

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

İMMOBİLİZE EDİLMİŞ LİPAZ ENZİMİ İLE HİNT YAĞININ REAKSİYONLARININ İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra ÖZDEMİR

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA
Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA
**Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Semra YILMAZER
KESKİN**

Ağustos 2019

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İMMOBİLİZE EDİLMİŞ LİPAZ ENZİMİ İLE HİNT
YAĞININ REAKSİYONLARININ İNCELENMESİ**

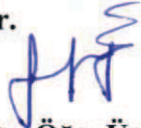
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra ÖZDEMİR

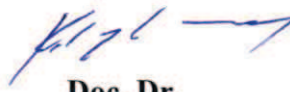
Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA

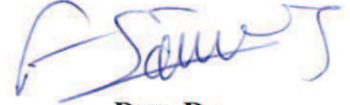
Bu tez 05/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.



Dr. Öğr. Üyesi
Semra YILMAZER KESKİN
Jüri Başkanı



Doç. Dr.
Kudret YILDIRIM
Üye



Doç. Dr.
Fatih SÖNMEZ
Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.



Kübra ÖZDEMİR

05/08/2019

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda bilgi ve desteğini almaktan çekinmediğim, araştırmanın planlanmasından yazılmasına kadar tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, aynı titizlikte beni yönlendiren değerli danışman hocam Dr.Öğr.Üyesi Semra YILMAZER KESKİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında benden yardım ve desteklerini esirgemeyen hocam Doç.Dr.Can Serkan KESKİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Karşılaştığım her zorlukta hep yanımda olan, varlığıyla bu sürecin kolaylaşmasını sağlayan arkadaşım Mikail KARAKAYA'ya teşekkür ederim.

Benden maddi, manevi desteklerini esirgemeyen, beni büyük bir ilgi ve sevgiyle bugünlere getiren babam Kemalettin ÖZDEMİR, annem Emine ÖZDEMİR ve hayatımı anlamlı hale getiren kardeşlerim Serra ÖZDEMİR ve Zehra ÖZDEMİR'e teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığı (Proje No:2017-50-01-035) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
SUMMARY	x
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	
KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Enzimler.....	5
2.1.1. Enzimatik bir tepkimenin hızını etkileyen faktörler.....	6
2.2. Enzim İmmobilizasyonu.....	8
2.2.1. Enzim immobilizasyonun tarihteki yeri.....	9
2.2.2. Enzim immobilizasyonunun avantajları.....	9
2.2.3. İmmobilize enzimlerin özellikleri.....	10
2.2.4. İmmobilize enzimlerin uygulama alanları.....	11
2.3. Enzim İmmobilizasyonu Yöntemleri.....	13
2.3.1. Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri.....	14
2.3.1.1. Bağlama yöntemleri.....	14
2.3.1.1.1. Çapraz bağlama.....	15
2.3.1.1.2. Enzim kopolimerizasyonu.....	15

2.3.1.1.3. Taşıyıcıya bağlama.....	15
2.3.1.2. Tutuklama yöntemleri.....	19
2.3.2. Çözünür formda immobilizasyon.....	20
2.4. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması.....	21
2.5. Lipazlar.....	22
2.6. Lipazın Yapı ve İşlevi.....	22
2.7. Lipazların Özellikleri.....	24
2.7.1. Optimum pH.....	24
2.7.2. Optimum sıcaklık ve termal kararlılık.....	25
2.7.3. Lipazın aktivasyon ve inhibisyonu.....	25
2.7.4. İzoelektrik nokta.....	25
2.8. Lipazların Sınıflandırılması.....	25
2.8.1. Spesifik olmayan (non-spesifik) lipazlar.....	25
2.8.2. 1,3-spesifik lipazlar.....	26
2.8.3. Yağ asiti spesifik lipazlar.....	27
2.9. Lipazların Analiz Yöntemleri.....	27
2.10. Lipazların Kaynakları.....	27
2.11. Lipazların Önemi.....	28
2.12. Lipazların Kullanım Alanları.....	29
2.12.1. Lipazların endüstriyel uygulamaları.....	29
2.12.2. Uygulama alanları.....	31
2.13. Yağlar.....	32
2.13.1. Yağların kimyasal yapısı.....	32
2.13.1.1. Trigliseridler.....	33
2.13.1.2. Yağ asitleri.....	33
2.13.1.2.1. Doymuş yağ asitleri.....	33
2.13.1.2.2. Bir çift bağa sahip doymamış yağ asitleri.....	34
2.13.1.2.3. Çift bağa sahip doymamış yağ asitleri.....	35
2.13.1.2.4. Diğer yağ asitleri.....	36
2.14. Hint Yağı Bitkisi.....	38
2.15. Hint Yağı.....	39
2.15.1. Hint yağının kullanım alanları.....	40

2.15.2. Hint yağının fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	41
--	----

BÖLÜM 3.

MATERYAL VE YÖNTEM	43
3.1. Materyaller ve Kullanılan Cihazlar.....	43
3.2. Gliksal Agaroz Üzerine Lipaz İmmobilizasyonu.....	43
3.3. Aktivasyon Ölçümleri.....	44
3.4. Hidroliz/Transesterleşme Denemeleri.....	44
3.5. Ürün analizi.....	44

BÖLÜM 4.

ARAŞTIRMA BULGULARI	46
4.1. Enzim İmmobilizasyonu.....	46
4.2. Hidroliz/Transesterleşme Reaksiyonları.....	48
4.3. Ürün Analizleri.....	49
4.4. Optimizasyon Deneyleri.....	51

BÖLÜM 5.

TARTIŞMA VE SONUÇ	56
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	67

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

<i>p</i> -NFB	: <i>p</i> -nitro fenil bitürat
<i>p</i> -NF	: <i>p</i> -nitro fenol
3D	: Üç boyutlu
dk	: Dakika
s	: Saat
RA	: Risinoleik asit
GA	: Glioksal agaroz
HY	: Hint yağı
°C	: Santigrat derece
M	: Molar
mM	: Milimolar
µm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
FTIR	: Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Enzim reaksiyonu hızına karşı substrat konsantrasyonu grafiği.....	7
Şekil 2.2. Lineweaver-Burk grafiği.....	8
Şekil 2.3. Enzimlerin immobilize edilmesine yardımcı yöntemler.....	14
Şekil 2.4. Çapraz bağlanma ile immobilizasyon.....	15
Şekil 2.5. Taşıyıcı bağlama yöntemleri.....	16
Şekil 2.6. Enzimi desteğe adsorpsiyon yöntemiyle bağlama.....	17
Şekil 2.7. Kovalent bağlama ile immobilizasyon.....	17
Şekil 2.8. Kovalent bağlama immobilizasyonunda aktif görev yapan amino asit artıkları.....	18
Şekil 2.9. Enzim tutuklama yöntemi ile immobilizasyon.....	20
Şekil 2.10. Çözünür formda immobilizasyon.....	21
Şekil 2.11. Lipazların α -sarmal ve β -yaprak yapılarının şematik gösterimi.....	23
Şekil 2.12. Spesifik olmayan lipazların katalizlediği reaksiyon denklemi.....	26
Şekil 2.13. 1,3-Spesifik lipazların katalizlediği reaksiyon denklemi.....	26
Şekil 2.14. Yağ asidi spesifik lipazların katalizlediği reaksiyon denklemi.....	27
Şekil 2.15. Yağ oluşum reaksiyonu.....	32
Şekil 2.16. Basit ve bileşik trigliserit.....	33
Şekil 2.17. Hint yağı bitkisi	39
Şekil 2.18. Hint yağının yağ aside bileşimi.....	42
Şekil 4.1. İmmobilize lipaz ile p-nitrofenil bütiratın reaksiyonu.....	46
Şekil 4.2. İmmobilizasyona zamanın etkisi.....	47
Şekil 4.3. İmmobilizasyona enzim miktarının etkisi.....	47
Şekil 4.4. Hidroliz ve transesterleşme reaksiyonu.....	48
Şekil 4.5. Etanol, fosfat tamponu içerisinde gerçekleştirilen reaksiyon ürünleri ve hint yağının kromatogramları.....	49
Şekil 4.6. Risinoleik asit tayini için oluşturulan kalibrasyon doğrusu.....	50

Şekil 4.7. Hint yağı ve ürününün FTIR spektrumları.....	51
Şekil 4.8. Zamanın reaksiyona etkisi.....	52
Şekil 4.9. 2 saat reaksiyon süresinde elde edilen ürün kromatogramı.....	52
Şekil 4.10. 72 saat reaksiyon süresinde elde edilen ürün kromatogramı.....	53
Şekil 4.11. Çalkalanma hızının reaksiyona etkisi.....	53
Şekil 4.12. İmmobilize lipaz miktarının etkisi.....	54
Şekil 4.13. Hint yağı miktarının reaksiyona etkisi.....	54
Şekil 4.14. 0,5 g HY kullanılarak yapılan reaksiyon ürününün kromatogramı.....	55



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması.....	21
Tablo 2.2. Mikrobiyal lipaz kaynakları ve uygulama alanları.....	31
Tablo 2.3. Mikrobiyal lipaz endüstriyel alanlarda kullanımı.....	31
Tablo 2.4. Doymuş yağ asitleri.....	34
Tablo 2.5. Bazı önemli tek çift bağa sahip yağ asitleri.....	35
Tablo 2.6. Bazı önemli çift bağa sahip yağ asitleri.....	36
Tablo 2.7. Ender görülen bazı yağ asitleri.....	37
Tablo 2.8. Hint yağının fiziksel özellikleri.....	41
Tablo 2.9. Hint yağının yağ aside kompozisyonu.....	42

ÖZET

Anahtar Sözcükler: Lipaz, hint yağı, risinoleik asit, agaroz taneleri, immobilizasyon

Enzimlerin organik hidroliz ve dönüşümler için biyokatalizörler olarak kullanılması, moleküler tanıma ve seçici kataliz gibi birçok avantaj sağlar. Lipaz, triaçilgliserol açıl hidrolaz, hidroliz ve transesterleşme reaksiyonları için en çok kullanılan enzimlerden biridir. Bu çalışmada, lipaz kovalent bağlanma yoluyla agaroz boncukları üzerine immobilize edildi ve hint yağının etanol ortamında hidroliz/transesterleşmesini katalize etmek için kullanıldı. Hint yağı, hafif koşullarda bir risinoleik asit ve risinoleik asit esterleri üretmek için hint yağının enzimatik hidrolizi /transesterifikasyonu için bir yağ asitleri deposu ve lipazların bir trigliseritidir. Etanol ortamında, hem hidroliz hem de transesterleşme reaksiyonlarının her ikisi de oluştu. İmmobilize edilmiş lipazın aktivitesi, substrat olarak 346 nm'de *p*-nitrofenolün salınımının ölçülmesiyle test edildi. Sentezlenen immobilize lipaz, herhangi bir yüzey aktif cismi ve tuz kullanılmadan oda sıcaklığında hint yağının enzimle katalize edilen hidroliz/transesterifikasyonu için kullanılmıştır. Ana hidroliz ve transesterifikasyon ürünleri, sırasıyla, risinoleik asit ve etil risinoleat. Maksimum reaksiyon verimini bulmak için hareketsizleştirme ve hidroliz/transesterleşme koşulları incelenmiştir. %90 etanol, diğer tampon-etanol karışımından daha çözücü olarak kullanıldığında daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Yetmiş iki saatte 1 gram (g) hint yağı kullanılarak %87 (%40 risinoleik asit ve %47 etil risinoleat) dönüşüm elde edildi.

INVESTIGATION OF CASTOR OIL REACTIONS WITH IMMOBILIZED LIPASE ENZYME

SUMMARY

Keywords: Lipase, castor oil, ricinoleic acid, agarose beads, immobilization

The use of enzymes as biocatalysts for organic hydrolysis and transformations provides many advantages, such as molecular recognition and selective catalysis. Lipase, triacylglycerol acylhydrolase, is one of the most used enzymes for hydrolysis and transformation reactions. In this study, lipase was immobilized on agarose beads via covalent bonding and used to catalyze the hydrolysis/transesterification of castor oil in ethanol medium. Castor oil is a triglyceride of fatty acids and lipases can be used for enzymatic hydrolysis /transesterification of castor oil to produce ricinoleic acid/ricinoleic acid esters under mild conditions. In ethanol medium, both of the hydrolysis and transesterification reactions were occurred. The activity of immobilized lipase was assayed by measuring the release of nitrophenol at 346 nm from p-nitrophenyl butyrate as substrate. The synthesized immobilized lipase was used for enzyme-catalyzed hydrolysis/transesterification of castor oil at room temperature without the use of any surfactants and salts. The main hydrolysis and transesterification products were ricinoleic acid and ricinoleic acid ethyl ester, respectively. The immobilization and hydrolysis/transesterification conditions were investigated to find maximum reaction yield. Better results were obtained when 90% ethanol was used as solvent than other buffer-ethanol mixture. 87% (40% ricinoleic acid and 47% ethyl ricinoleate) conversion was obtained with using 1.0 g of castor oil at 72 hours.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

İnsanlar uzun yıllar boyunca enzimlerden yararlanmaktadır. Biyoteknolojik kimyasal değişimlere örnek olarak bira yapımı, ekmek yapımı, alkol fermantasyonunu sayılabilmektedir. Milattan önce 2000’li yıllarda mayalar şarap üretimi için kullanılmıştır. İşlenmemiş enzim özleri, canlı organizma kullanımından önce kullanılmıştır. İncir ağacından elde edilen incir enzimi hakkında milattan önce 600’lü yıllara ait Truva destanında sütün kesilmesi için ve peynir yapımında kullanıldığı yazılmıştır (Şirin, 2016).

Biyokimya dalının oluşumundan bu yana araştırmaların büyük çoğunluğunu enzimler üzerindeki çalışmalar oluşturmuştur. Midede meydana gelen enzimatik sindirim üzerine 1760 ile 1825 yıllarında gerçekleştirilen önemli sayılan deneyler kataliz olayını kapsamaktadır. Berzelius 1835’te ilk olarak belirli bir enzim üzerinde çalışmaya başlamıştır. *In vivo* ile diastazın nişastayı diğer kimyasallara oranla daha iyi ve daha yüksek verim alarak hidrolizlemeyi başarmıştır. Enzimlerin yalnızca canlı organizmalarda işlev gördüğünü düşünen Pasteur, fermantasyon olayının enzimlerin yardımıyla gerçekleştiğini ilk olarak 1860 yılında ispat etmesiyle birlikte ferment terimi enzimleri tanımlamak amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. 1926 yılında Summer, üreazı *Canavalia ensiformis* bitkisinde kristallendirme yöntemini kullanarak protein yapısında bir bileşik olduğunu belirterek elde etmesi enzimoloji alanında önemli gelişmeler arasına girmiştir. İlk başlarda şüphe ile karşılanan bu sonuç, 1930’lu yıllarda tripsin, kimotripsin ve pepsin enzimlerini kristallendiren Northrop’un bunların protein yapısında olduklarını kesin olarak ispatlamasından sonra doğrulanmıştır (Keha ve Kührevioğlu, 2000).

Enzimleri biyolojik reaksiyonları canlı organizmalara zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleştiren ve protein yapılarında bulunan biyokatalizörler olarak

tanımlayabiliriz (Alagöz, 2007). Bütün proteinlerde olduğu gibi enzimlerin de monomeri, amino asitlerdir. Canlı organizmalar, yaşamlarını devam ettirebilmek için birçok biyokimyasal reaksiyonlardan mesuldürler (Sümengen, 2011). Enzimler, kimyasal reaksiyonları yüksek bir seçicilikle katalizlerler ve oldukça yüksek verimlilikle ürün elde edilmesini sağlarlar. Bu kimyasal reaksiyonlar, bütün canlı organizmaların temel metabolik reaksiyonlarıdır. Enzimler endüstriye, hızlı, etkili ve daha ekonomik biyokatalitik dönüştürücüler sağlarlar (Beilen ve Li, 2002). Enzimlerin avantajları, yüksek katalitik etkinlikleri ve sahip oldukları özgünlükleri sayesinde ortaya çıkar. İstenilen son ürünün sağlanması ve istenmeyen yan ürün oluşumunu engellemek için enzimlerin substratlara karşı yüksek seçicilik göstermeleri kullanılabilir. Ayrıca enzimler, katalizlenmemiş reaksiyonlara kıyasla reaksiyon hızını 10^7 - 10^{16} kez artırırlar. Katalizledikleri reaksiyonlar arasında, literatürlerde bulunan organik kimya metotlarıyla ulaşılamayan, kompleks kimyasal transformasyon reaksiyonları vardır. Bu durum enzim çeşitlerini biyoteknolojik kullanımlar için son derece önemli hale getirmiştir (Berg ve ark., 2002). Tüm bu özellikleri dolayısıyla 1960 yılından bu yana enzimlerin endüstriyel kataliz olarak kullanımları artmaktadır (Sümengen, 2011; Özçömlekçi, 2006). Geniş uygulama alanına sahip enzimler, sanayilerde kullanım amaçlı, analitiksel amaçlı, tıpta bulgu, tedavi ve ilaç düzenlemelerinde kullanılmaktadır (Sümengen, 2011; Alptekin, 2009).

Enzimlerin fiziksel olarak bir yere tutuklanması ya da yerleştirilmesi ile beraber katalizleme gücünün korunması ve bunların yanında sürekli yenilenebilir olmasını sağlamak olarak enzim immobilizasyonunu tanımlayabiliriz. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcının fiziksel ve kimyasal özellikleri immobilize enzimin performansını (örneğin; aktivitesini, kararlılığını, seçiciliğini) direkt olarak etkilemektedir. Seçilen taşıyıcılar reaktif değil ise yardımcı bir reaktif yardımıyla aktifleştirilmesi gerekir. Aktifleştirilmiş desteklerdeki enzimlerin immobilizasyonunda düşük immobilizasyon etkinliği ve enzim kararlılığında artış veya azalış meydana gelebilmektedir (Sümengen, 2011; Alptekin, 2009; Hürrem, 2010).

Lipazlar hidrolaz bölümünde bulunan triaçil gliserol ester hidrolazlar olarak

tanımlanabilirler ve hayvan, bitki ve mikrobiyal yağların ana bileşeni olan mono, di ve triaçilgliserollerin karboksil ester bağlarının hidrolizini katalizlerler. Hidroliz sonucunda alkoller ve karboksilik asitler meydana gelir (Bakkal, 2006). Enzimler biyoteknoloji alanında kullanılır ve bunların aşağı yukarı %25'i lipazlardır (Benjamin, 1998; Mutlu 2006). Sanayi alanındaki lipaz uygulamaları bugün bile özgürce kullanılmasına rağmen yeni çağda bile enzimlerin yenilenebilir olması ile ilgili teknoloji alanındaki izlenecek yolların olumlu yönde finanse edebilmek ve sık kullanılan enzimatik proseslerde meydana gelen enzim ile ürün ayrıştırmasının oluşturduğu olumsuzlukları önlemek amacıyla, lipaz enzimleri immobilize edilir (Bailey, 1986; Webb, 1992; Benjamin ve Pandey, 1998; Paiva ve ark., 2000; Kamori ve ark., 2002; Bakkal 2006).

Hint yağı (HY), düşük maliyeti, düşük toksisitesi ve tarımsal kaynak olarak elde edilebilirliği nedenleri ile sentezlerde kullanılmaya oldukça elverişlidir (Mutlu ve Meier, 2010; Yeganeh ve Talemi, 2007). HY, diğer bitkisel yağlardan ana komponentinin bir hidroksiasit olmasından dolayı farklıdır. Esas olarak risinoleik asit (RA) (cis-12-hidroksi-9-oktadesenoik asit) esterli olan HY, diğer doğal bitkilerde görülmeyen yüksek viskoziteye, alkollerde çözünübilirliğe ve optikçe aktifliğe sahiptir (Yeganeh ve Talemi, 2007; Rogero ve ark, 2003).

Hint tohumlarından elde edilen HY, %85 kadar risinoleik asit içeren ve sıvı HY içeren modern bir HY türüdür ki buda %95 kadar risinoleik asit içeren miktarları elde etmemize izin verir. Hindistan ve Çin, dünya ülkelerinden başlıca HY üreticileridir. Yüksek RA içeriği nedeniyle HY, tıp ve veterinerlik biliminde yaygın olarak kullanılır, sahip olduğu özellikleri (örneğin, yüksek viskozite, hidroksi stabilitesi ve yüksek yoğunluklu) farklı endüstrilerde kullanılmaya uygun hale getirir. HY kullanımındaki en önemli trendlerden biri, dokuzuncu karbon atomunun sis konformasyonuna sahip doymamış bir hidroksi asit ve dokuzuncu karbon atomunun bir kiral karbonhidrat asitinin elde edilmesidir. HY hidrolizinin bilinen yöntemleri saf olmayan bir ürünü yani risinoleik asiti verir. HY'nın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan ürünü, açık renkli ve kokusuz olduğundan üretim için alternatif bir ayrıcalığa sahiptir (Meenal, 2006).

Risinoleik asite ilaç alanında oldukça büyük ilgi duyulmaktadır, çünkü bakteri öldürücü etkisi ve iltihap önleyici etkiye sahip olmasındandır. Bununla birlikte, ana uygulama alanı organik sentez, yani, bir dizi asit (sebasik, azelaik ve undesilenik), heptanal, 2-oktanol, yüzey aktif cisimleri ve diğ r değerli ürünler elde etmektir. Risinoleik aside ek olarak, dirisinoleik asit daha yüksek sıcaklıklarda tetra ve pentarisinoleik asitlerde reaksiyon sonucu birlikte oluşur. Bu sebeple, kimyasal hidrolizin, yumuşak koşullar altında, yani 35–45 C sıcaklık aralığında ve yüksek basınç olmadan saf RA elde etmemizi sağlayan enzimatik hidrolizle değiştirilmesi mantıklıdır (Gamayurova, 2013).



BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Enzimler

Canlı hücrelerde üretilen, reaksiyonları hızlandıran ya da basitleştiren, farklı maddeleri bünyesinde barındıran, reaksiyonlardan değişmeden çıkan protein moleküllerine enzim denir (Keha ve ark., 2004). Kataliz ile yapılan kimyasal reaksiyonlara göre biyokimyasal reaksiyon hızını enzimler defalarca kez arttırlar. Enzimler, substratları ile bağ yaparak tek bir ürün oluşturabilmeleri substratlara karşı iyi derecede spesifiklik göstermelerinden kaynaklıdır (Chaplin ve ark., 1990). Sanayi alanında kullanılan reaksiyonlardan canlı organizmaların özelliklerinin düzenlemesine kadar olan iyi özellik yelpazesinin yanında tabi ki sorunlarda vardır. Belirli substrat spesikliğine sahip, üretiminde harcanan değerin yüksek olması ve kararsız olmaları sorunlardan birkaçıdır (Wong ve ark., 1994). Kendi ortamlarından yalıtılmış enzimlerin aktivasyonunun düşmesi de yaşanan sorunların içerisinde (Aehle, 2004). Kimya alanındaki son zamanlarda ki gelişmeler, sanayi alanındaki yeni ihtiyaçlar bu sorunların kalkmasına yönelik çalışmaların yapılmasına olanak sağlar. Enzimlerin yüksek seçicilikleri doğal ve doğal olmayan substratlar ile birlikte istenilen ara ürün ya da istenilen son ürün elde edilebileceğini kanıtlanmasına sebep olur (Bugg, 1996).

Avantajlar:

- Substratlara karşı oldukça spesifiktirler. Sadece doğal olanlara karşı değil, kimyasal bileşiklere de uygulanabilirliğinden sadece istenilen ürün oluşarak %100 verim elde edilir.

- Katalizlere oranla binlerce kez daha hızlı kimyasal reaksiyon gerçekleşmesini sağlarlar.
- Doğal işleyiş biçimlerine sahiptirler. Bu sebepten bulundukları ortama uygun enzim aktivitesi düzenlenebilir. Enzim aktivitesi, ortam şartlarında bulunan diğer moleküllere göre değişim gösterebilir.
- Basınç altında, değişen sıcaklıkta ve fizyolojik pH'ta çalışabilirler. Bunların yanında düşük sıcaklıkta ve daha az enerjiyle gerçekleşmesini reaksiyonun aktivasyon enerjisini azaltarak sağlarlar.
- Reaksiyon sonucunda yenilenebilir ve tekrar kullanılırlar (Wiseman, 1986).

2.1.1. Enzimatik bir tepkimenin hızını etkileyen faktörler

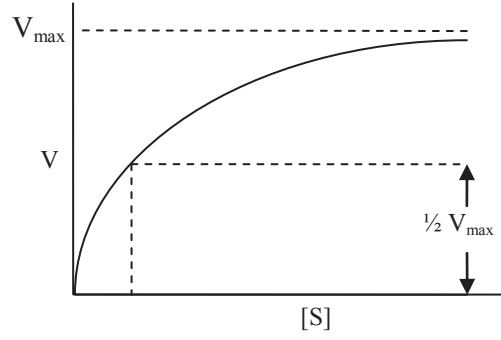
pH: Enzim aktivitesi, ortamda bulunan $[H]^+$ derişimine bağı olarak değışim sergileyebilir. Enzim içerikli reaksiyonun hız değıerinin maksimum olduğı ve her enzime özel optimum pH değıeri bulunabilmektedir.

Sıcaklık: Sıcaklık enzim içerikli reaksiyonlarda tepkime hızını çoğunlukla artırır. Bunun nedeni moleküller arası çarpışmadan kaynaklıdır. Fakat çıkabileceğı maksimum sıcaklıktan sonra sıcaklıkta artış devam ettiğı takdirde hızda azalmalar meydana gelir ve bu sıcaklık birimi optimum sıcaklıktır.

Enzim derişimi: Eğıer reaksiyon ortamında oldukça fazla substrat var ise, tepkimedeki hız enzim derişimi ile doğıru orantılı şekilde artış gösterir.

Substrat derişimi: Reaksiyon başında ortamda bulunan substrat diğıer değıerler değıişmeden arttırıldığında, ortamdaki enzim derişimi ve tepkime hızında artış meydana gelir. Reaksiyon hızı maksimum seviyeye ulaştığında eklenen substrat miktarı hızda herhangi bir değıişiklik meydana getirmez (Kutay, 2002).

Leonard Michaelis ve Maud Menten 1913'te enzimin reaksiyon hızına karşı substrat konsantrasyonu grafiğini çizerek hiperbolik eğıri ortaya çıkarmışlardır (Şekil 2.1.). Daha sonrasında bu eğırinin matematiksel ifadesini oluşturdular.



Şekil 2.1. Enzim reaksiyon hızına karşı substrat konsantrasyonu grafiği

Oluşan matematiksel ifade Michaelis-Menten eşitliği olarak adlandırılmıştır ve enzim tepkime hızı bu denklem ile hesaplanmaya başlanmıştır.

$$V = \frac{V_{mak} \times S}{K_m + S}$$

V: Tepkimenin başlama hızı

V_{mak} : Tepkimenin maksimum hızı

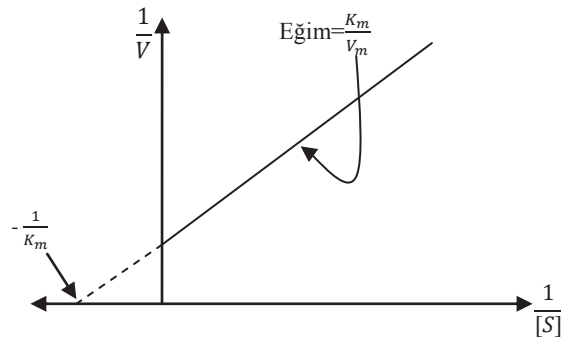
K_m : Denklem sabiti

S: Substrat derişimi

Tepkimenin maksimum hızı (V_{mak}) grafikten tam olarak tespit edilemez. Bu sebepten bu oluşturulan denklemin her iki yanı 1'e bölündüğünde yeni bir denklem meydana gelmiştir. Bu denkleme ise Lineweaver-Burk adı verilmiştir.

$$\frac{1}{V} = \left(\frac{K_m}{V_{mak}} \right) \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{mak}}$$

1/S değerlerine karşı 1/V değerleri grafiğe işlendiğinde V_{mak} ve K_m değerleri bulunabilir hale gelmiştir (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Lineweaver-Burk Grafiği

2.2. Enzim İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon, enzim teknolojisinin en eski ve en pratik tekniklerinden birisi olmuştur. İmmobilize enzimler ve bu enzimlerin uygulamaları ile ilgili çalışmalar sürekli olarak gelişmeye devam etmektedir. İmmobilize enzimler, gıda sanayinde, klinikte ve endüstriyel alanda pek çok uygulama alanında yer alırlar. Enzimlerin katalitik potansiyellerinden maksimum bir şekilde yararlanılmak isteniyorsa, en uygun immobilizasyon yönteminin belirlenerek şartların uygun hale gelmesi gerekmektedir. Enzimler için uygun immobilizasyon metodu aranırken karakteristik özelliklerini uyumu, bulunacağı ortam ve onaylanan metod ile özelliklerinin uyuşmasına önem gösterilir. İmmobilize enzimler serbest enzimlere göre daha kullanışlı ve avantajlı moleküllerdir.

İmmobilize işlemi görmüş enzimin üstünlükleri:

- İşlem sonlandığında ortamdan çeşitli yöntemlerle uzaklaştırılırlar.
- Enzim ürünleri kirletmez.
- pH, sıcaklık vb. tarzda ortam olanaklarına karşı dayanıklıdırlar.
- Yenilenebilirler. Devamlı muamelede uzun süre kullanılabilirler.
- Kararlıdırlar.
- Reaksiyon sonucu oluşacak ürünler kontrol edilebilir.
- Birçok basamaklı prosesler için uygundurlar.
- Aktiviteleri diğer serbest enzimlere oranla çok daha yüksektir.

- Otoliz olma ihtimali oldukça azdır.
- Sanayi alanında ekonomik yarar temin eder ve üretimde meydana gelecek kaybı azaltabilirler (Önal, 2000).

2.2.1. Enzim İmmobilizasyonunun tarihteki yeri

Nelsen ve arkadaşları 1916 yıllarında sükroz hidrolizinin odun kömüründe ihtiva eden maya intervazının katalizlediğini gözlemlemiştir (Nelson ve ark., 1916). Bu gözlem sonucunda çeşitli taşıyıcılar ile immobilizasyon üzerine çokça çalışma yapılmaya başlanmıştır. Grubhofer ve arkadaşları 1953'te bazı önemli enzimlerin kovalent bağlanma yöntemiyle poliaminstiren reçinesine immobilize etmiştir. Bunun ortaya çıkmasıyla birlikte pratik bir kullanım alanı ortaya çıkmıştır (Grubhofer ve ark., 1953). Mitz 1956'da iyonik bağlanmayı inceleyerek katalazın DEAE-selüloz üzerine katalaz enziminin immobilize işlemini gerçekleştirdiğini yayınladı (Mitz, 1956). 1963'te Bernfeld ve arkadaşları enzimlerin poliakrilamide jel içinde immobilize edilmesini tanımladı (Bernfeld, 1963). Çapraz bağlanma ile immobilizasyonu ise 1964 yılında Quioco ve arkadaşları karboksipeptidaz A enziminin gluteraldehit ile gerçekleştirerek ortaya sunmuşlardır (Quioco, 1964). Mikrokapsül immobilizasyonu Chang 1964'te karbonik anhidraz enzimi ile kanıtladı (Chang, 1964). İmmobilize enzimlerin sanayi alanındaki uygulanmasında adını ilk olarak duyuran isim Chibata ve çalışma arkadaşları 1969'da aminoasitleri iyonik bağlanma metoduyla immobilize ederek sonunda N-açil-D,L-amino asitleri hidroliz reaksiyonları yardımıyla L-amino asitlere dönüştürmeyi gerçekleştirmişlerdir (Chibata ve ark., 1972). Fakat Chibata ve arkadaşları bununla kalmayıp 1973'te Escherichia coli hücrelerinin jel ile tutuklama yöntemiyle immobilizasyonunu gerçekleştirdikten sonra amonyum fumarattan L-aspartat elde etmeyi başarmışlardır (Nashyan, 2012).

2.2.2. Enzim immobilizasyonunun avantajları

Enzimlerin, yüksek sıcaklıklardan ve organik çözücülerden etkilenmeleri gibi nedenlerden ötürü canlı mikroorganizmalarda gösterdikleri kararlılıklarında,

laboratuar koşullarında bir kayıp söz konusu olur. Enzimlerin immobilizasyonu bu kararsızlıkların çoğu ortadan kaldırılrsa da tamamen yok edilemez. İmmobilizasyon ile enzimin kararlılığı artar, tekrar kullanımı sağlanır, tepkimeler kontrol edilebilir ve yüksek saflıkta ürünler elde edilebilmektedir. İmmobilize enzimler, serbest hallerine oranla inhibisyonundan daha az etkilenir. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilmesi, maliyeti önemli ölçüde düşürür ve substrat ölçümleri için uygun enzim kaynakları sağlanır.

Deneyisel çalışmalar için, bitki ve hayvanlardan elde edilen enzimler, endüstriyel uygulamalar için, mikroorganizmalardan elde edilen enzimler kullanılır. Bunun nedeni, enzimlerin mikrobiyolojik kaynaklardan elde edilir olması, bitki ve hayvanlardan elde edilmesinden daha düşük maliyetli olması, üretimin zamanının daha kısa olması ve geniş aralıkta üretim yapılabilmesidir (Mateo ve ark., 2007).

2.2.3. İmmobilize enzimlerin özellikleri

Enzimler immobilizasyon işlemi sonrasında, kataliz gücü ya da termal kararlılığı, çözünme yeteneğine sahip olan eşleniklerle değişim gösterir (Kiener, 2001; Hartmeier, 1988; Trevan 1980). Bu değişimlerin iki farklı sebebi olabilmektedir, ya immobilize edilen enzim aktivitesinin artması veya azalması ya da immobilize işlemine tabi tutulan enzim ile substratı arasında meydana gelen karşılıklı etkinin çözeltinin sahip olduğu hacimden değişik olmasından kaynaklıdır. Enzim immobilizasyonları arasındaki katalizle ilgili olan niteliklerindeki farklılıklar proteinlerin sahip olduğu üç boyutlu (3D) yapısındaki değişim düşünülebilir. İmmobilize işlemi gören enzimler, sahip oldukları işlemsel stabilitesini geliştirmektedir. İmmobilize enzimler için önemli kavramlardan biridir stabilizasyon terimi. Birçok verilen emekte görülen çalışma azimliliği, immobilizasyon işlemi sırasında işlem gören enzimin fazla eklenmesiyle alakalı olduğu gösterilmiştir (Blanco ve ark., 1989).

Katalitik etkinliğin kaybı immobilize enzimler için çok büyük problem teşkil etmektedir (Zaks, 2001). Bunun sebebi olarak enzimin immobilize işlemi sırasında

sadece substratın yüzeyindeki maddelerle bağ kurması sonucu bu kayıp görülmüş olabilir. Katalitik aktivitenin kayıplarının sebeplerinden birisi de enzim ile makro molekül substrat arasındaki etki olabilir (Boundy ve ark., 1976). Oluşan sterik problemler için günümüze kadar yöntemler geliştirilmiş fakat bazıları immobilize olacak enzim kalıntılarının dikkatli seçimi, izole makro moleküler zincirlerin ağlarından oluşan taşıyıcıların seçimindendir (Guisan, 1997).

2.2.4. İmmobilize enzimlerin uygulama alanları

Enzimler geçmişten günümüze kadar bira, şarap, ekmek, peynir gibi mayalama ya da fermente işlemi gerektiren ürünlerin yapımında kullanılır. Bunların yanında ilaç yapımında da önemli yere sahiptirler. Enzimlerin izolasyonu, saflaştırılması ve yapılarının tayini ile ilgili yapılan çalışmalarda katalitik potansiyeli ve tabiatı daha iyi bir şekilde anlaşılmış olup ve endüstride bu çok faydalı maddelerden geniş ölçüde yararlanılmaya başlanmıştır. Endüstriyel katalizatör olan enzimler klasik kimyasal katalizatlara göre bazı üstünlüklere sahiptirler. İleri derecede substrat spesifikliği, istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu büyük ölçüde elimine etmekte ve sadece materyal maliyetini düşürmekle kalmayıp, çevre sorunuda yaratabilmektedirler. Bazı stereospesifik reaksiyonlar, enzimlerin yardımı olmaksızın gerçekleşmezler. Operasyon koşullarının ısıya duyarlı substratları bozma olasılığını azaltır ve operasyonun korozyon etkilerinin yanında enerji gereksinmesini düşürebilir. Reaksiyonun hızı yüksek ve reaksiyonun maliyet düşüktür. Bu avantajlara karşın enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılması oldukça pahalıdır. Çoğu enzim canlı hücre dışında çokça dayanıksızdır, çözünen formda ve sulu ortamda kullanılır. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleşir. Serbest enzimlerin katalizör olarak kullanılması birçok sakınca yarattığından immobilize enzimler tercih edilebilirler (Telefoncu, 1986; Telefoncu, 1996) .

İmmobilize enzimlerin, tıbbi, analitik ve endüstriyel uygulamalar olmak üzere üç alanda kullanım imkanı bulunmuştur. Tıbbi uygulamalara örnek olarak tedavi amaçlı kullanımlar, yapay organlar, analitik uygulamalara analiz otomatları, biyosensörlerin hazırlanması, ELISA testleri, endüstriyel uygulamalara L-aminoasit üretimleri, süt

şekerinin parçalanması ve rafinoz hidrolizi sayılabilir. Endüstriyel açıdan bakıldığında immobilize enzimlerin oldukça geniş bir uygulama alanı olduğu söylenebilir. Bu uygulama alanları sayılacak olursa, biyotransformasyonlar, gıda sanayi, deterjan sanayi, deri sanayi, tekstil sanayi ve diğer sanayiler söylenebilir. Endüstriyel uygulama olanağı bulunan enzimlerin çoğu hidrolaz sınıfına ait enzimlerdir. Endüstriyel enzimler içerisinde proteolitik enzimlerin hissesi %60, glikozidazların hissesi ise %20' dir.

Biyotransformasyonlar, enzimler ya da bunları içeren mikroorganizmalar tarafından katalizlenen kimyasal dönüşüm reaksiyonlarıdır. Amino asit dönüşümleri (amino asit, rasemik karışımlarından L-amino asit üretimi, L-amino asit sentezi, hidroksiasitlerden amino asit sentezi), antibiyotik dönüşümleri (6-aminopenisilamik asit üretimi, yarı sentetik penisilin üretimi), diğer biyokimyasal dönüşümler (L-Malik asit üretimi, ürokanik asit üretimi), organik sentezler (hidrolitik, oksidasyon-redüksiyon, glikozil transfer ve halojenleme reaksiyonları) biyotransformasyonların en önemli uygulamaları olarak gösterilir.

Gıda sanayinde immobilize enzimler oldukça geniş bir uygulama alanına sahiptirler. Genellikle hidrolaz, oksidoredüktaz ve izomeraz sınıfı enzimler (α - ve β -amilaz, glukoamilaz, glukonaz, selülaz, laktaz, glukoz oksidaz, pektinaz, proteaz, glukoz izomeraz gibi) kullanılmaktadır. Süt teknolojisi (laktozun hidrolizi), nişasta sanayi (yüksek fruktozlu mısır şurubu üretimi, maltoz üretimi), protein modifikasyonu (soya protein hidrolizatlarının hazırlanması), bira sanayi, lipid modifikasyonu (yağların enzimatik interestarifikasyonu), meyve suyu sanayi, ekmek sanayi ve aspartam üretimi immobilize enzimlerin kullanıldığı endüstriyel süreçlerdir. Gıda sanayisinde kullanılacak enzimlerin güvenilirliği ve sağlık açısından herhangi bir sakıncasının olup olmadığı mutlaka test edilmelidir.

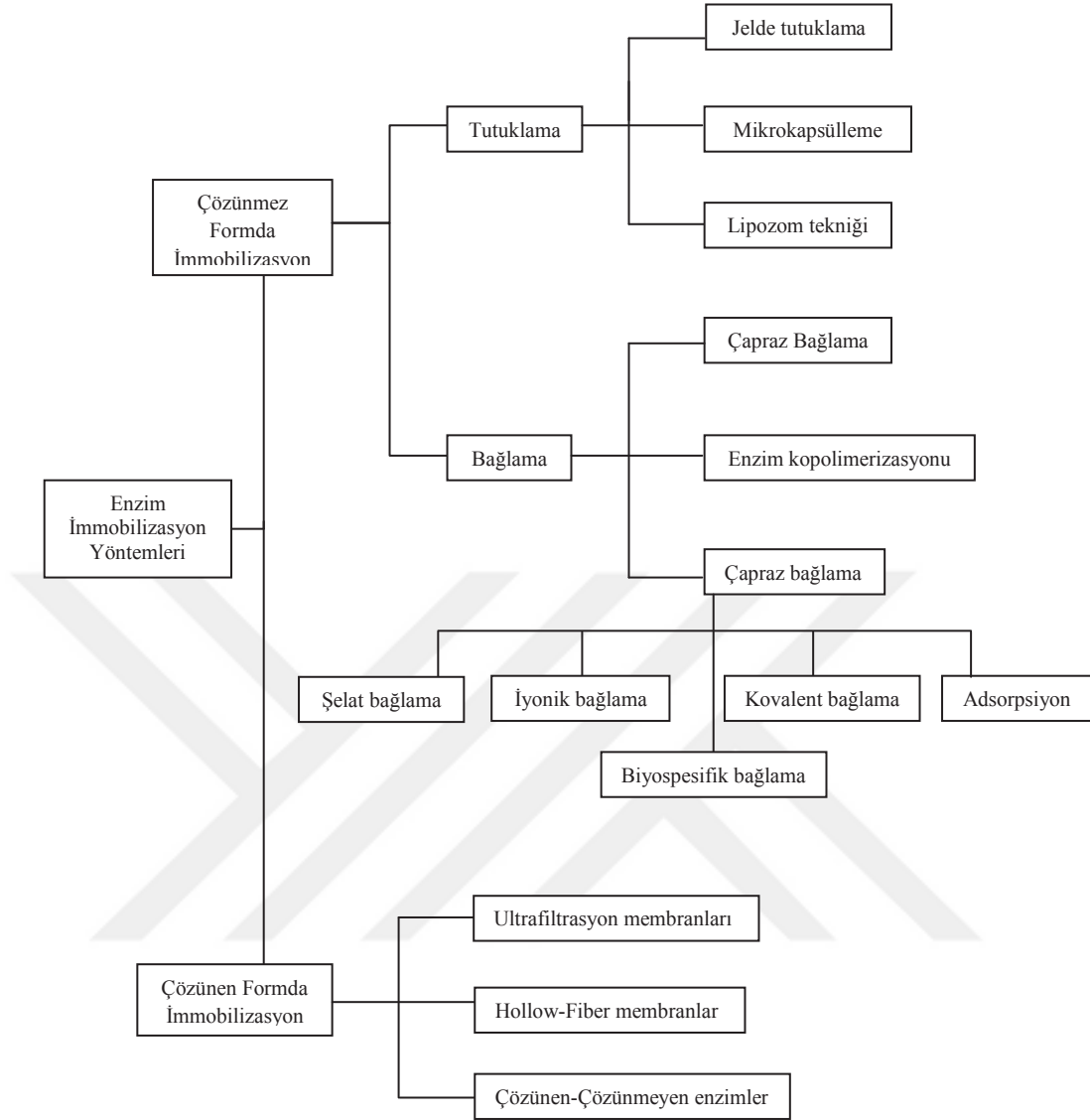
İmmobilize enzimlerden, deterjan sanayisinde, yıkama etkinliğinin artırılmasında, deri sanayinde, deri işleme prosesinin yıkama aşamasında, şeker sanayisinde rafinozun hidrolizinde, selülozun parçalanmasında, tekstil sanayisinde iplik kalitesinin arttırılmasında yararlanılmaktadır (Önal, 2000).

2.3. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyonu sisteminde bulunan bileşenler, enzim, matriks, enzimin matriksle oluşturduğu bağlanma yöntemleridir. Matrikse katı-faz destek ve taşıyıcıda denilebilmektedir (Çolak, 2011). Katalitik etkinliğinde kayıp yaşatmayan, kendi yapısında değişim göstermeyen yöntemin seçilerek enzimi bir yere immobilize ederken taşıyıcı maddenin özellikleri önemli noktalardır ve bunun sağlanabilmesi için enzimin substrat ile bağlanacağı bölgenin bilgilerinin bilinmesi gereklidir (Wang ve ark.,2008). Substrat ile bağ yapacak enzim bölgesinin immobilize işlemi esnasında korunabilir olması ve bunun için bazı ek maddelerin kullanılması mümkündür. Bu maddeler immobilize işlemi sonrasında etkinliğinin kaybına sebebiyet vermeden ortamdan ayrılabilirler (Özçömlekçi, 2006).

İmmobilize işlemi görmüş enzimin gösterebileceği özellikler, yüksek saflık ve kararlılık, ekonomik oluşu, yenilenebilir oluşu, ürün veriminin yüksekliği ve reaksiyon kontrolüne olanak vermesidir.

Günümüzde enzimler adına immobilizasyon işlemi için uygulanacak belirli bir yol bulunmaz bu sebeple immobilizasyon için en uygun şartları bulmak amacıyla çeşitli denemeler yürütülür. İmmobilizasyon uygulaması için uygun yöntemin belirlenmesi, istenilen sonun ana ögesi ele alınarak, tepkimenin ve tepkime gerçekleşmesi için kullanılan maddeler belirlenerek yapılır. Şuanda bile kullanılan immobilizasyon yöntemleri Şekil 2.3.'te gösterilmiştir. Elbette ki bu yöntemler birleştirilerek kullanılabilir (Özçömlekçi, 2006). İmmobilizasyon metodları iki gruba ayrılarak incelenebilmektedir (Alptekin, 2009).



Şekil 2.3. Enzimlerin immobilize edilebilmesine yardımcı yöntemler

2.3.1. Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri

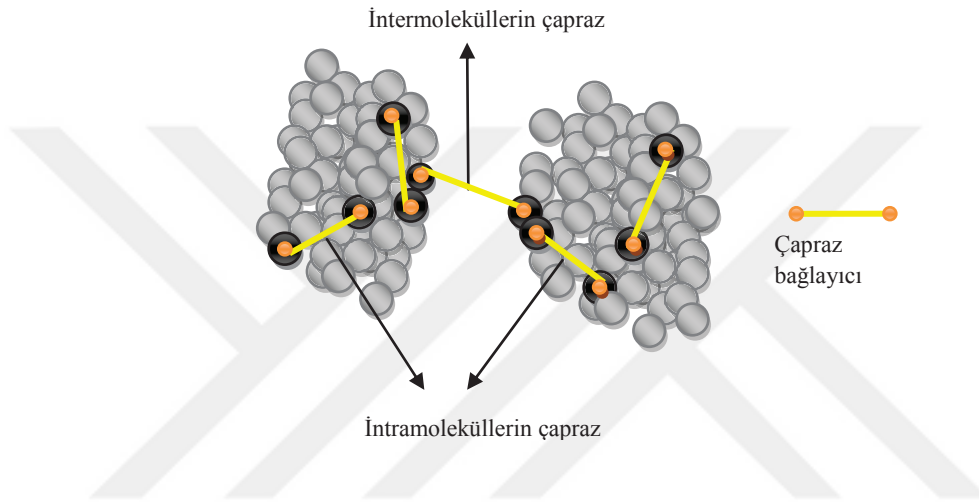
Çözünmez formda gerçekleşen immobilizasyon yöntemleri 2 tanedir ve bunlar; bağlama ve tutuklama yöntemidir.

2.3.1.1. Bağlama yöntemleri

Bağlama yöntemi ise kendi içerisinde üç gruba ayrılarak incelenebilir. Bunlar, çapraz bağlama, enzim kopolimerizasyonu ve taşıyıcıya bağlanmadır.

2.3.1.1.1. Çapraz bağlanma

Küçük molekülü birden fazla fonksiyonel grup içeren reaktifler enzim bünyesinde bulunan küçük moleküller ile çapraz bağ oluştururlar (Şekil 2.4.). En sık kullanılan tepkenler; geçiş metal iyonları, bioksiranlar, divinilsülfoler, heterosiklik halojenürlerdir (Fernandes, 2008). Gluteraldehit, kolay bulunabilirliğinden ve diğer tepkenlere göre daha ucuz olduğundan çapraz bağlamaya en uygun reaktiftir.



Şekil 2.4. Çapraz bağlama ile immobilizasyon (Alagöz 2007)

2.3.1.1.2. Enzim kopolimerizasyonu

Enzimler matrikse bağlanırken monomer gibi tutum gösterirler bu şekilde olması enzimin tutuklu kalmasına olanak sağlar.

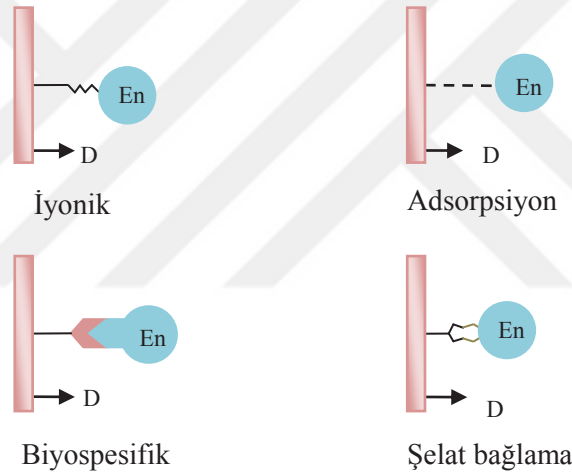
2.3.1.1.3. Taşıyıcıya bağlama

Madde üzerindeki fonksiyonel yapı, hidrofobik bölge ve iyonik gruplar taşıyıcıya bağlama immobilizasyon metodunda başı çektiklerinden dolayı kullanılacak enzimin molekül bünyesindeki yapılardan yararlanılmaktadır. Immobilizasyon işlemi gerçekleşirken doğal ya da doğal olmayan organik ve inorganik gereçler kullanılabilir. Taşıma işlemini gören katman, katı ve polimer olabilmektedir. Taşıyıcıya bağlama metodu beş grupta incelenebilir. Bunlar; iyonik bağlama,

biyospesifik bağlama, adsorpsiyon, şelat bağlama ve kovalent bağlamadır (Şekil 2.5).

İyonik bağlama: Sulu ortamda çözünmeye uğramayan taşıyıcı membranlar iyon değiştirme gücünü bünyesinde bulundurarak enzmin substratına iyonik bağlar yardımıyla bağlanmasına dayanmaktadır.

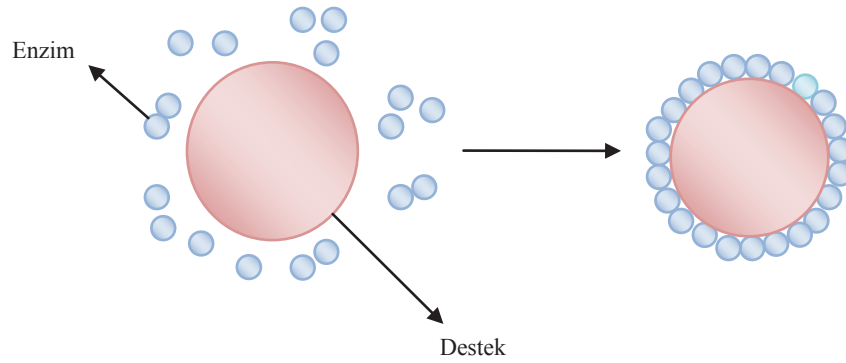
Bu yöntem ılımlı koşullarda uygulandığından enzimin sahip olduğu 3D boyutunda ve aktif merkezinde değişime sebep olmadan sonlanabilmektedir. Fakat iyonik bağlar kovalent bağlara oranla daha az kuvvetli olmasından dolayı enzimin tutulmaması ile karşılaşılabilir (Alptekin, 2009).



Şekil 2.5. Taşıyıcıya bağlama yöntemleri (D:Destek, En: Enzim)

Biyospesifik bağlama: Biyospesifik bağlama metodunda biyospesifik etkileşimden faydalanılır ve bu etkileşimler enzimler, antikolar ve lektinler arasında gerçekleşmektedir.

Adsorpsiyon: Enzim immobilizasyonu ortaya çıkışından beri kullanılan kolay yöntemdir adsorpsiyon. Suda çözünme yeteneğine sahip olmayan bir adsorbanın enzimin içerisinde bulunduğu çözelti ile birleştirilmesiyle ve ortamda bulunan enzim fazlalıklarının uygun yıkama yöntemleri kullanılarak yıkanması ve uzaklaştırılmasıyla olmaktadır. Enzim ile taşıyıcı membranlar arasında van der Waals kuvvetleri etkindir (Şekil 2.6.).

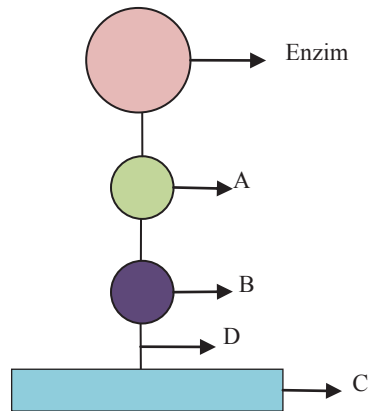


Şekil 2.6. Enzimi desteğe adsorpsiyon yöntemiyle bağlama (Alagöz, 2007)

Şelat bağlama: Geçiş elementlerinin aktif olarak kullanıldığı bir yöntem olmakla birlikte bu elementler destek katısını etken hale getirmek ve enzimin tutuklanmasını sağlamaktadırlar.

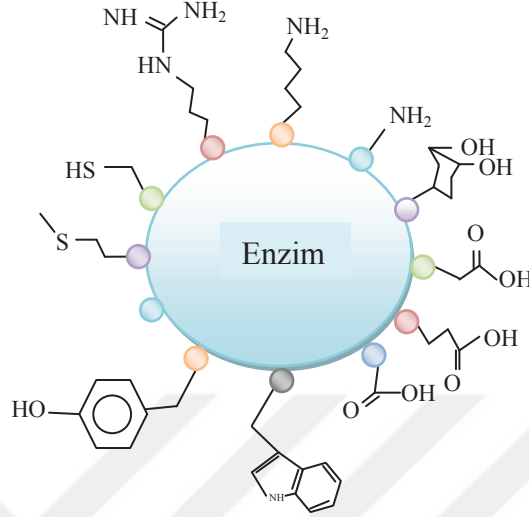
Kovalent bağlama: Suda çözünme yeteneğine sahip olmayan enzim taşıyıcısına, kuvvetli kovalent bağlarla enzimi bağlama kabiliyetine dayanan bir yöntemdir. Kovalent bağların çokça kuvvetli olması bu yöntemi çok tercih edilen immobilizasyon yöntemi haline getirmiştir ve bu sayede enzim kaçısı çok aza indirilmiştir.

Bu metod, kimyasal tepkime açısından oldukça zengindir. Enzimin yüzeyinde bulunan amino asitlerin artıkları, kovalent bağ oluşması istenen desteğin üzerinde yer alan fonksiyonel grup ile oluşan kimyasal bağ Şekil 2.7.'de gösterilmiştir (Alptekin, 2009).



Şekil 2.7. Kovalent bağlama ile immobilizasyon (A: Amino asit artığı; B: Desteğin bağ yapacak grubu ; C: Destek; D: Ara kol)

Şekil 2.8.'de kovalent bağlama ile immobilizasyon sırasında aktif olarak görev alan amino asit artıkları verilmiştir (Özçömlekçi, 2006).



Şekil 2.8. Kovalent bağlama immobilizasyonunda aktif görev yapan a.asit artıkları

İmmobilizasyon işlemlerinde kullanılacak aktif taşıyıcının özellikleri immobilize edilmiş enzimin kararlılığını, aktivitesini, seçiciliğini vb. özelliklerini etkilemektedir. Seçilen taşıyıcılar reaktif değil ise yardımcı bir reaktif yardımıyla aktive edilmesi gerekebilmektedir. Aktifleştirilmiş desteklere enzimlerin immobilizasyonunda düşük immobilizasyon etkinliği, enzim kararlılığında artış veya azalış meydana gelebilir (Hürrem, 2010).

Bağlanmada yer alabilecek fonksiyonel gruplar şunlardır; amino, karboksil, sülfidril, hidroksil, imidazol, fenolik, tiol ve treonin gruplarıdır (Çoşkun, 2007).

Kovalent bağlar yardımıyla immobilize edilmiş enzimin performansını etkileyebilecek özellikler şu şekilde sayılabilmektedir. Enzim yönlenmesi, kimyasal bağın yapısı, enzimin bağlanma ortamının özellikleri, enzim ve destek arasında oluşan bağın sayısı, desteğin yüzeyindeki ya da desteğin içindeki enzim dağılımı, desteğin fiziksel özellikleri (gözenek büyüklüğü, geçirgenliği, şekli vb.), immobilizasyon sırasında ya da immobilizasyon sonrasında enzimin konformasyonu, desteğin kimyasal yapısı (yapının kimyasal bileşimi, aktif fonksiyonel gruplar, aktif olmayan fonksiyonel gruplar).

İmmobilizasyon işlemi kovalent bağlama yöntemi ile gerçekleştirilmiş enzimlerin avantajları:

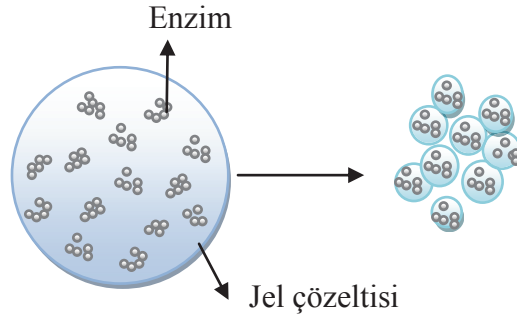
- Kuvvetli kovalent bağ sebebiyle, yararlanılacak basamakta kayba ve bozunmaya sebebiyet vermez,
- Enzim immobilizasyon sonrasında substratı ile bağını zahmetsiz şekilde kurabilmektedir bunun sebebi ise enzimin desteğin üzerine kuvvetli kovalent bağlar ile tutturulmasıdır,
- Isı istikrarının yükselişi enzim ile destek olarak kullanılan madde ile güçlü etkileşimler meydana getirmesidir.

İmmobilizasyon işlemi kovalent bağlama yöntemi ile gerçekleştirilmiş enzimlerin dezavantajları:

- Umumi olarak bakıldığında destek yüzeyleri yenilenebilir olmamaktadır,
- İmmobilizasyon işleminin gerçekleşmesi için gerekli olan uygun şartların bulunabilmesi zordur,
- Enzimlerin etkinlikleri modifikasyonlar sebebiyle bozunma gösterebilirler,
- Kuvvetli kovalent bağlar enzimlerin olağan davranışlarını engelleyebileceğinden dolayı enzimin etkinliğinde düşüş meydana getirebilmektedir.

2.3.1.2. Tutuklama yöntemleri

Bu immobilizasyon yönteminde enzim bir bölgede sabit tutulmaya zorlanarak oldukları yerden çıkamayabilirler ve polimer matrikste bulunan keseciklerde gerçekleştirilmelerinin yanında yarı saydam katmanlarda mikrokapsülleme ile misiller yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemde enzim taşıyıcıya bağlanmadığından dolayı kovalent bağlama yöntemi ile immobilizasyon ve çapraz bağlama ile immobilizasyon işlemlerinden ayıran özelliğidir (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. Enzimin tutuklama yöntemiyle immobilizasyonu (Alagöz, 2007)

Bu yöntemde ayrıca kendi içerisinde çeşitlerine ayrılabilir. Bunlar; polimer matrikse tutuklama, mikrokapsülleme, lipozom tekniğidir.

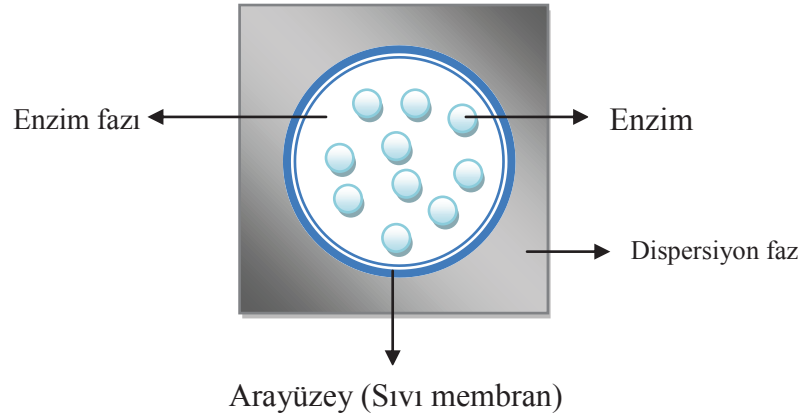
2.3.2. Çözünür formda immobilizasyon

Bu metodta enzimin taşıyıcısıyla kimyasal ya da fiziksel etkileşiminden ziyade, yarı saydam bir çeper ile kaplandığında, enzimin serbest hareketi için oldukça yerin hazırlandığı metottur (Şekil 2.10.). Çözünür formda immobilizasyon işlemi kimyasallara ya da kimyasal bir tekniğin kullanılmasına gerek kalmadan, zahmetsiz sonuç veren yöntemlerdendir.

Enzimlerin geometrisi, esneklik ve katalitik eylemlerinin değişmeden gerçekleşebilmesinin nedeni enzimin bir yere bağlı olmamasından kaynaklanmaktadır. Fakat kullanılan yarı saydam membrandan substrat geçisi zor olacağından bu yöntemin en büyük dezavantajı budur.

Enzimin etkinliğinin artması substratın boyutuna bağlıdır. Çünkü bağlanacak substrat ne kadar küçükse membrandan geçişide o kadar kolay olmaktadır.

Enzimlerin bu yöntem uygulanmadan önce daha kararlı olması gerekmektedir. Bunun sağlanması için enzimin cinsine göre düşük ya da yüksek molekül ağırlığına sahip maddelerle kimyasal reaksiyonlarla değiştirilmesi gerekebilmektedir (Hürrem, 2010).



Şekil 2.10. Çözünür formda immobilizasyon

2.4. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması

Enzim immobilizasyonu için tek bir yöntem bulmak mümkün olmamıştır. Bunun nedeni ise her enzimin yapısının farklı olması, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin farklılığı, ana ürünün ve kendisine uygun olacak substratın farklı olmasını istemesinden kaynaklıdır. Bu sebeplerden ötürü bir enzimin immobilize edilmesi istendiğinde farklı metodlar önerilir. İmmobilizasyon yöntemlerin kıyaslanması Tablo 2.1.'de sergilenmektedir (Alptekin, 2009).

Tablo 2.1. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması

Karakteristik	Fiziki Absorpsiyon	İyonik Bağlama	Şelat ve Metale Bağlanma	Kovalent Bağlama
Hazırlama	Kolay	Kolay	Kolay	Zor
Bağlanma Gücü	Zayıf	Orta	Orta	Güçlü
Enzim Aktivitesi	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Destek Yenilenebilirliği	Mümkün	Mümkün	Mümkün	Nadiren
İmmobilizasyon Maliyeti	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek
Kararlılık	Düşük	Orta	Orta	Yüksek
Genel Uygulanabilirlik	Evet	Evet	Evet	Hayır
Enzimin Mikrobiyal Ataklara Karşı korunabilmesi	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır

2.5. Lipazlar

Lipazlar triaçilgliserol açıl hidrolaz sınıfında bulunan bitkisel ile hayvansal yağların olağan şartlarda tersinir hidrolizinde kataliz görevi gören enzimler olarak karşımıza çıkarlar. Sadece hidroliz tepkimelerini değil esterifikasyon, transesterleşme tarzı tepkimelerde de kataliz görevi yaparlar. Lipaz enzimi lipid-su ara yüzeyinde aktiftirler (Chen ve ark., 2003; Sayari ve ark., 2005), suda çözünmeyen uzun zincirli trigliseritlere karşı maksimum aktivite göstermişlerdir (Droge, 2004).

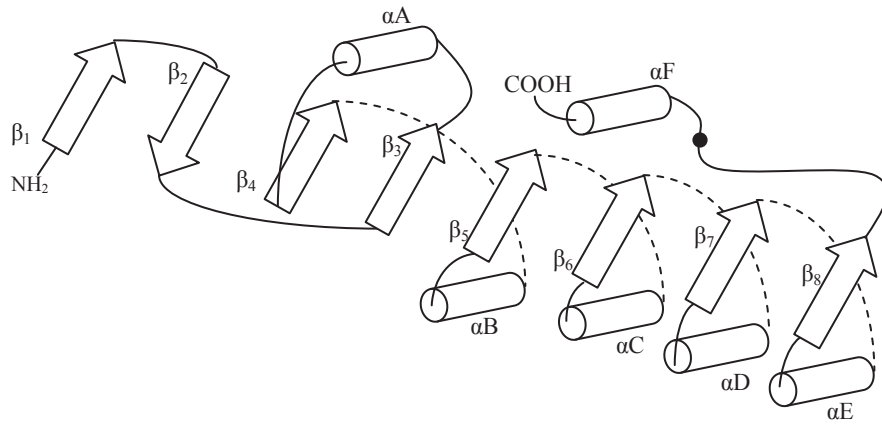
Sulu ve susuz ortamlarda etkin olan lipazlar, sanayi ve tıpta oldukça mühim yere sahip olmuşlardır. Uygulama alanları oldukça geniştir ve süt endüstrisi, kağıt yapımı, besin endüstrisi, deterjan alanında ve organik sentez alanlarında kullanılmak üzere oldukça ümit veren uygulama alanına sahiptirler (Bjorkling ve ark., 1991).

Lipazlar, genellikle hidroliz reaksiyonları ve sentez ya da açıl değişim reaksiyonları arasında farklı olabilen yüksek oranda kimyasal, bölgesel veya enantioselektif bütün reaksiyonları gerçekleştirebilmektedirler (Gunstone, 1999). Enzim alanında önemli bir yere sahip olan lipazların yerinin genişlemesinde, enzimin enantio seçiciliği, belirli bir bölge seçmesi ve kendisine ait substrat özgünlüğü sayesinde oldukça büyük etki göstermiştir (Yang ve Rhee, 1992).

2.6. Lipazın Yapı ve İşlevi

Hemen hemen tüm enzimler küresel protein yapısındadır ve lipazlarda onlara dahildir. Diğer enzimlerde olduğu gibi lipazların da uzun, düz zincirli ve kıvrımlı amino asitlerden oluşan 3D yapısı vardır. Lipazların 3D yapısal özelliği Şekil 2.10.'da gösterilmiştir ve α -heliks tarafından her iki yandan çevrelenmiş sekiz paralel β -yapraktan oluşarak hidrolazı bir α/β yapısı izler. 1958 yılında Sarda ve Desnuelle ara yüzey aktivasyonu olayını araştırarak, lipazların etki mekanizmasını kinetik olarak söylemişlerdir. Buna göre, lipazların aktivitelerinin çözünen substratlara karşı zayıf, ancak çözünmeyen substratlara karşı oldukça fazla olduğu bulunmuştur. Bu özellikleri ile lipazlar, suda çözünen ester moleküllerine etki eden esterazlardan

oldukça farklıdır. Uzun zamandan beri lipazlar, suda agrağı olan moleküllerin hidrolizinde aktif olan, özel esteraz sınıfı olarak anılırlar. Esterazlar, lipazlardan arayüzey aktivasyonu göstermemeleri ve etki ettikleri substratların farklılıklardan dolayı ayrılabilirler. Esterazlar, uzun zincirli yağ asitlerin esterlerini hidrolizlemezler, suda çözünebilen substratları isterler (Schmid ve ark., 1998; Bornscheuer ve ark., 2002). İlk kez insan pankreatik lipazı ve *Rhizomucor miehei* lipazlarının yapıları, X-ışını kırınım yöntemi ile 1990 yılında ortaya çıkarılmıştır. Bu lipazlarda, bir kapağın aktif bölgeyi kapladığı görülerek, daha sonraki araştırmalarda, lipaz ve substrat analogları arasındaki ortak kristallerin X-ışını yapılarından, lipid-su arayüzeyi varlığında, kapağın konformasyonel bir yeniden düzenlenme ile aktif bölgeyi, substratı kabul edebilecek hale getirdiğı ortaya çıkarılmıştır (Pleiss ve ark., 1998). Ancak, Avrupa Lipaz Projesi çerçevesinde, 1990-1994 yılları arasında 24 laboratuarda, yüksek saflıktaki lipazlar üzerinde gerçekleştirilen yapısal ve biyokimyasal çalışmalar sonucunda tüm lipazların arayüzey aktivasyonu göstermediğı bulunmuştur. Örneğın, tersiyer yapıları bilinen *Pseudomonas glumae* ve *Candida antarctica* (CAL-B) lipazları da aktif bölgelerini kaplayan amfipatik kapağına sahip oldukları halde, arayüzey aktivasyonu göstermezler (Schmid ve ark., 1998). X-ışını yapı araştırmaları tüm lipazların α/β hidrolaz kıvrımailesinden olduklarını ve α sarmal ve β yaprakların spesifik dizininden oluşan ortak bir yapıya sahip olduklarını gösterir. α/β Hidrolaz kıvrımı, amfipatik iki α -sarmal arasına sıkışmış, merkezi, sekiz şeritli hidrofobik β -yapraktan oluşur. Şekil 2.11.'de bu yapı şematik olarak gösterilmiştir (Schmid ve ark., 1998; Pleiss ve ark., 1998).



Şekil 2.11. Lipazların α -sarmal ve β -yaprak yapılarının şematik gösterimi (Silindirler α -sarmalları, oklar da β -yaprak yapıları simgelemektedir. Aktif bölge kalıntıları siyah yuvarlaklar halinde gösterilmiştir. Ser, $\beta 5$ 'ten sonra, Asp/Glu $\beta 7$ 'den sonra, His ise $\beta 8$ ile αF arasında yer almaktadır).

Lipazların birincil yapılarının amino asit sayısında büyük farklılıklar olmasına rağmen, bütün lipazların ortak özelliği aktif konumlarının üç serin amino asit olan aspartat, glutamat ve histidinden oluşmuş olmasıdır. Lipazların aktif bölgesindeki kapakların büyük bir bölümü yüzeysel sarmal özelliğindedir. Katalitik aktivitenin tam gerçekleşebilmesi için lipazda olmayan ek protein bileşenli *proco lipazları* adı verilen yapılar gerekmektedir.

Lipazların yapısı ve fonksiyonları geniş kapsamlı olarak incelenmiş ve 1990 yılında Winkler ve ark. pankreasın lipaz yapısını aydınlığa kavuşturmuşlardır. Üç yıl sonra Van Tilbeurgh ve ark. ara yüzeyi harekete geçirecek mekanizmayı ortaya çıkarmışlardır. Yani, kataliz sırasında kısa bir α -sarmal tamamen farklı bir uyum benimser ve geri enzimin aktif sitesine bağlamak için zemin sağlayan lipaz, aktivasyona sebep olurlar. Aksi halde, su-lipid ara yüzey yokluğunda, lipaz ve inaktif durumda bulunan bir kapak aktif sitesini kapsamaktadır (Winkler, 1990; Tilbeurgh, 1993).

2.7. Lipazların Özellikleri

2.7.1. Optimum pH

Yüksek pH'larda enzimlerin genellikle etkinlikleri yok olur. Optimum pH enzimlerin aktivitelerinin en yüksek olduğu pH'a geldiklerinde okunan değerdir. Çok düşük ya da çok yüksek pH gösteren enzimler vardır. Bunlar istisnai durumlardır ve çoğunlukla optimum pH aralığı 4,5 ile 8,5 arasındadır. Eğer bu aralıklarda optimum pH düzeyine sahip bir enzimin pH değeri yükseltirirse enzimin aktivitesi düşecektir bunun nedeni ise protein yapısında oluşan bozulmalardır ve eski haline geri dönemez (Fennema, 1985).

Mikrobiyal lipazların önemli özyapısal niteliklerini oluşturan değerler pH:7 ile 9, sıcaklık ise 30 ile 40°C'dir. En iyi aktivitelerini bu değerler arasında gösterirler (Ollis ve ark., 1992; Fadioğlu, 1996).

2.7.2. Optimum sıcaklık ve termal kararlılık

Lipazlar 30 ile 40°C arasında genellikle maksimum aktivite gösterirler. Hayvan kaynaklı ve bitki kaynaklı lipazlar, mantar ile bakteri lipazlarına oranla termal istikrarı azdır (Fadıoğlu, 1996).

2.7.3. Lipaz aktivasyonu ile inhibisyonu

Ağır metallerin lipazların aktivasyonuna azalma sağladığı, alkali metallerin ise artış sağladığı incelemeler sonucu ortaya çıkmıştır ve bulgular sonucu lipaz aktivitesinde artış meydana getiren iyonun Ca^{2+} olduğu bulunmuştur. Sn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} 'nin tuzları ve bazı boronik asitler lipaz enziminin aktivitesinde engelleme meydana getirdiği bulunmuştur (Akoh ve ark., 1998).

2.7.4. İzolelektrik nokta

Proteinlerin yükleri sıfır değerinden uzaklaştıkça çözünme değerlerinde artış meydana gelir. pI değerine yakın noktalarda sulu çözeltilerinde az çözünürler, pI değerlerinden uzaklaştıkça çözünme değerleri artar ve anlaşıldığı üzere pI değeri net yükün sıfır olduğu noktadır (Kutay, 2002; Whellcuright, 1991).

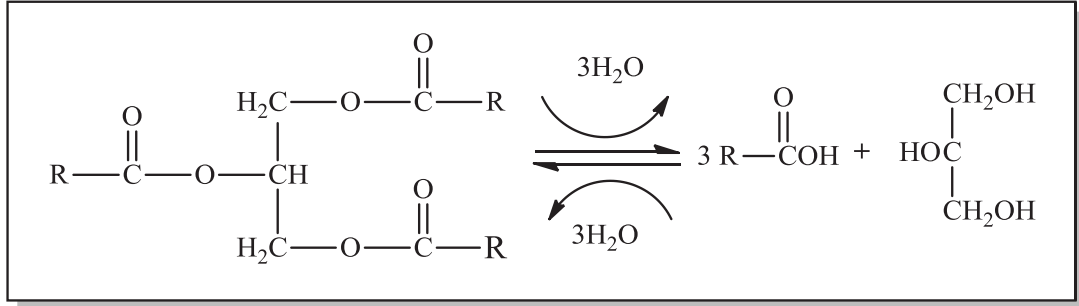
2.8. Lipazların Sınıflandırılması

Gösterdiği karakteristik özelliğe göre spesifik olmayan lipazlar, 1,3-spesifik lipazlar ve yağ asiti spesifik lipazlar olarak üç grupta incelenebilirler (Telefoncu, 1997).

2.8.1. Spesifik olmayan (non-spesifik) lipazlar

Spesifik olmayan lipazlar kümesine dahil olan enzimler, trigliseridlerin bünyesinde bulunan açıl grupları bütünden ayırabilme özelliğine sahiptirler ve reaksiyon sırasında oluşan ara ürünler diaçil ve monoaçilgliserinlerdir. Trigliseridlere

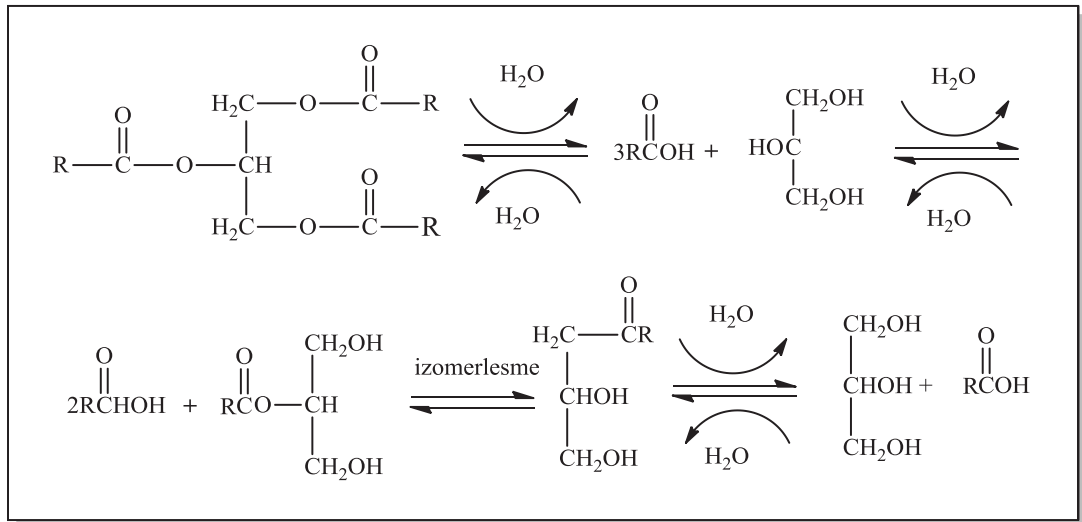
parçalanma işlemi uygulandığında gliserin ve yağ asitlerine parçalanırlar (Şekil 2.12.).



Şekil 2.12. Spesifik olmayan lipazların katalizlediği reaksiyonun denklemi

2.8.2. 1,3-spesifik lipazlar

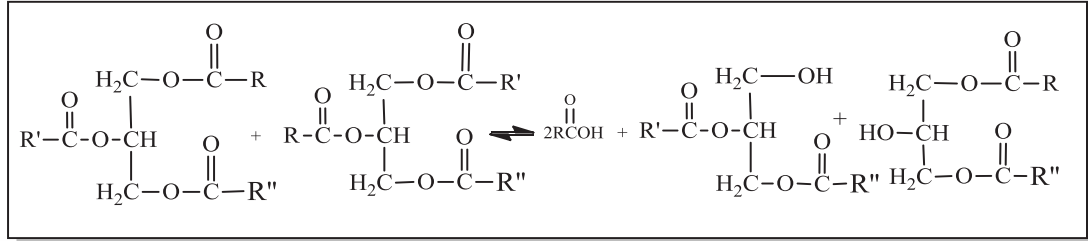
1 ile 3 konumlarından özellikli bir şekilde nötral yağları hidrolizleyebilmektedirler. Bu tepkimelerin sonucunda çeşitli açilgliserinler meydana gelir. Bu şekilde olan açilgliserinler enzimlere tekrar substrat olarak görev yapabilmektedirler. Trigliseridleri glisin ve yağ asitlerine parçalayarak spesifik olmayan lipazlarla aynı işlemi görmektedirler (Şekil 2.13.).



Şekil 2.13. 1,3-Spesifik lipazların katalizlediği reaksiyon denklemi

2.8.3. Yağ asiti spesifik lipazlar

Şekil 2.14.'te görüldüğü gibi yağ asitleri meydana getirdiği ester bağlarının parçalanmasını sağlamaktadırlar. Bu yağ asitleri açilgliserinlerde bulunan özel yağ asitlerindendir.



Şekil 2.14. Yağ asidi spesifik lipazların katalizlediği reaksiyonun denklemi

2.9. Lipazların Analiz Yöntemleri

Enzimatik bir tepkimenin hızının tayini olarak enzim aktivitesini tanımlamak mümkündür, bu sebepten dolayı normal bir kimyasal tepkimenin hızını bulmak için hangi yollar izleniyorsa enzim aktivitesini bulmak içinde o yollar izlenebilir. Aktivasyonu ölçerken ortamdan eksilen substratı veya oluşan ana ürünün miktarını tayin ederek aktivite ölçümü yapılabilmektedir. Lipazlar, trigliseridleri hidrolize ederler sonucunda yağ asitlerinin ve gliserolün ortaya çıkmasına sebep olarak, lipaz enzimlerinin miktarını bulmak amacıyla çözümleme yöntemleri olarak serbest yağ asitlerinin analiz edilebilmesi kriterleri etrafında geliştirilir. Yağ asitlerinin oluşumlarını tespit etmek amacıyla çeşitli medodlar uygulanabilir. Bunlar; kalitatif ve kantitatif, titrimetri, kromotografik cihazlardır (Beisson ve ark., 2000).

2.10. Lipazların Kaynakları

Lipaz elde etmek için bitkisel kaynakları, hayvansal canlı dokuları ve organizmalar kullanılmaktadır. Hayvansal kaynaklı lipazlar, canlı doku ile vücutta bulunan sıvılardan çoğunlukla pankreastan, bitki kaynaklı lipazlar ise kabuk ve köklerde bulunarak yağlı tohumlardan elde edilmektedir (Mukherjee ve ark., 1994). Lipaz enzimi yağ miktarı çok olan fındık, ayçiçeği, zeytin gibi bitkilerde bulunabilir

(Arpigny ve ark., 1999). Mikroorganizmalarda doğal halde bulunan lipazlar, üretiminin zahmetsiz olması ve hidrolitik, yapay tepkimeyi katalizleme özelliğinden ötürü yüksek miktarlarda kullanılan mikrobiyal kaynaklı lipazlardan olmuştur. Ökaryot hücreye sahip canlılarda lipaz, tekrardan meydana gelmek, yağ sindirimi, absorpsiyon ve lipoproteinlerin kimyasal dönüşümleri içinde olmak üzere metabolitik reaksiyonların gerçekleşmesi için gerekli yapı taşlarıdır. Lipazlar bitkilerde ihtiva ederken enerji barındıran dokularda bulunurlar (Balashev ve ark., 2001). Lipazlar doğal ortamda oldukça fazla bulunmasına karşın (Klibanov, 2001), mikrobiyal lipazlar tecimsel olarak önem arz eder (Saxena ve ark., 2003).

Lipaz barındıran canlı dokuları, enzim elde edilirken bulundukları hücrenin çeperinin parçalanması gerekebilmektedir, bu sebepten lipazları bitki ve hayvan dokusundan ayırtmak fazlaca zahmetli bir işlemdir. Zahmetin ortadan kalkması için öncelikle hücrenin parçalanmasını sağlayacak fazladan ürün gerekmektedir fakat hücre parçalanırken enzim bu sırada zarar görebilir (Taipa ve ar., 1992).

Hücre dışı lipaz üretimi sağlayan mikroorganizmalar, endüstriyel alanda fazlaca ihtiyaç duyulan mikrobiyal lipazların temin edilmesini zahmetsiz ve kazançlı hale getirmişlerdir (Rathi ve ark., 2001; Sharma ve ark., 2001). Mikrobiyal lipazlar istenildiği kadar üretilebilme olanağına sahip olmalarından dolayı (Jaeger ve ark., 2002) sanayi alanında diğer lipaz çeşitlerine göre daha da önemli hale gelmişlerdir (Gill ve ark., 1997). Mikrobiyal lipazlar kararlı olmalarından ötürü oluşturdukları ürünler kullanışlı ve güven teşkil ederler (Wiseman, 1995). Lipaz üretimine katkı sağlayan mikroorganizmalardan olan küf, maya ve bakteriler (Sharma ve ark., 2003), değişik alanlardaki topraklar (Jinwal ve ark., 2003), endüstriyel atıklar (Gombert ve ark., 1999), kompost yığınları (Rathi ve ark., 2000; Tsai ve ark., 2007), kömür madenleri (Wang ve ark., 1995) ve sıcak su kaynakları (Castro-Ochoa ve ark., 2005; Li ve Zhang, 2005) gibi farklı habitatlardan izole edilerek elde edilmişlerdir.

2.11. Lipazların Önemi

Endüstri alanında kullanılan enzimler, çeşitli yöntemlerde yürütülebildiklerinden

dolayı bilhassa mikrobiyal olarak karşımıza çıkanlara yönelik istek artış göstermektedir. Zahmetli ve de maliyetli kimyasal reaksiyonlardan daha ön plana çıkan enzim içerikli tepkimeler avantajlarından dolayı cazip hale gelmişlerdir. Günümüzden on yıl öncesi önemi çokça artan lipazlar, bilhassa organik bileşim sahasında diğer enzimlere oranla fazlaca ehemmiyeti artmıştır.

Lipazlardan birçok alanda ilaçların tayininde, bitkisel yağ amaçlı üretilen maddelerin tayininde, yakıt tayininde, kişiye özel ürünlerin tayini ve aroma verici ürünlerin sentezinde faydalanılmaktadır. Geniş kullanım alanına sahip olan lipazlar kimyacıların, eczacıların, biyofizikçilerin, süreç mühendislerinin son zamanlarda ilgi odağı olmuştur.

Hidrolazlar grubuna ait olan lipazlar hiçbir kofaktöre ihtiyaç duymazlar (Jaeger ve ark., 1994). Sulu ortamda düşük çözünme yeteneğine sahip olan trigliseridler lipazların saf substratlarıdır. Lipaz enzimi sulu ortamda çözünmeyen substrat ile enzimin içerisinde çözünemediği sıvı faz ile oluşan ester bağlanmasının hidroliz işlemini katalizleyebilmektedirler. Bir reaksiyon sırasında eğer su yok ise lipazlar tepkimeyi ters yöne çevirerek yağ asitleri ile gliserolden gliserid elde edilmesine olanak sağlar.

Transesterleşme, peynir için değişik aromaların geliştirilmesinde, hayvanlar için özel üretilen mamaların üretiminde tadın güzelleştirilmesinde kullanılan yöntemlerde ester bağlarına rastlanır, lipazlarda bu ester bağlarına etki eder. Şuanda bile kullanılan uygulamalar arasında yer alan organik asit ve alkoller ile ester sentezi çözücüleri için lipaz kullanımı önerilmiştir (Seren, 2013).

2.12. Lipazların Kullanım Alanları

2.12.1. Lipazların Endüstriyel Uygulamaları

Endüstriyel uygulamalardaki potansiyelinden dolayı mikrobiyal lipaz üretimine ilgi son yıllardır giderek artış göstermektedir. Protein ekstraksiyonu ve saflaştırma

metotları, genetik mühendisliği ve buna bağlı olarak klonlama çalışmalarının ilerlemesi ile lipaz katalizli reaksiyonların klasik kimyasal yöntemlere kıyasla, ticari açıdan daha uygun alternatif oluşturacağı düşünülebilir.

Ekolojik kaygılar da lipaz kullanımını desteklemektedir, lipaz katalizli reaksiyonlar canlı metabolizmasında gerçekleşen metabolik yollara eşdeğer olduğundan bu reaksiyonlar, kimyasal katalizli reaksiyonlara göre çevre açısından sorun oluşturmazlar (Jaeger ve Reetz, 1998). Bu uygulamalara örnek olarak; gıda katkısı (lezzet artırıcı), kozmetik (lipidlerin uzaklaştırılması), eczacılık (gıdalardaki katı ve sıvı yağların sindirimi), kaliteli kimyasallar (ester sentezleri), deterjanlar (yağların hidrolizi), atık su arıtımı (yağ kalıntılarının uzaklaştırılması ve ayrılması), dericilik (hayvan derisindeki yağların uzaklaştırılması), medikal (kan trigliserid tayini) verilebilir (Kirk ve ark., 2002). Bunun yanı sıra lipazların diğer avantajları;

- Sterospesifiklik, seçimlilik ve substrat seçimliliği gibi özellikleri sayesinde kimyasal katalizörlere göre daha kaliteli ürün üretimine imkan tanınması,
- Düşük aktivasyon enerjisine gereksinim duymalarından ve ılımlı koşullarda tepkime vermelerinden dolayı, düşük sıcaklık sebebiyle tepkime sonucu çıkan ürünler sıcaklık sebebiyle herhangi bir zarara uğramadan alınabilmektedir.

Yıkama esnasındaki yağ uzaklaştırma işlemi, lipolitik yıkım gerektirdiğinden sentetik kimyasal deterjanlar yerine enzim içeren deterjan üretimi lipazlar için büyük alan oluşturmuştur. Yüksek hızla gelişim göstermekte olan biyoteknoloji alanı açısından mikrobiyal lipazlar büyük ölçüde önem teşkil etmektedirler. Poliüretan ve yağ atıklarını bölüştürme işleminin hızının artması sebebiyle lipazlar kolaylıkla kullanılabilirler. Yaygın bir şekilde kullanılan ticari lipazlar Tablo 2.2.'de verilmiştir.

Tablo 2.2. Mikrobiyal lipaz kaynakları ve uygulama alanları

Tip	Kaynak	Uygulama Alanı	Üretici Firma
Fungal	<i>C.rugosa</i>	Organik sentez	Amano, Biocatalysis, Boehringer

Tablo 2.2. (Devamı)

Tip	Kaynak	Uygulama Alanı	Üretici Firma
Fungal	<i>C.antarctica</i>	Organik sentez	Mannheim, Novo, Nordisk
Fungal	<i>T.lanuginosus</i>	Deterjan katkısı	Novo Nordisk, Biocataliysis, Amano
Fungal	<i>R.miehei</i>	Gıda işlenmesi	Boehringer, Mannheim, Amano, Fluka
Fungal	<i>B.cepacia</i>	Organik sentez	Genencor
Bakteriyel	<i>P.alcaligenes</i>	Deterjan katkısı	Genencor
Bakteriyel	<i>P.mendocina</i>	Deterjan katkısı	Asahi
Bakteriyel	<i>Ch.viscosum</i>	Organik sentez	Biocataliysis

2.12.2. Uygulama alanları

Lipazlar bugün bile endüstriyel alanda birçok tepkimelerin ihtiyaç kaynağı olmasından ötürü kullanımı çokça göze çarpmaktadır. Tablo 2.3.'te lipaz çeşitlerinin hangi amaçla hangi ürünlere etki ettiği verilmiştir (Chen ve ark., 2003; Kirk ve ark., 2002).

Tablo 2.3. Mikrobiyal lipazların endüstriyel alanlarda kullanımı

Sektör	Etki	Ürün
Ekmekçilik	Tatlandırma ve raf ömrü uzatma	Unlu mamüller
Meşrubat	Aroma	Meşrubat
Kimyasal	Enantioseçicilik	Kiral yapılar ve kimyasallar
Temizleme	Sentez ve hidroliz	Kimyasallar, surfaktanlar gibi temizleme ajanlarının uzaklaştırılması
Kozmetik	Sentez	Emülsifiyerler, nemlendiriciler

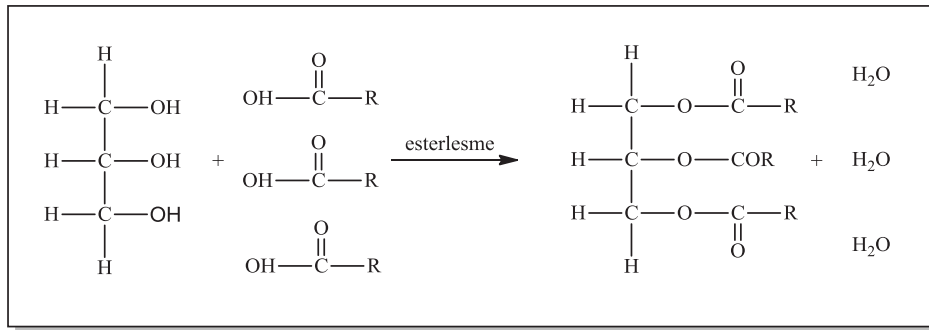
Tablo 2.3. (Devamı)

Sektör	Etki	Ürün
Süt	Sütteki yağın hidrolizi, peynir olgunlaştırılması, tereyağının modifikasyonu	Tatlandırıcı, peynir, tereyağ
Katı ve sıvı yağlar	Trans-esterifikasyon	Kakao yağı, margarin
Gıda süsleme	Kalite arttırma	Mayonez, süsleme
Dericilik	Hidroliz	Deri işleme
Et ve balık	Tat geliştirme ve yağ uzaklaştırması	Et ve balık ürünleri
Kağıt	Hidroliz	Kağıt ürünleri
Sağlıklı gıda	Trans-esterifikasyon	Sağlıklı gıda ürünleri

2.13. Yağlar

2.13.1. Yağların kimyasal yapısı

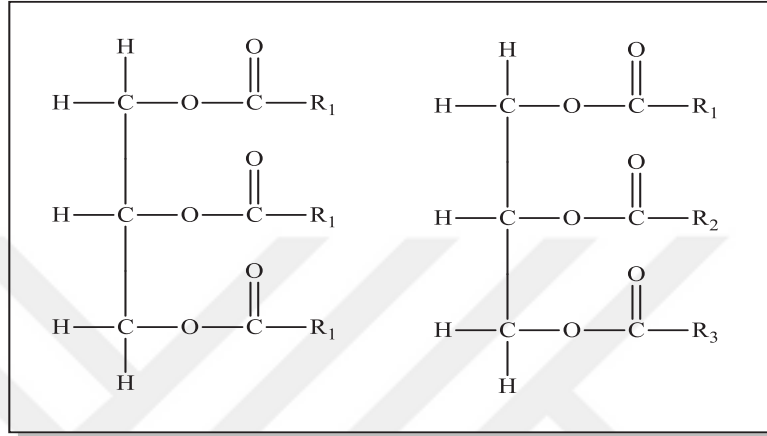
Gliserol ve yağ asitlerinin esterleşme tepkimesi sonucu Şekil 2.15.'te görüldüğü gibi meydana gelen bir mol trigliserid ve yanında üç mol su oluşumu gözlenir (Bockish,1998). Yağların temel bileşeni olan trigliseridler saf bitkisel yağın %95'ini oluşturabilirler fakat %5'lik kısım safsızlıklar olarak tanımlanabilmektedir (Strayer ve ark., 2006; Nas ve ark., 2001). Rafinasyon işlemi yardımıyla istenilmeyen safsızlıklar yağdan uzaklaştırılabilirler ve sonucunda %5'lik değer %0,02'lere düşebilmektedir (Nas ve ark., 2001).



Şekil 2.15. Yağ oluşum reaksiyonu

2.13.1.1. Trigliseridler

Yapısında bulunan yağ asitlerinin benzerliklerine göre ikiye ayrılmaktadırlar. Eğer bünyesinde bulundurduğu üç yağ asidi de aynı ise basit, üç yağ asidi de farklı ise bileşik trigliserid denilmektedir (Şekil 2.16.).



2.16. Basit ve bileşik trigliserid (Aygün, 2009)

2.13.1.2. Yağ asitleri

Yağ asitleri, çoğunlukla karbon sayısının çift olduğu, düz ve farklı zincir uzunluğuna malik monobazik asit olarak tanımlanabilmektedir (Saldamlı 1998). Son yıllardaki bilgilere göre sıvı ile katı yağların 200 ve daha üstü miktarda yağ asidi ihtiva ettiği bilinmektedir. Ancak bilinen bu yağ asitlerinin yalnızca %3'ünü kapsayan kısım canlıların tüketebileceği yağlardandır.

Doğada ihtiva eden yağ asitleri çoğunlukla monobazik dallanmış yapıda görülmektedirler (Bockish, 1998). Bünyelerinde bulunan tek ya da çift bağlara göre sınıflandırılabilirler. Doymuş yağ asitleri bünyelerin çift bağları barındırmaz bu sebeple de doymuş adı verilir fakat çift bağ içeriyorsa doymamış yağ asidi olarak adlandırılmaktadırlar (Swern, 1979). Genelleme yapıldığında içerisinde “doymamış yağ asidi barındıran” gliseridler sıvı, “doymuş yağ asitlerini” barındırıyorsa katı denilebilmektedir (Tyler ve ark., 1973).

2.13.1.2.1. Doymuş yağ asitleri

En düşük karbonlu asetik asit (C_2) trigliserid yapısı içinde yer almaz, en düşük karbonlu gerçek yağ asidi bütirik asittir (C_4). C_8 'e kadar olan yağ asitleri sıvıdır ve süt yağı içerisinde bulunur.

Kaprik, miristik ve laurik asitler kakao yağı ve palm çekirdeği yağında bulunur; palmitik ve stearik asitler ise en yaygın doymuş yağ asitleri olarak bilinmektedir (Bockisch 1998). Tablo 2.4.'te doymuş yağ asitlerinin, basit ve sistematik isimleri verilmektedir (Christie 1973).

Tablo 2.4. Doymuş yağ asitleri

Kısa Gösterim	Sistematik isim	Basit isim
2:0	Etanoik asit	Asetik asit
3:0	Propanik asit	Propionik asit
4:0	Bütanoik asit	Bütirik asit
5:0	Pentanoik asit	Valerik asit
6:0	Hekzanoik asit	Kaproik asit
7:0	Heptanoik asit	Enantik asit
8:0	Oktanoik asit	Kaprilik asit
9:0	Nonanoik asit	Pelargonik asit
10:0	Dekanoik asit	Kaprik asit
11:0	Hendekanoik asit	-
12:0	Dodekanoik asit	Laurik asit
13:0	Tridekanoik asit	-
14:0	Tetradekanoik asit	Miriktik asit
15:0	Pentadekanoik asit	-
16:0	Hekzadekanoik asit	Palmitik asit
17:0	Heptadekanoik asit	Margarik asit
18:0	Oktadekanoik asit	Stearik asit
19:0	Nonandekanoik asit	-

2.13.1.2.2. Bir çift bağa sahip doymamış yağ asitleri

Doğal yağlarda bugüne kadar bulunmuş en kısa zincirli doymamış yağ asidi, süt yağında eser miktarda bulunan kaproleik asittir. Tek çift bağa sahip yağ asitlerinden 10–18 karbona kadar olanları süt yağlarında, 16–24 karbona kadar olanları balık yağlarında, 30 karbona kadar olanları ise bitki tohumu yağlarında bulunur (Bockisch 1998). Bazı önemli tek çift bağlı yağ asitleri Tablo 2.5.'te verilmektedir (Christie 1973).

Tablo 2.5. Bazı önemli tek çift bağa sahip yağ asitleri

Kısa Gösterim	Sistematik isim	Basit isim
12:1 (n-3)	Cis-9-dodekenoik asit	Lauroleik asit
14:1 (n-5)	Cis-9-tetradekenoik asit	Miristoleik asit
16:1*	Trans-3-hekzadekenoik asit	-
16:1 (n-7)	Cis-9-hekzadekenoik	Palmitoelik asit
18:1 (n-12)	Cis-6-oktadekenoik asit	Petroselinik asit
18:1 (n-9)	Cis-9-oktadekenoik asit	Oleik asit
18:1*	Trans-9-oktadekenoik asit	Elaidik asit
18:1 (n-7)	Cis-11-oktadekenoik asit	Cis-vassenik asit
18:1*	Trans-11-oktadekenoik asit	Trans-vassenik asit
20:1 (n-11)	Cis-9-eikosenoik asit	Gadoleik asit
20:1 (n-9)	Cis-11-eikosenoik asit	Gondoik asit
22:1 (n-9)	Cis-13-dokosenoik asit	Erusik asit
24:1 (n-9)	Cis-15-tetrakosenoik asit	Nervonik asit

2.13.1.2. 3. Çift bağa sahip doymamış yağ asitleri

Birden fazla çift bağa sahip doymamış yağ asitleri yenilebilen tüm katı ve sıvı yağlarda görülür. Sadece bitkisel yağlarda tüm cis izomerleri bulunmaktadır ve bunlardan bazıları da hayvansal yağlarda da karşımıza çıkmaktadır. Bunun nedeni vücudun bunları sentezleyememesinden kaynaklıdır. Organizma bu yağları bitkilerden alarak karşılar.

Konjuge doymamış yağ asitlerinin yok denilecek kadar az bir kısmı yenilmeyen katı ve sıvı yağlarda ihtiva ederler. Linoleik ve linolenik asitler hem miktarları açısından hem de canlı vücudunun gereksinimi açısından en önemli çok çift bağ içeren yağ asitleridir. Araşidonik asit de az miktarlarda bulunsa da önemli yağ asitidir (Bockisch 1998). Yaygın olarak bulunan bazı yağ asitleri Tablo 2.6.'da verilmektedir (Christie, 1973).

Tablo 2.6. Bazı önemli çift bağa sahip yağ asitleri

Kısa Gösterim	Sistemik isim	Basit isim
18:2 (n-6)	9,12-oktadekadienoik asit	Linoleik asit
18:3 (n-6)	6,9,12-oktadekatrienoik asit	γ -Linolenik
20:3 (n-6)	8,11,14-eikosatrienoik asit	homo- γ -Linolenik
20:4 (n-6)	5,8,11,14-eikosatetraenoik asit	Araşidonik asit
20:5 (n-6)	4,7,10,13,16-dokosapentaenoik asit	-
18:3 (n-3)	9,12,15-oktadekatrienoik asit	α -Linolenik
20:5 (n-3)	5,8,11,14,17-eikosapentaenoik asit	-
22:6 (n-3)	4,7,10,13,16,19-dokosahekzaenoik asit	-
20:3 (n-9)	5,8,11-eikosatrienoik asit	-

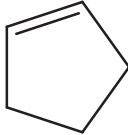
2.13.1.2.4. Diğer yağ asitleri

Doymuş, tek çift bağa sahip doymamış ve birden fazla çift bağa sahip doymamış yağ asitlerinin yanında, alkin yağ asitleri, dallanmış yağ asitleri, alisilik yağ asitleri ve substitute olmuş yağ asitleri yağların yapısında bulunabilirler. Bu yağ asitleri yenilen yağların hepsinin yapısında bulunamayabilirler.

Alkin yağ asitleri oldukça nadir bulunurlar (isanik ve taririk asit gibi). Dallanmış yağ asitleri ise çoğu yağlarda özellikle hayvansal yağlarında eser miktarda ihtiva ederler. Substitute olmuş yağ asitleri oldukça nadirdir ancak çok önemli yerleri vardır.

Hidroksi yağ asitleri serebrositlerin (beyin sıvısı) %53'ünü oluşturur, beyin fonksiyonları için çok önemlidir (Bockisch 1998). Nadir olarak görülen bazı yağ asitlerinin yapısı, basit isimleri ve hangi bitkiden elde edildikleri Tablo 2.7.'de gösterilmiştir (Christie 1973).

Tablo 2.7. Ender görülen bazı yağ asitleri

Kısa Gösterim	Sistematik isim	Basit isim
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ $\begin{array}{c} \\ \text{OH} \end{array}$	Risinoleik asit	Hint yağı
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{C}=\text{CCH}_2=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Krapeninik asit	Crepis foetida
$\begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3(\text{CH}_3)_7\text{C}=\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{COOH} \end{array}$	Sterilik asit	Sterculiaceae Malvaceae
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CHCH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	α -eleosterik asit	Tung yağı
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}-\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ $\begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \end{array}$	(+)-vernolik asit	Vernonia anthelmintica
 $-(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	Şolmugrik asit	Hydnocarpas türleri
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	-	Douglasii tohum yağı
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	Labellerik asit	-

Hint yağının yapısında bulunan yağ asitleri;

Stearik asit: Yüksek kalitedeki stearik asit, %40'dan az stearik asit ve %40'dan az palmitik asit içermez ve bu iki asidin toplamı %90'dan az olmamalıdır. Saflaştırılmış stearik asit %90'dan az stearik asit içermez ve toplam palmitik ve stearik asit içeriği %96'dan az olmamalıdır. Bu maddeler katı, soluk sarı veya beyaz renkli katı ya da

toz maddeler olup suda çözünmez. Steraik asit emülsiyon birleştiricisi ve tablet yağlayıcısı amacıyla kullanılması mümkündür (Tyler ve ark. 1988).

Oleik asit: Oleik asit yenilebilen katı yağlardan ve sabit yağlardan elde edilebilmektedir. Genellikle stearik asidin üretiminde yan ürün olarak elde edilmektedir. Oleik asit, temel olarak cis-9 oktadekenoik asidi içerir ve renksiz ya da soluk sarı renkli yağimsı bir sıvı halindedir. Suda çözünmez fakat alkolle karışabilme özelliğine sahiptir. Oksijeni yavaş bir şekilde absorplar ve havaya maruz kaldığında rengi koyulaşmaya başlar. Oleik asit bir emülsiyon birleştiricisi olarak da kullanılır (Tyler ve ark. 1988).

Linoleik ve linolenik asitler: Linoleik ve linolenik asitler birden fazla çift bağa sahip oktadekenoik asitlerdendir. Bu yağ asitleri insan beslenmesinde çok önemlidir ve vitamin F olarak adlandırılır. Çoğunlukla linoleik asit ve linolenik asit içeren doymamış yağ asidi karışımı soya yağı ve diğer uygun bitkisel yağlardan elde etmek mümkündür. Bu yağ asitlerinin karışımı besinlere ek olarak kullanılmalıdır (Tyler ve ark. 1988).

Risinoleik asit: RA (12-hidroksi-9-oktadekanoik asit) 18 karbonlu, 12. Karbon atomunda hidroksil grubu bulunan ve 9 ile 10. karbon atomları arasında da cis-çift bağa sahip olan yağ asididir. Molekül ağırlığı 298,46 ve nötralizasyon değeri 188'dir (Tallent ve Sumrell 1974). Viskoz, açık sarı renkte bir yağ asidi olup, erime noktası 5,5°C, kaynama noktası ise 245°C'dir. Saf alkolde çözünür, suda çözünmez ve petrol kökenli alifatik çözücülerde belli bir orana kadar çözünmesi sağlanmaktadır (Cherry 2000). Risinoleik asidin varlığı hint yağına eşsiz olma ve nadir olarak görülen çok yönlü kullanım özelliklerini sunmaktadır (Tallent ve Sumrell, 1974). RA, değerli kimyasal endüstrisinde kullanılan tek hidroksile yağ asidi olmuştur (Cherry, 2000).

2.14.Hint Yağı Bitkisi

Tohum bitkisi olan ve 10 metre uzayabilen tropikal soya sahip, yağ ihtiva eden *Ricinus communis*, genellikle hint yağı bitkisi olarak tanınmaktadır. Hint yağı,

tohumunun bünyesinde bulunan risin ve risinin, değişik alerjik unsurlardan dolayı toksin yapabilmektedir ve bu sebepten canlılar tarafından tüketilmesi sakıncalıdır. Fakat %56 ile %45 yağ içermektedir (Barajas, 2005; Ogunniyi, 2006; Scholz ve Silva, 2008). Isısı yüksek ve rutubetli alanlarda ekilip büyütülür (Aygün, 2009). Şekil 2.17.'de HY bitkisi ve hangi sınıflandırmalarda yer aldığı verilmiştir (TÜBİTAK, 2007).



Şekil 2.17. Hint yağı bitkisi

2.15. Hint Yağı

HY tohumlarının yarısı saf yağ, yararlı olmayan risin, alkolid, steroller, E vitamini ve lipaz ihtiva eder. Bu yağ alkol içerisinde oldukça kolay çözülebilmektedir (Baytop, 1980). Ekstraksiyon yöntemi yardımıyla hint yağı bitkisi tohumlarından elde edilmiştir. Kurumayan ve uçucu olmayan bir yağ çeşididir. Diğer yağlara oranda raf süresi uzundur ve çok yüksek sıcaklıklara maruz bırakılmadığı sürece bozulmayan bir yağdır (Ogunniyi, 2006).

Bitki kökenli yağlar kadar, esterleşme işlemi görmüş gliserolden ve yağ asidinin bileşiminden oluşan trigliserittir (Akpan ve ark., 2006). Hint yağını tercih edilen hale getiren niteliği ise, %88 civarlarında bir adet çift bağ içeren karbon sayısı 18 olan risinoleik asit içermesidir (Kirk-Othmer, 1979). RA yapısal olarak oleik yağ asidine oldukça benzemektedir fakat RA'nın bünyesinde bir adet OH bulundurması ikisini birbirinden ayıran özelliktir (Baytop, 1980). Sıvı halde ve bir yağ asidi olan çeşitli çözücülerde (kloroform, alkol, eter, aseton) çözünebilen RA, trigliseridi olduğu bilinen HY, doğal yaşamımızda karşımıza çıkabilecek en arı gliseridlerden birisi olmuştur (Keys, 1976).

HY'nin aktif olarak işlem görmesi sanayi alanında epey çoktur (Kirk-Othmer, 1979). Çokça senelerdir mürekkep, boya ve kaplama sanayilerinde HY kullanımı birçok avantaj içerir. Zahmetsiz temin edilebilmesinin yanında ekonomik anlamda fiyatının düşüklüğü ve canlı yaşamına zarar vermeyişi bu avantajlar içerisinde (Cherry, 2000).

2.15.1. Hint yağı'nın kullanım alanları

HY bitkisi tohumları tahminen bünyesinde %45 ile %54 arasında yağ bulundurur. Fakat bu yağın içerisinde bulunan yağ asitlerinin bazı birleşimlerinden ve içeriklerden ötürü gıda kolunda değil de, sanayi alanında kullanıma elverişlidir (Austin, 1984). Sıvılara nazır direnç gösterebilme yeteneğinden koruyucu örtü, yalıtım, kaplama, maske ve besinlerin dış kaplarında kullanımının yanında silah sanayinde de oldukça yaygın olarak kullanılmıştır. Hoş olmayan koku ve tadına karşın çokça bitki kokusu ve meyve esansları elde etmekte kullanılabilmektedir ve bunların eldesi ise HY'nin bünyesinde bulunan RA sayesinde olmaktadır (Swern, 1979). Hayvan besini olarak kullanılan HY bitkisi, yağı ayrıldıktan sonra kalan posası içerisinde yararlı olmayan toksinleri barındırmasından dolayı buhar yardımıyla bu zararlı toksinler parçalanılarak uzaklaştırılması sağlanarak kullanılmalıdır (Johnson ve Fritz, 1989). Geçmiş senelerde HY müshil diye kullanılırdı fakat bünyesinden bulunan risin maddesi zehirlenmelere sebebiyet verdi ve bu sebepten şuanda bile kullanılması yasaktır (Evans, 2002). HY bitkisinin gövde kısmı gemilerde kullanılmak için halat imalatında, olta kullanım sürelerinin artması için kullanılmaktadır. Tekstil sanayinde ve vernik yapımında HY yağlama işlemi için kullanılır. Normal şartların altındaki ısı ve yüksek basınçta kararlı olabilmelerinden dolayı uçak motorunda da yağlama işlemi yapmak için kullanılır (Scarpa ve Guerci, 1982).

HY bünyesinde bulunan RA'nın $-OH$ grubu ve sahip olduğu çift bağlar, bu yağın birçok tepkime gerçekleştirmesine olanak sağlamaktadır. Tepken olan $-OH$ grubu, fazla ısı piroliz, kostik birleşim yardımıyla oldukça kısa zincire sahip ürünlerin elde edilmesini sağlar (Ogunniyi 2006). Değişik koşullarda oksijensiz ortamda yakılan

HY, birçok sanayi alanında ilaç yapımı, parfüm yapımı, polime yapımı gibi işlerde işlenmemiş yağ ya da aramaddede olarak tepkimeye girerek farklı ürünler oluşmasını sağlarlar (Vasishtha ve ark., 1990).HY ve onun türevi olan maddeler sanayi alanında oldukça çok işlem alanına haizdir ve gün geçtikçe yeni kullanım alanları ortaya çıkmaktadır. RA'in bünyesinde bulunan hidroksil grubu kimyasal tepkimeler yardımıyla ortamdaki ayrıldığında çift bağların sayısı ikiye çıkar. Bu çift bağlı RA, hızlı kuruma yetisine sahip olması sebebiyle dehisrasyon işlemi görmüş HY vernik ve boya üreticileri tarafından ilgi görmektedir (Erciyes ve ark., 1991).

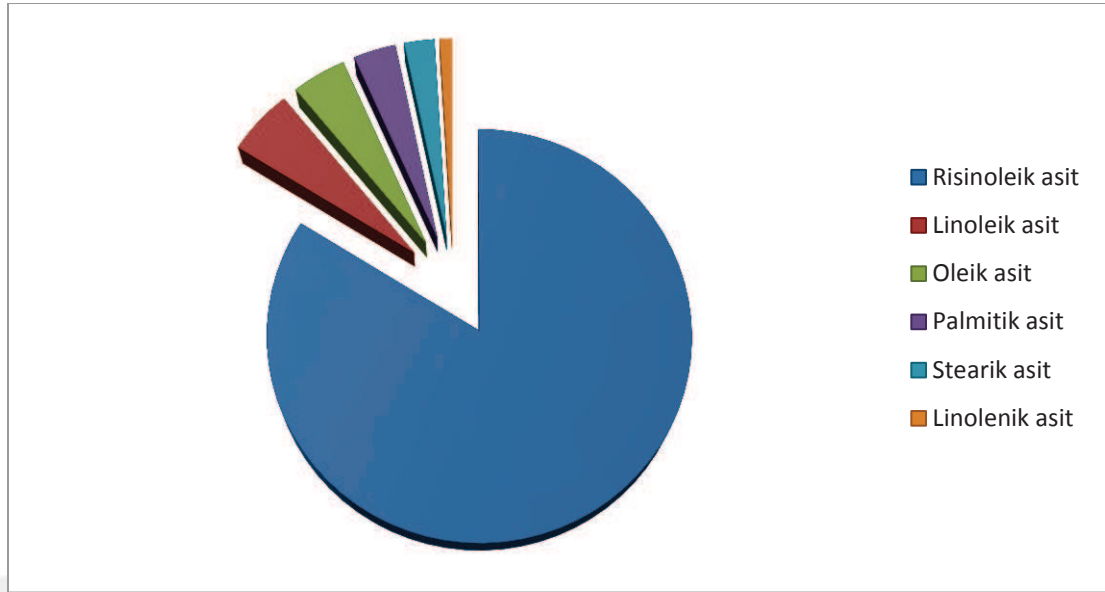
2.15.2. Hint yağının fiziksel ve kimyasal özellikleri

HY %10'luk kısmı hariç RA olarak bilinen yağ asidinden oluşmaktadır. Fakat HY bitkisi tohumunda bulunan, yağ kısmında olmayan, zararlı toksik alkolit risini ve lektin olan risini içerir. Toksik maddelerin başında sayılan risin kötü hayati sonuçlar oluşturabilmektedir (Keys, 1976; Wyk ve ark., 1977). HY'nın özellikleri Tablo 2.8.'de sıralanmıştır. HY'nın sahip olduğu asit değeri, HY bitkisinin senesi, hasarlı tohumlar, hatalı ekstraksiyon, depoda saklanma süresi gibi sebeplerden artar.

Tablo 2.8. Hint yağının fiziksel özellikleri

Fiziksel Özellik	Değer
Asitlik indisi (maksimum)	2,0
Hidroksil değeri	160–168
Sabunlaşma indisi	176–184
Sabunlaşmayan madde miktarı (maksimum, %)	0,7
İyot indisi	84–88
Peroksit değeri	<5
Kırılma indisi (25°C)	1,4764–1,4778
Bağıl yoğunluk (25/25°C)	0,957–0,961
Viskozite (25°C) (cm ² /s=stokes)	6,5–8,0

Hintyağının yağ asidi kompozisyonu ve Şekil 2.18. ve Tablo 2.9.' da verilmektedir. (Kirk-Othmer 1979).



Şekil 2.18. Hint yağının yağ asidi bileşim

Tablo 2.9. Hint yağının yağ asidi kompozisyonu

Yağ asitleri	(Ogunniyi 2006)	(Oliveira ve ark. 2005)	(Lima ve ark. 2004)	(Schneider ve ark. 2004)
Risinoleik Asit (C18:1-OH)	89,0	88,9	88,0	88,2
Linoleik Asit (C18:2)	4,2	4,9	2,0	4,9
Oleik Asit (C18:1)	3,0	3,5	5,0	3,8
Palmitik Asit (C16:0)	1,0	1,4	2,0	1,4
Stearik Asit (C18:0)	1,0	0,9	3,0	0,9
Dihidroksistearik Asit	0,7	-	-	-
Araşidik Asit (C20:0)	0,3	-	-	-
Linolenik Asit (C18:3)	0,3	0,3	-	0,3
Σ Doymuş Yağ Asitleri	2,3	2,3	5,0	2,3
Σ Doymamış Yağ Asitleri	97,2	97,6	95,0	97,2
Σ Yağ Asitleri	99,5	99,9	100,0	99,5

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller ve Kullanılan Cihazlar

İmmobilizasyon işlemlerinde bağlanma fazı olarak yüksek yoğunluklu glioksal içeren Glioksal agaroz (GA) (ABT-6BCL) kullanılmıştır. Glioksal agaroz yüzeylerine ise *Pseudomonas cepacia*'tan izole edilen ticari lipaz (Sigma) enzimi immobilize edilmiştir. RA (TCI Chemicals), etanol, sodyum hidroksit (NaOH), asetonitril, aseton, *p*-nitrofenilbütirat (Merck) firmasından temin edilmiştir. İşlem sonrası elde edilen çözeltiler RP-HPLC analizi öncesi 0,45 µm gözenek çapına sahip selüloz ester (CHEMLAB) ile fitre edilmiştir. Fostat tamponu sodyumdihidroksifosfat (NaH_2PO_4) ve disodyumhidroksifosfat (Na_2HPO_4) kullanılarak hazırlanmıştır. İmmobilizasyon reaksiyonu 0,1 M'lık sodyum bikarbonat (NaHCO_3) çözeltisi içerisinde gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon sonrasında enzim aktivitesinin ölçümlerinde substrat olarak *p*-nitro fenil bütirat kullanılmıştır. Reaksiyon sonucu oluşan *p*-nitro fenol'un absorpsiyon spektrumu alınarak, hazırlanan standart çözeltiler yardımı ile miktarı hesaplanmıştır.

Aktivasyon ölçümleri için Shimadzu model (UV-2600) spektrofotometre kullanılmıştır. Hidroliz işlemleri sonucu elde edilen çözeltiler Shimadzu model HPLC kullanılarak analiz edilmiştir. Karakterizasyon için Perkin Elmer model (Spectrum Two) FTIR kullanılmıştır.

3.2. Glioksal Agaroz Üzerine Lipaz İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon işlemi literatürde belirtildiği gibi yapılmıştır (Bolivar ve ark. 2008). Lipaz enzimi, 25 mL, 0,1 M sodyumbikarbonat (NaHCO_3) çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan bu çözelti üzerine 2,5 mL GA kürecikleri ilave edilmiştir.

Optimum immobilizasyon süresini bulmak amacıyla hazırlanan süspansiyon orbital karıştırıcıda 150 rpm karıştırma hızı ile 1, 2, 4, 8 ve 12 saat çalkalanmıştır. Süre sonunda, enzim ile glioksal agaroz küreler arasında oluşan bağın indirgenmesi amacıyla çözeltiye 20 mg sodyumborhidrür (NaBH_4) eklenerek 30 dk daha çalkalanmıştır. Hazırlanan lipaz immobilize edilmiş glioksal agaroz kürecikler bolca ultra saf su ile yıkandıktan sonra fosfat tamponu (pH=7) içerisinde $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır. Ayrıca glioksal agaroz küreler üzerine bağlanacak optimum enzim miktarını bulabilmek amacıyla 2,5, 5 ve 7,5 mg lipaz miktarları ile de immobilizasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

3.3. Aktivasyon Ölçümleri

Aktivasyon ölçümleri için 1 mM konsantrasyona sahip stok *p*-nitro fenol (*p*-NF) çözeltisinden, 0,01-0,04 mM konsantrasyon aralığına sahip standart çözeltiler hazırlanmıştır. Seyreltme işlemleri fosfat tamponu ile yapılarak 346 nm'de kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Aktivasyon denemeleri için ise 25 mL 0,04 mM *p*-nitrofenilbütirat (*p*-NFB) hazırlanmış ve içerisine 3 mL immobilize enzim ilave edilmiştir. Bu çözelti oda sıcaklığında, 150 rpm karıştırma hızında, 2 s çalkalanmıştır. Çözelti filtre edildikten sonradan edilen ürün olan *p*-NF'nin absorbansı 346 nm de UV-Vis spektrofotometresiyle ölçülmüştür.

3.4. Hidroliz/Transesterleşme Denemeleri

Hidroliz/Transesterleşme denemeleri %90 etanol içeren çözelti içerisinde 2-72 s reaksiyon süresi, 30-200 rpm çalkalama hızı, 1-5 mL immobilize lipaz miktarı, 0,1-2 g HY kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çözeltiler filtre edildikten sonra RP-HPLC ile analiz yapılmıştır.

3.5. Ürün Analizi

Elde edilen ürünler absorbans dedektörü içeren ters faz HPLC'de 205 nm de analiz edilmiştir. Mobil faz olarak aseto nitril, aseton (2:1) karışımı kullanılmıştır. Karbon

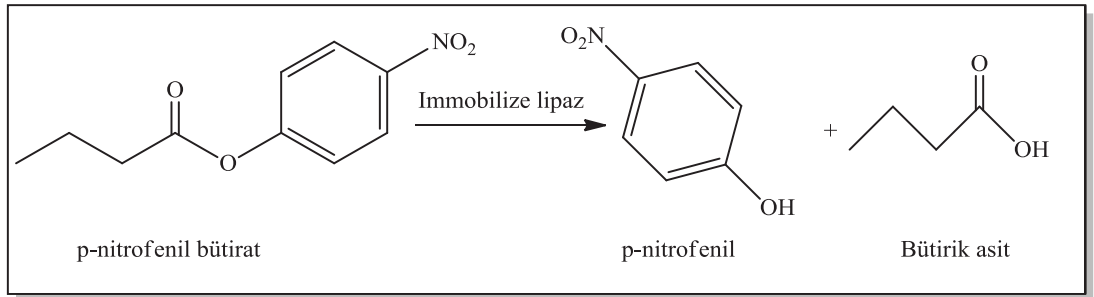
18 (150 mm x 4,6 mm, 5µm, intersustain) kolon kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25 °C’de sabit tutulmuştur. Analiz süresi 20 dk olarak bulunmuştur. Akış oranı ise 1,25 mL/dk olarak seçilmiştir.



BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Enzim İmmobilizasyonu

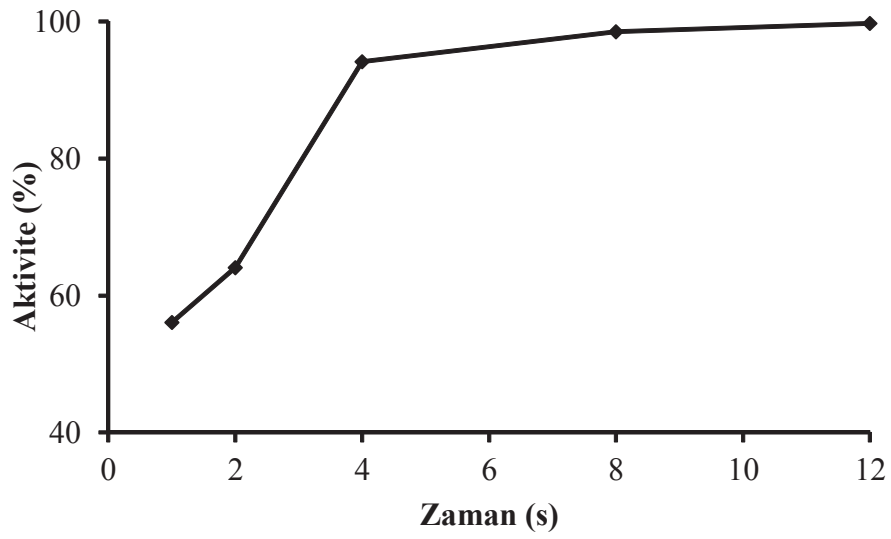
İmmobilizasyon reaksiyonu lipazın amin grupları ile GA kürelerinin aldehit grupları arasında gerçekleşmektedir. Reaksiyon sonucu oluşan imin grupları, NaBH_4 eklenerek indirgenir ve lipaz ile GA küreleri arasında sağlam kovalent bağlar oluşur (Bolivar ve ark. 2008; Keskin 2014). İmmobilizasyon işleminin gerçekleştiğini ve enzimin aktivitesini koruduğunu görebilmek için *p*-NFB kullanılarak aktivasyon ölçümleri yapılmıştır. Substrat olarak kullanılan *p*-NFB reaksiyon sonucu *p*-NF'ye dönüşmektedir (Zaid ve ark. 2017). Gerçekleşen reaksiyon Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



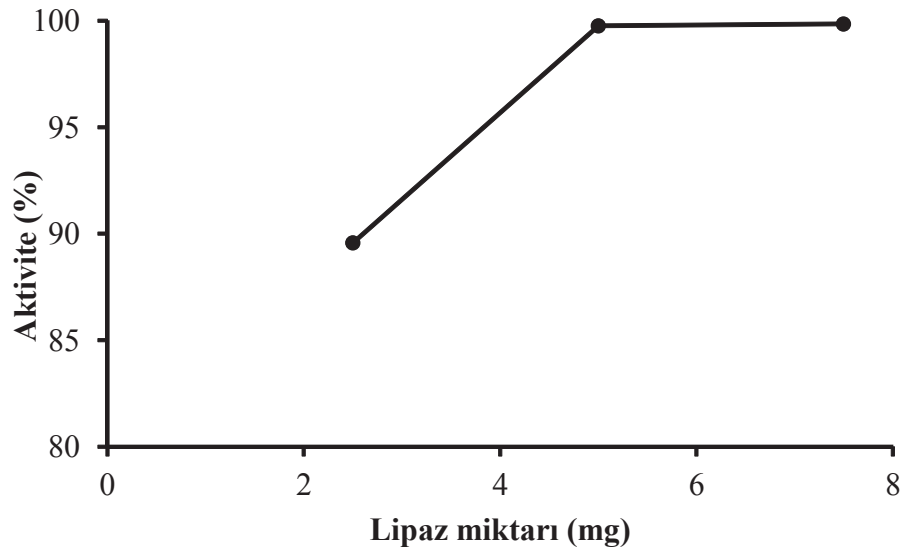
Şekil 4.1. İmmobilize lipaz ile *p*-nitrofenil bütiratın reaksiyonu

Maksimum immobilizasyonu elde etmek için yapılan zaman denemelerinin sonuçları ise Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. 1 s reaksiyon sonucu elde edilen verim % 56 iken 12 s reaksiyon süresinde %99 immobilizasyon verimi elde edilmiştir. Reaksiyon süresinin artması ile enzim ve glioksal agaroz küreleri arasındaki etkileşim miktarı da artmaktadır. Bunun sonucu olarak immobilize enzimde daha fazla aktivite ve bağlanma gözlemlenmektedir. Ayrıca immobilizasyon için farklı enzim miktarları denenerek, optimum enzim miktarı bulunmuştur. Buna göre 2,5 mg enzim

kullanıldığında 12 s süre sonucunda %89 verim elde edilmiştir. 5 mg ve 7,5 mg lipaz kullanılarak yapılan denemelerde ise %100 aktiviteye ulaşılmıştır (Şekil 4.3.). 2,5 mg enzimin agaroz küreler üzerine immobilizasyonu, kullanılan *p*-NFB'nin hepsinin hidrolizi için yeterli olmamıştır. 5 mg enzim immobilizasyonu ise *p*-NFB'nin tümünü hidroliz etmek için yeterli olmuştur. Sonuçlara bakılarak immobilizasyon için optimum süresi 12 s, optimum enzim miktarı ise 5 mg olarak bulunmuştur.



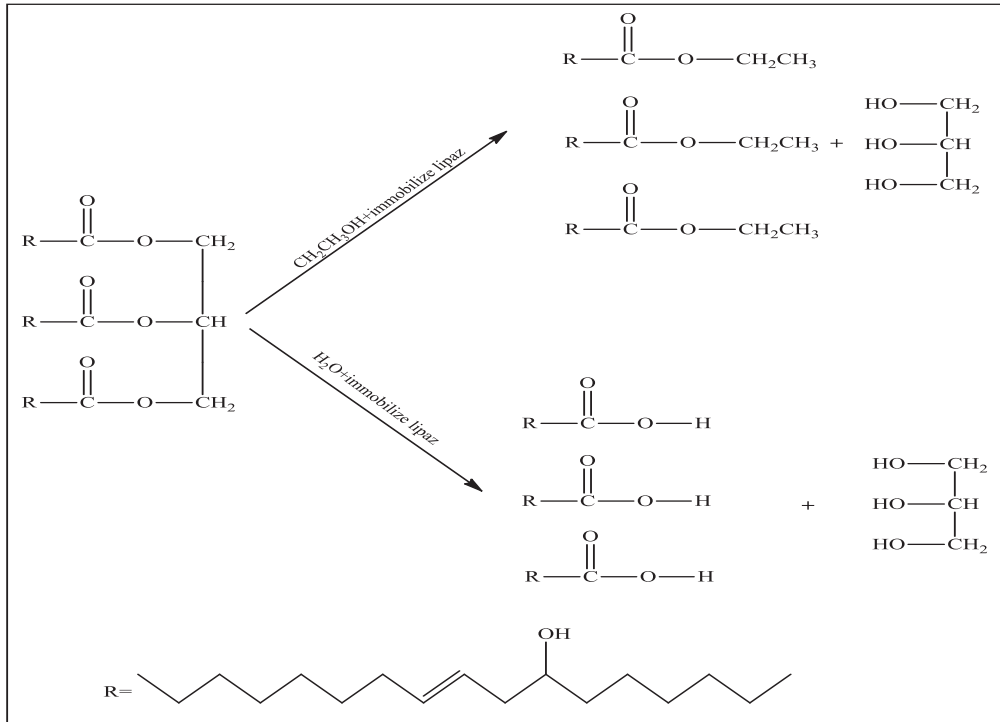
Şekil 4.2. İmmobilizasyon zamanının etkisi (5.0 mg Lipaz, 2.5 mL glikoksal agaroz)



Şekil 4.3. İmmobilizasyona enzim miktarının etkisi (2,5 mL GA, 12 s)

4.2. Hidroliz/Transesterleşme Reaksiyonları

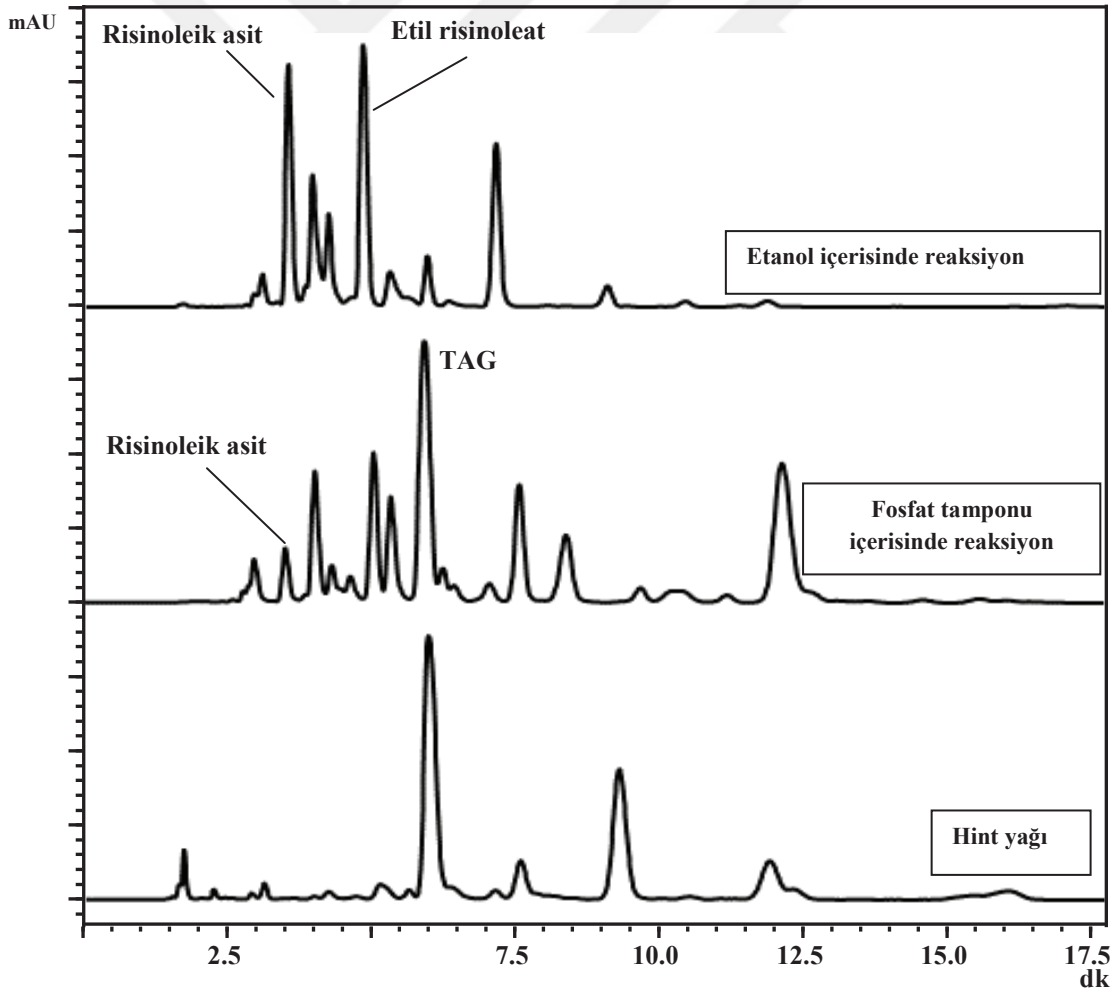
Reaksiyon ortamı olarak farklı etanol/fosfat tamponu karışım oranları denenmiştir. Sadece fosfat tamponu kullanıldığında yağın su içerisindeki çözünürlüğü çok az olduğu için enzim substrat etkileşimi çok düşük derecede gerçekleşmiştir. Literatürde bu sorunu çözebilmek için yüzey aktif madde, çeşitli tuzlar veya yüksek sıcaklık kullanılsa da bu yöntemlerin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Alkol kullanılarak yağ çözünürlüğü artırılabilir. Fakat reaksiyon ortamında alkol oranının artması hidroliz reaksiyonunun gerçekleşme derecesini düşürmektedir. Alkol kullanımı ile ortamda hidroliz reaksiyonunun yanında transesterleşme reaksiyonunda gerçekleşmektedir. Yapılan denemelerde alkol oranının artırılması ile çözünmüş yağ oranı arttığı için hem hidroliz hemde transesterleşme reaksiyonlarının gerçekleştiği görülmüştür. Kullanılabilen maksimum alkol oranı %90'dır. Çünkü immobilize lipaz fosfat tamponu içerisinde saklanmakta ve reaksiyon ortamına fosfat tamponu ile beraber eklenmektedir. %90 etanol ortamında gerçekleşen hidroliz ve transesterleşme reaksiyonları Şekil 4.4.'te gösterilmiştir. Hidroliz reaksiyonu sonucu serbest yağ asitleri oluşurken transesterleşme reaksiyonu sonucu yağ asidi esterleri oluşmaktadır.



Şekil 4.4. Hidroliz ve transesterleşme reaksiyonları

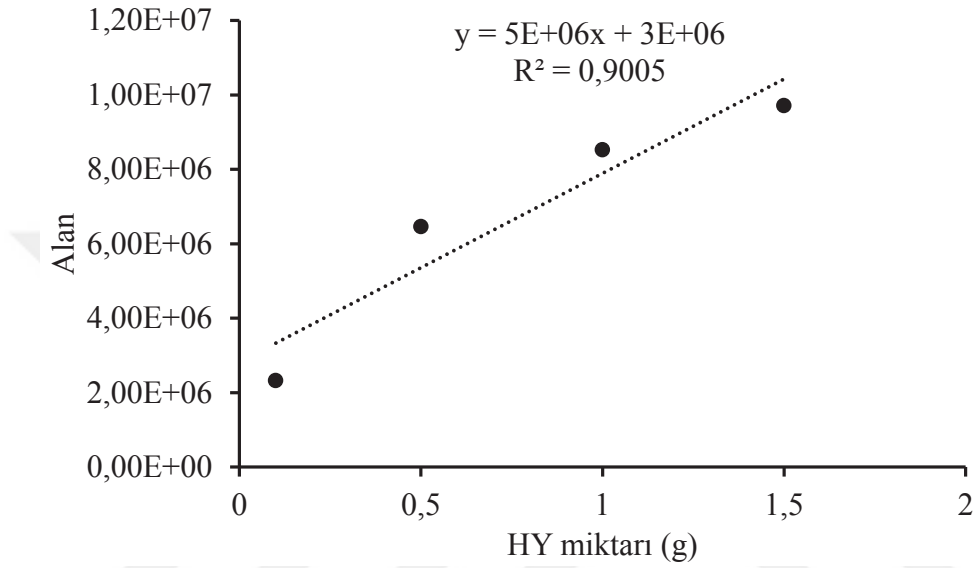
4.3. Ürün Analizleri

Ürün karakterizasyonu için ters faz HPLC ve FTIR analizleri yapılmıştır. Şekil 4.5.'te hint yağının fosfat tamponu içerisinde yapılan reaksiyon ürünü ve etanol içerisinde yapılan reaksiyon ürünlerinin kromatogramları gösterilmiştir. HY yaklaşık %70 oranında tririsinolein(TAG)'den oluşmuştur. Şekilde de görülebileceği gibi fosfat tamponu içerisinde yapılan reaksiyonda yüksek miktarda TAG bulunmaktadır. Alkol ortamında gerçekleşen reaksiyonda ise TAG miktarı azalmış, hidroliz ve transesterleşme ürün miktarları artmıştır. Ana hidroliz ürünü olan RA'in alıkonma zamanı 3,47 dakika (dk) olarak bulunmuştur. Ana transesterleşme ürünü olan etil risinoleatın alıkonma zamanı ise 4,72 dk olarak bulunmuştur. Kromatogramda görülen diğer pikler ise rinoleik, oleik, palmetik, stearik asit ve bunların esterleridir.



Şekil 4.5. Etanol, fosfat tamponu içerisinde gerçekleştirilen reaksiyon ürünleri ve hint yağının kromatogramları (1,25 mL/dk akış hızı)

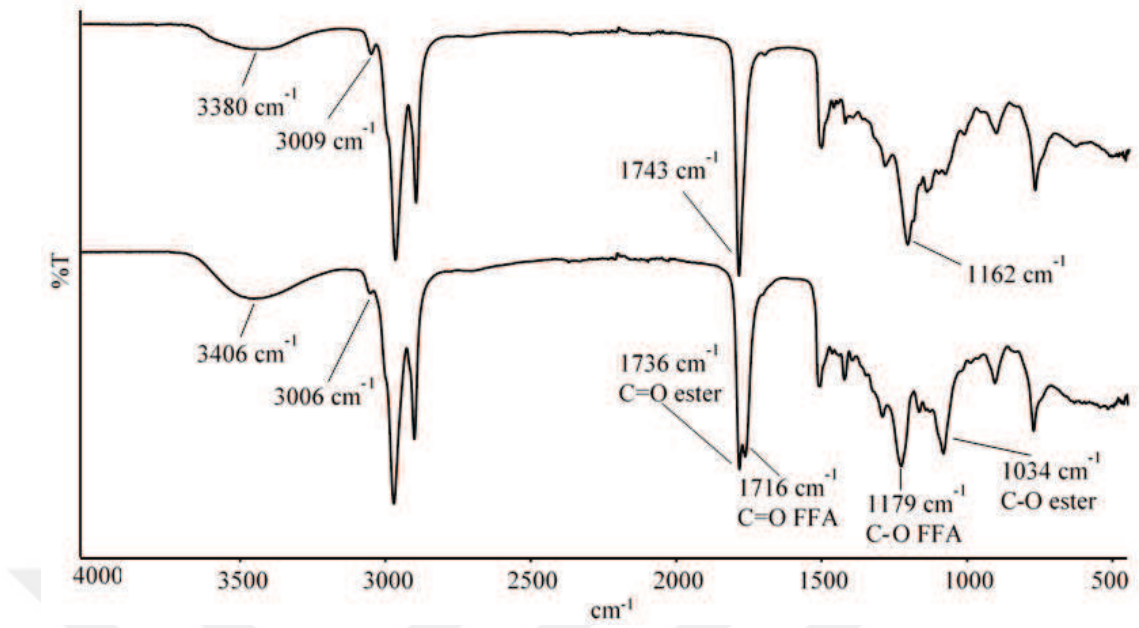
Ürün içerisinde bulunan risinoleik asit miktarının bulunması amacıyla 0,1 – 1,5 g risinoleik asit içeren standart çözeltilerin kromatogramları alınmış ve kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur (Şekil 4.6). 2,5 mL immobilize enzim kullanarak 72 saat (s) sürede 1 g HY ile yapılan reaksiyon sonucunda 0,47 g RA olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.6. Risinoleik asit tayini için oluşturulan kalibrasyon doğrusu

Hint yağını ve %90 alkol içerisinde gerçekleşen reaksiyon ürününün FTIR spektrum Şekil 4.7.'de gösterilmektedir. HY spektrumunda görülen 3380 cm^{-1} piki OH titreşimi nedeniyle oluşmuştur. 3009 cm^{-1} de görülen pik ise C=C titreşimleri sonucu ortaya çıkmıştır. C=O ve C-O simetrik gerilme titreşimleri sırasıyla 1743 ve 1162 cm^{-1} de ortaya çıkmıştır.

Ürünün FTIR analizine bakıldığında reaksiyon sonucunun bir karışım olduğu anlaşılmaktadır. 1700 cm^{-1} civarında çıkan yarılmış bant yağ asidi C=O ve yağ asidi esterleri C-O nedeniyle ortaya çıkmıştır. Benzer şekilde yağ asitlerine ait C-O titreşim bandı 1179 cm^{-1} ortaya çıkarken yağ asidi esterlerine ait C-O piki ise 1034 cm^{-1} de çıkmıştır. Bu sonuçlar literatür ile uygundur (Khaskheli ve ark. 2015).



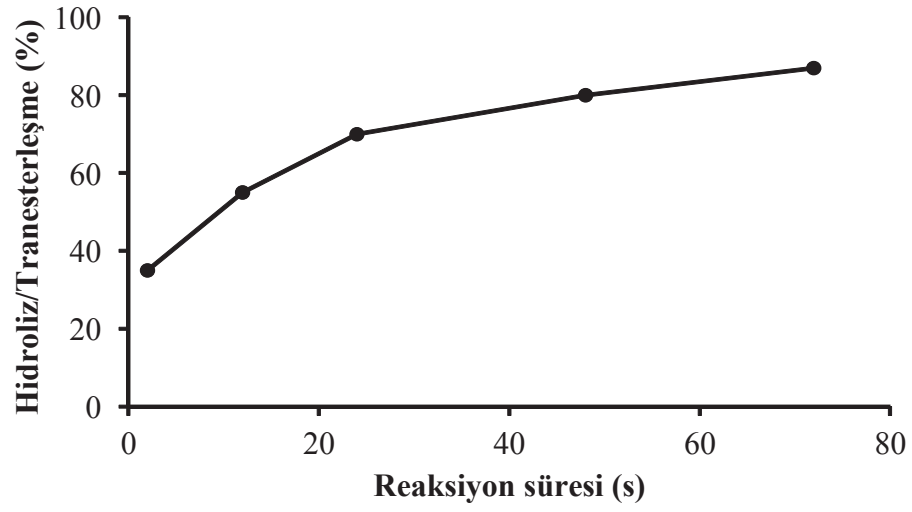
Şekil 4.7. Hint yağı ve reaksiyon ürününün FTIR spektrumları

4.4. Optimizasyon Deneyleri

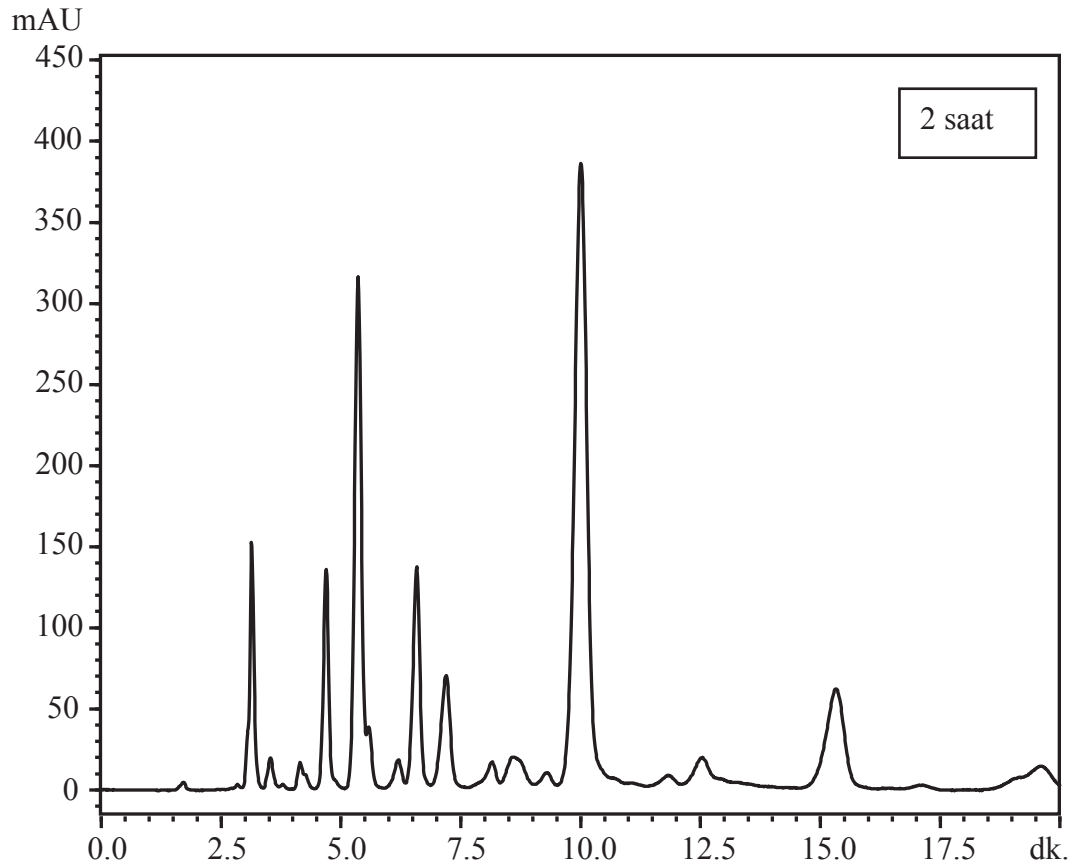
Optimizasyon deneyleri oda sıcaklığında yaklaşık 25°C'de yapılmıştır. Reaksiyonda alkol kullanıldığı için sıcaklık etkisi denemeleri araştırılmamıştır.

Reaksiyon zamanı denemelerine ait sonuçlar Şekil 4.8.'de gösterilmiştir. 2,5 mL immobilize enzim kullanılarak yapılan denemelerde 2 s reaksiyon süresinde %35 hidroliz verimi elde edilirken 72 s reaksiyon süresinde %87 verim elde edilmiştir. Bu artış zamanın artmasıyla enzim substrat etkileşiminin de artması ile açıklanabilir. 2 ve 72 s reaksiyon sürelerine ait ürünlerin kromatogramlar Şekil 4.9.'da verilmiştir.

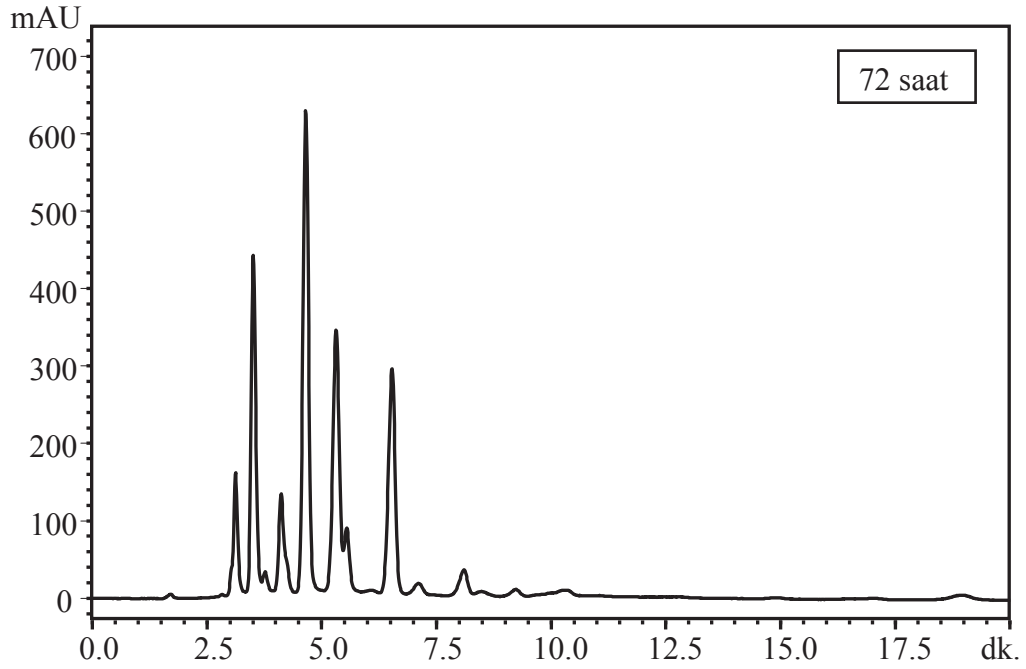
2 s reaksiyon süresinde hint yağının yapısında bulunan TAG pik şiddetindeki (ve/veya alanındaki) azalmanın çok küçük olduğu görülebilmektedir. 72 s reaksiyon süresinde ise bu pikin hemen hemen kaybolduğu görülebilmektedir. Bu durum 72 s reaksiyon süresinde HY yapısında bulunan TAG'ın büyük çoğunluğunun hidroliz olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.8. Zamanın reaksiyona etkisi (1 g hint yağı, 2,5 mL immobilize lipaz, 150 rpm)

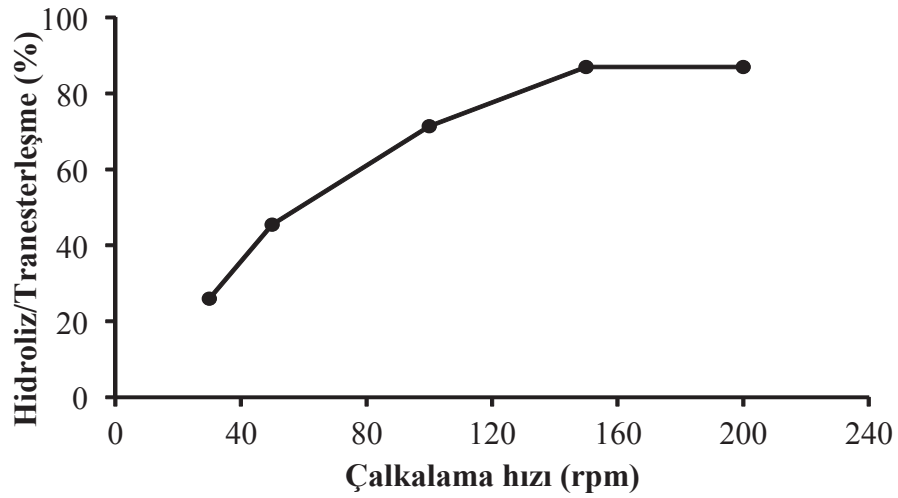


Şekil 4.9. 2 saat reaksiyon süresinde elde edilen ürün kromatogramı (1 mL/dk akış oranı, 1 g hint yağı, 2,5 mL immobilize lipaz, 150 rpm)



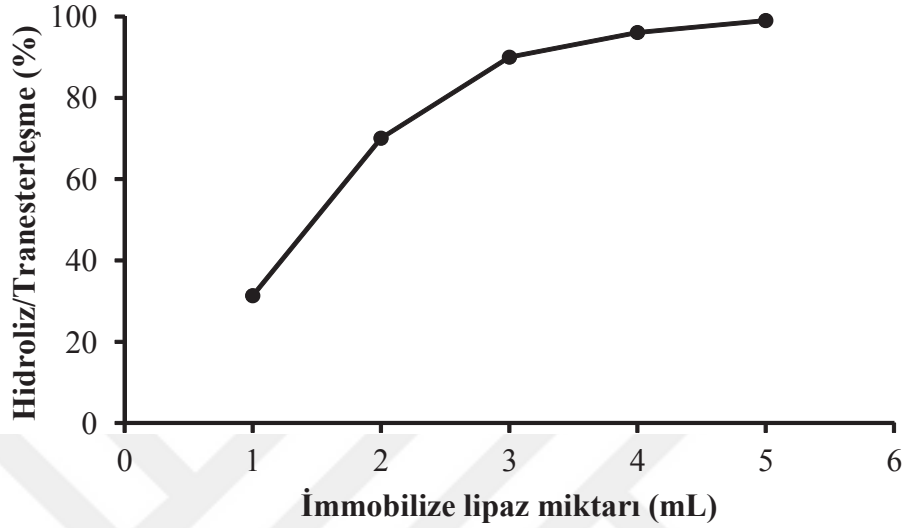
Şekil 4.10. 72 saat reaksiyon süresinde elde edilen ürün kromatogramı (1 mL/dk akış oranı, 1 g hint yağı, 2,5 mL immobilize lipaz, 150 rpm)

Benzer şekilde karıştırma hızının artması ile reaksiyon verimini artmıştır (Şekil 4.11.). 30 rpm de elde edilen verim %30 iken, 150 rpm de elde edilen verim %87'dir. Reaksiyon ortamında GA küreleri çevresinde bir sıvı film oluşmaktadır. Düşük karıştırma hızlarında substratın bu filme difüzyon oranı daha azdır. Yüksek karıştırma hızlarında ise substratın film difüzyon oranının artmasının yanında film direncide elimine olmaktadır (Ertugay ve Bayhan 2008).



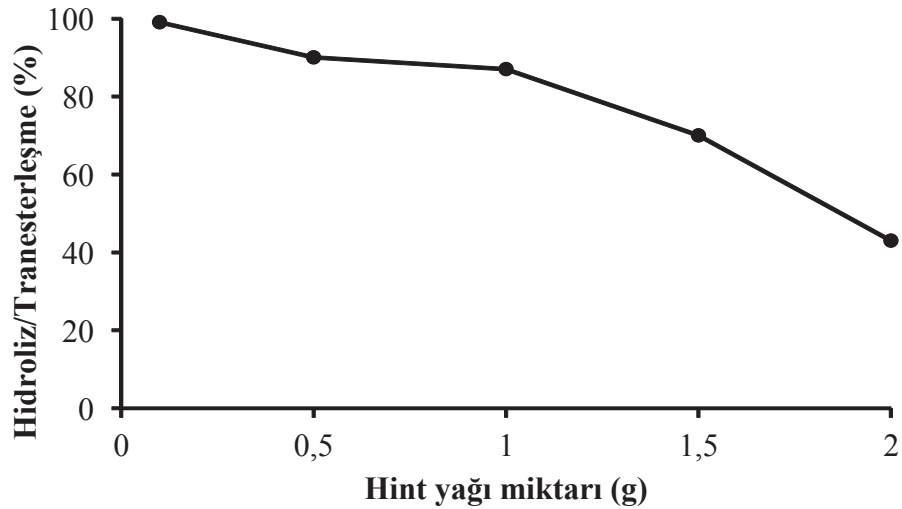
Şekil 4.11. Çalkalanma hızının reaksiyona etkisi (1 g hint yağı, 2,5 mL immobilize lipaz, 72 saat)

Kullanılan lipaz immobilize edilmiş GA kürelerinin miktarı 1 mL'den 5 mL'ye arttırıldığında elde edilen verim %31'den %99'a çıkmaktadır (Şekil 4.12.). Enzim miktarının artması ile hidrolize olmadan kalan TAG'ların da hidroliz olması verimi arttırmıştır.

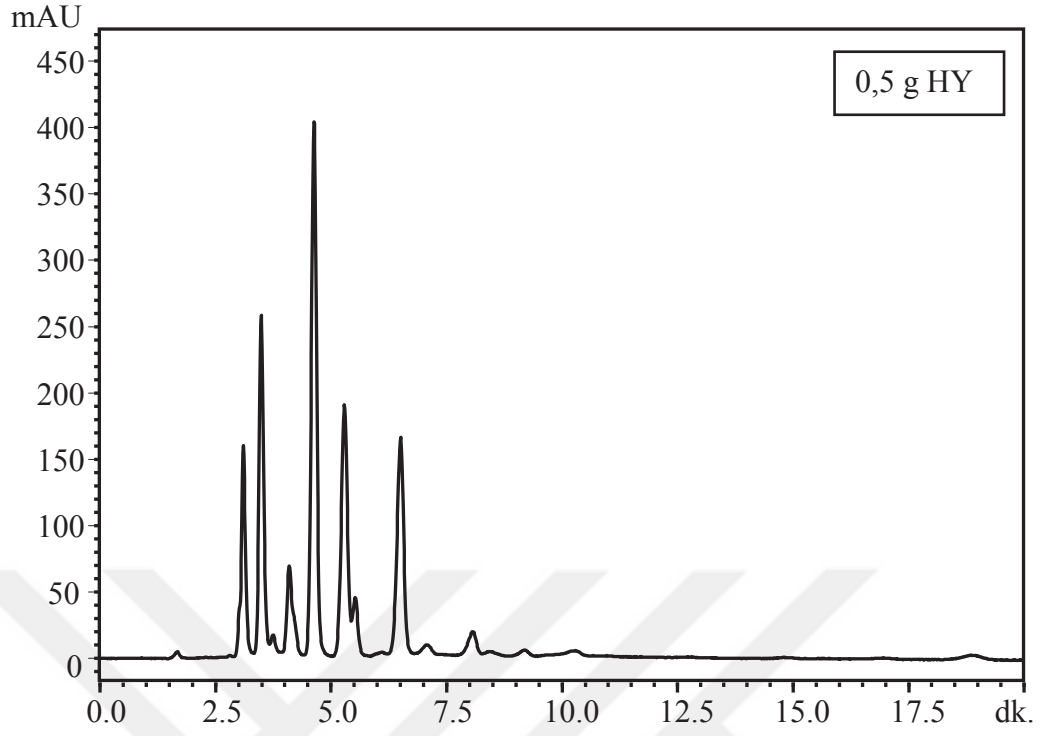


Şekil 4.12. İmmobilize lipaz miktarının reaksiyona etkisi (1 g hint yağı, 150 rpm, 72 saat)

Yağ miktarı arttırıldığında ise elde edilen reaksiyon verimi düşmektedir. Bu düşüşün nedeni var olan yağ ile reaksiyona girecek yeterli miktarda enzimin olmamasıdır. 0,1 g HY kullanılarak elde edilen verim %99, 0,5 g HY kullanıldığında %90 iken, 2 g HY kullanıldığında elde edilen verim %43'tür (Şekil 4.13.). Şekil 4.14'de 0,5 g HY kullanılması ile elde edilen kromtogram gösterilmiştir. Kromatogramda TAG pikinin hemen hemen kaybolduğu görülebilmektedir.



Şekil 4.13. Hint yağı miktarının reaksiyona etkisi (2.5 mL immobilize lipaz, 150 rpm, 72 saat).



Şekil 4.14. 0,5 g HY kullanılarak yapılan reaksiyon ürününün kromatogramı (1 mL/dk akış oranı, 2.5 mL immobilize lipaz, 150 rpm, 72 saat).

BÖLÜM 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada hint yağı örneği lipaz immobilize edilmiş glioksal agaroz küreleri ile hidroliz/transesterleşmesi incelenmiştir. Bu amaçla ticari olarak alınan lipaz enzimi glioksal agaroz küreleri üzerine immobilize edilmiştir. Kovalent bağlanma ile gerçekleşen immobilizasyon ile enzimin kararlılığı serbest haline göre arttırılmıştır. Immobilizasyon sonrası enzim aktivitesi *p*-NFB'a karşı bakılmış ve %100 aktivite verim elde edilmiştir. Aktivasyon ölçümleri için UV-Görünür alan spektroskopisi kullanılmıştır. 346 nm'de oluşturulan kalibrasyon doğrusu vasıtasıyla reaksiyon sonucu oluşan *p*-NF'nin miktarı tayin edilmiştir.

Sadce fosfat tamponu içerisinde gerçekleştirilen yağ hidrolizi denemelerinde elde edilen verimler çok düşük çıkmıştır. Bu yüzden farklı çözücü ortamları denenmiş ve etanolde karar kılınmıştır. %90 etanol ortamında gerçekleştirilen denemelerde 1 g hint yağı için 0,47 g risinoleik asit elde edilmiştir. Elimizde etilrisinolat'ın standardı bulunmadığı için oluşan etilrisinoloat miktarı tayin edilememiştir. Bunun yerine hint yağı içerisinde var olan ve ürünlerin temel kaynağı olan triaçilgilerol (TAG) yapısında olan tririsinolein'in dönüşüm oranları deney sonuçları olarak verilmiştir. 2,5 mL immobilize agaroz kullanılarak elde edilen dönüşüm oranı %87 iken, 5 mL'de %99' a ulaşılmıştır. Reaksiyon ürünleri ters faz HPLC ile asetonyitril: aseton (2:1) hareketli fazı ve C18 kolon kullanılarak analiz edilmiştir. FTIR spektroskopisi ile de ürünlerin karakterizasyonu yapılmaya çalışılmıştır.

Sonuçlara göre immobilizasyon için optimum süre 12 s, optimum enzim miktarı ise 5 mg olarak bulunmuştur. Yağ hidrolizinde ise 72 s sürede, 150 rpm çalkalama hızında, 2,5 mL ve 5 mL immobilize enzim kullanılarak 1,0 g yağ için sırasıyla %87 ve %99 dönüşüm verimi elde edilmiştir.

Hint yağının ana hidroliz ve transesterleşme ürünleri risinoleik asit ve etil risinolat bileşikleridir. Bunların yanında linolenik, oleik, stearik asit ve bunların esterleri de oluşmaktadır. Bu hidroliz ve transesterleşme ürünleri endüstride pek çok alanda kullanılmaktadır. Ayrıca hint yağı transesterleşmesi sonucu elde edilen esterlerin biyodizel olarak kullanım alanında mevcuttur. Bu ürünlerin enzim kullanılmadan üretimi, “sert koşullar” isimi de verilen yüksek sıcaklık ve basınç altında veya ilave kimyasallar kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Enzim kullanılması daha “yumuşak koşullarda” bahsi geçen ürünlerin elde edilmesini sağlamaktadır. Tez kapsamında yapılan denemelerde ana ürün olan risinoleik asit ve esteri yüksek verimde elde edilmiştir. Ana ürünlerin yanında yan ürünlerde oluşmuştur. Reaksiyon ile tek bir hidroliz ürünü elde edilmeye çalışılmış fakat başarısız olmuştur. Reaksiyon karışımı çeşitli ayırma metotları kullanılarak saflaştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Aehle, W., 2004. Enzymes in Industry Production and Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, USA.
- Akoh, C.C., Min, D.B., 1998. Microbial Lipases and Enzymatic Interesterification. Food Lipids-Chemistry. Nutrition and Biotechnology. Marel Deccer, Inc., 641-698.
- Akpan, U. G., Jimoh, A. ve Mohammed, A. D. 2006. Extraction, characterization and modification of castor seed oil. Leonardo Journal of Sciences, 8: 43-52.
- Alagöz, D., 2007. β -galaktozidaz ve glukoz izomerazın eupergit desteğe kovalent immobilizasyonu ve immobilize enzimlerin laktoz hidrolizi ve glukoz izomerizasyonunda kullanılması. Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Alptekin, Ö. 2009. Katalazın eupergit, florisil ve cam desteklere kovalent olarak immobilizasyonu ve karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Arpigny, J.L. ve Jaeger, K.E. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. Biochemistry Journal, 343: 177-183.
- Austin, G.T. (1984), Shreve's chemical process industries, Mc Graw Hill, New York, A.B.D., 508-512.
- Aygün, A. 2009. Hint yağından biyodizel eldesi. İstanbul Teknik Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Kimya Mühendisliği Bölümü. Yüksek Lisans Tezi.
- Bailey, J.E., and Ollis, D.F. 1986. Biochemical Engineering Fundamentals.. McGraw Hill, Singapore, 2.
- Bakkal, M., 2006. Tutuklanmış *Candida Rugosa* lipazı ile rasemik naproksen metil esterden (S)-Naproksen üretiminde proses parametrelerinin incelenmesi. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Bakker, M. 2000. Immobilisation of metalloenzymes and their application in nonnatural conversions, Technical University Delft.

- Balashev, K., Jensen, T.R., Kjaer, K. ve Bjornholm, T. 2001. Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces. Atomic forcemicroscopy. Biochemie, 83(5), 387–397.
- Barajas C. 2005. Biodiesel from castor oil: A promising fuel for cold weather, Proceedings of International Conference on Renewable Energies and Power Quality. Zaragoza, İspanya, 16-18.
- Baytop, T. 1980. Farmakognazi. Dilek Matbaası İstanbul. 183-185.
- Bernfeld, P., Wan, J. 1963. Antigens and enzymes made insoluble by entrapping them into lattices of synthetic polymers. Science, 142:678–679.
- Beilen, J.B., Li, Z. 2002. Enzyme technology: an overview, Current Opinion in Biotechnology, 13: 338–344.
- Beisson, F., Tiss, A., Riviere, C. ve Verger R. 2000. Methods for lipase detection and assay: a critical review. European Journal of Lipid Science and Technology, 133-153.
- Benjamin, S., Pandey, A. 1998. *Candida rugosa* lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology. Yeast, 14: 1069–1087.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. 2002. Sci and Tech Biochemistry, New York, 5.
- Bjorkling, F., Godtfredsen, S.E. ve Kirk, O. 1991. The future impact of industrial lipases. Trends Biotechnology, 9: 360–363.
- Blanco, R.M., Calvete J.J., Guisan, J.M. 1989. Immobilization-stabilization of enzymes. Variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose-(aldehyde) -multipoint attachment. Enzyme Microb. Technol., 11:353–359.
- Bolivar, J. M., Cava, F., Mateo, C., Rocha-Martin, J., Guisan, J. M., Berenguer, J., et al. 2008. Appl. Microbiol. Biotechnol., 80: 49–58.
- Bockisch, M. 1998. Fats and oils handbook, AOCS Press, Hamburg, Almanya, 53–68, 221–224, 345–360, 446–671.
- Bornscheuer U.T., Besler C., Srinivas R., Krishna S.H. 2002. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application, Trends Biotechnol., 20:433-37.
- Boundy, J., Smiley, K.L., Swanson, C.L., Hofreiter, B.T. 1976. Exoenzymic activity of alpha-amylase immobilized on a phenol-formaldehyde resin Carbohydr. Res., 48:239–244.
- Bugg, T. 1996. An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry, Blackwell Science, Great Britain.

- Cabral, J.M.S., Kennedy J.F. 2000. Immobilisation techniques for altering thermal stability of enzymes In: Gupta MN (Ed.) Thermostability of enzymes. Springer,163.
- Castro-Ochoa, L.D., Rodriguez-Gomez, C., Valerio-Alfaro, G. ve Ros, R.O. 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans*. Enzyme and Microbiology Technology, 37: 648–654.
- Chang, T.M.S. 1964. Semipermeable microcapsules. Science,146:524–525.
- Chaplin, M.F., Bucke, C. 1990. Enzyme Technology, Cambridge University Press, Cambridge.
- Chen, L., Daniel, R.M. ve Coolbear, T. 2003. Detection and impact of protease and lipase activities in milk powders. International Dairy Journal, 13: 255-275.
- Cherry, N. A. .2000. Spilling the beans about castor oil and its derivatives. NLGI Spokesman. 64:18–24.
- Chibata, I., Tosa, T., Sato, T., Mori, T. and Matuo, Y. 1972. In: Terui G (Ed.) Fermentation technology today, 383–389.
- Christie, W. 1973. Lipid analysis, Pergamon Press, Oxford, İngiltere, 3–12.
- Çolak, U. 2011. İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin Kitosan Üzerine İmmobilizasyonu Ve Karakterizasyonu Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Çoşkun G. 2007. Glutatyon –s–transferaz enziminin farklı taşıyıcılarda immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Ege Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Demirel, E. 2007. Hint yağından değerli kimyasalların elde edilmesi. Anadolu Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Kimya Mühendisliği Bölümü. Yüksek Lisans Tezi.
- Droge, M.J. 2004. Selection of novel lipases and esterases for enantioselective biocatalysis. Ridderprint BV, Ridderkerk, The Netherlands.
- Erciyes, A. T., Dandik, L., Erkal, F. S. 1991. The decomposition of secondary esters of castor oil with fatty acids. J. Amer. Oil Chem. Soc.,68: 642-645.
- Ertugay, N., Bayhan, Y.K. 2008.J. Hazard. Mater., 154: 432–439.
- Evans, W. C. 2002. pharmacognosy, elsevier publications, Londra, İngiltere, 185–186.

- Fadıloglu, S. 1996. Kinetics of olive oil hidrolisis by free and immobilized *Candida Rugosa* lipase. Ph. D. Thesis, Universtiy of Gaziantep, 24–56.
- Fennema, O.R. 1985. Food Chemistry, Second Edition, Mdi Dekker, Wisconsin, Madison, USA, 371-475.
- Fernandes C.S., Olivera I.R.W.Z., Orlando F.F., Almir S., Vieira C.L. 2008;, Biosensor based on laccase immobilized on microspheres of chitosan crosslinked with tripolyphosphate, Sensors and Actuators ,133: 202–207.
- Gamayurova, V.S. 2013. Features of the enzymatic hydrolysis of castor oil. Biocatalysis, 3:269-273.
- Gill J. ve Parish J.H. 1997. Minireview: Lipases-Enzymes at an Interface, Biochemical Education, 25.
- Gombert, A.K., Pinto, A.L., Castilho, L.R., ve Freire, D.M.G. 1999. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate, Process Biochemistry, 35: 85–90.
- Grubhofer, N., Schleith, L. 1953. Modified ionexchange resins as specific adsorbent. Naturwissenschaften., 40:508–508.
- Guisan, J.M., Penzol, G., Armisen, P., Bastida, A. and Blanco, R.M. 1997. Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates. In: Immobilization of Enzymes and Cells, (Bickerstaff, G. F., ed.), Humana Press, Totowa, NJ, 261–275.
- Gunstone, F.D. 1999. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids, Journal of the Science of Food and Agriculture, 79: 1535–1549.
- Haki, G.D., Rakshit, S.K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresource Technology, 89: 17-34.
- Hartmeier, W. 1988. Immobilized Biocatalysts: An Introduction, Springer-Verlag, Berlin, 212.
- Hürrem, F. 2010. Katalazın Çapraz Bağlı Enzim Agregatlarını (Clea) Oluşturma Yöntemiyle İmmobilizasyonu Ve Karakterizasyonu, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M. ve Misset, O. 1994. Bacterial lipases, FEMS Microbiology Reviews, 15: 29-63.
- Jaeger, K.E. ve Reetz, M.T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. TIBTECH, 16: 396–403.

- Jaeger, K. ve Eggert, T. 2002. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 390–397.
- Jinwal, U.K., Roy, U., Chowdhury, A.R., Bhaduri, A.P. ve Roy, P.K. 2003. Purification and Characterization of an Alkaline Lipase from a Newly Isolate *Pseudomonas mendocina* PK-12CS and Chemoselective Hydrolysis of Fatty Acid Ester. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 11: 1041–1046.
- Johnson, R. W. ve Fritz, E. 1989, Fatty acids in industry processes properties derivatives applications, Marcel-Dekker Inc., New York, A.B.D., 13-14.
- Khaskheli, AA., Talpur, F.N., Ashraf, M.A., Cebeci, A., Jawaid, S., Afridi, H.I. 2015. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 113: 56–61.
- Katchalski-Katzir, E., Silman, I. and Goldman, R. 1971. Effect of the microenvironment on the mode of action of immobilized enzymes. *Adv Enzymol.*, 34:445–536.
- Kamori, M., Yamashita, Y. and Naoshima, Y. 2002. Enzyme immobilization utilizing a porous ceramics support for chiral synthesis, *Chirality*, 14: 558-561.
- Keha, E.E. Ve Küfrevioğlu, Ö., 2004. *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum.*
- Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., 2000. *Biyokimya 2. Baskı, Aktif Yayınevi, 638.*
- Keskin, S.Y., Keskin, C.S. 2014. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 172:289–297.
- Keys, J. D. 1976, Chinese herbs, their botany, chemistry and pharmacodynamics, Tokyo, Japonya, 105.
- Kiener, A., Wubbolts, M. and Witholt, B. 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature London.*, 409:258–268.
- Kirk-Othmer, 1979. *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*, Cilt 5. John&Wiley Sons, New York, A.B.D., 1–15.
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C. 2002. Industrial enzyme application. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 345-351.
- Klibanov, A.M. 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, 409: 241–246.
- Kutay, F., 2002. Enzimler. İnsan Biyokimyası, Taner Onat, Kaya Emerk, Eser Y.Sözmen, Palme Yayıncılık, Ankara, 197–202.
- Li, H., Zhang, X. 2005. Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus sp.* *Protein Expression and Purification*, 42: 153–159.

- Mateo C., Palomo J.M., Lorante- Fernandez G., Guisan J.M., Fernandez- Lafuente R., Improvement of Enzyme Citivity, Stability and Selectivity, Enzim Microbiology Technology, Weinheim ,704-707, 2007.
- Martinez, A., Soberon-Chavez, G. 2001. Characterization of the lipA gene encoding the major lipase from *Pseudomonas aeruginosa* strain. AppliedMicrobiology Biotechnology, 56: 731-5.
- Meenal, S., Puthli Virenda, K., Rathod Aniruddha, B. 2006. Enzymatic hydrolysis of castor oil: proces intensification studies. Biochemical Engineering Journal, 31(1):31-41
- Mitz, M.A. 1956. New soluble active derivatives of an enzyme as a model for study of cellular metabolism. Science.,123:1076–1077.
- Mukherjee, K.D. ve Hills, M.J. 1994. in Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application. Cambridge UniversityPress, Cambridge, 49–75,
- Mutlu, D. 2006. Rasemik Naproksen Esterden Enantiyoseçimli Hidroliz İle S- Naproksen Üretiminde Reaksiyon Parametrelerinin İncelenmesi. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Mutlu, M., Meier, M. A. R. 2010. Castor oil as a renewable resource for the chemical industry. Eur. J. Lipid Sci. Technol.,112: 10-30.
- Nas S., Gökalp H. Y., Ünsal M. 2001. Bitkisel Yağ Teknolojisi, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları, 15-25.
- Naslıyan, M. 2012. Çeşitli dokulardan aldöz redüktaz enziminin izolasyon ve immobilizasyonu. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Nelson, J.M. Griffin, E.G. 1916. Adsorption of invertase. J Am Chem Soc.,38:1109–1115.
- Ogunniyi D. S. 2006: Castor oil: A vital industrial raw material, Bioresource Technology,97: 1086-1091.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J.L., Verscheuren, K.H.G., Goldman, A. 1992. The / β hydrolase fold. Protein Engineering, 5: 197-211.
- Önal, S., Tatar, S. 2000, Karpuz β -galaktozidazının doğal ve sentetik polimerlerde immobilizasyonu. Ege Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi.
- Özçömlekçi E. 2006. Proteaz Enziminin Glutaraldehit Kullanarak Kovalent Bağlanma İle İmmobilizasyonunda Optimum Şartların Belirlenmesi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.

- Paiva, A.L., Balcao, V.M. and Maltaca, F. X. 2000. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 27:187-204.
- Pekin, B. 1978. Fizikokimya Dersleri. Erciyes Üniversitesi. Fen Fakültesi. Ders Notları.
- Pleiss J., Fischer M., Schmid R.D. 1998. Anatomy of Lipase Binding Sites. The Scissile Fatty Acid Binding Site. *Chem. Phys. Lipids*, 93: 67-80.
- Rathi, P., Bradoo, S., Saxena, R.K. ve Gupta, R. 2000. A hyper-thermostable, alkaline from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation. *Biotechnology Letters*, 22: 495–498.
- Rogero, S.O., Malmonge, S.M., Lugao, A.B., Ikeda, T.I., Miyamaru, L. & Cruz A.S. 2003. Biocompatibility Study of Polymeric Biomaterials Artificial Organs, 27: 424-427.
- Quiococho, F.A. and Richards, F.M. 1964. Intermolecular cross-linking of a protein in the crystalline state: carboxypeptidase A. *Proc Natl Acad Sci. USA.*, 52:833–839.
- Saldamlı, İ. 1998. Gıda kimyası, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 110–115.
- Sayari, A., Frikha, F., Miled, N., Mtibaa, H., Ali ,Y.B., Verger, R. ve Gargouri, Y. 2005. N-terminal peptide of *Rhizopus oryzae* lipase is important for its catalytic properties. *FEBS Letters*, 579: 976–982.
- Saxena, R.K., Davidson, W.S., Sheoran, A. ve Giri, B. 2003. Purification and characterisation of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochemistry*, 39: 239–247.
- Scarpa, A. ve Guerci, A. 1982. Various uses of castor oil plant (*Ricinus Communis* L.) a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 5: 117–137.
- Schmid, R.D., Verger, R. 1998. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Application. *Angewandte Chemie International Edition*, 37:1608.
- Scholz V., Silva J. N. 2008. Prospects and risks of the use of castor oil as a fuel. *Biomass and Bioenergy*, 32: 95-100.
- Sharma, R., Chisti, Y. ve Banerjee, U.C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19: 627-662.
- Singh, S. ve Banerjee UC. 2007. Purification and characterization of trans-3-(4 methoxyphenyl) glycidic acid methyl ester hydrolyzing lipase from *Pseudomonasaeruginosa*. *Process Biochemistry*, 42: 1063–1068.

- Smibert, R.M, ve Krieg N.R. 1981. General characterization, 409–443.
- Strayer D.,2006. Foods, Fats and Oils, Institute of Shortening and Edible Oils, New York.
- Sümengen M., 2011. Laktik Asit Bakterilerinden Fitaz Üretimi Ve Endüstriyel Kullanım Olanakları. Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Swern, D. 1979. Bailey's industrial oil and fat products. John&Wiley Sons, Cilt 2, New York, A.B.D., 175-176.
- Şirin, Y. 2016. Termofilik *Geobacillus* sp. TF16 suşundan saflaştırılan fitazın farklı destek materyallerine immobilizasyonu ve doğal bir besin kaynağındaki fitatı parçalama etkinliğinin incelenmesi. Karadeniz Teknik Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Kimya Bölümü. Yüksek Lisans Tezi.
- Taipa, M.A., Aires-Barros, M.R. ve Cabral, J.M.S. 1992. Purification of lipases. Journal of Biotechnology, 26: 111–142.
- Tsai, S.H., Liu, C.P., ve Yang, S.S. 2007. Microbial conversion of food wastes for biofertilizer production with thermophilic lipolytic microbes. Renewable Energy,32: 904–915.
- Tallent, W. H., Sumrell, G. 1974. Production, chemistry, and commercial applications of various chemicals from castor oil. J. Amer. Oil Chem. Soc.,51: 65–71.
- Telefoncu, A. 1986. Enzimolojinin prensipleri, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. Ders Notları, 18.
- Telefoncu, A. 1996. Protein saflaştırma stratejisi ve amacı, Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Ders Notları, 18.
- Telefoncu, A. 1997. İmmobilize enzimler, Enzimoloji. Ders Notları, 193.
- Tilbeurgh, H. Van., Egloff, M.P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R., Cambillau, C. 1993. Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: ctytallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*. Nature, 362: 814-820.
- Trevan, M. 1980. Techniques of Immobilization. In: Immobilized Enzymes. An Introduction and Applications in Biotechnology. Wiley, Chichester-New York, 1–9.
- Tyler, V. E., Brady, L. R. ve Robbers, J. E. 1988. *Pharmacognosy*, Lea& Febiger, Philadelphia, A.B.D., 82-97.

- Vasishtha, A. K. Trivedi, R. K. ve Das, G. 1990. Sebacic acid and 2-octanol from castor oil, J. Amer. Oil Chem. Soc.,67, 333-337.
- Wang F., Guo C., Liu H.Z., Liu C.Z. 2008. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase by metal affinity adsorption on magnetic chelator particles, J. Chem. Technol. Biotechnol, 83: 97-104.
- Wang, Y., Srivastava, K.C., Shen, G.J. ve Wang, H.Y. 1995. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain. Journal of Fermentation and Bioengineering, 79: 433-438.
- Webb, C. E. 1992. Enzyme Nomenclature. Academic Press.,306-307.
- Winkler, F.K., D'Arcy A., Hunziker, W. 1990. Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism, Nature,343: 771-774.
- Whellcuright, S.M. 1991. Protein Characteristics. Protein Purification: Design and Scale up of Downstream Processing. Oxford University Pres, New York, 26-40.
- Wiseman, A. 1986. Handbook of Enzyme Biotechnology. 2nd Edition, Jon Wiley & Sons, Chicester, England.
- Wiseman, A. 1995. Introduction to principles. In: Wiseman A, editor. Handbook of enzyme biotechnology. Ellis Horwood Ltd. T.J. Press Ltd, Padstow, Cornwall, UK, 3-8.
- Wong, C.H., And Whitesides, G.M. 1994. Enzymes in Synthetic Organic Chemistry, Pergamon, Great Britain.
- Wyk, B. E. V., Oudtshoorn, B. V. ve Gericke, N. 1977. Medicinal plants of South Africa, Briza Publications, Güney Afrika, 216-217.
- Yang, D. S. ve Rhee, J. S. 1992. Continuous hydrolysis of olive oil by immobilized lipase in organic solvent. Biotechnology Bioengineering, 40: 748-752.
- Yeganeh, H., Talemi P.H. 2007. Preparation and properties of novel biodegradable polyurethane networks based on cator oil and poly (ethylene glycol). Science Direct.,92: 480-489.
- Zaid, A.N., Zohud, N., E'layan, B., Aburadi, T., Jaradat, N. Ali, I., et al. 2017. Drug Des. Dev. Ther.,11: 3291-3298.
- Zaks, A. 2001. Industrial biocatalysis Curr. Opin. Chem. Biol., 5: 130-136.

ÖZGEÇMİŞ

Kübra Özdemir, 18.11.1993'te Sakarya'da doğdu. İlkokulu Atatürk İlköğretim Okulu'nda tamamladı. Orta öğretimini Nuri Bayar Orta Okulu'nda tamamladıktan sonra 2011 yılında Hacı Zehra Akkoç Kız Lisesi'nden mezun oldu. Aynı yıl Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde üniversite eğitimine başladı. Lisans eğitimini sekiz dönemde tamamlayarak 2015 yılında mezun oldu. Son döneminde Hendek Eğitim Bilimleri Fakültesinde formasyon eğitimini alıp 2015 yılı içerisinde Sakarya Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü'nde Biyokimya dalında yüksek lisansına başladı.