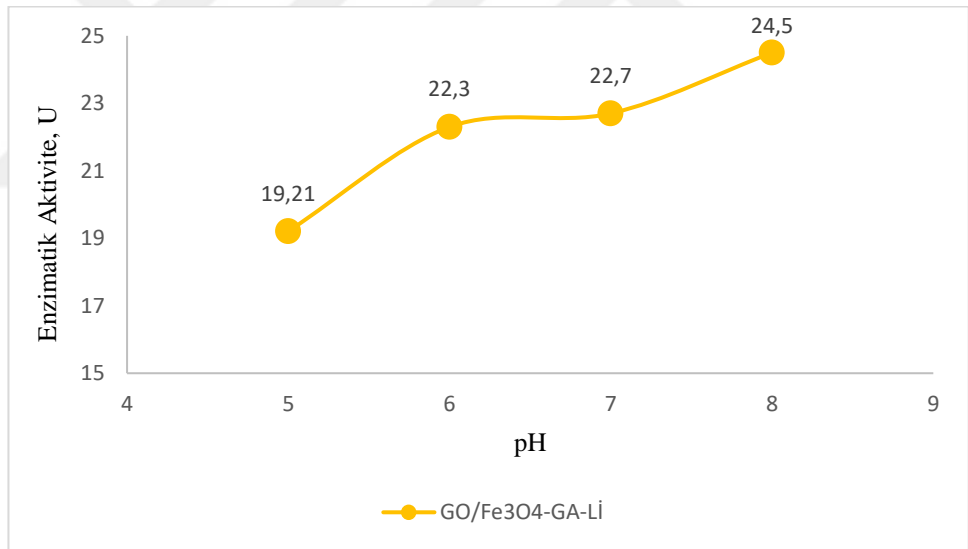


Şekil 5.10 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ tutuklanmış enzim aktivitesi üzerine pH etkisi

(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>=15 mg, GA=250 mM, Cal-B=1 ml, Fosfat t.=50 mM, t=12 saat, T=30 °C ve N=150 rpm)



Şekil 5.11 GO-GA-Lİ tutuklanmış enzim aktivitesi üzerine pH etkisi  
(GO=20 mg, GA=250 mM, Cal-B=1 ml, Fosfat t.=50 mM, t=12 saat, T=30 °C ve N=150 rpm)



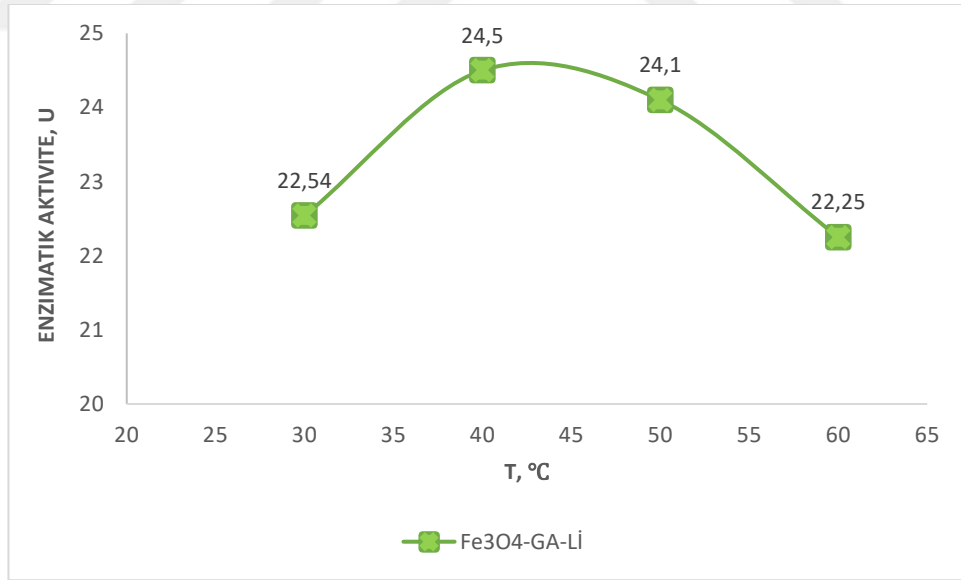
Şekil 5.12 GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ tutuklanmış enzim aktivitesi üzerine pH etkisi  
(GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>=20 mg, GA=250 mM, Cal-B=1 ml, Fosfat t.=50 mM, t=12 saat, T=30 °C ve N=150 rpm)

#### 5.4 Sıcaklığın Serbest ve Tutuklanmış Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

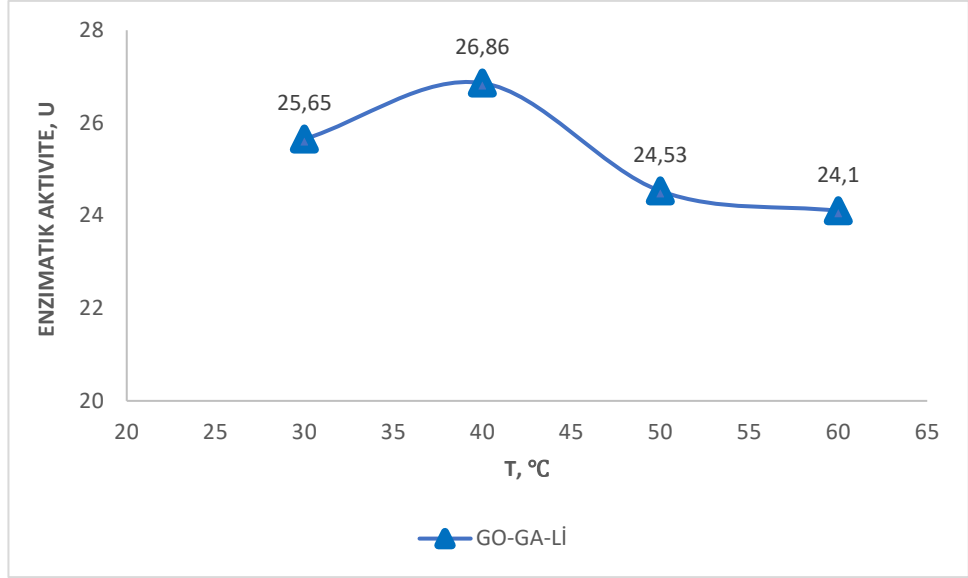
(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ), (GO-GA-Lİ) ve (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GO-GA-Lİ) tutuklanmış lipazların termal kararlılığını incelemek için nanoparçacıklar öncelikle 250 mM GA ile 4 saat aktifleştirilmiş; sonrasında 30-60 °C sıcaklıklarda ve pH 7'de 12 saat boyunca serbest

Cal-B ile tutuklama işlemine tabi tutulmuştur. Nanoparçacıkları aktifleme ve enzim tutuklama işlemi orbital çalkalayıcıda 150 rpm de gerçekleştirilmiştir.

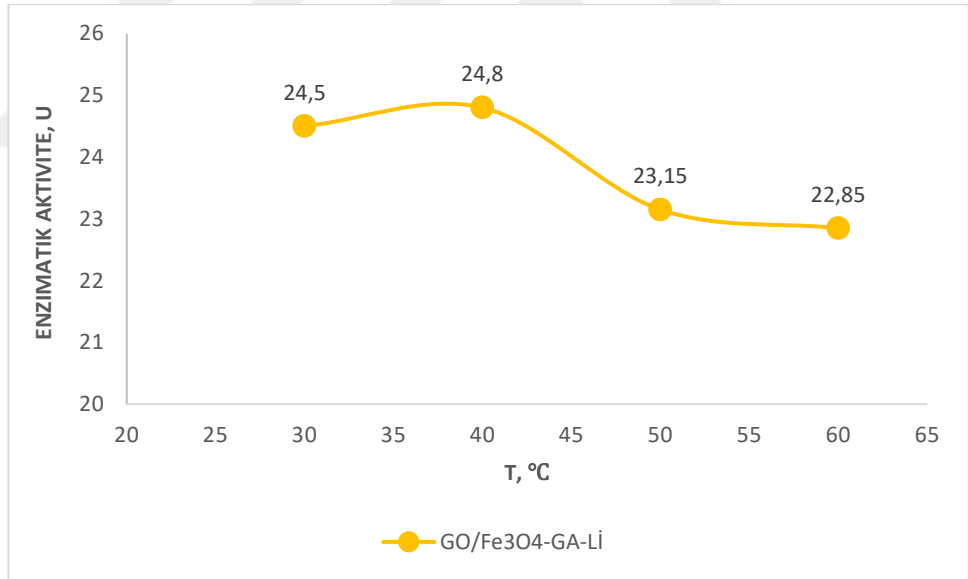
Çalışılan sıcaklık aralığında serbest Cal-B lipazının uygun sıcaklık değeri 30 °C iken, farklı destek materyallerine tutuklanmış enzimlerin üçününde ((Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ), (GO-GA-Lİ) ve (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GO-GA-Lİ)) sıcaklıkları 40 °C bulunmuştur. Tutuklanmış enzimlerin (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ, GO-GA-Lİ ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GO-GA-Lİ) 40 °C'de aktiviteleri sırasıyla 24.5, 26.86 ve 24.8 ünedir; relatif aktiviteleri ise sırasıyla %74.2, %81.4 ve %75.15'tir (Şekil 5.13-5.15). Enzim ve destek materyalleri arasında oluşan kovalent bağlanma sırasında moleküllerin konformasyonel hareketliliği sınırlı olduğu için, değişik deaktivasyon güçlerine karşı stabilitede artış gözlenmektedir (Arıca ve Bayramoğlu 2004, Phadtare vd. 2004). Yüksek sıcaklıklarda serbest lipazlar kolaylıkla denatürasyona uğrarken tutuklanmış lipazlar rijit konformasyonlarından dolayı katalitik aktivitelerini korumaya devam ederler. Bu sebeple, tutuklanmış enzimler daha yüksek sıcaklıklarda katalitik aktive göstermektedirler (Ye vd. 2005).



Şekil 5.13 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ tutuklanmış enzim aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>=15 mg, GA=250 mM, Cal-B=1 ml, Fosfat t.=50 mM, pH=7 t=12 saat ve N=150 rpm)



Şekil 5.14 GO-GA-Lİ tutuklanmış enzim aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi (GO=20 mg, GA=250 mM, Cal-B=1 ml, Fosfat t.=50 mM, pH=7 t=12 saat ve N=150 rpm)

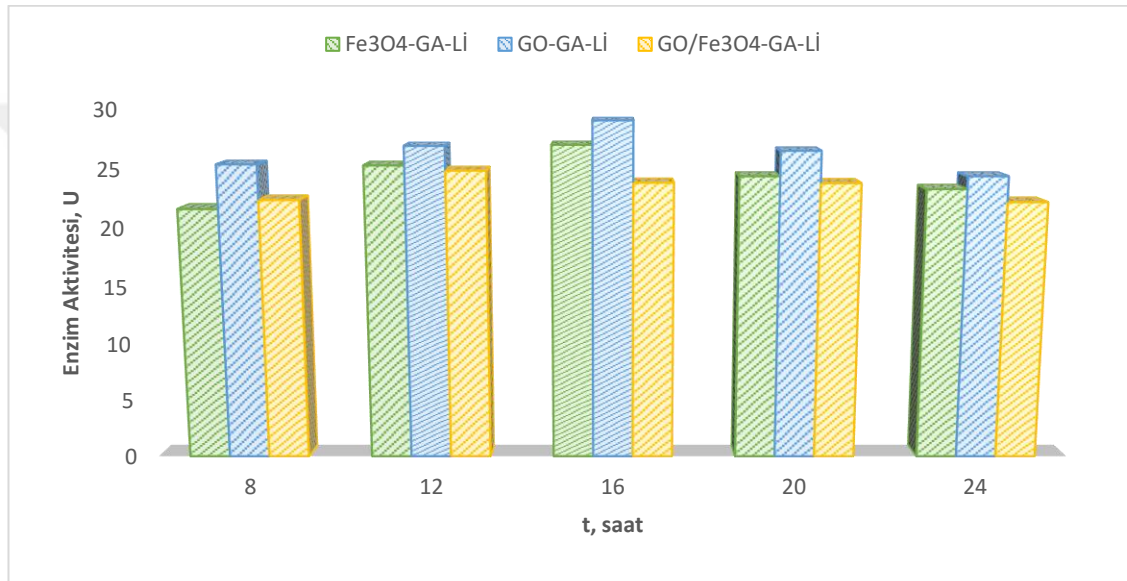


Şekil 5.15 GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ tutuklanmış enzim aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi (GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>=20 mg, GA=250 mM, Cal-B=1 ml, Fosfat t.=50 mM, pH=7, t=12 saat, N=150 rpm)

Chiaradia vd. (2016) manyetik poli(üre-üretan) nanoparçacıklar (manyetik PUU nanoparçacıkları) üzerine *Candida antartica* lipazını kovalent bağlama yöntemi ile tutuklamışlardır. Serbest ve tutuklanmış enzimin termal kararlılığını ölçmek için, enzimler fosfat tamponu içerisinde 40, 60 ve 80 °C sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. 6

saatlik tepkime sonunda, 40, 60 ve 80 °C sıcaklıklarda tutuklanmış enzimlerin kalan aktiviteleri sırasıyla % 95, 100 ve 100 bulunmuştur. Serbest enzimin ise aynı sıcaklıklarda kalan aktiviteleri sırasıyla % 100, 84 ve 98 bulunmuştur. Sıcaklığın artması ile tutuklanmış enzimde aktivite kaybının olmadığı, serbest enzimin ise yüksek sıcaklıkta aktivite kaybettiği tespit edilmiştir.

### 5.5 Tutuklama Süresinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi



Şekil 5.16 Tutuklama süresinin aktiviteye etkisi

(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>=15 mg, GA=250 mM, Cal-B=1 ml, Fosfat t.=50 mM, pH=7, T=40 °C ve N=150 rpm)

(GO=20 mg, GA=250 mM, Cal-B=1 ml, Fosfat t.=50 mM, pH=6, T=40°C ve N=150 rpm)

(GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>=15 mg, GA=250 mM, Cal-B=1 ml, Fosfat t.=50 mM, pH=8, T=40 °C ve N=150 rpm)

Nanoparçacıkların çapraz bağlayıcılar ile aktive edilmesinden sonra, aktif nanoparçacıkların belli bir süre enzim ile etkileşime geçmesiyle aralarında kovalent bir bağ oluşur. Bu bağın oluşması için uzunca bir süre geçmesi gerekir. Üç farklı aktif destek materyali (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA, GO-GA, GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA) serbest lipaz ile 8-24 saat aralığında kovalent bağlanma için tepkimeye girmiş ve tutuklanma süresinin aktiviteye etkisi Şekil 5.16'da gösterilmiştir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ enzimine bakıldığında uygun tutuklanma süresi 16 saattir ve bu sürede enzim aktivitesi 26.95 U'dur. 16 saatten sonra enzim aktivitesinde azalma görülmüştür. GO-GA-Lİ enziminde ise on ikinci ve on

altıncı saatlerde sırasıyla aktivite 26.86 ve 28.98 U olarak bulunmuştur. Bu durumda enzimin belli bir süreden sonra daha fazla bağlanamadığı görülmektedir. Daha uzun sürelerde ise enzim aktivitesi düşmüştür. GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ enzimi en yüksek aktiviteyi (24,8 U) 12 saatte göstermiştir. GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanokompozitinin tepkimeyi hızlandırdığı söylenebilir. Her üç durumda da serbest enzimin % 100'ü kazanılamamıştır. Süre ne kadar uzun tutulursa tutulsun enzimin belli bir kısmı bağlanamayıp sıvıda kalmış ve serbest enzimin sadece % 75-80'i kazanılabilmektedir.

### 5.6 Aktifleyici Madde Derişiminin Enzim Aktivitesine Etkisi

Kovalent bağlama ile enzim tutuklama iki basamaktan oluşmaktadır. Birinci basamakta destek materyalleri çapraz bağlayıcılar ve çeşitli katkı maddeleri (yüzey aktif maddeler, metal iyonları vb.) ile aktive edilir, ikinci basamakta ise enzim aktifleşmiş destek materyallerine tutuklanır. Enzim aktivitesi tutuklama yöntemine, taşıyıcı tipine ve ortam koşullarına bağlı olduğu kadar, çapraz bağlayıcı tipine ve derişiminde bağlıdır. Bu çalışmada glutaraldehit ve epiklorohidrin olmak üzere iki tür çapraz bağlayıcı ile çalışılmış ve aktivite üzerine etkileri incelenmiştir. Derişimi 150-300 mM arasında değişen çapraz bağlayıcılar ile nanoparçacıklar 4 saat, 30 °C'de aktive edilmiş ve enzim aktivitesine etkileri şekil 5.17-5.19'da gösterilmiştir.

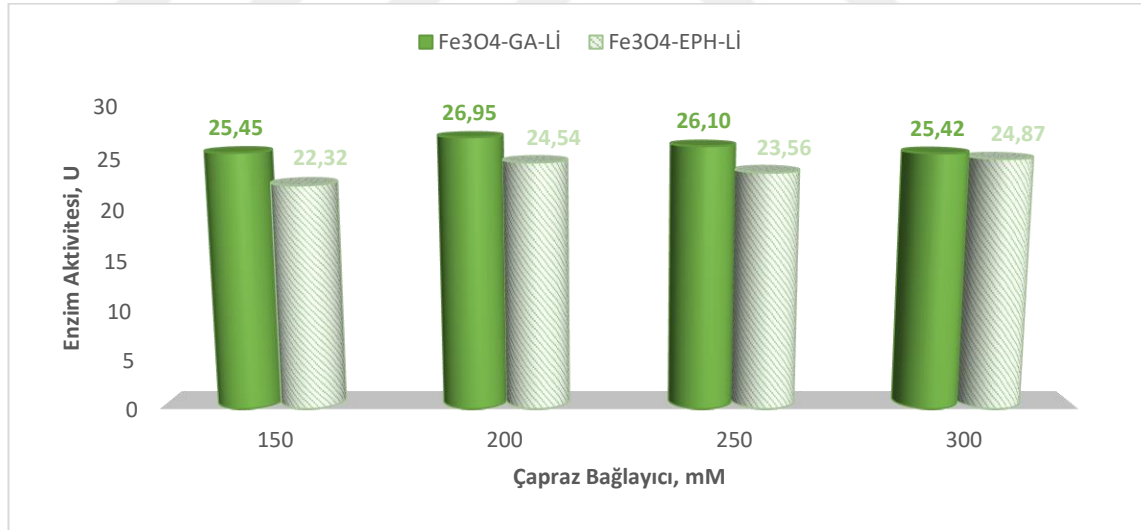
Şekil 5.17'de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıkların GA ve EPH ile aktiflenmesi sonucunda değişen enzim aktivitesi görülmektedir. GA ile aktive edilen nanoparçacıklara tutuklanan enzimlerin aktivitesine baktığımızda 150 mM GA derişiminden sonra aktivitede yavaş bir artış görülmüştür. 26.95 U (relatif aktivite=%78) olan en yüksek aktivite ise 200 mM GA derişiminde elde edilmiştir. EPH ile aktive edilmiş enzimlere bakıldığında yine 300 mM derişimde en yüksek aktivite 24.87 U (relatif aktivite=%71) bulunmuştur.

Şekil 5.18'de GO-GA-Lİ ve GO-EPH-Lİ tutuklanmış enzimlerin aktivite derişimi görülmektedir. GA ile aktifleme işlemi sonucuna bakıldığında, tutuklanmış enzimin aktivitesi artan GA derişimi ile artmakta ve 250 mM GA derişiminden sonra aktivite azalmaktadır. En yüksek aktivite 28.98 U (relatif aktivite=%82.8) olmak üzere 250 mM GA ile elde edilmiştir. Aynı şekil üzerinde EPH derişimi etkisi incelendiğinde, artan

EPH derişimi ile tutuklanmış enzim aktivitesinin de arttığı görülmüştür. 250 mM EPH kullanılarak aktive edilmiş nanoparçacıklara tutuklanmış enzimlerin aktivitesi 26.86 U (relatif aktivite=%76.7) bulunmuştur.

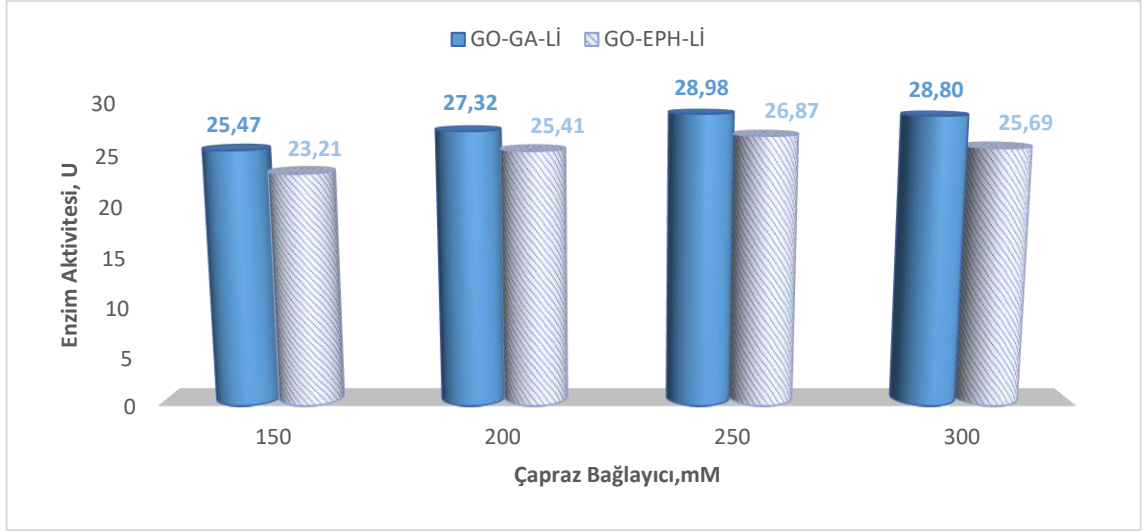
Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GO nanokompoziti GA ile aktive edildiğinde tutuklanmış enzimin aktivite değeri 200 mM'a kadar artmış daha sonra azalmıştır. 200 mM'da en yüksek aktivite 25.47 U'dur. EPH derişimi incelendiğinde ise 200-250 mM derişimde aktiviteler birbirine oldukça yakındır. 250 mM derişim sonrası aktivite azalmış, 23.69 üniteden 22.10'a düşmüştür (Şekil 5.19).

Şekiller incelendiğinde üç farklı destek materyalinde de genel olarak 250 mM GA ve 200 mM EPH derişimi en iyi sonuçları vermiştir. Belli bir çapraz bağlayıcı miktarına kadar derişim artmış, sonrasında muhtemelen fazla aktifleyici enzimin tersiyer yapısını değiştirerek denatürasyona sebep olmuştur (Panek vd. 2013).



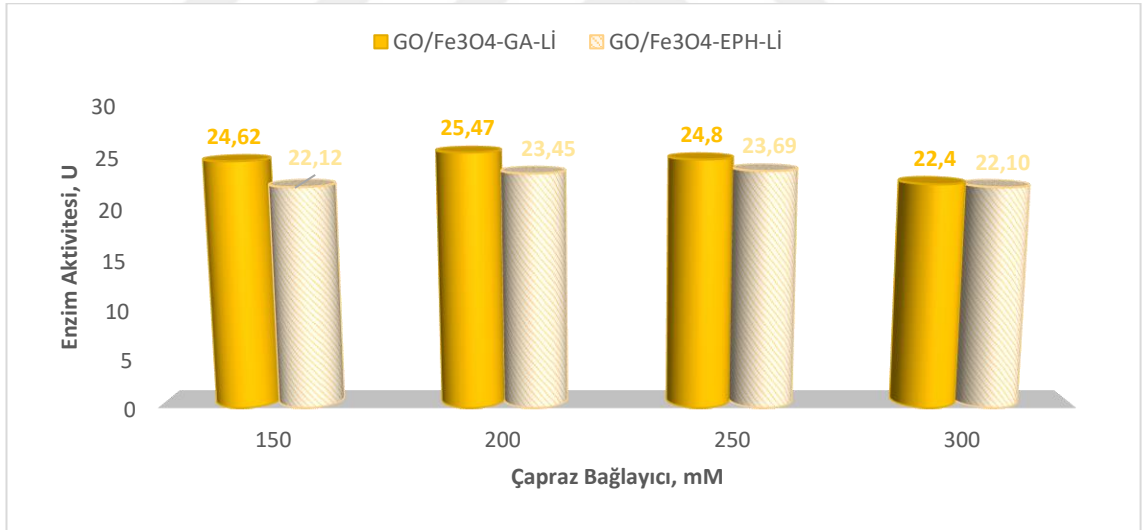
Şekil 5.17 Glutaraldehit ve epiklorohidrin derişiminin Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-EPH-Lİ tutuklanmış enzim aktivitelerine etkisi

(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>=15 mg, GA=150-300 mM, EPH=150-300 mM, Fosfat tamponu=50 mM, pH=7, Cal-B=1 ml, T=40 °C, t<sub>aktivasyon</sub>=4saat, t<sub>tutuklama</sub>=16 saat ve N=150 rpm)



Şekil 5.18 Glutaraldehit ve epiklorohidrin derişiminin GO-GA-Lİ ve GO-EPH-Lİ tutuklanmış enzim aktivitelerine etkisi

(GO=20 mg, GA=150-300 mM, EPH=150-300 mM, Fosfat tamponu=50 mM, pH=6, Cal-B=1 ml, T=40 °C, t<sub>aktivasyon</sub>=4saat, t<sub>tutuklama</sub>=16 saat ve N=150 rpm)



Şekil 5.19 Glutaraldehit ve epiklorohidrin derişiminin GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ ve GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-EPH-Lİ tutuklanmış enzim aktivitelerine etkisi

(GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>=15 mg, , GA=150-300 mM, EPH=150-300 mM, Fosfat tamponu=50 mM, pH=8, Cal-B=1 ml, T=40 °C, t<sub>aktivasyon</sub>=4 saat, t<sub>tutuklama</sub>=12 saat ve N=150 rpm)

Rehman vd. (2016) yaptıkları çalışmada, *Pencillium notatum* lipzını GA ile tutuklayarak çapraz bağlı agregatlar oluşturmuşlardır. Bu çalışmada 50-300 mM arasında değişen GA kullanılmış, 200 mM derişimde en yüksek aktiviteye ulaşılmış ve

200 mM'dan sonra aktivite azalmaya başlamıştır. Derişimin artması ile aşırı çapraz bağlanma görülmüş ve enzimin esnek yapısını kaybetmesine sebep olarak aktiviteyi düşürmüştür. Ya da istenmeyen çapraz bağlanmalar güçlü bir difüzyon kısıtlamasına sebep olarak aktivitenin azalmasına neden olmuştur (Rehman vd. 2016).

Üç ayrı destek materyalinde GA ile aktive edilmiş nanoparçacıklara tutuklanmış enzimler, EPH ile aktive edilmiş olanlara göre daha yüksek bir aktivite sergilemiştir. Bu durumda her iki aktive edici madde farklı kimyasal modifikasyona sebep olmuştur. GA ile kovalent bağlama sıkça kullanılan bir enzim tutuklama metodudur. Nötr pH ortamında GA proteinlerin birden fazla fonksiyonel grubu ile tepkimeye girmektedir. Destek materyali üzerindeki amino fonksiyonel grupları GA ile aldehit gruplarına transfer edilmiş ve lipazın amin grubuna bağlanmıştır. GA'nın daha yüksek bir aktivite göstermesi muhtemelen GA yapısındaki aldehitlerin önce destek yüzeyine bağlanması ve daha sonra kalan aldehit gruplarının enzimin  $-NH_2$  grubuna bağlanarak sağlam bir yapı oluşturması olarak açıklanabilir (Zhu vd. 2015).

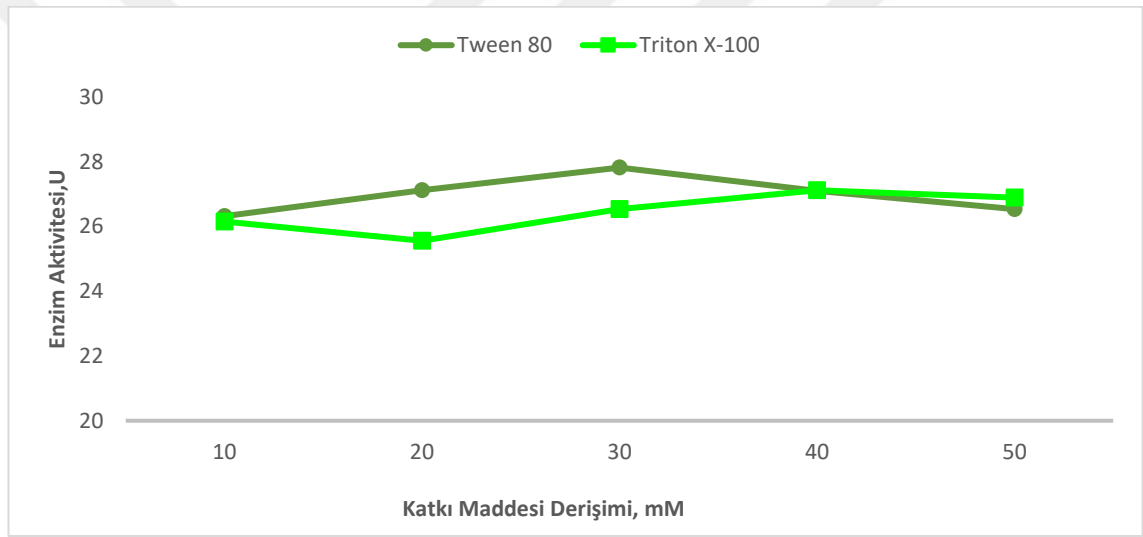
### **5.7 Katkı Maddelerinin Enzim Aktivitesine Etkisi**

Son zamanlarda, enzim tutuklama yöntemlerinde enzimin aktif merkezini korumak için ortama çeşitli katkı maddeleri eklenmektedir. Adsorpsiyon veya çapraz bağlama metodlarında tutuklama ortamına direkt olarak eklenen katkı maddeleri, kovalent bağlama yönteminde tutuklama ortamına değil, destek materyalinin aktivasyonu sırasında tepkimeye eklenmektedir. Metal iyonları, ligandlar, yağ asitleri ve yüzey aktif maddeler sıkça kullanılan katkı maddeleridir.

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (anyonik), Tween 80, Tween 20 ve Triton X-100 (noniyonik) katkı maddelerinden en çok kullanılanlardır. Farklı yüzey aktif maddeleri aynı koşullarda farklı enzim aktivitesi göstermektedir. İki lipaz molekülünün açık formu arasındaki etkileşim sonucu lipaz homo- veya heterodimerleri oluşur. Yüzey aktif maddeler, oluşan bu lipaz homo- veya heterodimerleri kırarak lipazın açık halini dengede tutarlar ve lipaza hiperaktivite kazandırırılar. Ayrıca yüzey aktif maddeler

lipazın topaklanmasını önleyerek arayüzey alanını dengede tutarlar ve böylece substratın enzime ulaşmasını kolaylaştırırlar (Bussamara vd. 2011).

Bu çalışmada noniyonik yüzey aktifleyicilerden Tween 80 ve Triton X-100 kullanılarak tutuklama üzerine etkisi incelenmiştir. Derişimi 10-50 mM arasında değişen katkı maddeleri destek materyalinin aktive edilmesi için ultrasonik banyoda ve tampon ortamında (pH=7.0) 45 dk tepkimeye girmiştir. Daha sonra, önceden anlatıldığı gibi tutuklama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen enzimatik aktivite değerleri şekil 5.20-5.22’de gösterilmiştir.

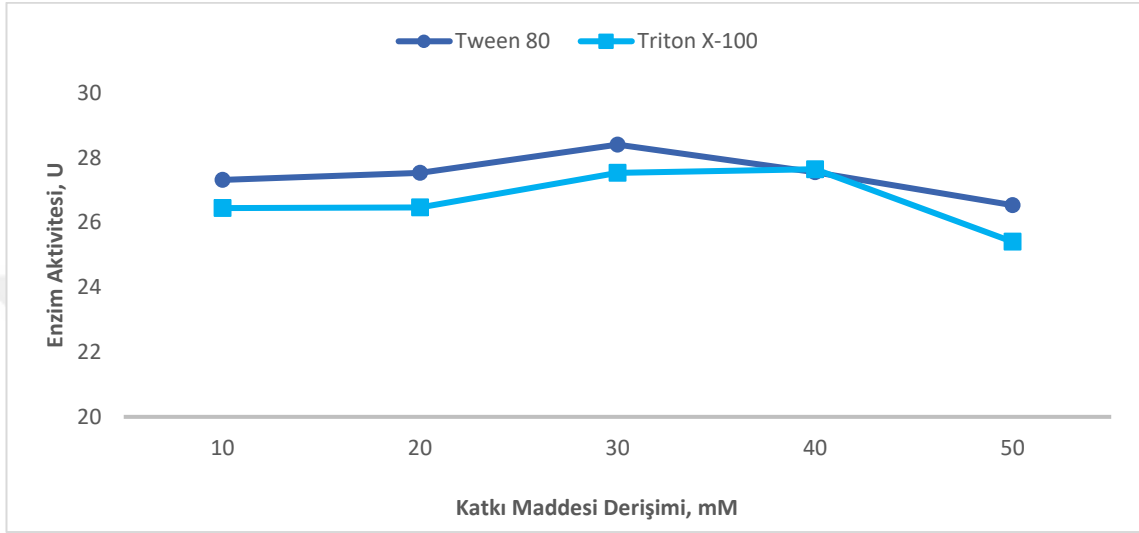


Şekil 5.20 Tween 80 ve Triton X-100 derişiminin Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ tutuklanmış enzim aktivitesine etkisi

(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>=15 mg, GA=250 mM, Fosfat tamponu=50 mM, pH=6, Cal-B=1 ml, T=40 °C, t<sub>aktivasyon</sub>=4 saat, t<sub>tutuklama</sub>=16 saat ve N=150 rpm) Katkı maddesi olmadan aynı koşullarda enzim aktivitesi=26.95 U

Şekil 5.20’de manyetik demir oksit nanoparçacıklarının Triton X-100 ve Tween 80’den nasıl etkilendiğini görmekteyiz. Tween 80 kullanıldığı durumda aktivitenin 30 mM derişime kadar artıp sonrasında azaldığı görülmüştür. Fakat 10-50 mM derişim arasında aktivitede genel olarak çok büyük farklar görülmemiştir. Ortalama aktivite Tween 80 kullanıldığında 26-27 U arasında değişmektedir. En yüksek aktivite, 27.82 U, ise 30 mM Tween 80 kullanıldığında gözlenmiştir. Triton X-100 incelendiğinde yine benzer sonuçlar görülmüştür. En yüksek aktivite olan 27.10 U, 40 mM Triton X-100

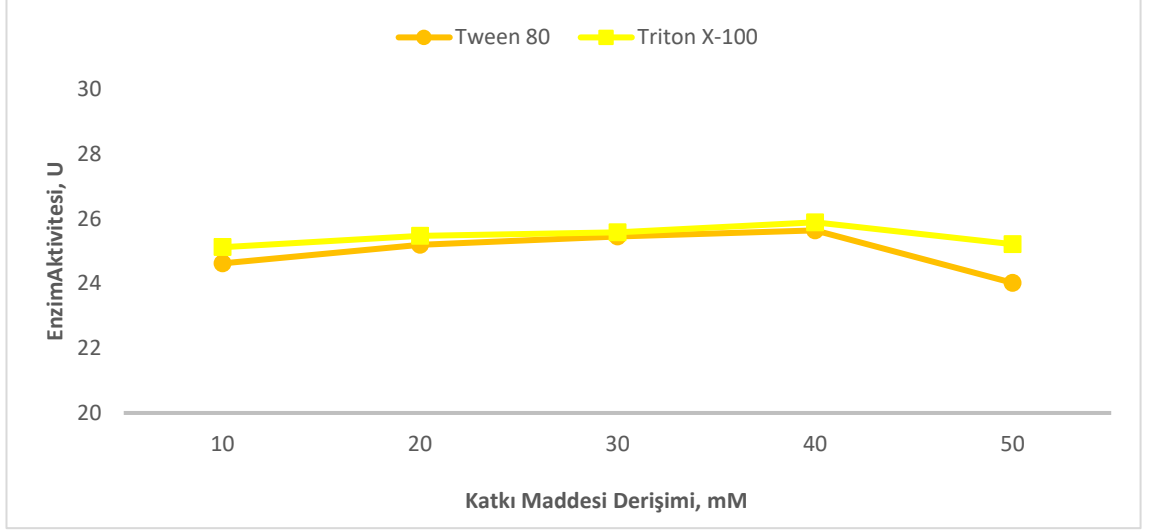
kullanıldığında elde edilmiştir. 40 mM'dan sonra aktivite azalmıştır. Katkı maddesi olmadan aynı koşullarda tutuklanan enzimin aktivitesi, 28.98 U, ile kıyaslama yapıldığında her iki noniyonik yüzey aktif maddesinin de aktiviteyi azalttığı görülmüştür.



Şekil 5.21 Tween 80 ve Triton X-100 derişiminin GO-GA-Lİ tutuklanmış enzim aktivitesine etkisi

(GO=20 mg, GA=250 mM, Fosfat tamponu=50 mM, pH=7, Cal-B=1 ml, T=40 °C, t<sub>aktivasyon</sub>=4 saat, t<sub>tutuklama</sub>=16 saat ve N=150 rpm) Katkı maddesi olmadan aynı koşullarda tutuklanan enzim aktivitesi=28.98 U

Şekil 5.21'de GO-GA-Lİ tutuklanmış enziminin aktivite değişimini görüyoruz. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ enzminde olduğu gibi benzer sonuçlar karşımıza çıkıyor. 30 mM Tween 80 kullanıldığında en yüksek ativite 28.41 U iken, 40 mM Triton X-100 kullanıldığında en yüksek aktivite 25.65 U'dur. GO destek materyaline tutuklanmış enzimlerin, noniyonik yüzey aktifleyicilerin derişim değişiminden pek etkilenmediği söylenebilir. Katkı maddesi kullanılmadan aynı şartlarda tutuklanan enzimin aktivitesi ile karşılaştırıldığında, 30 mM Tween 80 kullanıldığında aktivite 26.95 U'dan 28.41 U'ya çıkmıştır. Triton X-100 ise tüm derişimlerde aktiviteyi az da olsa düşürmüştür; 40 mM Triton X-100 ile, 26.95 U'ya en yakın aktivite 25.65 U olarak elde edilmiştir.



Şekil 5.22 Tween 80 ve Triton X-100 derişiminin GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ tutuklanmış enzim aktivitesine etkisi

(GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>=15 mg, GA=250 Mm, Fosfat tamponu=50 mM, pH=8, Cal-B=1 ml, T=40 °C, t<sub>aktivasyon</sub>=4 saat, t<sub>tutuklama</sub>=12 saat ve N=150 rpm Katkı maddesi olmadan aynı koşullarda enzim aktivitesi=25.47 U

Şekil 5.22’de GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ kompozitinin kullanılan noniyonik yüzey aktifleyicilerden nasıl etkilendiği görülmektedir. Genel olarak bakıldığında, farklı derişimlerde her iki noniyonik aktifleyici birbirinden çok farklı aktivite göstermemiştir. Yani tüm derişim değerlerinde enzim aktiviteleri birbirine yakın sonuçlar vermiş ve aktiviteler 24-26 U arasında değişmiştir. Katkı maddesi olmadan tutuklanan enzim ile kıyaslama yapıldığında, 40 mM Tween 80 kullanıldığında aktivite 25.47 U’dan 25.65 U’ya çıkarak çok az bir artış sergilemiştir. Yine 40 mM Triton X-100 kullanıldığında ise enzim aktivitesi 25.47 U’dan 25.89 U’ya artmıştır. Bu sonuçlara göre, her iki katkı maddesi de 40 mM kullanıldığında en yüksek sonuçlar elde edilmiş, enzim aktivitesi azalma göstermemiş fakat belirgin bir artışta söz konusu olmamıştır.

Her destek materyali için farklı derişimlerde farklı enzimatik aktivite görülmüştür. Genel olarak, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ destek materyali için katkı maddeleri negatif etki gösterirken GO-GA-Lİ ve GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ destek materyalleri için katkı maddeleri azda olsa pozitif etki göstermiştir. Bunun sebebi destek materyallerinin farklı gruplar içermesi ve katkı maddelerinin bu gruplara bağlanarak farklı bir konformasyonel yapı oluşturmasıdır. Literatürde benzer çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalarda katkı maddesi

olarak Triton X-100 ve Tween 80 kullanıldığında enzim aktivitesinin çok etkilenmediği ya da aktiviteyi azalttığı görülmüştür. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda kısaca anlatılmıştır.

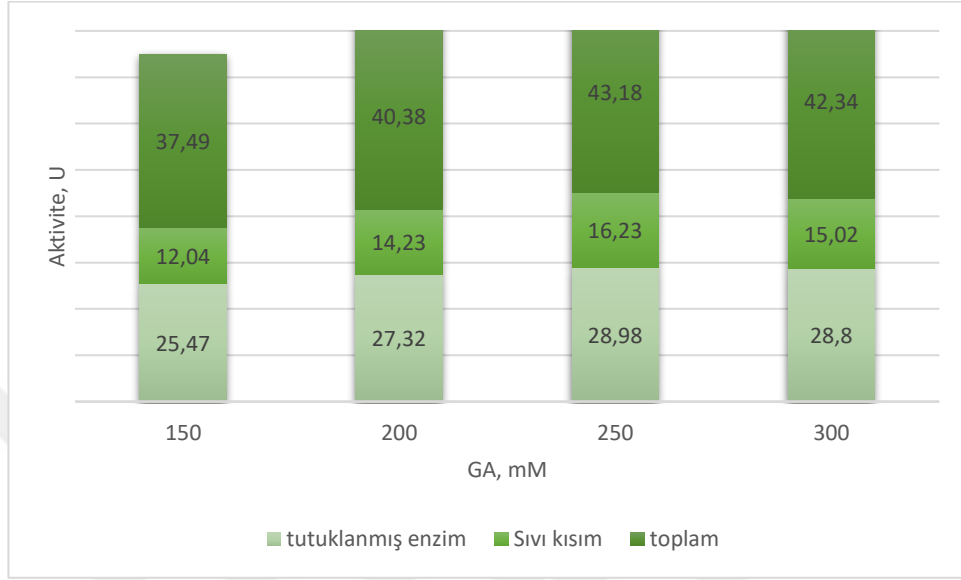
Gupta ve arkadaşları (2009)'nın yaptığı çalışmada *Thermomyces lanuginosa* kaynaklı bir lipazın glutaraldehit ile çapraz bağlanmasıyla tutuklama işlemi çalışılmıştır. Tutuklama ortamına, her biri ayrı olmak üzere, 5 ml hacim için 100 er mg SDS, Tween 80 ve Triton X-100 eklenmiştir. Anyonik SDS kullanıldığında serbest enzimin relatif aktivitesi % 100'den % 137.0'ye yükselmiştir. Noniyonik Tween 80 ve Triton X-100 kullanıldığında ise relatif aktivite sırasıyla % 78.2 ve % 17.6 olarak bulunmuştur. Bu tutuklama yöntemi ve lipaz için Triton X-100 ve Tween 80 kullanmanın negatif etkisi olduğu görülmüştür.

Salameh ve Weigel (2010), çeşitli yüzey aktif maddelerin lipaz aktivitesine etkisini araştıran bir çalışma yapmıştır. Çalışmada *Thermosyntropha lipolytica* adlı anaerobik termofilik lipolitik bakterisinden elde edilen bir lipaz kullanılmıştır. Yüzey aktif maddelerin lipaz aktivitesine etkisini incelemek için derişimi 1 mM ve 10 mM arasında olan SDS, CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide), Triton X-100, Tween 20 ve Tween 80 ile belli koşullarda tepkime gerçekleştirilmiştir. Anyonik SDS kullanıldığı durumda spesifik aktivite 1 mM SDS için 3 U/mg iken 7 mM SDS için 105 U/mg' a hızla artmış ve daha fazla SDS derişiminde enzim denatüre olarak spesifik aktivite düşmeye başlamıştır. Katyonik yüzey aktifleyici CTAB, aynı derişimlerde lipazı inhibe etmiş ve aktiviteyi düşürmüştür. Muhtemelen, tepkime esnasında istenmeyen elektrostatik etkileşimler substratın bağlanmasında negatif etki ortaya çıkartmıştır. Aynı derişimde noniyonik yüzey aktif maddeler (Triton X-100, Tween 20 ve Tween 80) kullanıldığı durumda ise aktivitenin çok etkilenmediği görülmüştür.

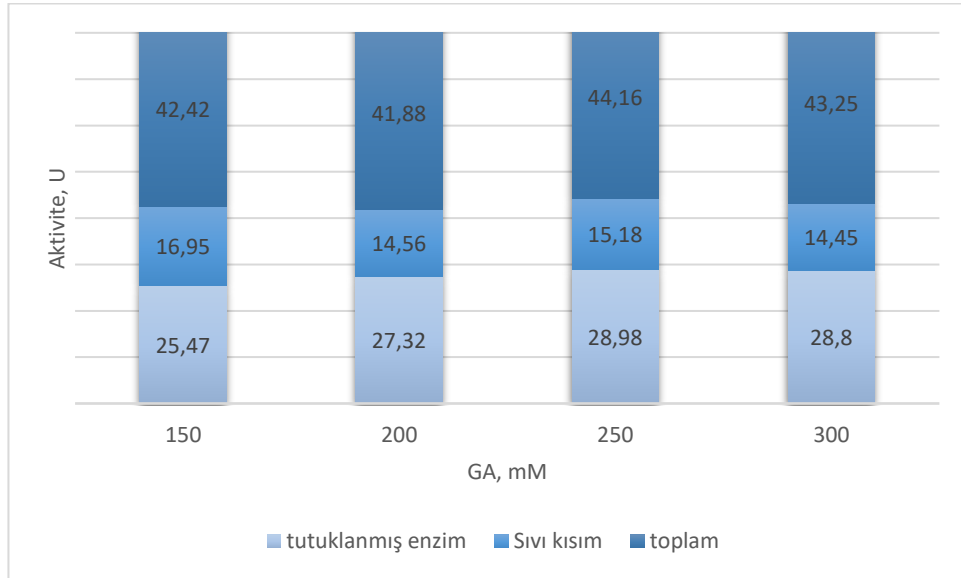
### **5.8 Sıvıda Kalan (Bağlanmamış Enzim) Aktivite Miktarı**

Tutuklamanın ne kadar başarılı olduğunu ve enzimin çözeltiliye sızıp sızmadığını anlamak için sıvıda kalan kısmın aktivitesi ayrıca ölçülmüştür. Derişimi 150-300 mM arasında değişen çapraz bağlayıcı GA ile nanoparçacıklar 4 saat, 30 °C'de aktive

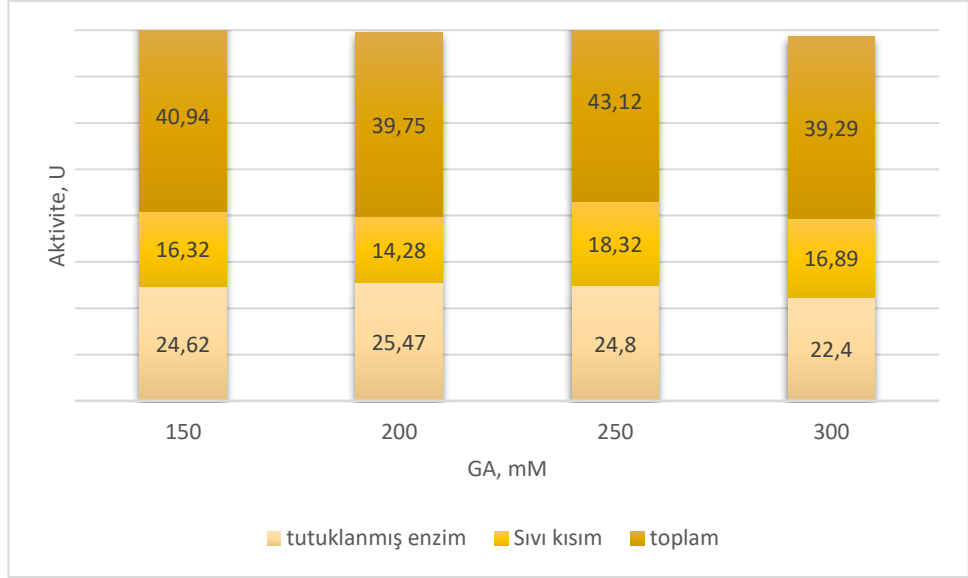
edilmiş ve ortama enzim eklenerek tutuklama gerçekleştirilmiştir. Önce tutuklanmış enzimin aktivitesi daha sonra çözelti aktivitesi önceden anlatıldığı gibi ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar şekil 5.23-5.25’de gösterilmiştir.



Şekil 5.23 Bağlanmamış ve tutuklanmış enzim aktivitesi ( $Fe_3O_4$ -GA-LI)



Şekil 5.24 Bağlanmamış (çözeltide kalan) ve tutuklanmış enzim aktivitesi (GO-GA-LI)



Şekil 5.25 Bağlanmamış ve tutuklanmış enzim aktivitesi (GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ )

Çalışmanın büyük bölümünde sıvı aktivitesi ölçülmüş; ve her çözeltilerde büyük oranda enzimin kaldığı görülmüştür. Yukarıdaki her üç tutuklama çalışmasında da büyük oranda enzim desteğe bağlanmamış ve çözeltilerde kalmıştır. Genel olarak, yaklaşık 12-18 U arasında enzim çözeltilerde bağlanmadan kalmış; yaklaşık 22-29 U arasında enzim desteğe tutuklanmıştır. Tutuklanmış enzimlerin aktivitesi sıvıda kalan aktiviteye göre daha yüksek bulunmuştur. Uygun koşullarda serbest enzimin aktivitesi (35 U) ile toplam aktivite karşılaştırıldığında, her üç tutuklama çalışmasında da toplam aktivite artmıştır. Fakat burada önemli olan desteğe tutuklanan enzim miktarıdır. Serbest enzime göre tutuklanan enzim aktivitesinin daha az olmasının çeşitli nedenleri olabilmektedir.

Kovalent bağlanma ile tutuklanmış enzim aktivitesi, taşıyıcı materyalin şekil ve büyüklüğüne, tutuklama metodunun doğasına, taşıyıcı materyalin bileşimine ve tutuklama koşullarına bağlıdır. Kovalent bağlar diğer kovalent olmayan adsorpsiyon bazlı enzim tutuklama yöntemleri ile karşılaştırılacak olursa genellikle enzim ve taşıyıcı arasında en güçlü bağları sağlar. Fakat bu yöntem enzim tutuklama için bir çok kimyasal reaksiyon içerir. Genelde taşıyıcı tutuklama basamağından önce aktive edilmelidir. Ardından çapraz bağlayıcı bir ajan, enzimin fonksiyonel bir grubuyla aktive edilmiş taşıyıcıyı bağlamak için kullanılır. Bu çok basamaklı enzim tutuklama tekniği süresince enzimin deaktivasyonu sonuçlanabilir. Buna rağmen eğer gerekli

kimyasallar enzimle uyumlu olursa enzim ile destek maddesi arasında kovalent bağdan dolayı tutuklanmış enzim daha iyi bir aktivite gösterebilir. Fonksiyonel grup ile desteğin seçimi, enzim ile desteğin davranışı ve enzimin dayanıklılığına bağlıdır.

Bu çalışmada serbest enzim aktivitesine göre tutuklanmış enzim aktivitesi daha azdır. Yaklaşık % 75-80 oranında serbest enzim desteğe tutuklanabilmiştir. Yukarıda anlatılanlar doğrultusunda, enzim ile uyumlu destek materyali seçmek, desteği uygun aktiflyiciler ile aktive etmek, enzimin konformasyonunun bozulmasını engelleyecek uygun katkı maddeleri eşliğinde tutuklama yapmak gibi yöntemler ile daha iyi sonuçlar elde edilmeye çalışılmalıdır.

### **5.9 (R,S)-1-Feniletanolün Tutuklanmış Enzimler ile Kinetik Rezolüsyonu**

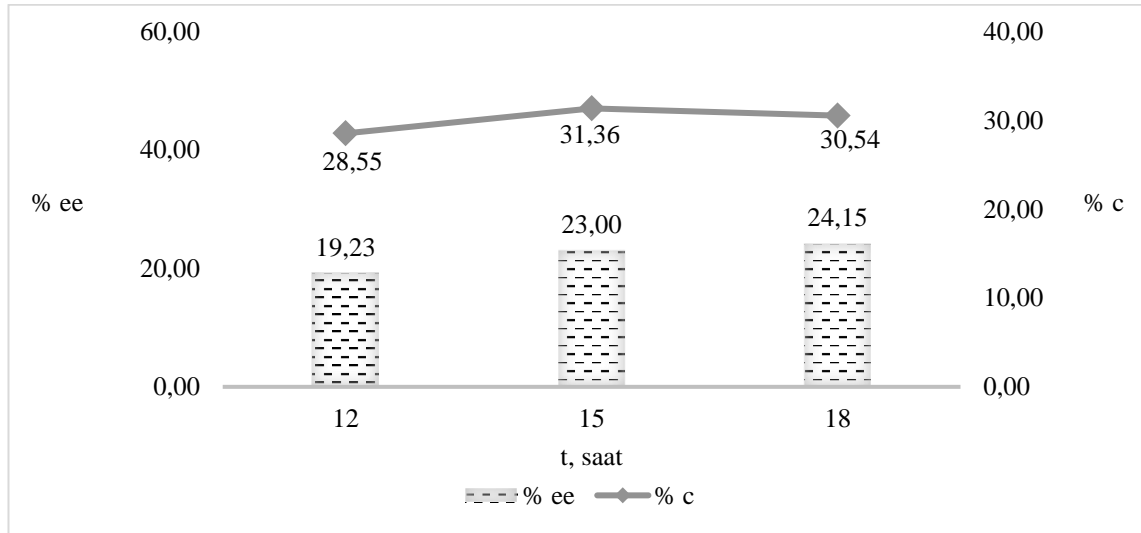
Rasemik bileşiklerin kinetik rezolüsyonu, lipazların katalizlediği dönüşüm tepkimelerinden en yaygın olanıdır ve lipaz enzimi rasemik karışımdaki iki enantiyomer arasında ayırım yapabilir. Dolayısıyla bir enantiyomer diğerinden daha hızlı ürüne dönüştürülür. Çalışmanın bu aşamasında, tutuklanmış enzimler rasemik bir bileşeni enantiyomerlerine ayırmak için biyokatalizör olarak kullanılmıştır. Rasemik 1-feniletanolün enantiyoseçimli transesterleşme tepkimesinde enzim etkisini incelemek amacıyla biyokatalizör olarak *Candida antarctica* lipazının tutuklanmış farklı formları denenmiş ve % 50 dönüşüm ile % 100 enantiyomerik aşırılığa ulaşmak için hangi tutuklanmış enzimin daha iyi sonuç verdiği incelenmiştir. Kullanılan her enzim için enantiyomerik aşırılık, enantiyomerik oran, dönüşüm değerleri belirlenmiş ve tepkime süresinin etkisi incelenmiştir.

Farklı lipazların katalizörlüğündeki tepkimeler toluen, hegzan ve heptan gibi organik çözücülerde gerçekleştirilmiştir. Tepkimeler vida kapaklı şişelerde ve 3 ml hacimde gerçekleşmiştir. Açıl verici olarak kullanılan 240 mM veya 480 mM vinil asetat, organik çözücüde çözüldükten sonra tepkime ortamına 120 mM (R,S)-1-feniletanol ve 100 mg moleküler elek eklenmiştir. En son 50 mg enzim eklenerek tepkime başlatılmıştır. Tepkimeler 40 °C'de ve 150 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir.

### 5.9.1 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ enzimi ile (R,S)-1-feniletanolün kinetik rezolüsyonu

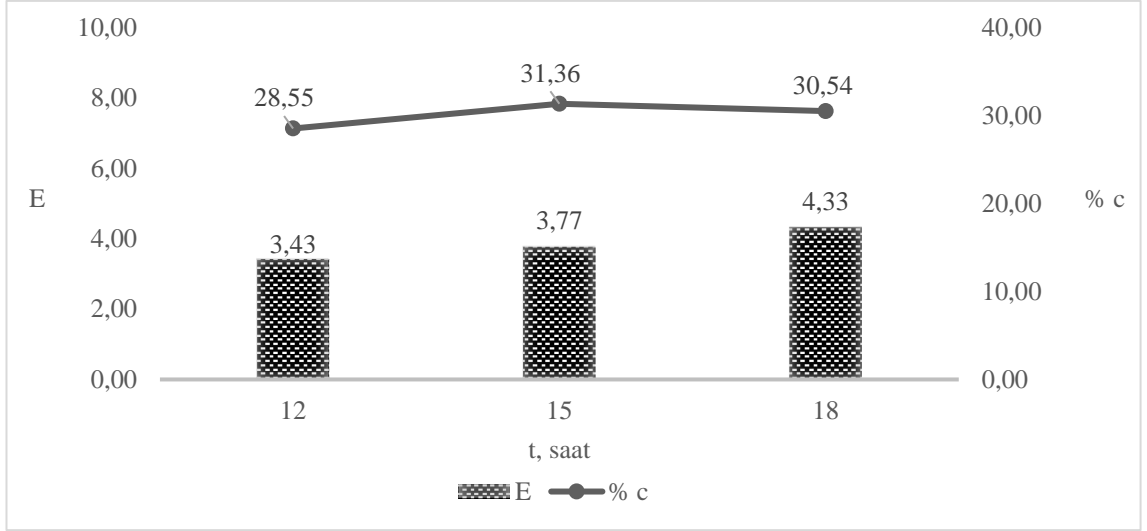
Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ enziminin kullanıldığı tepkime 1:4 oranında substrat:açıl verici kullanılmış ve tepkime hegzan ortamında gerçekleşmiştir. 12, 15 ve 18 saat süren tepkimelerden elde edilen enantiyomerik aşırılık (ee(S)) ve enantiyomerik oran (E) sonuçları şekil 5.26, 5.27’de gösterilmiştir.

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ enziminin biyokatalizör olarak kullanıldığı tepkime incelendiğinde 18 saat tepkime sonrası bile % 50 dönüşüm elde edilememiştir. Dönüşüm değeri ortalama % 30 olarak bulunmuştur. % ee(S) ve E değerleri ise sürenin artmasıyla çok az bir artış göstermiştir. 18 saat sonunda % 30.54 dönüşüm değerinde, % ee(S) ve E değerleri sırasıyla % 24.15 ve 4.33 bulunmuştur (Şekil 5.26, 5.27). Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ lipazının 1-feniletanolü enantiyomerlerine ayırmak için uygun bir biyokatalizör olmadığı görülmüştür. Demir oksit nanoparçacıkları büyük yüzey alanına sahiptir. Ayrıca gözenek difüzyon mukavemeti ve kirleneme olmaksızın büyük oranda enzim yüklenebilir. Burada başarılı sonuç elde edilememesinin sebebi tutuklanmış enzimin 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesi için uygun bir biyokatalizör olmasıdır.



Şekil 5.26 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm üzerine etkisi

(C<sub>(R,S)-1-FE</sub>=120 mM, C<sub>VA</sub>=480 mM, M<sub>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ</sub> =50 mg, Org. çözücü=Hegzan, V<sub>top</sub>=3 ml, M<sub>moleküler</sub> elek=100 mg, T=40 °C, N=150 rpm, enzim aktivitesi=26.95 U)



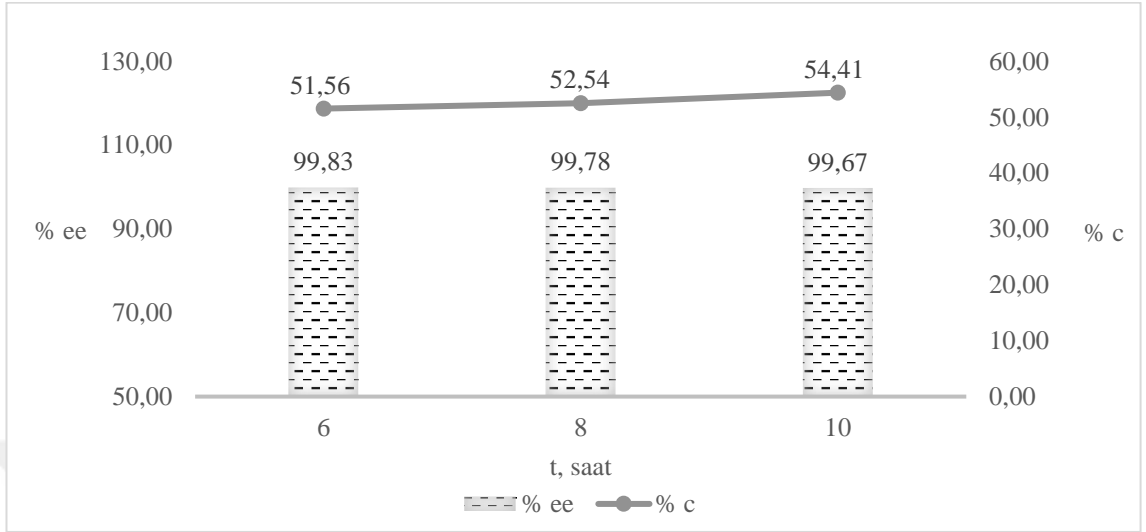
Şekil 5.27 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik oran ve dönüşüm üzerine etkisi

(C<sub>(R,S)</sub>-1-FE=120 mM, C<sub>VA</sub>=480 mM, M<sub>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ</sub> =50 mg, Org. çözücü=Hegzan, V<sub>top</sub>=3 ml, M<sub>moleküler elek</sub>=100 mg, T=40 °C, N=150 rpm, enzim aktivitesi=26.95 U)

Son yıllarda bir çok çalışmada *Candida rugosa* veya *Candida antarctica* lipazı kovalent bağlanma ile nanoparçacıklara tutuklanmıştır. Kovalent bağlama ile lipaz tutuklama çalışmalarının çoğunda, lipazın serbest amino grupları ile reaktifler tepkimeye girdiğinde lipazın inaktif olduğu gözlenmiştir. Fakat farklı lipazların ya da farklı nanoparçacıkların kullanıldığı başarılı olmuş kovalent bağlama çalışmalarında mevcuttur. Lipazın inaktif olmasını engellemek için, lipazı adsorpsiyon metodu ile demir oksit nanoparçacıklara tutuklamak daha başarılı sonuçlar vermiştir (Gupta ve Salonki 2011).

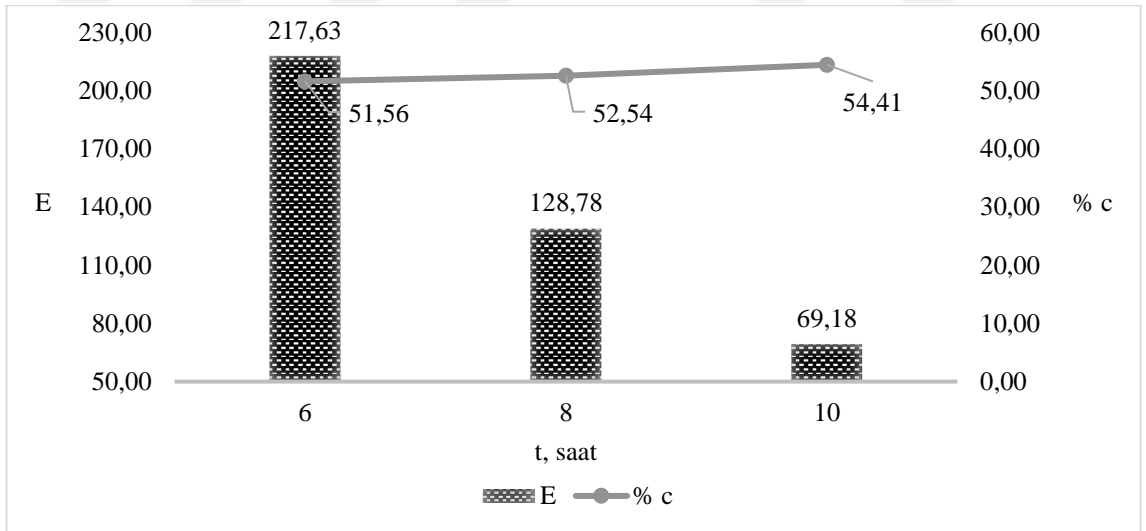
Gupta ve Salonki'nin (2011) yaptıkları çalışmada, Tween 80 ve polietilenimin polimeri ile modifiye edilmiş demir oksit nanoparçacıklar üretilmiş ve *Candida rugosa* lipazı bu nanoparçacıklara adsorpsiyon metodu ile tutuklanmıştır. Serbest enzime göre tutuklanmış enzimlerin aktivitesinde 2-3 kat artış görülmüştür. Polietilenimin ile modifiye edilmiş enzim biyokatalizörlüğünde yapılan 1-feniletanolün kinetik rezolüsyonundan elde edilen % dönüşüm, % ee ve E değerleri sırasıyla % 41, % 99 ve 412 bulunmuştur. Enantiyomerik oranın 100'ün üzerinde olması başarılı bir çalışma olduğunu göstermektedir.

## 5.9.2 GO-GA-Lİ enzimi ile (R,S)-1-feniletanolün kinetik rezolüsyonu



Şekil 5.28 GO-GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm üzerine etkisi

( $C_{(R,S)-1-FE}=120$  mM,  $C_{VA}=240$  mM,  $M_{GO-GA-LI}=50$  mg, Org. çözücü=Heptan,  $V_{top}=3$  ml,  $M_{moleküler\ elek}=100$  mg,  $T=40$  °C,  $N=150$  rpm, enzim aktivitesi=28.98 U)



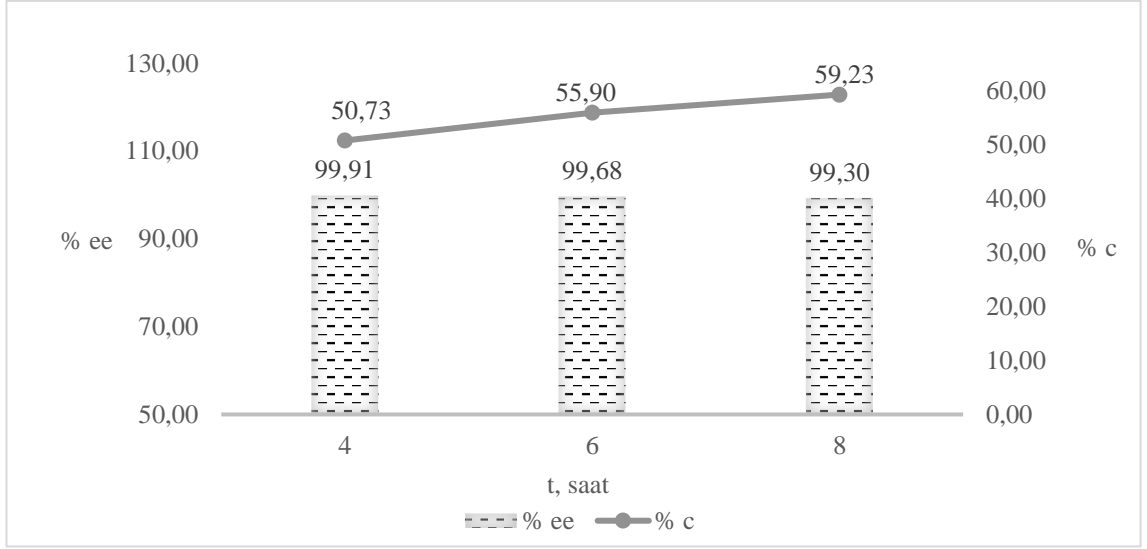
Şekil 5.29 GO-GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik oran ve dönüşüm üzerine etkisi

( $C_{(R,S)-1-FE}=120$  mM,  $C_{VA}=240$  mM,  $M_{GO-GA-LI}=50$  mg, Org. çözücü=Heptan,  $V_{top}=3$  ml,  $M_{moleküler\ elek}=100$  mg,  $T=40$  °C,  $N=150$  rpm, enzim aktivitesi=28.98 U)

GO-GA-Lİ enziminin kullanıldığı tepkimede 1:2 oranında substrat:açıl verici kullanılmış ve tepkime hegzan ile heptan ortamında gerçekleşmiştir. Organik çözücü olarak heptanın kullanıldığı ve 6, 8, 10 saat süren tepkimelerden elde edilen enantiyomerik aşırılık (ee(S)) ve enantiyomerik oran (E) sonuçları şekil 5.28, 5.29'da görülmektedir. 4, 6 ve 8 saat süre ile çalışılan tepkimelerde ise hegzan organik çözücü olarak kullanılmıştır. Elde edilen enantiyomerik aşırılık (ee(S)) ve enantiyomerik oran (E) değerleri şekil 5.30, 5.31'de görülmektedir.

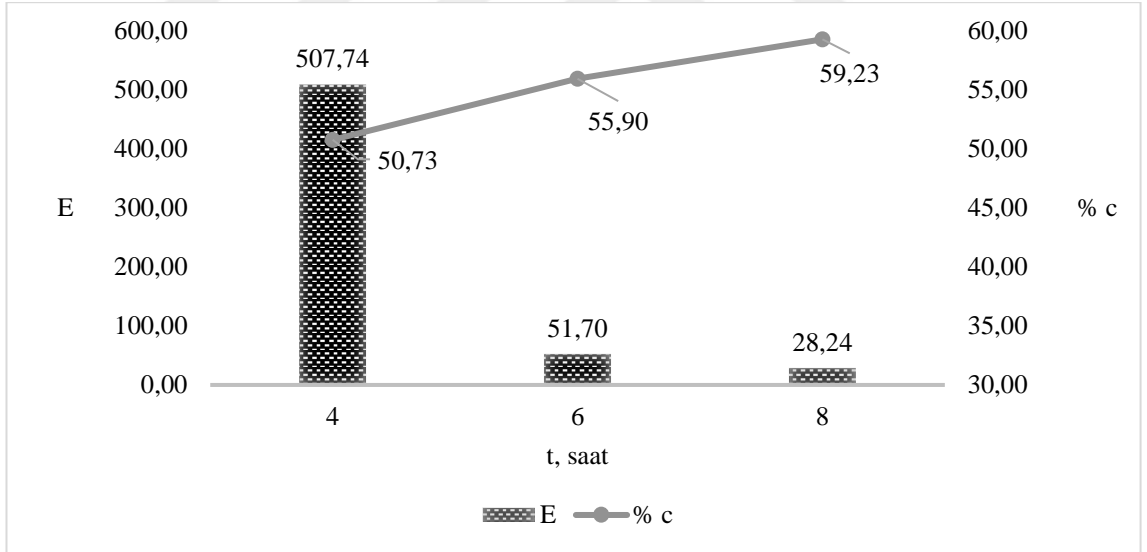
Organik çözücü olarak heptanın kullanıldığı tepkimede GO-GA-Lİ lipazının enantiyomerik aşırılığa etkisine baktığımızda % 99 oranında bir başarı görülmektedir. 6, 8 ve 10 saat süre ile çalışılan tepkimelerde 6 saat sonunda % 51.56 dönüşüm elde edilmiş ve bu durumda % ee(S) değeri % 99.83 olarak bulunmuştur (Şekil 5.28). Sürenin artmasıyla dönüşüm zamanla artmış ve bu sebeple enantiyomerik oran zamanla azalmıştır. En yüksek E değeri % 51.56 dönüşüm ile 217.63 olarak bulunmuştur (Şekil 5.29).

Organik çözücü olarak hegzanın seçildiği tepkimede benzer sonuçlar görülmektedir. 4, 6 ve 8 saat süren tepkimelerde yine % 100'e yakın oranda başarı elde edilmiştir. 4 saat sonunda % 50.73 dönüşüm değeri ile % ee(S) değeri % 99.91 bulunmuştur. Bu süre sonunda E değeri ise 507.74 bulunmuştur. Tepkime süresinin artmasıyla dönüşüm de artmış ve buna bağlı olarak E değeri büyük ölçüde azalmıştır (Şekil 5.30, 5.31). Her iki tepkimede de % 100'e yakın bir başarı elde edilmiş olup hegzanın tepkime süresini kısalttığı görülmüştür. GO-GA-Lİ tutuklanmış enzimi kısa bir tepkime süresi ile 1-feniletanolü saf enantiyomerlerine ayırmak için oldukça başarılı bulunmuştur.



Şekil 5.30 GO-GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm üzerine etkisi

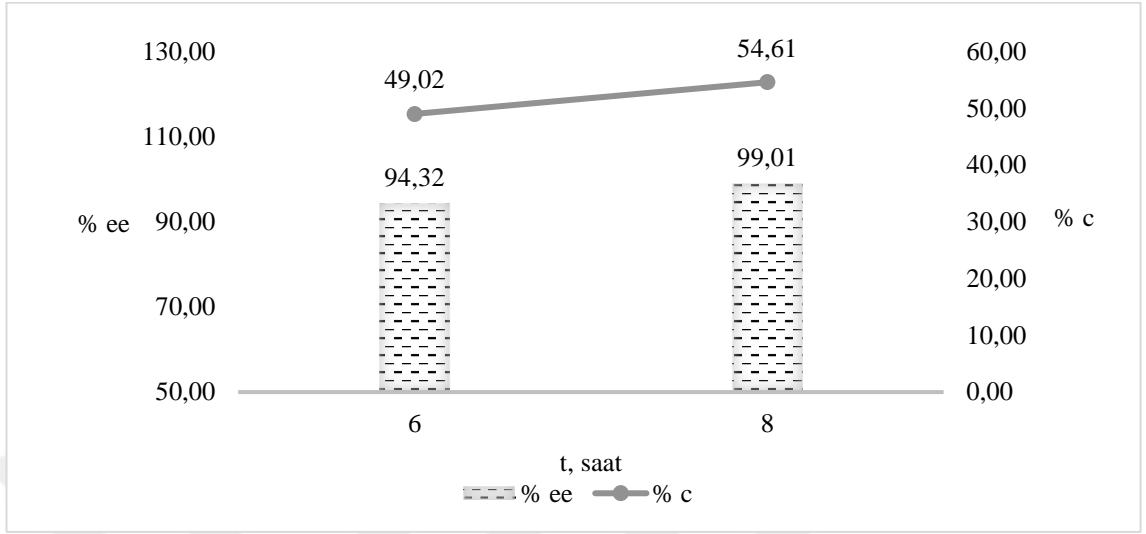
( $C_{(R,S)-1-FE}=120$  mM,  $C_{VA}=240$  mM,  $M_{GO-GA-Lİ}=50$  mg, Org. çözücü=Hegzan,  $V_{top}=3$  ml,  $M_{moleküler\ elek}=100$  mg,  $T=40$  °C,  $N=150$  rpm, enzim aktivitesi=28.98 U)



Şekil 5.31 GO-GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik oran ve dönüşüm üzerine etkisi

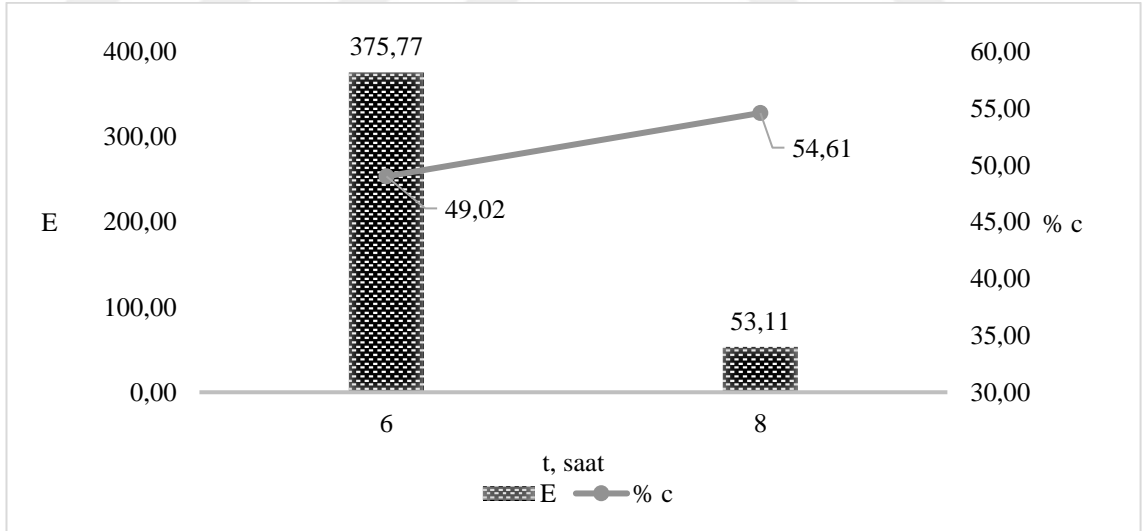
( $C_{(R,S)-1-FE}=120$  mM,  $C_{VA}=240$  mM,  $M_{GO-GA-Lİ}=50$  mg, Org. çözücü=Hegzan,  $V_{top}=3$  ml,  $M_{moleküler\ elek}=100$  mg,  $T=40$  °C,  $N=150$  rpm, enzim aktivitesi=28.98 U)

### 5.9.3 GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ enzimi ile (R,S)-1-feniletanolün kinetik rezolüsyonu



Şekil 5.32 GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm üzerine etkisi

(C<sub>(R,S)-1-FE</sub>=120 mM, C<sub>VA</sub>=240 mM, M<sub>GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ</sub>=50 mg, Org. çözücü=Hegzan, V<sub>top</sub>=3 ml, M<sub>moleküler elek</sub>=100 mg, T=40 °C, N=150 rpm, enzim aktivitesi=25.47 U)



Şekil 5.33 GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik oran ve dönüşüm üzerine etkisi

(C<sub>(R,S)-1-FE</sub>=120 mM, C<sub>VA</sub>=240 mM, M<sub>GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ</sub>=50 mg, Org. çözücü=Hegzan, V<sub>top</sub>=3 ml, M<sub>moleküler elek</sub>=100 mg, T=40 °C, N=150 rpm, 25.47 U)

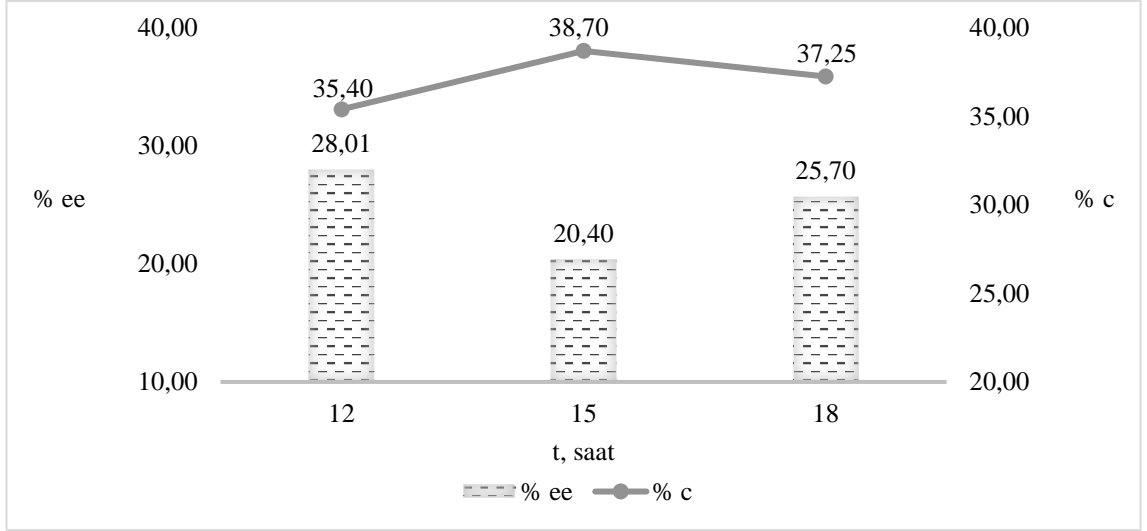
GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ enzimi ile yapılan çalışmada benzer şekilde hegzan organik çözücü olarak kullanılmış olup, 6 ve 8 saat sürede tepkimeler olmuştur. Bu tepkimelerden elde edilen % c, % ee(S) ve E değerleri şekil 5.32, 5.33'te gösterilmiştir.

6 saat süren tepkimede % 49.02 dönüşüme ulaşılmış ve bu durumda % ee(S) değeri 94.32, E değeri ise 375.77 olarak bulunmuştur. 8 saat sonunda ise dönüşüm % 50'nin üzerine çıkmış ve % ee(S) ile E değerleri azalmıştır (Şekil 5.32, 5.33). GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ tutuklanmış enzimide, GO-GA-Lİ tutuklanmış enzimi gibi kısa bir tepkime süresi ile 1-feniletanolü saf enantiyomerlerine ayırmak için oldukça başarılı bulunmuştur.

#### **5.9.4 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ enzimi ile (R,S)-1-feniletanolün kinetik rezolüsyonu**

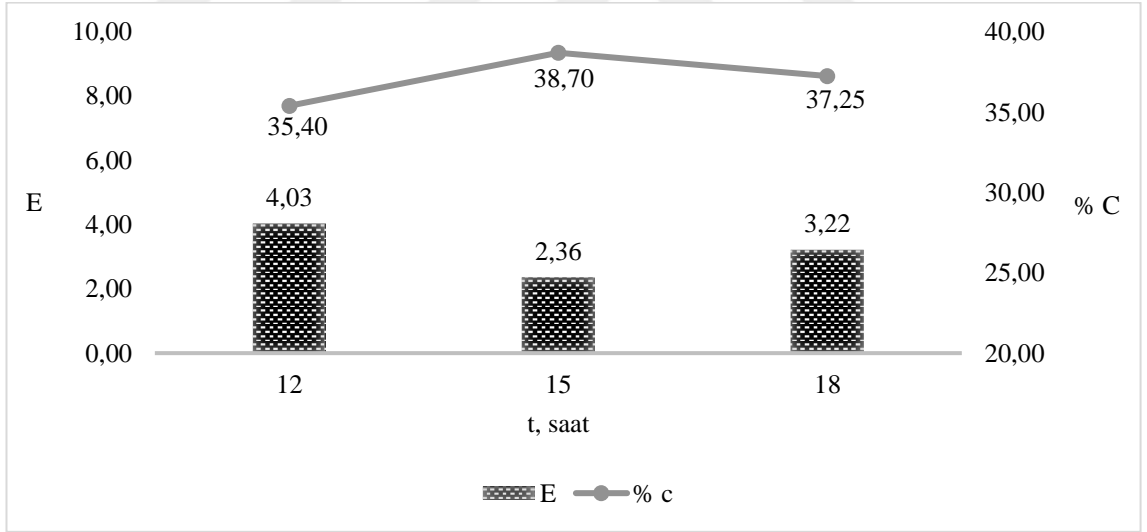
GO ve demir oksit bazlı nanoparçacıklar dışında kitosan temelli nanoparçacıklar da üretilmiş ve bu parçacıklara da aynı enzim tutuklanmıştır. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ enziminin biyokatalizör olarak kullanıldığı tepkimede hegzan ve 1:2 oranında substrat:açıl verici kullanılmıştır. 12, 15 ve 18 saat süren tepkimelerden elde edilen sonuçlar şekil 5.34, 5.35'te gösterilmiştir.

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ enziminin görev yaptığı tepkimede 12, 15 ve 18 saat sürelerde çalışılmış ve istenen dönüşüm oranına ulaşamamıştır. En yüksek dönüşüm değeri 15 saat sonunda % 38.70 bulunmuştur. Bu durumda % ee(S) ve E değerleri sırasıyla % 20.40 ve 2.36'dır. Fakat sürenin artmasıyla % ee(S) ve E değerleri önce artmış sonra azalmıştır. En yüksek değerlere en az dönüşüm değerinde yani % 35.40 dönüşüm olduğu zaman ulaşılmıştır. Bu durumda % ee(S) ve E değerleri ise sırasıyla % 28.01 ve 4.03 bulunmuştur (Şekil 5.34, 5.35). Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ lipazının 1-feniletanolün kinetik rezolüsyonunda iyi bir katalizör olmadığı görülmüştür.



Şekil 5.34 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm üzerine etkisi

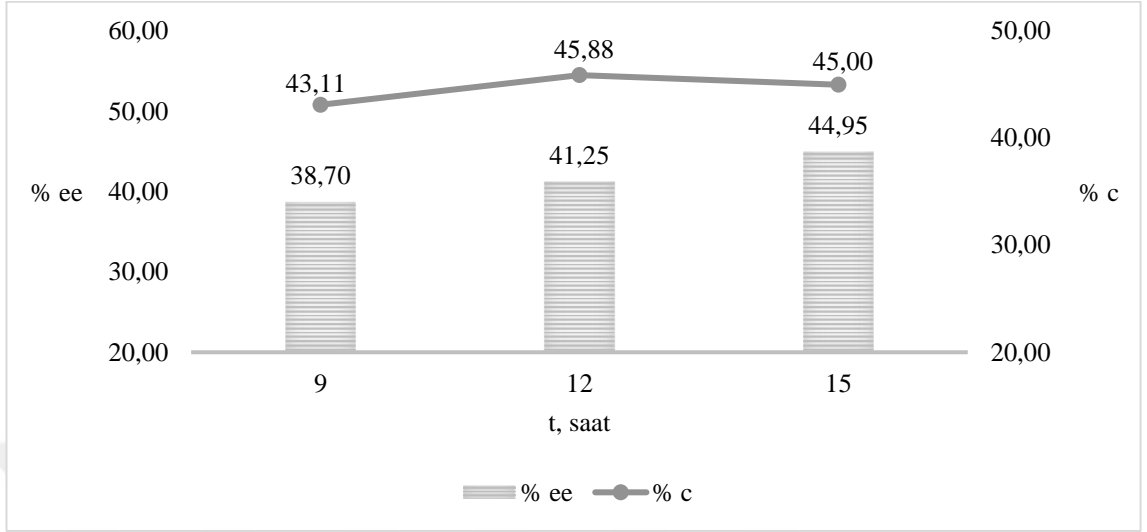
(C<sub>(R,S)</sub>-1-FE=120 mM, C<sub>VA</sub>=240 mM, M<sub>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ</sub>=50 mg, Org. çözücü=Hegzan, V<sub>top</sub>=3 ml, M<sub>moleküler elek</sub>=100 mg, T=40 °C, N=150 rpm, enzim aktivitesi=21.56 U)



Şekil 5.35 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik oran ve dönüşüm üzerine etkisi

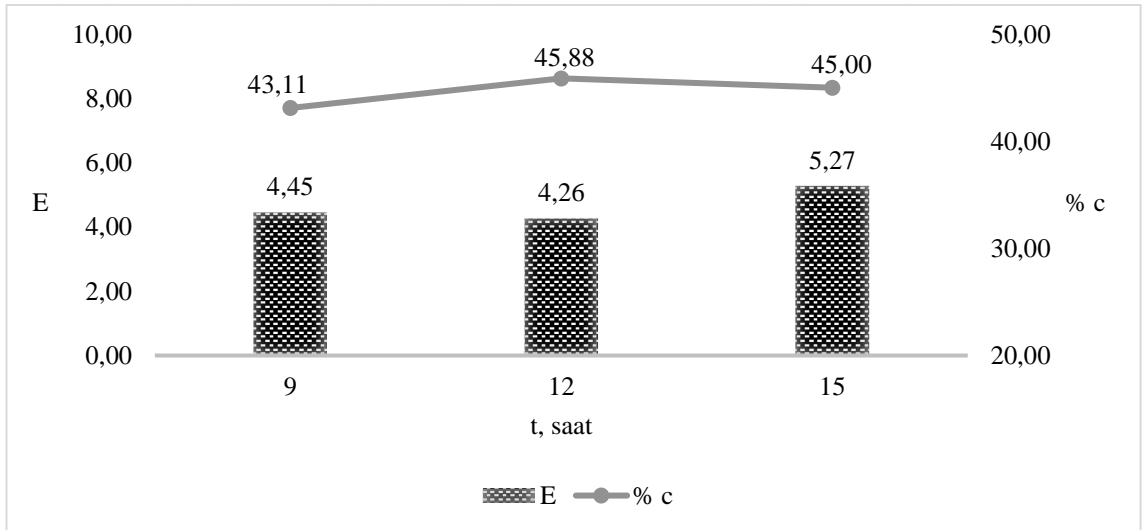
(C<sub>(R,S)</sub>-1-FE=120 mM, C<sub>VA</sub>=240 mM, M<sub>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ</sub>=50 mg, Org. çözücü=Hegzan, V<sub>top</sub>=3 ml, M<sub>moleküler elek</sub>=100 mg, T=40 °C, N=150 rpm, enzim aktivitesi=21.56 U)

### 5.9.5 GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ enzimi ile (R,S)-1-feniletanolün kinetik rezolüsyonu



Şekil 5.36 GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm üzerine etkisi

(C<sub>(R,S)-1-FE</sub>=120 mM, C<sub>VA</sub>=240 mM, M<sub>GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ</sub>=50 mg, Org. çözücü=Toluen, V<sub>top</sub>=3 ml, M<sub>moleküler elek</sub>=100 mg, T=40 °C, N=150 rpm, enzim aktivitesi=23.87 U)



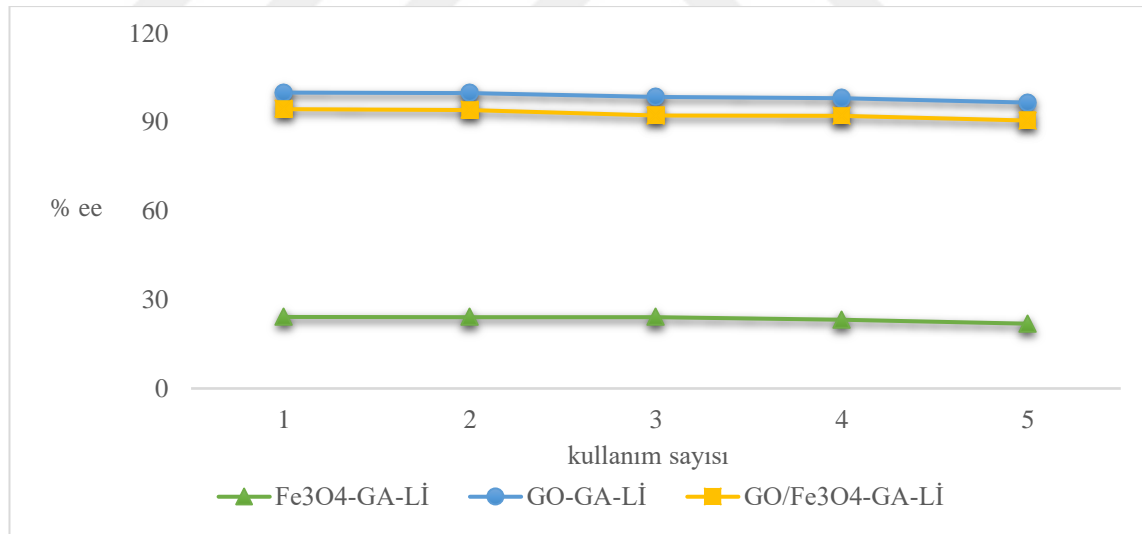
Şekil 5.37 GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ enzimi ile rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde sürenin enantiyomerik oran ve dönüşüm üzerine etkisi

(C<sub>(R,S)-1-FE</sub>=120 mM, C<sub>VA</sub>=240 mM, M<sub>GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ</sub>=50 mg, Org. çözücü=Toluen, V<sub>top</sub>=3 ml, M<sub>moleküler elek</sub>=100 mg, T=40 °C, N=150 rpm, enzim aktivitesi=23.87 U)

Diğer kitosan temelli tutuklanmış enzim olan GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ enziminin kullanıldığı tepkime ise toluen ortamında gerçekleşmiştir. Bu tepkimede diğer tepkimelerden farklı olarak hegzan yerine toluen organik çözücü olarak kullanılmıştır. Çünkü hegzan ve heptan kullanıldığında azda olsa bir enantiyomerik ayırım olmadığı görülmüştür. 9, 12 ve 15 saat süren tepkimeler sonucunda elde edilen % c, % ee(S) ve E değerleri şekil 5.36, 5.37’de gösterilmiştir.

GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/KT-GA-Lİ enzimi ile 9, 12 ve 15 saat çalışılmış, en yüksek dönüşüm değerine 12 saatte ulaşılmıştır. Bu durumda dönüşüm % 45.88 bulunmuştur. İstenilen dönüşüm değerine ulaşılamamış olup, tepkime süresi arttığında yani 15 saat sonra dönüşüm değeri çok az bir azalma ile % 45 bulunmuştur. Bu durumda en yüksek ee(S) ve E değerleri elde edilmiş, sırasıyla % 44.95 ve 5.27 bulunmuştur.

### 5.10 Tutuklanmış Enzimlerin Tekrar Kullanılabilirliği



Şekil 5.38 Tutuklanmış enzimlerin tekrar kullanılabilirliği

(C<sub>(R,S)</sub>-1-FE=120 mM, C<sub>VA</sub>=480 mM, M<sub>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ</sub> =50 mg, Org. çözücü=Hegzan, V<sub>top</sub>=3 ml, M<sub>moleküler elek</sub>=100 mg, T=40 °C, N=150 rpm, t=18 saat, enzim aktivitesi=26.95 U)

(C<sub>(R,S)</sub>-1-FE=120 mM, C<sub>VA</sub>=240 mM, M<sub>GO-GA-Lİ</sub>=50 mg, Org. çözücü=Heptan, V<sub>top</sub>=3 ml, M<sub>moleküler elek</sub>=100 mg, T=40 °C, N=150 rpm, t=4 saat, enzim aktivitesi=28.98 U)

(C<sub>(R,S)</sub>-1-FE=120 mM, C<sub>VA</sub>=240 mM, M<sub>GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ</sub> =50 mg, Org. çözücü=Hegzan, V<sub>top</sub>=3 ml, M<sub>moleküler elek</sub>=100 mg, T=40 °C, N=150 rpm, t=6 saat, enzim aktivitesi=25.47 U)

Tutuklanmış enzimlerin serbest enzimlere göre tekrar tekrar kullanılabilmesi endüstriyel uygulamalarda çok önemlidir. Tutuklanmış enzimleri bir katalitik sistemden diğerine kolayca transfer etmek üretim maliyetini düşürür; bu durum ekonomik açıdan oldukça faydalıdır.

Tutuklanmış enzimlerin tekrar kullanılabilirliğini ölçmek için enzimler aynı transesterleşme tepkimesinde beşer kez kullanılmıştır. Her kullanımdan sonra enzimler yıkanıp kurutulmuştur. Beş kez kullanımda bile enantiyomerik aşırılık değerlerinde çok az bir azalma olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.38). Bu durum tutuklama çalışmasının verimli olduğunu ve kararlı bir yapının meydana geldiğini gösterir.

Netto vd. (2009)'nin çalışmasında tekrar kullanılabilirlik açısından benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada yüzeyi c-aminopropyltriethoxysilane (APTS) ile kaplı süpermanyetik nanoparçacıklar üretilmiş ve bu parçacıklara *Candida antarctica* lipazı tutuklanmıştır. Serbest enzime göre aktivitesi 2 kat artan tutuklanmış lipaz, rasemik 1-feniletanolün transesterleşme tepkimesinde kullanılmış ve % 99'un üzerinde mükemmel bir enantiyoseçicilik ile 300'ün üzerinde enantiyomerik oran elde edilmiştir. Tutuklanmış enzimin tekrar kullanılabilirliği aynı tepkime ile beş kez test edilmiş ve her döngüde sadece % 5'in altında küçük bir azalma görülmüştür.

## 6. SONUÇLAR

Bu çalışmada *Candida antarctica* lipazını nanoparçacıklara tutuklamak ve tutuklanmış enzimi (R,S)-1-feniletanolün kinetik rezolüsyonunda biyokatalizör olarak kullanarak, optikçe saf enantiyomerler üretmek hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda öncelikle nanoparçacıklar üretilmiş; daha sonra üretilen nanoparçacıklara *Candida antarctica* lipazı kovalent bağlama yöntemi ile tutuklanmış ve son olarak tutuklanmış enzimler (R,S)-1-feniletanolün enantiyoseçimli transesterleşme tepkimesini katalizlemişlerdir.

Birinci kısımda, grafen oksit (GO), demir oksit ( $Fe_3O_4$ ), grafen oksit/demir oksit nanokompoziti (GO/ $Fe_3O_4$ ), manyetik kitosan ( $Fe_3O_4/KT$ ) ve grafen oksit/demir oksit/kitosan nanokompoziti (GO/ $Fe_3O_4/KT$ ) üretilmiştir.

İkinci kısımda, üretilen tüm nanoparçacıklara çapraz bağlayıcılar olan glutaraldehit (GA) ve epiklorohidrin (EPH) eşliğinde *Candida antarctica* lipazı kovalent bağlama yöntemi ile tutuklanmıştır. Tutuklanmış ve serbest enzim aktivitesinin sıcaklık, pH, tutuklama süresi, yüzey aktif madde derişimi ve çapraz bağlayıcı derişiminden nasıl etkilendiği incelenmiştir. Ayrıca üretilen saf ve enzim yüklü nanoparçacıkların yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak karakterize edilmiştir.

Serbest enzimin uygun pH değeri 6 ve sıcaklık değeri 30 °C olarak tespit edilmiş ve bu koşullarda enzimatik aktivitesi 35 U bulunmuştur.

GO,  $Fe_3O_4$  ve GO/ $Fe_3O_4$  üzerine tutuklanmış lipazların aktivite üzerine etkisini incelemek için nanoparçacıklar öncelikle 250 mM GA ile 4 saat aktifleştirilmiş ve sonrasında 12 saat, 30 °C'de serbest Cal-B ile farklı pH larda (pH 5-8) tutuklama işlemine tabi tutulmuştur.  $Fe_3O_4$ -GA-Lİ tutuklanmış enzimin uygun pH'ı 7 ve enzimatik aktivitesi 22.4 U'dur. Uygun pH değerinde serbest enzimin sadece % 68'i kazanılabildiği görülmüştür. GO üzerine tutuklanmış enzimin uygun pH'nın serbest enzimininkine eşit olduğu görülmüştür. Her ikisinde de uygun pH 6 ve tutuklanmış enzim aktivitesi 25.12 U'dur. Serbest enzimin % 72'si kazanılabildiği görülmüştür. GO/ $Fe_3O_4$ -GA-Lİ enziminin

uygun pH'ta enzim aktivitesi 24.5 U ve kazanılan aktivite % 70'dir. GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> kompozitinde uygun pH'ın 8 olması pH değenin bir miktar alkali bölge civarına kaydığını göstermektedir.

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ, GO-GA-Lİ ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GO-GA-Lİ tutuklanmış lipazların termal kararlılığını incelemek için nanoparçacıklar öncelikle 250 mM GA ile 4 saat aktifleştirilmiş; sonrasında 30, 40, 50, 60 °C sıcaklıklarda ve pH 7'de 12 saat boyunca serbest Cal-B ile tutuklama işlemine tabi tutulmuştur. Serbest Cal-B için uygun sıcaklık 30 °C iken farklı destek materyallerine tutuklanmış enzimlerin üçünde en uygun sıcaklığı 40 °C bulunmuştur. Tutuklanmış enzimlerin Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ, GO-GA-Lİ ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GO-GA-Lİ 40 °C'de aktiviteleri sırasıyla 24.5, 26.86 ve 24.8 ünedir; relatif aktiviteleri ise sırasıyla %74.2, %81.4 ve %75.15'tir. Enzim ve destek maddeleri arasında oluşan kovalent bağlanma sırasında moleküllerin konformasyonel hareketliliği sınırlandırıldığından, değişik deaktivasyon güçlerine karşı stabilitede artış gözlenmiştir.

Nanoparçacıkların çapraz bağlayıcılar ile aktive edilmesinden sonra, aktif nanoparçacıkların belli bir süre enzim ile etkileşime geçmesiyle aralarında kovalent bir bağ oluşur. Bu bağın oluşması için uzunca bir süre geçmesi gerekir. Üç farklı aktif destek materyali serbest lipaz ile 8-24 saat aralığında kovalent bağlanma için tepkimeye girmiştir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ, GO-GA-Lİ ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GO-GA-Lİ enzimlerinin uygun sıcaklık ve bu sıcaklıktaki aktiviteleri sırasıyla şöyledir: 16 saat, 26.95 U; 16 saat, 28.98 U ve 12 saat, 24.80 U. GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanokompozitinin tepkimeyi hızlandırdığı gözlenmiştir. Her üç durumda da serbest enzimin %100'ü kazanılamamıştır. Süre ne kadar uzun tutulursa tutulsun enzimin belli bir kısmı bağlanamayıp sıvıda kalmış ve serbest enzimin sadece % 75-80'i kazanılabilmektedir.

Bu çalışmada glutaraldehit ve epiklorohidrin olmak üzere iki tür çapraz bağlayıcı ile çalışılmış ve aktivite üzerine etkileri incelenmiştir. Derişimi 150-300 mM arasında değişen çapraz bağlayıcılar ile nanoparçacıklar 4 saat, 30 °C'de aktive edilmiştir. Üç farklı destek materyalinde de genel olarak 250 mM GA ve 200 mM EPH derişimi en iyi sonuçları vermiştir. Belli bir çapraz bağlayıcı miktarına kadar derişim artmış, sonrasında muhtemelen fazla aktifleyici enzimin tersiyer yapısını değiştirerek

denatürasyona sebep olmuştur. GA'nın EPH ye göre daha yüksek aktivite sağladığı görülmüş ve diğer tüm deneylerde GA çapraz bağlayıcı olarak seçilmiştir. GA'nın daha yüksek bir aktivite göstermesi muhtemelen GA yapısındaki aldehitlerin önce destek yüzeyine bağlanması ve daha sonra kalan aldehit gruplarının enzimün  $-NH_2$  grubuna bağlanarak sağlam bir yapı oluşturması olarak açıklanabilir.

Son zamanlarda, enzim tutuklama yöntemlerinde enzimün aktif merkezini korumak için ortama çeşitli katkı maddeleri eklenmektedir. İki lipaz molekülünün açık formu arasındaki etkileşim sonucu lipaz homo- veya heterodimerleri oluşur. Yüzey aktif maddeler oluşan bu lipaz homo- veya heterodimerleri kırarak lipazın açık halini dengede tutarlar ve lipaza hiperaktivite kazandırır. Ayrıca yüzey aktif maddeler lipazın topaklanmasını önleyerek arayüzey alanını dengede tutarlar ve böylece substratın enzime ulaşmasını kolaylaştırır. Bu çalışmada noniyonik yüzey aktif maddeler Tween 80 ve Triton X-100 kullanılarak tutuklama üzerine etkisi incelenmiştir. Derişimi 10-50 mM arasında değişen katkı maddeleri destek materyalinin aktive edilmesi için ultrasonik banyoda ve tampon ortamında (pH 7.0) 45 dk tepkimeye girmiştir. Genel olarak,  $Fe_3O_4$ -GA-Lİ destek materyali için katkı maddeleri negatif etki gösterirken GO-GA-Lİ ve GO/ $Fe_3O_4$ -GA-Lİ destek materyalleri için katkı maddeleri azda olsa pozitif etki göstermiştir. Bunun sebebi destek materyallerinin farklı gruplar içermesi ve katkı maddelerinin bu gruplara bağlanarak farklı bir konformasyonel yapı oluşturmasıdır.

Son kısımda ise, en uygun koşullarda üretilen tutuklanmış enzimler (R,S)-1-feniletanolün saf enantiyomerlerini elde etmek için kullanılmışlardır. En iyi sonuçları GO ve GO/ $Fe_3O_4$  üzerine tutuklanan enzimler vermiştir. GO-GA-Lİ enzimi 4 saat sonunda % 50.73 dönüşüm ile % 99 enantiyo aşırılık (ee) ve 507.74 enantiyomerik oran (E) değeri göstermiştir. GO/ $Fe_3O_4$ -GA-Lİ ise 8 saat sonunda % 49.02 oranında dönüşüme ulaşmış; sırasıyla % 94.32 ee % ve 375.77 E değerlerini göstermiştir. Yapılan çalışmada üç farklı destek materyalinin rasemik 1-feniletanolün kinetik rezolüsyonunda farklı etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.  $Fe_3O_4$ -GA-Lİ enzimi ile saf enantiyomerler elde edilemezken, GO-GA-Lİ ve GO/ $Fe_3O_4$ -GA-Lİ enzimleri ile % >99 ve % 94.32 oranında enantiyomerik aşırılık değerleri ile saf enantiyomerler elde edilebilmiştir.

Tutuklanmış enzimler enantiyoseçimli transesterleşme tepkimesinde 5 kez kullanılmış ve küçük miktarda enantiyoseçimlilik ve enantiyomerik oran değerinde azalma görülmüştür. Yapılan çalışma ile tutuklanmış enzimlerin kararlı bir yapı oluşturduğu gözlenmiştir. Buna ek olarak, tutuklanmış enzimlerin bir katalitik sistemden diğerine kolayca aktarılabilmesi görülmüştür. Bu durumda enzimler tekrar tekrar kullanılabilir ve böylece maliyetin düşmesi sağlanır.

Sonuç olarak, yapılan çalışmada kararlı ve çevre koşullarına daha dayanıklı enzimler üretilmiştir. Bu çalışmadaki tutuklanmış enzimlerden özellikle GO-GA-Lİ ve GO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-GA-Lİ enzimlerinin kararlı bir yapı kazandığı ve rasemik-1-feniletanolün saf enantiyomerlerini ayırmak için uygun birer katalizör oldukları görülmüştür. Tutuklanmış enzimlerin tekrar tekrar kullanılması ekonomik açıdan çok önemlidir. Çalışmada tutuklanmış enzimlerin en az beş kez kullanılabilmesi gözlenmiştir. Yapılan çalışma ileride yapılacak endüstriyel uygulamalar için yol gösterici olabilir.

## 7. ÖNERİLER

Bu çalışmada bazı kısıtlamalar da mevcuttur. Çalışmanın geliştirilmesi gereken yönü, tutuklanmış enzimlerde görülen aktivite kaybıdır. Tüm destek materyellerine tutuklama yapılırken enzimler aktivite kaybına uğramıştır. Kazanılan aktivite yaklaşık %70-80 oranındadır. Kovalent bağlamada tutuklama koşulları diğer tutuklama yöntemlerine göre daha karmaşıktır. Bu nedenle kovalent bağlamada enzimin aktif merkezi ve konformasyonel yapısı değişiklik göstermekte ve buna bağlı olarak enzimin aktivitesi düşmektedir. Aktivite düşmesini engellemek için enzimin katalitik aktivite gösteren grupları dışındaki fonksiyonel gruplarının taşıyıcıya bağlanması gerekmektedir. Aktif bölgenin aminoasit kalıntılarıyla inaktivasyon reaksiyonlarının engellenmesi sonucunda yüksek aktiviteler elde edilmektedir. Ya da tersinir, kovalent olarak bağlanmış enzim-inhibitör kompleksi kullanılabilir.

Kovalent bağlamada kullanılan çapraz bağlayıcılar ile kararlı, çevredeki çözeltiliye sızıntı yapmayan tutuklanmış enzim türevleri elde edilmektedir. Bağlanma reaksiyonlarının ve kovalent bağ yapabilen taşıyıcıların çeşitliliği bu yöntemin genellikle kullanılan bir tutuklama yöntemi olmasını sağlamaktadır. Aktivite kaybının sebeplerinden biri uygun olmayan çapraz bağlayıcı olabilir. Kloroformat, bioksiranlar, divinilsülfonlar, metal geçiş iyonları ve heterosiklik halojenürler gibi farklı aktifleyicilerin bu çalışmada kullanılan destek materyellerine daha uygun olup olmadığı araştırılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Akkuş, P. 2006. Lipaz Kullanılarak Şeker Esteri Sentezi. Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 125, Kocaeli.
- Akoh, C.C. and 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 Taşıyıcılara İmmobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 140, İstanbul.
- Alloue, W., Destain, J., Amighi, K. and Thonart, P. 2007. Storage of *Yarrowia lipolytica* lipase after spray-drying in the presence of additives. Process Biochemistry, 42, 1357–1361.
- Arıca, M.Y. and 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.
- Arroyo, M., Sanchez-Montero, M.J. and Sinisterra, J.V. 1998. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media. Enzyme and Microbial Technology, 24, 3–12.
- Atila-Dincer, C., Yildiz, N., Aydogan, N. and Calımlı, A. 2014. A comparative study of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles modified with different silane compounds. Applied Surface Science, 318, 297–304.
- Babaarslan, Ç. 2006. Biyokatalitik olarak enantiyoseçimli α-hidroksi keton üretim prosesinin geliştirilmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 128, Ankara.
- Barbosa, J.M.P., Ranyere, L., Alini, T., Fricks, F., and Soares, L. 2012. Biochemical characterisation of lipase from a new strain of *bacillus* sp. Quim. Nova, 35(6),1173-1178.
- Bezbradicaa, D., Jugoviç, B., Gvozdenovic, M., Jakovetic, S. and Knezevi, Z. 2011. Electrochemically synthesized polyaniline as support for lipase immobilization. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 70, 55–60.
- Bjokling, F., Godtfredsen, S.E., Kirk, O. 1991. The future Impact of Industrial Lipases. Trends in Biotechnology, 9, 360-363.

- Brem, J., Pilbák, S., Paizs, C., Bánóczy, G., Irimie, F. D., Toşa, M. I., & Poppe, L. 2011. Lipase-catalyzed Kinetic Resolutions of Racemic 1-(10-ethyl-10H-phenothiazin-1,2, and 4-yl)ethanols and Their Acetates. *Tetrahedron Asymmetry*, 22(8), 916-923.
- Brena B., González-Pombo P., Batista-Viera F. 2013. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In: Guisan J. (eds) *Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 1051. Humana Press, Totowa, NJ.
- Bussamara, R., Agnol, L. D., Schrank, A., Fernandes, K. F. and Vainstein M. H. 2011. Optimal Conditions for Continuous Immobilization of *Pseudozyma hubeiensis* (Strain HB85A) Lipase by Adsorption in a Packed-Bed Reactor by Response Surface Methodology. *Hindawi Publishing Corporation Enzyme Research*, Article ID329178.
- 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.
- Caterina, G.C.M., Leonardo, A., Henrique, E. 2009. Enantioselective transesterification catalysis by *Candida antarctica* lipase immobilized on superparamagnetic nanoparticles. *Tetrahedron: Asymmetry*, 20, 2299–2304.
- Cernia, E., Deflini, M., Cocco, E., Palocci, C. and Soro, S. 2002. Investigation of lipase-catalysed hydrolysis of naproxen methyl ester : Use of NMR spectroscopy methods to study substrate-enzyme interaction. *Bioorganic Chemistry*, 30, 276-284.
- Chang, Q. and Tang, H. 2014. Immobilization of Horseradish Peroxidase on NH<sub>2</sub>-Modified Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> Particles and Its Application in Removal of 2,4 Dichlorophenol. *Molecules*, 19, 15768-15782.
- Chang Q., Huang J., Ding Y., Tang H. 2016. Catalytic Oxidation of Phenol and 2,4-Dichlorophenol by Using Horseradish Peroxidase Immobilized on Graphene Oxide/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. *Molecules*, 21(8), 1044.
- Chiaradia, V., Soares, N.S., Valério, A., Débora de Oliveira, Araújo, P.H.H. and Sayer, C. 2016. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B on Magnetic Poly(Urea-Urethane) Nanoparticles. *Appl Biochem Biotechnol*, 180, 558–575.
- Ching-Shih, C. and Sih J. C. 1989. General Aspects and Optimization of Enantioselective Biocatalysis in Organic Solvents: The Use of Lipases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28, 695-707.
- Choudhury, P. and Bhunia, B. 2015. Industrial Application of Lipase: A Review. *Biopharm Journal*, 1(2), 41-47.

- Fonseca dos Reis, E., Campos, F.S., Lage, A.P., Leite, R.C., Heneine, L.G., Vasconcelos, W.L., Lobato, Z.P. and Mansur, H.S. 2005. Synthesis and Characterization of Poly (vinyl alcohol) Hydrogels and Hybrids for rMPB70 Protein Adsorption. *Materials Research*, 9(2),185-191.
- Foresti, M.L., Valle, G., Bonetto, R., Ferreira, M.L. and Briand, L.E. 2010. FTIR, SEM and fractal dimension characterization of lipase B from *Candida antarctica* immobilized onto titania at selected conditions. *Applied Surface Science*, 256, 1624–1635.
- Frings, K., Koch, M., Hartmeier, W. 1999. Kinetic resolution of 1-phenyl ethanol with high enantioselectivity with native and immobilized lipase in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 303–309.
- Gao, X. 2004. Immobilization of Lipases via Sol-Gel Procedures and Application of the Immobilized Lipases in Oleochemical Reactions. PhD Thesis, University of Nebraska, 166, 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.
- Garcia-Galan, C., Barbosa, O., Hernandez, K., dos Santos, J. C. S., Rodrigues, R. C. and Fernandez-Lafuente, R. 2014. Evaluation of Styrene-Divinylbenzene Beads as a Support to Immobilize Lipases. *Molecules*, 19, 7629-7645.
- Garrett, R., Grisham, C. 1999. *Biochemistry*, 2nd edition, edited by S. Kiselica, Saunder College Publishing, 426-435, Orlando, Florida.
- Ghanem, A. and Aboul-Enein, H.Y. 2004. Lipase-Mediated Chiral Resolution of Racemates in Organic Solvents. *Tetrahedron: Asymmetry*, 78(15), 3331-3351.
- Ghosh, P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P., Davidson, S. 1996. *Microbial Lipases: Production and Applications*. Science Progress, 79, 119-157.
- Goswami A. and Goswami J. 2005. DMSO-triggered enhancement of enantioselectivity in Novozyme[435]-catalyzed transesterification of chiral 1-phenylethanols. *Tetrahedron Letters*, 46, 4411–4413.
- Gupta, P., Dutt, K., Misra, S., Raghuwanshi, S., Saxena, R.K. 2009. Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde. *Bioresource Technology*, 100, 4074–4076.
- Gül, Ü. D. 2013. Fungal Lipazlar ve Endüstride Kullanım Alanları. *Afyon Kocatepe University Journal of Science and Engineering*, 13:1-8.
- Hernandez-Fernandez, F.C., Rios, A.P., Tomas-Alonso, F., Gomez, D. and Villora, G. 2009. Kinetic resolution of 1-phenylethanol integrated with separation of substrates and products by a supported ionic liquid membrane. *Chem Technol Biotechnol*, 84, 337–342.

- Hung, T.C., Giridhar, R., Chiou, S.H., Wu, W.T. 2003. Binary Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase on Chitosan, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26, 69-78.
- İşbakan, N. 2006. Lipaz enzimi biyokatalizörlüğünde enantiyomerik saflıkta 1-fenil-1-propanolün transesterleşme tepkimesiyle kinetik rezolüsyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 107, Ankara.
- Jaeger, K.E. and Reetz, M.T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 16, 396–403.
- Jiang, Y., Guo, C., Xia, H., Mahmood, I., Liu, C. and Liu, H. 2009. Magnetic nanoparticles supported ionic liquids for lipase immobilization: Enzyme activity in catalyzing esterification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58, 103–109.
- Jochems, P., Satyawali, Y., Diels, L. and Dejonghe, W. 2011. Enzyme immobilization on/in polymeric membranes: status, challenges and perspectives in biocatalytic membrane reactors (BMRs). *Green Chem.*, 13, 1609-1623.
- Karaca, N. 2006. Poli(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, 123, Ankara.
- Karadeniz, F. 2007. Rasemik 1-fenil 1-propanolün Lipaz katalizörlüğünde enantiyoseçimli Esterleşme Tepkimesiyle Kinetik Rezolüsyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 145, Ankara.
- Kasavi, C. 2006. Kovalent bağlanma ve fizikseladsorpsiyon metotları ile proteaz enziminin immobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 81, İstanbul.
- Kharissova, V.O., García, B.O., Kharisov, B.I. and Méndez U.O. 2016. Magnetic-Graphene-Based Nanocomposites and Respective Applications. *InTech*, 51, Rijeka.
- Klahn, M., Lim, G. S., Seduraman, A. and Wu, P. 2011. On the different roles of anions and cations in the solvation of enzymes in ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13, 1649–1662.
- Krishna, S.H. and Karanth, N.G. 2002. Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catalysis Reviews*, 44(4), 499-591.
- Lau, S.C., Lim, N.H., Basri M., Masoumni, H.R.F., Tajudin, A., Huang, N.M., Pandikumar, A., Chia, C.H., Andou, Y. 2014. Enhanced Biocatalytic Esterification with Lipase-Immobilized Chitosan/Graphene Oxide Beads. *Plos One*. 9(8), 104695.

- León-Mancilla, B.H., Araiza-Téllez, M.A., Flores-Flores, J.O. and Pina-Barba, M.C. 2016. Physico-chemical characterization of collagen scaffolds for tissue engineering. *Journal of Applied Research and Technology* 14, 77–85.
- Létant, S.E., Hart, B.R., Kane, S.R., Hadi, M.Z., Shields, S.J. and Reynolds J.G. 2004. Enzyme Immobilization on Porous Silicon Surfaces. *Advanced Materials*, 16, 689-693.
- Li, L., Fan, L., Luo, C., Duan, H. and Wang, X. 2014. Study of fuchsine adsorption on magnetic chitosan/graphene oxide. *RSC Advances*, 4, 37114.
- López, R.G., Pineda, M.G., Hurtado, G., Ramón Díaz de León, Fernández, S., Saade, H. and Bueno, D. 2013. Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles Prepared in One Step by Reverse Microemulsion Precipitation. *Int. J. Mol. Sci.*, 14,19636-19650.
- Martinelle, M., Holmquist, M. and Hult, K. 1995. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1258, 272-276.
- Mohamada, N.R., Marzukia, N.R., Buanga, N.A., Huyopb, F. and Abdul Wahab, R. 2015. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), 205-220.
- Mojovic, L., Knezevic, Z., Popadic, R., Jovanovic, S. 1998. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on a polymer support. *Appl Microbiol Biotechnol*, 50, 676-681.
- Moreno J.M., Sinisterra J.V. 1994. Immobilization of Lipase from *Candida Cylindracea* in Inorganic Supports. *J. Mol. Catal.*, 93, 357-369.
- Nelson, J.M. and Griffen, E.G. 1916. Adsorption of Invertase. *Journal of the American Chemical Society*, 38, 1109–1115.
- Nguyen, L.A., He, H. and Pham-Huy C. 2006. Chiral Drugs: An Overview. *International Journal of Biomedical Science*, 2(2), 85–100.
- Öztürk, B. 2001. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports. Yüksek Lisans Tezi, İzmir Institute of Technology, 87, Turkey.
- Panek, A., Pietrow, O., Synowiecki, J. and Filipkowski, P. 2013. Immobilization on magnetic nanoparticles of therecombinant trehalose synthase from *Deinococcus geothermalis*. *Food and bioproducts processing*, 9, 632–637.
- 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.

- Poojari Y. and Clarson S.J. 2013. Thermal stability of *Candida antarctica* lipase B immobilized on macroporous acrylic resin particles in organic media. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2, 7–11.
- Rehman, S., Bhatti, H.N., Bilal M. and Asgher, M. 2016. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of *Pencillium notatum* lipase enzyme with improved activity, stability and reusability characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 1161–1169.
- Rios, S.N., Pinheiro, P.M., José, S., Lima, D.L., Marcos C. de Mattos, Freire, D.M.G., Ivanildo, J., Rodríguez-Aguado, E., Gonçalves, L.R.B. 2016. Strategies of covalent immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B on pore-expanded SBA-15 and its application in the kinetic resolution of (*R,S*)-Phenylethyl acetate. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic* 133, 246–258.
- Salameh, M. and Wiegel, J. 2010. Effects of Detergents on Activity, Thermostability and Aggregation of Two. Alkalithermophilic Lipases from *Thermosyntropha lipolytica* *The Open Biochemistry Journal*, 4, 22-28.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. 2001. Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627-662.
- Sheldon, R.A. 1993. *Chirotechnology*. Marcel Dekker, Inc, 47-83, New York.
- Sheldon, R. A. 2007. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts. 7th International Conference on Protein Stabilization. Department of Biotechnology, Delft University of Technology, Julianalaan 136, 2628 BL Delft, The Netherlands.
- Sikora, A., Chełminiak-Dudkiewicz, D., Siódmiak, T., Tarczykowska, A., Sroka, W., Ziegler-Borowska, M. and Marszał, M. 2016. Enantioselective acetylation of (*R,S*)-atenolol: The use of *Candida rugosa* lipases immobilized onto magnetic chitosan nanoparticles in enzyme-catalyzed biotransformation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 134, 43-50.
- Singh, A.K. and Mukhopadhyay, M. 2014. Immobilization of *Candida antarctica* lipase onto cellulose acetate-coated Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles for glycerolysis of olive oil. *Korean J. Chem. Eng.*, 31(7), 1225-1232.
- Singh, M.N., Hemant, K.S.Y., Ram, M., and Shivakumar, H.G. (2010). Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 65–77.
- Solanki, K. and Gupta, M.N. 2011. Simultaneous purification and immobilization of *Candida rugosa* lipase on superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for catalyzing transesterification reactions. *New J. Chem.*, 35, 2551–2556.
- Surewicz, W.K., Mantsch, H.H. and Chapman, D. 1993. Determination of Protein Secondary Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A Critical Assessment. *Biochemistry*, 32(2), 389-394.

- Takac, S. and 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.
- Telefoncu, A. 1997. Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskısı, 249-306, Kuşadası-Türkiye.
- Tolasz, J., Štengl, V. and Ecorchard, P. 2014. The Preparation of Composite Material of Graphene Oxide–Polystyrene 3rd International Conference on Environment, Chemistry and Biology. IPCBEE vol.78, Singapore.
- Tüzün, C. 1994. Stereokimya. Palme Yayıncılık, Ankara.
- Turcu, M.C. 2010. Lipase-catalyzed approaches towards secondary alcohols: intermediates for enantiopure drugs. University of Turku, Institute of Biomedicine, Faculty of Medicine, Turku, Finland.
- Uozaki, R.R., Iwasaki, Y. and Yamane, Y., 1997. Repeated Use of Immobilized Lipase for Monoacylglycerol Production of Solid-phase Glycerolysis of Olive Oil, *JAOCS*, 74, 445-450.
- 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, Kimya Anabilim Dalı, 106, Aydın.
- Vakhlu, J. and Kour, A. 2006. Yeast Lipases: Enzyme Purification, Biochemical Properties and Gene Cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9, 69-85.
- 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.
- Wiseman, A. 1995. Introduction to principles. In: Wiseman A (ed). *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 3rd edn. Ellis Horwood Ltd, Cornwall, 3–8.
- Xue, B., Zhu, J., Liu, N. and Li, Y. 2015. Facile functionalization of graphene oxide with ethylenediamine as a solid base catalyst for Knoevenagel condensation reaction. *Catalysis Communications*, 64, 105–109.
- Yadav, G.D., Jadhav, S.R. 2005. Synthesis 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.
- Yadav, M., Rhee, K.Y., Park, S.J. and Hui, D. 2014. Mechanical Properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/GO/chitosan Composites. *Composites: Part B*, 66, 89–96.

- Ye, N., Xie, Y., Shi, P., Gao, T. and Ma, J. Synthesis of Magnetite/Graphene oxide/Chitosan Composite and its Application for Protein Adsorption. *Materials Science and Engineering C*, 45, 8–14.
- 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.
- Yılmaz, E. 2010. Farklı Teknikler Kullanarak Değişik Destek Materyallerine lipaz Immobilizasyonu ve Biranti-inflammatör Olan *S*-naproksenin Oluşumunda Kullanılması. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 261, Konya.
- Zaitsev, S.Y., Gorokhova, I.V., Kashtigo, T.V., Zintchenko, A. and Dautzenberg, H. 2003. General Approach for Lipases Immobilization in Polyelectrolyte Complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineering Aspects*, 221, 209-220.
- Zhang, H., Feng, J., Fei, T., Liu, S. and Zhang, T. 2014. SnO<sub>2</sub> nanoparticles-reduced graphene oxide nanocomposites for NO<sub>2</sub> sensing at low operating temperature. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 190, 472–478.
- Zhu, W., Li, Y., Zeng, F., Yin, H., Wang L. and Zhu, H. 2015. Superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles modified by water-soluble and biocompatible polyethylenimine for lipase immobilization with physical and chemical mechanisms. *The Royal Society of Chemistry*, 5, 23039–23045.
- Zucca, P., Fernandez-Lafuente, R. and Sanjust, E. 2016. Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization. *Molecules*, 21, 1577.

## **EKLER**

EK 1 (R,S)-1-feniletanol'e Ait Kalibrasyon Grafiği

EK 2 (R,S)-1-feniletanol'e Ait Fiziksel Özellikler

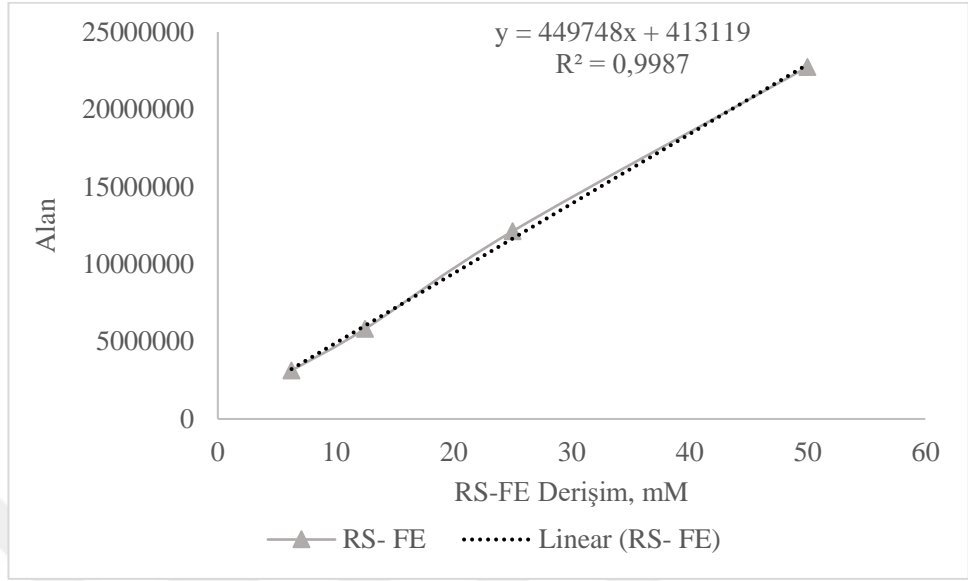
EK 3 (R)-1-feniletanol ve (S)-1-feniletanol'e Ait HPLC Kromatogramı ve

Enantiyoseçicilik Örnek Hesabı

EK 4 Enzim Aktivitesi Ölçüm Hesabı

EK 5 Kullanılan Kimyasallara Ait Fiziksel Özellikler

### EK 1 (R,S)-1-Feniletanol'e Ait Kalibrasyon Grafiği



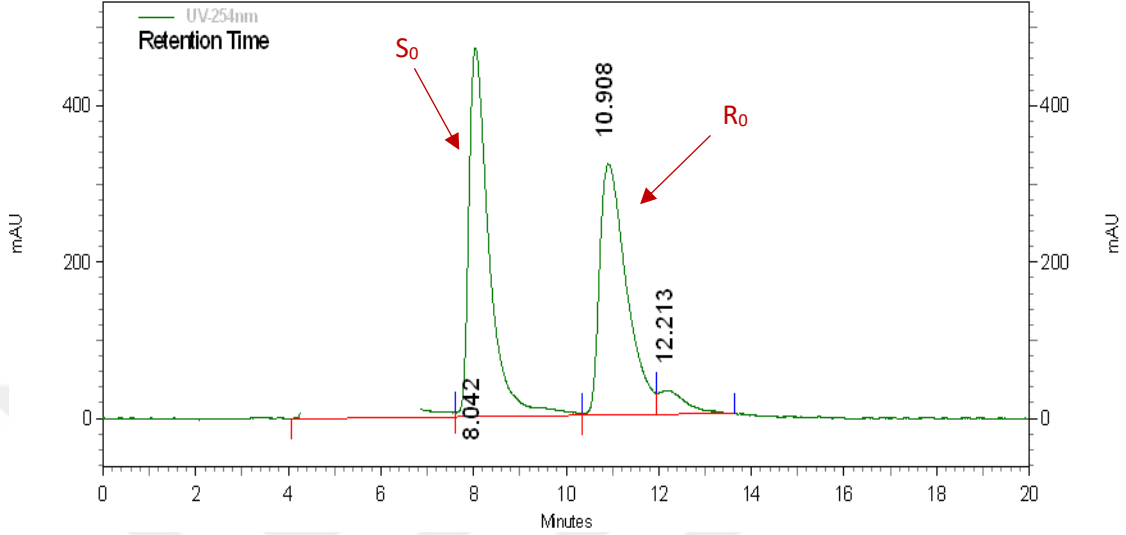
Şekil 1 Rasemik 1-feniletanolün kalibrasyon grafiği, 254 nm

## EK 2 (R,S)-1-Feniletanol'e Ait Fiziksel Özellikler

Çizelge 1 (R,S)-1-feniletanol'e Ait Fiziksel Özellikler

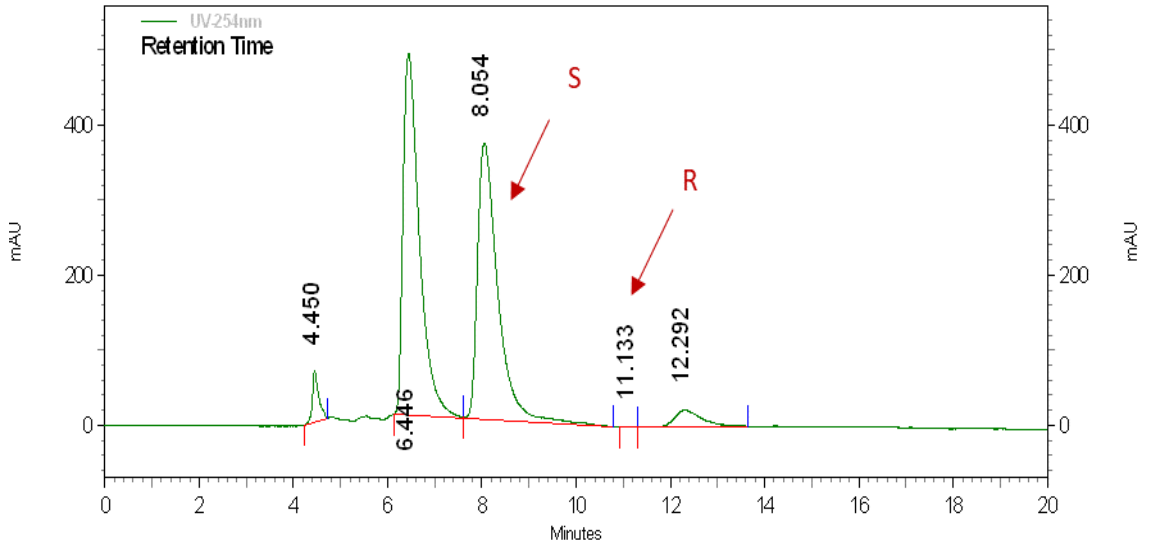
<b>Diğer adı</b>	Metil fenil karbinol, stiren alkol, alfa-metilbenzil alkol
<b>Kapalı formülü</b>	$C_6H_5CH(OH)CH_3$
<b>CAS no</b>	98-85-1
<b>Molekül ağırlığı</b>	122.16 g/mol
<b>Yoğunluk</b>	1.012 g/mL (25 °C'da)
<b>Kaynama noktası</b>	204 °C

### EK 3 (R)-1-Feniletanol Ve (S)-1-Feniletanol'e Ait HPLC Kromatogramı ve Enantiyoseçicilik Örnek Hesabı



Şekil 1 (R,S)-1-feniletanolün referans HPLC kromatogramı

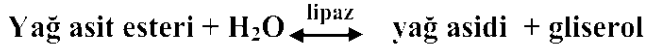
( $C_{(R,S)-1-FE}$ =120 mM,  $C_{VA}$ =240 mM, Org. çözücü=Heptan,  $V_{top}$ =3 ml,  $M_{moleküler\ elek}$ =100 mg,  $T$ =40 °C,  $N$ =150 rpm)



Şekil 2 (R)-1-feniletanol ve (S)-1-feniletanol'e Ait HPLC Kromatogramı

( $C_{(R,S)-1-FE}$ =120 mM,  $C_{VA}$ =240 mM, Org. çözücü=Heptan,  $V_{top}$ =3 ml,  $M_{moleküler\ elek}$ =100 mg,  $T$ =40 °C,  $t$ =6 saat,  $N$ =150 rpm,  $M_{GO-GA-Li}$ =50 mg, enzim aktivitesi=28.98 U)

#### EK 4 Titrimetrik Aktivite Örnek Hesabı



Bir ünite enzim (U), bir dakikada 1 µmol yağ asidi açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

$$\text{Spesifik Aktivite (U/ml veya mg)(µmol /dak.ml veya mg)} = (V_1 - V_2) * C * 1000 / 20 * E$$

$V_1$  = Numune için sarf edilen NaOH hacmi (ml)

$V_2$  = Şahit için sarf edilen NaOH hacmi (ml)

$C$  = NaOH konsantrasyonu ( mol/l )

$E$  = Numunenin miktarı (ml veya mg)'dir.

Toplam aktivite (U:ünite), spesifik aktivitesi saptanan örneğin miktarı (ml veya mg) ile spesifik aktivite değerinin çarpılmasıyla hesaplanır.

$$V_1 = 2.95 \text{ ml}, V_2 = 0.1 \text{ ml}, C = 0.191 \text{ M}, E = 20 \text{ mg}$$

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{(3.1 - 0.1) \times 0.191 \times 1000}{20 \times 20} = 1.432 \text{ U/mg}$$

$$\text{Toplam aktivite} = 1.432 \frac{\text{U}}{\text{mg}} \times 20 \text{ mg} = 28.65 \text{ U}$$

## EK 5 Kullanılan Kimyasallara Ait Fiziksel Özellikler

Çizelge 1 Kullanılan Kimyasallara Ait Fiziksel Özellikler

Adı	Kapalı Formül	Erime Sıc., °C	Kaynama Sıc., °C	Molekül Ağırlığı g/mol	Yoğunluk g/ml
<b>MTBE</b>	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	-109	55.2	88.15	0.74
<b>Hegzan</b>	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	-95	69	86.18	0.65
<b>Toluen</b>	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	-93	110.6	92.14	0.87
<b>Heptan</b>	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub>	-90.6	98.4	100.20	0.68
<b>Vinil asetat</b>	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	-93.0	72	86.09	0.93
<b>Glutaraldehit</b>	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	-14.0	187	100.117	1.06
<b>Epiklorohidrin</b>	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> ClO	-25.6	117.9	92.52	1.18
<b>Triton X-100</b>	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub>	6	270	647	1.07
<b>Tween 80</b>	C <sub>32</sub> H <sub>60</sub> O <sub>10</sub>	-20.5	>100	604.82	1.08

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gülcan COŞKUN

Doğum Yeri : İzmit

Doğum Tarihi: 15.09.1984

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce, Fransızca

### Eğitim Durumu

Lise : Kocaeli Teknik Lisesi (2002)

Lisans : Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık  
Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü (2012)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,  
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı (Şubat 2015-Mart 2018)

### Çalıştığı Kurumlar

Sito-Patoloji Tanı Laboratuvarı (2013-2014)

Bekaert İzmit Çelik Kord San. Tic.A.Ş. (2014)

### Uluslararası Kongre Sunum

Coşkun, G., Çıplak, Z., Yıldız, N. and Mehmetoğlu, Ü. 2017. Immobilization of Lipase Enzyme on Nanosized Materials and Investigation of the Enzymatic Activity. 22nd International Symposium on Biomedical Science & Technology, Ankara.