



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



LİPAZ ENZİMİNİN UV IŞINLARIYLA SERTLEŞEBİLEN SOL-JEL HİBRİT KAPLAMA FİLMLERİNE KOVALENT İMMOBİLİZASYONU

DİLEK DÖNGEZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Serap DEMİR

EŞ-DANIŞMAN

Prof. Dr. Ayşe OGAN

İSTANBUL, 2015



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



LİPAZ ENZİMİNİN UV IŞINLARIYLA SERTLEŞEBİLEN SOL-JEL HİBRİT KAPLAMA FİLMLERİNE KOVALENT İMMOBİLİZASYONU

DİLEK DÖNGEZ
(520613005)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Programı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Serap DEMİR

EŞ-DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe OGAN

İSTANBUL, 2015

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, ortaya çıkan her türlü probleme getirmiş olduğu bakış açısı ve yaklaşımları ile bana yol gösteren, iyi bir çalışma ortamı sağlayan ve her zaman desteğini hissettiren tez danışmanım değerli hocam Sayın Doç. Dr. Serap DEMİR'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tez konumun seçilmesinde ve tüm aşamasında her konuda büyük ilgi ve desteğini gördüğüm ikinci danışmanım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe OGAN'a,

Tez çalışmasında polimerik destek materyalinin sentezlenmesinde yardımcı olan Doç.Dr. Memet Vezir KAHRAMAN ve Araş. Gör. Aslı BEYLER ÇİĞİL'e,

Tez çalışmam da benden yardımını esirgemeyen Araş. Gör. Dr. Soner Çubuk'a,

Yüksek lisans yapmam konusunda beni destekleyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü anımda yanımda olan canım arkadaşım Pınar ERZİNCAN'a,

Tüm hayatım boyunca her daim desteğini benden esirgemeyen, her zaman yanımda olacaklarını bildiğim canım aileme,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Nisan, 2015

Dilek DÖNGEZ

İÇİNDEKİLER

SAYFA

TEŞEKKUR	İ
İÇİNDEKİLER	İi
ÖZET	V
ABSTRACT	Vi
SEMBOLLER	Viii
KISALTMALAR	İx
ŞEKİL LİSTESİ	X
TABLO LİSTESİ	Xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	2
1.1.1. Enzim Kinetiği	3
1.1.2. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	6
1.1.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Etki Eden Faktörler	7
1.1.3.1. Enzim konsantrasyonunun etkisi	7
1.1.3.2. Substrat konsantrasyonunun etkisi	7
1.1.3.3. Sıcaklığın etkisi	7
1.1.3.4. pH etkisi	7
1.1.3.5. Makromoleküler kalabalık derecesi	7
1.1.4. Enzim immobilizasyonu	7
1.1.4.1. Taşıyıcı destek materyali	9
1.1.4.2. Enzim immobilizasyon yöntemleri	9
1.1.5. Lipaz Enzimi	11

1.1.5.1. Lipazların kaynakları	13
1.1.5.2. Lipazların sınıflandırılması	13
1.1.5.3. Lipaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlar	14
1.1.5.4. <i>Candida rugosa</i> lipazı (CRL)	15
1.1.6. Sol-Jel Yöntemi	15
1.1.7. UV Sertleşebilen Polimerler	15
1.1.8. İlgili Literatür Işığı Altında Çalışmanın Yeri	16
2. MATERYAL VE YÖNTEM	18
2.1. Araştırmada kullanılan cihazlar	18
2.2. Araştırmada kullanılan kimyasallar	18
2.3. Deneysel Çalışmalar	21
2.3.1. Polimerik Destek Materyalinin Hazırlanması	21
2.3.2. Polimerik Desteğin Karakterizasyonu	21
2.3.3. Lipaz enziminin immobilizasyonu	21
2.3.4. Bradford Metoduna Göre Protein Tayini	21
2.3.5. Hidrolitik Aktivite Tayini	23
2.3.5.1. Serbest ve immobilize enzim üzerine pH etkisi	23
2.3.5.2. Serbest ve immobilize enzim üzerine sıcaklık etkisi	23
2.3.5.3. Serbest ve immobilize enzimlerin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi	23
2.3.5.4. İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi	23
2.3.5.5. Serbest ve immobilize enzim üzerine depolama kararlılıklarının etkisi	24
2.3.6. Sentetik Aktivite Tayini	24
2.3.6.1. Serbest ve immobilize enzim üzerine sıcaklık etkisi	24
2.3.6.2. Serbest ve immobilize enzimlerin K_m ve V_{max} değerlerinin Belirlenmesi	25

2.3.6.3. İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi	25
2.3.6.4. Serbest ve immobilize enzim üzerine depolama kararlılıklarının etkisi	25
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	26
3.1.Karakterizasyon	26
3.2. Polimerik Desteğe Lipaz Enzimin İmmobilizasyonu	28
3.3. Hidrolitik Aktivite Tayini	29
3.3.1. Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine pH Etkisi	29
3.3.2. Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine Sıcaklık Etkisi	30
3.3.3. Serbest ve İmmobilize Enzimin Kinetik Parametreleri	31
3.3.4. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği	33
3.3.5. Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine Depolama Süresinin Etkisi	33
3.4. Sentetik Aktivite Tayini	34
3.4.1. Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine Sıcaklık Etkisi	35
3.4.2. Serbest ve İmmobilize Enzimin Km ve Vmax Değerlerinin Belirlenmesi	36
3.4.3. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi	37
3.4.4. Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine Depolama Kararlılıklarının Etkisi	38
4. SONUÇLAR	40
KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	47

ÖZET

Lipaz Enziminin UV Işınlarıyla Sertleşebilen Sol-Jel Hibrit Kaplama Filmlerine Kovalent İmmobilizasyonu

Lipazlar lipidlerin metabolizmasında önemli enzimlerdir. EC 3.1.1.3. şeklinde hidrolazlar altında sınıflandırılırlar. Hidrolitik ve sentetik aktiviteye sahiptirler. Çeşitli kaynaklardan elde edilen lipazlar arasında *Candida rugosa*'dan elde edilen lipazlar yüksek aktiviteleri ve geniş bir spesifiklik göstermeleri nedeniyle daha fazla dikkat çekmektedir.

Bu çalışmada UV-sertleşebilen hibrit epoksi-silika film sol-jel metodu kullanılarak yapıldı. *Candida rugosa*'dan elde edilen Lipaz (E.C. 3.1.1.3) hibrit epoksi-silika film üzerine kovalent olarak immobilize edildi. 1 g polimere 7.22 mg enzim bağlandığı bulundu. Polimerik destegin morfolojisi Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) ve Fourier Dönüşümlü Infrared (FT-IR) karakterize edildi.

İmmobilize ve serbest enzimler sulu ortamda p-nitrofenil palmitatın hidrolizi ve hekzan içinde para nitrofenil linoleatın (para nitrofenol ve linoleik asitten) sentezi şeklinde iki farklı reaksiyon sisteminde analiz edildi. Hidrolitik aktivite ve sentetik aktivite yöntemleri kullanılarak serbest ve immobilize enzim üzerine depolama süresi, kinetik özellikleri, sıcaklık ve tekrar kullanılabilirlik gibi özellikleri incelenerek sonuçlar karşılaştırıldı.

Hidrolitik aktivite üzerine pH etkisi incelendiğinde serbest enzim pH 6.5'ta maksimum aktivite gösterirken, immobilize enzimin pH 6.0'ta maksimum aktivite gösterdiği bulundu. İmmobilizasyon sonucunda enzimin sıcaklığa olan dayanıklılığı gelişti ve 50°C'de maksimum aktivite gösterdi. Michaelis sabiti (K_m) serbest ve immobilize enzim için sırayla 0.71 ve 0.91 mM olarak hesaplandı. Serbest ve immobilize enzim için V_{max} değerleri sırayla 0.83 ve 0.23 mM/dakika olarak hesaplandı. 20 deneme sonrasında immobilize enzim ilk aktivitesininin %56'sını korumuştur. Serbest enzim 15 gün içinde tamamen aktivitesini kaybetmiştir. İmmobilize enzim 30 günde aktivitesinin sadece %22'sini kaybetmiştir.

Sentetik aktivite üzerine sıcaklık etkisi incelendiğinde serbest enzim 37°C'de maksimum aktivite gösterirken, immobilize enzim 45°C'de maksimum aktivite gösterdiği bulundu. Serbest ve immobilize enzim için Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve V_{maks} değerleri sırasıyla 5 mM, 0.0026 mM/dakika bulunurken immobilize enzim için 1.1 mM, 0.004 mM/dakika olarak bulunmuştur. 20 deneme sonrasında immobilize enzim ilk aktivitesininin %34'ünü kaybetmiştir. İmmobilize enzim 30 gün sonunda aktivitesinin %67'sini korumuştur.

Nisan, 2015

Dilek DÖNGEZ

ABSTRACT

Covalent Immobilization of Lipase Enzyme onto UV Curable Sol-Gel Hybrid Coating Films

Lipases are important enzymes in nature which are responsible for the metabolism of lipids. They are classified under hydrolases EC 3.1.1.3. They have both hydrolytic as well as synthetic activity. Among the lipases from various sources, *Candida rugosa* lipase received much attention due to its high activity and broad specificity.

In this study UV-curable hybrid epoxy-silica polymer films were prepared via sol-gel method. Lipase (E.C. 3.1.1.3) from *Candida rugosa* was covalently immobilized onto hybrid epoxy-silica polymer films. Immobilization yield was found as 7.22 mg/g of polymer films. The morphology of the polymeric support was characterized by scanning electron microscopy (SEM) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR).

Immobilized and free enzymes were used in two different reaction systems: hydrolysis of para nitrophenyl palmitate in aqueous medium and synthesis of para nitrophenyl linoleate (from p-nitrophenol and linoleic acid) in hexane medium. The effect of several parameters was investigated such as activity retention, as well as kinetic properties, thermal and operational stability aspects were investigated for hydrolytic activity and synthetic activity and compared with free enzyme.

The effects of pH on hydrolytic activities was found that the pH of maximum activity for the free enzyme was 6.5, while for the optimal pH of the immobilized enzyme was 6.0. By immobilization, the temperature resistance of the enzyme was improved and showed maximum activity at 50°C. The estimated Michaelis-Menten constants (K_m) for the free and immobilized lipase were 0.71 and 0.91 mM, respectively. The V_{max} values of free and immobilized enzymes were calculated as 0.83 and 0.23 mM/min enzymes, respectively. The immobilized enzyme retained 56% of its original activity after 20 runs. Free enzyme lost its activity completely within 15 days. Immobilized enzyme lost only 22% of its activity in 30 days.

The effects of temperature on synthetic activities was found that the temperature of maximum activity for the free enzyme was 37°C, while for the optimal temperature of the immobilized enzyme was 45°C. The Michaelis-Menten constants (K_m), and V_{max} , for the free and immobilized enzyme were found as 5 mM, 0.0026 mM/min and 1.1 mM., 0.0004 mM/min.,

respectively. The immobilized enzyme lost 34% of its activity after 20 runs. Immobilized enzyme retained 67% of its activity in 30 days.

April, 2015

Dilek DÖNGEZ

SEMBOLLER

%	: Yüzde
°C	: Santigrad derece
G	: Gram
Mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
µL	: Mikrolitre
µmol	: Mikromol
dk	: Dakika

KISALTMALAR

CRL	: Candida rugosa lipazı
dk	: Dakika
E	: Enzim
EC	: Enzim Komisyon
EI	: Enzim-İnhibitör kompleksi
ES	: Enzim-Substrat kompleksi
FT-IR	:Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
IU	: Enzim ünitesi
K_m	: Maksimum hızın yarısına erişildiği substrat konsantrasyonu
pNP	:para nitro fenol
pNPP	:para nitrofenil palmitat
S	: Substrat
SEM	: Taramalı Elektron Spektroskopisi
V_{max}	: Maksimum Hız

ŞEKİL LİSTESİ	SAYFA
Şekil 1.1. Enzimli reaksiyonun serbest enerji diyagramı	3
Şekil 1.2. Michaelis-Menten eğrisi	5
Şekil 1.3. Lineweaver-Burk eğrisi	6
Şekil 1.4. <i>Candida rugosa</i> 'dan elde edilmiş lipaz enzimin üç boyutlu yapısı	12
Şekil 2.1. Polimerik desteğin sentezi ve enzime immobilizasyonun şematik olarak gösterimi	22
Şekil 3.1. a) Organik/ inorganik hibrit SiO ₂ -matriks film b) Lipaz enzimi immobilize edilmiş film	26
Şekil 3.2. Immobilizasyon Öncesi (a) ve Sonrası (b) Organik/ inorganik hibrit SiO ₂ -matriks film	27
Şekil 3.3. Protein standart eğrisi	28
Şekil 3.4. pNP standart grafiği	29
Şekil 3.5. Hidrolitik Aktivite tayin yöntemine göre serbest ve immobilize enzim üzerine pH etkisi	30
Şekil 3.6. Hidrolitik Aktivite tayin yöntemine göre serbest ve immobilize enzim üzerine sıcaklık etkisi	31
Şekil 3.7. Hidrolitik aktivite tayin yöntemine göre serbest enzimin Lineweaver-Burk grafiği	32
Şekil 3.8. Hidrolitik aktivite tayin yöntemine göre immobilize enzimin Lineweaver-Burk grafiği	32
Şekil 3.9. Hidrolitik aktivite tayin yöntemine göre immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği	33
Şekil 3.10. Hidrolitik aktivite tayin yöntemine göre serbest ve immobilize enzimin depolama süresinin gösterilmesi	34
Şekil 3.11. Hekzan içinde hazırlanan pNP standart grafiği	35
Şekil 3.12. Sentetik Aktivite tayin yöntemine göre serbest ve immobilize enzim üzerine sıcaklık etkisi	36
Şekil 3.13. Sentetik aktivite tayin yöntemine göre serbest enzimin Lineweaver-Burk grafiği	37

Şekil 3.14. Sentetik aktivite tayin yöntemine göre immobilize enzimin Lineweaver-Burk grafiği	37
Şekil 3.15. Sentetik aktivite tayin yöntemine göre immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği	38
Şekil 3.16. Sentetik aktivite tayin yöntemine göre serbest ve immobilize enzimin depolama süresinin gösterilmesi	39

TABLO LİSTESİ	SAYFA
Tablo 1.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan destek materyalleri	9
Tablo 3.1. İmmobilizasyon öncesi ve sonrası enzim miktarları	28

BÖLÜM I

GİRİŞ

Lipaz, birçok reaksiyonda katalizör olarak kullanılan endüstriyel bir enzimdir. Bitki, hayvan ve mikrobiyal kaynaklı olarak gerçekleşen lipaz üretiminde tek hücreli bir maya olan *Candida rugosa* yaygın olarak kullanılmaktadır. *Candida rugosa* lipazı (CRL) geniş substrat spesifikliği nedeniyle lipazların kullanım alanlarının hemen hepsinde yer alır. CRL'nin başlıca kullanım alanları; gıda endüstrisi, karbonhidrat ester sentezi, biyosensörler, biyolojik temizleme, biyodeterjanlar, kozmetik ve parfümeri, pestisitler, deri endüstrisi, farmasötik endüstri ve organik sentezlerdir (Sharma ve ark. 2001;Aybastier 2010).

Enzimler deney şartlarına ve çevre koşullarına çok duyarlı olup yüksek sıcaklıklarda, asidik ve bazik çözeltilerde aktifliklerini kaybederler. Enzimlerin izolasyonu ve arıtılması zahmetli ve pahalıdır. Bu nedenle enzimlerin bir kez kullanımı yerine immobilize edilerek tekrar kullanılabilmesi ekonomik açıdan büyük önem taşır. Immobilize enzimler reaksiyon ortamından kolaylıkla uzaklaştırılabilirler. Ayrıca yüksek sıcaklık ve birçok deneysel şartlarda kullanılan organik çözücülere karşı da genellikle serbest enzime göre daha kararlıdır (Matero 2007).

Lipaz enzimi; şelit (Chang ve ark. 2007), Naylon-6 (Pahujanive ark. 2008), kitosan, agaroz (Rodriguesve ark. 2008), hidrotalsit, zeolit (Yagizve ark. 2007), poli(glisidilmetakrilat-metilmetakrilat) manyetik bilyeler (Bayramoğlu 2008), poli laktik asit, polivinil alkol ve kitosan üçlü karışım film (Badgujarve ark. 2013) gibi sayılabileceğimiz farklı destek materyallerine immobilize edilmiş ve aktivite çalışmaları yapılmıştır.

Tez çalışmasında, 3-metakriloksi propil trimetoksisilanın uygun hidroliz şartlarında alkoksi silanlarının hidrolizi sağlandı. Bir sonraki aşamada epoksi silan bileşiğiyle muamele edilerek silanollerin sol-jel tekniğiyle kondenzasyonu sağlandı ve UV ile sertleşen hibrit polimerik film elde edildi. Hibrit filmin morfolojisi Taramalı Elektron Mikroskop (SEM), yapısal özelliği Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi (FT-IR) ile karakterize edildi. Polimerik destek materyaline *Candida rugosa*'dan izole edilen lipaz enzimi kovalent olarak immobilize edildi. Serbest ve immobilize enzimin aktivite çalışmaları yapıldı, immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği, serbest ve immobilize enzimin depolama süresi ve kinetik parametreleri (K_m ve V_{max}) tayin edildi.

1.1. Enzimler

Enzimler reaksiyonların pek çoğunu hızlandıran, katalitik ribonükleik asit (RNA) moleküllerinin küçük bir grubu hariç, protein yapısındaki, biyolojik katalizörlerdir. Doğal olarak yalnız canlılar tarafından sentezlenirler. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü düzenlerler. Sindirim olayı, kas kasılması, hücre solunumu gibi önemli fizyolojik faaliyetler ve çeşitli metabolizma reaksiyonlarının sonucunda hücrelerde organik maddelerin yapılması ve yıkılması reaksiyonları enzimlerin katalitik etkisi ile mümkün olmaktadır (Nelson ve Cox, 2005).

Canlıları oluşturan biyomoleküller kinetik yönden kararlı olup, kendiliğinden kolayca reaksiyon vermezler. Bir hücredeki tüm kimyasal olaylar enzimler aracılığı ile gerçekleştirilir ve bir hücredeki tüm olaylar deoksiribonükleik asit (DNA) seviyesinde düzenlenip kontrol edilmektedir.

Buna göre katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç, bütün enzimler protein yapısındadır. Katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonunun sağlamlığına bağlıdır. Eğer enzim denatüre olursa veya altbirimlerine ayrılırsa katalitik aktivitesi genellikle kaybolur. Eğer enzim bileşeni olan aminoasitlere ayrılırsa katalitik aktivitesi yok olur. Bu yüzden protein enzimlerinin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısı katalitik aktivite için esastır (Nelson ve Cox, 2005).

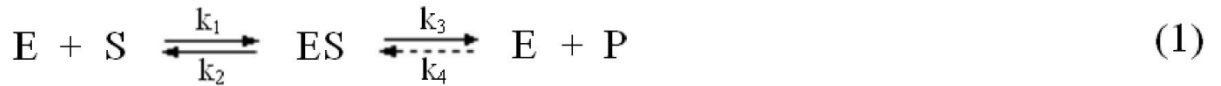
Biyolojik olarak uygun koşullarda, katalizlenmeyen tepkimeler yavaş gerçekleşme eğilimindedir. Enzimler ilgili reaksiyonlarını ılımlı koşullarda çok hızlı ve spesifik bir biçimde katalizler. Enzim reaksiyonları sırasında yan ürün oluşmaz, verim %100 dür. Enzimler substratlarına özgüdür ve tektir. Enzimler reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyon hızını diğer reaksiyonlara göre 10^8 - 10^{10} kat artırırlar. Enzimler 55°C'nin altındaki sıcaklıklarda yinelenen reaksiyonlar vermektedirler (Nelson ve Cox, 2005).

Yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini doğal ortamlarının dışında da gösterebiliyor olmaları enzimlerden pek çok alanda yararlanabilme olanağı sağlar. Bu nedenle enzimler tıp alanında, kimya endüstrisinde, gıda, tarım, tekstil ve ziraat alanlarında oldukça önemli bir yere sahiptirler.

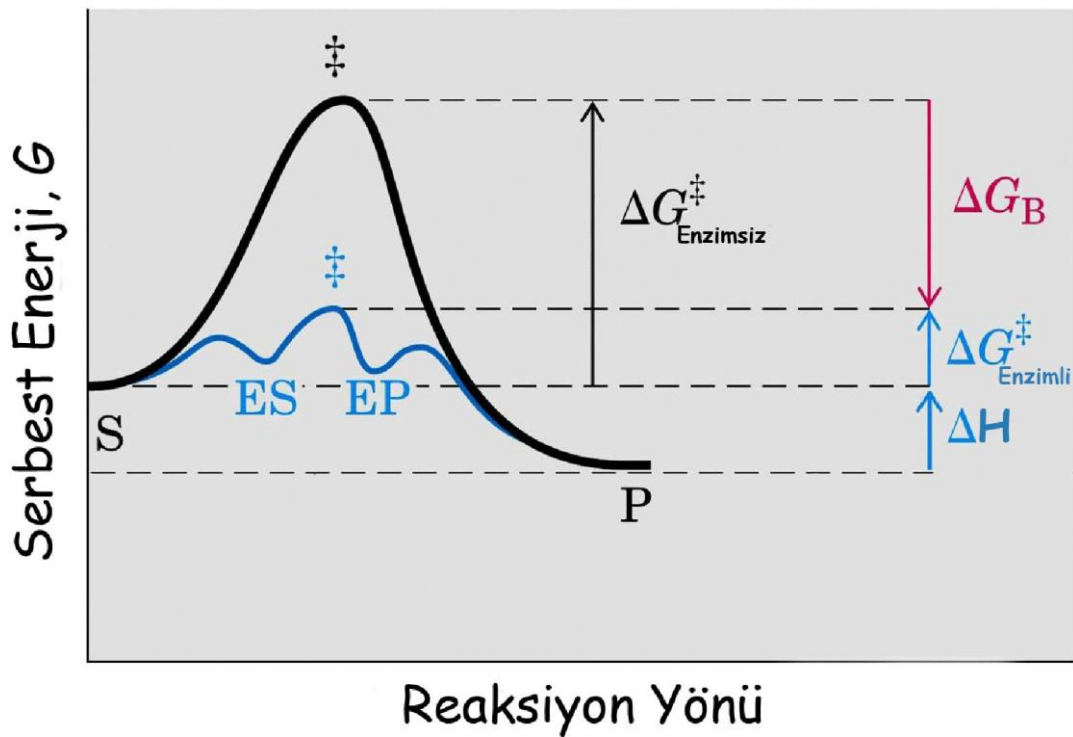
1.1.1.Enzim kinetiği

Bir enzimatik reaksiyonun hızı, enzimin etkinliği veya enzimin aktivitesi ile ilişkilidir. Etkinliği veya aktivitesi fazla olan bir enzim, belirli bir sürede daha fazla substrat molekülünü ürün haline dönüştürür.

E, S, P'nin enzim, substrat ve ürünü temsil ettiği durumda basit bir enzimatik tepkime aşağıdaki gibi yazılır:



Böyle bir reaksiyon genel kimyasal reaksiyon mekaniğine ve kinetiğine uyar. Diğer katalizörlerde de olduğu gibi enzimler reaksiyonun yönünü değiştirmezler sadece reaksiyonun hızına etki ederler. Reaksiyona ilerleyebileceği daha düşük aktivasyon enerjili ara yollar sunarak reaksiyonu hızlandırırlar.



Şekil 1.1. Enzimli reaksiyonun serbest enerji diyagramı (Ogan ve ark, 2010)

Şekilde $\Delta G_{\text{Enzimsiz}}$ enzimsiz reaksiyonun aktivasyon enerjisi, $\Delta G_{\text{Enzimli}}$ ise enzimli reaksiyonun aktivasyon enerjisidir. ΔH Reaksiyon entalpisi.

Reaksiyon başında substrat konsantrasyonu yüksek, ürün konsantrasyonu ise ihmal edilecek kadar azdır. ES kompleksi büyük bir serbest enerji düşmesi ile ayrıldığından k_4 ihmal

edilebilir. Öyleyse ES oluşumunun net hızı, ES bozunmasının net hızına eşit olacaktır ki denklem 1'e göre bu eşitlik;

$$k_1 [E] [S] - k_2 [ES] = k_3 [ES] - k_4 [E] [P] \quad (2)$$

olur. Reaksiyonun başında [P] ihmal edilebilir olduğundan, şeklinde yazılabilir:

$$k_1 [E] [S] = k_2 [ES] + k_3 [ES] ; \frac{[E] [S]}{[ES]} = \frac{K_2 + K_3}{K_1} = K_m \quad (3)$$

Burada K_m , kontrollü şartlarda reaksiyonun maksimum hızının yarısına eşit hız verensubstrat konsantrasyonudur ve Michaelis-Menten sabiti olarak adlandırılır.

$[E_0]$, başlangıçtaki toplam enzim konsantrasyonu ve reaksiyonun herhangi bir anındaki enzim konsantrasyonu $[E]$ ise, $[E] = [E_0] - [ES]$ olur.

Denklem 3 aşağıdaki sekile dönüşür;

$$\frac{[E_0] - [ES]}{[ES]} = \frac{K_m}{[S]} ; \frac{[E_0]}{[ES]} = \frac{K_m}{[S]} + 1 \quad (4)$$

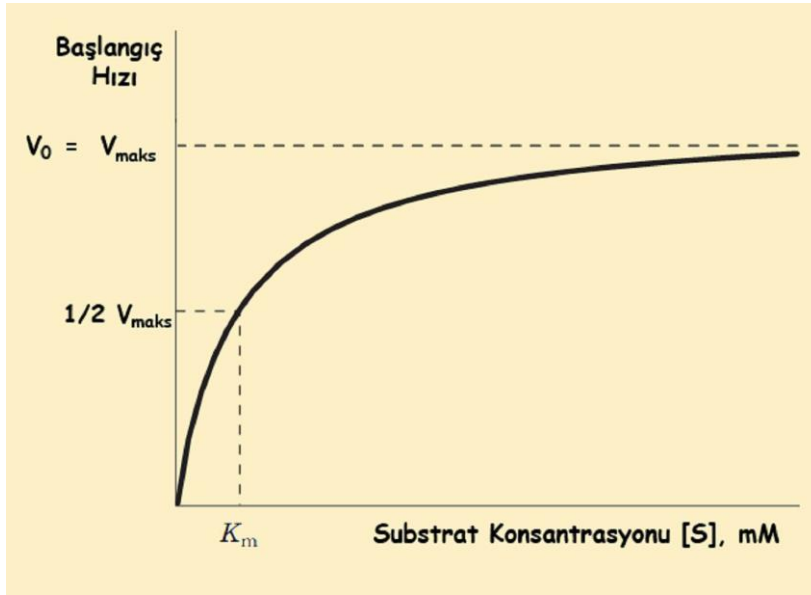
Maksimum hız toplam enzim konsantrasyonu ile orantılı olduğu kadar, başlangıç hızıyla da orantılıdır. Böylece $V_{maks} = K_3 [E_0]$ olduğundan denklem 4'te yerine konulursa aşağıdaki denklem elde edilir:

$$\frac{[E_0] K_3}{[ES] K_3} = \frac{V_{Maks}}{V_0} = \frac{K_m}{[S]} + 1 \quad (5)$$

Denklem 5'te başlangıç hızı V_0 yalnız bırakılacak olursa; aşağıdaki eşitlik elde edilir:

$$V_0 = \frac{V_{Maks} [S]}{K_m + [S]} \quad (6)$$

Denklem 6'ya göre V_0 ile $[S]$ arasında çizilen grafik aşağıdaki gibi olur. Bu eğriye Michaelis-Menten eğrisi denir.



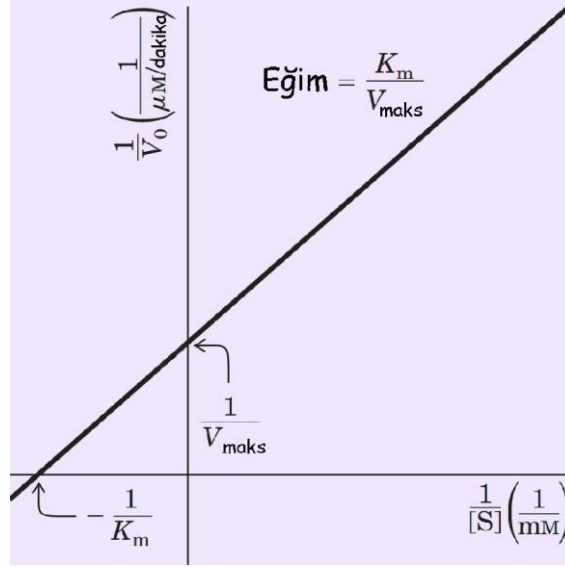
Şekil 1.2. Michaelis-Menten eğrisi (Ogan ve ark, 2010)

Düşük substrat konsantrasyonlarında denklem 6'nın paydasında $K_m \gg [S]$ olduğunda $[S]$, K_m yanında ihmal edilebilir ve $V_0 = V_{maks} [S] / K_m$ olur. Yüksek substrat konsantrasyonlarında denklem 6'nın paydasında $K_m \ll [S]$ olacağından K_m , $[S]$ yanında ihmal edilebilir, $V_0 = V_{maks}$ olur ve denklem 6'daki eşitlikle bölünerek doğru denklemi verecek şekle dönüştürülebilir.

$$y = mx + b \qquad \frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}}$$

Y eksenine $1/V_0$, X eksenine de $1/[S]$ değerleri yerleştirilerek çizilen grafikte elde edilen doğrunun eğimi K_m/V_{maks} 'a ve Y eksenini kesen nokta $1/V_{maks}$ 'a eşit olur. K_m değeri de grafikte gösterildiği şekilde bulunabilir. Bu eğriye Lineweaver-Burk eğrisi adı verilir.

K_m değerlerinden enzimlerin ayırt edilmesinde, ES komplekslerine ilişkin sabitlerin bulunmasında faydalanılır. K_m substrat konsantrasyonu birimi cinsindendir (mol/L veya mmol/L).



Şekil1.3. Lineweaver-Burk eğrisi (Ogan ve ark, 2010)

1.1.2.Enzim aktivitesinin ölçülmesi

Biyolojik maddelerde görev alan birçok enzim "Enzim Ünitesi" birimi ile ifade edilir. Buna göre 1 μ mol substratın, belirli ve özel şartlar altında (25°C) değişikliğe uğramasını katalize eden enzim miktarı "1 ünite enzim aktivitesi" olarak tanımlanır.

Enzim aktivitesi, bazen katal olarak ifade edilir. 1 katal enzim aktivitesi, optimal koşullarda, 1 saniyede 1 mol substratı değiştiren enzim etkinliğini ifade eder.

Enzim aktivitesi, spesifik aktivite olarak da ifade edilir. Bir enzim için spesifik aktivite, 1 mg enzim proteini başına düşen enzim ünitesi (IU veya katal) sayısıdır.

Enzimle katalize edilen reaksiyonların hızı üzerine, enzim ve substrat konsantrasyonlarının, temperaturün, ortamın pH'sının, zamanın, reaksiyon ürünlerinin, hormonların ve ışık vs. gibi fizikseletkenlerin rolü vardır (Nelson ve Cox, 2005).

Enzimlerin doku ve hücrelerdeki konsantrasyonu son derece az olduğundan miktarlarını ölçmek çok güçtür. En iyi ölçme usulü enzimin katalitik aktivitesini ölçmektir. Dolayısıyla enzim miktarı, enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak meydana gelen ürün miktarı ölçülerek saptanır. Enzim ölçümleri sürekli ölçümler ve süreksiz ölçümler olmak üzere iki yöntemle göre yapılır.

Sürekli ölçümler kullanışlıdır ve fazladan bir işleme gerek kalmadan bir ölçüm ile reaksiyon hızı spektrofotometrik, florometrik, kalorimetrik, kemilüminesan kullanılarak belirlenebilir.

Süreksiz ölçümlerde, enzim reaksiyonu ortamından düzenli aralıklarla numuneler alınır ve ürün oluşumu veya substrat tüketimi radyometrik ve kromatografik olarak belirlenebilir.

Enzimin aktivitesinin ölçümünde, oluşan ürün miktarının miktarı belirlenerek bu miktarla doğru orantılı olan enzim miktarı bulunabilir. Enzim aktivitesinin ölçümü, enzim kinetiği ve enzim aktivitesinin araştırılması için önemlidir.

1.1.3.Enzim aktivitesi üzerine etki eden faktörler

1.1.3.1.Enzim konsantrasyonunun Etkisi

Reaksiyonun hızı, enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Substrat konsantrasyonu sabitken enzim konsantrasyonu artırılırsa, substratın tamamı, enzim substrat kompleksi oluşturanaya kadar reaksiyon hızı artar. Substratın bittiği anda reaksiyon sabitlenir (Nelson ve Cox, 2005).

1.1.3.2. Substrat konsantrasyonunun etkisi

Enzim konsantrasyonu sabit tutulduğunda belirli bir noktaya kadar substrat konsantrasyonu arttıkça reaksiyon hızı artar. Belirli bir noktadan sonra substrat konsantrasyonu arttıkça reaksiyon hızı değişmez (Nelson ve Cox, 2005).

1.1.3.3. Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklık arttıkça enzimatik reaksiyonların hızı artar. Sıcaklığın her 10°C artmasıyla reaksiyon hızı ortalama olarak 2 kat artar. Fakat belirli bir sıcaklık düzeyinin üzerine çıkıldığında enzimler denatüre olurlar ve aktivitelerini kaybederler. Her enzim için substratına en fazla etki ettiği bir sıcaklık vardır. Bu sıcaklığa enzimin optimum sıcaklığı denir (Nelson ve Cox, 2005).

1.1.3.4. pH Etkisi

Belirli bir pH alanında enzimin hızı en fazladır. Bu pH'a enzimin optimumpH'ıdır. Optimum pH'ın altında veya üstünde reaksiyonun hızı daha fazladır. Belirli bir pH'dan sonra enzim tamamen etkisiz kalır (Nelson ve Cox, 2005).

1.1.3.5. Makromoleküler kalabalık derecesi

Çözeltide yüksek miktarda makromolekülün bulunması enzimatik reaksiyonların reaksiyon hızını ve denge sabitini etkiler (Minton, 2001).

1.1.4. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler canlılar tarafından üretildiklerinden endüstriyel veya analitik amaçlı kullanımları için doku, kan, mikroorganizma gibi canlı veya canlı kökenli kaynaklardan saflaştırılırlar.

Enzim üretiminde hammadde olarak canlıların kullanımı ekonomik açıdan sınırlayıcı bir durum olsa da bu sorun mikrobiyal kaynaklar sayesinde büyük ölçüde çözülmüş görünmektedir. Bununla birlikte enzimlerin mikrobiyal kaynaklardan saflaştırılması oldukça masraflı bir iştir. Bununla birlikte endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması oldukça zordur. Serbest enzimin reaksiyon ortamından istenildiği anda uzaklaştırılamaması reaksiyonun kontrolünü güçleştirir. Serbest enzimi reaksiyon ortamında etkisiz hale getirebilmek için kullanılan inhibitörler reaksiyon ortamını kirleteceğinden tercih edilmez. Enzimlerin birçok alanda çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanmasından dolayı, enzimleri daha ekonomik ve kullanışlı hale getirme çalışmaları artmıştır. Bu nedenle serbest enzimlerden daha fazla yararlanabilmek için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir (Yener 2007).

Son yıllarda immobilize enzimler besin üretiminde, farmasetiklerde ve diğer önemli alanlarda kullanılmaktadır. Biyoteknolojinin aktif çalışma alanı olan immobilize enzimler, diğer serbest formlarına göre birçok avantajlar sunmaktadır (Bayramoğlu 2007) Immobilize enzimler kolay yenilenebilir ve endüstriyel işlemler aracılığı ile düşük maliyetle kolaylıkla elde edilebilirler.

Endüstriyel uygulamaların çoğunun sulu çözeltilerde gerçekleşmesi ve enzimlerin de suda çözünüyor olmaları nedeniyle enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak immobilize edilirler.

İmmobilize enzimin serbest enzime göre pek çok üstünlüğü vardır:

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir.
- Sıcaklık, pH gibi çevre koşullarına karşı daha dayanıklıdır.
- Tekrar kullanılabilir özelliğe sahiptirler.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır ve enzimin kendi kendini parçalama olasılığı azalır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir ve ürünün enzimle kontaminasyonu gibi bir durum söz konusu değildir.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir (Baştürk ve ark. 2013)

1.1.4.1. Taşıyıcı destek materyali

İyi bir destek materyalinde geçirgenlik, çözünmezlik, hidrofilik karakter, termal, kimyasal ve mekanik kararlılık, mikrobiyolojik saldırılara karşı direnç gibi özellikler aranır. Bu özellikler enzim aktifliğinin korunmasına yardım eder. Aşağıdaki tabloda yaygın olarak kullanılan destek materyalleri verilmiştir:

Tablo1.1.Enzim immobilizasyonunda kullanılan destek materyalleri

Organik Destekler	Doğal Polimerler	<u>Polisakkaritler</u> : Seluloz, dekstran, agar, agaroz, kitin, aljinat
		<u>Proteinler</u> : Kollojen, albümin
		<u>Aktif Karbon</u>
	Sentetik Mineraller	<u>Polistiren</u>
İnorganik Destekler		<u>Diğer polimerler</u> : Poliakrilat, polimetakrilat, poliakrilamit, poliamidler, vinil, alil polimerler
		<u>Doğal mineraller</u> : Bentonit, silika
		<u>İşlenmiş Materyaller</u> : Cam (gözeneksiz ve kontrollü gözenekli), metaller, kontrollü gözenekli metal oksitler

1.1.4.2. Enzim immobilizasyon yöntemleri:

Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri genel olarak ikiye ayrılır:

1. Bağlama

- Çapraz bağlama
- Enzim kopolimarizasyonu
- Taşıyıcı bağlama
 - ✓ Fiziksel adsorpsiyon
 - ✓ Adsorpsiyon ve çapraz bağlama
 - ✓ İyonik bağlama
 - ✓ Şelat bağlama
 - ✓ Kovalent bağlama
 - ✓ Biyospesifik bağlama

2. Tutuklama

- Jelde tutuklama
- Mikrokapsülleme
- Lipozom tekniği

Enzim immobilizasyon yöntemleri yukarıdaki gibi çok değişik şekillerde sınıflandırılabilir fakat genel olarak fiziksel ve kimyasal yöntemler olarak sınıflandırmak mümkündür.

1. Kimyasal yöntemler

Kimyasal immobilizasyon yönteminde suda çözünmeyen polimer ile enzim arasında kovalent bağ oluşumu sağlanır ya da çok sayıda enzim molekülü arasında çapraz bağ oluşumu sağlanır. Kimyasal yöntemlerde serbest enzim geri kazanılmaz. Kimyasal yöntemler genel olarak ikiye ayrılır:

- Kovalent bağlanma: Kovalent bağlanma, geri dönüşümsüz bir immobilizasyon metodudur. Enzim immobilizasyon yöntemleri arasında en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Bu metodun yaygınlığı bağların stabilitesi ile ilişkilidir ve çevreye enzim salınımını önleyen bu yöntem enzim ile destek materyali arasında gerçekleşir. Daha da önemlisi, herhangi bir engel olmaması nedeniyle enzim ve substrat arasında sınırsız bir ilişki kurulur. Artan biyokatalizör dengesi de bu yöntemin avantajlarından biridir.
- Çapraz bağlanma: Küçük yapıdaki reaktifler herhangi bir katalizöre ya da destek materyaline ihtiyaç duymadan kendi aralarında bağlar yaparak suda çözünmeyen yapılar oluşturabilirler. Bu prensiple gerçekleştirilen immobilizasyon yöntemine çapraz bağlanma metodu denir. Bağlanmalar molekül içi veya moleküller arası olabilir.

2. Fiziksel yöntemler

Fiziksel yöntemlerde ise enzim belirli bir yere tutunması sağlanır. Bu fiziksel tutunma gerçekleştirilirken iyonik bağ oluşumu ve elektrostatik denge gibi çeşitli fiziksel etkileşimlerden yararlanılır. Enzimin tutunduğu yerler destek materyalinin içindeki mikrobölmeler veya gözenekli membranlardır. Fiziksel yöntemler genel olarak ikiye ayrılır:

- Adsorbsiyon ile immobilizasyonu: Bu metod en basit ve en eski olan immobilizasyon metodudur. Bu metotla katı matriks üzerinde enzimin fiziksel adsorbsiyonu veya iyonik bağlanması gerçekleşir. Fiziksel adsorbsiyonu

gerçekleştiren kuvvetler, hidrojen bağları Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerdir. İyonik bağlanma kısmında ise proteinin yüklü grupları ile destek materyalinin zıt yükleri arasında bir çekim gerçekleşir.

- Hapsetme ile immobilizasyonu: Polimer maddelerde ya da yarı geçirgen membranlarda enzimin hapsolması yöntemidir. Enzimin sulu bir polimer çözeltisinde veya monomer çözeltisinde çözülmesi gerekir. Polimerin oluşturulması, UV radyasyonu, gama ışınları veya ısıyla başlatılır. Oluşturulan ve hidrofilik olan polimer içerisinde enzim hapsedilir. Polimer, substrat ve ürünün difüzyonuna izin verip ürünü hapsetmelidir. Bu yüzden polimerin yeteri kadar sıkı olması gerekir. Bu metot kullanılarak, bütün hücreler, farklı büyüklükteki mikroorganizmalar, diğer biyokatalizörler hapsedilebilir (Yener 2007; Malkoç 2011)

1.1.5. Lipaz Enzimi

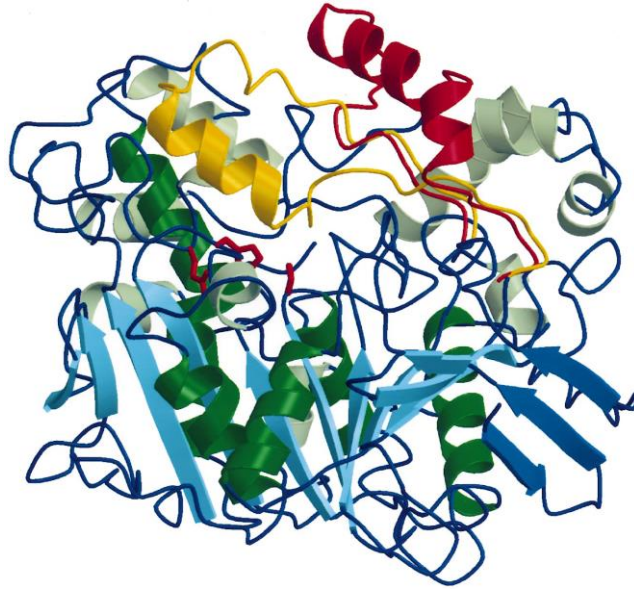
Lipazlar (EC.3.1.1.3, triaçilgliserol açıl hidrolaz) hayvansal ve bitkisel yağların normal koşullar altında tersinir hidrolizini kataliz eden enzimlerdir. Biyoteknoloji çalışmalarında çok yönlü kullanılabilirlikleri, kimyasal proseslere spesifiklik kazandırmaları, yan reaksiyonları önlemeleri ve reaksiyon ürünlerinin ayrılmasıyla ilgili problemleri kolaylaştırmaları gibi birçok özellikleri nedeniyle lipazlara her geçen gün artan bir talep vardır. Bu enzim dünya çapındaki enzim satışlarının sadece % 4'lük kısmına sahiptir (Paiva ve ark. 2000; Balcao ve Malcata, 1998). Burada lipazların ekonomik açıdan değerinin anlaşılamadığı bariz bir şekilde görülmektedir ve bu çalışmaların sanayiye yansması için belirli bir süre gerekmektedir. Ayrıca enzimin maliyeti yüksektir.

Enzimlerin sanayide kullanımının yaygınlaşmasını engelleyen en önemli nedenler ise düşük dayanım, aktivite ve seçicilikleridir. Bu sebeple, son yıllarda, lipazların hidroliz ve sentez reaksiyonlarındaki katalitik özelliklerinin geliştirilmesi için bazı kimyasal ve fiziksel işlemlere tabi tutulması gündeme gelmiştir. Buna ilave olarak moleküler biyoloji yolu ile enzimin maliyeti de düşürülebilir. Böylece de genetik özellikleri geliştirilmiş olan lipazın büyük miktarlarda üretimi sağlanabilir (Villeneuve ve ark. 2000).

Lipazlar hidroliz, interesterifikasyon, esterifikasyon, asidoliz ve aminoliz gibi çeşitli biyodönüşüm reaksiyonlarını gerçekleştiren çok amaçlı biyolojik katalizörlerdir. İlaç, pestisit, kozmetik, gıda, biyosensörler ve deterjan sanayi gibi birçok alanda lipaz enzimi kullanılmaktadır (Bassegoda ve ark. 2012).

Lipazlar hayvansal, bitkisel ve doğal veya genetik olarak iyileştirilmiş mikroorganizmalardan elde edilebilir. Bunların arasından, kolay üretilmesi ve pek çok hidrolitik ve sentetik reaksiyonu katalizlemesinden dolayı en fazla mikrobiyal kaynaklı lipazlar tercih edilmektedir. Lipaz tarafından katalizlenmiş olan reaksiyonlar doğal metabolik reaksiyonlara benzemesinden dolayı kimyasal reaksiyonlara oranla daha çevre dostu olarak tanımlanırlar. Düşük aktivasyon enerjileri sebebiyle lipazın katalizlediği reaksiyonlar daha düşük sıcaklık ve nötral pH gerektirir, enerji gereksinimi düşüktür ve de ürün ve substratlara karşı aktiviteleri çok yüksektir ve bu aktivite özellikle de substrat (yağ)-su ara yüzeyinde en yüksek seviyeye çıkmaktadır. Bu kavramlara yüzey aktivasyonu olarak tanımlanabilir. Bu sebeple, en yüksek aktivitelere, substrat içinyüksek yüzey alanına ulaşıldığı emülsiyon sistemlerinde ulaşılmaktadır.

Candida rugosa'dan elde edilen lipaz enzimin üç boyutlu yapısı Cygler ve Schrag tarafından araştırılmış ve yaptıkları çalışmalar sonucunda elde ettikleri yapı aşağıda verilmiştir (Cygler ve Schrag 1999). Aktif konumdaki katalitik üçlüyü kaplayan yapısal elementlerin (α -heliks) olduğu yapı aktif olmayan form, diğeri ise ara yüzey aktivasyonu sırasında bu kapağın açılması ile ara yüzey alanının artması ve böylece aktif konumun daha fazla substrat almak için substrata izin verdiği yapı; aktif formdur.



Şekil1.4. *Candida rugosa*'dan elde edilmiş lipaz enzimin üç boyutlu yapısı (Cygler ve Schrag 1999). Açık mavi; merkezde her iki taraftan α -heliksler ile kaplanan hidrofobik β -düzlemini, koyu yeşil; merkez β -düzlemini kaplayan heliksleri, sarı; kapalı konformasyonu, kırmızı; açık konformasyonu göstermektedir.

Lipazların en önemli özelliklerini aşağıdaki gibi özetleyebiliriz:

- ✓ Kemoselektivite, regioselektivite, diastereoselektivite ve enantioselektivite gösterirler.
- ✓ Mantar, maya ve bakteri gibi mikroorganizmalarca büyük miktarda üretilirler.
- ✓ Birçok lipazın kristal yapıları çözülmüştür ve istenen amaç doğrultusunda protein mühendisliği yoluyla olası dizaynları yapılmaktadır.
- ✓ Kofaktör gerektirmezler ve yan reaksiyonları katalizleyebilirler.
- ✓ Organik çözücülerde kararlıdır.
- ✓ Çok geniş substrat spesifikliği gösterirler.

1.1.5.1. Lipazların kaynakları

Lipazlar, doğada bulunuş şekline göre mikroorganizma, hayvansal, bitkisel lipazlar olmak üzere üç grupta incelenebilir.

1. Mikroorganizma Lipazları:

- ✓ Bakteriyel lipazlar: *Pseudomonas spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus faecalis*
- ✓ Mantar türü lipazlar: *Candida rugosa*, *Humicola lanuginosa*

2. Hayvansal lipazlar:

- ✓ Doku lipazları: Lipoprotein lipazı Adipoz dokusu lipazı Karaciğer lipazı
- ✓ Sindirim sistemi lipazları: Pankreas lipazı İnce bağırsak lipazı
- ✓ Süt lipazları

3. Bitkisel lipazlar: Buğday, yulaf, mısır lipazları...

1.1.5.2. Lipazların sınıflandırılması

Spesifikliklerine göre lipazlar üç grupta incelenir:

1. **Spesifik olmayan lipazlar:** Bu sınıftaki lipazlar triaçilgliserollerin bütün pozisyonlarındaki açıl gruplarını seçimsiz olarak ayırabilirler. Reaksiyon sonunda yağ asitleri ve gliserin oluşurken ara ürün olarak mono ve diaçil gliseridler açığa çıkar.
2. **1,3 - Spesifik Lipazlar:** Bu gruba giren lipazlar nötral yağları eşdeğer konuma sahip olan 1 ve 3 pozisyonlarından spesifik olarak hidrolizlerler. Reaksiyon sonunda triaçilgliserinlerden yağ asitleri, 1,2 (2,3)-diaçilgliserinler ve 2-monoaçilgliserinler oluşur. 1,2 (2,3)-diaçilgliserinler ve özellikle 2-monoaçilgliserinler kimyasal olarak kararsız olup sırasıyla 1,3-diaçilgliserinlere ve 1(3)-monoaçilgliserinlere izomerleşirler. Böylece oluşan izomerler enzim tarafından tekrar substrat olarak kullanılabilirler ve

sonuçta 1,3-spesifik lipazlarda spesifik olmayan lipazlar gibi trigliseritleri gliserin ve serbest yağ asitlerine kadar parçalarlar. Pankreatik lipaz bu gruba girmektedir.

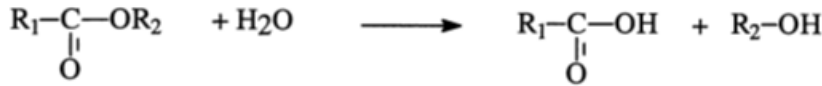
3. **Yağ Asidi Spesifik Lipazlar:** Bu gruptaki lipazlar açilgliserinlerdeki bazı yağ asitlerine özgü olup bu yağ asitlerinin oluşturduğu ester bağlarını parçalarlar.

1.1.5.3. Lipaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlar

Lipazlar, esterleşme, ester ve lipidlerin hidrolizini, trans-esterleşme ve tek kutuplu grup geçişleri gibi reaksiyonları kataliz ederler. Lipazlar hidrolazlar sınıfında olmakla birlikte yağ asit esterlerinin hem hidrolizini hem de sentezini katalizleyebilirler. Katalizleme, su ile çözünmez substratın oluşturduğu ara yüzeyde gerçekleşir. Enzim aktivitesi için su ve yağın oluşturduğu bu ara yüzey gereklidir. İmmobilizasyon sırasında lipaz ile birlikte immobilize edilmiş olan su, bu ara yüzeyin oluşmasını sağlar (Zaitsev ve ark. 2003).

Lipaz tarafından katalizlenen reaksiyonlar aşağıda gösterilmiştir (Villeneuve ve ark. 2000).

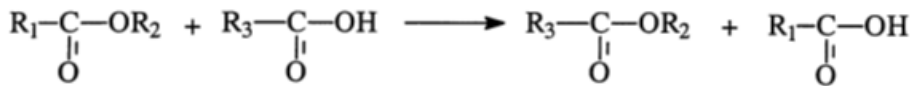
Ester hidroliz reaksiyonu



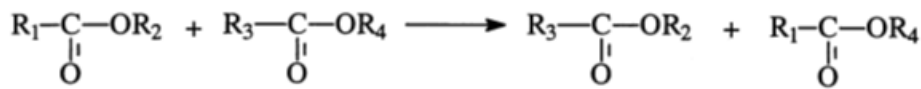
Ester sentez reaksiyonu



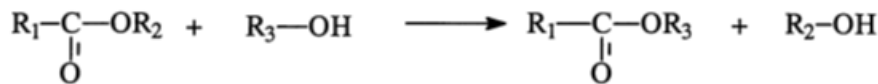
Asidoliz reaksiyonu



Trans-esterleşme reaksiyonu



Alkoliz reaksiyonu



Aminoliz reaksiyonu



1.1.5.4. *Candida rugosa* lipazı (CRL)

Candida rugosa (eski adı: *Candida cylindracea*); lipaz enzimi üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca sporsuz, patojen olmayan, tek hücreli bir mayadır. *C. rugosa*, salgıladığı lipazlardan dolayı en çok çalışılan mikroorganizmalar arasındadır. *C. rugosa*, lipaz izoenzimleri karışımı sentezler ve salgılar. *C. rugosa* lipazının geniş bir spesifiklik spektrumu vardır. Lipazın spesifikliği, enzimin moleküler özellikleri, substratın yapısı ve enzimin substrata bağlanmasını etkileyen faktörler tarafından kontrol edilir.

CRL; sentez, hidroliz ve esterleşme reaksiyonlarında katalizör olarak kullanılmaktadır. Yağlara etki edebilmesi, lezzet ve aroma verici özellikleri nedeniyle yiyecek endüstrisinde, yüzey aktif madde olarak deterjan ve deri endüstrisinde, farmasötik endüstrisinde, biyosensör ve biyodizel üretiminde *C. rugosa*'dan elde edilmiş lipaz kullanılmaktadır (Zivkovic ve ark. 2015).

1.1.6. Sol-Jel Yöntemi

Sol-jel prosesi, bir sol hazırlanması, bu solün jelleşmesi ve çözücünün uçurulması şeklinde seramik malzemelerin sentezinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, “sol” kelimesi kollaidal parçacıkların dispersiyonunu, “jel” ise solün birleşmesiyle elde edilen ağ yapıları ifade eder. Sol-jel yönteminde, metal alkoksitlerin (Si, Ti, Al, Zn,...) asidik ya da bazik ortamda hidrolizini takiben kondensasyonundan çeşitli inorganik ağ yapılar oluşturulmaktadır (Hoşgör 2011).

Sol-jel yöntemi, organik modifiye metal alkoksitlerin kontrollü hidrolizi ve kondensasyonu ile inorganik ağı oluşturulması ve daha sonra inorganik ağlara bağlanmış polimerize olabilen grupların termal veya UV ışınları sistemleri ile aktive edilerek reaksiyon vermesi esasına dayanır (Rubio ve ark. 2004; Brinker ve ark.1990; Kartal ve ark. 2009).

Sol-jel kaplamalar polimer, seramik, cam, metal, ahşap gibi birçok malzemenin yüzeyinin mekanik ve kimyasal dayanımını arttırmasının yansıra yüzeye antireflektif, antiadhesif, antistatik, hidrofilik, hidrofobik ve oleofobik gibi özelliklerin kazandırılmasına da önemli katkılar sağlamaktadır (Woters 2004).

1.1.7. UV Sertleşebilen Polimerler

Birçok kaplama türlerinde termal olarak kür işlemi yapılmaktadır. Buna alternatif olarak UV ışınlarıyla yapılan kür tekniği geliştirilmiştir. UV ışınlarıyla hazırlanan kaplamaların en büyük avantajları; ekonomik olmaları, düşük enerji gereksinimi, çok hızlı bir şekilde çapraz

bağlanmanın gerçekleşebilmesi, oda sıcaklığında uygulanabilmesi ve formülasyonda çevre ya da sağlığa zararlı uçucu organik yapı içermemesi gibi sıralanabilir. UV ışınlarıyla kür olabilen formülasyonlar, UV ışınlarıyla polimerize olabilen doymamış karbon çift bağına (C=C) sahip foto duyarlı organik gruplar içerirler (İnan ve ark. 2002).

UV ışınlarıyla sertleşebilen kaplamaların düşük enerji maliyeti, % 100 katı madde içeriğine sahip olmaları, organik uçucu solvent içermemeleri ve çevre ve sağlık açısından olumsuz bir etkiye sahip olmamaları, kaliteli ürünler verebilmeleri, düşük yatırım ve üretim maliyetine sahip olmaları, dışçilikten yer döşemesine kadar geniş bir uygulama alanına sahip olmaları bu tür kaplamaları cazip hale getirmiştir. UV ışınlarıyla sertleşebilen kaplamaların pazar payı her yıl yaklaşık olarak % 10 oranında artmaktadır (Kahraman ve ark. 2006).

1.1.8. İlgili Literatür Işığı Altında Çalışmanın Yeri

Enzimler mükemmel katalitik özelliklere sahip doğal katalizörlerdir. Günümüzde 4000'den fazla enzim bilinmekte ve bunların yaklaşık 200 kadarı ticari olarak kullanılmaktadır (Sharma ve ark. 2001). Ticari olarak lipaz enzimi; organik sentez, farmasötik, deterjan, gıda, fırıncılık, kozmetik, içki, meşrubat, deri, kağıt endüstrisi, atık işlemlerinde gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Sharma ve ark. 2001; Busto ve ark. 2010).

Enzimler ılımlı şartlarda çalışmaları ve çok spesifik olmaları bakımından kimyasal enzimlere göre daha avantajlıdır (Busto ve ark. 2010). Ancak enzimler kararlı olmamaları, izolasyon, ayrılma, organik çözeltilere karşı hassas olmaları gibi dezavantajlara sahiptirler ve bu durum enzimlerin biyokatalizör olarak kullanılmalarını zorlaştırır (Matero ve ark. 2007; Garcia-Galan ve ark. 2011; Hanefeld ve ark. 2009). Fiziksel adsorpsiyon, kovalent bağlanma, hapsedme, çapraz bağlanma gibi sayabileceğimiz çeşitli metotlarla enzimlerin immobilizasyonu sağlanır. İmmobilize enzimler aktivitelerinin artması, daha stabil olmaları, tekrar kullanılabilirlikleri ve organik solventlere karşı tolerans kapasitelerinin artması gibi pek çok avantaja sahiptir (Matero ve ark. 2007; Garcia-Galan ve ark. 2011; Hanefeld ve ark. 2009; Brady ve ark. 2009).

Biyoteknoloji çalışmalarında çok yönlü kullanılabilirlikleri, kimyasal proseslere spesifiklik kazandırmaları, yan reaksiyonları önlemeleri ve reaksiyon ürünlerinin ayrılmasıyla ilgili problemleri kolaylaştırmaları gibi birçok özellikleri nedeniyle lipazlara her geçen gün artan bir talep vardır.

Lipaz enziminin immobilizasyonu ile ilgili literatürde çok çeşitli çalışmalar vardır. Bu çalışmalarda serbest ve immobilize enzimin aktivite özellikleri ve kinetik parametreleri incelenmiştir. Lipaz enzimi; silika (Özyılmaz 2009), magnetik poli (glisidil metakrilat-

metilmetakrilat) bilyeler (Arıca ve ark. 2008), polipropilen içi boş hidrofobik polipeptit ile modifiye edilmiş fiber membran (Deng 2004), mezogözenekli silika (Wang ve ark. 2006), poli (hidroksietil metakrilat) bazlı membran (Bai ve ark. 2006), kalsiyum aljinat jel (Bayramoğlu ve ark. 2002), poli laktik asit, polivinil alkol ve kitosan üçlü karışım film (Badgujar ve ark 2013), hidroksil grupları ile aktive edilmiş kitosan (Chiou ve Wu 2004) bunlar gibi sayabileceğimiz farklı destek materyaline immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon sonrası enzim aktivitesi, optimum pH, substrata olan afinitesi ve kararlılığındaki değişiklikler incelenmiştir. Bu değişiklikler, destek materyali ve kullanılan immobilizasyon tekniğine göre farklılıklar göstermiştir.

Tez çalışmasında silanollerin sol-jel tekniğiyle kondenzasyonu sağlandı ve UV ile sertleşen hibrit polimerik film elde edildi. *C.rugosa*'dan izole edilmiş lipaz enzimi hibrit polimerik filme kovalent olarak immobilize edildi ve aktivite çalışmaları yapıldı.

BÖLÜM 2

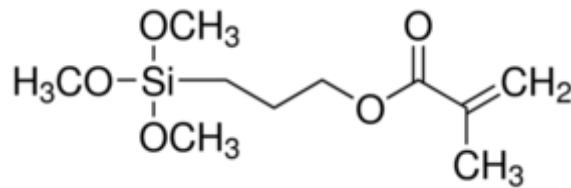
MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Araştırmada Kullanılan Cihazlar

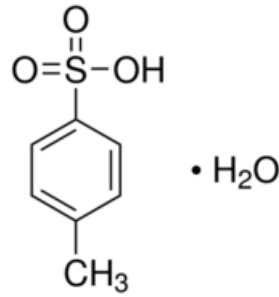
İNKÜBATÖR:	NÜVE (Türkiye)
SANTRİFÜJ:	Sigma, 3K 30 Yüksek devirli, soğutmalı (A.B.D.)
SPEKTROFOTOMETRE:	Termo Scientific, Helios zeta UV-VIS (A.B.D.)
HASSAS TERAZİ:	Sartorius Analytic, A200S $\pm 0,0001$ (Almanya)
-80°C DERİN DONDURUCU:	Thermo Electron Corp., Forma (A.B.D.)
BUZDOLABI:	Regal (Türkiye)
SU BANYOSU:	Wasserbad WB Serisi (Almanya)
VORTEKS KARIŞTIRICI:	Fisons, Whirlimixer (İngiltere)
DESTİLE SU CİHAZI:	Millipore, Rios-DI UV (A.B.D.)
MANYETİK KARIŞTIRICI:	VELP Scientifica, ARE (İtalya)
ETÜV:	Genlab, midi/2/AL (0-100)(İngiltere)
PH METRE:	HANNA, HI 9024 (Romanya)
ORBİTAL KARIŞTIRICI:	IKA-Werke, OS 10 B (Almanya)

2.2. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar

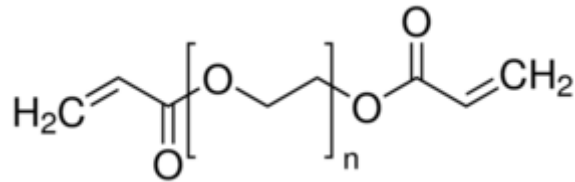
3- metakriloksi propil trimetoksisilan (MEMO): Kapalı formülü= $C_{10}H_{20}O_5Si$, MA=248.35, açık sarı sıvı (Sigma-Aldrich).



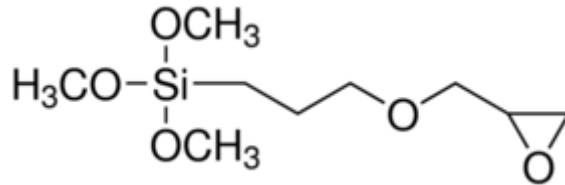
p-toluen sulfonik asit: Kapalı Formül= $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H} \cdot \text{H}_2\text{O}$, MA= 190.22g/mol ((Sigma-Aldrich).



poli(etilen glikol) diakrilat: Renksiz, sıvı (Sigma-Aldrich).

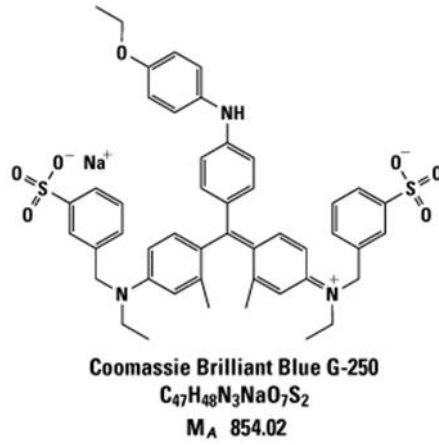


(3-glisidiloksipropil)trimetoksisilan: Kapalı Formü= $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{O}_5\text{Si}$, MA= 236.34g/mol (Sigma-Aldrich).

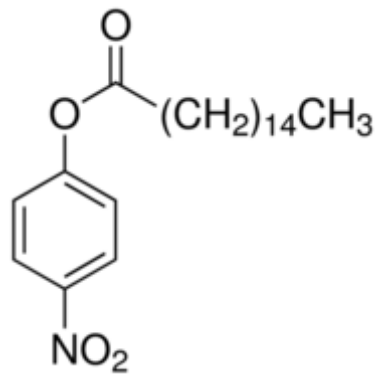


Lipaz *Candida rugosa*'dan elde edilmiş: ≥ 700 ünite/mg solid (Sigma-Aldrich).

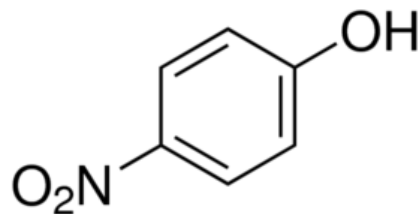
Bradford Reaktifi (Coomassie Brilliant Blue G-250): MA:854.02 g/mol, sarı-kahverengi sıvı (Bio-Rad).



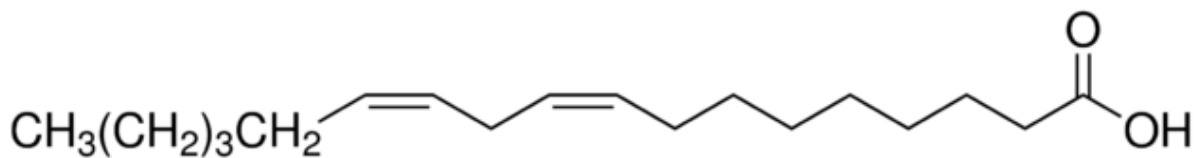
p-nitrofenil palmitat: Kapalı Formülü= $C_{22}H_{35}NO_4$, $MA = 377.52$, beyaz, katı (Sigma-Aldrich).



p-nitrofenol: Kapalı Formülü= $C_6H_5NO_3$, $MA = 139.11$, açık sarı, katı (Sigma-Aldrich).



Linoleik asit: Kapalı formülü= $CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7CO_2H$, sıvı, $MA = 280,45$ (Sigma-Aldrich).



2.3. Deneysel Çalışmalar

2.3.1. Polimerik destek materyalinin hazırlanması

Organik/inorganik hibrit SiO_2 -matriks film sol-jel metodu ile 3-metakriloksi propil trimetoksisilan (MEMO) başlatıcı olarak kullanılarak hazırlandı. Silika solüsyonunun hazırlanmasında MEMO başlatıcı olarak seçilirken etanol, su çözücü olarak *p*-toluen sulfonik asit katalizör olarak kullanıldı. UV ışınları ile sertleşebilen polimerik destek % 72 poli(etilen glikol) diakrilat, %18 hidrolize MEMO, %10 (3-glisidiloksi propil)trimetoksisilan ve %3 fotobaşlatıcı kullanılarak hazırlandı. 300 saniye UV lambası altında ışına maruz bırakılarak polimerik destek elde edildi.

2.3.2. Polimerik desteğin karakterizasyonu

Hazırlanan polimerin enzim immobilizasyonu öncesi ve sonrası fonksiyonel grup analizleri Fourier Dönüşümlü Infrared (FT-IR) Spektroskopisi kullanılarak yapıldı. Spektrumlar Perkin Elmer Spektrum 100 ATR-FTIR Spektrometre cihazı ile $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ aralığında kaydedildi. Philips marka XL30SEM FEG model Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) cihazı kullanılarak polimerin enzim immobilizasyonu öncesi ve sonrası görüntüleri morfolojik olarak incelendi.

2.3.3. Lipaz enziminin immobilizasyonu

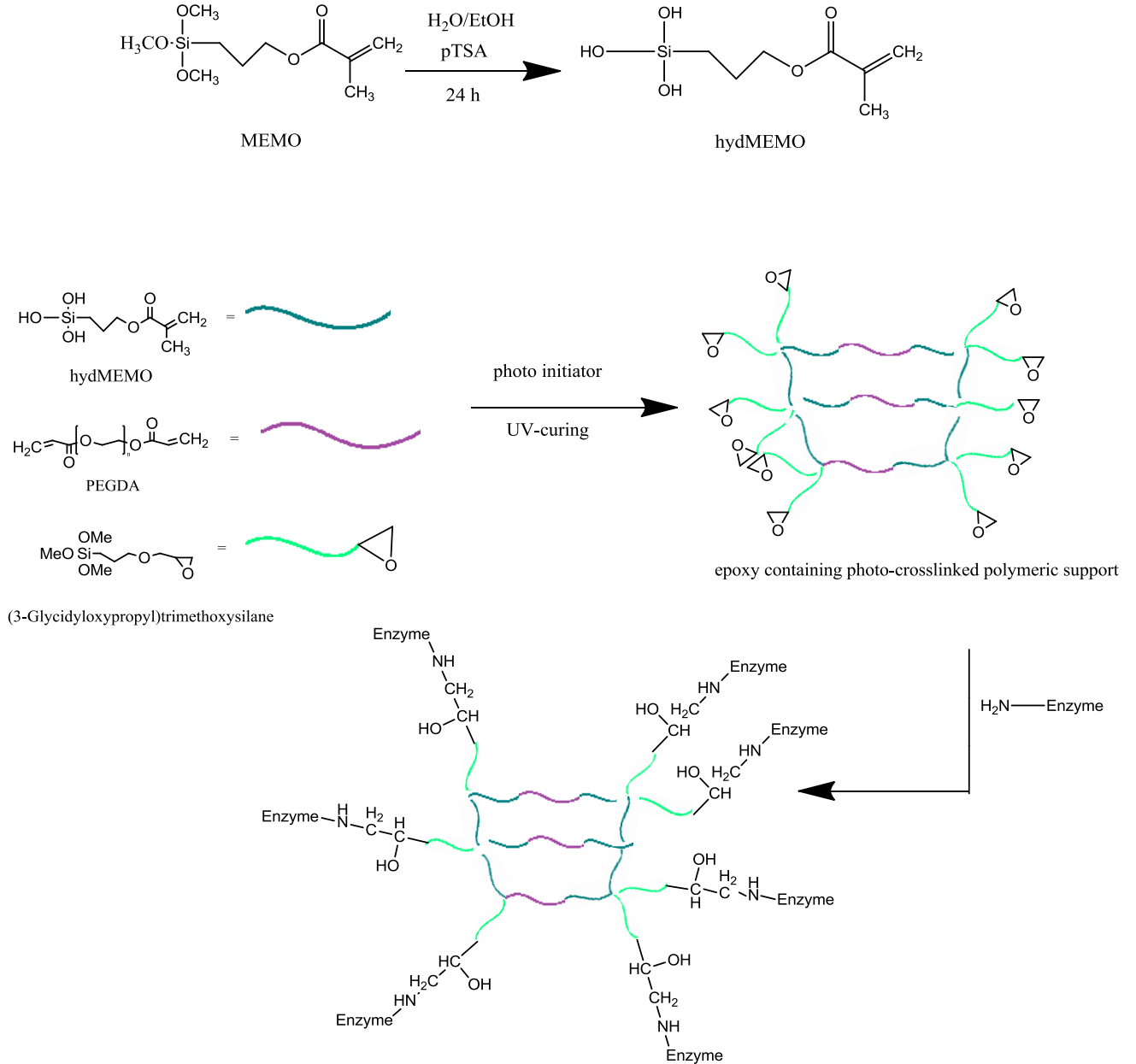
6.1 (4270 U) mg lipaz enzimi 50 ml pH 6.0 fosfat tamponunda çözüldü. Enzim çözeltisi 0.786 g polimer ile 8 saat orbital karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda immobilize enzim miktarını bulmak için Bradford protein tayini yapıldı.

2.3.4. Bradford metoduna göre protein tayini

İmmobilize olan enzimin miktar tayini Coomassie mavisi metoduna göre yapıldı (Bradford, 1976).

1. 2mg/mL ovalbumin stok çözeltisi 0,1 mg/mL olacak şekilde seyreltilerek, standart olarak kullanıldı.
2. Standart çözeltilerden 20 μL (2 $\mu\text{g/mL}$), 40 μL (4 $\mu\text{g/mL}$), 60 μL (6 $\mu\text{g/mL}$), 80 μL (8 $\mu\text{g/mL}$) olacak şekilde alındı.
3. Örnekten 100 μL alındı.
4. Standart ve örneklerin son hacmi distile su ile 800 μL 'ye tamamlandı.

- Referans olarak 800 μ L distile su kullanıldı.
- Standart, referans ve örnek çözeltilerine 200 μ L Bradford reaktifi ilave edildi, tüpler iyice karıştırıldı.
- 15 dakika sonra 595 nm’de referans çözeltisine karşı absorbans ölçümleri yapıldı.



Şekil 2.1. Polimerik desteğin sentezi ve enzime immobilizasyonun şematik olarak gösterimi

2.3.5. Hidrolitik aktivite tayini

Etanol içerisinde hazırlanan 14.4mM *p*-nitrofenil palmitat (*p*NPP) çözeltisinden 1 ml bir tüpe konuldu. Üzerine 1 ml pH 7.0 50 mM fosfat tamponu ilave edildi. 100µg enzim ilavesinden sonra 37°C de 15 dk karıştırıcılı su banyosunda inkübe edildi. 2 ml 0.5M Na₂CO₃ çözeltisi ilavesiyle reaksiyon durduruldu. 5000 g'de santrifüj edildikten sonra süpernatantın absorbansı 410 nm de ölçüldü. Değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış *p*NP çözeltielerinden elde edilmiş standart grafiğe göre ürün hesabı yapıldı (Özyılmaz 2009).

İmmobilize enzimin de aktivite tayini yukarıda anlatıldığı şekilde yapıldı. Sadece serbest enzim yerine tartımı alınmış immobilize enzim konuldu.

Aktivite (IU/mg)= *p*NP(µg) / (Enzim miktarı (µg)x 15 dk)

2.3.5.1. Serbest ve immobilize enzim üzerine pH etkisi

pH 5.0-7.5 aralığında değişik pH'larda fosfat tampon çözeltieleri hazırlandı. Bu tampon çözeltieler kullanılarak serbest ve immobilize enzim üzerine pH etkisi incelendi. Hidrolitik aktivite tayin metodu kullanılarak aktivite ölçümü yapıldı. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek diğer sonuçlar ona göre kıyaslanıp % aktivite hesapları yapıldı. % Bağıl Aktiviteye karşı pH grafiği çizildi.

2.3.5.2. Serbest ve immobilize enzim üzerine sıcaklık etkisi

Serbest ve immobilize enzim üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla çeşitli sıcaklıklarda (25°C - 65°C) hidrolitik aktivite tayini yapıldı. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek diğer sonuçlar ona göre kıyaslanıp % aktivite hesapları yapıldı. % Bağıl Aktiviteye karşı sıcaklık grafiği çizildi.

2.3.5.3. Serbest ve immobilize enzimlerin Km ve Vmax değerlerinin belirlenmesi

Serbest ve immobilize lipaz enzimlerinin aktiviteleri hidrolitik aktivite yöntemine göre optimum şartlarda farklı substrat derişimleri (0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mM) kullanılarak ölçüldü ve Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla Km ve Vmax değerleri hesaplandı.

2.3.5.4. İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

Etanol içerisinde hazırlanan 14.4 mM *p*-nitrofenil palmitat (*p*NPP) çözeltisinden 1 ml bir tüpe konuldu. Üzerine 1 ml pH 7.0 50 mM fosfat tamponu ilave edildi. İmmobilize enzim (ağırlığı bilinen) ilavesinden sonra 37°C de 15 dk karıştırıcılı su banyosunda inkübe edildi. 2 ml 0.5 M

Na₂CO₃ çözeltisi ilavesiyle reaksiyon durduruldu. Enzimin immobilize olduğu polimer çözeltiden alındı yıkanıp kurulandıktan sonra tekrar temiz bir tüpe konuldu. Deneme anlatıldığı şekilde tekrar edildi. Her defasında geriye kalan çözelti 5000 g'de santrifüj edildi ve süpernatantın absorbansı 410 nm de ölçüldü. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek diğer sonuçlar ona göre kıyaslanıp % aktivite hesapları yapıldı. % Bağıl Aktiviteye karşı kullanım sayısı grafiği çizildi.

2.3.5.5. Serbest ve immobilize enzim üzerine depolama kararlılıklarının etkisi

Serbest ve immobilize lipaz enziminin başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra 4°C'de ağzı kapalı şişelerde bekletildi ve bu enzimlerin aktiviteleri 1 ay boyunca belirli aralıklarla ölçüldü. Aktivite tayin ölçümleri hidrolitik aktivite tayin yöntemine göre yapıldı.

2.3.6. Sentetik aktivite tayini

1 mM *p*-nitrofenol (*p*NP) ve 5 mM linoleik asit içeren hekzan çözeltisinden 2 mL alındı ve üzerine 100µg enzim ilave edildi. 37°C de 15 dk karıştırıcılı su banyosunda inkübe edildi. 3.5 ml 25mM NaOH çözeltisi ilavesinden sonra 410 nm de absorbans ölçüldü. Değişik konsantrasyonlarda hekzan içerisinde hazırlanmış *p*NP çözeltilerine 3.5 mL 25 mM NaOH ilave edilerek ekstrakte edildi. Katalize olmuş ve katalize olmamış *p*NP konsantrasyon farkından esterleşme reaksiyonuna katılmış *p*NP miktarı hesaplandı. Aktivite hesabı aşağıdaki formüle göre yapıldı (Özyılmaz 2009).

İmmobilize enzimin de aktivite tayini yukarıda anlatıldığı şekilde yapıldı. Sadece serbest enzim yerine tartımı alınmış immobilize enzim konuldu.

Aktivite (IU/mg)= *p*NP(µg) / (Enzim miktarı (µg)x 15 dk)

2.3.6.1. Serbest ve immobilize enzim üzerine sıcaklık etkisi

Serbest ve immobilize enzim üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla çeşitli sıcaklıklarda (25°C - 65°C) sentetik aktivite tayini yapıldı. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek diğer sonuçlar ona göre kıyaslanıp % aktivite hesapları yapıldı. % Bağıl Aktiviteye karşı sıcaklık grafiği çizildi.

2.3.6.2. Serbest ve immobilize enzimlerin Km ve Vmax değerlerinin belirlenmesi

Serbest ve immobilize lipaz enzimlerinin aktiviteleri sentetik aktivite yöntemine göre optimum Şartlarda farklı substrat derişimleri(0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mM) kullanılarak ölçüldü ve Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla Km ve Vmax değerleri hesaplandı.

2.3.6.3. İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

1 mM *p*-nitrofenol (*p*NP) ve 50 mM linoleik asit içeren hekzan çözeltisinden 2 mL alındı ve üzerine tartımı alınan immobilize enzim ilave edildi. 37°C de 15 dk karıştırıcılı su banyosunda inkübe edildi. 3.5 ml 25mM NaOH zeltisi ilavesinden sonra 410 nm de absorbans ölçüldü. Enzimin immobilize olduğu polimer çözeltiden alındı yıkanıp kurulandıktan sonra tekrar temiz bir tüpe konuldu. Deneme anlatıldığı Şekilde tekrar edildi. En yüksek aktivite 100 kabul edilerek diğer sonuçlar ona göre kıyaslanıp % aktivite hesapları yapıldı. % Bağıl Aktiviteye karşı kullanım sayısı grafiği çizildi.

2.3.6.4. Serbest ve immobilize enzim üzerine depolama kararlılıklarının etkisi

Serbest ve immobilize lipaz enziminin başlangıç aktiviteleri belirlendikten sonra 4°C’de ağzı kapalı şişelerde bekletildi ve bu enzimlerin aktiviteleri 1 ay boyunca belirli aralıklarla ölçüldü. Aktivite tayin ölçümleri sentetik aktivite tayin yöntemine göre yapıldı.

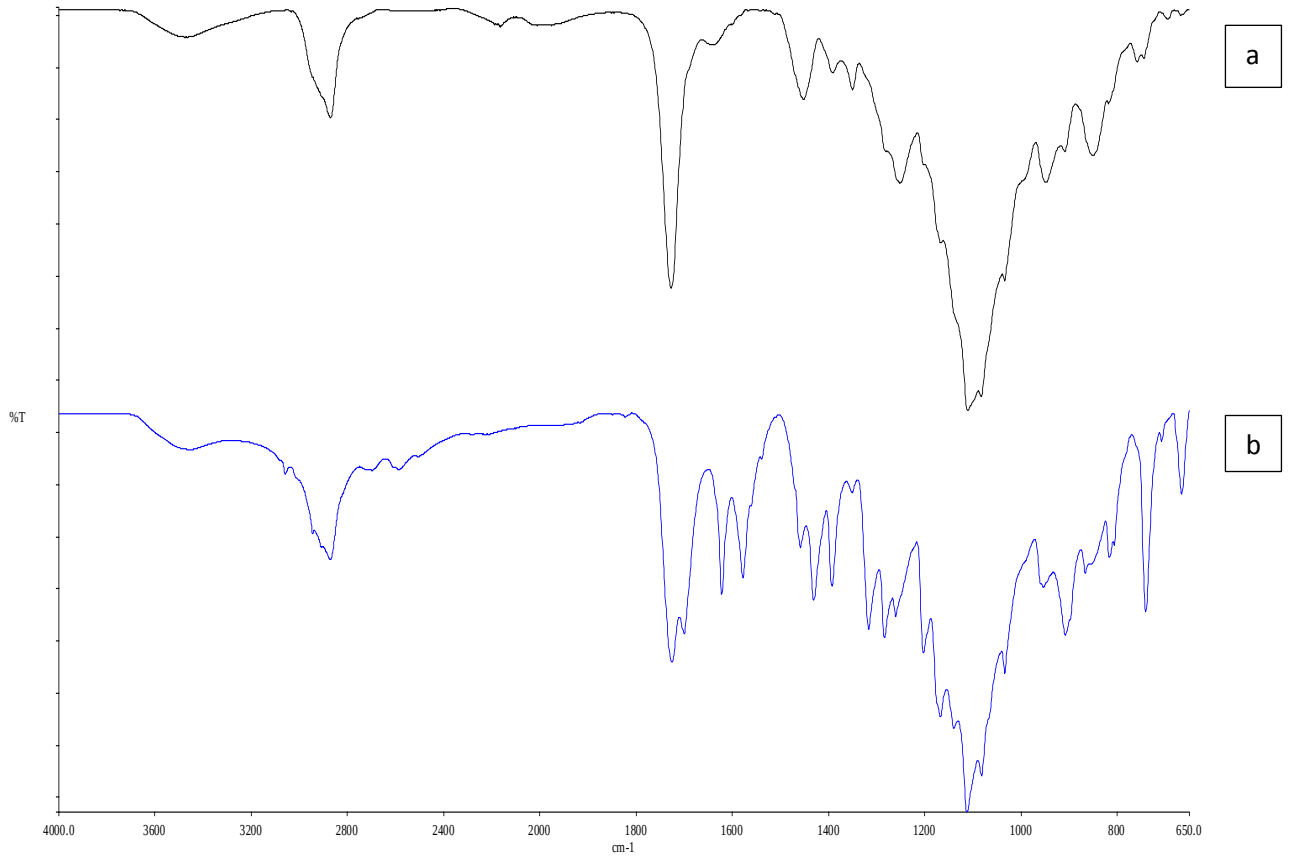
BÖLÜM 3

BULGULAR VE TARTIŞMALAR

3.1. Karakterizasyon

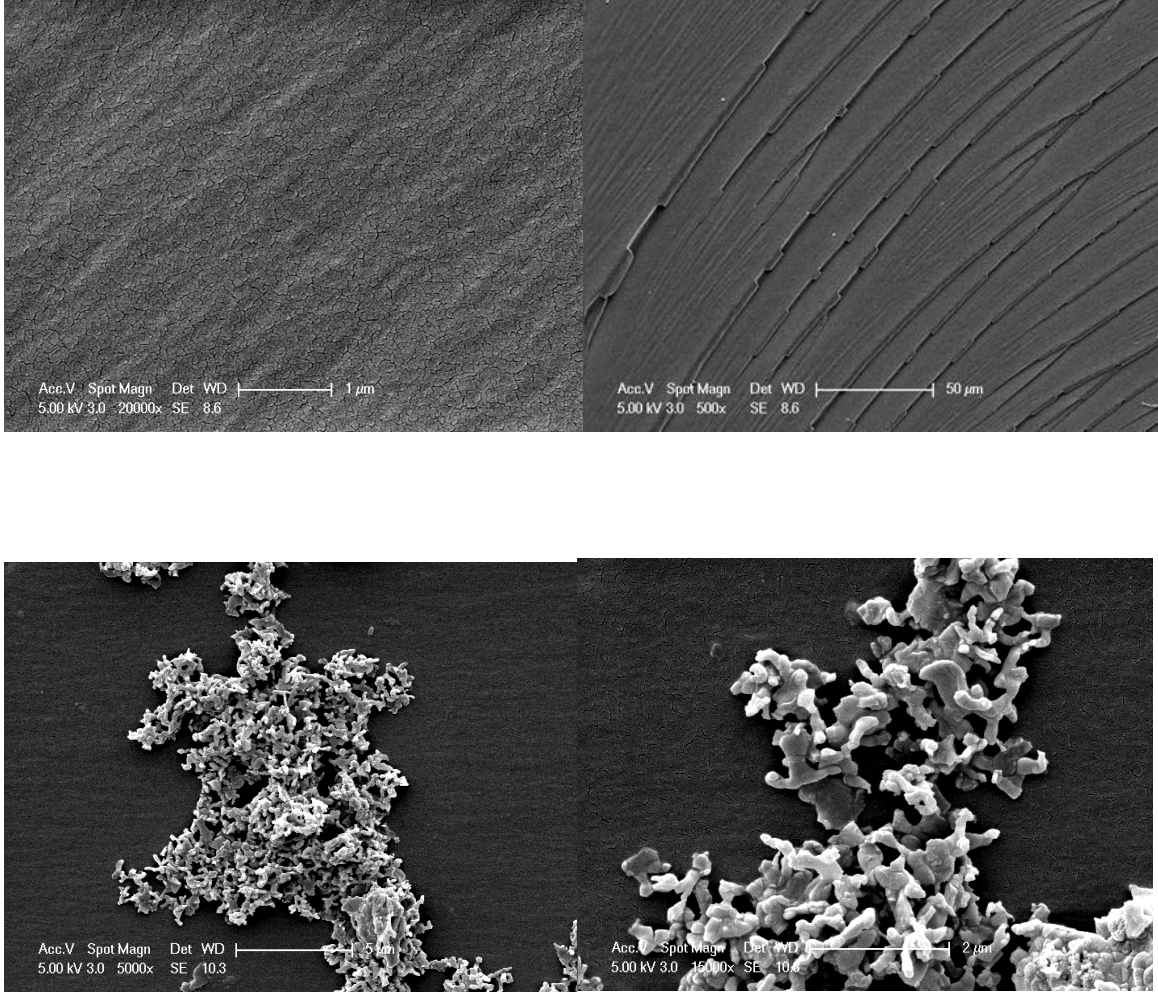
Polimerik desteğin kırık yüzey morfolojileri laktaz enzimi ile immobilizasyon öncesi ve sonrası görüntüleri taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir. SEM görüntüleri polimerik desteğin yüzeyine enzimin bağlandığını göstermiştir.

Organik/inorganik hibrit SiO_2 -matriks film sol-jel metodu ile 3-metakriloksi propil trimetoksisilan başlatıcı olarak kullanılarak hazırlandı. Hibrit polimerin FTIR spektrumları Şekil 3.1 a ve b’de gösterilmiştir. İmmobilize enzimli nanofiberde 1600 cm^{-1} civarında amit I ve amit II absorpsiyon bantları görüldü. Genel olarak amit I ve amit II bantları C=O bağlarının gerilme titreşimiyle enzim yapısındaki C-N gerilme ve N-H bükülme titreşimlerinin kombinasyonundan kaynaklanmaktadır.



Şekil 3.1. a) Organik/ inorganik hibrit SiO_2 -matriks film b) Lipaz enzimi immobilize edilmiş film

Polimerik desteğin kırık yüzey morfolojileri lipaz enzimi ile immobilizasyon öncesi ve sonrası görüntüleri taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Hibrit polimerin kırık yüzey morfolojisinin immobilizasyon öncesi (Şekil 3.2) ve immobilizasyon sonrası (Şekil 3.2) görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.2. Immobilizasyon Öncesi (a) ve Sonrası (b) Organik/ inorganik hibrit SiO₂-matriks film

3.2. Polimerik Desteğe Lipaz Enzimin İmmobilizasyonu

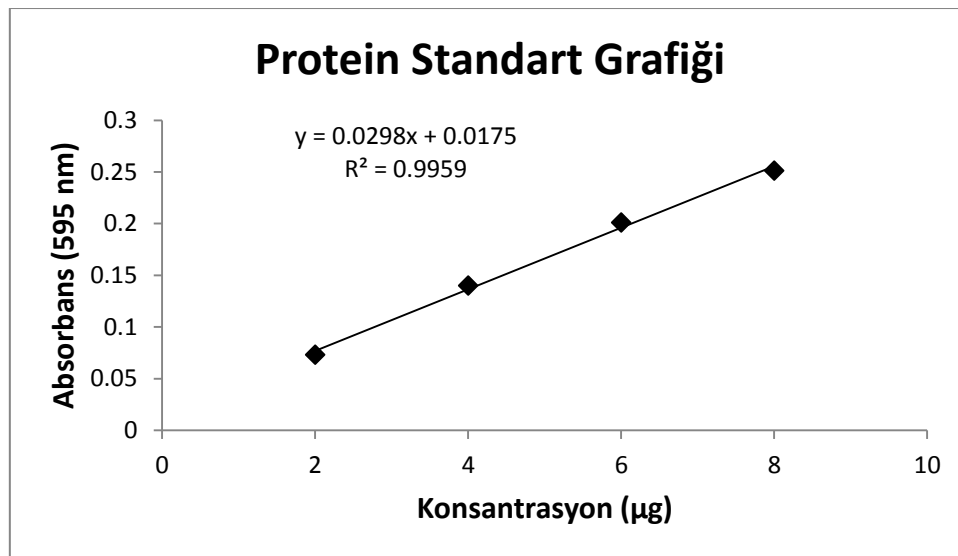
2.3.3’de anlatıldığı gibi lipaz enzimi polimerik destek üzerine immobilize edilmiştir. İmmobilize olan enzim miktarı Bradford protein tayin yöntemine göre ovalbumin standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır. Standart protein grafiği Şekil 3.3.’de aşağıda verilmiştir. Başlangıçta kullanılan enzim miktarından immobilizasyon sonunda bulunan enzim miktarı çıkarılarak bağlanan enzim miktarı bulunmuştur. Polimere yüklenen, bağlanmayan ve bağlanan enzim miktarları Tablo 3.1.’de gösterilmiştir.

Çeşitli destek materyalleri kullanılarak lipaz enzimi ile yapılmış pek çok immobilizasyon çalışması vardır. Bayramoğlu ve arkadaşları çalışmalarında 22.44 mg enzim/1 g polimer, Gunheva ve arkadaşları 23 mg enzim /1 g polimer, Özyılmaz ve arkadaşları yaptıkları farklı iki çalışmada 9 mg enzim /1 g polimer ve 28.6 mg enzim/1 g polimer şeklinde tayin etmişlerdir (Bayramoğlu ve ark. 2008; Gunheva ve ark. 2014; Özyılmaz 2009; Özyılmaz ve ark. 2014). İmmobilize olan enzim miktarı kullanılan polimere ve reaksiyon şartlarına (pH, zaman gibi) göre değişiklik göstermiştir.

Biz tez çalışmamızda 7.22 mg enzimin 1g polimere immobilize olduğunu bulduk.

Tablo 3.1.İmmobilizasyon öncesi ve sonrası enzim miktarları

Başlangıçtaki Enzim Miktarı (mg)	Bağlanmayan Enzim Miktarı (mg)	Bağlanan Enzim Miktarı (mg)
6.1	0.422	5.678



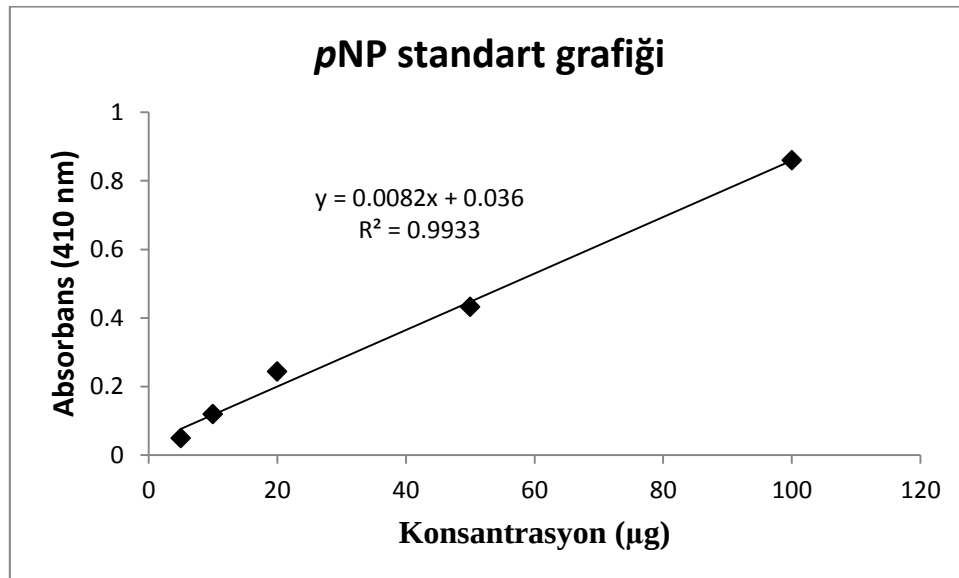
Şekil 3.3. Protein standart eğrisi

3.3. Hidrolitik Aktivite Tayini

Serbest ve immobilize lipaz enziminin hidrolitik aktivite tayinleri 2.3.5’de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Serbest ve immobilize enzim üzerine sıcaklık, pH, tekrar kullanılabilirlik ve depolama süresi üzerine etkileri hidrolitik aktivite tayin yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Serbest ve immobilize enzimlerin kinetik değerleri de (K_m ve V_{maks}) saptanmıştır.

$$\text{Aktivite (IU/mg)} = \frac{pNP(\mu g)}{(\text{Enzim miktarı } (\mu g) \times 15 \text{ dk})}$$

Yukarıdaki formüle göre aktivite sonuçları *pNP* (ürün) standart grafiğinden hesaplanmıştır. Farklı konsantrasyonlar kullanılarak hazırlanan *pNP* standart grafiği aşağıda Şekil 3.4’de verilmiştir.

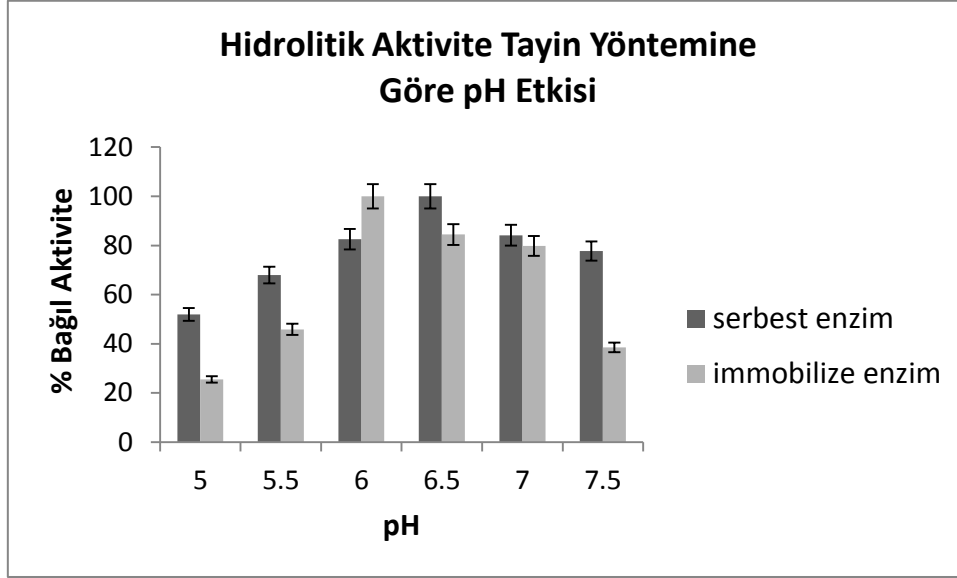


Şekil 3.4. *pNP* standart grafiği

3.3.1. Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine pH Etkisi

Serbest ve immobilize enzim üzerine pH etkisi 5.0-7.5 aralığında incelenmiş, serbest enzim pH 6.5’da, immobilize enzim ise pH 6.0’da maksimum aktivite göstermiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri pH değerleri birbirlerine yakın olmakla birlikte; enzim katı desteğe immobilize edildiğinde optimal pH’ı değiştiği pek çok çalışmada gösterilmiştir. Bu değişiklik katı desteğin yüzeyinde yük dağılımlarının farklı olması ve enzimin destekle etkileşimi sonucunda, enzimin çevresel yükünün değişmesi olarak açıklanmıştır (Kahraman ve ark. 2007).

Hou ve arkadaşları poliamidoamin dendrimer ile modifiye edilmiş makro gözenekli polistren üzerine lipaz enzimini immobilize ettiklerinde immobilize enzimin pH 7.5-8.0 aralığında aktif olduğunu bulmuşlardır (Hou 2014). Bayramoğlu ve arkadaşları amin fonksiyonlu polipropilen membran üzerine lipaz enzimini immobilize ettiklerinde immobilize enzimin pH 7.5'te maksimum aktivite gösterdiğini buldular (Bayramoğlu 2011).



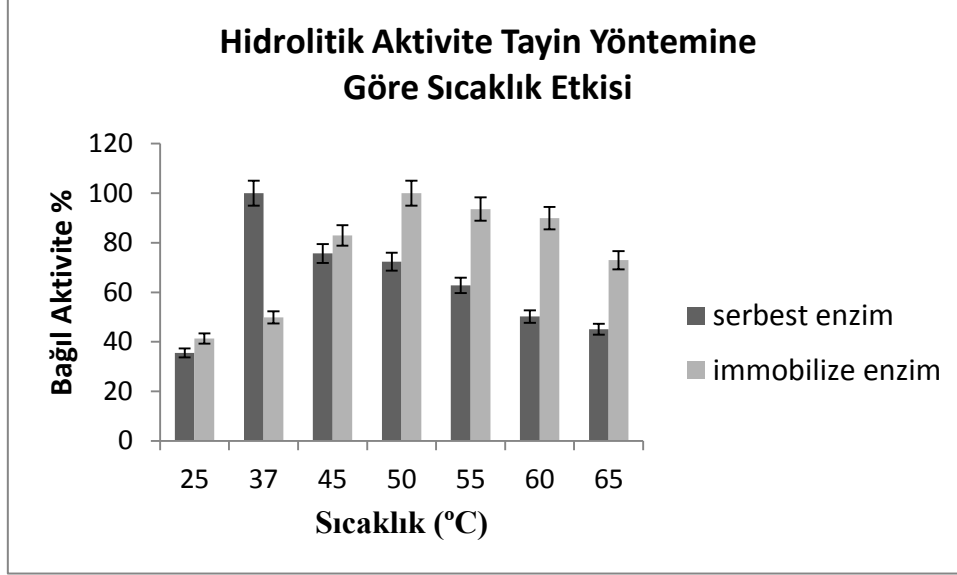
Şekil 3.5. Hidrolitik Aktivite tayin yöntemine göre serbest ve immobilize enzim üzerine pH etkisi

3.3.2. Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine Sıcaklık Etkisi

Serbest ve immobilize enzim üzerine sıcaklık etkisi 25-65°C aralığında incelenmiştir ve % Bağlı Aktiviteye karşı sıcaklık grafiği Şekil 3.6.'da verilmiştir. Serbest enzimin hidrolitik aktivite tayin yönteminde maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 37°C olarak bulunmuştur. İmmobilize enzim ise 50°C'de maksimum aktivite göstermiştir. Serbest enzim 50 °C'de yaklaşık % 72 oranında bir aktivite göstermiştir.

Yong ve arkadaşları manyetik hidrofilik mikrokürelere lipaz enzimini immobilize ettiklerinde, immobilize enzimin 35-45°C aralığında maksimum aktivite gösterdiğini buldular (Yong 2008). Hou ve arkadaşları poliamidoamin dendrimer ile modifiye edilmiş makro gözenekli polistren üzerine lipaz enzimini immobilize ettiklerinde immobilize enzimin 55-65°C aralığında aktif olduğunu bulmuşlardır (Hou 2014). Enzimin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değişmesi optimum sıcaklığın artmasına neden olabilir. Bu ise immobilizasyon ile enzimin aktif bölgesinin korunduğunu; sıcaklık değişimi ile aktif bölgenin konformasyonunun bozulma ve zarar görmesinin engellendiği şeklinde açıklanabilir.

İmmobilizasyon sonucunda enzimin konformasyonel hareketliliği kısıtlandığından daha kararlı hale gelmiş olması onu dışarıdan gelebilecek etkilere karşı korur. Bu yüzden immobilize enzim daha yüksek sıcaklıklarda serbest enzime göre daha aktiftir (Yong 2008).



Şekil 3.6. Hidrolitik Aktivite tayin yöntemine göre serbest ve immobilize enzim üzerine sıcaklık etkisi

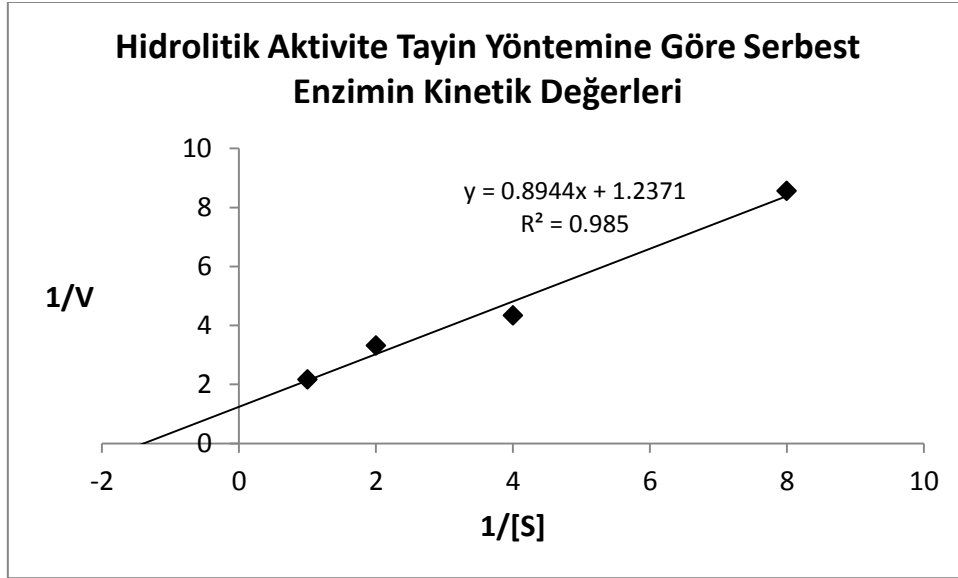
3.3.3. Serbest ve İmmobilize Enzimin Kinetik Parametreleri

Hidrolitik aktivite tayin yöntemi kullanılarak farklı substrat konsantrasyonlarında serbest enzimin K_m ve V_{maks} değerleri Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak hesaplanmıştır. Kinetik değerlerine ait grafik Şekil 3.7 ve 3.8’de verilmiştir. Tez çalışmasında serbest enzimin K_m değeri 0.71 mM iken immobilize enzimin K_m değeri 0.91 mM olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzimlerin V_{maks} değerleri sırası ile 0.83 mM/dakika ve 0.23 mM/dakika şeklinde tayin edilmiştir.

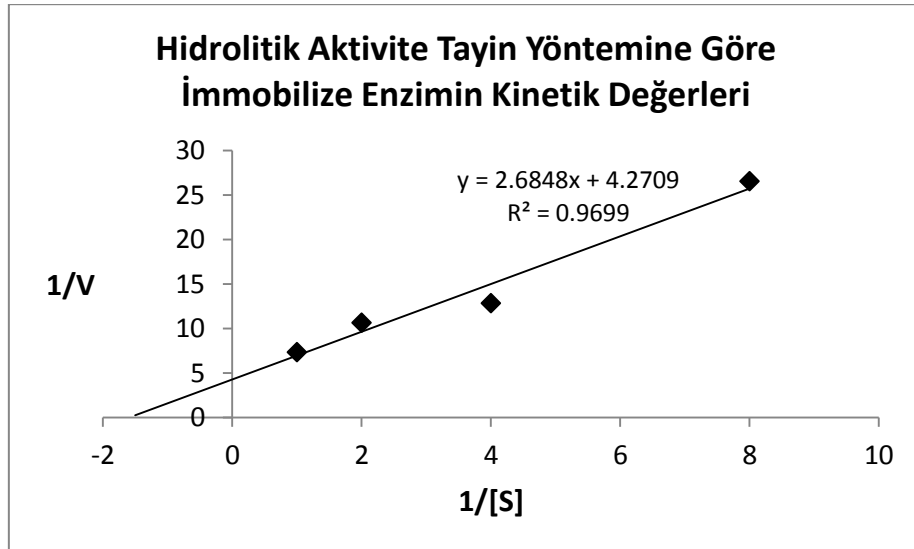
İmmobilizasyon sonunda V_{maks} değeri azalmış, K_m değeri artmıştır ve K_m değerinin artması enzimin substratına olan ilgisinin azaldığını göstermiştir. İmmobilizasyon sonunda substratın bağlı enzime hareket etmesi ve etkileşime girmesi zorlaşabilir. İmmobilize enzimin substrata olan ilgisi ve dolayısı ile katalitik parametreleri serbest enzimden farklı olabilir. İmmobilize olan enzimin konformasyonel yapısının değişmesi, sterik engel, difüzyon etkileri gibi nedenlerden dolayı kinetik parametreler değişiklik gösterebilir (Bayramoğlu 2007).

Bayramoğlu ve arkadaşları poli (gisidilmetakrilat-metilmetakrilat) manyetik bilyelerine lipaz enzimini immobilize ettiklerinde serbest enziminin K_m değerini 2.6 mM bulurken immobilize

enzimin K_m değerini 12.3 mM olarak tayin etmişlerdir. Serbest ve immobilize enzimin V_{maks} değerlerini ile 984 ve 773 U/mg şeklinde bulmuşlardır (Bayramoğlu 2008). Yong ve arkadaşları manyetik hidrofilik mikrokürelere lipaz enzimini immobilize ettiklerinde, serbest ve immobilize enzimin K_m değerlerini sırasıyla 0.52 ve 1.03 mg/mL olarak bulurken serbest ve immobilize enzim için V_{maks} değerlerini ise 138.9 U/mg ve 79.6 U/mg enzim şeklinde tayin etmişlerdir (Yong 2008).



Şekil 3.7. Hidrolitik aktivite tayin yöntemine göre serbest enzimin Lineweaver-Burk grafiği

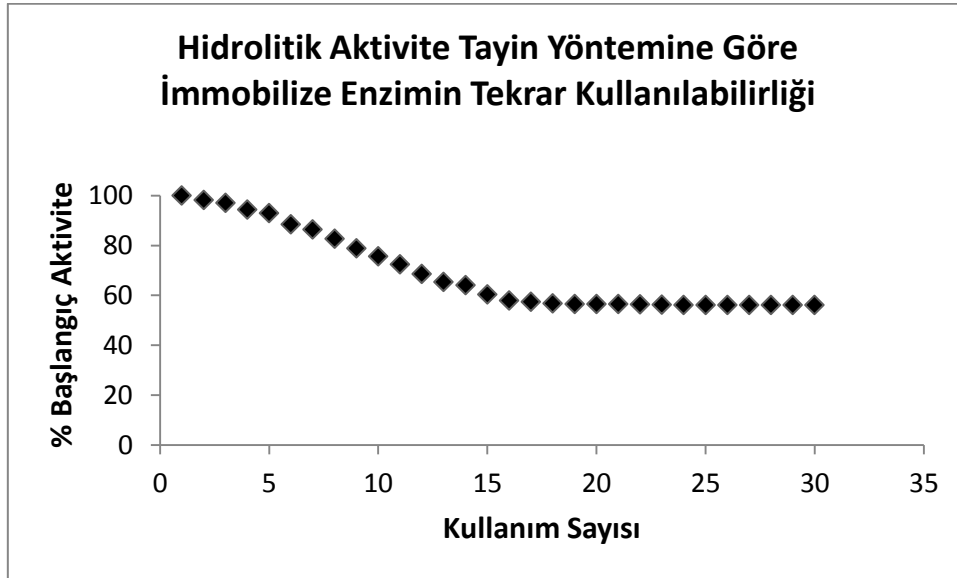


Şekil 3.8. Hidrolitik aktivite tayin yöntemine göre immobilize enzimin Lineweaver-Burk grafiği

3.3.4. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği

İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği endüstriyel uygulamalarda önemlidir. Aynı immobilize enzim kullanılarak yapılan 30 deneme sonunda elde edilen sonuçlar Şekil 3.9’da verilmiştir. İmmobilize enzimin başlangıç aktivitesi ilk 10 kullanım sonucunda % 75.6 bulunurken 20 kullanım sonucunda % 56.5 olarak saptanmıştır. 20 denemeden sonra aktivite sonuçları yaklaşık % 56 civarında sabit kalmıştır.

Bayramoğlu ve arkadaşları yaptıkları farklı iki çalışmada immobilize enzimin 10 denemeden sonra % 62 ve 12 denemeden sonra %81 oranında aktivite gösterdiğini bulmuşlardır (Bayramoğlu ve ark. 2008; Bayramoğlu ve ark. 2011).Yongve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada immobilize enzimin 10 kullanım sonucunda %80 oranında aktivite gösterdiğini tayin etmişlerdir (Yong 2008).



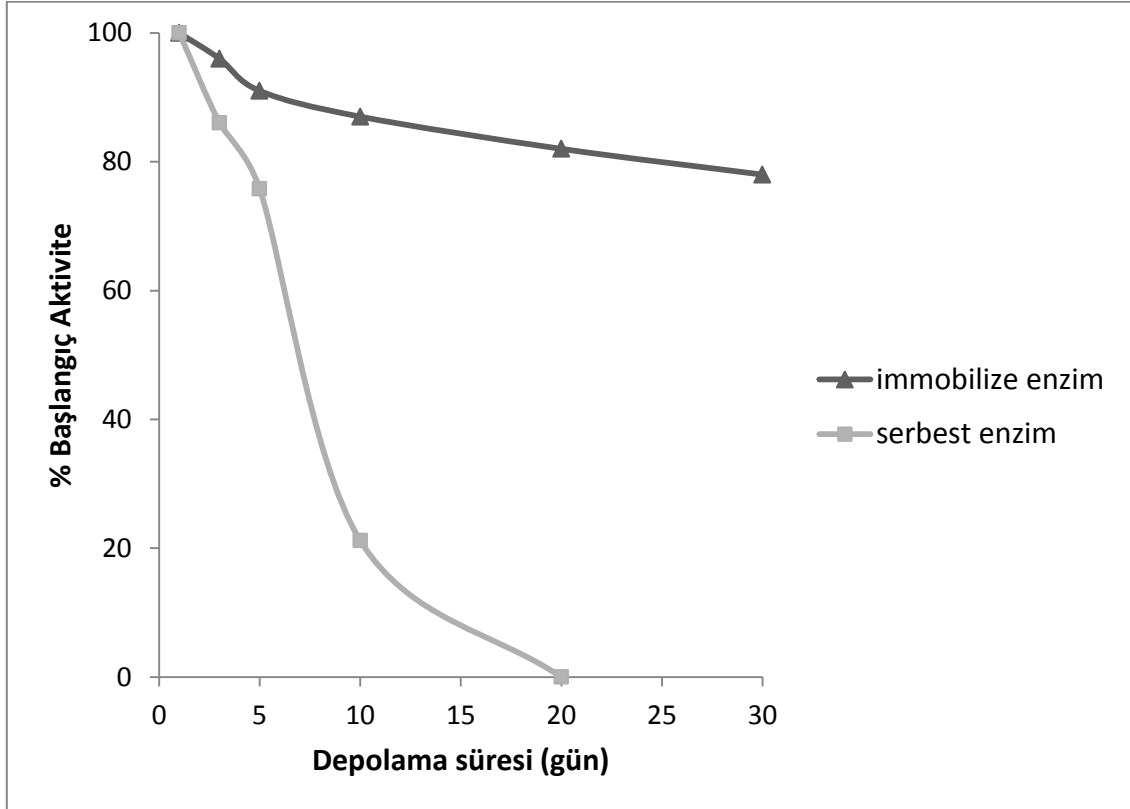
Şekil 3.9. Hidrolitik aktivite tayin yöntemine göre immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği

3.3.5. Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine Depolama Süresinin Etkisi

Serbest ve immobilize lipaz enziminin başlangıç aktiviteleri hidrolitik aktivite tayin yöntemine göre belirlendikten sonra 4°C’de ağzı kapalı şişelerde bekletilmiştir ve bu enzimlerin aktiviteleri 1 ay boyunca belirli aralıklarla ölçülmüştür ve sonuçlar Şekil 3.10’da verilmiştir. Serbest enzim yaklaşık 20 gün sonunda aktivitesini tamamen kaybederken immobilize enzim ise bu sürede %82 aktivite göstermiştir. 30. gün sonunda ise immobilize enzimin aktivitesi %78 bulunmuştur.

Bayramoğlu ve Arıca immobilize lipaz enziminin aktivitesini 30 gün sonunda yaklaşık %80, Bayramoğlu ve arkadaşları %64, Huang ve arkadaşları ise %62 olarak tayin etmişlerdir (Bayramoğlu ve Arıca 2008; Bayramoğlu ve ark. 2011, Huang ve ark. 2011).

Tez çalışmamıza ve diğer çalışmalara bakıldığında immobilize enzimin serbest enzime göre daha uzun süre aktivite gösterdiği saptanmıştır.



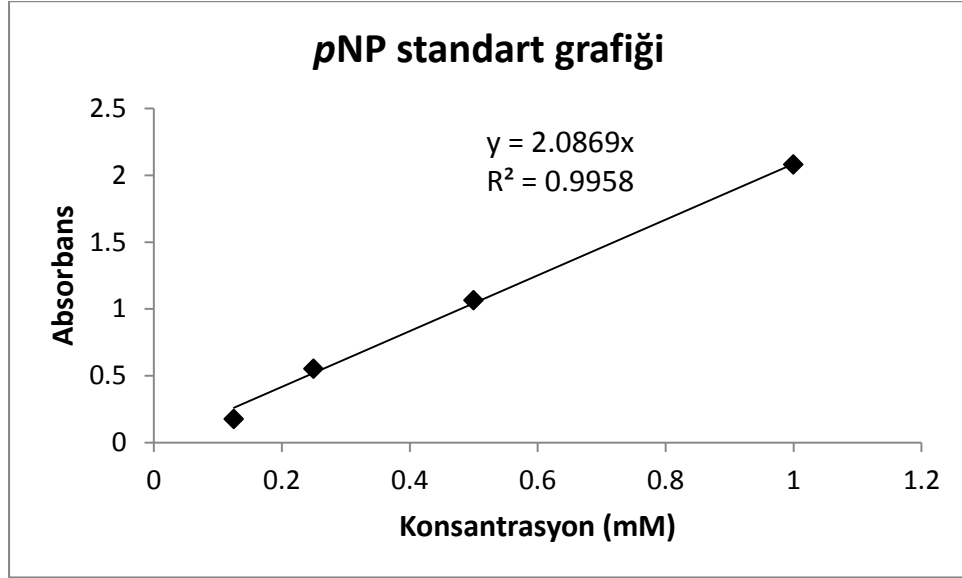
Şekil 3.10. Hidrolitik aktivite tayin yöntemine göre serbest ve immobilize enzimin depolama süresinin gösterilmesi

3.4. Sentetik Aktivite Tayini

Serbest ve immobilize lipaz enziminin hidrolitik aktivite tayinleri 2.3.6’da anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Serbest ve immobilize enzim üzerine sıcaklık, tekrar kullanılabilirlik ve depolama süresi üzerine etkileri hidrolitik aktivite tayin yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Serbest ve immobilize enzimlerin kinetik değerleri de (K_m ve V_{maks}) saptanmıştır.

$$\text{Aktivite (IU/mg)} = \frac{pNP(\mu g)}{(\text{Enzim miktarı } (\mu g) \times 15 \text{ dk})}$$

Farklı konsantrasyonlar kullanılarak hekzan içinde hazırlanan *p*NP standart grafiği aşağıda Şekil 3.11’de verilmiştir. Katalize olmuş ve katalize olmamış *p*NP konsantrasyon farkı esterleşme reaksiyonuna katılmış *p*NP miktarı yukarıdaki formüle göre hesaplandı.

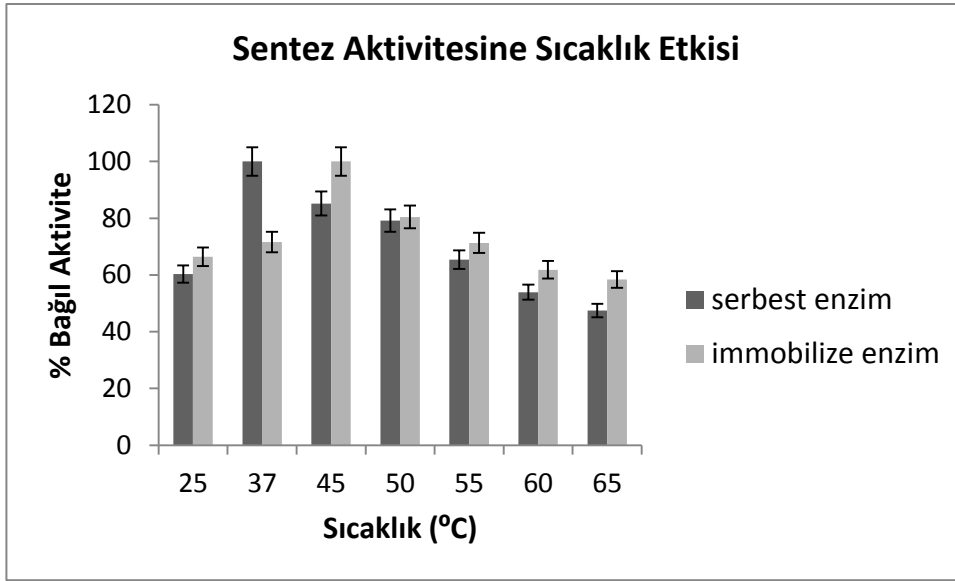


Şekil 3.11. Hekzan içinde hazırlanan *p*NP standart grafiği

3.4.1. Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine Sıcaklık Etkisi

Serbest ve immobilize enzim üzerine sıcaklık etkisi 25-65°C aralığında incelenmiştir ve % Bağıl Aktiviteye karşı sıcaklık grafiği Şekil 3.12’de verilmiştir. Serbest enzimin sentetik aktivite tayin yönteminde maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 37°C olarak bulunmuştur. İmmobilize enzim ise 45°C’de maksimum aktivite göstermiştir.

Özyılmaz 2009’da yaptığı bir çalışmada *C. rugosa*’dan elde edilmiş lipaz enzimini glutaraldehit ile aktive edilmiş silika jel üzerine immobilize ettiğinde immobilize enzimin 45°C’de maksimum sentez aktivitesi gösterdiğini tayin etmiştir (Özyılmaz 2009). Patel ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada grafen oksitle kaplanmış polimerik destek materyaline *C. rugosa*’dan elde edilmiş lipaz enzimini immobilize ettiklerinde; immobilize enzimin 40°C’de maksimum sentez aktivitesi gösterdiğini tayin etmişlerdir (Patel ve ark. 2015).

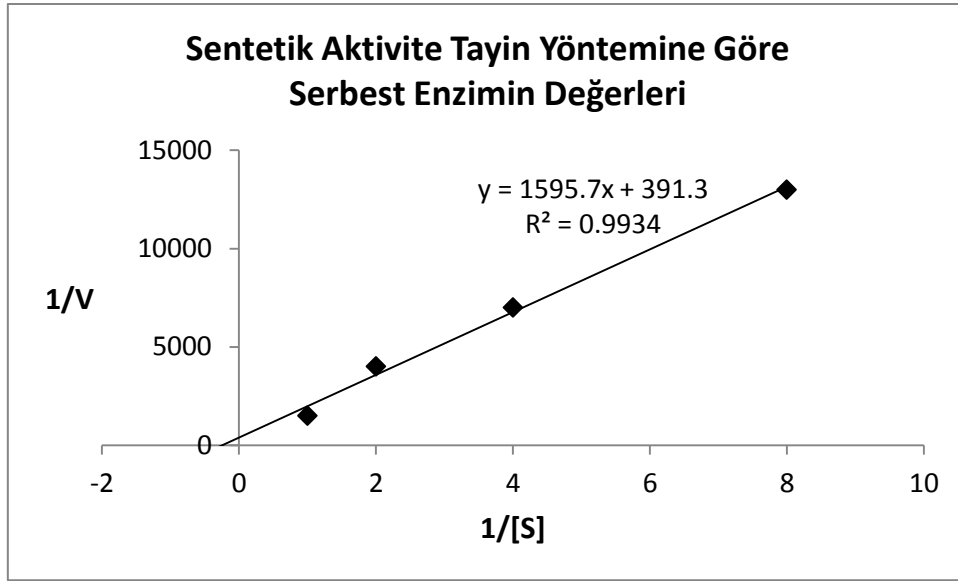


Şekil 3.12. Sentetik Aktivite tayin yöntemine göre serbest ve immobilize enzim üzerine sıcaklık etkisi

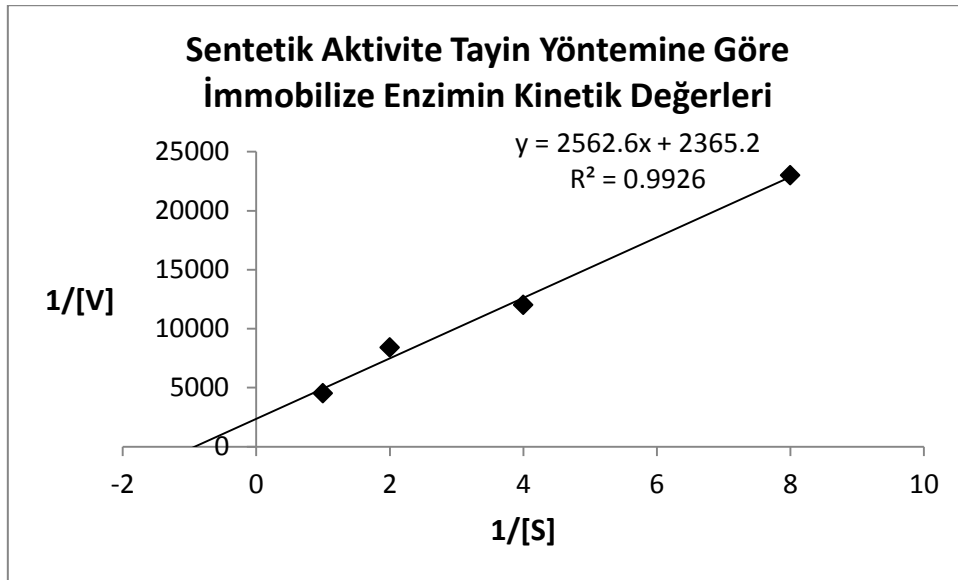
3.4.2. Serbest ve İmmobilize Enzimlerin K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

Sentetik aktivite tayin yöntemi kullanılarak farklı substrat konsantrasyonlarında (0.125-1 mM) serbest enzimin K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak hesaplanmıştır. Kinetik değerlerine ait grafik Şekil 3.13 ve Şekil 3.14'te verilmiştir. Serbest enzimin K_m değeri 5 mM, V_{max} değeri 0,0026 mM/dakika olarak bulunurken, immobilize enzimin K_m değeri 1.1 mM, V_{max} değeri 0,0004 mM/dakika olarak tayin edilmiştir.

Patel ve arkadaşları serbest ve immobilize enzimin K_m değerlerini sırasıyla 1.512, 0.83 mM şeklinde ve V_{max} değerlerini sırasıyla 0.025, 0.204 mM/dakika olarak tayin etmişlerdir (Patel ve ark.2015). Özyılmaz immobilize enzimin K_m değerlerini sırasıyla 1.3, 0.4 mM şeklinde ve V_{max} değerlerini sırasıyla 2.75, 2.97 mM/dakika olarak tayin etmişlerdir (Özyılmaz 2009).



Şekil 3.13. Sentetik aktivite tayin yöntemine göre serbest enzimin Lineweaver-Burk grafiği

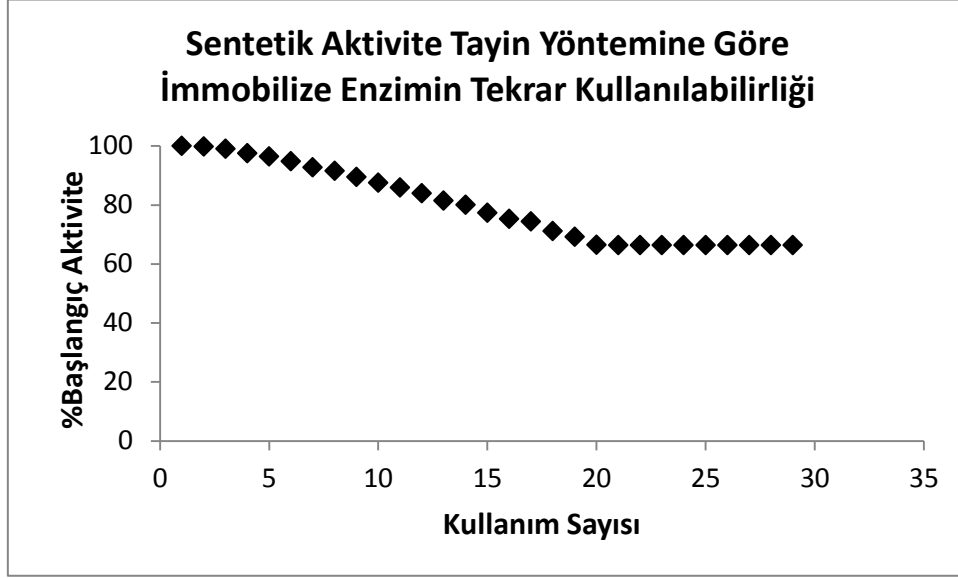


Şekil 3.14. Sentetik aktivite tayin yöntemine göre immobilize enzimin Lineweaver-Burk grafiği

3.4.3. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği 2.3.6.3’de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Aynı immobilize enzim kullanılarak yapılan 30 deneme sonunda elde edilen sonuçlar Şekil 3.15’te verilmiştir. İmmobilize enzimin başlangıç aktivitesi ilk 10 kullanım sonucunda 87.51 bulunurken 20 kullanım sonucunda 66.48 olarak saptanmıştır. 20 denemeden sonra aktivite sonuçları yaklaşık 66 civarında sabit kalmıştır.

Patel ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada immobilize enzimin 10 kullanım sonucunda % 92 ve 29 kullanım sonunda ise yaklaşık %50 oranında aktivite gösterdiğini tayin etmişlerdir (Patel ve ark. 2015). Özyılmaz yaptığı çalışmada immobilize enzimin 100 kullanım sonunda yaklaşık % 60 aktivite gösterdiğini bulmuştur (Özyılmaz 2009).

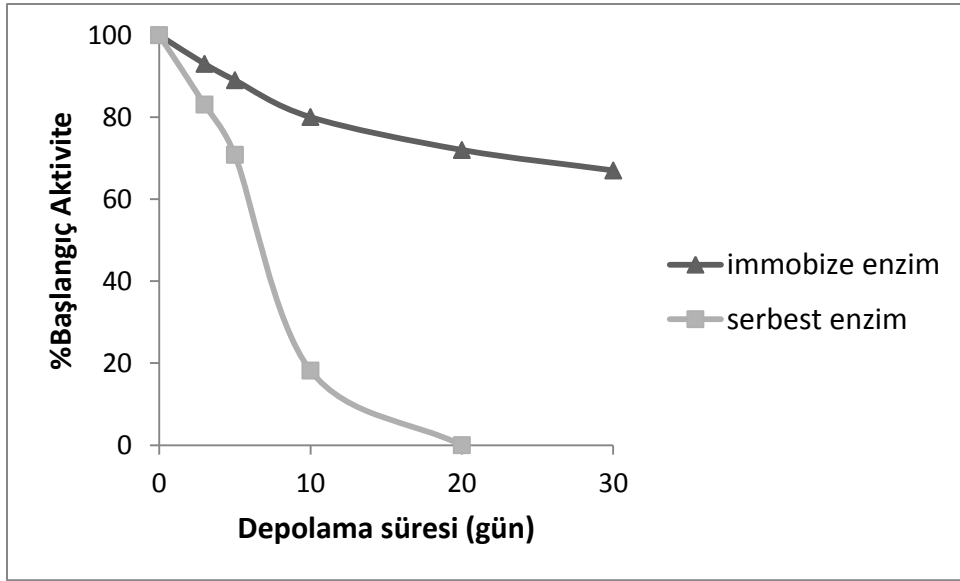


Şekil 3.15. Sentetik aktivite tayin yöntemine göre immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği

3.4.4. Serbest ve İmmobilize Enzim Üzerine Depolama Kararlılıklarının Etkisi

Serbest ve immobilize lipaz enziminin başlangıç aktiviteleri sentetik aktivite tayin yöntemine göre belirlendikten sonra 4°C’de ağzı kapalı şişelerde bekletilmiştir ve bu enzimlerin aktiviteleri 1 ay boyunca belirli aralıklarla ölçülmüştür ve sonuçlar Şekil 3.16’da verilmiştir. Serbest enzim yaklaşık 20 gün sonunda aktivitesini tamamen kaybederken immobilize enzim ise bu sürede % 72 aktivite göstermiştir. 30. gün sonunda ise immobilize enzimin aktivitesi % 67 bulunmuştur.

Özyılmaz immobilize lipaz enziminin aktivitesini 60 gün sonunda yaklaşık % 60, Patel ve arkadaşları 68 gün sonunda da yüksek aktivite gösterdiğini tayin etmişlerdir (Özyılmaz 2009; Patel ve ark. 2015).



Şekil 3.16. Sentetik aktivite tayin yöntemine göre serbest ve immobilize enzimin depolama süresinin gösterilmesi

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

Organik/inorganik hibrit SiO_2 -matriks film sol-jel metodu ile 3- metakriloksi propil trimetoksisilan başlatıcı olarak kullanılarak hazırlanmıştır ve FTIR ve SEM analizleri ile fonksiyonel gruplar ve yüzey morfolojisi incelenmiştir.

Çalışmamızda 1 gram polimere 7.22 mg *C. rugosa*'dan elde edilmiş lipaz enziminin immobilize olduğu tayin edilmiştir. Elde edilen sonuca göre uygulanan enzimin % 92.2'sinin immobilize olduğu bulunmuştur. Enzim ve matriks arasındaki bağın son derece dengeli ve sağlam olması nedeni ile kovalent immobilizasyon tercih edilmiştir. Enzimin polimerik destek materyaline yüksek konsantrasyonda immobilize olması oldukça iyi bir sonuçtur.

Tez çalışmamızda serbest ve immobilize lipaz enziminin hidrolitik ve sentetik aktiviteleri şeklinde iki farklı çalışma yapılmıştır.

Hidrolitik aktivite çalışmasında serbest ve immobilize enzim üzerine pH, sıcaklık, kinetik, tekrar kullanılabilirlik ve depolama üzerine aktivite farklılıkları incelenmiştir. Buna göre serbest enzim pH 6.5'te, immobilize enzim pH 6.0'da maksimum aktivite göstermiştir. Bu farklılığın nedeni katı desteğin yüzeyinde yük dağılımlarının farklı olması ve enzimin destekle etkileşimi sonucunda, enzimin çevresel yükünün değişmesi ile açıklanmıştır. Serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi incelendiğinde serbest enzim 37°C, immobilize enzim ise 50°C'de maksimum aktivite göstermiştir. Bu ise immobilizasyon ile enzimin aktif bölgesinin korunduğunu; sıcaklık değişimi ile aktif bölgenin konformasyonunun bozulma ve zarar görmesinin engellendiği şeklinde açıklanmıştır. Tez çalışmamızda serbest enzimin K_m değeri 0.71 mM iken immobilize enzimin K_m değeri 0.91 mM olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzimlerin V_{maks} değerleri sırası ile 0.83 mM/dakika ve 0.23 mM/dakika şeklinde tayin edilmiştir. Immobilizasyon sonunda V_{maks} değeri azalmış, K_m değeri ise artmıştır. K_m değerinin artması enzimin substratına olan ilgisinin azaldığını göstermiştir. V_{maks} değerinin azalması enzimin konformasyonunun immobilizasyon işlemi ile değiştiğini ve buna bağlı olarak aktivitesinin azaldığını göstermektedir. Immobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği, seçilen destek materyalinin ya da metodun etkinliğini değerlendirmede oldukça önemlidir. Tez çalışmamızda 20 denemeden sonra aktivite sonuçları yaklaşık % 56 civarında sabit kalmıştır. 30 gün boyunca serbest ve immobilize enzimin aktiviteleri belirli zamanlarda ölçülmüştür. Serbest enzim 20 gün sonunda aktivitesini tamamen kaybederken immobilize enzim başlangıçtaki aktivitesinin % 82'sini korumuştur. 30. gün sonunda ise immobilize enzimin aktivitesi %78 bulunmuştur.

Sentetik aktivite çalışmasında serbest ve immobilize enzim üzerine sıcaklık, kinetik, tekrar kullanılabilirlik ve depolama üzerine aktivite farklılıkları incelenmiştir. Serbest enzimin sentetik aktivite tayin yönteminde maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 37°C olarak bulunmuştur. İmmobilize enzim ise 45°C’de maksimum aktivite göstermiştir. Serbest enzimin Km değeri 5 mM, Vmaks değeri 0,0026 mM/dakika olarak bulunurken, immobilize enzimin Km değeri 1.1 mM, Vmaks değeri 0,0004 mM/dakika olarak tayin edilmiştir. İmmobilize enzimin sentetik aktivite çalışmasında tekrar kullanılabilirliği incelendiğinde 20 denemeden sonra aktivite sonuçları yaklaşık 66 civarında sabit kaldığı bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzim üzerine depolama süresinin Etkisi incelendiğinde serbest enzim yaklaşık 20 gün sonunda aktivitesini tamamen kaybederken immobilize enzim ise bu sürede %72 aktivite gösterdiği tayin edilmiştir.

Gelecek perspektifleri, öneriler

Lipaz gerek yapısı gerekse de sanayide kullanılabilirliği açısından oldukça ilgi çekici bir enzimdir. Lipaz enziminin immobilizasyonu ile enzimin stabilitesi, tekrar kullanılabilirliği, depolama süresi iyileştirilme yoluna gidilmektedir. Biz de tez çalışmamızda organik/inorganik hibrit SiO₂-matriks film üzerine lipaz enzimini kovalent olarak immobilize ederek; daha kararlı, uzun ömürlü, tekrar kullanılabilir hale getirdik.

Ticari öneme sahip olan lipazların immobilizasyonu için yeni, maliyeti az olan polimerik desteklerin geliştirilmesi, hem günümüzde hem de gelecekte araştırma konuları arasında yer almaya devam edecektir.

KAYNAKLAR

- Arica, M. Y., Bayramoglu, G.,(2008),“Covalent immobilization of lipase onto spacerarm attached magnetic poly(GMA-MMA) beads”, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 55, 76–83.
- Aybastier, Ö., Demir, C., (2010),“Optimization of immobilization conditions of Thermomyces lanuginosus lipase on styrene–divinylbenzene copolymer using response surface methodology” , Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 63, 170–178.
- Badgujar, K.C., Dhake, K.P., Bhanage, B.M.,(2013), “Immobilization of Candida cylindracea lipase on poly lactic acid, polyvinyl alcohol and chitosan based ternary blend film: Characterization, activity, stability and its application for N-acylation reactions” Process Biochemistry, 48, 1335–1347.
- Bai, Y-X., Li, Y-F., Yang, Y., Yi, L-X.,(2006),“Covalent immobilization of triacylglycerol lipase onto functionalized novel mesoporous silica supports” Journal of Biotechnology,125,574–8.
- Basseghoda, A., Cesarini, S., Diaz, P.,(2012),“Lipase improvement: goals and strategies”Computational and Structural Biotechnology Journal, 2(3),1-8.
- Baştürk, E., Demir, S., Danış, Ö., Kahraman, M.V., (2013),“Covalent Immobilization of α -Amylase onto Thermally Crosslinked Electrospun PVA/PAA Nanofibrous Hybrid Membranes”, 127(1), 349–355.
- Bayramoglu, G., Kacar, Y., Arica, M. Y.,(2002), “Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic group incorporated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based hydrophilic membrane matrix” Journal of Food Engineering, 52, 367–74.
- Bayramoğlu, G., Tunalı, Y., Arica, M.Y.,(2007), “Immobilization of β -galactosidase onto magnetic poly(GMA–MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor” Catalysis Communications, 8, 1094–1101.
- Bayramoğlu, G., Arica, M.Y.,(2008), “Preparation of poly(glycidylmethacrylate–methylmethacrylate) magnetic beads: Application in lipase immobilization” Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 55, 76–83.

Bayramoğlu, G., Hazer, B., Altıntaş, B., Arıca, M.Y., (2011), “Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis” *Process Biochemistry*, 46, 372–378.

Box, G. E. P., Wilson, K.B.,(1951), “On the Experimental Attainment of Optimum Conditions”. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*, 13(1), 1-45.

Bradford, M.M.,(1976), “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding *Analytical Biochemistry*”, 72, 248-254.

Brady, D., Jordaan, J.,(2009), “Advances in enzyme immobilization” *Journal of Biotechnology Letters*, 31,1639–50.

Brinker, C.J., Scherer, G. W., 1990, “Sol-Gel Science”, Academic Press, San Diego.

Busto, E., Gotor-Fernandez, V., Gotor, V.,(2010), Hydrolases: catalytically promiscuous enzymes for non conventional reaction in organic synthesis, *Chemical Society Reviews*, 39,4504–23.

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

Chiou, S.H., Wu, W. T., (2004), “Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups” *Biomaterials*, 25, 197–204.

Deng, H-T., Xu, Z-K., Huang, X-J., Wu, J., Seta, P., (2004),(2010), “Adsorption and activity of *Candida rugosa* lipase on polypropylene hollow fiber membrane modified with phospholipid analogous polymers” *Langmuir*, 168–73.

Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, A., Fernandez-Lafuente, R., Rodrigues, R. C.,(2011), “Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance” *Advanced Synthesis & Catalysis*, 3532885–904.

Guncheva, M., Paunova, K., Dimitrov, M., Yancheva, D.,(2014), “Stabilization of *Candida rugosa* lipase on nanosized zirconia-based materials” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 108, 43–50.

Hanefeld, U., Gardossi, L., Magner, E.,(2009), “Understanding enzyme immobilization” Chemical Society Reviews, 38453–68.

Hoşgör, Z.,(2011),“Fosfin Oksit İçeren Poliüretan-Silika Nanokompozitler Ve Kaplama Performanslarının İncelenmesi” Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.

Hou, C., Zhua, H., Wu, D., Li, Y., Hou, K., Jiang, Y., Li, Y.,(2014), “Immobilized lipase on macroporous polystyrene modified by PAMAM-dendrimer and their enzymatic hydrolysis”Process Biochemistry, 49, 244–249.

Huang, X.J., Chen, P.C., Huang, F., Ou, Y., Chen, M.R., Xu, Z.K.,(2011), “Immobilization of Candida rugosa lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane”,Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 70, 95–100.

İnan, T.Y., Ekinci, E., Kuyulu, A., Güngör, A.,(2002),“Preparation of Novel UV-curable Methacrylated Urethane Resins from a Modified Epoxy Resin and Isocyanatoethylmethacrylate (IEM)”, Polymer Bull.

Kahraman, M.V., Kugu, M., Menciloglu, Y., Apohan, N., Güngör, A.,(2006), “The Novel Use Of Organo Alkoxy Silane For The Synthesis Of Organic–Inorganic Hybrid Coatings”, Elsevier, Journal of Non-Crystalline Solids, 352, 2143-2151.

Kahraman, M.V., Bayramoğlu, G., Kayaman-Apohan, N., Güngör, A.,(2007), “ α -Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment”, Food Chemistry, 104, 1385–1392.

Kartal, İ., Kahraman, M.V., Akdemir, S.D., Güngör A., (2009),“Üretan modifiye perfloro alkoksi silan oligomer sentezi ve PMMA levhaların UV ışınları yardımıyla kaplanması” 5. Uluslararası İleri Teknolojiler Sempozyumu (IATS’09), 13-15 Mayıs, Karabük, Türkiye.

Malkoç, A.,(2011),“Polimer Modifiyeli Silika Nanopartiküllerin Enzim İmmobilizasyonunda Kullanımı” Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

Matero, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M.,(2007),“Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization technique” Enzyme and Microbial Technology, 40, 1451–1463.

Matero, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., (2007), "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization technique" *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1451–1463.

Minton, A.P., (2001), The Influence of Macromolecular Confinement on Biochemical Reactions in Physiological Media. *Journal of Biochemistry*, 276(14), 10577.

Montgomery, D.C., (2001), "Montgomery Design and analysis of experiments (5th ed.)" Wiley, New York.

Nelson, D.L., Cox, M.M., (2005), "Lehninger Biyokimyanın İlkeleri" Çeviri Editörü Prof.Dr.Nedret Kılıç, Palme Yayıncılık.

Özyılmaz, G., (2009), "The effect of spacer arm on hydrolytic and synthetic activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on silica gel" *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56, 231-236.

Pahujani, S., Kanwar, S.S., Chauhan, G., Gupta, R., (2008), "Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability" *Bioresource Technology*, 99, 2566–2570.

Patel, V., Gajera, H., Gupta, A., Manocha, L., Madamwar, D., (2015), Synthesis of ethyl caprylate in organic media using *Candida rugosa* lipase immobilized on exfoliated graphene oxide: Process parameters and reusability studies *Biochemical Engineering Journal*, 95, 62–70.

Rodrigues, D.S., Mendes, A.A., Adriano, W.S., Goncalves, L.R.B., Giordano, R.L.C., (2008), "Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods" *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 51, 100–109.

Rossi, C., Haupt, K., (2007), "Application of the Doehlert experimental design to molecularly imprinted polymers: surface response optimization of specific template recognition as a function of the type and degree of cross-linking" *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 389, 455–460.

Rubio, E., Almaral, J., Ramirez-Bon, R., Castano, V., Rodriguez, V., (2004), "Organic-inorganic Hybrid Coating (Poly (methyl methacrylate) / Monodisperse Silica)"; *Optical Materials*; Elsevier.

Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C., (2001) "Production, purification, characterization, and applications of lipases". *Biotechnology Advances*, 19(8), 627-62.

Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C., (2001), " Production, purification, characterization and application of lipases" *Biotechnology Advances*, 19, 627–62.

Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille, J., Haas, M. J.,(2000), "Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches" *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9, 113-148.

Wang, Z-G., Wang, J-Q., Xu, Z-K.,(2006),"Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on electrospun polysulfone nanofibrous membranes by adsorption" *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 42, 45–51.

Woters, M.E.L., Wolfs, D.P., Van Der Linde, M.C., Hovens, J.H.P., Tinnemans, A.H. A.,(2004),"Transparent UV Curable Antistatic Hybrid Coatings on Polycarbonate Prepared by the Sol–Gel Method" *Elsevier, Progress in Organic Coatings*, 51, 312–320.

Yagiz, F., Kazan, D., Akin, A.N., (2007),"Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites" *The Chemical Engineering Journal*, 134, 262–267.

Yener, F.,(2007),"Pektinaz Enziminin Farklı İki Destek Üzerine İmmobilizasyonu Ve Karakterizasyonu" *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*.

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

Zaitsev, S.Y., Gorokhova, I.V., Kashtigo, T.V., Zintchenko, A., Dautzenberg, H.,(2003),"General approach for lipases immobilization in polyelectrolyte complexes" *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 221, 209-220.

Zivkovic, L.T.I., Zivkovic, L.S., Babic, B.M., Kokunesoski M.J., Jokic, B.M., Karadzic, I.M.,(2015),"Immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zirconia" *Biochemical Engineering Journal*, 93, 73–83.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Dilek DÖNGEZ
Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul/30.10.1987
Yabancı Dili : İngilizce
E-Posta : dlk.dongez@gmail.com

Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/program	Üniversite/Lise	Mezuniyet Yılı
Lise	Fen-Mat.	Maltepe lisesi	2005
Üniversite	Kimya	Balıkesir Üniversitesi	2013