

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İMMOBİLİZE LİPAZ KULLANARAK DEĞİŞİK
BİTKİSEL YAĞLARDAN YAĞ ASİDİ ÜRETİMİ

SERKAN AKKÖSE
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE
2013

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İMMOBİLİZE LİPAZ KULLANARAK DEĞİŞİK
BİTKİSEL YAĞLARDAN YAĞ ASİDİ ÜRETİMİ

SERKAN AKKÖSE
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. AZİZ TANRISEVEN

GEBZE
2013



**GEBZE YÜKSEK
TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 17/06/2013 tarih ve 2013/32 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 17/07/2013 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Serkan Akköse'nin tez çalışması Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

A. Tanrıseven

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN

ÜYE

A. Çelik

: Doç. Dr. Ayhan ÇELİK

ÜYE

B. Keskinler

: Prof. Dr. Bülent KESKİNLER

ONAY

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Yağların hidrolizi ile elde edilen yağ asitleri, boya, vernik, polimer, ilaç, kozmetik ve gıda sektörlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yağların hidrolizi yaygın olarak kimyasal yöntemlerle yüksek sıcaklık (250°C) ve basınç altında (30-60atm) gerçekleştirilmektedir. Lipaz kullanılarak yağ hidrolizi düşük sıcaklıklarda (25-60°C) yapılabilmektedir. İmmobilize enzimle yağ asitleri kimyasal metodlara göre daha yüksek verimle ekonomik olarak üretilebilmektedir. Bu çalışmada enzimatik olarak değişik bitkisel yağların (ayçiçek, zeytin ve mısır yağı) hidroliziyle yağ asitlerinin üretimi çalışılmıştır. Detaylı çalışmalarda ayçiçek yağı kullanıldı. Enzim immobilizasyonu, stiren, divinil benzen ve poliglutaraldehit kullanılarak hazırlanan ve yapısında aldehit fonksiyonel grupları ihtiva eden bir ko-polimer üzerinde gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında, immobilizasyon işlemi ve hidroliz reaksiyonunun optimizasyonlarıyla bu enzimin ayçiçek yağının hidrolizinde başarılı bir şekilde kullanılabileceği gösterildi. İmmobilizasyon şartları optimize edilerek, *Thermomyces lanuginosa* lipazı bu ko-polimer üzerine kovalent olarak %100 immobilizasyon ve % 85.6 aktivite verimleriyle immobilize edildi. Gram matriks başına 16.5 mg protein immobilize edildi. pH, tampon çözelti konsantrasyonu, tampon çözelti miktarı, sıcaklık, organik çözücü ve tuz etkileri çalışılarak hidroliz reaksiyonu optimize edildi. İmmobilize sistemin depolama ve tekrarlı kullanımı araştırıldı ve 30 günlük depolama sonunda immobilize enzimin aktivitesinin %8.1 oranında ve 20 tekrarlı kullanım deneylerinde aktivitede %38.5 oranında azalma olduğu bulundu. Aktivite kayıplarının bir kısmı (%50) süzme esnasında oluşmaktadır. Bu tez çalışmasında geliştirilen metot basit olmasına rağmen çok etkilidir ve yağ asidi üretiminde kullanılabılme potansiyeli vardır.

Anahtar Kelimeler: Enzimlerin İmmobilizasyonu; Yağ Asidi Üretimi; Thermomyces Lanuginosa Lipazı.

SUMMARY

Fatty acids, obtained from hydrolysis of oils, have been widely used in such industries as paint, varnish, polymer, medicine, cosmetic, and food. They are produced in large quantities with chemical and enzymatic catalysts or without catalysts. In the process without catalyst, high pressure (150 bar) and temperatures (250°C) are required for the hydrolysis of oils. Fatty acids could be produced at lower pressure (1-60 atm) and temperatures (23-60°C) if the hydrolysis is catalyzed by chemical or biological catalysts. Lipases from various sources have been used in hydrolysis of oils to produce fatty acids. Economic production of fatty acids requires the usage of immobilized lipases. Many different methods have been developed for the immobilization of these biocatalysts. In this study, production of fatty acids from sunflower, olive, and corn oils were studied using immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosa*. This enzyme was covalently immobilized onto a porous copolymer, formed using styrene, divinylbenzene and polyglutaraldehyde. Immobilization of the enzyme onto this co-polymer was optimized. Immobilization gave rise to 100% immobilization and 85.6% activity yields. In immobilization, 16.5mg protein per gram matrix was covalently bound. The hydrolysis of sunflower oil by immobilized lipase resulted in fatty acids more than olive and corn oil. Thus, hydrolysis optimizations were carried out using sunflower oil. In hydrolysis optimization studies, such parameters as pH, buffer solution concentration, buffer solution quantity, temperature, organic solvent, and salt were studied. It was shown that the immobilized lipase could be used in hydrolysis of sunflower oil. The immobilized enzyme retained 61.5 and 91.9% initial activities in 20 batch reactions and at storage for 30 days at 4°C, respectively. 50% of the activity loss in batch reactions was due to filtering process. The method developed in this study is simple, yet effective and could be used in production of fatty acids.

Key Words: Immobilization of Enzymes, Production of Fatty Acids, Thermomyces Lanuginosa Lipase.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda yeni bilgiler sunarak, farklı bakış açısına sahip olmamı sağlayan danışmanım Sayın Prof.Dr. Aziz TANRISEVEN' e,

Tez çalışmalarım boyunca bilgi alışverişinde bulunduğum çok değerli Biyokimya laboratuvarındaki arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yüksek lisansım boyunca maddi ve özellikle manevi desteklerini, sevgilerini eksik etmeyen aileme ve kız arkadaşıma çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. ÇALIŞMA İLE İLGİLİ TEORİK BİLGİLER	2
2.1. Yağlar	2
2.1.2. Yağların Reaksiyonları	3
2.1.2.1. Transesterifikasyon	3
2.1.2.2. İnteresterifikasyon	5
2.1.2.3. Hidroliz	5
2.2. Yağ Asitleri	8
2.2.1. Yağ Asitlerinin Fiziksel Özellikleri	9
2.2.2. Yağ Asitlerinin Kimyasal Özellikleri	11
2.2.3. Yağ Asitlerinin Reaksiyonları	11
2.2.3.1. Esterifikasyon	11
2.2.3.2. Deterjan Oluşumu	12
2.2.3.3. Hidrojenlenme	13
2.2.3.4. Oksitlenme	13
2.2.3.5. Halojenleme	14
2.2.4. Yağ Asitlerinin Kullanım Alanları	14
2.3. Enzimler	16
2.3.1. Enzim Aktivitesi Üzerine Etki Eden Faktörler	17
2.3.1.1. pH	17
2.3.1.2. Sıcaklık	17

2.3.1.3. Tuz ve İyonik Şiddet	18
2.3.2. Lipazlar	18
2.3.2.1. Substrat Seçiciliği	19
2.3.2.2. Bölgesel Seçicilik	19
2.3.2.2.1. Seçici olmayan Lipazlar	19
2.3.2.2.2. 1,3 Spesifik Lipazlar	19
2.3.2.2.3. Spesifik yada Seçici Tip Yağ Asitleri	20
2.3.2.2.4. Enantiyoseçicilik	20
2.3.2.3. <i>Thermomyces Lanuginosa</i> Lipaz	21
2.3.2.3.1. Yağların Hidrolizi	25
2.4. Enzim İmmobilizasyonu	26
2.4.1. Enzim İmmobilizasyon Metotları	27
2.4.1.1. Kovalent Olmayan İmmobilizasyon	27
2.4.1.1.1. Adsorpsiyon	27
2.4.1.1.2. İyonik Bağlanma	28
2.4.1.1.3. Hidrofobik Etkileşim	28
2.4.1.1.4. Afinite İle Bağlanma	28
2.4.1.2. Kovalent İmmobilizasyon	28
2.4.1.2.1. Kafes Tipi	30
2.4.2. Matriks Aktivasyon Yöntemleri	32
2.4.2.1. Siyonojen Bromür	32
2.4.2.2. Karbodiimid	33
2.4.2.3. Epiklorohidrin	34
2.4.2.4. Siyanürik Klorür	34
2.4.2.5. Glutaraldehit	35
2.5. Stiren-Divinilbenzen Ko-polimeri	37
2.5.1. Stiren	37
2.5.2. Divinilbenzen	37
2.5.3. Stiren-Divinilbenzen Uygulamaları	38
2.5.4. Stiren-Divinilbenzen Poliglutaraldehit Ko-polimeri	39
2.5.4.1. Glutaraldehidin Poliglutaraldehide Dönüşümü	39
3. KONUYLA İLGİLİ ÇALIŞMALAR	41
4. MATERYAL VE METOT	46
4.1. Materyal	46

4.1.1. Kullanılan Kimyasallar	46
4.1.2. Kullanılan Enzim	46
4.1.3. Kullanılan Aletler	47
4.2. Metot	47
4.2.1. Aktivite Tayini	47
4.2.2. Asit Sayısı Tayini	47
4.2.3. Deneylerde Kullanılan Yağların Nötralizasyonu	48
4.2.4. İmmobilizasyon Matriksinin Hazırlanması	48
4.2.4.1. Poliglutaraldehidin Hazırlanması	48
4.2.4.2. STY-DVB-PGA Ko-polimerinin Hazırlanması	48
4.2.5. Kolon Sistemi Kullanılarak Optimum Şartlarda TLL İmmobilizasyonu	49
4.2.6. STY-DVB-PGA Ko-polimerine Enzim İmmobilizasyon Optimizasyonu	50
4.2.6.1. Matriks Miktarı	50
4.2.6.2. pH	51
4.2.6.3. Tampon Çözelti Konsantrasyonu	51
4.2.6.4. Süre	51
4.2.6.5. İmmobilize Olan Serbest Enzim Miktarı ve Aktivitenin Arttırılması	52
4.2.6.5.1. Enzim Miktarı	52
4.2.6.5.2. PGA Muamele Süresi	52
4.2.6.5.3. PEG Miktarı	52
4.2.6.5.4. PEG Muamele Süresi	53
4.2.7. Zeytin, Mısır ve Ayçiçek Yağlarının Hidrolizi	53
4.2.8. Serbest ve İmmobilize Enzimin Hidroliz Reaksiyonu Optimizasyonu	53
4.2.8.1. pH	53
4.2.8.2. Tampon Çözelti Konsantrasyonu	54
4.2.8.3. Tampon Çözelti Miktarı	54
4.2.8.4. Sıcaklık	54
4.2.9. Organik Çözücü ve Tuzların Hidrolitik Aktiviteye Etkisi	54
4.2.10. Yağ Hidrolizine Sürenin Etkisi	55
4.2.11. Sürekli Kullanım ve Depolama Kararlılığı	55
4.2.12. Kantitatif Protein Tayini	55
5. SONUÇLAR	56
5.1. Protein Standart Grafiğinin Oluşturulması	56
5.2. TLL' nin STY-DVB-PGA Ko-polimeri Üzerine İmmobilizasyon	

Optimizasyonu	57
5.2.1. Matriks miktarı	57
5.2.2. pH	58
5.2.3. Tampon Çözelti Konsantrasyonu	58
5.2.4. Süre	59
5.3. İmmobilize Olan Serbest Enzim Miktarı ve Aktivitenin Arttırılması	59
5.3.1. Enzim miktarı	59
5.3.2. PGA Muamele Süresi	60
5.3.3. PEG miktarı	60
5.3.4. PEG muamele süresi	61
5.4. Zeytin, Mısır ve Ayçiçek Yağlarının Hidrolizi	61
5.5. Serbest Enzimin Ayçiçek Yağı Hidroliz Reaksiyonu Optimizasyonu	62
5.5.1. pH	62
5.5.2. Tampon Çözelti Konsantrasyonu	62
5.5.3. Tampon Çözelti Miktarı	63
5.5.4. Sıcaklık	63
5.6. Ayçiçek Yağının İmmobilize Lipaz ile Hidroliz Reaksiyonu Optimizasyonu	64
5.6.1. pH	64
5.6.2. Tampon Çözelti Konsantrasyonu	64
5.6.3. Tampon Çözelti Miktarı	65
5.6.4. Sıcaklık	65
5.6.5. Organik Çözücü	66
5.6.6. Tuz	67
5.7. Ayçiçek Yağının İmmobilize Lipaz ile Hidrolizinde Sürenin Etkisi	68
5.8. Tekrar Kullanım Deneyleri	68
5.9. İmmobilize Enzimin Raf Ömrünün Belirlenmesi	69
6. TARTIŞMA	70
7. SONUÇ	73
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	80

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
AlCl_3	: Alüminyum klorür
$\text{Ca}(\text{Ac})_2$	: Kalsiyum asetat
CaCl_2	: Kalsiyum klorür
CNBr	: Siyanojen bromür
CrCl_3	: Krom (III) klorür
KCl	: Potasyum klorür
KOH	: Potasyum hidroksit
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	: Potasyum persülfat
LiCl	: Lityum klorür
MgCl_2	: Magnezyum klorür
NaBH_4	: Sodyum borhidrür
NaCl	: Sodyum klorür
NaH_2PO_4	: Sodyum dihidrojen fosfat
NaIO_4	: Sodyum periodat
ZnCl_2	: Çinko klorür
BSA	: Sığır albumin
DHA	: Dokasahekzanoik asit
EPA	: Eikosapentaenik asit
DVB	: Divinilbenzen
dk	: Dakika
CALB	: <i>Candida antartica</i> lipaz B
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mg	: Miligram
μg	: Mikrogram
PEG	: Polietilen glikol
PGA	: Poliglutaraldehit
PVA	: Polivinilalkol
RML	: <i>Rhizomucor miehei</i> lipaz

rpm	: Dakikadaki tam tur sayısı
STY	: Stiren
SP80	: Span 80
TLL	: <i>Thermomyces lanuginosa</i> lipaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Yağ molekülü.	2
2.2: Bazik katalizörlerle yağlardan yağ asidi alkil esteri (biyodizel) sentezi.	3
2.3: Asit katalizörü ile yağlardan yağ asidi alkil esteri (biyodizel) sentezi.	4
2.4: Enzimatik metot ile biyodizel eldesi.	4
2.5: İnteresterifikasyon reaksiyonu.	5
2.6: Yağ hidrolizi.	6
2.7: Yağ hidrolizi için tasarlanan reaktör.	6
2.8: Su buharı kullanarak yüksek basınçta yağ hidrolizi.	7
2.9: Distilasyon metoduyla yağ asitlerinin saf olarak eldesi.	8
2.10: Trans ve sis oleik asit.	10
2.11: Asidik ortamdaki esterifikasyon reaksiyonu.	12
2.12: Deterjan oluşumu.	13
2.13: Oleik asidin hidrojenlenmesi.	13
2.14: Oleik asidin oksitlenmesi.	14
2.15: Oleik asidin bromlanması.	14
2.16: Farklı lipazlar tarafından katalizlenen hidroliz reaksiyonları.	20
2.17: TLL üzerinde bulunan kapakcığın açık ve kapalı formları.	22
2.18: Lys, Asp, Glu rezüdülerinin dört farklı TLL yüzeyinde görünütüsü gösterilmektedir. Ayrıca Lys gri ile gösterilmiş olup, Asp ve Glu rezüdülerini siyah ile gösterilmiştir. a) Aktif bölgenin ön yüzden görüntüsü. b) Birinci yüzeyin 90° döndürüldükten sonra. c) Birinci yüzeyin 180° döndürüldükten sonra. d) Birinci yüzeyin 270° döndürülmesi ile elde edilen TLL resimleri.	23
2.19: Arayüzey aktivasyonu ile hidrofobik yüzeye enzim immobilizasyonu.	24
2.20: Çapraz bağlı enzim çöktirlerinin oluşturulması.	24
2.21: TLL tarafından yapılan yağ hidrolizi ve açıl göçü.	26
2.22: A) fiziksel adsorpsiyon, B) hapsetme, C) kovalent bağlanma.	27
2.23: Enzimin matrikse kovalent immobilizasyonu.	29
2.24: m) Guluronik asit, n) Manuronik asit birimlerinden oluşan alginat.	30
2.25: Kapsül metodu ile enzim immobilizasyonu.	31
2.26: Separozun CNBr ile aktivasyonu ve enzim bağlanması.	33

2.27: Karbodiimid ile matriks aktivasyonu ve enzim bağlanması.	33
2.28: Epiklorohidrin ile matriks aktivasyonu ve enzim immobilizasyonu.	34
2.29: Siyanurik klorür ile enzim immobilizasyonu.	35
2.30: Glutaraldehit.	35
2.31: Selüloz üzerine enzim immobilizasyonu.	36
2.32: Stiren.	37
2.33: a) meta-divinilbenzen, b) para-divinilbenzen.	38
2.34: Stiren divinilbenzen kopolimeri oluşumu.	38
2.35: Poliglutaraldehit oluşumu.	39
2.36: Enzimin kovalent olarak poliglutaraldehide bağlanması.	40
4.1: STY-DVB-PGA kopolimerinin hazırlanması.	49
4.2: 1) Peristaltik pompa, 2) Manyetik karıştırıcı, 3) Besleme tankı, 4) Immobilizasyon kolonu, 5) Bağlantı hortumları.	50
5.1: Kantitatif protein tayininde kullanılan standart grafiği.	57
5.2: Sürenin immobilize enzimin aktivitesine etkisi.	68
5.3: ●) Immobilize enzimin tekrarlı kullanımları, ○) Immobilize enzimin tekrarlı kullanımları (süzme esnasındaki immobilize enzim miktarında kayıplar olmadığı varsayıldığında).	69
5.4: Immobilize lipazın 30 günlük raf ömrü.	69

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Yaygın olarak kullanılan bitkisel yağların yağ asidi bileşimi.	2
2.2: Bazı yağ asitleri ve kimyasal yapısı.	9
2.3: Endüstriyel enzimler ve kullanım alanları.	16
3.1: Bazı immobilize lipazlar.	41
3.2: Farklı tuzların <i>Pseudomonas aeruginosa</i> KKA-5 lipaz aktivitesine etkileri.	44
4.1: Deneylerde kullanılan kimyasallar.	46
4.2: Deneylerde kullanılan araç ve gereçler.	47
5.1: Matriks miktarının enzim immobilizasyonuna etkisi.	57
5.2: pH' ın enzim immobilizasyonuna etkisi.	58
5.3: Tampon çözelti konsantrasyonunun enzim immobilizasyonuna etkisi.	58
5.4: İmmobilizasyon süresinin enzim immobilizasyonuna etkisi.	59
5.5: PGA muamelesinin enzim immobilizasyonuna etkisi.	59
5.6: PGA muamele süresinin enzim immobilizasyonuna etkisi.	60
5.7: PEG' in enzim immobilizasyonuna etkisi.	60
5.8: PEG muamele süresinin aktivite verimine etkisi.	61
5.9: Zeytin ve mısır yağlarının nötralizasyonu.	61
5.10: Değişik yağların serbest lipazla hidrolizi.	62
5.11: pH' ın serbest enzimin hidrolitik aktivitesine etkisi.	62
5.12: Tampon çözelti konsantrasyonlarının serbest enzimin hidrolitik aktivitesine etkisi.	63
5.13: Tampon çözelti miktarının serbest enzimin hidrolitik aktivitesine etkisi.	63
5.14: Sıcaklığın serbest enzimin hidrolitik aktivitesine etkisi.	64
5.15: pH'ın hidroliz reaksiyonu üzerine etkisi.	64
5.16: Tampon çözelti konsantrasyonlarının aktiviteye etkisi.	65
5.17: Tampon çözelti miktarlarının aktiviteye etkisi.	65
5.18: Sıcaklığın aktiviteye etkisi.	66
5.19: Heptanın immobilize enzim aktivitesine etkisi.	66
5.20: Hekzanın immobilize enzim aktivitesine etkisi.	66
5.21: NaCl'ün immobilize enzimin aktivitesine etkisi.	67
5.22: CaCl ₂ ' ün immobilize enzim aktivitesine etkisi.	67

1. GİRİŞ

Yağ asitleri yaygın kullanımı olan ve tonlarca üretilen önemli maddelerdir. Sabun, vernik, boya ve gıda alanlarında kullanılırlar ve yağların hidroliziyle üretilirler. Üretim katalizörsüz veya katalizörlü (kimyasal ve biyokimyasal) olarak gerçekleştirilebilmektedir. Katalizörsüz üretimde yüksek sıcaklık (250 °C) ve basınca (35-55 bar) ihtiyaç duyulur. Kimyasal katalizörlerle (H₂SO₄, çinko, nikel, bakır, borik asit, fosforik asit tuzları) daha düşük sıcaklıkta (100-150°C) ve atmosfer basıncında hidroliz yapılabilmesine rağmen bazı yan ürünlerin oluşması verimi düşürmektedir. Yağ asitlerinin üretimi lipazlar kullanılarak düşük sıcaklıklarda (25-60°C) gerçekleştirilebilmektedir. Lipazlarla yapılan hidroliz çalışmalarının çoğu araştırma seviyesinde olup endüstriyel kullanımı sınırlıdır. Bu enzimlerle ekonomik olarak yağ asitlerinin üretimi için enzimlerin immobilize formda kullanımları gereklidir.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışmasında, bitkisel yağlardan yağ asitlerinin üretiminde kullanılan kimyasal metotlara alternatif olabilecek *Thermomyces lanuginosa* lipazının immobilize formu kullanılarak düşük enerji maliyetiyle yağ asitlerinin üretimi amaçlanmıştır. Tez çalışması kapsamında TLL kullanımının maliyetini azaltmak ve verimliliği arttırmak adına yapıya uygun hidrofobik karakterde STY-DVB-PGA kopolimeri üzerine modifikasyonlarla kovalent olarak bağlanması ve farklı tipteki yağlarla hidroliz reaksiyonu gerçekleştirip optimum hidroliz reaksiyonu şartlarının belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, STY-DVB-PGA kopolimerinin sentezi, enzim immobilizasyon optimizasyonu, immobilize ve serbest enzimin hidroliz reaksiyonu optimizasyonları, immobilize enzimin tekrar kullanımı ve saklama süreleri bulunarak literatürdeki benzer çalışmaların sonuçlarıyla kıyaslanmıştır. Bulunan tüm deneysel sonuçların, şimdiye kadar gerçekleştirilen benzer çalışmalardan daha iyi olduğu gözlenmiştir.

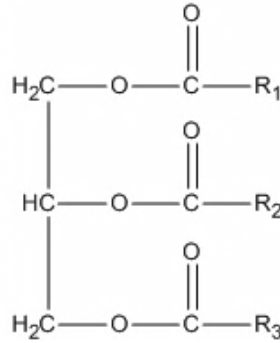
2. ÇALIŞMA İLE İLGİLİ TEORİK BİLGİLER

2.1. Yağlar

Yağlar (Şekil 2.1), gliserolün üç yağ asidiyle oluşturduğu esterlerdir. Bu bileşikler genel olarak kloroform, hekzan, etanol gibi organik çözücülerde çözünmelerinden dolayı ekstraksiyonları oldukça kolaydır. Ayrıca adsorpsiyon, ince tabaka ve gaz kromatografisi ile saflaştırılmaları mümkündür. Günümüzde farklı yağ asidi çeşitliliğine sahip olan ayçiçek, zeytin, mısır yağları yaygın olarak kullanılmaktadır (Tablo 2.1) [Web 1, 2012].

Tablo 2.1: Yaygın olarak kullanılan bitkisel yağların yağ asidi bileşimi.

YAĞ ASİDİ	AYÇİÇEK YAĞI	MISIR YAĞI	ZEYTİN YAĞI
Palmitik asit	5.9	10.58	10.93
Linoleik asit	65.7	53.52	9.21
Oleik asit	19.5	27.3	72.29
Stearik asit	4.5	1.85	1.98
Araşidik asit	-	0.43	0.42
Beheneik asit	-	-	0.13
Palmitoleik asit	-	0.14	1.16
α linolenik asit	-	0.16	0.79
Miristik asit	-	0.24	-
Gadoleik asit	-	-	0.31



Şekil 2.1: Yağ molekülü.

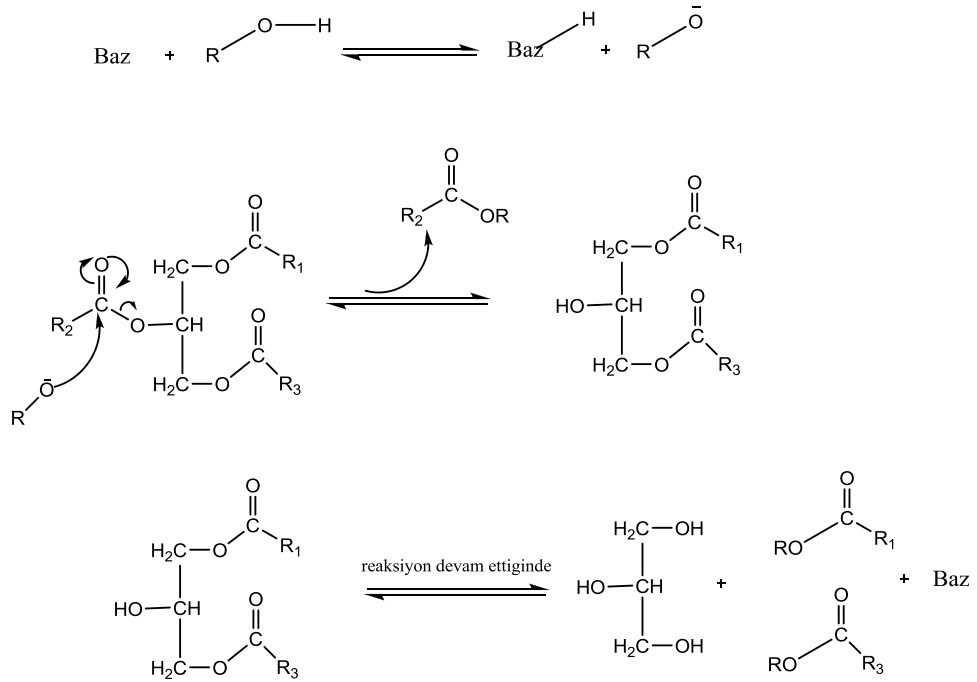
2.1.2. Yağların Reaksiyonları

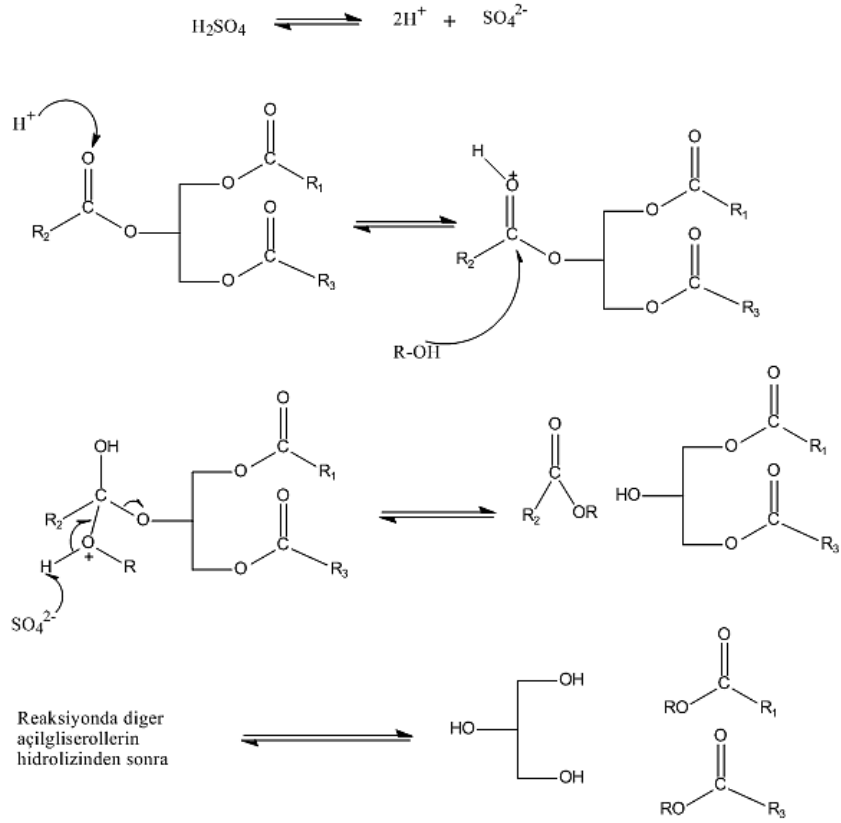
Yağların reaksiyonları, kimyasal ve enzimatik olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Kimyasal olarak gerçekleşen reaksiyonlar katalizör yada katalizörsüz meydana gelmektedir. Yağların enzimatik reaksiyonları lipaz katalizörlüğünde olmaktadır. Enzimatik olarak gerçekleştirilen reaksiyonlar ılıman koşullarda olup ürünün istenilen özellikte olmasının yanısıra spesifik ürün elde edilmesini de sağlamaktadır.

2.1.2.1. Transesterifikasyon

Kimyasal olarak;

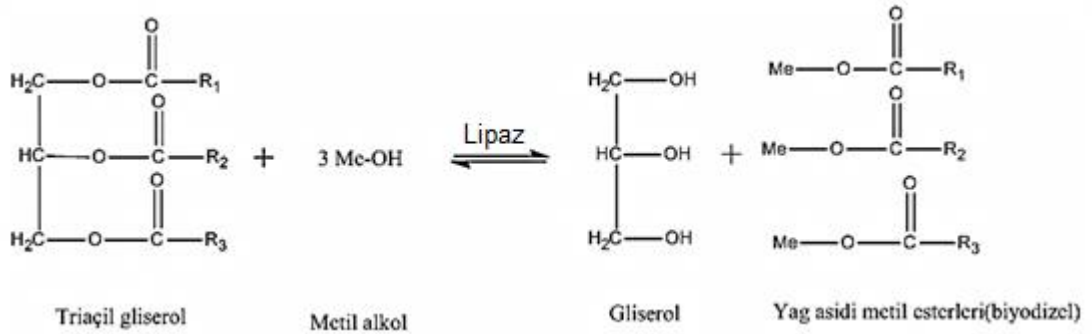
Transesterifikasyon reaksiyonu, yağların katalizör varlığında alkol bulunan homojen ortamda yapmış oldukları reaksiyon sonucu yağ asidi alkol esterlerinin elde edilmesi olayıdır. Bu reaksiyon asidik (Şekil 2.2) ve bazik (Şekil 2.3) ortamda gerçekleştirilmektedir [Foster et al., 2010].





Şekil 2.3: Asit katalizörü ile yağlardan yağ asidi alkil esterleri (biyodizel) sentezi.

Enzimatik olarak; Enzimler kullanılarak da yağların transesterifikasyon reaksiyonları gerçekleştirilebilmektedir. Transesterifikasyon reaksiyonuyla alkol ile yağın reaksiyonu sonucu yağ asidi esterleri (biyodizel) elde edilmektedir (Şekil 2.4). Dünyada dizel yakıt yanında biyodizel de kullanılmaktadır. Çünkü dizel yakıtı alternatif olan bu yakıt çevreye zararlı olmayıp ayrıca motora olumsuz etkisi bulunmamaktadır. Yağ asidi alkol esterleri bir çok alkol ile triaılgliserollerin enzimatik olarak transesterifikasyon reaksiyonu sonucu elde edilmektedir. Biyodizel üretimi için çoğunlukla metil alkol kullanılmaktadır.



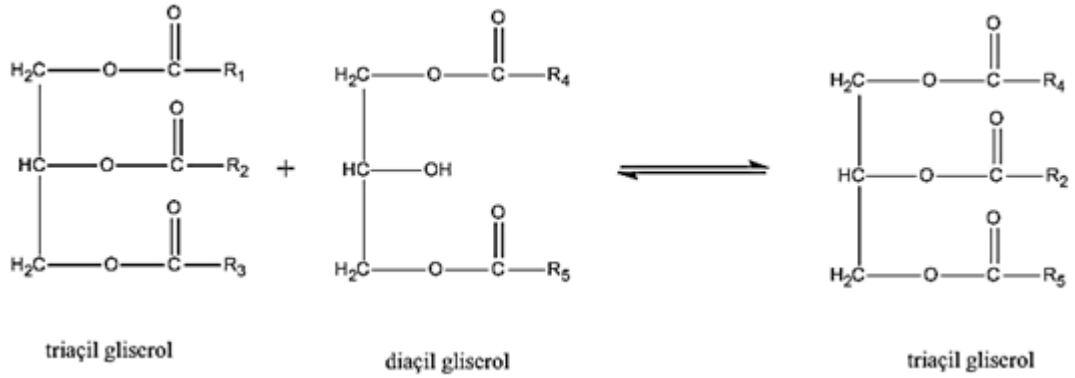
Şekil 2.4: Enzimatik metot ile biyodizel eldesi.

2.1.2.2. İnteresterifikasyon

İnteresterifikasyon reaksiyonu, farklı tip yağ asidi içeren yağların yada mono, diaçil gliserollerin katalizör varlığında yeni bir mono, di, triaçil gliserol oluşturduğu reaksiyonlardır.

Kimyasal olarak;

Skogerson ve arkadaşları katı formda doymuş halde bulunan monoaçil ve diaçil gliserollerle, sıvı halde bulunan bitkisel yağları alkalın katalizörü varlığında 250°C’ de interesterifikasyon reaksiyonu ile margarin yağı elde etmişlerdir (Şekil 2.5.) [Skegerson, 2007].



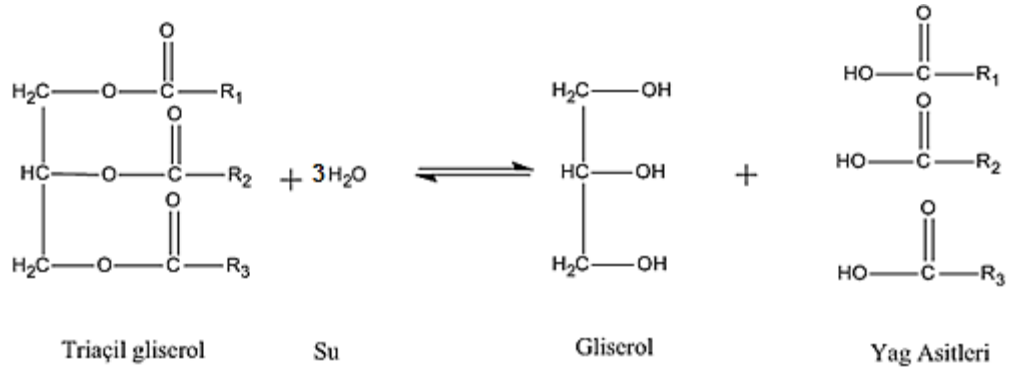
Şekil 2.5: İnteresterifikasyon reaksiyonu.

Enzimatik olarak iki farklı triaçilgliserol ile gerçekleştirilen bu reaksiyon, genellikle margarin yapımında hidrojenasyon yerine kullanılmaktadır. Ayrıca farklı özellikte yağ elde etmek için de bu reaksiyondan faydalınılmaktadır.

Hong Zhang ve arkadaşları, palmiye ağacı yağı (PO) ve hindistan cevizi yağı (HY) arasında immobilize TLL ile interesterifikasyon reaksiyonu gerçekleştirmişlerdir. Karışım oranı PO:HY 75:25 olarak belirlenmiştir. Sıcaklık olarak 55-80°C’ de reaksiyonlar denenmiştir. 1,3 spesifik olan bu lipaz bu tür reaksiyonlar için oldukça aranan enzim özelliği taşımaktadır. Ayrıca lipazın spesifik özelliklerinin bilinmesi oluşacak ürünün tahmin edilmesine de olanak sağlamaktadır [Zhang et al., 2001].

2.1.2.3. Hidroliz

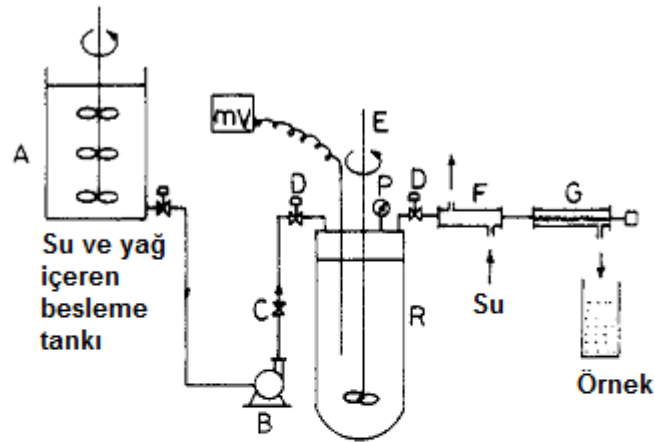
Yağ hidrolizi, yağın kendisini oluşturan yağ asidi ve gliserollere parçalanmasıdır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Yağ hidrolizi.

Yağ hidrolizi bir çok metotla gerçekleştirilebilmektedir. Yüksek sıcaklık ve yüksek basınç kullanarak yapılan hidroliz bunlardan birisidir.

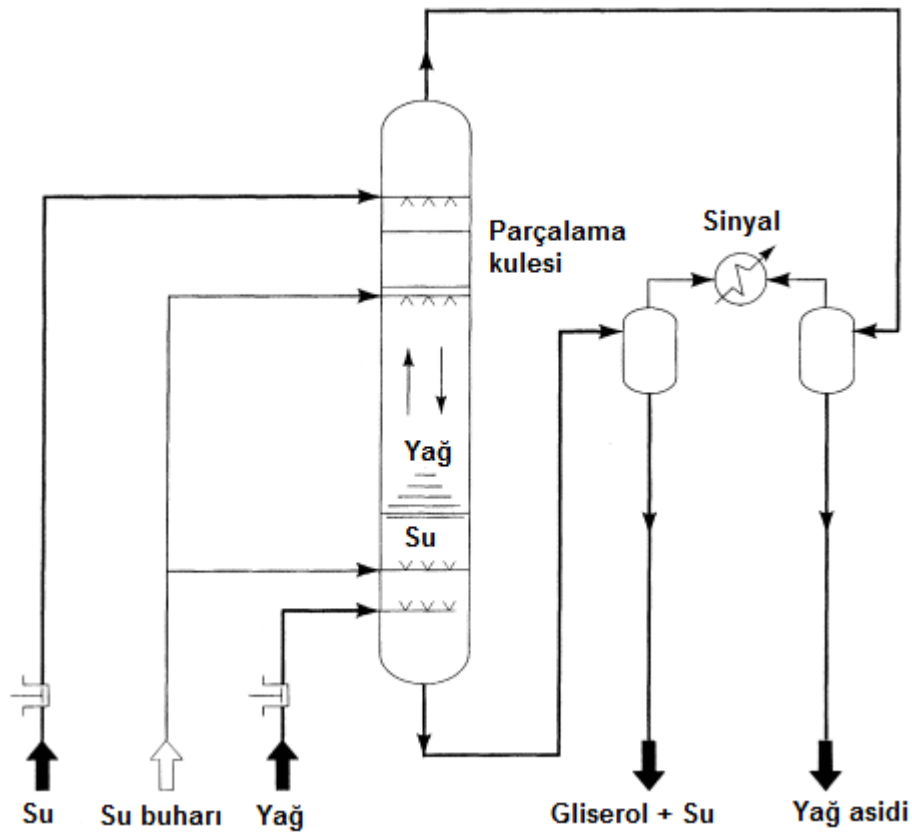
Patil ve arkadaşları 225°C ile 260°C arasında 3000-5000 kPa basınçta yağın yağ asitlerine parçalanarak hidroliz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde su ve yağ belli oranda karıştırılıp ve belli bir basınçla reaktör içerisine pompalanmıştır. 1,5-2 saat sonra geri toplanıp oluşan yağ asitleri sodyum hidroksit yardımıyla hesaplanmıştır (Şekil 2.7) [Patil et al., 1988].



- A - Besleme tankı
- B - Yüksek basınçlı dozlama pompası
- C - Geri yönde akışı engelleyen vana
- D- İğne vana
- E - Pervane
- F - Sıcaklık değiştirici
- G- Basınç düzenleyici vana
- H - Reaktör

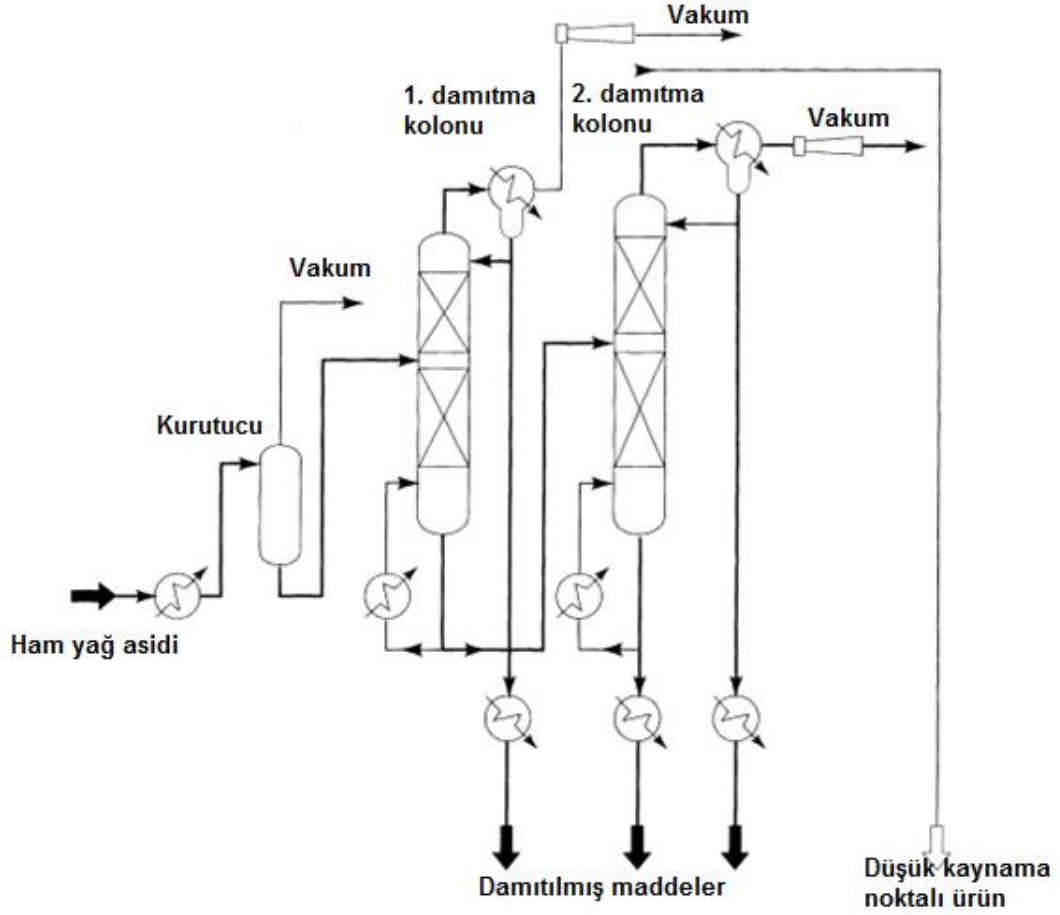
Şekil 2.7: Yağ hidrolizi için tasarlanan reaktör.

Yağ asidini kimyasal olarak elde etmenin yolu ise yüksek sıcaklıkta katalizör kullanarak hidroliz reaksiyonu gerçekleştirmektir. Sülfürik asit, çinko oksit, magnezyum oksit gibi katalizörler yağın parçalanmasında etkili bir katalizör olarak kullanılmaktadırlar. Şekil 2.8’ de yağ asidi elde etmek için kullanılan tek basamaklı reaktör bulunmaktadır.



Şekil 2.8: Su buharı kullanarak yüksek basınçta yağ hidrolizi.

Kimyasal metotlarla yağ asidi elde etmek için çok yüksek maliyetler gerekmektedir. Ayrıca elde edilen ürünlerin istenilen saflıkta elde etmek mümkün değildir. Çünkü yüksek sıcaklıkta yağlar bozunmaya uğrar ve renkleri değişmektedir. Elde edilen yağ asitlerini saflaştırmak amacıyla distilasyon metodu kullanılarak her bir yağ asidi vakumlu ortamda saflaştırılabilmektedir (Şekil 2.9) [Gervajio, 2005].



Şekil 2.9: Distilasyon metoduyla yağ asitlerinin saf olarak eldesi.

Yağların hidrolizi, endüstriyel olarak gıda, içecek, kozmetik ve ilaç sektöründe kullanılan yağ asitlerini elde etmek için gerçekleştirilen bir prosestir. Yağ asidi endüstrisinde yüksek buhar muamelesi ve yüksek basınç ile yağların parçalanması gerçekleştirilerek yağ asitleri üretilmektedir. Bu proseslerde enerji sarfıyatı çok yüksek olmakla birlikte elde edilen ürünün kaliteside düşük olmaktadır. Bunlara alternatif olarak daha ılıman koşullarda ve daha az enerji sarfıyatı ile yağ asidini enzimatik yollarla elde etmek mümkündür.

2.2. Yağ Asitleri

Yağ asitleri uzun zincirli karboksili asitlerdir (Tablo 2.2). Yağ asitleri doğada serbest halde bulunmazken esterleşmiş formları şeklinde bulunmaktadır. Hayvanlarda ve bitkilerde en çok bulunan yağ asidi rezüdüleri 16-18 karbon ihtiva etmektedir. Bitki ve hayvan lipidlerinde bulunan yağ asidi rezüdülerinin yarısından fazlası bir yada birden fazla çift bağ içermektedir. Ancak bakteriyel kaynaklı yağ

asitlerinde doymamış yağ asidi çok nadir bulunmasının yanısıra genel olarak dallanmış, hidroksillenmiş yada siklopropan halkaları içermektedir.

Tablo 2.2: Bazı yağ asitleri ve kimyasal yapısı.

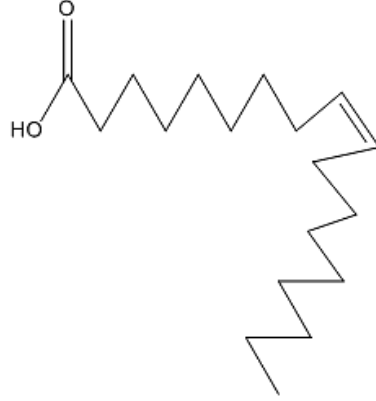
YAĞ ASİDİ	KİMYASAL YAPISI
Palmitoleik	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Sapiyenik	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
Oleik	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Linoleik	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
α Linolenik	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Araşidonik	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
Palmitik	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Stearik	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Araşidik	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$

2.2.1. Yağ Asitlerinin Fiziksel Özellikleri

Doymuş ve doymamış yağ asitlerinin konformasyonları farklıdır. Doymuş yağ asidi, zincirindeki karbon-karbon bağının dönme serbestliğinden dolayı daha esnek yapıya sahiptir. Karbon-karbon çift bağı içeren yağ asitleri dönme serbestliğine sahip olmayıp belirli konformasyonlara sahip olarak bulunmaktadırlar. Eğer karbon-karbon çifte bağında cis konumunda ise düz hidrokarbon zincirine göre 30° açı yapmakta, trans konumunda ise doymuş hidrokarbon zinciriyle aynı düzlemde bulunmaktadır (Şekil 2.10).



trans-oleik asit



cis-oleik asit

Şekil 2.10: Trans ve sis oleik asit.

Yağ asitlerinin hemen hemen hepsi sis konumundadır. Yağ asitlerinin bu özelliklerinden dolayı ortamda oluşan 30° lik açı ile moleküllerin kümelenmesi engellenmekte ve ayrıca Van der Waals etkileşimlerinin azalmasına sebep olmaktadır. Bu sebepten dolayı aynı karbon sayısına sahip doymuş yağ asidinin erime noktası daha düşük çıkmaktadır [Arslan, 2007]. Yağ asitlerinin fiziksel özelliklerine en etkili etmen karbon sayılarıdır. Karbon sayısı 10 ve altındaki doymuş tüm yağ asitleri oda sıcaklığında sıvı ve uçucudurlar. Daha fazla karbon sayısına sahip yağ asitleri aynı koşullarda katıdırlar. Yani karbon sayısı arttıkça uçuculuk özellikleri azalmaktadır. 2-4 karbonlu asetik, propiyonik, bütirik asitler suda rahat çözünebilirken karbon sayısı arttıkça sudaki çözünürlükleri azalmaktadır. Doymamış tüm yağ asitlerinin tamamı oda sıcaklığında sıvıdırlar. Suda çözünmezler ve uçucu değildirler. Yağ asitlerinin çoğu sıcak alkol, eter, benzol ve kloroformda çözünebilmektedir.

2.2.2. Yağ Asitlerinin Kimyasal Özellikleri

Altı karbondan yüksek karbon sayısına sahip yağ asitlerinin metallerle yapmış oldukları tuzlara sabun denmektedir. Sodyum ve potasyum sabunları suda çözündüğü halde diğer sabunlar suda çözünmezler. Bu yüzden sodyum ve potasyum haricindeki sabunlar temizleyicilik özelliği göstermemektedir. Ayrıca doymamış yağ asitlerinin sabunları doymuş yağ asitlerinin sabunlarından daha fazla suda ve alkolde çözünmektedir. Potasyum sabunları sodyum sabunlarına göre suda çözünürlüğü daha fazladır. Uzun zincirli yağ asitlerinin kalsiyum tuzları ise motor yağlarında kullanılmaktadır. Kurşunun doymamış yağ asitleri ile yapmış olduğu tuzlar eter ve alkolde çözündüğü için, karışımda bulunan doymuş ve doymamış yağ asitleri bu yolla birbirlerinden ayrılabilirlerdir.

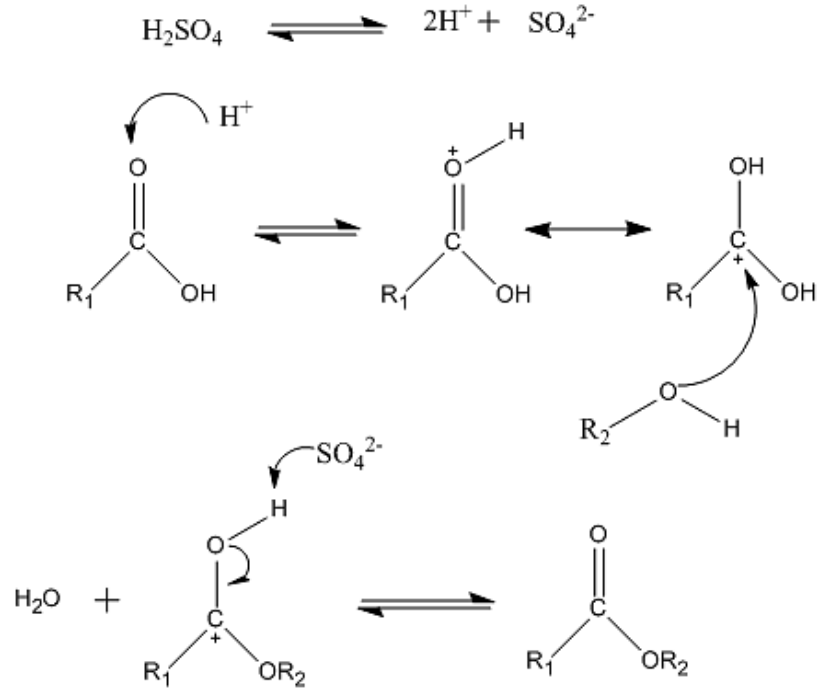
2.2.3. Yağ Asitlerinin Reaksiyonları

2.2.3.1. Esterifikasyon

Yağ asitlerinin hidroksil kaynaklarıyla genellikle gliserollerle yapmış olduğu reaksiyondur. Gliserollerle yapılan reaksiyon sonunda mono, di, triaçil gliseroller elde edilmektedir.

Yu-Chih Yeh ve Erdogan Gulari, köpük reaktörü içerisinde laurik asit-gliserolün esterifikasyon reaksiyonunu *Rhizomucor miehei* lipazının katalizlemesi sonucunda elde etmişlerdir. Kabul edilebilen en güzel sonuca %50 gibi yüksek su oranı içeren ortam kullanarak elde etmişlerdir. Monolaurin ve dilaurin %80 gibi verimle oluşturulmuştur. pH ve iyonik etkiler arayüzey mekanizmasının anlaşılmasına, laurik asit ve gliserol oranları ise sadece reaksiyon hızında bir değişikliğe sebep olmuştur. Reaksiyon başlamadan önce belli miktarda gliserol ve yağ asidi birbirleriyle homojen olarak karıştırılmış ve daha sonra köpük reaktörün içerisine gönderilerek hava ve su ara yüzeyinde lipazla reaksiyon vererek esterifikasyon ürünleri elde edilmiştir [Yeh and Gulari, 1998].

Kimyasal metot ile; Yağ asitleri, katalizör varlığında alkollerle esterifikasyon reaksiyonu vermektedirler (Şekil 2.11) [Foster et al., 2010].



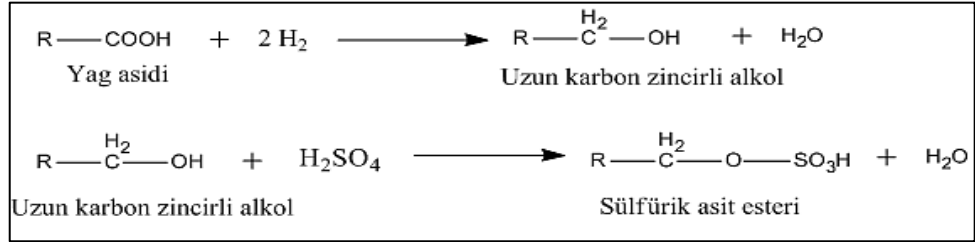
Şekil 2.11: Asidik ortamdaki esterifikasyon reaksiyonu.

J.M. Marchetti ve A.F. Errazu, farklı yağ asit sayısına sahip atık yağları katalizör varlığında, yağ asitlerini esterifikasyon reaksiyonu ile, yağları ise transesterifikasyon reaksiyonu ile biyodizele çevirmişlerdir. Alkol olarak geleneksel olarak kullanılan metanol yerine toksik olmayan etanol kullanmışlardır. Sülfürik asit katalizörlüğünde yapılan bu reaksiyonların verimi transesterifikasyonda olduğu gibi esterifikasyon reaksiyonunda da etkili sonuçlar elde edilmiştir. Esterifikasyon sırasında biyodizele çevirilen yağ asidi miktarları fenolftalein indikatörü varlığında baz ile titrasyonla belirlenmiştir. Bu çalışmada transesterifikasyon reaksiyonu için şartlar, sıcaklık: 45°C, alkol:yağ oranı 6:1, katalizör %2.2, triağılglicerollerin %30' unun tamamen biyodizele çevrilmesi için gerekli olan süre 4 saat olarak bulunmuştur [Marchetti and Errazu, 2008].

2.2.3.2. Deterjan Oluşumu

Deterjanlar, yağ asitlerinin yüksek karbon sayısına sahip alkollerinin sülfürik asit esterlerinin metal tuzlarıdır. Yağ asitleri ilk önce 320°C' de ve 200 atm basınç altında hidrojen ile tepkimeye sokularak yüksek karbon sayısına sahip alkollere indirgenir (Şekil 2.12). Elde edilen yüksek alkoller sülfürik asitle tepkimeye

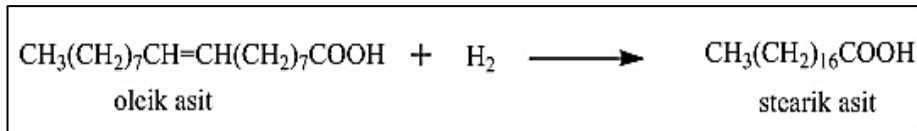
sokularak sülfürik asit esterleri elde edilmektedir. Bu elde edilen esterlerin sodyum tuzlarının iyi temizleyicilik özellikleri bulunmaktadır. Ayrıca deterjanların kalsiyum ve magnezyum ile oluşturdukları tuzları suda çözündüğü için sert sular içinde kullanımı uygundur. Ayrıca deterjanlar, sülfürik asit esterleri olduklarından dolayı asit ortamlarında parçalanmazlar. Sabunlara nazaran daha çok temizleyici özellikleri bulunmaktadır.



Şekil 2.12: Deterjan oluşumu.

2.2.3.3. Hidrojenlenme

Doymamış yağ asitlerinin yapısında bulunan etilen bağı kolaylıkla H' le doyurulabilmektedir. Yapıda bulunan çifte bağların bulunduğu bölgeye H' ler katılarak doymuş yağ asidi elde edilir (Şekil 2.13.).

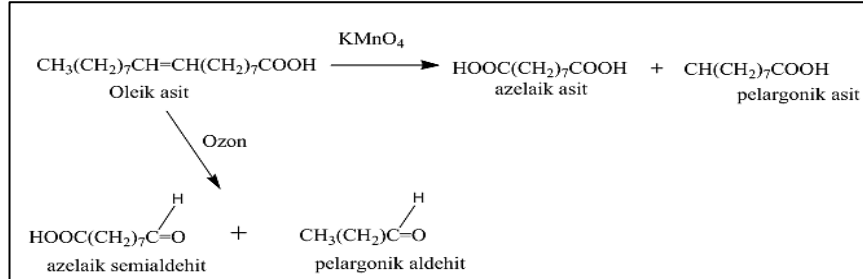


Şekil 2.13: Oleik asidin hidrojenlenmesi.

2.2.3.4. Oksitlenme

Doymamış yağ asitlerinin çifte bağlarının oksitlenmesi olayıdır. Doymamış yağ asitlerinin örneğin oleik aside oksitleyici olarak potasyum permanganat kullanıldığında düşük sıcaklıkta çifte bağa iki tane OH grubu eklenerek dihidroksi stearik asit elde edilmektedir. Oksidasyon ilerler ve ısı 30°C'nin üzerine çıkarılırsa molekül ikiye ayrılır azelaik asit ve pelargonik asit elde edilmektedir. Doymamış yağ asitlerinin çifte bağları için ozon ile yükseltgenmesi mümkün olup, çifte bağa ozon eklenmesi ile ozonoid adı verilen türevler ele geçmektedir. Yine oleik asidin

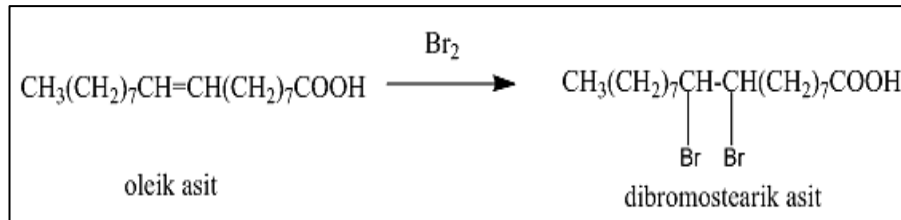
oksidlenmesi ile oleik asit azonid elde edilmektedir. Ozonoid indirgen koşullarda su alarak hidrolize olur ve çifte bağın bulunduğu yerlerden parçalanarak iki aldehit molekülü oluşturmaktadır. Ozonoidler indirgen koşullarda değilde oksidan koşullarda hidrolize edilirse iki asit molekülüne parçalanmaktadırlar (Şekil 2.14).



Şekil 2.14: Oleik asidin oksitlenmesi.

2.2.3.5. Halojenleme

Doymamış yağ asitlerinin yapısında yer alan etilen bağının flor, klor, brom, iyot gibi halojenlerden herhangi biriyle doyurulmasıdır. Oleik asit brom ile doyurulduğunda dibromostearik asit elde edilir (Şekil 2.15). Eğer doymamış yağ asitleri iyot ile doyurulmuş ise yağ asidinin adsorbe ettiği iyot miktarı ölçülerek çifte bağ sayısını yani doymamışlık derecesi ölçülebilir [Ası, 1996].



Şekil 2.15: Oleik asidin bromlanması.

2.2.4. Yağ Asitlerinin Kullanım Alanları

Yağ asitleri ilaç, petrokimya, polimer, boya, vernik, gıda, yağ, sabun, deterjan, kozmetik alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

Yağ asitleri üzerinde bulunan çifte bağlar ve reaktif grupları sayesinde polimerleşmeye katılabilmektedir. Uzun karbon zincileri sayesinde katıldığı polimere esneklik sağlamaktadırlar. Marina ve arkadaşları biyolojik olarak bozunabilir

polimerlerde esnekliği, düşük erime noktası, hidrofobisite ve bükülebilirliği sağlaması için yağ asidini kullanmışlardır. Yağ asitleri, polimerik yapıların doğal olarak bozunabilir ve çevreye dost bir materyal olmasını sağlamaktadır. Yağ asitleri üzerinde bulunan karboksilik asit fonksiyonel grubundan yararlanmak için polimer zincirine monomerler ile bağlanmaktadır. Çoğu yağ asitleri tek fonksiyonel yapılarından dolayı polimerleşmeyi durdurucu etkileri bulunmaktadır. Bu yüzden iki fonksiyonel grubu bulunan yağ asitleri ile polimerleşmeyi gerçekleştirmek gerekmektedir. Son yıllarda bu polimerizasyona uygun rikinoleik asit ve kastor yağı bazı polianhidratlar ve ko-poliesterler ortaya çıkmıştır.

Biyomedikal uygulamalarda kullanılan herhangi bir polimerin medikal uygulama için uygun özelliklere sahip olması gerekmektedir. Polimer ilacın vücuda salınımı için gereken hidrofobisiteye, çözünürlüğe, uygun fiziksel özelliğe sahip olmalıdır. Yağ asidi bazı polimerler medikal uygulamalar için gerekli olan özellikleri taşıyan polimerlerdir. Yağ asidi içeren polimerler, geciken bozunma ve içerisine hapsedilmiş kimyasalların salınımını geciktirme özelliklerinden dolayı ilaç endüstrisinde kullanımları mümkün olmaktadır [Sokolsky et al., 2008].

Boyalar, içerisinde farklı komponent karışımlarını bulundurmaktadırlar. Linseed ve soya gibi bitkisel yağlardan elde edilen yağlı boya sıradan boyanın içerisindeki materyalleri oluşturabilmektedir. Alkilid boyada, alkilid reçine olarak isimlendirilen sentetik reçine bağlı bulunmaktadır. Genellikle boyalarda bağlayıcılar, organik solventler, su, renk pigmentleri ve az miktarda bazı kimyasal maddeler bulunmaktadır. Genellikle alkilidler poliesterlerin yağ yada yağ asitleri ile modifiye halleriyle karşımıza çıkmaktadır [Bouwman, 2005]. Alkilid reçineler özellikle dekoratif uygulamalar için oldukça yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Alkilid reçineler yağ asitleri ile fitalik asit anhidritlerin kondenzasyonu ile oluşmaktadır. Alkilid reçinelerin boyalarda tercih edilmesinin sebepleri ise; ucuz olması, kolay üretilmesi, reçinelerin çok ucuz olan çözücülerde yüksek çözünürlük sağlamasıdır. Alkilid reçineler, dekoratif boyalarda kullanımları dışında fırın boyalarında, mürekkeplerde, makine parçaları temizlenmesinde, mobilyaların mat ve yarı mat olarak verniklenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [Aghaie et al., 2011].

Megahed, sükroz ve değişik tipte yağ asitlerini kullanarak sükroz yağ asidi esterleri elde etmiş ve bunları gıdalarda emülsüfiyer olarak kullanmıştır. Bunların yüzey aktivitesini ve buna bağlı olarak emülsüyon özelliklerini incelemiştir. Laurik , palmitik ve oleik asitler sırasıyla %86.5, %87.3, %88.6 gibi emülsiyon

verimliliklerini göstermişlerdir. Oluşan ürünler hidrofil-lipofil dengesiyle değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın yapılmasının bir diğer nedeni ise geleneksel metotlarda elde edilen emülsülfierler insan sağlığı açısından zararları daha fazla olmasından dolayı tercih edilmiştir. Genel olarak, yağ asitlerinin sükroz esterleri (olestra) polialkol türevlerinden daha güvenlidir. Ayrıca sükroz esterlerinin fizyolojik özellikleri eşsiz olup zehirsiz, kokusuz ve tatsız haldedir. Ayrıca sükroz esterleri gıda olarak tüketildiğinde, normal gıda formuna hidrolize edilirler. Bu emülsülfierler genel olarak çikolata, ekmek, pasta, mayonez yapımında yaygın olarak kullanılmaktadır [Megahed, 1999].

2.3. Enzimler

Enzimler, biyolojik katalizörlerdir. Kimyasal katalizörlere göre bazı üstün yönleri vardır. Enzimatik reaksiyonlar düşük sıcaklıklarda gerçekleştirildiğinden dolayı kimyasal reaksiyonlara göre daha temiz ürün eldesi mümkündür. Kimyasal katalizörlerle eldesi mümkün olmayan bazı spesifik ürünler de enzim kullanılarak sentezlenebilmektedir. Endüstride sıkça kullanılan enzimler ve uygulama alanları Tablo 2.3.' de gösterilmiştir.

Tablo 2.3: Endüstriyel enzimler ve kullanım alanları.

Enzim	Kullanım Alanları
α -amilaz	Deterjan, gıda prosesleri (nişasta prosesleri, ekmek yapımında) tekstil , mayalama, hayvan yemi.
Selulaz	Deterjan, alkol, tekstil.
Ksilinaz	Kağıt, hayvan yemi, ekmek yapımı, nişasta prosesi.
Proteaz	Deterjan, hayvan yemi, et.
Papain	İlaç, gıda, deri, tekstil, mayalama.
Glukoamilaz	Nişasta prosesleri, meyve suyu, alkol ve ekmek yapımı.
β glukonaz	Alkol, mayalama.
Lipaz	Yağ, biyodizel, deterjan, emülsülfier.

2.3.1. Enzim Aktivitesi Üzerine Etki Eden Faktörler

Enzim aktivitesini belirlemek için ortamın ve kullanılan değişkenlerin optimize edilmesi gerekmektedir. Bazı durumlarda enzim aktivitesini istenildiği gibi göstermezken bazı durumlarda ise beklenen reaksiyonları kolaylıkla göstermektedir. Enzimin aktivitesine etki eden faktörler, substrat konsantrasyonu, pH, iyonik şiddet, tuzlar ve sıcaklıktır.

2.3.1.1. pH

Enzim aktiviteleri pH' a bağlıdır. Çünkü reaksiyonların gerçekleşmesi için aktif grupların belirli yüklere sahip olması gerekmektedir. pH' a bağımlı olarak bu yükler değişmektedir. Dolayısıyla bunların maksimum aktivite gösterdiği pH aralığı vardır. Bu pH' ların üzerinde ve altında (kararlılık aralığında) enzimin üçboyutlu yapısı değişmemesine rağmen aktif bölgenin istenilen yükte olmamasından dolayı enzim aktivitesinde azalmalar olmaktadır.

2.3.1.2. Sıcaklık

Sıcaklık, enzimatik reaksiyonlarda önemli bir parametredir. Her enzimin aktivitesini en iyi gösterdiği sıcaklık aralığı vardır. Bu sıcaklığın altında yada üzerinde istenilen aktiviteyi göstermezler. Yüksek sıcaklıkta aktivitesinin düşmesinin en önemli sebeplerinden birisi enzimin üç boyutlu yapısının dönüşümsüz olarak bozulmasından dolayıdır. Düşük sıcaklıklarda ise enzimin hareket kabiliyetinin düşmesi ve aktivite göstermesi için uygun konformasyona gelmesi zaman aldığından dolayı aktivitesinde düşüşler gözlenmektedir.

2.3.1.3. Tuz ve İyonik Şiddet

Bazı enzimler aktivitelerini reaksiyon ortamına eklenen değişik tuzlar ile arttırabilmekte yada azaltabilmektedir . 0,5 M tuz konsantrasyonlarının üzerinde çoğu enzimler inhibe olmaktadır. Fakat bazı enzimler farklı tuzlar sayesinde aktivitelerini arttırmaktadır [Scopes, 2001].

2.3.2. Lipazlar

Lipazlar açıl gliserollerin hidrolizi için sorumluluğu en yüksek olan hidrolaz sınıfındadır. Sistematik kısa adı ise EC 3.1.1.3' dür. Doğada yağların (triacilgliserollerin) biyolojik dönüşümleri için yaygın olarak kullanılırlar. Ayrıca lipazların biyolojik önemi, biyoteknolojide kullanımı için büyük bir potansiyel olmasını sağlamaktadır. Lipazlar esterazlardan ayırt eden özelliği sulu ve organik faz arasında eşsiz bir görevi bulunmasıdır. Lipazın bu durumu lipid ve su arasındaki katalitik aktivite kısıtlamalarından etkilenmeyip ara yüzey aktivitesi göstermesidir [Vakhlu and Kour, 2006]. Lipazlar hidroliz, interesterifikasyon, alkoliz, asidoliz, esterifikasyon ve aminoliz gibi geniş reaksiyon aralığında aktivite göstermektedir. Triacil gliserollerin ester bağlarını hidroliz eder ve serbest yağ asitlerinin ortama verilmesini sağlamaktadırlar [Sheldon, 1993].

Lipazlar biyoteknolojik uygulamalar için biyokatalizörlerin en önemli grubunu oluşturmaktadır. Lipazlar, bitkiler, hayvanlar, bakteriler, mantarlar ve mayaların çoğu türlerinden izole edilmektedirler. Mikroorganizmalardan elde edilen enzimler, süt, gıda, deterjan, tekstil, ilaç, kozmetik ve biyodizel gibi çeşitli endüstrilerde kullanılmaktadır. Bu yüzden günümüzde mikrobiyal lipazların araştırılması çok büyük ticari öneme sahiptir. Lipazlar ev ve endüstriyel çamaşırların yıkanması ayrıca bulaşıklar için deterjana katılarak yağların giderilmesi, tıkalı olan tıkanmış boruların açılması için kullanılmaktadır. Lipazın temizleme gücü, deterjanlarla beraber daha iyi bir etkiye sahip olmaktadır. Ayrıca proteaz, amilaz, selülazın deterjanlara eklenmesi ile temizleme güçleri arttırılabilmektedir [Hasan et al., 2010].

Lipazlar son yıllarda modern gıda endüstrisinin ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Bitkisel fermantasyon, fırınlanmış gıdalar, meyve suları gibi geniş ölçekte ürünlerin hazırlanmasında, deri endüstrisinde post ve deri yıkama proseslerinde,

aktive edilmiş çamurun ve diğer aerobik atık ürünlerinin üst kısmındaki oksijen transeferine engel olan ince tabakanın yok edilmesi için kullanılmaktadırlar [Vakhlu and Kour, 2006]. Lipazlar gerçekleştirdikleri reaksiyonların özelliklerine göre üç ana gruba ayrılırlar.

2.3.2.1. Substrat Seçiciliği

Lipaz için doğal substratlar gliserol esterleridir. Lipazlar triaçilgliserollerin hidrolizini katalizleyebilirken aynı zamanda mono, diaçilgliserolleri ve fosfolipidlerde hidrolize edebilmektedir.

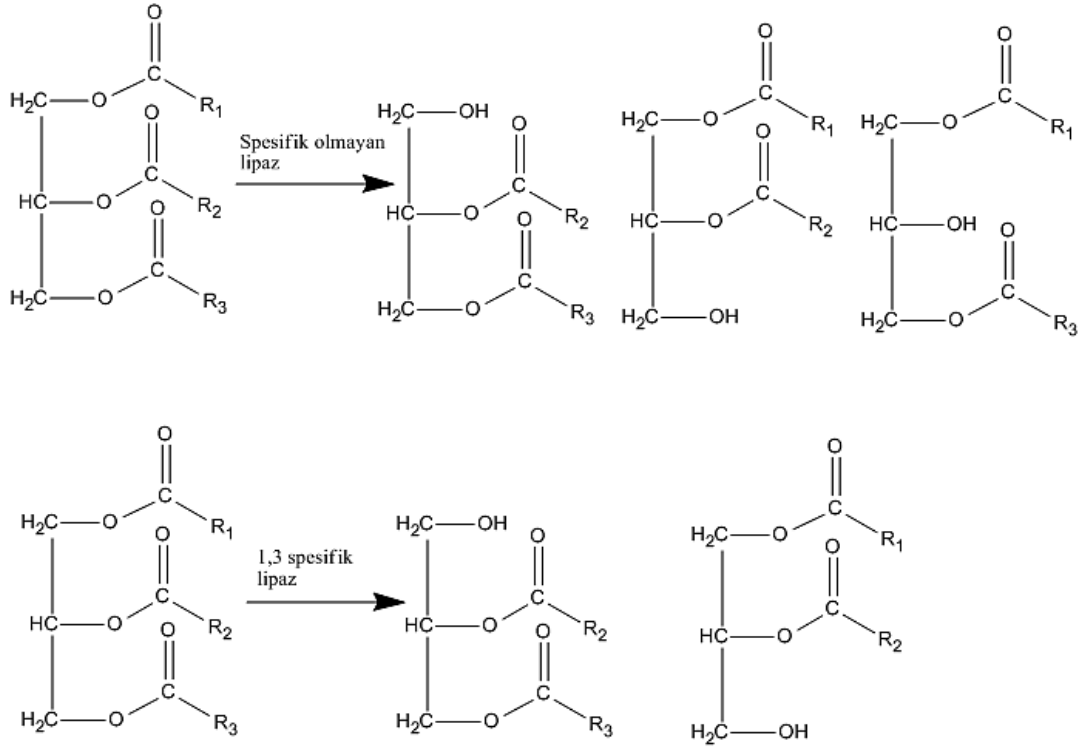
2.3.2.2. Bölgesel Seçicilik

2.3.2.2.1. Seçici Olmayan Lipazlar

Triaçilgliserollerin tamamını yağ asitleri ve gliserollere karışık olarak hidrolize eden lipazlardır. Mono ve diaçilgliseroller ara ürünleridir.

2.3.2.2.2. 1,3 Spesifik Lipazlar

Sadece triaçil gliserolün C1 ve C3 gliserol bağına hidrolize eder ve ortamda yağ asitleri, 2-monoaçilgliseroller ve 1,2-diaçilgliserol yada 2,3-diaçil gliserol oluşmaktadır. Son iki ürün kararsız bir yapıda olduğu için açıl gruplarının göçmesi sonucu 1,3 diaçilgliserol ve 1 yada 3 monoaçilgliserol elde edilmektedir (Şekil 2.16).



Şekil 2.16: Farklı lipazlar tarafından katalizlenen hidroliz reaksiyonları.

2.3.2.2.3. Spesifik yada Seçici Tip Yağ Asitleri

Lipazlar belli tip yağ asitlerine spesifik olup onlarla reaksiyon vermektedirler. Bu lipazlar, triaçil gliserollerin herhangi bir pozisyonunda hidrolizleme reaksiyonu ile ürün oluşturmaktadırlar.

2.3.2.2.4. Enantiyoseçicilik

Bazı enzimlerin rasemik karışımlardaki enantiyomerleri ayırt etme özellikleri bulunmaktadır. Örneğin spartinin R izomerinin tadı şekerlidir. S izomerinin ise acıdır. Lipazların enantiyoseçicilikleri substrat ve esterlerin konumuna göre çeşitlendirilebilir.

Her lipazın kendine has özellikleri olup genel olarak yağ ve benzeri maddeleri hidrolizlemede yada oluşturmada kullanılmaktadır [Barros et al., 2010].

2.3.2.3. *Thermomyces Lanuginosa* Lipaz

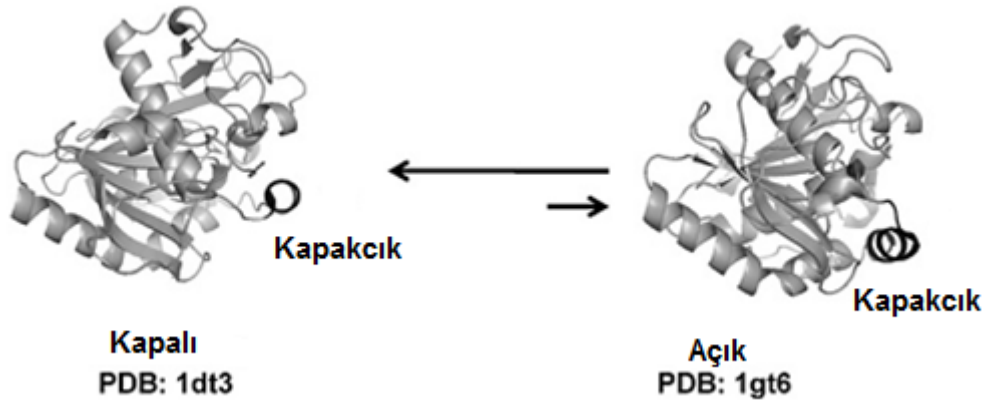
Spesifik ve kompleks kimyasalların geliştirilmesi modern endüstrinin vazgeçilmez hedeflerinden birisidir. Çoğu enzimler arasında lipazlar daha fazla öneme sahiptirler. Ayrıca lipazlar farklı substratları tanıması ve spesifik özelliklerinden geniş bir alana sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı lipazlar çok farklı reaksiyonlar için katalizör olarak özellikle ilaç endüstrisinde, enerji sektöründe (biyodizel) ve gıda endüstrisinde kullanılabilmektedirler.

Lipazların homojen olan ortamda genel özellikleri aynı olup, aktif bölgenin üzerinde bulunan kapakcıkları bulunmaktadır. Örneğin *Candida antartica* lipaz B' in kapakcığı küçük, *Bacillus thermocatenulatus* lipazının kapağı oldukça büyüktür. Herhangi bir hidrofobik arayüzey durumunda, örneğin yağ damlası ya da hidrofobik maddeler ile kapakcığın hareketi söz konusu olup hidrofobik olan rezüdüler lipazın aktif bölgesine yakın bulunması aktivitenin belirlenmesinde etkili olmaktadır. Böylece lipaz kolaylıkla bu hidrofobik maddeleri aktif bölgelerinde reaksiyona maruz bırakabilir. Bu mekanizma genellikle lipazın ara yüzey aktivasyonu olarak bilinmektedir. Lipazlar poroz desteklere immobilize edildiklerinde aktivitelerinde düşme gözlenebilmektedir. Lipazın aktif bölgesinin hareketliliği için ortamdaki en ufak değişiklik enzimin reaksiyon eğilimini bozabilmektedir.

TLL , 269 aminoasit içeren tek zincirli bir proteindir. Moleküler ağırlığı 31700 g/mol ve izoelektrik noktası pH 4,4' tür. Merkezinde 8'li kıvrımlar bulunmakta ve ağırlıklı olarak β -sheet ile α -heliks yapısı yer almaktadır. Enzim üzerindeki kapakcık aktif bölgeyi 86-93 sayılı aminoasit rezüdülleri tarafından koruyan loop bölgesinde yer almaktadır (Şekil 2.17) [Jha et al., 1999]. X-ray kristalografik çalışmalarla bu kapakcığın hareketli olduğu gözlenmiştir. Aktif bölge tüm lipazlar gibi serin (Ser), histidin (His), aspartik asit (Asp) rezüdülleri üzerinden reaksiyonları katalizlemektedir. TLL'nin dört triptofan (Trp) rezüdülleri arasından bir tanesi (Trp89) kapacıkta yer almaktadır. Trp89 üzerine yapılan mutasyonla hidroliz reaksiyonu için Trp89' un ne kadar önemli olduğu tespit edilmiştir [Berg et al., 1998]. Ayrıca kapakcığın etrafında katyonik rezüdüler tarafından kontrol edildiği tespit edilmiştir. S146A mutasyonu göstermiştir ki Serin rezüdüsü ayrıca stabilizasyonu sağlamakta görevlidir [Peters et al., 1998]. TLL 55-60°C' de oldukça

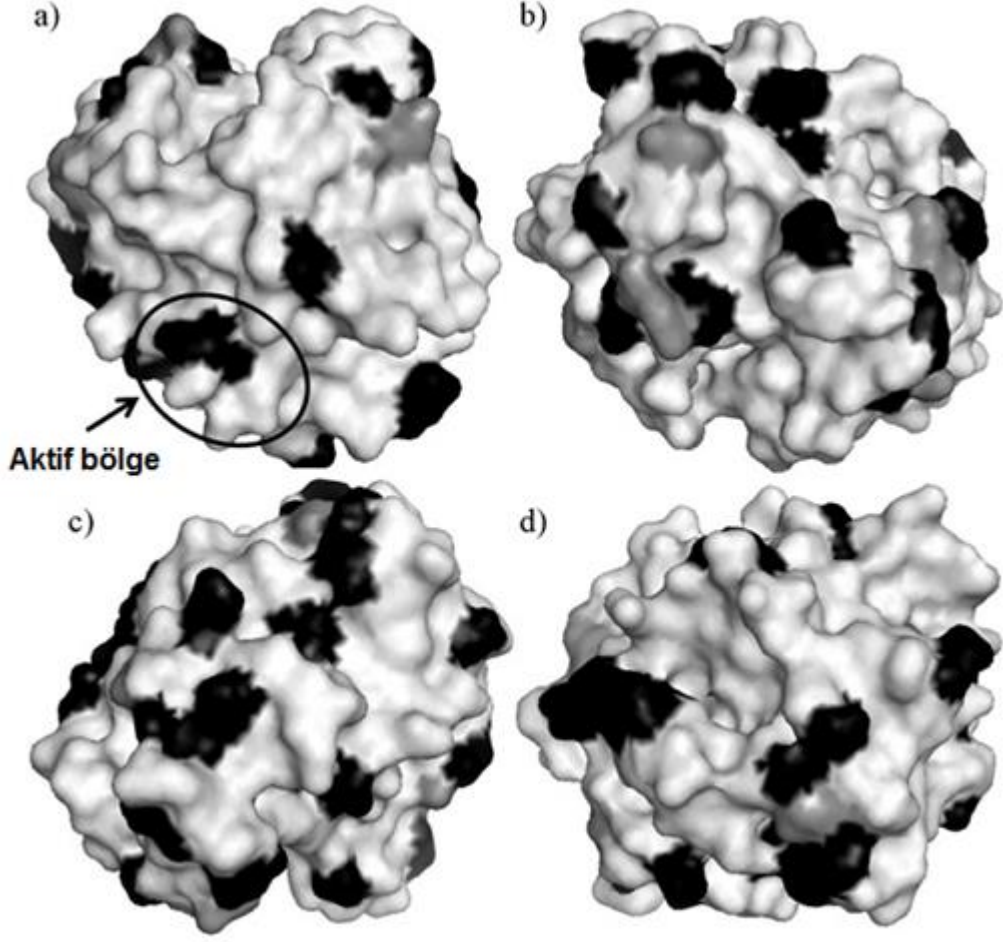
stabil ve aktivitesini korumakta [Fernandes et al., 2004], maksimum aktivitesini ise pH 9' da göstermektedir [Rodrigues et al., 2009].

Enzim ortamına eklenen bazı kimyasalların TLL' in özelliklerine etkisi bulunmaktadır. Örneğin betain termal stabiliteyi arttırmaktadır. Deterjanlar ise TLL birbirinden ayrılmasına ve böylece stabilitenin düşmesine fakat aktivitesinin artmasına sebep olmaktadır. Diğer bir taraftan deterjanlar lipazın açık formunu stabilize edebilirler. Her iki durum uygun konsantrasyonda deterjanın TLL aktivitesindeki artışına etkisini açıklamaktadır. Yani deterjanlar uygun olarak kullanıldığında enzim aktivitesi üzerine önemli etkileri bulunmaktadır [Söderlund et al., 2002].



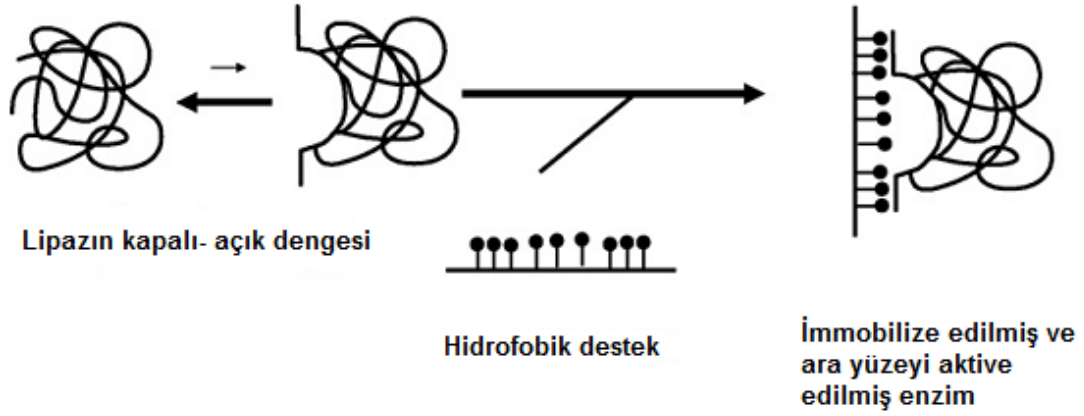
Şekil 2.17: TLL üzerinde bulunan kapakcığın açık ve kapalı formları.

TLL oldukça kararlı bir enzimdir. Ticari uygulamalarında immobilizasyonla çok noktadan kovalent olarak bağlanarak daha stabil hale getirilebilmektedir. Enzimin çok noktadan kovalent olarak immobilize edilmesi enzimi tam anlamıyla rijit yapmakta bu etkiden dolayı enzime etki edecek kimyasalların etkinliği azalmaktadır [Mateo et al., 2007]. Kovalent immobilizasyon genellikle enzim üzerindeki primer amin gruplarıyla gerçekleştirilmektedir. TLL üzerinde sadece yedi adet lizin (lys) grubu bulundurmasından dolayı immobilizasyon için yoğun çok noktalı kovalent bağlantı yapmak oldukça zordur [Derewende et al., 1994]. Karboksilik asit gruplarının karbodiimid ile aktivasyonundan sonra etilendiamin ile muamele edilir ve böylece primer amino gruplarının sayısı arttırılmış olur. Şekil 2.18' de aminlenmiş ve aminlenmemiş enzimi gösterip aminlenen enzimin çok noktalı kovalent bağlantıya oldukça yatkın olduğu görülmektedir [Rodrigues et al., 2009].



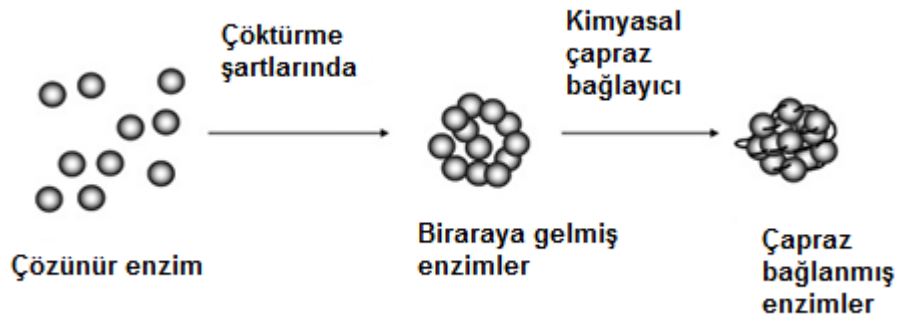
Şekil 2.18: Lys, Asp, Glu rezüdülerinin dört farklı TLL yüzeyinde görünütüsü gösterilemektedir. Ayrıca Lys gri ile gösterilmiş olup, Asp ve Glu rezüdüleri siyah ile gösterilmiştir. a) Aktif bölgenin ön yüzden görüntüsü. b) Birinci yüzeyin 90° döndürüldükten sonra. c) Birinci yüzeyin 180° döndürüldükten sonra. d) Birinci yüzeyin 270° döndürülmesi ile elde edilen TLL resimleri.

TLL' nin immobilizasyonu için diğer bir strateji ise lipazın alışılmamış katalitik mekanizmasının farklı hidrofobik desteklere arayüzey aktivasyonu ile adsorblanmasının kullanılmasıdır (Şekil 2.19). Bu yolla, immobilize edilmiş enzimin açık konformasyonu stabilize edilmiş olur.



Şekil 2.19: Arayüzey aktivasyonu ile hidrofobik yüzeye enzim immobilizasyonu.

TLL immobilizasyonunda hidrofobik yüzeylerin özelliklerine göre enzim davranış göstermektedir. TLL' nin hidrofobik yüzeylere immobilizasyonu ile enzimin açık formu korunmaktadır. Yüksek hidrofobisiteye sahip maddeler aktif bölge etrafında ise hidrofilik substratlara karşı düşük aktivite gösterirken, hidrofobik substratlara karşı da çok yüksek aktivite göstermektedir [Duinhoven et al., 1995]. İmmobilizasyonda bir çok hidrofobik destekler kullanılırken bunun yanında çapraz bağlı enzim agregatları (CLEAs) kullanılmaktadır (Şekil 2.20). Bu immobilizasyon tekniğinin avantajı, herhangi bir destek materyaline gerek olmadan enzimlerin çöktürülmesi ve bunların birbirlerine çapraz bağ yapıcılarla (glutaraldehit) kovalent bağ yapılmasıyla elde edilmesidir [Cao et al., 2000]. İlk önce TLL SDS varlığında $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ ile çöktürülür ve glutaraldehit ile çapraz bağlanarak normal enzimin hidrolitik aktivitesinden 3 kat fazla aktiviteli enzim elde edilir [Cao et al., 2003].



Şekil 2.20: Çapraz bağlı enzim çökeltilerinin oluşturulması.

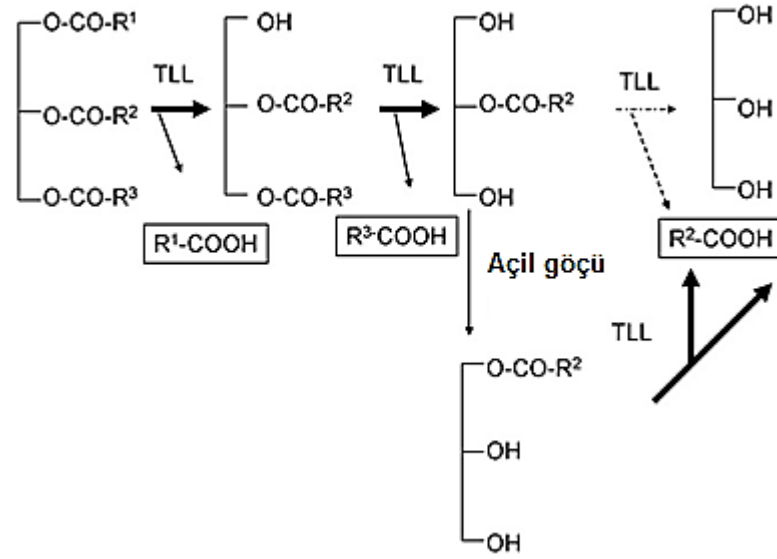
İmmobilizasyonda kullanılan polimerler bazı koşullarda çözünebilir formda olurken diğer koşullarda ise çözünmez hale gelebilir. Eupergit (E) S100 ve karboksimetil selüloz (CMC) suda çözünebilir polimerlerdir. TLL Eupergit üzerine

bağlandığında suda dönüşümlü çözünürlüğü vardır. pH 5' in altında suda çözünmez olurken pH 5,5 üzerinde suda çözünür hale gelmektedir. Bu yüzden CMC-Lipaz' da dönüşümlü çöktürülebilmektedir. E-lipaz suda çözünmeyen substratlar için spesifik aktivitede artış gözlenirken, CMC-lipaz da ise suda çözünen substratlar varlığında aktivitede artışlar gözlenmektedir. E-TLL serbest TLL' ye göre 4 kat daha fazla hidrolitik aktivite gösterirken, CMC-Lipaz serbest lipaza göre 4 kattan daha fazla hidrolitik aktivite göstermektedir [Charusheela and Arvind, 2002].

TLL' nin yüksek aktiviteli ve stabil yapısı endüstriyel anlamda çok fazla reaksiyonda kullanımına olanak sağlamaktadır. Su ve organik çözücü bulunan iki fazlı ortamlarda enzim tarafından gerçekleştirilen birçok reaksiyon bulunmaktadır. Örneğin, TLL yüksek polaritelere sahip iyonik sıvılarda uygun sıcaklıkta oldukça etkilidir. Bu çözeltilerin uçucu olmayan, yanmayan özelliklerinden dolayı geleneksel organik solventlere alternatif olarak ilgi çeken ortamlar oluşturmaktadırlar. İyonik sıvılar yüksek kaynama noktalarına sahiptirler [Yang and Pan, 2005]. Ayrıca TLL su ve iyonik sıvı mikroemülsiyon ortamında da kullanılmaktadır. Su ve iyonik sıvı ortamı noniyonik yüzey aktif madde (Tween 20, Triton X-100) ile lipaz katalizli esterifikasyon reaksiyonunda kullanılmaktadır. Enzimin katalitik davranışı en çok yüzey aktif maddenin konsantrasyonuna ve su miktarına bağlıdır. Ayrıca TLL'nin kritik basınç ve kritik sıcaklıktan yüksek değerlerde yani superkritik sıvılarda da kullanımı bulunmaktadır. Sıcaklık ve basıncın fonksiyonu istenilen yoğunlukta ve çözücü gücünde süperkritik ortam ve bu ortamların normal ortamlara nazaran etkin çözünürlüğü sayesinde TLL hidroliz reaksiyonlarında, kakao yağının sentezi, saf kimyasalların veya farklı kimyasalların sentezi gibi reaksiyonlarda oldukça yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir [Kamat et al., 1995].

2.3.2.3.1. Yağların Hidrolizi

TLL farklı yapıdaki yağların hidrolizi ile yağ asidi elde etmek için kullanılmaktadır. Bu enzim C1 ve C3 konumları için spesifik olup hidroliz reaksiyonunda C2 pozisyonunda kalan ester de açıl göçü ile 1 pozisyonuna göç etmektedir (Şekil 2.21) [Chew et al., 2008].



Şekil 2.21: TLL tarafından yapılan yağ hidrolizi ve açıl göçü.

Ayrıca birçok çalışmada enzim aktivitesini arttırmak için farklı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, 1-monoolein veya 1,2 diolein monomoleküler filmlerin hidrolizi β -siklodekstrin varlığında aktiviteleri ölçülmüştür. β -siklodekstrin varlığında hidrolitik proses ivme kazanmış böylece reaksiyon hızı artmıştır. Örneğin ayçiçek yağının ve soya lesitinin hidrolizi 60°C ' de ve heptan-tampon çözeltisi (pH 7) ikili faz sisteminde test edilmiştir. Ayçiçek yağının Lipozyme TL IM ile hidroliz reaksiyonunda %85,3' lük yağ asidi çevirimi olurken, lesitin ile %100' lük bir dönüşüm gerçekleşmektedir [Fernandez, 2010].

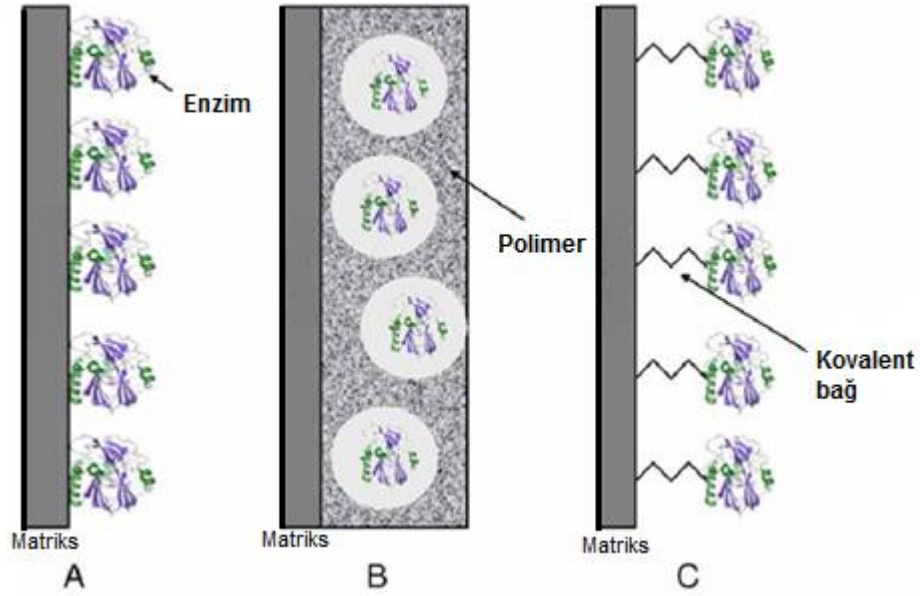
2.4. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, son zamanlarda gıda, ilaç, kimyasal üretimi endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar [Klaus et al., 2005]. Geçtiğimiz iki yarı yüzyıldan beri çeşitli uygulamalar için immobilize enzimlerin geliştirilmesiyle ilgili çok fazla çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda serbest olan enzimden ziyade immobilize olan enzim kullanılması açık şekilde yararlı olduğu görülmüştür. Immobilize enzimler prosesin kontrolü ve etkili tekrar kullanımı sayesinde ürün masrafında düşüş sağlanmaktadır [Cao, 2006].

2.4.1. Enzim İmmobilizasyon Metotları

2.4.1.1. Kovalent Olmayan İmmobilizasyon

İmmobilize enzimler uzun ömürleri ve tekrar kullanılabilme olanaklarıyla serbest enzimlerden daha kullanışlı olduğu bilinmektedir. Ayrıca reaksiyon hızı, başlatılması ve sonlandırılması kontrol edilebilmektedir. Safılaştırma masraflarını, enzim substrat arasındaki kontaminasyonu engellemeye yardımcı olarak düşürmektedir. İmmobilize enzim için kullanılan birçok metot vardır. Yaygın olarak üç tanesi kullanılmaktadır. Adsorpsiyon, hapsetme, çapraz bağlı yada kovalent bağlı sistemlerdir (Şekil 2.22).



Şekil 2.22: A) fiziksel adsorpsiyon, B) hapsetme, C) kovalent bağlanma.

İmmobilizasyon metodu ne olursa olsun, enzim immobilizasyonu sırasında immobilizasyon ortamında bulunan çözücüde çözünmesi gerekmektedir. Genellikle bu ortamlarda su kullanılmaktadır.

2.4.1.1.1. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon metodu ile enzimler genellikle polimerlerden oluşan destek materyallerine fiziksel olarak adsorbe olmaktadır. Bu yöntemde enzim çözücü

ortamında fiziksel adsorpsiyondan sonra yıkanıp kurutularak çok basit olan bu immobilizasyon işlemi tamamlanmaktadır. Bu metotla elde edilen immobilize enzimin tekrar kullanımı, substratın kontaminasyonu ile enzim matriksten ayrıldığından dolayı mümkün olmamaktadır [Spahn and Minter, 2008].

2.4.1.1.2. İyonik Bağlanma

İyonik bağlanma prensibi kromatografide olduğu gibi protein ligand etkileşimleri temeline dayanmaktadır. Örnek olarak en basiti kromatografide proteinin geridönüşümlü olarak iyon değiştiricilere bağlanmasını söyleyebiliriz. Bu metot basittir ve dönüşümlüdür. Hem güçlü bağlanma şartlarını hemde bu şartlarda enzimin tamamen aktif olduğu durumu bulmak oldukça güçtür.

2.4.1.1.3. Hidrofobik Etkileşim

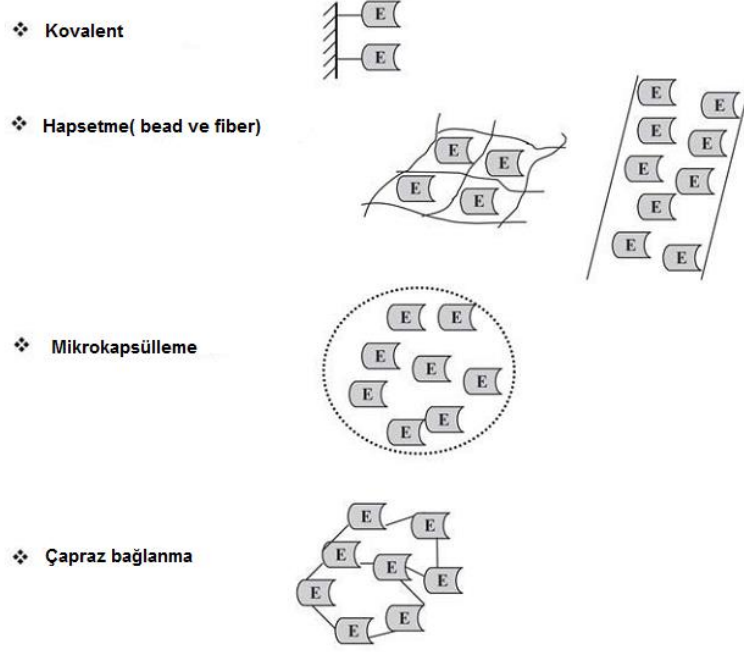
Bu immobilizasyon metodu kimyasal bağ içermez, tamamen entropi ile açıklanmaktadır ve pH, sıcaklık, tuz konsantrasyonları gibi değişkenlere bağımlı olarak gerçekleştirilmektedir. Etkileşim kuvveti kullanılan adsorbent ve proteinin hidrofobisitelerine bağlıdır. Hidrofobik adsorbent hidrofobik ligantlarla modifiye edilerek immobilizasyonda kullanılabilir.

2.4.1.1.4. Afinite İle Bağlanma

Enzimin ilgi duyduğu ligantların adsorbente bağlanması ile elde edilen immobilizasyon çeşididir. Fakat bu metot oldukça pahalıdır.

2.4.1.2. Kovalent İmmobilizasyon

Bu metotta enzim matrikse kovalent olarak bağlanmaktadır. Bu immobilizasyon metodu kovalent, çapraz bağlanma, hapsetme, kapsülleme olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2.23).



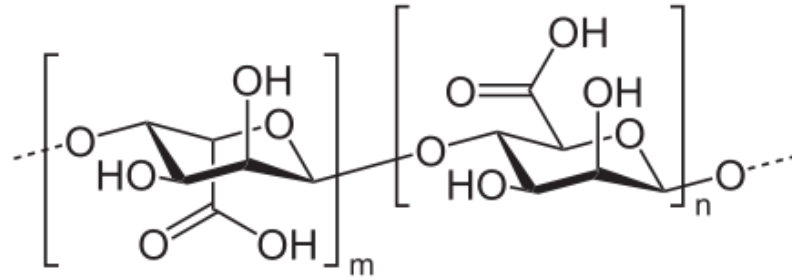
Şekil 2.23: Enzimin matrikse kovalent immobilizasyonu.

Kovalent olarak enzimin matrikse bağlanması istenilen sonuçları vermesine rağmen aktivitelerinde düşüş gözlenmektedir. Bunu önlemek için immobilizasyon ortamına substrat eklenip enzim aktif bölgesi korunarak immobilizasyon yapıldığında enzim aktivitesinde önemli ölçüde artış olduğu gözlenmektedir. Böylece immobilizasyon matriksi aktif bölgedeki fonksiyonel gruplar yerine enzimin diğer bölgelerinde bulunan fonksiyonel gruplar ile kovalent bağ yapması sağlanır [Guisan, 2006]. Ayrıca kovalent olarak aktif bölgesi korunmuş enzimi matrikse bağlayıp aktivitesini ölçmek beklenen sonuçları veremeyebilir. Kovalent olarak bağlanan enzimin hareket kabiliyeti azaldığından dolayı enzim aktivitesinde bir miktar düşüş gözlenebilmektedir.

Hapsetme metodu, kafes yapısında materyali bulunan yada polimer membranlar arasına immobilize olmuş enzimin bulunduğu sistemleri ifade etmektedir. Bu immobilizasyon metodu aslında enzimlerin katı matrikslerin gözenekleri veya lifleri arasına hapsedilmesi esasına dayanmaktadır. Katı matriks olarak kullanılan malzemeler gözenekli yapıya sahip Ca-Alginat, hallow fiberler, hidrofilik yada hidrofobik membranlar, N-N' metilen bisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamidlerdir [Chang, 1998].

2.4.1.2.1. Kafes Tipi

Kalsiyum-Alginat İle İmmobilizasyon: Algin yada alginik asit olarak da adlandırılan alginat kahverengi deniz yosunlarının hücre duvarlarından elde edilen anyonik bir polisakkarittir. Bu polisakkarit β -D-manuronat, α -L-guluronat monomerlerinden oluşmaktadır (Şekil 2.24).



Şekil 2.24: m) Guluronik asit, n) manuronik asit birimlerinden oluşan alginat.

Alginat Kullanım Alanları: Alginatın hızlı bir şekilde suyu adsorplayan özelliği bulunduğu için kağıt ve tekstil endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca meyve sularında, dondurmalarda, kozmetikte, ilaç endüstrisinde, enzim ve hücre immobilizasyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Alginat, sulu çözeltilerde Ca^{+2} , Sr^{+2} , Ba^{+2} , Al^{+3} , Fe^{+3} gibi iki yada üç değerlikli metaller ile kompleks yaparak jel formunu oluşturmaktadır.

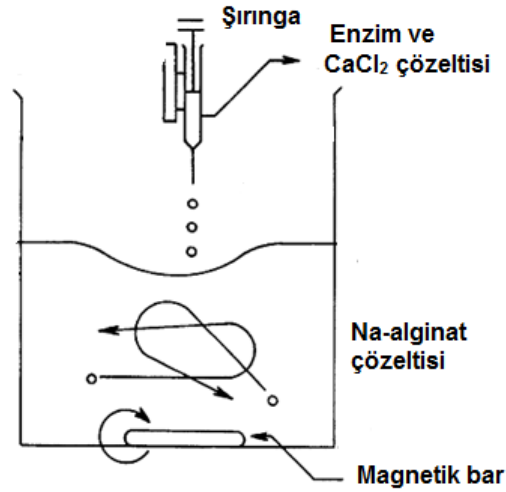
Alginat kullanılarak üç farklı metotla enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmektedir.

Bead: Na-Alginat çözeltisine enzim ilave edildikten sonra ortama CaCl_2 çözeltisi damlatılarak elde edilir. Ortamda Ca-Alginat bir jel oluşturarak enzimin bead içerisinde saklı kalmasını sağlar. Fakat bu yöntemde zaman geçtikçe enzim kaçışlarının olduğu gözlenmiştir. Bunları önlemek için;

- Oluşan beadler tekrar Na-Alginat ile muamele edilerek üzerinde film tabakası oluşturulur.
- Beadler kurutularak gözeneklerin küçülmesi sağlanır. Ayrıca ortama CaCl_2 eklenir.
- İmmobilizasyon başlamadan önce enzim büyük molekül ağırlıklı polimerlerle kovalent olarak bağlanıp daha sonra bead oluşturulabilir.
- Enzim, karbodiimid ile aktive olan alginatla kovalent olarak bağlanabilir.

- Enzimin ilgi duyduğu katyonlarla immobilize edilebilir. Yada ortama artı yüklü polimerler katılabilir.

Mikrokapsül: Enzim yada bakteri ilk önce CaCl_2 çözeltisiyle muamele edilir. Ortama az miktarda ksantan sakızı katılarak ortamın viskoz olması sağlanır. İçinde Na-alginat olan belli hızda karışan çözeltiye yavaşça damlatılır. Damlama esnasında CaCl_2 bileşiği dışı doğru hareket ederek alginat ile Ca-alginat polimerini oluşturur ve mikrokapsülü meydana getirir (Şekil 2.25).



Şekil 2.25: Kapsül metodu ile enzim immobilizasyonu.

Chang çalışmasında maya hücrelerinin bead ve mikrokapsül yöntemleriyle immobilizasyonunu gerçekleştirmiş ve bu iki yöntemi karşılaştırdığında Ca-alginat kapsülleri 27 kullanımdan sonra aktivitesi %100' den %90' a düşerken, beadlerin aktivitesi 15 kullanımdan sonra %85' den %45' e düştüğü görülmüştür. Bu sonuç kapsül yöntemi ile yapılan immobilizasyonun daha dayanıklı olduğunu kanıtlamıştır [Chang, 1998].

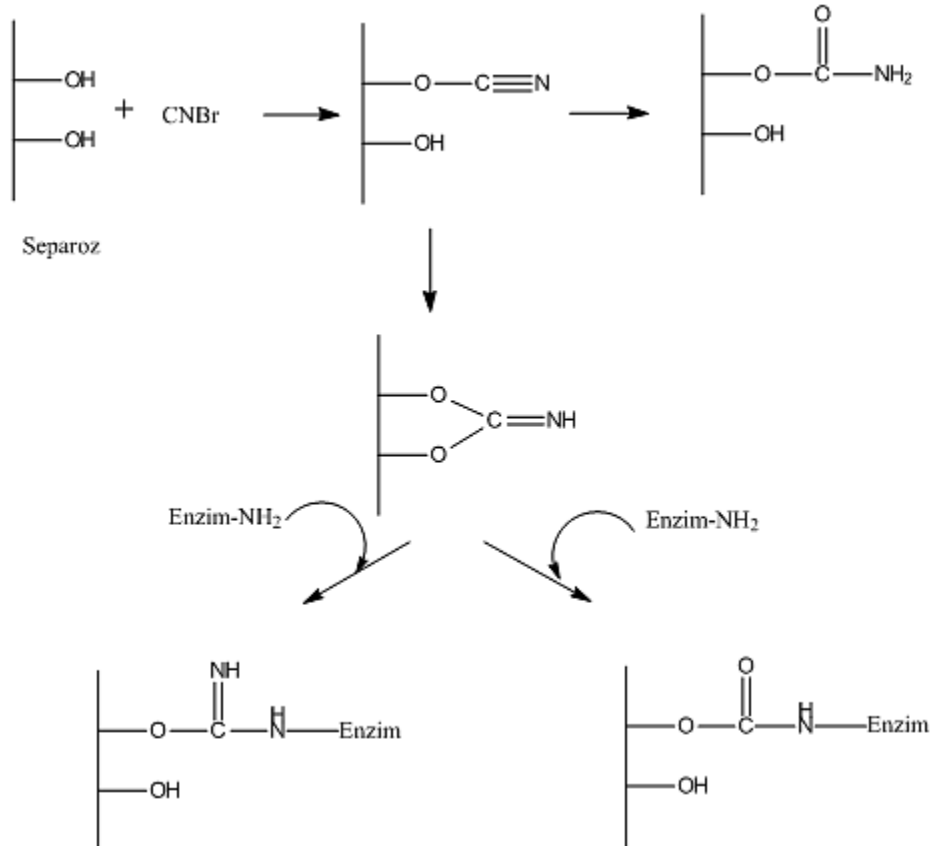
Fiber: Bu immobilizasyon metodu, bead yapımıyla aynı aşamalara sahip olup sadece şırınga içine yerleştirilen enzim ve Na-Alginat karışımı istenilen boyuta göre eklenip bead sistemine göre daha etkili olan fiber elde edilmektedir. Tanrıseven ve arkadaşları alginate fiber kullanarak glukoamilazın immobilizasyonunu çalışmışlardır. Bu çalışmada mısır nişastası, asetat tampon çözeltisi ile jelatin haline getirilip üzerine glukoamilaz ve gliserolde çözünmüş sodyum alginat eklenerek karıştırılmıştır. Bu karışım glutaraldehit ve maltodekstrin içeren CaCl_2 çözeltisine iğneli şırınga yardımıyla eklenmiştir. Solusyonu eklerken ortamda fiber oluşumu bitene kadar karıştırma yapılmamıştır. Ayrıca aynı şekilde bead oluşturularak

immobilizasyon yapılmış her iki immobilizasyonun sonuçlarına bakıldığında fiberin daha üstün olduğu görülmüştür. Ayrıca fiberde kullanılan nişastanın enzim kaçıışını engellediğı ve aktiviteyi arttırdığı gözlenmiştir. Glutaraldehidin çapraz bağları sayesinde enzim kaçıış minimuma indirilmiştir [Tanriseven et al., 2002]. Bu metotlarda genellikle enzim süzdürmesini minimize eden ve daha stabil immobilize sistemler elde edilir. Fakat sistemde enzim aktif bölgesine gidecek substrate limiti vardır. Bu yüzden substrat seçilirken bu parametre göz önüne alınmalıdır [Spahn and Minteer, 2008].

2.4.2. Matriks Aktivasyon Yöntemleri

2.4.2.1. Siyonojen Bromür

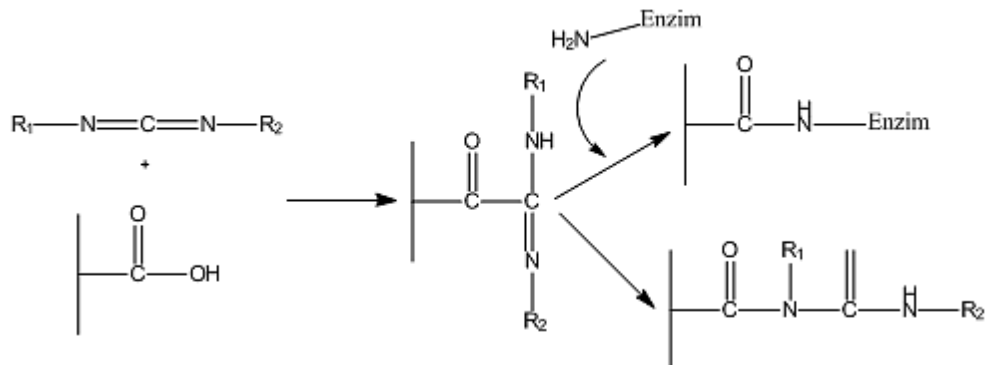
CNBr metodu ilk olarak Axen grubu tarafından kullanılmıştır [Porath et al., 1973]. CNBr çeşitli polisakkaritlerin hidroksil gruplarını aktive ederek enzimlerle kovalent olarak bağlanması sağlanmaktadır. CNBr kullanılacak reaksiyonda polisakkaridin bazik ortamla muamele edilmesi ile hidroksil gruplarının nükleofililiğı artırılması gerekmektedir. Fakat bazisitesi yüksek ortam CNBr' ün hidrolize olmasına sebep olmakta ve hidroksil grupları ile yüksek oranda toksik siyanat esterlerinin oluşmasını sağlamaktadır (Şekil 2.26).



Şekil 2.26: Separozun CNBr ile aktivasyonu ve enzim bağlanması.

2.4.2.2. Karbodiimid

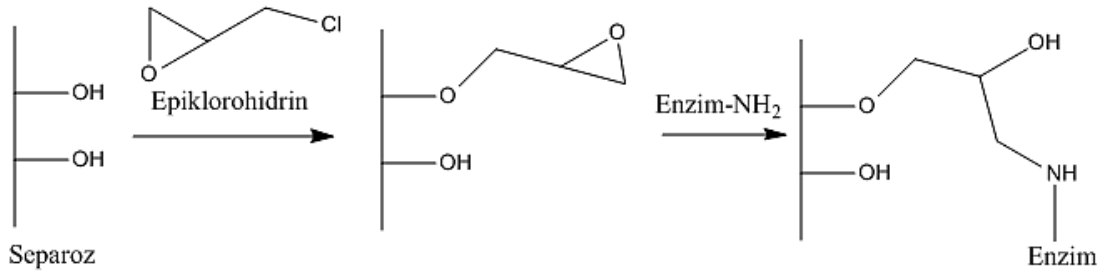
Matriksler üzerindeki karboksil grupları karbodiimid ile aktive edilerek enzim immobilizasyonunda kullanılabilir. Asidik ortamda aminlerle kolay reaksiyona giren O-açilizoüre oluşturulur. Genellikle kullanılan karbodiimid 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimidir. Matriks aktivasyonu ve enzimle reaksiyonu Şekil 2.27' de gösterilmiştir.



Şekil 2.27: Karbodiimid ile matriks aktivasyonu ve enzim bağlanması.

2.4.2.3. Epiklorohidrin

Epiklorohidrin üzerinde halojen grubu ve epoksi grubu içeren, hidroksil grubu içeren matrislerle reaksiyona girerek enzimin immobilizasyonu için uygun ortamı sağlayan kimyasal bir bileşiktir. Şekil 2.28’ de separozun epiklorohidrin ile aktivasyonu ve enzim immobilizasyonu gösterilmiştir.



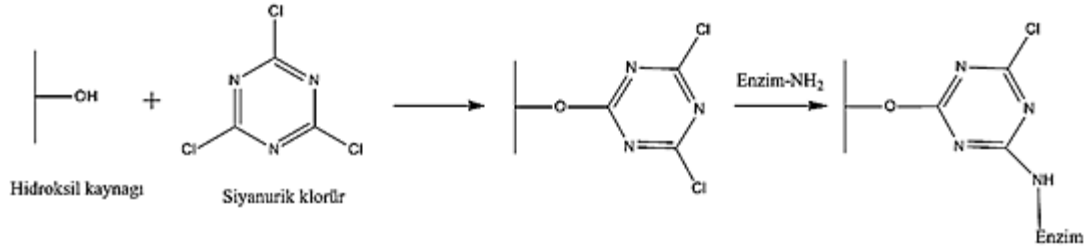
Şekil 2.28: Epiklorohidrin ile matriks aktivasyonu ve enzim immobilizasyonu.

Costa ve Reis’ in yaptığı immobilizasyon çalışmasında nişasta selüloz asetat ve nişasta polikrapolakton gibi iki farklı polimerik çıkış maddesi kullanılmıştır. Her iki yüzey epiklorohidrin ile aktive edilerek katalaz enzimi immobilize edilmiştir. Immobilizasyon sonunda immobilize enzimin yarı ömrünün serbest enzime göre iki kat fazla olduğu bulunmuştur [Costa and Reis, 2004].

2.4.2.4. Siyanürik Klorür

Polimer yüzeyindeki amino ve hidroksil gruplarını aktif hale getirmenin bir diğer yolu da siyanürik klorür ile muamele etmektir. Şekil 2.29’ da siyanürik klorürün herhangi bir hidroksil kaynağıyla gerçekleştirdiği reaksiyon ve enzim immobilizasyonu gösterilmiştir. Nemenja ve arkadaşları mikroporoz polimer sentezledikten sonra polimer yüzeyindeki hidroksil gruplarını immobilizasyona elverişli hale getirmek için glutaraldehit ve siyanurik klorür ile muamele etmişlerdir. Sentezlenen polimer iki basamakta modifiye edilmiştir. Polimer 1,6-diaminohekzan ile tolüen ortamında muamele edilmiş ve yıkanıp kurutularak aminasyon basamağı (1.basamak) tamamlanmıştır. Son basamakta (2.basamak) ise kuruyan polimerler dioksan ve tolüen bulunan ortamda siyanurik klorür çözülerek hazırlanan karışımla

muamele edilmiştir. Elde edilen matriks yıkanıp kurutularak immobilizasyona hazır hale getirilmiştir [Miletic et al., 2009].



Şekil 2.29: Siyanurik klorür ile enzim immobilizasyonu.

2.4.2.5. Glutaraldehit

Glutaraldehit (Şekil 2.30), üzerinde iki adet aldehit grubu bulunduran kapalı formülü $\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CHO})_2$ olan organik bileşiktir. Medikal ekipmanların dezenfeksiyonu, endüstriyel suların bakterilerden korunması ve biyoteknolojik çalışmalarda özellikle enzim immobilizasyonu gibi önemli alanlarda kullanılmaktadır.



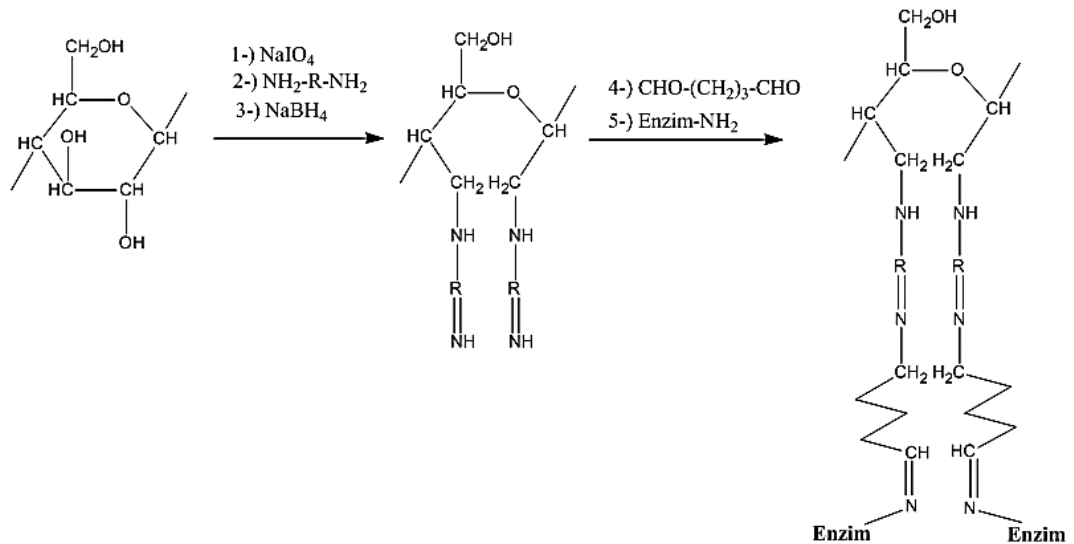
Şekil 2.30: Glutaraldehit.

Glutaraldehit üzerinde bulunan aldehit gruplarının herhangi bir amin kaynağı ile Schiff bazı reaksiyonu gerçekleştirilerek kovalent bağ oluşturabilmesi enzimlerle kovalent bağ yapma ihtimalini göstermektedir. Ayrıca enzim üzerindeki amin gruplarının glutaraldehit ile Michael-tipi katılma reaksiyonu gösterebilmektedir. Glutaraldehidin bu özellikleri enzim immobilizasyonunda yaygın olarak kullanımının mümkün olduğunu göstermektedir [Nimni et al., 1987].

S.Pahujani ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ekstraselüler alkaline lipaz glutaraldehit tarafından aktive edilen nylon-6'ya kovalent olarak immobilize edilmiştir. Optimum koşullar altında nylon-6 ya 228µg/g protein yüklenmiştir. Nylon-6 ya lipazın immobilizasyonu ise şu şekilde yapılmıştır. Belli miktarda olan matriks üzerine (50mg) miktarı artacak şekilde (2,28-22,8mg) protein eklenmiştir. İlk önce nylon-6 polimerleri 6N'lik HCl ile 30 dk boyunca hidrolize edilmiş ve saf su ile durulanmıştır. Potasyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7) ile hazırlanan %2,5' luk

glutaraldehit ile 1 saat muamele edilmiştir. Glutaraldehit ile aktifleşen nylon-6 aşırı tampon çözeltiyle yıkanıp kurutularak +4°C saklanmıştır [Pahujani et al.,2008]. Glutaraldehidin bir diğer uygulaması, enzimleri birbirlerine çapraz bağlayarak enzimin kararlı şekilde immobilize olmasını sağlamaktır. Gupta ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada enzimler çöktelir ve glutaraldehit ile çapraz bağlanarak immobilizasyon gerçekleşmektedir (CLEAs). CLEAs' ın stabilite ve tekrar kullanım çalışmaları için zeytin yağı ile hidroliz çalışması yapılmıştır. CLEAs ile %90' dan fazla aktivite ve 10 kere tekrar kullanımında sonra en düşük aktivite kaybı olduğu bulunmuştur [Gupta et al., 2009].

Bir diğer immobilizasyon için kullanılan materyal katı selüloz ve lignindir. Bu alanda yapılan enzim immobilizasyonunda basamaklı olarak bu materyallerin uygun konuma getirilmesi sağlanır. İlk olarak sodyumperiodat (NaIO_4) ile selüloz üzerindeki şeker rezüdülerin 2. ve 3. karbonları yükseltgenerek aldehit formuna getirilir. Oluşan aldehitler ara bileşik olan diamin ile Schiff bazı reaksiyonu ile kovalent bağ yapılması sağlanır. Oluşan bileşikteki çifte bağların NaBH_4 ile indirgenmesi sağlanır. Amin içeren son yapıya enzim bağlamak amacıyla aktivatör olarak glutaraldehit kullanılmış ve enzim ile Schiff bazı reaksiyonu ile selüloz üzerine enzim immobilizasyonu sağlanmıştır (Şekil 2.31) [Monsan, 1983].



Şekil 2.31: Selüloz üzerine enzim immobilizasyonu.

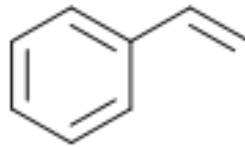
Öztürk ve Kılınç immobilizasyon sırasında ortama eklenen bazı maddeler ile enzimin aktivitesi üzerine etkisini çalışmışlardır. Bu çalışmada immobilizasyon aktivitesini arttırmak için domuz pankreas lipaz (PPL) kovalent olarak polivinilalkol

(PVA) üzerine organik solventler eşliğinde yağ asitleri varlığında immobilize edilmiştir. Ortama eklenen yağ asidinin etkisi hem hidroliz reaksiyonunda hemde esterifikasyon reaksiyonunda test edilip karşılaştırma yapılmıştır. Lipazın esterifikasyon reaksiyonunda substratı olan değişik tipte yağ asitleri, organik solvent varlığında immobilizasyon ortamına aktif bölgeyi korumak için eklenmiştir. Bu deneylerin sonucunda immobilizasyon sırasında ortama eklenen yağ asidi enzimin hidrolitik ve esterifikasyon aktivitelerini arttırdığı görülmüştür. Immobilizasyon ortamında organik solvent kullanılmasının sebebi kullanılan yağ asitleri bu ortamda çözünür hale gelip istenilen fonksiyonu yerine getirmesi amacıyla kullanılmıştır. Gerçekleştirilen immobilizasyondan sonra yapılan hidroliz reaksiyonunun 5 defa kullanılmasıyla aktivite %100' den %70' e düşmüştür [Ozturk and Kilinc, 2010].

2.5. Stiren-Divinilbenzen Ko-polimeri

2.5.1. Stiren

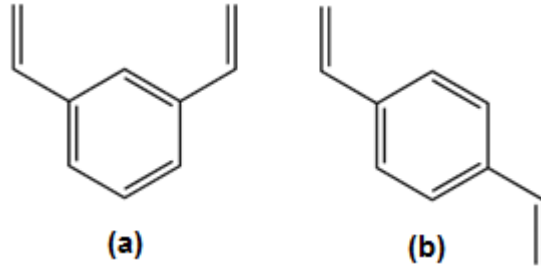
Vinil benzen (Şekil 2.32) olarak da bilinir. Kimyasal formülü $C_6H_5CH=CH_2$ dir. Benzenin bu türevi renksiz ve yağimsı yapıya sahiptir. Kolaylıkla buharlaşabilen yapısı ve buharının kokusu tatlımsıdır. Stiren, çoğu polimer reaksiyonlarında oluşan polistirenin öncü maddesidir [Castor, 2005]. 10 haziran 2011' de Amerika Ulusal Toksikoloji programında bu maddenin kanserojen yapıcı madde olduğu bildirilmiştir [Harris and Gardiner, 2011].



Şekil 2.32: Stiren.

2.5.2. Divinilbenzen

Benzen grubuna bağlı iki tane vinil grubu içeren yapıdır. Stirene bir tane daha vinil grubu eklenmesi ile oluşur. Divinil benzenin molekül şekli aşağıda gösterildiği gibidir (Şekil 2.33) [Robert, 1984].

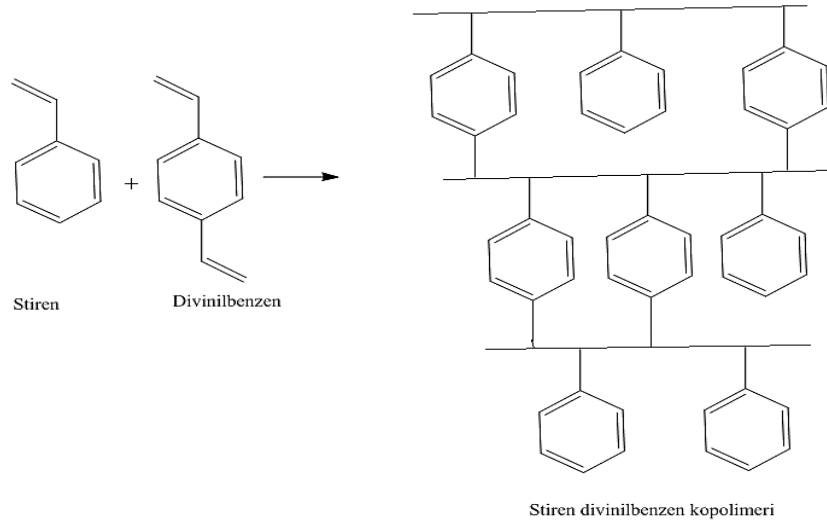


Şekil 2.33: a) meta-divinilbenzen, b) para-divinilbenzen.

2.5.3. Stiren-Divinilbenzen Uygulamaları

Stiren ile divinilbenzen birlikte kullanıldıkları zaman çapraz bağlı polimerler ele geçer (Şekil 2.34). Bu polimerler genellikle iyon değiştirici reçine yapımında yaygın olarak kullanılmaktadırlar [Castor, 2005].

Matheel D. Al-Sabti ve arkadaşlarının stiren ve divinil benzen ile yapmış oldukları çalışmada süspansiyon polimerizasyon tekniği kullanarak makroporoz stiren-divinil benzen kopolimer kürelerini değişik mollerde divinil benzen ve değişik miktarlarda seyreltici kullanarak elde etmişlerdir. Seyrelme miktarlarının farklı olması değişik poroziteli kopolimerlerin elde edilmesini sağlamıştır. Bu elde edilen kopolimerlere sülfonlama yapılarak katyon değiştirici, klorometilasyon yada aminasyon yapılarak anyon değiştirici reçine olarak kullanılmaktadır [Matheel et al., 2007].



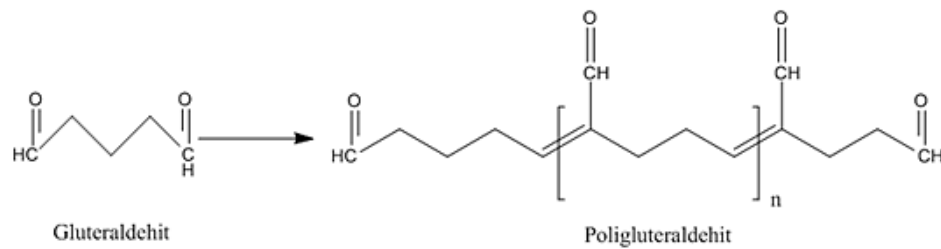
Şekil 2.34: Stiren divinilbenzen kopolimeri oluşumu.

Munir Ahmed ve arkadaşlarıda petrol eteri ve sikloheksanon kullanarak süspansiyon polimerizasyonu ile farklı hacimlerde por büyüklüğü içeren makroporoz stiren-divinilbenzen kopolimer sentezini gerçekleştirmişlerdir. Kopolimerler sulfonlama yapılarak katyon değiştirici reçine haline getirilmiştir. Reçine sentezinde por büyüklüğü 0,3-0,4 ml/ g olan kopolimerler yüksek kapasiteye sahip olan iyon değiştirici olarak kullanılmıştır [Ahmed et al., 2004].

2.5.4. Stiren-Divinilbenzen Poliglutaraldehit Ko-polimeri

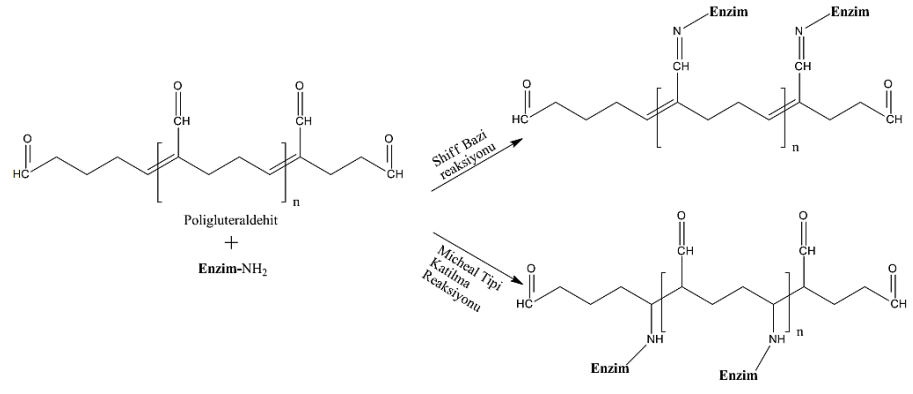
2.5.4.1. Glutaraldehydin Poliglutaraldehyde Dönüşümü

Yağimsı ve renksiz görünümü olan Glutaraldehit genellikle medikal ve diş ekipmanlarının dezenfeksiyonu için kullanılan $\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CHO})_2$ kimyasal formülüne sahip organik bir bileşiktir [Kohlpaintner et al., 2000]. Glutaraldehit depolanırken pH: 3.5' e ayarlanmış çözeltide depolanır. Ortamdaki pH, sıcaklık, konsantrasyon değiştikçe glutaraldehidin kimyasal formu değişime uğramaktadır. pH 3 ile 8 arasında glutaraldehit monomerik ve halkalı hemiasetal formda bulunmaktadır. pH değeri 11'e geldiğinde kendi içinde aldol kondenzasyonu yolu ile polimerleşerek poliglutaraldehidi meydana getirmektedir (Şekil 2.35) [Margel and Rembaum, 1980].



Şekil 2.35: Poliglutaraldehit oluşumu.

Enzim immobilizasyonunda çok noktalı kovalent bağ için üzerinde aldehit ve çift bağ bulunduran poliglutaraldehit formu tercih edilmektedir (Şekil 2.36).



Şekil 2.36: Enzimin kovalent olarak poliglutaraldehide bağlanması.

3. KONUYLA İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Ülkemizde biyokimyasal alanlardaki çalışmaların endüstriye uygulandığı sektörlerin sayısı oldukça azdır. Enzim üretimi ülkemizde olmadığından dolayı bunun uygulamalarının sayısı azınlıktadır. Enzimler katalizör olarak kullanıldığında enerji masrafları ve yan ürün bakımından düşük miktarlara sahiptirler. Yağların hidrolizi için yaygın olarak kullanılan yüksek basınç ve yüksek sıcaklık parametreleri ile kimyasal olarak yağ asidi elde edilmesi, çok fazla enerji maliyeti ve istenmeyen yan ürünlerin oluşması sonucunu doğurmaktadır. Hidroliz için immobilize lipaz kullanıldığında bunun gibi sonuçlar ortadan kaldırılabilir. Tablo 3.1’ de bazı matrikslere immobilize olan lipazlar ve aktiviteleri verilmiştir

Tablo 3.1: Bazı immobilize lipazlar.

Enzim	Matriks	Aktivite (U/g matriks)
<i>Aspergillus niger</i> lipaz	İpek ipliği	59
<i>Bacillus coagulans</i> BTS-3 lipaz	Naylon-6	1.2
<i>Candida clindracea</i> lipaz	Hidrofobik içi boş iplik	35
<i>Mucor miehei</i> lipaz	Makro gözenekli iyon değiştirici reçine	189

Chatterjee ve arkadaşları lipazı glutaraldehit yardımı ile ipek iplikler üzerine kovalent olarak bağlamışlar ve bu enzimi ayçiçek yağının hidrolizinde kullanmışlardır. İki fazlı ortamda hidrolitik aktivitesi düşük olan sistemde, ayçiçek yağı su ile emülsülfiye edilerek aktivitesi arttırılmıştır. Immobilize lipazın hidrolitik aktiviteleri rhamnolipid biosurfactant, triton X100 ve ultrasonikasyon ile sırasıyla 47.73U, 36.11U, 0 U olarak bulunmuştur. Serbest lipaza göre %12 gibi daha düşük aktivite verimine sahip olan immobilize lipaz elde edilmiştir. Immobilize sistemin yağ asidi verimi ikinci, üçüncü ve dördüncü kullanımlarda sırasıyla %49.45, %22.91, %5.09 olarak elde edilmiştir [Chatterjee et al., 2009].

Pahujani ve arkadaşları glutaraldehit ile aktive edilmiş nylon-6 polimerinin lipaz immobilizasyonunda kullanımını, enzimatik olarak karakteristiğini ve stabilitesini test etmişlerdir. Sıcaklık toleranslı *Bacillus coagulans* BTS-3 extrasellüler alkaline lipazı kovalent bağ ile glutaraldehit tarafından aktive edilmiş

nylon-6 üzerine immobilize edilmiştir. Optimum koşullar altında, immobilizasyon nylon-6 üzerine 228µg/g protein yükleme verimine sahip olmuştur. İmmobilize enzim pH 7.5' da ve 55°C' de maksimum aktiviteye sahip olmuştur. İmmobilize enzim 2 saat boyunca 55°C' de orjinal aktivitesinin %88' ini korumuştur ve p-NPP' ın 8 defa hidrolizinden sonra orjinal aktivitesinin %88' ini korumuştur. Ayrıca katalitik aktiviteye organik solventlerinde etkisi çalışılmıştır. N-heptanın aktiviteyi arttırdığı gözlenmiştir. Bu enzimin substrat seçiciliği ise 16 karbondan fazla olan ester bağlarını koparma yönünde eğilimi olduğu ispatlanmıştır [Pahujani et al., 2008].

Mohammad ve arkadaşları mikroporoz polipropilenden yapılan hallow fiber içindeki *Candida cylindracea* lipazı ile 40°C' de zeytin yağını sürekli sistemde hidrolize etmişlerdir. Lipazın yağ ile ıslanmış hollow fibere adsorbe olması kolay olduğu tespit edilmiştir. Enzim ve gliserol çözeltileri sistemden alındıktan ve tampon-gliserol çözeltisi sisteme eklendikten sonra, zeytin yağı hollow fiberin içerisinden sürekli olarak beslenir bu arada fiberlerin dışı %18 oranında tampon çözelti ve gliserol ile doldurulmuştur. Sistem içerisinde enzim miktarı 1-5 mg/ mL olduğunda 14 günlük yarılanma ömrü değişmemiştir. Sisteme 0,05mg/ mL enzim eklendiğinde yarılanma ömrü 6 günden az olduğu gözlenmiştir. 4°C' nin altında ve en az 3 ay boyunca enzim bu sistem içerisinde gliserollü yada gliserolsüz olarak saklanabilmekte olduğu bulunmuştur. Bu sistem 3 kere temizlenip tekrar hidroliz yapıldığında başlangıç aktivitesini korumuştur [Hog et al., 1985].

Lee ve arkadaşları immobilize lipaz kullanarak hindistan cevizi yağının karıştırmalı sistemde hidrolizini ortam koşullarını optimize ederek gerçekleştirmişlerdir. Lipaz olarak *Mucor miehei* immobilize lipazını kullanmışlardır. Optimizasyon için ortamdaki yağın konsantrasyonu, enzim miktarı, su oranı ve sıcaklık parametreleri çalışılmıştır. Hidroliz reaksiyonu 50 ml toplam reaksiyon hacmi kullanılarak solventli ve solventsiz ortamda reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. İlk olarak ortamdaki enzim miktarı 0.2 ile 0.6 g arasında gerçekleştirilmiştir. En yüksek hız 0.5 g enzim ile elde edilmiştir. 0.5 g' dan sonra reaksiyon hızının düşmesi ortama salınan yağ asitlerinin ara yüzeyde engelleyici olduğu düşünülmüştür. İkinci olarak farklı yağ miktarları 20, 40, 60, 80, %98 miktarında çalışılmış, başlangıç reaksiyon hızı %40 miktarında en yüksek aktiviteye ulaşırken reaksiyon uzun süreliğine yapıldığında %60 olan miktar daha fazla aktivite göstermiştir. Bunun açıklamasında ortamda ilk etapta oluşan fazla miktardaki yağ

asitlerinin enzimi bir miktar geçici olarak inhibe ettiği görüşü ortaya atılmıştır. Hidroliz reaksiyonu için ortamdaki su miktarı çok fazla önem taşıdığı görülmektedir. Genellikle bu tür reaksiyonlar organik solvent ortamında gerçekleştirilmekte ve böylece yağ ile su arasındaki etkileşim arttırılmaktadır. Deneyde 1 ile 5 ml arasında su miktarları kullanılarak reaksiyon gerçekleştirilmiş, 4 ml' lik su miktarı eşik değeri olup bunun aşırısında aktivitede düşüş gözlenmektedir. Son olarak reaksiyon hızına sıcaklığın etkisi 30 ile 50 °C arasında çalışılmış, normalde sıcaklık arttıkça reaksiyon hızının artması beklenirken 45 °C' de reaksiyon en yüksek başlangıç hızına ulaşmıştır. Fakat 200 dakikalık reaksiyonla bunların son ürün miktarlarına bakıldığında 40 °C' nin diğerlerine nazaran açık ara önde olduğu görülmüştür. Bu yüzden tekrar deneyleri yapılırken 45°C yerine 40 °C sıcaklıkta yapılmıştır [Chua et al., 2012].

Kulkarni ve Pandit, lipaz katalizli kastor yağının hidrolizini çalışmışlardır. Bu çalışmada solventin, sıcaklığın, pH' ın ve enzim miktarının reaksiyon hızına etkisi incelenmiştir. Eklenen solventin reaksiyon hızını etkilediği gözlemlenmiştir. Hidroliz reaksiyonu 1ml yağ ile 8 ml tampon ile 10 dk boyunca sonikasyon banyosunda muamele edilmiş, daha sonra üzerine 1ml enzim çözeltisi (2mg) pH 7 fosfat tampon çözeltisi eşliğinde eklenmiştir. Belli zaman periyotlarında 20ml etanol karışımıyla reaksiyon durdurulup asit sayısı bakılmış, ortama farklı maddeler eklenmesi ile enzimin aktivitesindeki değişikliğin meydana geldiği görülmüştür. Kullanılan solvent ile suyun oranı 1:4 olacak şekilde kullanılmış olup 3 saatin sonunda solvent kullanmadan %16 lık aktivite gösteren sistem solventle birlikte %46' lık bir verim göstermiştir. İzooktan, n-hekzan, dietileter çözücüler de aynı etkiyi yapmışlardır. Bu yüzden denemelerde izooktan ile çalışılmıştır. Reaksiyon ortamında izooktan kullanılması ortamda oluşan ürünlerin inhibitör etkisinin ortadan kaldırılmasına sebep olmakta ve böylece reaksiyon hızına etkisi olumlu yönde olduğu görülmüştür. İzooktanın 3 saatlik reaksiyon sonunda reaksiyon hızını 2.5 kat arttırdığı gözlenmiştir [Kulkarni and Pandit, 2005].

Sharon ve arkadaşları çeşitli metallerin castor yağının enzimatik hidrolizine etkisini çalışmışlardır. *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 lipazının metal klorürlerle hidroliz reaksiyonu çalışılmış, CaCl_2 haricinde AlCl_3 , CrCl_3 ve MgCl_3 ün hidrolitik aktiviteyi arttırdığı gözlenmiştir. Özellikle Cr^{+3} hidrolitik aktivite olarak kalsiyumdan 4 kat daha etkili, Al^{+3} e göre 1,6 kat daha fazla etkili olduğu görülmüştür. Aktivite için lipaz 10mM potasyum fosfat tampon çözeltisinde 10mM metal iyon klorürleri

ile pH 8' de ham lipaz ile 30°C' de ve 30 dk boyunca muamele edilip hazır hale getirilmiş reaksiyon ortamında ise 0,25g castor yağı, 10ml 10mM potasyum fosfat (pH 8) tampon çözeltisi, hazır hale getirilmiş enzim ve 1ml 0,01M metal klorürü eklenip 30°C' de muamele edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için ortama 15ml etanol:aseton (1:1) karışımı eklenip ve daha sonra 0,1M KOH ile fenol fitalein indikatörlüğünde ortama salınan yağ asidi miktarı tespit edilmiştir. Metallerin hidroliz reaksiyonuna etkisi Tablo 2.2'de gösterilmiştir [Sharon et al., 1998].

Tablo 2.2: Farklı tuzların *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 lipaz aktivitesine etkileri.

Metal klorürler	Aktivite(%)
Kontrol	100
Lityum	89.2
Sodyum	81.5
Potasyum	70
Bakır	77.7
Berilyum	65
Magnezyum	101.5
Kalsiyum	95.6
Srntiyum	79.4
Kadmiyum	72.5
Civa	70.4
Aluminyum	73.3
Kurşun	66.8
Krom	85.7
Mangan	94.7
Femir	80.9
Nikel	80.6

Radhot ve Pandit yaptıkları bir çalışmada castor yağının enzimatik hidrolizinde farklı maddelerin etkisini çalışmışlardır. Özet olarak 35-40°C' de ve yağ:su, 3:1 oranı ile hidroliz çalışması gerçekleştirilmiştir. Ayrıca ortama eklenen solvent ve değişik tipte tuzların reaksiyon hızını arttırdığı görülmüştür. Ortamdaki gliserolün yağ hidrolizine etkisi olmadığı bulunmuştur. Kastor yağının hidrolizi için 200 mM, pH 7 fosfat tampon çözeltisi ile reaksiyon yapılmıştır. Reaksiyon sonunda sistem santrifüj edilip yağ ve su fazı birbirinden ayrılmıştır. Enzim miktarının etkisini bulmak için farklı konsantrasyonlarda enzimler ile aynı şartlarda reaksiyon yapılarak sonuçlar elde edilmiştir. 15g kastor yağı üzerine 5ml konsantrasyonu

bilinen enzim eklenmiş ve yağ:tampon çözelti oranı 3:1 olarak belirlenip, reaksiyon 1 saat süresince devam etmiştir. Her 15 dk da bir numune alınarak yağ asidi miktarı test edilmiştir. Yağların hidrolizinde ortama eklenen solvent ortamdaki yağın çözünmesini sağlamakta böylece ara yüzey aktivasyonu en aza indirilmiş olmaktadır. Solvent olarak kısa zincirli, izooktan, hekzan çalışılmış olup hidrolitik aktivitede artış gözlenmiştir. Ortama eklenen gliserolün etkisinde çalışılmış fakat aktivitede bir artış gözlenmemiştir [Rathod and Pandit, 2009].

Fernandez ve arkadaşları, balık yağının poröz yüzeye immobilize edilmiş lipaz enzimi yardımıyla hidrolizini çalışmışlardır. Bu çalışmada amaç omega 3 yağ asitlerinin [eikosapentaenik asit (EPA) ve dokosaheksanik asit (DHA)] immobilize lipazın balık yağını hidrolize etmesiyle ortama salınımını çalışmışlardır. Hidrolizasyon reaksiyonu 2 fazlı sistem yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada *Rhizomucor miehei* lipazının (RML) oktil-sepharoz üzerine immobilizasyonu optimize edilmiştir. Standart reaksiyon koşulları ise organik fazının içerisinde 3 birim sikloheksan ve 7 birim yağ bulunmakta, su fazında ise 10mM pH 7 tris tampon çözeltisi içerisinde 50mM metil siklo dekstrin çözünmüş halde bulunmaktadır. Tüm reaksiyonlar 25°C’ de yapılmıştır. Ayrıca 3 farklı lipaz [*Candida antarctica* lipaz B (CalB), (TLL), (RML)] kullanılmış ve bunların türevlerinin daha aktif olduğu görülmüştür. Oleik ve palmitik yağ asitlerine göre çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) bakımından CALB çok aktif ve seçici olduğu diğer bir taraftan DHA’ ya göre EPA’nın üretilmesinde TLL ve RML türevleri daha seçici olduğu gözlenmiştir [Fernandez et al., 2011].

4. MATERİYAL VE METOT

4.1. Materyal

4.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Deneylerde kullanılan kimyasallar Tablo 4.1’ de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Deneylerde kullanılan kimyasallar.

Kimyasal Adı	Firma	Katalog No
Lipaz (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	Sigma	L0777.250
Divinil benzen	Merck	803598
C. Brilliant Blue R-250 Staining Solutions	BIO-RAD	161-0435EDU
Stiren	Baker	82.572.500
Span 80	Fluka	85548
Glutaraldehit	Merck	8.206.031.000
Potasyum persülfat	Sigma-Aldrich	7727-21-1
Hidroklorik asit	Merck	1.003.172.500
Sodyum hidroksit	Fluka	71692
Sodyum azid	Merck	1.066.880.250
Hekzan	Merck	1.043.682.500
Etil asetat	Merck	82.222.772.500
Asetik asit	Merck	100.056
Sodyum klorür	Sigma-Aldrich	7647-14-5
Kalsiyum klorür	Sigma-Aldrich	10043-52-4
Magnezyum klorür	Sigma-Aldrich	7786-30-3
Alüminyum klorür	Sigma-Aldrich	7446-70-0
Polietilen glikol 2000	Sigma-Aldrich	25322-68-3
Ayçiçek yağı	Kırlangıç (AS:0)	-
Zeytin Yağı	Komili (AS:4.5)	-
Mısır Yağı	Kırlangıç (AS:2.3)	-

4.1.2. Kullanılan Enzim

Çalışmada ticari bir enzim olan *Thermomyces lanuginosa* lipaz kullanılmıştır. Aktivite birimi (IU), kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (5 ml, 50mM , pH: 6.0) 30g ayçiçeği yağından 50°C’ de 1 dakikada 1µmol yağ asidi oluşturan enzim miktarı olarak tanımlandı. Enzimin spesifik aktivitesi 128 IU/mg protein olarak hesaplandı.

4.1.3. Kullanılan Aletler

Deneylerde kullanılan aletler Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: Deneylerde kullanılan araç ve gereçler.

ARAÇ VE GEREÇLER	MARKA	MODEL
pH metre	WTW	Inolab 8F93
Magnetik karıştırıcı	Heidolph	MR3004
İnce tabaka kromatografi ısıtıcısı	CAMAG	Heater 3
Hassas terazi	Sartorius	Basic
Peristaltik pompa	WATSON MARLOW	101U/R
Otomatik pipet (1000µL)	Eppendorf	R311165
Otomatik pipet (5000µL)	Eppendorf	R311173
Otomatik pipet (10µL)	Eppendorf	R311149
Otomatik pipet (200µL)	Eppendorf	R311157
Çelik kolon	---	---
Poliüretan esnek borular	---	Poliüretan
Otomatik titratör	ISOLAB	007.01.001
Mikro şırınga	Hamilton	7002KH
İnce tabaka kromatografi plakası	Whatman	K5

4.2. Metot

4.2.1. Aktivite Tayini

0.5g immobilize lipaz, 60°C’ de 30g ayçiçek yağı ile kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (5 ml, 25mM, pH: 5.0) su banyosu (140 rpm) kullanılarak 30dk muamele edildi. Oluşan yağ asidi miktarı asit sayısı tayin metodu ile belirlendi.

4.2.2. Asit Sayısı Tayini

Asit sayısı tayin edilecek numune (0.5 g) izopropil alkolde (10 mL) çözülerek üzerine fenolftalein indikatörü (2 damla) ilave edilir ve etanolde hazırlanan potasyum hidroksit (0.1 M) çözeltisiyle ortamın rengi pembe olana kadar titre edilir. Asit sayısı (AS), 1 g numunede bulunan yağ asitlerini nötralleştirmek için gerekli olan KOH miktarı (mg) olarak tanımlanmaktadır. Titrasyonda tüketilen potasyum hidroksit

(0.1 M) miktarı, Vs (ml) olduğunda asit sayısı (AS) aşağıdaki denklem (4.1) kullanılarak bulunabilir.

$$\frac{Vs(ml) \times Ma(KOH) \times [KOH]}{numune(g)} \quad (4.1)$$

4.2.3. Deneylerde Kullanılan Yağların Nötralizasyonu

Zeytin (AS: 4.5) ve mısır yağlarında (AS:2.3) bulunan serbest yağ asitleri sodyum hidroksit çözeltisi kullanılarak nötralize edildi. 200g zeytin yağı NaOH çözeltisiyle (1.3 NaOH, 1 ml saf suda çözülür) 60°C de 1 saat muamele edildi. Nötralizasyon sonunda oluşan sabun oda sıcaklığında kaba filtre kağıdından süzülerek asit sayısı 0 olan 160 gr yağ elde edildi. Aynı nötralizasyon işlemleri, 200 g mısır yağının 1ml suda çözünen 0.7 g NaOH le muamelesiyle gerçekleştirildi ve asit sayısı 0 olan 180 gr yağ elde edildi.

4.2.4. İmmobilizasyon Matriksinin Hazırlanması

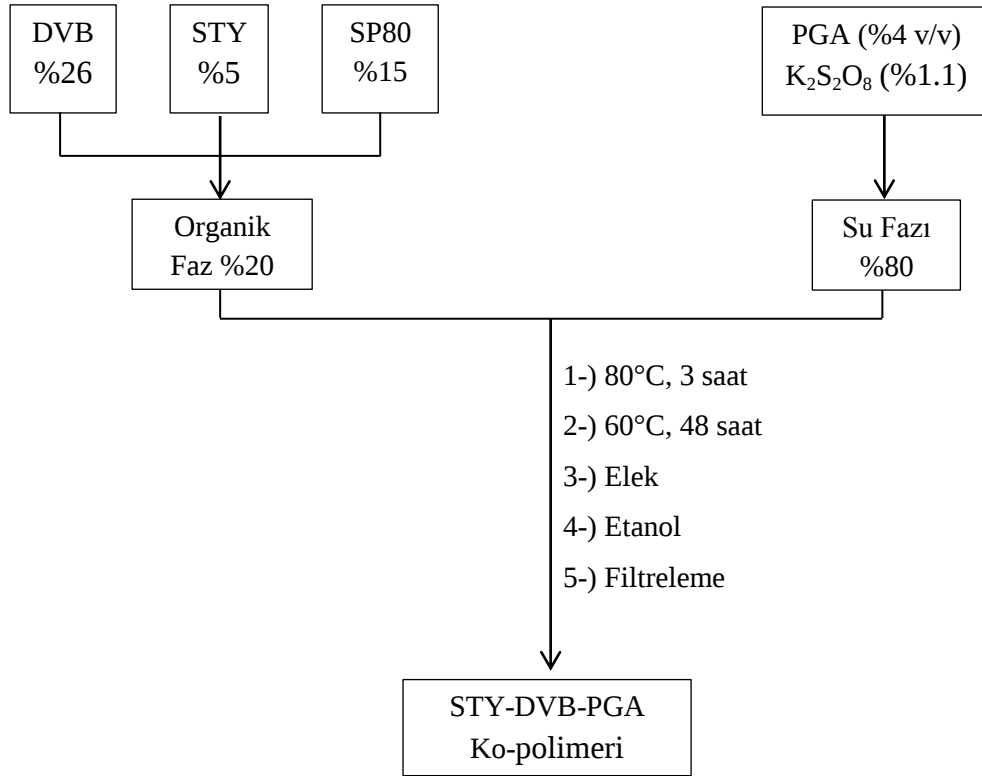
4.2.4.1. Poliglutaraldehydin Hazırlanması

Glutaraldehyt (40 ml, %4 v/v) çözeltisinin pH' ı NaOH (0.1M) kullanılarak 11' e getirildi ve oda sıcaklığında (23°C) 30 dakika bir manyetik karıştırıcı kullanılarak (600 rpm) polimerleşme gerçekleştirildi.

4.2.4.2. STY-DVB-PGA Ko-polimerinin Hazırlanması

Ko-polimerin üretilmesi için gerekli olan reaktifler iki ayrı fazda (organik ve sulu) hazırlandı. Organik faz %59 stiren (ST) (v/v), %26 Divinilbenzen (DVB) (v/v) ve %15 Span80 (SP80) (v/v) içermektedir. Sulu faz ise poliglutaraldehyt çözeltisine konsantrasyonu %1,1 (w/v) olacak şekilde potasyum persülfat ilavesiyle elde edildi. Polimer sentezi için organik (10 mL) ve sulu faz (40 mL) bir falkon tüpünde vortex kullanılarak karıştırıldı ve etüvde ilk olarak 3 saat 80°C' de sonra 48 saat 60°C' de tutuldu. Sentezlenen polimer rende yardımıyla toz haline getirilip

elekten (1mm²) geçirildi ve etanol (%96, 1/20 matriks/etanol) ile yıkanarak reaksiyona girmeden kalan monomerler uzaklaştırıldı. Ko-polimerin hazırlanışı Şekil 4.1' de şematik olarak gösterilmiştir.

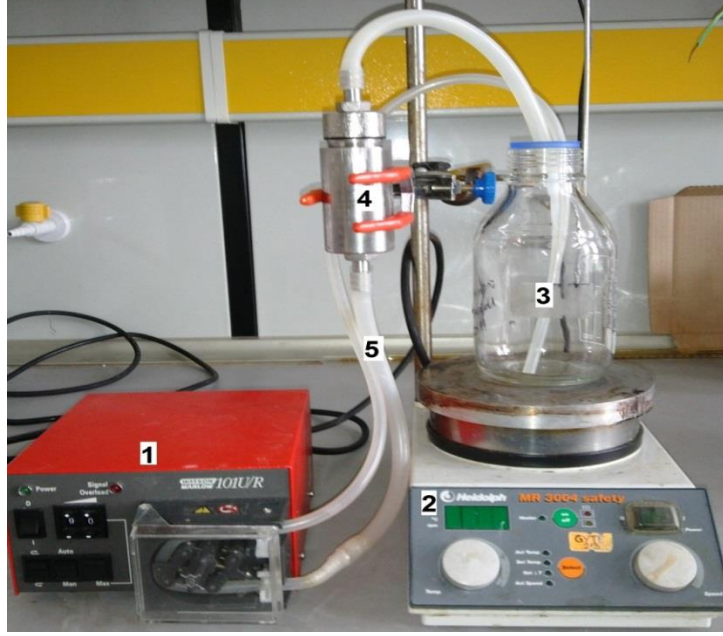


Şekil 4.1: STY-DVB-PGA kopolimerinin hazırlanması.

4.2.5. Kolon Sistemi Kullanılarak Optimum Şartlarda TLL İmmobilizasyonu

Ca(Ac)₂ çözeltisinde (100ml, 25mM, pH:6) bulunan serbest enzimle (1.2ml, 24.72mg) PEG (2.5g/L) oda sıcaklığında (23°C) manyetik karıştırıcı (200 rpm) kullanılarak 15dk muamele edildi. Bu enzim çözeltisi peristaltik pompa kullanılarak (30 ml/dk) içinde toz STY-DVB-PGA kopolimeri (1.5g, 1cm elek) bulunan çelik kolon (çap: 3cm, boy: 7cm) içinde 2 saat sirküle edildi. Daha sonra enzim çözeltisine PGA (50ml, %8 v/v) eklenerek sirkülasyona 45 dakika devam edildi. İmmobilize olan enzim kolonda Ca(Ac)₂ tampon çözeltisiyle (150ml, 25mM, pH:6) yıkandı ve sonra vakumlu huni yardımıyla süzüldü.

İmmobilizasyon sistemi, çelik kolon (çap: 3cm, yükseklik: 7cm), peristaltik pompa, manyetik karıştırıcı, besleme tankı ve silikon hortumlardan oluşmaktadır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: 1) Peristaltik pompa, 2) Manyetik karıştırıcı, 3) Besleme tankı, 4) İmmobilizasyon kolonu, 5) Bağlantı hortumları

4.2.6. STY-DVB-PGA Ko-polimerine Enzim İmmobilizasyon Optimizasyonu

Enzim immobilizasyonu için matriks miktarları (1.0-4.0g), tampon çözelti konsantrasyonları (15-65mM), tampon çözelti pH' ları (4.0-9.0), immobilizasyon süresi (30-240dk), PGA (%8 v/v, 50 ml) muamele süresi (30-120dk), serbest enzim miktarı (0.7-1.3ml), PEG (1.0-3.0g/L) konsantrasyonu ve PEG muamele süreleri (10-90 dak.) ayrıntılı olarak çalışıldı. Çalışmalarda immobilizasyon ve aktivite verimleri hesaplanarak optimum şartlar belirlendi.

4.2.6.1. Matriks Miktarı

Ca(Ac)₂ tampon çözeltisi (25mM, pH:6.0, 100ml) içerisinde serbest enzim (0.75ml, 15.45mg), peristaltik pompa yardımı ile içinde immobilizasyon matriksi (1.0-4.0g) bulunan kolon içinde 2 saat boyunca sirküle edildi. İmmobilize enzim, Ca(Ac)₂ tampon çözeltisiyle (25mM, pH:6.0, 150ml) peristaltik pompa yardımıyla

temizlendikten (30dk) sonra vakumlu huni yardımıyla vakum altında suyu uzaklaştırıldı. Süzüntüde protein analizi yapıldı ve enzim aktiviteleri aktivite tayin metodu kullanılarak bulundu.

4.2.6.2. pH

Farklı pH' lardaki [(4.0-6.0) $\text{Ca}(\text{Ac})_2$, (6.0-9.0) NaH_2PO_4] tampon çözeltileri (25mM, 100ml) içerisinde serbest enzim (0.75ml, 15.45mg), peristaltik pompa yardımı ile 1.5 g immobilizasyon matriksi içeren kolon içinde 2 saat boyunca sirküle edildi. İmmobilize enzim $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltisiyle (25mM, pH:6.0, 150ml) peristaltik pompa kullanılarak temizlendikten (30dk) sonra vakumlu huni yardımıyla vakum altında suyu uzaklaştırıldı. Süzüntüde protein analizi yapıldı ve enzim aktiviteleri aktivite tayin metodu kullanılarak bulundu.

4.2.6.3. Tampon Çözelti Konsantrasyonu

0.75 ml enzim ihtiva eden farklı konsantrasyonlardaki (15-65mM) $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltileri (pH:6.0, 100 ml), peristaltik pompa yardımı ile 1.5 gr immobilizasyon matriksi içeren kolon içinde 2 saat sirküle edildi. İmmobilize enzim, $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltisiyle (25mM, pH:6.0, 150ml) peristaltik pompa kullanılarak temizlendikten (30dk) sonra vakumlu huni yardımıyla vakum altında suyu uzaklaştırıldı. Süzüntüde protein analizi yapıldı ve enzim aktiviteleri aktivite tayin metodu kullanılarak bulundu.

4.2.6.4. Süre

0.75 ml serbest enzim içeren $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltisi (25mM, pH:6.0, 100ml), peristaltik pompa kullanılarak 1.5 gr immobilizasyon matriksi ihtiva eden kolon içinde farklı sürelerde (30-240dk) sirküle edildi. İmmobilize enzim, $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltisiyle (25mM, pH:6.0, 150ml) peristaltik pompa yardımıyla temizlendikten (30dk) sonra vakumlu huni yardımıyla vakum altında suyu uzaklaştırıldı. Süzüntüde protein analizi yapıldı ve enzim aktiviteleri aktivite tayin metodu kullanılarak bulundu.

4.2.6.5. İmmobilize Olan Serbest Enzim Miktarının ve Aktivitenin Arttırılması

4.2.6.5.1. Enzim Miktarı

(0.7-1.3 ml) serbest enzim içeren $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltileri (25mM, pH:6.0, 100ml) peristaltik pompa kullanılarak 1.5 gr immobilizasyon matriksi içeren kolon içinde 2 saat sirküle edildi. Tampon çözeltilere PGA (50ml, %8) eklenerek sirkülasyona 45 dk daha devam edildi. İmmobilize enzim, $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltisiyle (25mM, pH:6.0, 150ml) peristaltik pompa yardımıyla temizlendikten (30dk) sonra vakumlu huni yardımıyla vakum altında suyu uzaklaştırıldı. Süzüntüde protein analizi yapıldı ve enzim aktiviteleri aktivite tayin metodu kullanılarak bulundu.

4.2.6.5.2. PGA Muamele Süresi

1.2 ml serbest enzim içeren $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltisi (25mM, pH:6.0, 100ml) peristaltik pompa yardımı ile 1.5 gr immobilizasyon matriksi ihtiva eden kolon içinde 2 saat sirküle edildi. Tampon çözeltiye PGA (50ml, %8) eklenerek sirkülasyona farklı sürelerde (30-120dk) devam edildi. İmmobilize enzim, $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltisiyle (25mM, pH:6.0, 150ml) peristaltik pompa yardımıyla temizlendikten (30dk) sonra vakumlu huni yardımıyla vakum altında suyu uzaklaştırıldı. Süzüntüde protein analizi yapıldı ve enzim aktiviteleri aktivite tayin metodu kullanılarak bulundu.

4.2.6.5.3. PEG Miktarı

1.2 ml serbest enzim içeren $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltisi (25mM, pH:6.0, 100ml) farklı miktarlarda (1.0-2.5g/L) polietilen glikol (PEG 2000) ile 15dk muamele edildikten sonra, peristaltik pompa yardımı ile 1.5 gr immobilizasyon matriksi ihtiva eden kolon içinde 2 saat sirküle edildi. Tampon çözeltiye PGA (50ml, %8) eklenerek sirkülasyona 45dk devam edildi. İmmobilize enzim, $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltisiyle (25mM, pH:6.0, 150ml) peristaltik pompa yardımıyla temizlendikten (30dk) sonra

vakumlu huni yardımıyla vakum altında suyu uzaklaştırıldı. Süzüntüde protein analizi yapıldı ve enzim aktiviteleri aktivite tayin metodu kullanılarak bulundu.

4.2.6.5.4. PEG Muamele Süresi

1.2 ml serbest enzim ihtiva eden $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltisi (25mM, pH:6.0, 100ml) 2.5g/L polietilen glikol (PEG 2000) ile farklı sürelerde (10-90dk) muamele edildikten sonra, peristaltik pompa yardımı ile 1.5 gr immobilizasyon matriksi içeren kolon içinde 2 saat sirküle edildi. Tampon çözeltiye PGA (50ml, %8) eklenerek sirkülasyona 45dk daha devam edildi. İmmobilize enzim, $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltisiyle (25mM, pH:6.0, 150ml) peristaltik pompa yardımıyla temizlendikten (30dk) sonra vakumlu huni yardımıyla vakum altında suyu uzaklaştırıldı. Süzüntüde protein analizi yapıldı ve enzim aktiviteleri aktivite tayin metodu kullanılarak bulundu.

4.2.7. Zeytin, Mısır ve Ayçiçek Yağlarının Hidrolizi

Ayçiçek, zeytin ve mısır yağları (30 g) kalsiyum asetat tampon çözeltisi (pH 5, 5ml, 25mM) içinde serbest enzimle (0.4ml, 8.2mg), su banyosunda (60°C, 140 rpm) 30 dakika muamele edildi. Bu süre sonunda oluşan yağ asidi miktarları belirlendi.

4.2.8. Serbest ve İmmobilize Enzimin Hidroliz Reaksiyonu Optimizasyonu

Ticari olarak satın alınan serbest ve immobilize edilen enzimlerin optimum hidroliz şartlarının belirlenmesinde, tampon çözelti pH'ı (4-9), tampon çözelti konsantrasyonu (15-200 mM) , tampon çözelti miktarı (1-30 ml) ve sıcaklık (30-70 °C) parametreleri çalışıldı. Reaksiyon sonunda karışımdan 0.5g örnek alınarak izopropil alkol içerisinde çözülerek asit sayısı tayin metodu ile asit sayıları bulundu.

4.2.8.1. pH

Farklı pH'lardaki [(4.0-6.0) $\text{Ca}(\text{Ac})_2$, (6.0-9.0) NaH_2PO_4] tampon çözeltileri (25mM, 5 ml) içinde bulunan 30 gr ayçiçek yağı, 0.4ml (8.2mg) serbest enzim veya

0.5 gr immobilize enzimle su banyosunda (60°C, 140 rpm) 30dk muamele edildi ve oluşan yağ asitleri tayin edildi.

4.2.8.2. Tampon Çözelti Konsantrasyonu

Farklı konsantrasyonlardaki (15-200mM) $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltilerinin [(5ml, pH 6.0 (serbest enzim için), pH 5.0 (immobilize enzim için)] içinde bulunan 30g ayçiçek yağı, 0.4ml (8.2mg) serbest enzim veya 0.5 gr immobilize enzimle su banyosunda (60°C, 140 rpm) 30dk muamele edildi ve oluşan yağ asitleri tayin edildi.

4.2.8.3. Tampon Çözelti Miktarı

Farklı miktarlarda (1-30ml) $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltilerinin [(25mM, pH 6.0 (serbest enzim için), pH 5.0 (immobilize enzim için)] içinde bulunan 30 g ayçiçek yağı, 0.4ml (8.2mg) serbest enzim veya 0.5 gr immobilize enzimle su banyosunda (60°C, 140 rpm) 30dk muamele edildi ve oluşan yağ asitleri tayin edildi.

4.2.8.4. Sıcaklık

$\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltisinde [(25mM, 5ml, pH 6.0 (serbest enzim için), pH 5.0 (immobilize enzim için)] bulunan 30 g ayçiçeği yağı, 0.4ml (8.2mg) serbest enzim veya 0.5 gr immobilize enzimle su banyosunda (140 rpm) farklı sıcaklıklarda (30-70°C) 30dk muamele edildi ve oluşan yağ asitleri tayin edildi.

4.2.9. Organik Çözücü ve Tuzların Hidrolitik Aktiviteye Etkisi

Optimum şartlar belirlendikten sonra, organik çözücü ve çeşitli tuzların hidroliz reaksiyonuna etkileri araştırıldı. $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltisinde (25mM, 5ml, pH 5.0) bulunan 30g ayçiçek yağı 0.5 gr immobilize enzimle su banyosunda (140rpm) ortama farklı miktarlarda organik çözücüler [heptan, hekzan (0.25-4 ml)] ve tuzlar (NaCl , MgCl_2 , CaCl_2 (1-100mM)) eklenerek 30 dk muamele edildi ve oluşan yağ asitleri tayin edildi.

4.2.10. Yağ Hidrolizine Sürenin Etkisi

0.5g immobilize enzim $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltisi (5 ml, pH: 5.0, 25mM) içinde 30 g ayçiçeği yağıyla farklı sürelerde (10-50dk) reaksiyona sokuldu ve oluşan yağ asitleri tayin edildi.

4.2.11. Sürekli Kullanım ve Depolama Kararlılığı

Sürekli kullanım kararlılığı, immobilize enzimin aktivitesinin 20 kez aktivite tayin metodu kullanılarak ölçülmesiyle belirlendi. Her bir kullanımdan sonra immobilize enzim $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltisiyle (25mM, pH:5, 30ml) yıkandı. Depolama kararlılığı ise, 30 gün süresince hergün aktivitenin aktivite tayin metoduyla bulunmasıyla belirlendi. Depolama kararlılığı süresince immobilize enzim 4°C' de buzdolabında saklandı.

4.2.12. Kantitatif Protein Tayini

Protein miktar tayinleri için Bradford metodu kullanıldı [Bradford, 1976]. Standart protein olarak sığır albumini (BSA) kullanıldı. Bu proteinin farklı konsantrasyonlarda (0-0.6mg/ml) çözeltileri hazırlandı ve mikropipet kullanılarak mikroluka üzerine 10 μL damlatıldı. Üzerine beş kat seyreltilen boya çözeltisi (Coomassie brilliant blue) (200 μL) ilave edilerek 10 dakika bekletildi ve 595 nm' de absorbanslar UV cihazıyla (BIO-RAD Model 3550-UV) ölçüldü. Bulunan değerler kullanılarak protein standart grafiği oluşturuldu. İmmobilizasyonda kullanılan lipaz çözeltisi ve immobilizasyon süzüntülerinde bulunan protein miktarları, bu örneklerin (10 μL) yukarda anlatılan şekilde Coomassie brilliant blue ile muamelesi sonrasında absorbansların ölçülmesi ve standart grafiğinin kullanılmasıyla tayin edildi.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında *Thermomyces lanuginosa* lipaz, STY-DVB-PGA kopolimeri üzerine başarılı bir şekilde immobilize edildi ve ayçiçek yağının hidrolizinde başarıyla kullanıldı. Serbest enzimle yapılan yağ (zeytin, mısır ve ayçiçeği) hidroliz deneylerinde, en yüksek yağ hidrolizi ayçiçeği yağında gerçekleştiği için serbest ve immobilize enzim kullanılan optimizasyon çalışmalarında bu yağ kullanıldı. Geliştirilen immobilizasyon metoduyla, aktivite ve immobilizasyon verimleri sırasıyla %85.6 ve %100 olarak elde edildi. Immobilizasyon ve aktivite verim tanımları Denklem (5.1) ve Denklem (5.2)' de gösterilmiştir. Denklemlerde, A: Immobilizasyonda kullanılan protein miktarını, B: Süzüntü protein miktarını, C: Immobilize lipaz aktivitesini, D: Serbest lipaz aktivitesini, E: Süzüntü lipaz aktivitesini göstermektedir.

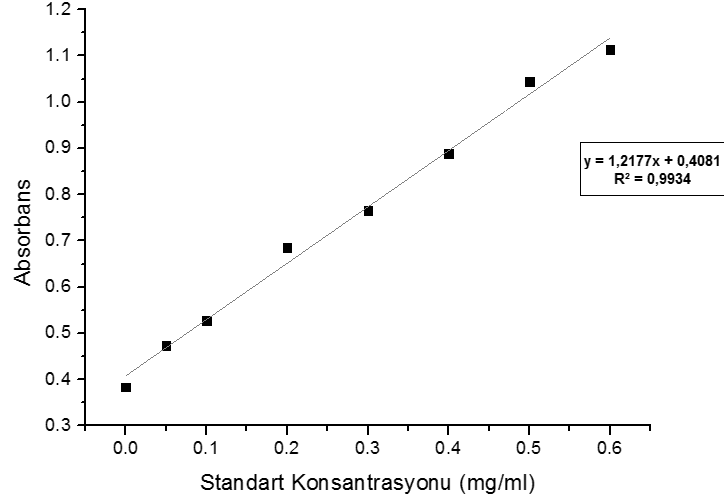
$$\% \text{ Immobilizasyon Verimi: } \frac{A - E}{A} \times 100 \quad (5.1)$$

$$\% \text{ Aktivite verimi: } \frac{C}{D - E} \times 100 \quad (5.2)$$

Geliştirilen immobilizasyon metoduyla, 1g polimer başına 16.5 mg protein immobilize edildi. Elde edilen immobilize enzimin yağ hidrolizinde kullanılabileceği, enzimin sürekli kullanım ve depolama kararlılıklarının olduğu gösterildi.

5.1. Protein Standart Grafiğinin Oluşturulması

Deneyde standart protein olarak sığır serum albümini (BSA) (0.05-0.6 mg/ml) kullanıldı. Elde edilen standart grafik Şekil 5.1' de gösterilmiştir.



Şekil 5.1: Kantitatif protein tayininde kullanılan standart grafiği.

5.2. TLL 'nin STY-DVB-PGA Ko-polimeri Üzerine İmmobilizasyon Optimizasyonu

5.2.1. Matriks miktarı

Farklı matriks miktarlarıyla gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu elde edilen değerler Tablo 5.1' de gösterilmiştir.

Tablo 5.1: Matriks miktarının enzim immobilizasyonuna etkisi.

STY-DVB-PGA MİKTARI (g)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzimin aktivitesi (IU)	Süzüntüdeki protein miktarı (mg)
1.0	67.0	43.2	305.1	5.1
1.5	100.0	72.1	760.9	0.0
2.0	100.0	71.2	750.9	0.0
2.5	100.0	70.5	743.8	0.0
3.0	100.0	70.2	740.2	0.0
3.5	100.0	69.5	732.8	0.0
4.0	100.0	69.3	731.3	0.0

Elde edilen sonuçlara göre matriks miktarı 1.5 gram olduğunda kullanılan serbest enzimin tamamı matrikse bağlanmış ve immobilizasyon verimi %100 olarak bulunmuştur.

5.2.2. pH

Farklı pH’ da gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu elde edilen değerler Tablo 5.2’ de sunulmuştur.

Tablo 5.2: pH’ ın enzim immobilizasyonuna etkisi.

pH	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzimin aktivitesi (IU)	Süzüntüdeki protein miktarı (mg)
4.0	70.2	61.1	452.6	4.6
5.0	79.9	64.0	539.9	3.1
6.0	100.0	72.1	760.9	0.0
7.0	70.9	45.3	338.6	4.5
8.0	58.6	26.8	165.7	6.4
9.0	54.0	16.9	96.2	7.1

pH 6’ da gerçekleştirilen immobilizasyonda serbest enzimin tamamı matrikse bağlanmaktadır.

5.2.3. Tampon Çözelti Konsantrasyonu

Farklı tampon çözelti konsantrasyonlarında gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu elde edilen değerler Tablo 5.3’ de sunulmuştur.

Tablo 5.3: Tampon çözelti konsantrasyonunun enzim immobilizasyonuna etkisi.

Tampon çözelti konsantrasyonu (mM)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzimin aktivitesi (IU)	Süzüntüdeki protein miktarı (mg)
15	75.4	49.4	392.9	3.8
25	100.0	72.1	760.6	0.0
35	100.0	72.1	760.6	0.0
45	100.0	71.6	755.6	0.0
55	100.0	71.1	750.2	0.0
65	100.0	71.4	753.8	0.0

Elde edilen sonuçlara göre immobilizasyonda kullanılan 25mM tampon çözelti serbest enzimin tamamının matrikse bağlanmasını ve immobilizasyon veriminin %100 olarak elde edilmesini sağlamaktadır.

5.2.4. Süre

Sürenin immobilizasyona etkisi Tablo 5.4' de gösterilmiştir.

Tablo 5.4: İmmobilizasyon süresinin enzim immobilizasyonuna etkisi.

Süre (dakika)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzimin aktivitesi (IU)	Süzüntüdeki protein miktarı (mg)
30	52.8	14.1	78.4	7.3
60	66.3	36.2	253.0	5.2
90	79.3	55.6	465.1	3.2
120	100.0	72.1	760.9	0.0
180	100.0	71.4	753.8	0.0
240	100.0	71.8	757.4	0.0

Elde edilen sonuçlara göre 120 dakikalık immobilizasyon süresi serbest enzimin tamamının matrikse bağlanmasını ve immobilizasyon veriminin %100 olarak elde edilmesini sağlamaktadır.

5.3. İmmobilize Olan Serbest Enzim Miktarı ve Aktivitenin Arttırılması

5.3.1. Enzim miktarı

İlk olarak 10.3 mg protein/ g matriks ve %100 immobilizasyon verimi olarak elde edilen immobilizasyon şartlarına ek olarak immobilize edilen enzim miktarını arttırmak için PGA [50 ml, %8 (v/v)] kullanıldığında elde edilen sonuçlar Tablo 5.5' de gösterilmiştir.

Tablo 5.5: PGA muamelesinin enzim immobilizasyonuna etkisi.

Enzim miktarı (ml)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzimin aktivitesi (IU)	Süzüntüdeki protein miktarı (mg)
0.7	100.0	57.4	605.9	0.0
0.8	100.0	57.6	607.7	0.0
0.9	100.0	57.9	611.2	0.0
1.0	100.0	58.1	613.0	0.0
1.1	100.0	58.4	616.6	0.0
1.2	100.0	74.0	780.5	0.0
1.3	97.5	58.2	598.8	1.9

Elde edilen sonuçlara göre 1.2ml (24.72mg) enzim, %100 immobilizasyon verimiyle matrikse kovalent olarak bağlanmaktadır.

5.3.2. PGA Muamele Süresi

PGA [50 ml, %8 (v/v)] muamele süresinin immobilizasyona etkileri Tablo 5.6.' da gösterilmiştir.

Tablo 5.6: PGA muamele süresinin enzim immobilizasyonuna etkisi.

Süre (dakika)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzimin aktivitesi (IU)	Süzüntüdeki protein miktarı (mg)
30	81.4	25.3	217.4	4.6
45	100.0	73.3	773.4	0.0
60	100.0	72.1	760.9	0.0
90	100.0	72.1	761.1	0.0
120	100.0	71.3	752.0	0.0

45 dakikalık PGA muamelesiyle kullanılan serbest enzimin tamamı kovalent olarak matrikse bağlanmıştır.

5.3.3. PEG miktarı

PGA muamelesiyle matrikse bağlanan enzim miktarının artırılmasının yanında PGA' nın enzimin aktivitesini olumsuz yönde etkilediği görüldü. Bu etkiyi en aza indirmek için enzim, immobilizasyondan önce polietilen glikol'le (PEG 2000) muamele edildikten sonra immobilizasyon gerçekleştirildi. Tablo 5.7' de farklı miktarlarda PEG' in immobilize enzim aktivitesine etkisi gösterilmiştir.

Tablo 5.7: PEG' in enzim immobilizasyonuna etkisi.

PEG miktarı (g/L)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzimin aktivitesi (IU)	Süzüntüdeki protein miktarı (mg)
0.0	100.0	73.5	775.2	0.0
1.0	100.0	74.0	780.5	0.0
1.3	100.0	75.3	794.8	0.0
1.5	100.0	79.0	834.0	0.0
2.0	100.0	81.4	858.9	0.0
2.5	100.0	85.8	905.3	0.0
3.0	100.0	85.7	904.4	0.0

Sonuçlardanda anlaşılabacağı gibi 2.5g/L PEG miktarı ile %73.5 olan aktivite verimi %85.8' e çıkarılmıştır.

5.3.4. PEG muamele süresi

Serbest enzimin farklı sürelerde PEG ile muamelesi sonucu elde edilen sonuçlar Tablo 5.8' de gösterilmiştir.

Tablo 5.8: PEG muamele süresinin aktivite verimine etkisi

PEG muamele süresi(dk)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzimin aktivitesi (IU)	Süzüntüdeki protein miktarı (mg)
10.0	100.0	71.1	750.2	0.0
15.0	100.0	85.6	903.5	0.0
30.0	100.0	85.8	905.3	0.0
45.0	100.0	84.6	892.8	0.0
60.0	100.0	85.3	899.9	0.0
90.0	100.0	83.9	885.7	0.0

PEG' in enzimle 15 dakika muamelesiyle en yüksek aktivite verimi (%85.8) elde edilmiştir.

5.4. Zeytin, Mısır ve Ayçiçek Yağlarının Hidrolizi

Satın alınan zeytin ve mısır yağları serbest yağ asitleri ihtiva ettiği için kullanılmadan önce nötralle edildiler (Tablo 5.9).

Tablo 5.9: Zeytin ve mısır yağlarının nötralizasyonu

Yağ	Başlangıçtaki Asit Sayısı	Nötralizasyon Sonrası Asit Sayısı
Zeytin	4.5	0.0
Mısır	2.3	0.0

Serbest yağ asitleri ihtiva etmeyen zeytin, mısır ve ayçiçek yağlarının serbest lipazla gerçekleştirilen hidrolizi sonucu elde edilen asit sayıları Tablo 5.10' da gösterilmiştir.

Tablo 5.10: Değişik yağların serbest lipazla hidrolizi.

Yağ	Asit Sayısı
Zeytin	46.1
Mısır	50.6
Ayçiçek	59.1

Çizelgeden görüldüğü gibi en iyi sonuç ayçiçeği yağı kullanılarak elde edildiğinden optimizasyon çalışmalarında yalnız bu yağ kullanıldı.

5.5. Serbest Enzimin Ayçiçek Yağı Hidroliz Reaksiyonu Optimizasyonu

Serbest lipazın hidroliz reaksiyonu optimizasyonu için pH, tampon çözelti konsantrasyonu, tampon çözelti miktarı ve sıcaklık çalışıldı.

5.5.1. pH

Serbest enzimle farklı pH' larda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu sonuçları Tablo 5.11' de sunulmuştur.

Tablo 5.11: pH' ın serbest enzimin hidrolitik aktivitesine etkisi.

pH	Asit sayısı
4.0	28.2
4.5	30.1
5.0	45.7
5.5	51.4
6.0	59.1
7.0	55.1
8.0	49.3
9.0	40.8

Farklı pH' larda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonlarına göre serbest enzim en yüksek aktiviteyi pH 6' da göstermektedir.

5.5.2. Tampon Çözelti Konsantrasyonu

Serbest enzimin farklı tampon çözelti konsantrasyonlarında gerçekleştirdiği hidroliz reaksiyonu sonucu elde edilen asit sayıları Tablo 5.12' de sunulmuştur.

Tablo 5.12: Tampon çözelti konsantrasyonlarının serbest enzimin hidrolitik aktivitesine etkisi.

Tampon Çözelti Konsantrasyonu (mM)	Asit sayısı
15	54.7
20	56.1
25	59.3
50	59.2
100	59.3
200	59.1

Bu sonuçlara göre 25mM ve daha yüksek konsantrasyonlardaki $\text{Ca}(\text{Ac})_2$ tampon çözeltilerinde aynı sonuçlar alınmaktadır.

5.5.3. Tampon Çözelti Miktarı

Serbest enzimin farklı tampon çözelti miktarları kullanılarak gerçekleştirdiği hidroliz reaksiyonu sonucu elde edilen asit sayıları Tablo 5.13’ de sunulmuştur.

Tablo 5.13: Tampon çözelti miktarının serbest enzimin hidrolitik aktivitesine etkisi.

Tampon Çözelti Miktarı (ml)	Asit Sayısı
1.0	39.1
2.5	45.9
5.0	54.7
10.0	48.2
15.0	35.1
30.0	22.7

Serbest enzim 5ml tampon çözelti olan ortamda en yüksek aktivitesine göstermiştir.

5.5.4. Sıcaklık

Serbest enzimin farklı sıcaklıklarda gerçekleştirdiği hidroliz reaksiyonu sonucu elde edilen asit sayıları Tablo 5.14’ de sunulmuştur.

Tablo 5.14: Sıcaklığın serbest enzimin hidrolitik aktivitesine etkisi.

Sıcaklık (°C)	Asit sayısı
30	50.2
40	55.7
50	59.2
60	51.2
70	39.4

Serbest enzim 50°C’ de en yüksek aktivitesini göstermiştir.

5.6. Ayçiçek Yağının İmmobilize Lipaz ile Hidroliz Reaksiyonu Optimizasyonu

Hidroliz optimizasyon reaksiyonlarında pH, tampon çözelti konsantrasyonu, tampon çözelti miktarı, sıcaklık, organik çözücü ve tuz etkileri çalışıldı.

5.6.1. pH

İmmobilize enzimin farklı pH’ larda gerçekleştirdiği hidroliz reaksiyonu sonucu elde edilen asit sayıları Tablo 5.15’ de sunulmuştur.

Tablo 5.15: pH’ın hidroliz reaksiyonu üzerine etkisi.

pH	Asit sayısı
4.0	44.7
4.5	48.4
5.0	50.2
5.5	49.5
6.0	45.9
7.0	42.2
8.0	38.1
9.0	31.6

İmmobilize enzim pH 5’ te Ca(Ac)₂ tampon çözeltisinde en yüksek aktiviteyi göstermiştir.

5.6.2. Tampon Çözelti Konsantrasyonu

İmmobilize enzimin farklı tampon çözelti konsantrasyonlarında gerçekleştirdiği hidroliz reaksiyonu sonucu elde edilen asit sayıları Tablo 5.16’ da sunulmuştur.

Tablo 5.16: Tampon çözelti konsantrasyonlarının aktiviteye etkisi.

Konsantrasyon(mM)	Asit sayısı
15	45.5
20	48.4
25	50.3
50	50.2
100	50.3
200	50.3

İmmobilize enzim 25mM ve daha yüksek tampon çözeltilerinde en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Optimum tampon çözelti konsantrasyonu 25mM olarak seçilmiştir.

5.6.3. Tampon Çözelti Miktarı

İmmobilize enzimin farklı tampon çözelti miktarlarında gerçekleştirdiği hidroliz reaksiyonu sonucu elde edilen asit sayıları Tablo 5.17’ de sunulmuştur.

Tablo 5.17: Tampon çözelti miktarlarının aktiviteye etkisi.

Çözelti miktarı(ml)	Asit sayısı
1.0	46.0
2.5	48.0
5.0	50.2
10.0	41.9
15.0	35.2
30.0	28.3

İmmobilize enzim 5ml tampon çözeltide en yüksek aktiviteyi göstermiştir.

5.6.4. Sıcaklık

İmmobilize enzimin farklı sıcaklıklarda gerçekleştirdiği hidroliz reaksiyonu sonucu elde edilen asit sayıları Tablo 5.18’ de sunulmuştur.

Tablo 5.18: Sıcaklığın aktiviteye etkisi.

Sıcaklık(°C)	Asit sayısı
40	41.4
45	45.7
50	46.6
55	48.2
60	50.6
65	50.1
70	45.9

İmmobilize enzim 60°C’ de en yüksek aktiviteyi göstermiştir.

5.6.5. Organik Çözücü

İmmobilize enzimin optimum şartları belirlendikten sonra heptan ve hekzanın hidrolitik aktiviteye etkileri çalışıldı ve sonuçlar Tablo 5.19 ve 5.20’ de verilmiştir.

Tablo 5.19: Heptanın immobilize enzim aktivitesine etkisi.

Heptan (ml)	Asit sayısı
0.00	50.6
0.25	50.4
0.50	50.5
1.00	50.3
2.00	50.3
4.00	50.4

Tablo 5.20: Hekzanın immobilize enzim aktivitesine etkisi.

Hekzan (ml)	Asit sayısı
0.00	50.6
0.25	50.2
0.50	50.1
1.00	50.3
2.00	50.5
4.00	50.3

Bu sonuçlara göre, hekzan ve heptanın immobilize lipazın hidrolitik aktivitesine etkileri bulunmamaktadır.

5.6.6. Tuz

İmmobilize enzimin hidroliz reaksiyonuna değişik tuzların (NaCl, CaCl₂, MgCl₂) etkileri çalışıldı ve sonuçlar Tablo 5.21, 5.22 ve 5.23’ de gösterilmiştir.

Tablo 5.21: NaCl’ün immobilize enzimin aktivitesine etkisi.

[NaCl] (mM)	Asit sayısı
0	49.8
5	50.8
10	50.6
20	50.7
40	50.1
100	50.0

Tablo 5.22: CaCl₂’ ün immobilize enzim aktivitesine etkisi.

[CaCl ₂] (mM)	Asit sayısı
0	49.2
5	49.4
10	49.1
20	49.4
40	49.0
100	49.2

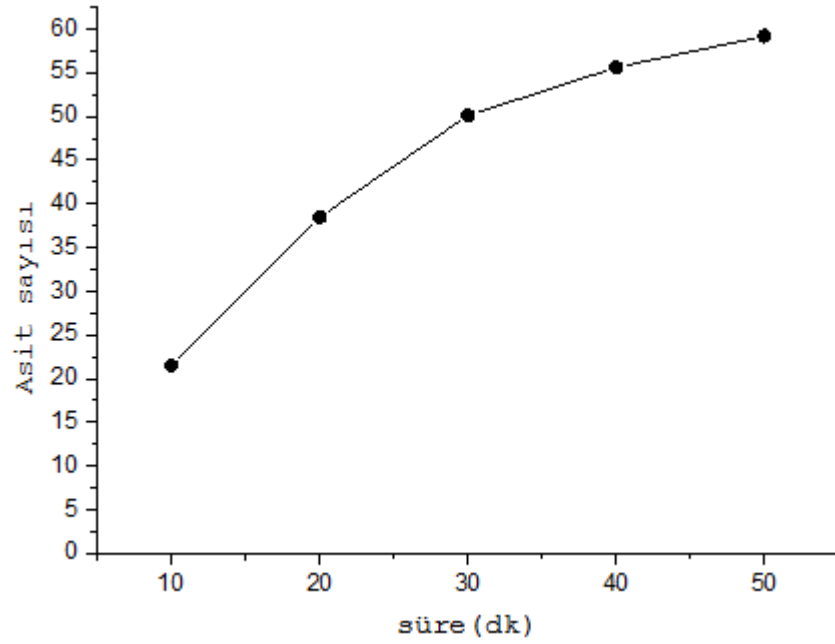
Tablo 5.23: MgCl₂’ ün immobilize enzim aktivitesine etkisi

[MgCl ₂] (mM)	Asit sayısı
0	49.2
5	49.1
10	49.0
20	49.4
40	49.7
100	49.5

Farklı tuzların immobilize enzimin hidroliz reaksiyonuna etkisi çalışıldığında sadece NaCl’ ün (5 mM) immobilize enzimin aktivitesini %2 oranında arttırdığı bulunmuştur.

5.7. Ayçiçek Yağının İmmobilize Lipaz ile Hidrolizinde Sürenin Etkisi

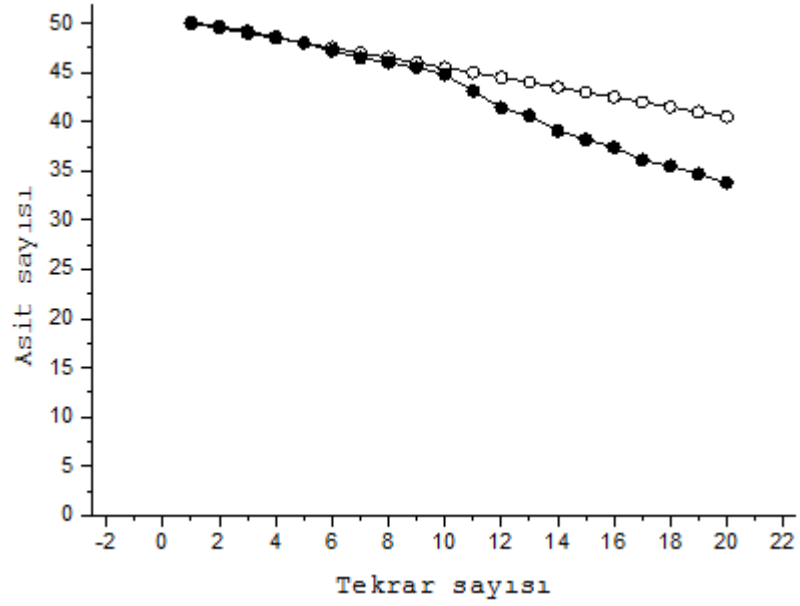
Ayçiçek yağının immobilize lipaz ile zamana karşı hidroliz aktivitesine bakıldığında aktivitenin 30. dakikadan sonra azaldığı bulundu. Bunun nedeni ortamda oluşan ürünlerin (yağ asidi ve gliserol) enzimi kısmen inhibe etmesidir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2: Sürenin immobilize enzimin aktivitesine etkisi.

5.8. Tekrar Kullanım Deneyleri

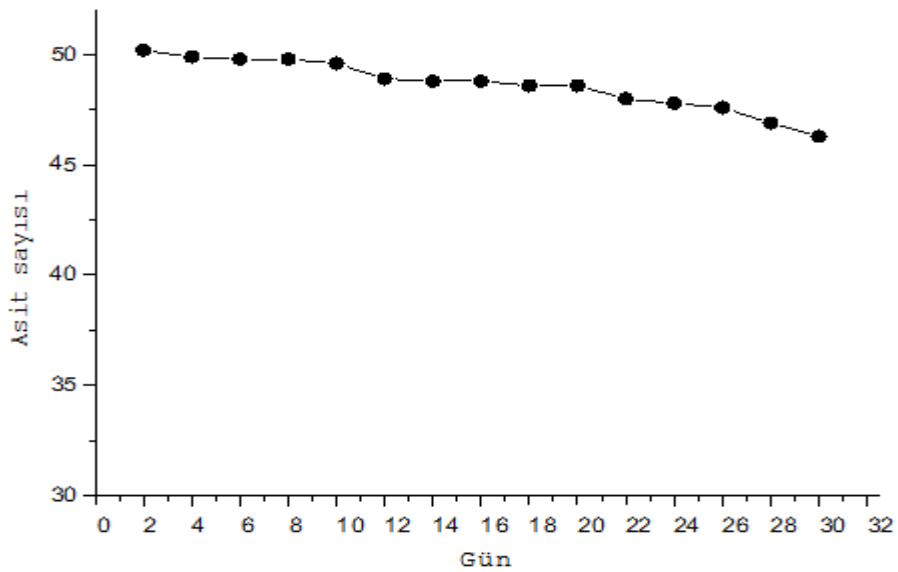
İmmobilize enzim, optimum hidroliz reaksiyon şartlarında 20 kez hidroliz reaksiyonunda kullanıldı. Deneyler sonunda enzim aktivitesinin %38.5 oranında düştüğü gözlemlendi (Şekil 5.3.). Bu düşüşün bir kısmı (%50) immobilize enzimin tekrar kullanımları arasında gerçekleştirilen yıkamalardan kaynaklanmaktadır. Bir kısmı ise aktif bölgedeki kapakçığın kapanmasından olabilir.



Şekil 5.3: ●) İmmobilize enzimin tekrarlı kullanımları, ○) İmmobilize enzimin tekrarlı kullanımları (süzme esnasındaki immobilize enzim miktarında kayıplar olmadığı varsayıldığında)

5.9. İmmobilize Enzimin Raf Ömrünün Belirlenmesi

İmmobilize edilen lipazın buz dolabında (+4°C) saklama süresinin tayini için 30 gün boyunca hergün aktivite tayinleri yapıldı. Sonuçlar Şekil 5.4’ de gösterilmektedir. 30 gün sonunda enzim aktivitesinin %8.13 oranında düştüğü gözlenmiştir.



Şekil 5.4: İmmobilize lipazın 30 günlük raf ömrü.

6. TARTIŞMA

Bu çalışmada, TLL' nin STY-DVB-PGA ko-polimerine immobilizasyonu optimize edildi ve immobilizasyon %100 immobilizasyon ve %85.6 aktivite verimleriyle gerçekleştirildi. Gram matriks başına 16.5mg protein kovalent olarak bağlanmıştır. Bağlanan protein miktarı ve aktivite verimlerini arttırmak için çözünür PGA ve PEG kullanılmıştır. PGA ve PEG kullanılmadığında gram matriks başına bağlanan protein miktarı ve aktivite verimi sırasıyla 10.3mg, %73.5' dir. Immobilizasyonda kullanılan PGA çözeltisi sentezlenen matriks üzerinde daha fazla serbest aldehit gruplarının oluşmasına ve böylece daha fazla enzimin kovalent olarak bağlanmasına sebep olmuştur. Fakat enzimin PGA ile inaktivasyonundan dolayı enzim aktivitesinde %24 azalma olmuştur. Aktivitedeki bu azalmayı engellemek için PEG2000 kullanılmış ve böylece aktivite verimi %73.5' dan %85.6' ya çıkartılmıştır. Serbest lipaz kullanılarak ayçiçek, mısır ve zeytin yağları hidroliz edildi. En başarılı netice ayçiçek yağının hidrolizinde elde edildiği için hidroliz reaksiyonu optimizasyon çalışmalarında yalnız ayçiçek yağı kullanıldı. Hidroliz optimizasyon çalışmalarında optimum pH, tampon çözelti konsantrasyonu, miktarı, sıcaklık, tuz (NaCl, MgCl₂, CaCl₂) ve organik çözücü (hekzan, heptan) etkileri çalışıldı. Hidroliz ortamında NaCl (5mM) olduğunda hidroliz reaksiyonunun %2 oranında arttığı bulundu. 30 günlük depolama sonunda immobilize enzim aktivitesinin %8.1' ini, 20 tekrarlı deneylerde ise aktivitesinin %38.5' ini kaybetmiştir.

Literatürde bu tez çalışmasında kullanılan enzim ve matriksin kullanıldığı üç farklı grup bulunmaktadır. Bu çalışmalarda immobilize lipaz yağ asidi üretimi yerine biyodizel üretiminde kullanılmıştır. Dizge ve arkadaşları TLL' yi STY-DVB ko-polimerine adsorpsiyon (immobilizasyon verimi: %63.3), STY-DVB-PGA ko-polimerine (immobilizasyon verimi: %76.0) ise kovalent olarak bağlamışlardır. Gram STY-DVB ko-polimerine 9.5mg protein bağlanırken, STY-DVB-PGA ko-polimerine ise 11.4mg protein bağlandığı bulunmuştur. En yüksek immobilizasyon verimi (%76), pH: 6.0 ve 25mM Ca(Ac)₂ tampon çözeltisinde yapılan immobilizasyonla elde edilmiştir [Dizge et al., 2009]. Bizim yaptığımız çalışmada da aynı tampon çözelti sistemi optimum şart olarak bulunmuştur. Aybastier ve Demir tarafından yapılan çalışmada %59 immobilizasyon verimi elde edilmiş ve gram matriks başına 5.7 mg protein bağlanmıştır [Aybastier and Demir, 2010]. Yücel

tarafından yapılan çalışmada ise %82 immobilizasyon verimi elde edilmiş ve bu çalışmada gram matriks başına 12.9 mg protein matrikse kovalent olarak bağlanmıştır [Yücel, 2011]. Yukarıda anlatılan çalışmalardan görüldüğü gibi yaptığımız çalışmada elde edilen neticeler diğerlerinden daha iyidir. Çalışmamızda enzim aktivitesini immobilizasyon esnasında korumak için PEG 2000 kullanıldı. PEG 2000 (2.5g/L) kullanılarak aktivite verimi %73.5' den %85.6' ya çıkarılmıştır. PEG enzimi kararlı hale getirmektedir. PEG enzim etrafında bulunan su moleküllerini uzaklaştırmakta ve ortam vizkositeni arttırmaktadır. PEG' in değişik enzimlerin aktivitelerini arttırdığına dair çok sayıda yayınlar mevcuttur. Chae ve arkadaşları proteazın glutaraldehit ile yapılan immobilizasyonu sırasında aktivite düşüşünü engellemek için ortamda PEG 4000 kullanarak aktivite verimini %38'den %60' a çıkarmışlardır [Chae et al., 2000]. Rocha ve arkadaşları ise *Mucor miehei* lipazının immobilizasyon sırasında kaybolan aktivitesini kazanmak için ortamda farklı miktarlarda PEG denemişler ve PEG2000 kullanarak aktivite verimi %40' dan %100' e çıkarmışlardır [Rocha et al., 1998]. Lipaz tarafından gerçekleştirilen yağ hidroliz reaksiyonlarında bazı tuzların hidroliz reaksiyonunu arttırdığı bilinmektedir. Salgın ve Takaç *Candida Rugosa* lipazının p-nitrofenilasetatın hidrolizi sırasında LiCl, KCl, MgCl₂, NaCl, ZnCl₂ metal tuzlarının enzim aktivitesi üzerine etkilerini çalışmışlar ve tuzların hidrolitik aktiviteyi arttırdığı bulunmuştur. Bu tuzların hidrolitik aktiviteye katkısı %31 ile %45 arasında bulunmuştur [Salgın and Takac, 2007]. Rathod ve Pandit *Aspergillus oryzae* lipaz aktivitesi üzerine bazı tuzların(KCl, NaCl, MgCl₂) ve organik çözücülerin (metanol, aseton, izooktan, hekzan) etkilerini çalışmışlar. Herbir tuzun ve organik çözücünün enzim aktivitesini düşürmüştür [Rathod and Pandit, 2009]. Yaptığımız tez çalışmasında hidroliz reaksiyonu optimizasyonu ile belirlenen şartlarda farklı tuzlar (KCl, MgCl₂, NaCl) denendi. Yalnız NaCl kullanıldığında hidroliz reaksiyonu aktivitesinde artış gözlemlendi. 5mM NaCl tuzu kullanıldığında enzimin aktivitesi %5 oranında arttırıldı. Lipazla yağ hidrolizinde reaksiyon hızı oluşan yağ asitleri tarafından yavaşlatılmaktadır. Serri ve arkadaşları tarafından yağların, enzimatik hidroliz reaksiyonu süresince zamanla reaksiyon hızının azaldığı ve sabitlendiği görülmüştür. Bunun sebebi olarak ortamda oluşan yağ asitlerinin enzimi inhibe etmesi olarak açıklanmaktadır. Bu yüzden hidroliz reaksiyonlarında süre oldukça önemlidir [Serri et al., 2008]. Bizim çalışmamızda da immobilize ve serbest enzim aktivitesi 50 dakikaya kadar artmakta ve daha sonra sabitlenmektedir. Dolayısıyla aktivite ölçümlerinde reaksiyon süresi

olarak 30 dakikalık reaksiyonlar kullanılmıştır. Böylece ortamda oluşan yağ asitlerinin enzimi inhibe etme özelliğinden korunmuş olundu. Ting ve arkadaşları soya yağını immobilize *Candida rugosa* lipazı kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Serbest lipaz immobilize edildikten sonra optimum pH' ı 7 iken 8, sıcaklığı ise 35°C' iken 40°C olmuştur. İmmobilize lipaz 10 kere tekrarlı kullanımı sonucunda aktivitesinin %40' ını kaybetmiş, 30 günlük bekleme sonrasında aktivitesinde herhangi bir kayıp tespit edilmemiştir [Ting et al., 2006]. Yiğitoğlu ve Temoçin' de *Candida rugosa* lipazının PET-g-Aam üzerine immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Serbest enzim ve immobilize enzim tarafından gerçekleştirilen farklı tipteki yağların (mısır, zeytin, ayçiçek ve kanola yağları) hidrolizini çalışmışlardır. Serbest enzimin optimum pH'ı 6 iken, immobilize hale geldiğinde pH' ı 7 olmuştur. İmmobilize lipaz 10 tekrarlı hidroliz reaksiyonu sonucu aktivitesinin %74'ünü, 60 günlük saklama sonunda %10' unu kaybetmiştir [Yigitoglu and Temocin, 2010]. Bizim yaptığımız çalışmada da hidroliz reaksiyonu optimum pH' ı serbest enzimde 6 iken, immobilize enzimde 5 olarak bulundu. Ayrıca bitkisel yağlardan yağ asidi üretimi için geliştirdiğimiz immobilize lipaz sistemi 20 tekrarlı kullanımlarda ve 30 günlük saklama sonrası aktiviteleri literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında daha iyi sonuç verdiği görülmektedir. Yağ asidi elde etmek için geliştirdiğimiz bu sistem yeni olup oldukça kullanışlı bir yapıya sahiptir.

7. SONUÇ

Enzimatik metodla yağ asitleri üretiminin yan ürün problemi ve enerji maliyetleri açısından avantajları bulunmaktadır. Ayrıca lipazın immobilize formda kullanılması maliyeti oldukça düşürmektedir. Bu tez çalışmasında *Thermomyces lanuginosa* lipaz üzerinde serbest aldehit grupları ihtiva eden STY-DVB-PGA ko-polimeri üzerine kovalent olarak optimum şartlarda %100 immobilizasyon ve %85.6 aktivite verimleriyle immobilize edildi. Matriks üzerine maksimum miktarda enzim immobilizasyonu için yeni bir metod geliştirildi. Immobilizasyonda PGA ve PEG 2000'in kullanımıyla gram matriks başına 16.5 mg protein kovalent olarak bağlandı. Sentezlenen matriks ile immobilizasyon optimizasyon çalışmaları kolon sistemi kullanılarak gerçekleştirildi.

İmmobilize lipaz, mısır, zeytin, ve ayçiçek yağlarının hidrolizinde kullanıldı. En iyi sonuç ayçiçeği yağının hidrolizinde alındığı için, detaylı deneylerde yalnız ayçiçeği yağı kullanıldı. Hidroliz için optimum şartlar (pH, tampon çözelti konsantrasyonu, sıcaklık, tuz ve organik çözücü etkileri) belirlendi. Optimizasyon sonunda 5mM NaCl' nin immobilize enzimin ayçiçek yağı ile hidroliz reaksiyonunda %2 enzim aktivitesini arttırdığı gözlemlendi.

İmmobilize enzim 20 tekrar kullanım deneyleri sonucunda başlangıçtaki aktivitesinin %62 sini, 30 günlük saklama süresi deneyleri sonunda ise aktivitesinin %92 sini korumaktadır. Bu tez çalışmasında *Thermomyces lanuginosa* lipazın immobilize formda yağ hidrolizinde elde edilen sonuçlar literatürde belirtilen sonuçlarla kıyaslanabilir niteliktedir. Hidroliz deneylerinde membran sisteminin kullanılmasıyla yağ asitlerinin inhibisyonu azalacağından elde edilen hidroliz miktarı arttırılabilir.

Bu çalışmayla STY-DVB-PGA ko-polimeri üzerine kovalent olarak immobilize edilen *Thermomyces lanuginosa* lipazın bitkisel yağların hidrolizinde kullanılabileceği gösterilmiştir. İlave olarak, geliştirilen yeni bir metodla matriks üzerine kovalent olarak bağlanabilen enzim miktarı %60 civarında arttırılmıştır.

KAYNAKLAR

Aghaie H., Ilkhani A. R., Choobeh S., (2011), "Utilization Soya Bean Fatty Acid for Synthesis of Alkyd Resin and Comparison of Properties with Other Vegetable Oils", Journal of Nanochemical Agriculture.

Ahmed M., Muhammad A. M., Shahid P., Muhammad R., (2004), "Effect of Porosity on Sulfonation of Macroporous Styrene-Divinylbenzene Beads", European Polymer Journal, 40 (8), 1609-1613.

Arslan O., (2007), "Biyomoleküller, Teori Ve Uygulamalar", Balıkesir Üniversitesi.

Ası T., (1996), "Tablolarla Biyokimya" Cilt 1, Nobel Tıp Kitapevleri.

Aybastier Ö., Cevdet D., (2010), "Optimization of Immobilization Conditions of Thermomyces Lanuginosus Lipase on Styrene-Divinylbenzene Copolymer Using Response Surface Methodology", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 63 (3), 170-178.

Barros M., Fleuri F., Macedo G. A., (2010), "Seed Lipases: Sources, Applications and Properties - a Review", Brazilian Journal of Chemical Engineering, 15-29.

Berg O. G., Yolanda C., Glenn L. B., Ronald L. G., Asuncion A., Yu B., Jain M., (1998), "Interfacial Activation of Triglyceride Lipase from Thermomyces (Humicola) Lanuginosa: Kinetic Parameters and a Basis for Control of the Lid", Biochemistry, 37 (9), 6615-6627.

Bouwman G. R., (2005), "Alkyd Paint and Paint Driers", Coord. Chem. Rev.

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 (1), 248-254.

Cao L., (2006), "Introduction: Immobilized Enzymes: Past, Present and Prospects", Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Cao L., Langen L., Sheldon R., (2003), "Immobilised Enzymes: Carrier-Bound or Carrier-Free?" Current Opinion in Biotechnology, 14 (4), 387-394.

Cao L., Rantwijk F., Sheldon R., (2000), "Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase" Organic Letters, 1361-1364.

Castor D. H., William J. M., (2005), "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry" Wiley-VCH.

Chae H. E., Kim E. Y., In M., (2000), "Improved Immobilization Yields by Addition of Protecting Agents in Glutaraldehyde-Induced Immobilization of Protease", Journal of Bioscience and Bioengineering, 89 (4), 377-379.

Chang H., Seong G., Yoo I., Park J., Seo J., (1998), "Method for Immobilization of Whole Microbial Cells in Calcium Alginate Capsules", Korea Advanced Institute of Science & Technology.

Charusheela A., Arvind L., (2002), "Enzyme Catalyzed Hydrolysis of Esters Using Reversibly Soluble Polymer Conjugated Lipases", Enzyme and Microbial Technology, 30 (1), 19-25.

Chatterjee S., Barbora L., Cameotra S., Mahanta P., Goswami P., (2009), "Silk-Fiber Immobilized Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Emulsified Sunflower Oil" Applied Biochemistry and Biotechnology, 157 (3), 593-600.

Chew Y. H., Chua L. S., Cheng K. K., Sarmidi M. J., Ramlan A.A., Chew T. L., (2008), "Kinetic Study on the Hydrolysis of Palm Olein Using Immobilized Lipase", Biochemical Engineering Journal, 39 (3), 516-520.

Chua L. S., Alitabarimansor M., Lee C., Mat R., (2012), "Hydrolysis of Virgin Coconut Oil Using Immobilized Lipase in a Batch Reactor", Enzyme Research.

Costa S. A., Reis R. L., (2004), "Immobilization of Catalase on the Surface of Biodegradable Starch-Based Polymers as a Way to Change Its Surface Characteristics", Journal of Material Science: Materials in Medicine.

Derewenda U., Swenson L., Green R., Wei Y., Yamaguchi S., Joerger R., Haas M., Derewenda Z., (1994), "Current Progress, in Crystallographic Studies of New Upases from Filamentous Fungi", Protein Engineering, 7 (4), 551-557.

Dizge N., Keskinler B., Tanriseven A., (2009), "Biodiesel Production from Canola Oil by Using Lipase Immobilized onto Hydrophobic Microporous Styrene-Divinylbenzene Copolymer", Biochemical Engineering Journal, 44 (2-3), 220-225.

Duinhoven S., Poort R., , Norde W., Lyklema J., (1995), "Driving Forces for Enzyme Adsorption at Solid-Liquid Interfaces 2. The Fungal Lipase Lipolase", Journal of Colloid and Interface Science, 170 (2), 351-357.

Fernandes M., Krieger N., Baron A., Zamora P., Ramos L., Mitchell D., (2004), "Hydrolysis and Synthesis Reactions Catalysed by Thermomyces Lanuginosa Lipase in the Aot/Isooctane Reversed Micellar System", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 30 (1), 43-49.

Fernandez R., (2010), "Lipase from Thermomyces Lanuginosus: Uses and Prospects as an Industrial Biocatalyst", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 62 (3-4), 197-212.

Fernández G., Pizarro C., López D., Betancor L., Carrascosa A., Pessela B., Guisan J., (2011), " Hydrolysis of Fish Oil by Lipases Immobilized inside Porous Supports", Journal of American Oil Chemical Society.

Foster A. A., Achenie L., Zhiyou W., (2010), "Sulfate and Hydroxide Supported on Zirconium Oxide Catalysts for Biodiesel Production", Master Thesis, Virginia Polytechnic Institute.

Gervajio G., (2005), "C. Bailey's Industrial Oil and Fat Products", Sixth Edition, John Wiley & Sons, Inc.

Guisan J., (2006), "Immobilization Enzyme and Cells, Second Edition Method in Biotechnology" Edited by John M. Walker.

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 (18), 4074-4076.

Harris G., (2011), "Government Says 2 Common Materials Pose Risk of Cancer", *Newyork Times*.

Hasan F., Shah A., Javed S., Hameed A., (2010), "Enzymes Used in Detergents: Lipases Review", *African Journal of Biotechnology*.

Hoq M. M., Koike M., Yamane T., Shimizu S., (1985), "Continuous Hydrolysis of Olive Oil by Lipase in Microporous Hydrophobic Hollow Fiber Bioreactor", *Agricultural and Biological Chemistry*, 49 (1), 3171-3178.

Jha B. K., Svensson M., Kronberg B., Holmberg K., (1999), "Titration Microcalorimetry Studies of the Interaction Between *Humicola Lanuginosa* Lipase and Ionic Surfactants." *Journal of Colloid and Interface Science*, 213 (1), 262-264.

Klaus B., Kasche V., Bornscheuer U.T., (2005), "Biocatalysts and Enzyme Technology", Wiley.

Kamat S. V., Beckman E. J., Russell A. J., (1995), "Enzyme Activity in Supercritical Fluids", *Critical Reviews in Biotechnology*, 15 (1), 41-71.

Kohlpaintner C., Schulte M., Falbe J., Lappe P., Weber J., (2000), "Aldehydes, Aliphatic", Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Kulkarni R., Pandit A., (2005), "Enzymatic Hydrolysis of Castor Oil: An Approach for Rate Enhancement and Enzyme Economy", *Indian Journal of Biotechnology*.

Marchetti J. M., Errazu A. F., (2008), "Esterification of Free Fatty Acids Using Sulfuric Acid as Catalyst in the Presence of Triglycerides", *Biomass and Bioenergy*, 32 (9), 892-895.

Margel S., Rembaum A., (1980), "Synthesis and Characterization of Poly(Glutaraldehyde) A Potential Reagent for Protein Immobilization and Cell Separation", *Methods for Investigation of Biofilms*, Mülheim, Germany, 17-18 May.

Mateo C., Palomo J., Fernandez G., Guisan J., Lafuente R., (2007), "Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity Via Immobilization Techniques", *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (6), 1451-1463.

Matheel D. A., Jawad K. J., Jacob W., (2007), "Preparation of Macroporous Styrene-Divinyl Benzene Copolymers", *Engineering and Technology*.

Megahed G., (1999), "Preparation of Sucrose Fatty Acid Esters as Food Emulsifiers and Evaluation of Their Surface Active and Emulsification Properties", *Grasas Y. Aceites*.

Miletić N., Rohandi R., Vuković Z., Nastasović A., Loos K., (2009), "Surface Modification of Macroporous Poly(Glycidyl Methacrylate-Co-Ethylene Glycol Dimethacrylate) Resins for Improved *Candida Antarctica* Lipase B Immobilization", *Reactive and Functional Polymers*, 69 (1), 68-75.

Monsan P., (1983), "Enzymes Immobilized on a Solid Support Containing Cellulose and Lignin", *Beghin-Say*.

Nimni M. E., Cheung D., Strates B., Kodama M., Sheikh K., (1987), "Chemically Modified Collagen: A Natural Biomaterial for Tissue Replacement", *Journal of Biomedical Materials Research*, 21 (6), 741-771.

Ozturk T. K., Kilinc A., (2010), "Immobilization of Lipase in Organic Solvent in the Presence of Fatty Acid Additives" *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67 (3-4), 214-218.

Pahujani S., Kanwar S., Chauhan G., Gupta R., (2008), "Glutaraldehyde Activation of Polymer Nylon-6 for Lipase Immobilization: Enzyme Characteristics and Stability", *Bioresource Technology*, 99 (7), 2566-2570.

Patil T. A., Raghunathan T. S., Shankar H. S., (1988), "Thermal Hydrolysis of Vegetable Oils and Fats. 2. Hydrolysis in Continuous Stirred Tank Reactor", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 27 (5), 735-739.

Peters G. H., Svendsen A., Langberg H., Vind J., Patkar SA., Toxvaerd S., Kinnunen PKJ., (1998), "Active Serine Involved in the Stabilization of the Active Site Loop in the *Humicola Lanuginosa* Lipase", *Biochemistry*, 37 (36), 12375-12383.

Porath J., Aspberg K., Drevin H., Axén R., (1973), "Preparation of Cyanogen Bromide-Activated Agarose Gels", *Journal of Chromatography A*, 53-56.

Rathod V. K., Pandit A. B., (2009), "Effect of Various Additives on Enzymatic Hydrolysis of Castor Oil" *Biochemical Engineering Journal*, 47 (1), 93-99.

Robert C., (1984), "Handbook of Chemistry and Physics ", *CRC*.

Rocha J., Gil M., Garcia F., (1998), "Effects of Additives on the Activity of a Covalently Immobilised Lipase in Organic Media", *Journal of Biotechnolog*, 66 (1), 61-67.

Rodrigues R. C., Godoy C. A., Volpato G., Ayub M., Fernandez R., Guisan J., (2009), "Immobilization–Stabilization of the Lipase from *Thermomyces Lanuginosus*: Critical Role of Chemical Amination", *Process Biochemistry* 44 (9), 963-968.

Salgın S., Takaç S., (2007), "Effects of Additives on the Activity and Enantioselectivity of *Candida Rugosa* Lipase in a Biphasic Medium", *Chemical Engineering & Technology*, 30 (12), 1739-1743.

Scopes R. K., (2001), "Enzyme Activity and Assays", John Wiley & Sons, Ltd.

Serri N. A., Kamarudin A. H., Rahaman S. N., (2008), "Preliminary Studies for Production of Fatty Acids from Hydrolysis of Cooking Palm Oil Using *C. Rugosa* Lipase", *Journal of Physical Science*, 19 (1), 79-88.

Sharon C., Nakazato M., Ogawa H. I., Kato Y., (1998), "Lipase-Induced Hydrolysis of Castor Oil: Effect of Various Metals", *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 21 (6), 292-295.

Sheldon R. A., (1993), "Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds", Marcel Dekker.

Skogerson B., (2007), "Non-Hydrogenated Vegetable Oil Based Margarine for Puff Pastry Containing an Elevated Diglyceride Emulsifier", World Intellectual Property Organization, USA, 12 December.

Söderlund T., Zhu K., Jutila A., Kinnunen P., (2002), "Effects of Betaine on the Structural Dynamics of *Thermomyces (Humicola) Lanuginosa* Lipase", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 26 (1), 75-83.

Sokolsky M., Shikanov A., Kumar N., Vaisman B., Domb A., (2008), "Fatty Acid Based Biodegradable Polymers-Synthesis and Applications", *Bulletin of the Israel Chemical Society*.

Spahn C., Minter S., (2008), "Enzyme Immobilization in Biotechnology." *Recent Patents on Engineering*, 195-200.

Tanriseven A., Uludağ Y., Doğan Ş., (2002), "A Novel Method for the Immobilization of Glucoamylase to Produce Glucose from Maltodextrin" *Enzyme and Microbial Technology*, 30 (3), 406-409.

Ting J., Tung Y., Giridhar R., Wu T., (2006), "Application of Binary Immobilized *Candida Rugosa* Lipase for Hydrolysis of Soybean Oil", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 42 (1), 32-38.

Vakhlu J., Kour A., (2006), "Yeast Lipases: Enzyme Purification, Biochemical Properties and Gene Cloning", *Electronic Journal of Biotechnology*.

Web 1, (2012), <http://thepaleodiet.com/vegetable-oil-fatty-acid-composition/>, (Erişim Tarihi 03/02/2012)

Yang Z., Pan W., (2005), "Ionic Liquids: Green Solvents for Nonaqueous Biocatalysis", *Enzyme and Microbial Technology*, 37 (1), 19-28.

Yeh Y. C., Gulari E., (1998), "Enzymatic Glyceride Synthesis in a Foam Reactor", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75 (5), 643-650.

Yiğitoğlu M., Temoçin Z., (2010), "Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase on Glutaraldehyde-Activated Polyester Fiber and Its Application for Hydrolysis of Some Vegetable Oils", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66 (1), 130-135.

Yücel Y., (2011), "Biodiesel Production from Pomace Oil by Using Lipase Immobilized onto Olive Pomace." *Bioresource Technology*, 102 (4), 3977-3980.

Zhang H., Xu X., Nilsson J., Mu H., Adler-Nissen J., Erik C., (2001), "Production of Margarine Fats by Enzymatic Interesterification with Silica-Granulated *Thermomyces Lanuginosa* Lipase in a Large-Scale Study", *Journal of the American Oil Chemists' Society*.

ÖZGEÇMİŞ

1986 Gebze doğumlu olan Serkan AKKÖSE, 2004 yılında Neşet Yalçın Lisesinden mezun oldu. Aynı yıl Balıkesir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünü kazandı. 2008 yılında Lisans eğitimini bitirdikten sonra 2009 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen bilimleri Enstitüsü, Kimya bölümünde yüksek lisansa başladı. Halen bu bölümde bilimsel çalışmalarını sürdürmektedir.