

TC.  
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PAPATYADAN (*Matricaria chamomilla* L.)  
SAFLAŞTIRILAN LİPAZ ENZİMİNİN ÇEŞİTLİ  
TAŞIYICILARA İMMOBİLİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tuğba AZAP**

**Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA**

**Tez Danışmanı : Bahar BİLGİN SÖKMEN**

**Aralık 2018**

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

**PAPATYADAN (*Matricaria chamomilla* L.) SAFLAŞTIRILAN LİPAZ  
ENZİMİNİN ÇEŞİTLİ TAŞIYICILARA İMMOBİLİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tuğba AZAP**

**Enstitü Anabilim Dalı**

**: Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Bu tez 03.12.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.**

**Doç. Dr.  
Nurhan  
GÜMRÜKÇÜOĞLU  
Jüri Başkanı**

**Prof. Dr.  
Bahar BİLGİN  
SÖKMEN  
Üye**

**Doç.Dr.  
Hakan BEKTAŞ  
Üye**

**Doç. Dr.  
Bahadır KOZ  
Enstitü Müdürü**

## 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.

Tuğba AZAP  
03/12/2018

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca, tez çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde yardım ve desteğini hiç esirgemeyen çok değerli danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Bahar BİLGİN SÖKMEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve bugünlere gelmemi sağlayan canım aileme, tez çalışmam boyunca cihaz kullanımı ve bilgileri konusunda deneyim ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Betül YILMAZOĞLU, Esra AYAR ve Kimyager Rıdvan İLGÜN'e en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No: FEN-BAP-A-140316-65) teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

|                                       |     |
|---------------------------------------|-----|
| TEŞEKKÜR .....                        | I   |
| İÇİNDEKİLER .....                     | II  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ ..... | VI  |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                | VII |
| TABLolar LİSTESİ .....                | IX  |
| ÖZET.....                             | IX  |
| SUMMARY .....                         | XI  |

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| BÖLÜM 1. GİRİŞ .....                                           | 1  |
| 1.1. Enzimler ve Özellikleri.....                              | 1  |
| 1.1.1. Enzim Kullanmanın Avantajları.....                      | 3  |
| 1.2. Enzimatik Bir Tepkimenin Hızını Etkileyen Faktörler ..... | 4  |
| 1.2.1.pH.....                                                  | 4  |
| 1.2.2.Sıcaklık.....                                            | 4  |
| 1.2.3. Enzim derişimi .....                                    | 4  |
| 1.2.4. Substrat derişimi .....                                 | 4  |
| 1.3. Lipaz Enzimi.....                                         | 6  |
| 1.4. Lipazların Özellikleri .....                              | 6  |
| 1.4.1. .Optimum pH.....                                        | 7  |
| 1.4.2. Optimum Sıcaklık ve Termal Kararlılık .....             | 8  |
| 1.4.3. Lipazın Aktivasyon ve İnhibisyonu .....                 | 8  |
| 1.4.4 İzoelektrik Nokta.....                                   | 8  |
| 1.5. .Lipazların Kaynakları.....                               | 8  |
| 1.5.1. Mikroorganizma Lipazları .....                          | 9  |
| 1.5.2. Hayvansal Lipazlar.....                                 | 9  |
| 1.5.3. Bitkisel Lipazlar .....                                 | 9  |
| 1.6. Lipazların Sınıflandırılması .....                        | 9  |
| 1.6.1. Spesifik Olmayan(Non Spesifik) Lipazlar .....           | 9  |
| 1.6.2. 1,3 Spesifik Lipazlar .....                             | 10 |
| 1.6.3. Yağ Asiti Spesifik Lipazlar .....                       | 10 |

|                                                                        |        |
|------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1.7. Lipazların Endüstriyel Kullanım Alanları.....                     | 10     |
| 1.7.1. Gıda Endüstrisinde Lipazlar.....                                | 11     |
| 1.7.2. İlaç Endüstrisinde Lipazlar.....                                | 11     |
| 1.7.3. Organik Sentezlerde Lipazlar.....                               | 12     |
| 1.7.4. Kozmetik ve parfüm endüstrisinde lipazlar. ....                 | 12     |
| 1.7.5. Deri endüstrisinde lipazlar.....                                | 12     |
| 1.7.6. Kağıt Hamuru ve Kâğıt Endüstrisinde Lipazlar.....               | 12     |
| 1.8. Enzim İmmobilizasyonu.....                                        | 12     |
| 1.8.1. .Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....                           | 15     |
| 1.8.2. Taşıyıcıya Bağlama Metodu.....                                  | 16     |
| 1.8.2.1. Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi.....                             | 17     |
| 1.8.2.2. İyonik Bağlama Yöntemi.....                                   | 18     |
| 1.8.2.3. Kovalent Bağlama Yöntemi.....                                 | 18     |
| 1.8.2.4. Çapraz Bağlama Yöntemleri.....                                | 21     |
| 1.8.2.5. Tutuklama Yöntemleri.....                                     | 22     |
| 1.8.2.6. Kafes Yöntemi.....                                            | 23     |
| 1.8.2.7. Mikrokapsülleme Yöntemi.....                                  | 24     |
| 1.8.2.8 .Sol-jel Tutuklama.....                                        | 24     |
| <br>BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....                                   | <br>26 |
| <br>BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM.....                                   | <br>28 |
| 3.1. Materyal.....                                                     | 28     |
| 3.1.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar.....                             | 28     |
| 3.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....                    | 28     |
| 3.2. Yöntem.....                                                       | 29     |
| 3.2.1. Lowry Yöntemi ile Protein Miktar Tayini. ....                   | 29     |
| 3.2.1.1. Ayıraçlar.....                                                | 29     |
| 3.2.1.2. Deneyin Yapılışı.....                                         | 29     |
| 3.2.1.3. Bovin Serum Albumini Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi. .... | 30     |
| 3.2.2. Lipaz Aktivitesi Tayini. ....                                   | 30     |
| 3.2.2.1.Estaraz Aktivitesi Tayini.....                                 | 30     |

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.2.1.1. Ayıraçlar.....                                                                                 | 30 |
| 3.2.2.1.2. Deneyin Yapılışı.....                                                                          | 31 |
| 3.2.3.Papatya Lipazının İmmobilizasyonu.....                                                              | 31 |
| 3.2.3.1. Kovalent Bağlama İle İmmobilizasyon.....                                                         | 31 |
| 3.2.3.1.1.Papatya Lipazının Kieselgel 60, Deniz Kumu ve Gözenekli Cam<br>Boncuklara İmmobilizasyonu.....  | 31 |
| 3.2.4. Adsorpsiyon Yöntemi ile İmmobilizasyon.....                                                        | 32 |
| 3.2.4.1. Papatya Lipazının Alümina'ya İmmobilizasyonu.....                                                | 33 |
| 3.2.4.2. Papatya Lipazının Cam Boncuklara İmmobilizasyonu.....                                            | 33 |
| 3.2.5. İyonik Bağlama Yöntemi ile İmmobilizasyon.....                                                     | 33 |
| 3.2.6. Lipazın Çeşitli Taşıyıcılardaki % Tutuklanmaları.....                                              | 34 |
| 3.2.7. İmmobilize Papatya Lipazının Esteraz Aktivitesine Göre Kinetik Özelliklerinin<br>İncelenmesi ..... | 34 |
| 3.2.8. İmmobilize Papatya Lipazının Esteraz Aktivitesi ve Protein Miktar<br>Tayini.....                   | 34 |
| 3.2.9. İmmobilize Lipazın Esteraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisinin<br>İncelenmesi.....                 | 34 |
| 3.2.10. Esteraz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi.....                                  | 35 |
| 3.2.11. İmmobilize Lipazın Esteraz Aktivitesine Zamanın Etkisi.....                                       | 35 |
| <br>BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....                                                                     | 36 |
| 4.1. Lipazın Çeşitli Taşıyıcılardaki % Tutuklanmaları.....                                                | 36 |
| 4.2 İmmobilize Lipazın Kinetik Özellikler .....                                                           | 36 |
| 4.2.1. İmmobilize Lipaz Esteraz Aktivitesine pH'nın Etkisi. ....                                          | 36 |
| 4.2.2. İmmobilize Lipaz Esteraz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi.....                                       | 40 |
| 4.2.3. İmmobilize Lipazın Esteraz Aktivitesine Zamanın Etkisi.....                                        | 46 |
| <br>BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....                                                                      | 48 |
| <br>KAYNAKLAR.....                                                                                        | 50 |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                                                             | 55 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

|        |                       |
|--------|-----------------------|
| °C:    | Santigrat Derece      |
| %:     | Yüzde                 |
| μmoL:  | Mikromol              |
| mM:    | Milimolar             |
| μg/mL: | Mikrogram / Mililitre |
| kDa:   | Kilo Dalton           |
| mg/mL: | Miligram/Mililitre    |
| μg:    | Mikrogram             |
| M:     | Molar                 |
| μL:    | Mikrolitre            |
| mL:    | Mililitre             |
| Nm:    | Nanometre             |



## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1. Enzim Substrat İlişkisi.....                                                                  | 2  |
| 1.2. Michaelis-Menten Grafiği.....                                                                 | 5  |
| 1.3. Lipazların Katalitik Aktivasyonu.....                                                         | 7  |
| 1.4. Spesifik Olmayan Lipazların Katalizlediği Reaksiyonun Denklemi.....                           | 9  |
| 1.5. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Sınıflandırılması.....                                     | 16 |
| 1.6. Fiziksel Adsorpsiyon.....                                                                     | 17 |
| 1.7. Kovalent Bağlama.....                                                                         | 18 |
| 1.8. Çapraz Bağlanma.....                                                                          | 21 |
| 1.9. Enzim Tutuklama.....                                                                          | 23 |
| 1.10. Enzimin Bir Kapsül İçerisinde Tutuklanması.....                                              | 24 |
| 1.11. Sol-jel matrikste enzim tutuklanması.....                                                    | 25 |
| 4.1. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Silikajele İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği.....     | 37 |
| 4.2. Adsorpsiyon Yöntemi ile Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği.....         | 38 |
| 4.3. Kovalent Olarak Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği.....                 | 38 |
| 4.4. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Deniz Kumuna İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği.....   | 39 |
| 4.5. İyonik Bağlama Yöntemi ile Amberlite'e İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği.....      | 39 |
| 4.6. Adsorpsiyon Yöntemi ile Aluminaya İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği.....           | 40 |
| 4.7. Kestane Lipazı ile İmmobilize Lipazların Optimum pH Grafiği.....                              | 40 |
| 4.8. Adsorpsiyon Yöntemi ile Alüminaya İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği.....     | 41 |
| 4.9. İyonik Bağlama Yöntemiyle Amberlite'e İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği..... | 41 |

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.10. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Deniz Kumuna İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği.....    | 42 |
| 4.11. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Silikajele İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği.....      | 42 |
| 4.12. Adsorpsiyon Yöntemi ile Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği.....          | 43 |
| 4.13. Kovalent Olarak Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği.....                  | 43 |
| 4.14. Kestane Lipazı ile İmmobilize Enzim Optimum Sıcaklık Grafiği.....                                    | 44 |
| 4.15. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Deniz Kumuna İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine Zamanın Etkisi..... | 44 |
| 4.16. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipaz Aktivitesine Zamanın Etkisi.....    | 45 |
| 4.17. Kovalent Bağlama ile Silikajele İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine Zamanın Etkisi.....           | 45 |
| 4.18. Adsorpsiyon Yöntemi ile Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine Zamanın Etkisi.....       | 46 |
| 4.19. Adsorpsiyon Yöntemi ile Aluminaya İmmobilize Edilen Lipaz Aktivitesine Zamanın Etkisi.....           | 46 |
| 4.20. İyonik Bağlama Yöntemi ile Amberlite'e İmmobilize Edilen Lipaz Aktivitesine Zamanın Etkisi.....      | 47 |
| 4.21. İmmobilize ve Doğal Lipaz Aktivitesine Zamanın Etkisi.....                                           | 47 |

## TABLÖLER LİSTESİ

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1.1. Enzimlerin Kullanım Alanları.....                                                 | 2  |
| Tablo 1.2. Kullanımı Yaygın Bazı Ticari Lipazlar .....                                       | 11 |
| Tablo 1.3. Mikrobiyal Lipazların Endüstriyel Uygulamaları.....                               | 11 |
| Tablo 4.1. Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilize Edilmiş Lipaz Enziminin %<br>Tutuklanmaları ..... | 36 |
| Tablo 4.2. İmmobilize ve Serbest Enzimin Optimum pH ve Sıcaklık<br>Değerleri.....            | 36 |

## **Papatyadan (*Matricaria Chamomilla* L.) Saflaştırılan Lipaz Enziminin Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilizasyonu**

### **ÖZET**

Bu çalışmada, ölkemizde Giresun İli ve çevresinde bol miktarda yetişen papatyadan (*Matricaria chamomilla* L.) ilk defa saflaştırılan lipaz enziminin çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu incelendi.

Lipazlar (Triaçilgliserol açıl hidrolaz, E.C.3.1.1.3), su-yağ ara yüzeyinde trigliseridlerin hidrolizini katalizleyen ve endüstride sayısız uygulama alanına sahip olan enzimlerdir. Gıda, deri, deterjan, kağıt, biyomedikal, biyodizel, biyosensör, kozmetik ve parfüm sanayinde uygulama alanları bulunmaktadır.

Enzimlerin kimya endüstrisinde ve biyoteknolojide çeşitli amaçlar için kullanılması, bu katalizörlerin daha ekonomik ve kullanışlı hale getirilmesini gerektirmiştir. Endüstriyel işlemlerde immobilize lipaz enzimleri serbest lipaz enziminin yerini almış ve kullanım alanı artmıştır.

Lipaz enziminin çok çeşitli bitkilerden saflaştırıldığı ancak papatya bitkisinden saflaştırılmadığı literatür araştırmalarından görölmüştür. Özgün nitelikte bir çalışma olduğu düşünöldüğünden, papatya bitkisinden lipaz enziminin ilk defa saflaştırılması ve çeşitli taşıyıcılara immobilize edilerek kullanım alanının artırılması amaçlanmıştır. Enzimleri kimya ve biyoteknoloji alanında daha çekici hale getirebilmek için özellikle son 30 yıl içinde enzim immobilizasyonu üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. İmmobilize enzimlerin endüstride, birçok alanda kullanımının yaygınlaştığı görölmektedir.

Saflaştırılan lipaz çeşitli taşıyıcılar üzerine adsorpsiyon, kovalent ve iyonik bağlama yöntemleri ile immobilize edildi. Protein miktarı ve lipaz esteraz aktivitesi, sırasıyla Lowry ve Erlanson yöntemlerine göre tayin edildi.

Papatya lipazı çeşitli taşıyıcılar (Kieselgel 60, deniz kumu, Amberlite IRA-900, alumina, cam boncuk) üzerine immobilize edilerek immobilize lipazların optimum pH, optimum sıcaklık, optimum reaksiyon süresinin tayini gibi kinetik özellikleri de incelendi.

**Anahtar Kelimeler:** Papatya (*Matricaria chamomilla* L.), Lipaz, İmmobilizasyon.

## **Immobilization to Various Carriers of Purified Lipase Enzyme from Chamomile (*Matricaria Chamomilla* L.)**

### **SUMMARY**

In this study, the immobilization of lipase enzyme, which has been purified for the first time, from chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) grown in Giresun Province and its surroundings was investigated.

Lipases (Triacylglycerol acyl hydrolase, E.C.3.1.1.3) are enzymes that catalyze the hydrolysis of triglycerides at the water-fat interface and have numerous applications in the industry. They have application areas in food, leather, detergent, paper, biomedical, biodiesel, biosensor, cosmetics and perfume industries.

The use for various purposes in the chemical industry and in biotechnology of enzymes has necessitated making more economical and useful of these catalysts. In industrial processes, the immobilized lipase enzymes replaced of free lipase enzymes and increased its use.

It was seen in literature studies that lipase enzyme has been purified from various plants but not purified from chamomile plants. Since it is thought to be an original work, it was aimed to purify from chamomile plant of lipase enzyme and increase its use by immobilizing to various carriers for the first time. In order to make enzymes more attractive in chemistry and biotechnology, studies on enzyme immobilization have intensified in the last 30 years. It is seen that the use of immobilized enzymes in industry in many fields has become widespread.

The purified lipase was immobilized on the various carriers by adsorption, covalent and ionic bonding methods. Protein amount and lipase esterase activity were determined according to Lowry and Erlanson methods, respectively.

Chamomile lipase was immobilized on various carriers (Kieselgel 60, sea sand, Amberlite IRA-900, alumina, glass beads) and it was investigated kinetic properties such as optimum pH, optimum temperature and optimum reaction time of immobilized lipases.

**Keywords:** Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.), Lipase, Immobilization.

# BÖLÜM 1. GİRİŞ

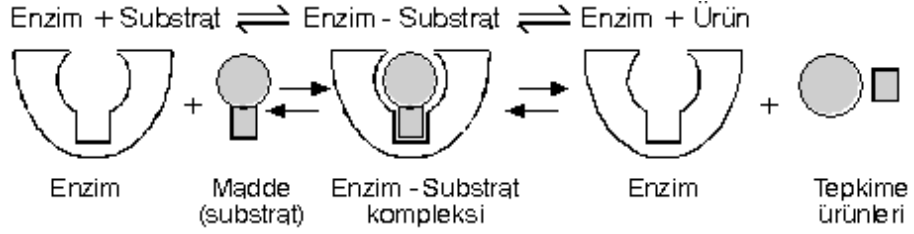
## 1.1. Enzimler ve Özellikleri

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek şekilde ılımlı koşullarda gerçekleşmesine olanak sağlayan biyokatalizatör olarak bilinir. Bununla birlikte yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösteriyor olmaları, enzimlerin doğal ortamlarının dışında daha çok alanda yararlanabilme olanağını ortaya çıkarmaktadır. Bundan dolayı enzimoloji bilim dalı, enzimlere ilişkin özellikleri bir bütün olarak inceler ve başlıca biyokimya ve moleküler biyoloji, yanısıra genetik, bakteriyoloji ve mikrobiyoloji, fizikokimya, botanik, farmakoloji ve toksikoloji, tarım, tıp, patoloji, fizyoloji, mühendislik, biyoteknoloji vb. bilim dalları ile bazı endüstriyel alanlarda büyük öneme sahiptir.

Enzimler, canlı hücrelerde gerçekleşen metabolitik reaksiyonların çoğunu hızlandıran veya düzenleyen protein yapıdaki biyolojik katalizörlerdir. Enzimler, kimyasal tepkimelerde herhangi bir değişikliğe uğramadan canlı sistemlerde meydana gelen tepkimelerin hızını artırır [1].

Enzimlerin hemen hepsi protein yapılı moleküllerdir. Bununla beraber bazı enzimler, katalitik etkinlik göstermek için protein yapısında olmayan bir bileşene de gereksinim duyarlar ki bu bileşene “kofaktör” adı verilir. Böyle enzimlerde inaktif protein bileşeni “apoenzim”, kofaktör ile beraber aktif enzim ise “holoenzim” olarak tanımlanabilir. Kofaktör, organik yapılı molekül (koenzim) veya metal iyonu olabilir. Enzim moleküllerinde protein ve kofaktör bileşenleri katalizde işlevseldir.

Enzimlerin protein kısmı doğal proteinlerde olduğu gibi peptit bağı ile birbirine bağlı 20 amino asitten oluşur. Fakat birçok enzimde posttranslasyonel modifikasyonlar olayları sonucunda protein zincirinde bulunan amino asitlerin R-grubunda bazı kimyasal olaylar ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte posttranslasyonel modifikasyonlar sonucunda proteinin zincirine karbonhidrat, çeşitli organik moleküller lipid ve metal iyonları bağlanmaktadır [2].



Şekil 1.1. Enzim-Substrat İlişkisi [3]

Tablo 1.1. Enzimlerin Kullanım Alanları [5]

| Enzim                                  | Kullanım alanı                    |
|----------------------------------------|-----------------------------------|
| Kolesterol oksidaz                     | Tıp'ta kolesterol tayininde       |
| Proteazlar, lipaz, amilaz              | Deterjan sanayinde                |
| Laktaz, mikrobiyal proteazlar          | Süt ve süt ürünleri endüstrisinde |
| Pektinaz, selüloz, limonaz             | Meyve suyu sanayinde              |
| Proteaz, lipaz                         | Deri sanayinde                    |
| Amilaz, glukoz izomeraz                | Nişasta endüstrisinde             |
| Katalaz, amilaz                        | Tekstil sanayinde                 |
| Amilaz, amiloglikozidaz, pentosanaz    | Ekmek sanayinde                   |
| Redüktaz, amilaz, fosfataz, oksidazlar | Analitik amaçlı analizlerde       |
| Termolizin                             | Aspartam üretiminde               |
| Ksilenaz                               | Kağıt endüstrisinde               |
| Papain, katalaz                        | Et sanayinde                      |
| Penisilin amidaz, oksidaz              | Eczacılıkta                       |

Enzimler, sistemli bir şekilde tepkime türüne göre isimlendirilmekte ve gruplandırılmaktadır. Bu sisteme göre enzim çeşitleri altı gruba ve her grup alt sınıflara bölünmüştür:

**a) Oksidoredüktazlar:** Biyolojik redoks tepkimelerine etki eden enzimlerdir.

**b) Transferazlar:** Bu tür enzimler bazı gruptaki bileşiklerin molekülünden diğerine transferini katalizlerler.

**c) Hidrolazlar:** Ester, asit anhidrit, eter, amid (peptid), C-C, C-Halojen, P-N ve glikolizit bağlarını etkileyerek bu moleküllerin hidroliz tepkimelerini katalizler ve etkiledikleri bağların türüne göre de alt sınıflara ayrılırlar. Lipaz enzimi bu grupta bulunmaktadır.

**d) Liyazlar:** Organik bileşiklerdeki C-C, C-O, C-S ve C-Halojen bağlarının birbirinden uzaklaştırılıp, çift bağların oluşturulduğu tepkimeleri kataliz etmektedirler.

**e) İzomerazlar:** Molekül içi çevrilmeleri, Geometrik ya da optik izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizlemektedirler.

**f) Ligazlar:** Bu sınıftaki enzimler, iki molekülden yeni C-O, C-N, C-S, C-C bağlarını oluşturarak birbirleri ile birleşmesini katalizler [1].

### 1.1.1. Enzim Kullanmanın Avantajları

Enzimler, reaksiyon türüne ve substrata karşı spesifiktir. Doğal substratlarla sınırlı kalmazlar ve organik bileşiklerde de uygulanırlar. Bununla birlikte enzimatik reaksiyonlarda herhangi bir yan ürün oluşturmazlar. Verim %100' dür. Proses basamaklarının sayısı gittikçe azalmaktadır.

Kimyasal katalizörlere karşı reaksiyonu 10<sup>8</sup>-10<sup>11</sup> kere daha hızlı bir şekilde gerçekleştirebilirler.

Enzimlerin birçok doğal kontrol mekanizma şekilleri vardır. Enzimlerin aktivitesi, bulundukları koşullara göre düzenlenebilmektedir. Ortamda bulunan kontrol edici küçük moleküllere göre enzim aktivitesini azaltır veya artırabilir.

Fizyolojik pH, basınç ve sıcaklıkta çalışmaya olanak sağlar. Bundan dolayı reaksiyonun çalışması için aktivasyon enerjisinin düşmesini sağlayarak, reaksiyonu daha az enerjide ve düşük sıcaklık seviyesinde gerçekleştirebilirler [3].

Reaksiyonun gerçekleştiği ortamdan geri dönüştürülerek tekrar kullanılabilir hale getirilebilirler.

Kemoselektivite, diastereoselektivite, regioselektivite ve enantioselektivite gösterebilirler.



## **1.2. Enzimatik Bir Tepkimenin Hızını Etkileyen Faktörler**

### **1.2.1. pH**

Enzimlerin aktiviteleri, bulundukları ortamın hidrojen iyonunun derişimine bağılı değışmektedir. Enzim tepkimelerinde hızın maksimum değerde bulunduğu ve bütün enzimler için spesifik durumda bulunan optimum pH değerleri bulunmaktadır. pH değeri değışikliği ile amino asit zincirindeki iyonik özellikler değıştiiğinden denatüre duruma gelen enzimler katalitik aktivitelerini kaybederler.

### **1.2.2. Sıcaklık**

Enzimatik tepkimelerde sıcaklığın artması durumunda moleküller arasında çarpışmanın artışı söz konusu olacağından tepkimenin hızıda buna karşı artmaktadır. Fakat, maksimum değerde bir hıza ulaşıldıktan sonra sıcaklığın artması ile hız da yeniden bir azalma olduğu görülecektir. Bu sıcaklığa optimum sıcaklık adı verilmektedir. Enzimler protein yapılı bir bileşik olduğından optimum sıcaklığın üzerine çıkıldığında denatürasyon olmaktadır. Öncelikle enzimin molekül yapısı bu sıcaklıktan etkilenir ve daha sonra enzimin içinde bulunduğu aktif merkezde etkilenerek, reaksiyonun tepkime hızını düşürürler.

### **1.2.3. Enzim Derişimi**

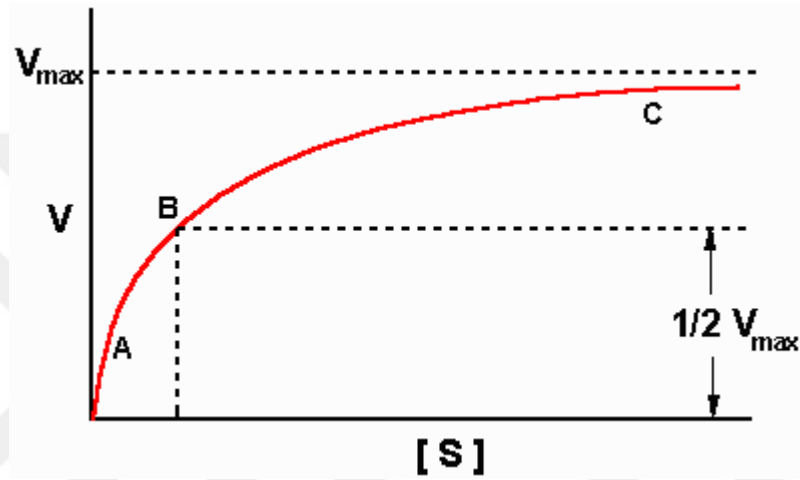
Enzimatik tepkimelerde çok substrat olması durumunda tepkimenin hızı, enzimin derişimi ile orantılı bir şekilde artmaktadır. Denge durumunda olan enzim derişiminin denge sabiti üzerinde herhangi bir etkisi söz konusu değıildir. Tepkimenin hızına etki eden enzimler, hızın ve dengenin saatlerini değııştirmemektedirler.

### **1.2.4. Substrat Derişimi**

Ortamda yer alan enzim derişimi ve diğer etmenler değıışmediği müddetçe tepkimenin hızı, başlangıçta bulunan substrat derişiminin artması ile doğru bir şekilde artış göstermektedir. Ancak buna substrat ilavesi yapılırsa reaksiyonun hızı

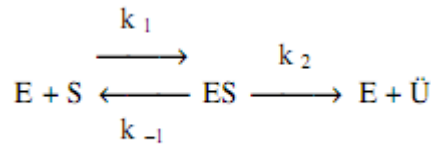
giderek daha az artacak ve belirli bir süre substrat derişiminde maksimum bir hıza ( $V_{max}$ ) ulaşacaktır. Substratın derişimi daha fazla artsada reaksiyon hızında bir değişme olmayacaktır [4].

Enzimin reaksiyon hızı (V), substrat konsantrasyonuna (S) karşı grafiğe dökölürse hiperbolik bir eğri meydana gelecektir. 1913 yılında Leonard MICHAELIS ve Maud MENTEN ikisi birlikte hiperbolik eğrinin matematiksel bir şekilde nasıl gösterileceğini formülle belirtmişlerdir.



Şekil 1.2. Michaelis-Menten Grafiği (Sürekli artan substrat konsantrasyonuna karşı hızda meydana gelen değişim).

Enzim-substrat (ES) kompleksine ait tepkimede; E: enzim, S: substrat, ES: enzim-substrat kompleksini ifade etmektedir.



Bu reaksiyonda; E: enzim, S: substrat, ES: enzim-substrat kompleksi, Ü: ürünü gösterir. Enzim tepkime hızı Michaelis-Menten eşitliği ile verilir.

### 1.3. Lipaz Enzimi

Biyoteknolojik çalışmalarda çeşitli yönlerde kullanılmaları, kimyasal proseslere spesifiklik kazandırmaları, yan reaksiyonlardaki durumları önlemesi ve

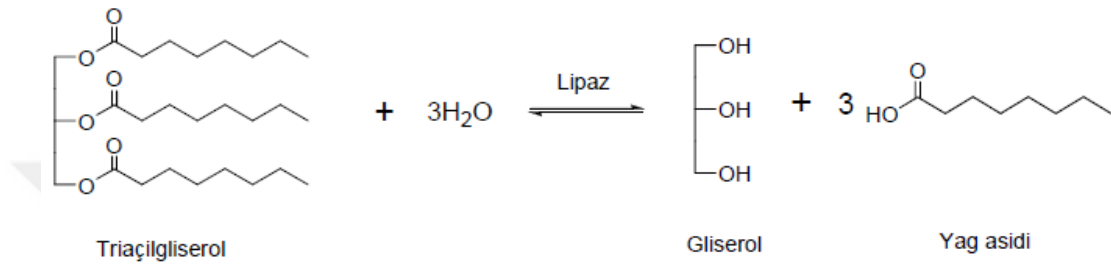
reaksiyondaki ürünlerin ayrılmalariyla ilgili sorunlari kolaylastirdiklarindan, birçok özellikleri sebebiyle lipazlara gitgide büyük bir ilgi vardır. Günümüzde enzimlerin kullanım alanlarında lipazın önemi gitgide artmaktadır. Lipazların enzim alanında paylarının büyümesinde, enzimlerin enantiyo seçiciliği, bölgesel seçiciliği ve büyük substrat aralıkları etki göstermiştir. Lipazlar bitki, hayvan ve mikrobiyal kaynaklı olmakla birlikte, endüstriyel alanda mikrobiyal kaynak yapıllı lipazlar tercih edilmektedir. Son yıllarda üç boyutlu yapıların belirlenmesinde yapılmış çalışmalar, lipazların yapı-işlev özelliklerine karşı ışık tutacak çalışmalara temel atmaktadır [5]. Lipazlar hidroliz, esterifikasyon, interesterifikasyon, aminoliz ve asidoliz gibi birçok biyodönüşüm olaylarının gerçekleşmesini sağlayan çok yönlü biyolojik katalizörlerdir. Günümüzde ilaç, kozmetik, pestisit, biyosensör ve deterjan sanayileri vb.birçok alanlarda lipazlar önümüze gelmektedir [3].

Lipazlar, triaçilgliserollerin ester hidrolizine etki eden enzimlerdir. Böyle enzimler, insan ve hayvansal organizmasında, birçok bitki ve mikroorganizmalarda ortaya çıkmaktadır. Birçok biyolojik sıvılar, hücreler, organlar ve çeşitli dokularda bulunurlar [6].

Lipazın endüstrideki uygulamaları deterjan sanayisi, peynir üretimi, cilt ve yüzey temizleyicileri ve kağıt üretimi gibi birçok uygulama alanlarına sahiptirler [7-10]. Lipazlar normal koşullarda bitkisel ve hayvansal yağların tersinir hidrolizine etki eden enzimlerdir. Adlandırması; E.C. 3.1.1.3 Triaçilgliserol Açıl Hidrolaz biçimindedir. Son yıllarda lipaz enzimi araştırmalarına karşı olan ilgi gitgide artmaktadır. Bu lipazların benzersiz yapıda karakteristik özelliklerine bağlı bir olaydır. Yüksek sıcaklıkta ve pH değerinde organik çözücülere karşı büyük kararlılıktadır. Kimyasal ürünlerine karşı yüksek seçicilik oranına sahiptirler. Bu özelliklerden dolayı lipaz enzimlerine karşı düşük sıcaklık ve basınçta reaksiyonlarını etkileme imkanına sahiptir [8,11].

Son yıllardaki yeni lipaz çalışmalarının kullanıldığı proseslerde, özellikle tutuklanmış hücrelerin çalışıldığı lipazı katalizleyen sürecin teknik çalışmalarına karşı yapılan araştırmaların çoğaldığı görülmektedir [12]. Lipazların kullanılır

özellikleri kimyasal seçicilik, bölgesel seçicilik ve çift yönlü seçicilik göstermesinden kaynaklanmaktadır. Fungi ve bakteriler gibi mikroorganizmalar tarafından büyük bir verimle üretildiğinden büyük oranda kullanılabilir olma özellikleri vardır. Birçok lipazın kristal yapısının sırları bilimsel araştırmalarda ortaya çıkması ve mühendislik stratejilerinin oluşmasını epeyce kolaylaştırmışlardır. Bu özelliklerden dolayı, organik kimya alanında en çok biyokatalizör olarak lipazlar seçilmektedir [13].



Şekil 1.3. Lipazların katalitik aktivasyonu

## 1.4. Lipazların Özellikleri

### 1.4.1. Optimum pH

Yüksek pH'lı yapıdaki enzimler genellikle etkilerini kaybederler. Enzimlerin yüksek oranda çalıştıkları pH değeri "optimum pH" değeri olarak adlandırılmaktadır. Pepsinin yapısındaki pH 1,8'de ya da arginazın yapısındaki pH 10,0'da en yüksek etkinlik gösteren istisnâ enzimler de bulunduğu gibi, birçok enzimde pH 4,5-8,5 aralıklarında en yüksek etkinliğine sahiptirler. Yüksek pH'larda yapısındaki proteinlerin yapılarının bozulmaları ile enzimin etkinliği, geri dönüşümlü olarak düşmektedir [6].

pH 7,0-9,0 aralıklarında ve 30-40°C sıcaklığında yüksek etkinlik göstermesi, mikrobiyal lipazın önemli karakteristik özelliğindendir [14]. Lipazlar sabit bir pH değerinde katalitik olarak aktiftirler. Çoğunda optimum pH değeri 7,0-8,0 arasında değişmektedir. Mikrobiyolojik yapıya sahip lipaz enzimleri pH 6,0-7,5 seviyesinde yüksek oranda kararlılık göstermektedirler [15].

#### 1.4.2. Optimum Sıcaklık ve Termal Kararlılık

Lipazların maksimum değerde gösterdiği aktivite sıcaklık değerleri ortalama 30-40°C'dır. Hayvansal ve bitkisel lipazlar, çoğunlukla mikrobiyal (mantar ve bakteri) lipaz enzimlerine karşı daha az termal kararlılık gösterirler [15].

#### 1.4.3. Lipazın Aktivasyon ve inhibisyonu

Lipazın aktivitesine karşı, iyonların ve reaktiflerin araştırılması sonucunda, ağır metal iyonları lipazın aktivitesine etki ettiğini, alkali metal iyonlarının artırdığını göstermiştir. Lipazın üzerinde aktif olan iyon  $\text{Ca}^{2+}$ 'dur. Lipazın aktivitesine etki eden maddelere  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ 'ın bazı tuzları, boronik asitler ve dietil-p-dinitrofenil fosfat örnek olarak gösterilebilir [16].

#### 1.4.4. İzoelektrik Nokta (pI)

Net yükün sıfır olduğu noktalardır. pI civarında proteinler daha az çözünmeye uğrarken pI değerinden uzaklaştıkça daha fazla çözünme gösterirler.

#### 1.5. Lipazların Kaynakları

Lipaz enzimleri genellikle bakteri, mantar ve mayalardan meydana gelen mikrobiyal florada bulunmaktadır. Lipaz enzimleri, domuz ve insanda bulunduğu gibi, yüksek yapılı bitkiler olan kene otu tohumu (*Ricinus communis*) ve kolza tohumu (*Brassica napus*)'nda da bulunmaktadır. Biyoteknolojik alanlarda mikrobiyal lipaz enzimleri oldukça dikkat çekmektedir. Lipaz enzimleri ile yapılan endüstriyel çalışmalarda genelde saflaştırılmış ticari enzimler kullanılmaktadır [17]. Lipazlar, doğada bulunma durumuna göre şöyle sınıflandırılabilir:

### 1.5.1. Mikroorganizma Lipazları

Bakteriyel lipazlar, mantar türü lipazlar, *Pseudomonas* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus faecalis*, *Candida cylindracea*, *Humicola lanuginosa*

### 1.5.2. Hayvansal Lipazlar

Doku lipazları, sindirim sistemi lipazları, lipoprotein lipazı, adipoz dokusu lipazı, karaciger lipazı, süt lipazları, pankreas lipazı, ince bağırsak lipazı.

### 1.5.3. Bitkisel Lipazlar

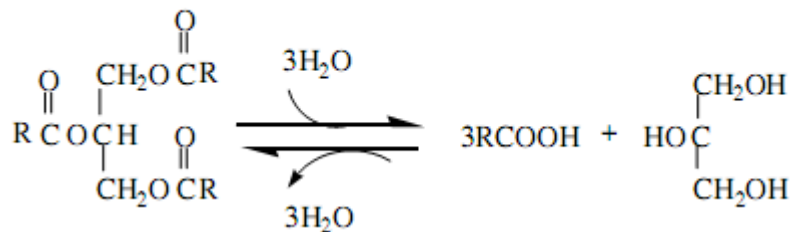
Buğday, yulaf, mısır lipazları

## 1.6. Lipazların Sınıflandırılması

Lipaz enzimleri özellik durumuna göre üç ayrı grup altında incelenebilirler [1].

### 1.6.1. Spesifik Olmayan (Non-Spesifik) Lipazlar

Bu grupta bulunan enzimler trigliseridlerin tüm pozisyonlarındaki açıl gruplarını koparabilme özelliğine sahip enzimlerdir. Reaksiyon uygulamalarında ara ürün diaçil ve monoaçilgliserinlerden oluşmaktadır. Trigliseridler, gliserin ve yağ asitlerine kadar parçalanırlar.



Şekil 1.4. Spesifik olmayan lipazların katalizlediği reaksiyonun denklemi [1].

### 1.6.2. 1,3 - Spesifik Lipazlar

Bu grupta bulunan lipaz enzimleri nötral yağları eşdeğer konuma ait olan 1 ve 3 durumundan spesifik olarak hidroliz ederler. Reaksiyon olayları sonucunda triağılglicerollerden yağ asitleri, 1,2 (2,3)-diğılgliceroller ve 2-monoğılgliceroller oluşmaktadır. 1,2 (2,3)-diğılgliceroller ve özellikle 2-monoğılgliceroller kimyasal yönden kararsız yapıda olup sırasıyla 1,3-diğılglicerollere ve 1(3)-monoğılglicerollere izomerleşirler. Bu durumda meydana gelen izomerler enzimler tarafından tekrar substrat şekilde geri kullanılırlar ve sonuç olarak 1,3-spesifik lipazlar da spesifik olmayan lipaz enzimleri gibi triağılgliceroller gliserol ve serbest yağ asidine kadar ayırırlar. Pankreatik lipaz enzimleri de bu gruba dahil olmaktadır.

### 1.6.3. Yağ Asiti Spesifik Lipazlar

Bu grupta yer alan lipaz enzimleri ağılglicerollerdeki birkaç yağ asitlerine özgü olup buradaki yağ asitlerinin meydana getirdiğı ester bağlarını parçalara ayırırlar.

## 1.7. Lipazların Endüstriyel Kullanım Alanları

Endüstriyel alanda harcanan enzimlerin hemen hemen hepsi mikrobiyal kaynaklı olmakla beraber, bitkisel yapılı enzimler de bu alanda kullanılmaktadır. Lipaz enzimleri bir organizmadan başkasına veya organizma içindeki lipidlerin biyolojik dönüşümü için önemli enzimlerdendir.

Kullanım alanı geniş bazı ticari lipaz enzimleri Tablo 1.2’de verilmiştir. Tablo 1.3’te ise mikrobiyal lipazların uygulama alanları verilmiştir [18].

Tablo 1.2. Kullanımı yaygın bazı ticari lipazlar

| Tip    | Kaynak           | Uygulama alanı | Üretici firma                                                         |
|--------|------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Fungal | <i>C. rugosa</i> | Organik sentez | Amano, Biocatalysts,<br>Boehringer Mannheim, Fluka,<br>Genzyme, Sigma |

|                   |                       |                   |                                   |
|-------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------------------|
|                   | <i>C. antarctica</i>  | Organik sentez    | Boehringer Mannheim, Novo Nordisk |
|                   | <i>T. lanuginosus</i> | Deterjan katkısı  | Boehringer Mannheim, Novo Nordisk |
|                   | <i>R. miehei</i>      | Gıda işlenmesi    | NovoNordisk, Biocatalysts, Amano  |
| <b>Bakteriyel</b> | <i>B. cepacia</i>     | Organik sentez    | Amano, Fluka, Boehringer Mannheim |
|                   | <i>P. alcaligenes</i> | Deterjan katkısı  | Genencor                          |
|                   | <i>P. mendocina</i>   | Deterjan katkısı  | Genencor                          |
|                   | <i>Ch. Viscosum</i>   | Organik sentezler | Asahi, Biocatalysts               |

Tablo 1.3. Mikrobiyal Lipazların Endüstriyel Uygulamaları

| <b>Endüstri</b> | <b>Görevi</b>         | <b>Ürün ya da Uygulama</b>                                  |
|-----------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------|
| Deterjan        | Yağların Hidrolizi    | Kumaşlardan yağ lekelerinin uzaklaştırılması                |
| Süt ürünleri    | Süt yağının hidrolizi | Peynir, süt ve tereyağdaki Tatlandırıcıların geliştirilmesi |
| Kozmetik        | Sentez                | Nemlendiriciler                                             |
| Kağıt           | Hidroliz              | Geliştirilmiş kalitede kağıt                                |
| Deri            | Hidroliz              | Deri ürünleri                                               |
| Temizlik        | Hidroliz              | Yağların uzaklaştırılması                                   |
| İlaç            | Transesterifikasyon   | Sindirim düzenleyiciler                                     |
| İlaç            | Hidroliz              | Özel lipidler                                               |
| Yağ             | Transesterifikasyon   | Margarin, gliserol,                                         |
| Yağ             | Hidroliz              | Mono ve diaçil gliseroller                                  |
| İçecek          | Aroma geliştirilmesi  | İçecekler                                                   |
| Ekmek           | Tat geliştirilmesi    | Raf ömrünün uzatılması                                      |

### 1.7.1. Gıda Endüstrisinde Lipazlar

Lipaz ezimleri, triaçilgliserollerdeki yağ asidindeki zincirlerin yerlerini değiştirmesinden dolayı lipidlerde özelliklerin farklılaşmasını sağlarlar. Bundan dolayı daha ucuza mal olur ve çok az miktarda lipid ile dahabüyük bir değerde yağ değiştirmesine olanak sağlarlar [19].

### 1.7.2. İlaç Endüstrisinde Lipazlar

Kimyasal yolla üretilmeyen ilaçların oluşumunda, kiral bileşiklerin meydana gelmesinde lipaz enziminden faydalanılır. Ayrıca antiinflamatuvar ilaçlar,



angiotensin-I dönüştürücü enzimler ve  $\beta$ -blokerlerin üretiminde lipaz enzimleri kullanılmaktadır [20].

### **1.7.3. Organik Sentezlerde Lipazlar**

Lipaz enzimleri kimyasal, stereo, bölgesel ve seçici transformasyonların önemli bir bölümünde katalizör olarak kullanılmaktadırlar [21].

### **1.7.4. Kozmetik ve Parfüm Endüstrisinde Lipazlar**

Endüstriyel alanda bulunan kozmetik ve kokulu ürünlerin bileşiklerinin üretilmesinde lipaz enzimleri önemli yer tutmaktadır. Kozmetik ve kokulu ürünlerin bileşiklerinin meydana getirilmesinde lipaz enzimlerinin kullanıldığı literatürlerde görülmektedir [22].

### **1.7.5. Deri Endüstrisinde Lipazlar**

Deri sanayisinde üretilen post ve deri işleme geçmişten bugüne kadar gelmektedir. Deri işleme, deri altı yağlarının kaldırılması, kılların ayıklanması, doldurma vb. işlemlerden oluşmaktadır[17].

### **1.7.6. Kâğıt Hamuru ve Kâğıt Endüstrisinde Lipazlar**

Kâğıt sanayisinde meydana gelen kâğıt hamurundan katranı uzaklaştırmak için lipaz enzimi kullanılmaktadır. Katran, kâğıt ve kâğıt hamuru üretiminde önemli problemlere neden olan trigliseridler ve balmumu olarak bilinen ağacın hidrofobik bileşenlerini açıklamak için kullanılmaktadır. Japonya'daki Nippon Kâğıt Endüstrisi, trigliseridlerin yaklaşık % 90 kadarını hidroliz etmek için *Candida rugosa*'dan meydana getirilen lipaz enzimi ile bir katran kontrol metodu geliştirmiştir [18].

## **1.8. Enzim İmmobilizasyonu**

Enzimler kimya, biyoteknolojik alan ve bunun gibi endüstri alanında kullanılmaktadırlar. Harcanan bu enzimlerin pahalı ve ortam koşullarına karşı güçsüz

olmaları, enzimlerin daha ekonomik ve kullanılır duruma gelmesi için yapılan araştırmalara daha fazla aşama katmıştır. Birçok kaynaktan izole edilen enzimlerin, aktivitelerini yitirmeden reaksiyon ortamından geri dönüşmeleri ise imkansızdır. Bundan dolayı enzimlerin fazla spesifik ve daha pahalı katalizör olmalarına neden olurlar ve maliyetin artmasını sağlarlar. Serbest halde bulunan enzimler devamlı üretim sistemine uygulanamazlar. Bu nedenlerden dolayı immobilizasyon işlemlerinin geliştirilmesi ve uygulanması bu enzimleri endüstriyel alanlarda daha etkili ve kullanılır hale getirebilmektedir.

İmmobilizasyon işlemi, enzimlerin suda çözünemeyen taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlı olması, suda çözünemeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak eklenmesi ve suda çözünemeyen bir matriks yada suda çözünemeyen mikrokapsüllerde tutuklanmasıdır.

Bütün enzimler için ideal bir taşıyıcı ve immobilizasyon işlemi seçilirken bilimsel koşulların olduğunu açıklamak pek mümkün değildir. Taşıyıcı ve immobilizasyon işlem yöntemini seçerken hem immobilize olan enzimin karakteristiklerini ve uygulanacağı alanı, hem de seçilen metod ile taşıyıcı kombinasyonunun sınırlamalarının ve özelliğinin uyumuna dikkat edilmelidir. [1].

İmmobilizasyon işleminin bu alanda getirdiği bazı avantajlardan aşağıda söz edilmiştir:

- ☐ Çok aşamalı ardışık reaksiyon olayları için uygundur. Reaksiyon aşamasında ürün oluşumunu gözaltına alınabilir.
- ☐ Doğal enzimlere karşı daha kararlı yapıdadırlar.
- ☐ Birçok şartlarda serbest halde bulunan enzimlerden daha yüksek yapıda aktivite gösterebilirler.
- ☐ Uzun süreli olarak ve tekrar tekrar kullanılabilirler.
- ☐ Devamlı olarak işlemlere uygulanabilme koşulları bulunmaktadır.
- ☐ Reaksiyonun sonucunda bulunduğu alandan rahatça uzaklaştırılır ve ürünün enzimler tarafından kirletilmesi gibi sorunlar yaratmazlar.

□ Enzimlerin kendi kendilerini parçalama (autolysis, self-digestion) olanakları azalır.

□ Çalkalama, karıştırma gibi işlemler (mekanistik) açısından uygundur.

□ Çevre şartlarına (pH, sıcaklık v.s.) karşı dayanıklıdır.

Çoğunlukla immobilize olan enzimlerin işletme şartları etrafında aktif bulunduğu sürece, serbest halde bulunan enzimlere göre daha yüksektir. Böylelikle işlemin süresi azalır ve daha fazla sayıda saf ürünler meydana getirilebilir [1, 23].

Bunun yanı sıra immobilizasyon işleminin dezavantajları da bulunmaktadır:

- İmmobilizasyon işlemi süresince sıcaklık, pH değişimi ve serbest radikallerin meydana gelmesi gibi faktörler enzimlerin denatüre olmalarına ve aktivitelerini yitirmelerine neden olurlar. Bu nedenlerden dolayı enzimin immobilizasyonu sırasında aktif durumdaki grupların korunması için immobilizasyon işlemleri gerekli koşullar altında (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) yapılmalıdır.

- Birden fazla basamaklı immobilizasyon işleminde enzimin kararlılığı sınırlı olmalıdır.

- Bazı enzim taşıyıcılarında maliyet oldukça pahalıdır. İmmobilizasyon işlemlerinde enzimin yapısı konformasyonel değişikliklerden etkilenebilir. Farklı sebeplerden dolayı immobilize olan enzim zincirin hareketlerini etkileyebilir. İmmobilizasyonda kullanılacak olan kimyasalların tipini, taşıyıcı ile enzimin karşılıklı olarak etkileşmesini, aktiveleştirici veya çapraz bağlayıcı kimyasallar ile enzimin etkileşmesini bunlar sağlayabilir.

Enzim immobilizasyon işlemi, enzimin etrafında bulunan mikro çevreyi de etkileyebilir ve enzimin davranışlarında aşağıda belirtilen bazı değişiklikler oluşturabilirler [24].

**-Yapısal Değişiklikler:** İmmobilizasyon aşamasında, enzimin yapısının belli pozisyonlarda uzun süreli korunması ile enzim ve taşıyıcı arasında fazla sayıda bağlanmalar oluşabilmektedir. Enzim yapısının katalitik aktifliği yapısal değişimlere

bağlı bulunduğundan  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerinde farklılık, enzimin aktifliğinde azalma olmaktadır.

- **Bölme Etkisi:** Poliiyonik destek uygulandığında iyonik yapıya sahip olan substrat, tepkime ortamında homojen bir yapıda dağılmaz. Enzimin çevresinde bulunan kütle fazından farklı derişimlerde bulunabilirler. Ölçülen bu derişim oranları genelde kütle fazından yapılmaktadır. Bölünme etkisi çok bulunan bir durumdur ve çözünen madde ile polimerik destek arasında hidrofobik etkileşim olmaktadır.

-**Difüzyon Sınırlaması:** Bu durum fiziksel büyüklük ile alakalıdır. Polimer desteğinin gözenek çapı substrat molekülünden daha küçük yapıda ise substratın destek içine difüzlenmesi ve enzim ile etkileşime geçmesi engellenir. Bunun sonunda tepkime meydana gelmez.

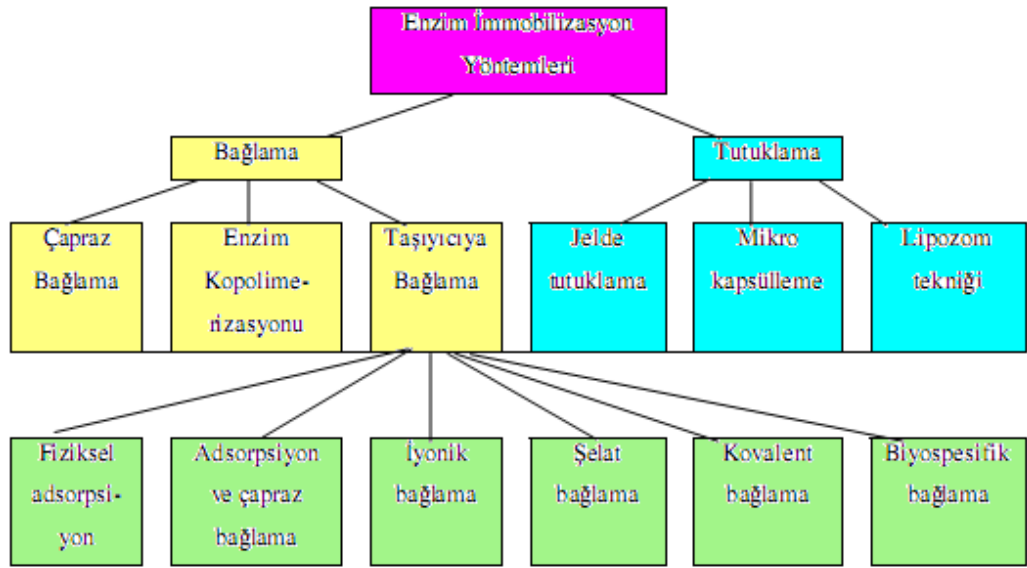
- **Sterik Sınırlamalar:** İmmobilize olan enzimin aktif halde bulunan uçları substrat molekülünün yaklaşmasına olanaklı yapıda değilse sterik nedenler ortaya çıkabilir. Mesela enzimin aktif halde bulunan grupları destek maddesine dönük halde ise substratın aktif merkezine yaklaşması engellenebilir. Enzim polimerik kafeste hapsedildiğinden, substrat moleküllerinin enzime yaklaşıp direk olarak temasa geçmesi matriks tarafından durdurulabilir.

- **İnaktivasyon:** Aşılması güç tepkime koşullarında (örneğin; ortamda serbest radikallerin veya oksitleyici reaktiflerin varlığı, yüksek pH gibi) meydana gelen immobilizasyon basamakları enzimin bir kısmını veya tamamını aktiflik yönünden kaybetmesine neden olabilirler. Bu durumda immobilize olan enzimin spesifik aktifliği, serbest halde bulunan enzimin aktifliğinden daha az seviyede bulunabilir. Enzimin başka bir konformasyonel değişimi söz konusu olmaksızın aktifliğini yitirebilir [25].

### 1.8.1. Enzim immobilizasyon Yöntemleri

İmmobilizasyon yöntemi seçilirken kullanılacak olan enzimin kimyasal yapısı ve bileşimi, substratın ve oluşacak ürünün özellikleri göz önünde bulundurulmalıdır [26]. Bunun yanında, immobilizasyon sırasında, enzimin aktivitesini yitirmesine sebep olmayacak bir yöntem seçilmesine dikkat edilmelidir.

Enzim immobilizasyon yöntemleri Şekil 1.5'teki gibi sınıflandırılabilir.



Şekil 1.5. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması [1].

### 1.8.2. Taşıyıcıya Bağlama Metodu

En bilinen immobilizasyon yöntemi olan Taşıyıcıya Bağlama Metodu, enzimlerin suda çözünmeyen taşıyıcılara bağlanması ile gerçekleşmektedir. Genel olarak; suda çözünen gruplardaki ve bağlanan enzim miktarındaki artış immobilize enzimin aktivitesinin artmasına neden olmaktadır.

Bu yönteme göre bağlı olan enzim miktarı ile immobilizasyon sonrasındaki enzim aktivitesi taşıyıcının yapısına bağlıdır [27]. Taşıyıcının belirlenmesi immobilize olan enzimin performansı yönünden çok fazla önem göstermektedir. Taşıyıcı seçilirken en

önemli etken enzimin türüdür [27]. Taşıyıcı seçiminde tanecik boyutu, yüzey alanı, polar grupların apolar gruplara oranı ve taşıyıcının kimyasal yapısı gibi etkenler göz önünde bulundurulur [28].

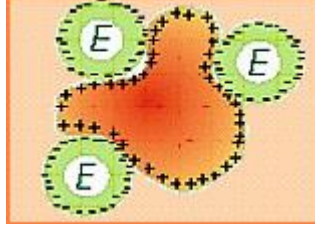
Taşıyıcıya bağlama metodu üç alt sınıfta incelenmektedir: Fiziksel adsorpsiyon, iyonik bağlanma ve kovalent bağlanma olmak üzere.

#### **1.8.2.1. Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi**

İmmobilizasyon işlemi için uygulanan en kolay metottur. Metod; yüzey aktif sularında çözünemeyen bir adsorbanın, enzim çözeltisi ile karıştırılarak enzimin fazlasının yıkanarak uzaklaştırılması esasına dayanır.

Eşdağılımlı olarak enzimi birbirine bağlayabilmek amacıyla kullanılan son yöntem; karıştırmalı ya da çalkalamalı bir banyoda, taşıyıcının enzim çözeltisine alınması ve karıştırılması ya da sürekli çalkalanması ile mümkündür. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimleri etkindir. Yöntemin başarılı olabilmesi için adsorban madde genellikle ön işleminden geçirilir. Enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan adsorbanlar; aktif karbon, diatome toprağı, gözenekli cam,  $\text{CaCO}_3$ , kül, silikajel, bentonit, hidrosiapatit, kollodyum nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır [29].

Adsorplanan enzimlerin aktif merkezleri bu işleminden etkilenmez, enzim serbest halde bulunan aktifliğini korur. Fakat enzim, bağlanmada rol alan etkileşimlerin kuvvetli olmamasından dolayı desorpsiyona uğrar. Bu sebeple yöntem dayanıklı değildir. İşlem sırasında aktivite kaybı ve üründe kirlilik oluşabilmektedir. Yüksek tuz veya substrat miktarı enzim desorpsiyon hızında artışa neden olmaktadır. Özellikle düşük derişim aralıklarında etkinlik gösteren enzimler için dezavantajdır Enzimin taşıyıcıya fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edilmesi Şekil 1.6'da görölmektedir [30].



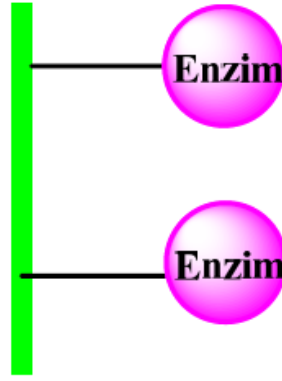
Şekil 1.6. Fiziksel Adsorpsiyon

#### 1.8.2.2. İyonik Bağlama Yöntemi

İyonik bağlama yöntemi enzimin suda çözünmeyen ve iyon değiştirici kalıntıları ihtiva eden bir taşıyıcıya iyonik bağlanması prensibine dayanmaktadır. Enzim ile taşıyıcı arasında fiziksel adsorpsiyon yöntemine göre daha kuvvetli bağ oluşur. Bu yöntemde kullanılan taşıyıcılar; selüloz gibi organik maddeler organik ve silika gibi inorganik destekleyici maddeler iyon değiştiricilerdir. Fiziksel adsorpsiyon yönteminde olduğu gibi iyonik bağlama yönteminde de immobilizasyon basit bir şekilde gerçekleştirilmektedir. İyonik bağlama ılımlı şartlarda gerçekleştiği için enzimin yapısında ve aktif merkezde değişikliğe sebep olmaz [28, 31].

#### 1.8.2.3. Kovalent Bağlama Yöntemi

Kovalent bağlama yöntemi enzimin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya kovalent olarak bağlanması esasına dayanmaktadır. Diğer yöntemlere göre daha karmaşık ve zor şartlarda gerçekleştirilir. Bu yöntemde taşıyıcı madde ile enzimin aktif bölgesinde yer alan fonksiyonel gruplar arasında bağ oluşumu gerekir. Taşıyıcı suda çözünmemelidir [28]; ayrıca enzimin taşıyıcıyı parçalamaması, taşıyıcının enzimde mikroorganizma üremesine imkan vermemesi, pH ve çözücülere dayanıklı olması gibi özellikler göstermesi göz önünde bulundurulur [28, 32, 33].



Şekil 1.7. Kovalent bağlama [34]

Kovalent bağlamaya bir örnek olarak Cho ve Rhee'nin gerçekleştirmiş olduğu silika bazlı immobilizasyonunda enzim aktivasyon aracı olarak glutaraldehitinde aracılığıyla florasil üzerine immobilize edilmiştir. Bu immobilize lipaz zeytinyağının hidrolizi için kullanılmıştır [35].

Knezevic ve ark., Eupergit C destek maddesine *Candida rugosa* lipazın immobilizasyon için üç farklı şekilde kovalent immobilizasyon yöntemi kullanmışlardır [36]. Geliştirilmiş bu immobilizasyon tekniği sulu sistemde oldukça basit olmasıyla birlikte yeniden uygulanabilir ve lipaz uygulamaları için ideal bir çözüm sağladığını öne sürmüşlerdir. Etkin bağlantı olabilmesi için enzim ve taşıyıcı immobilizasyondan önce etkin hale getirilmelidir. Genellikle enzimin bağlanması için taşıyıcı immobilizasyon öncesi aktivite edilir [37].

Kovalent bağ yöntemi uygulanan immobilize olan enzimin performansına etki eden etmenler sırasıyla:

- Taşıyıcının gözenek boyutu, partikül büyüklüğü
- Taşıyıcının kimyasal özellikleri
- Enzimin bağlanma özelliği
- İmmobilizasyon işleminden sonra veya immobilizasyon sırasındaki enzimin molekül şekli
- Enzimleri bağlamak amacıyla kullanılan ortamın şartları



- Taşıyıcı ve enzim arasında meydana gelen bağ sestate
- Taşıyıcıların içinde veya üzerindeki enzim miktarıdır.

Kovalent bağlanma metodunun avantaj ve dezavantajları ise aşağıda sıralanmaktadır.

#### *Avantajları*

- Enzim kararlılığı genellikle artar.
- Aktive edilmiş taşıyıcıya enzimi bağlamak basittir ve bağlı olmayan enzim yıkama ile giderilebilir.
- Enzim ve taşıyıcı arasında güçlü etkileşim olduğu için enzim çözeltiye karışmaz.
- Reaksiyon ortamından istenilen zaman giderilebilir.
- Sürekli sistemler için uygulanabilir.
- Değişik fiziksel şekillerde (tabaka, partikül vb.) üretilebilirler.

#### *Dezavantajları*

- Bağlanma aktivite için zorunlu aminoasit fonksiyonel grupları ile gerçekleştiğinden dolayı enzimin aktivitesinde düşüş gözlenebilir.
- Enzimin taşıyıcıya bağlanması için pahalı hazırlıklar gerekli olabilir.
- Enzimin zor reaksiyon şartlarına maruz kalmasıyla ürün veriminde düşüş gözlenir.
- Taşıyıcının yenilenememesi.

Kovalent bağlama yönteminde proteinlerin immobilizasyon işlemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemin avantajı enzim ile taşıyıcı arasında meydana gelen etkileşim güçlü olduğu için enzim çözelti ortamına sızmaz. Ancak aktivitenin yüksek değerde bulunması için temel aminoasit fonksiyonel grupları katalitik aktivite için destek maddesine karşı kovalent bağlanma söz konusu olmamalıdır. Bu durum bazen sıkıntı doğurabilir. Reaksiyon genellikle sulu ortamda gerçekleşir. Bu yöntemde kullanılan taşıyıcılar aktive edilmelidir. Yöntemin gerçekleştirilmesi çok kolay değildir. Enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ güçlü olduğu için bazen enzimatik

aktivitenin arttığı da gözlenmektedir [38]. Fonksiyonel gruplar içeren taşıyıcıya göre farklı reaksiyonlar geliştirilmiştir [39]. Bağlama yöntemleri genelde iki grupta incelenir: (1) bir polimere bir reaktif grup eklenmesiyle taşıyıcının aktivasyonu (2) aktivite edilmiş bir grup elde etmek amacıyla polimerin ana yapısının modifikasyonu. Bu aktivasyon süreçleri genel olarak, bağlama kısmında proteinlerdeki güçlü nükleofillerle tepkimeye girip destek maddesindeki elektrofilik grupları elde etmek amacıyla tasarlanmaktadır. Taşıyıcıya kovalent bağlama yönteminin temel ilkeleri, proteinlerin kimyasal modifikasyonu için kullanımıyla benzerdir. Genellikle tepkimelerde, yan zincirlerinde amino, karboksil gibi fonksiyonel grup bulunan lizin ( $\epsilon$ -amino grup), sistein (tiyol grup), aspartik asit veya glutamik asit (karboksilli asit) gibi aminoasitler kullanılırlar.

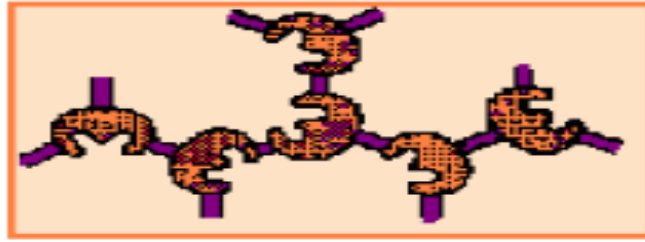
**Tablo 1.4.** Enzimlerin Kovalent Bağlama Metotları: Hidroksil fonksiyonlu matriksin aktivasyonu [40]

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

#### 1.8.2.4. Çapraz Bağlama Yöntemleri

Enzimlerin çapraz bağlanma yöntemi, protein moleküllerine veya suda çözünmeyen bir taşıyıcı üzerindeki fonksiyonel gruplara, proteinin moleküller arası çapraz bağlanması ile elde edilmektedir. Enzimlerin kendisi üzerine çapraz bağlanması masraflı olmakla birlikte aynı zamanda yeterli olmayan bir metoddur. Bu durumda

proteinin bir bölümü taşıyıcı gibi davrandığı için enzimatik aktivite düşmektedir. Genellikle çapraz bağlanmanın diğer immobilizasyon yöntemleriyle beraber uygulanması daha iyidir. Enzimin kovalent bağlanmayla immobilizasyon yapıldığı esnada çapraz bağlanma da kullanıldığında desorpsiyon çok az gözlenmektedir. Adsorblanmış haldeki enzimleri stabilize etmek ve poliakrilamit jellerden akan sızıntıyı önlemek amacıyla çapraz bağlanmanın sıklıkla kullanıldığı alanlardır [27]. Enzimin taşıyıcıya çapraz bağlanması aşağıdaki şekilde şematize edilmiştir:



Şekil 1.8. Çapraz Bağlanma

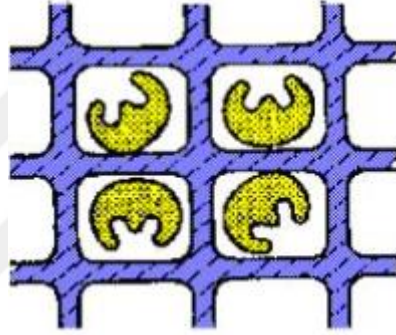
Çapraz bağlanma ile immobilizasyon, protein ve reaktif miktarı, pH ile immobilize edilecek enzime bağlı olmakla birlikte moleküleri bağlanmalar yanında moleküller arası bağlanmalar da oluşmaktadır [28]. Enzim immobilizasyonu bu yöntem ile dört farklı şekilde uygulanabilir;

- a) Enzimin sadece difonksiyonel reaktif ile tepkimesi
- b) Enzimin ortamda diğer bir protein olması halinde bifonksiyonel ajan ile tepkimesi
- c) Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıda adsorpsiyonu işlemi sonrasında bifonksiyonel ajanla tepkimesi
- d) Enzimin bifonksiyonel reaktifin etkin hale getirdiği polimer taşıyıcı ile tepkimesidir.

En sık kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehid, klorformat ve heterosiklik halojenürler, karbonildiimidazol, bisoksiranlar, pbenzokinonlar, divinilsulfanlar, geçiş metal iyonları ve epiklorhidrinler olmakla birlikte çapraz bağlama reaksiyonu ılıman şartlarda uygulanmadığından bazen önemli miktarda aktivite düşüşü gözlenebilmektedir [28, 41].

#### 1.8.2.5. Tutuklama Yöntemleri

Tutuklama yönteminde, diğer yöntemlerden farklı olarak enzimin kimyasal ya da fiziksel yollarla herhangi bir taşıyıcıya bağlı kalmadan belirli bir ortamda adsorpsiyonu gerçekleştirilir. Tutuklama esnasında enzim moleküllerinin polimer taşıyıcı içindeki kafeslerde ya da yarı geçirgen zar içinde ya da mikrokapsülleme ve misellerde tutulması gerçekleştirilir. Enzimin fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmış olmaması bu metodu kovalent bağlama ve çapraz bağlamadan farklı kılan en önemli faktördür [28].



Şekil 1.9. Enzim Tutuklama

Biyokatalizörleri tutuklama yöntemi kafes, lipozom, mikrokapsül, membran ve ters misel olmak üzere 5 çeşittir.

#### 1.8.2.6. Kafes Yöntemi

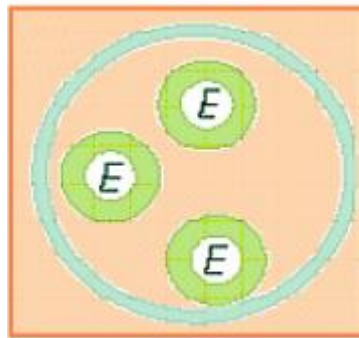
Kafes yönteminde enzim polimerin matriksinde çapraz bağlanma ile oluşan odacıklarda (kafes) tutuklanır. Bu yöntemde en sık kullanılmakta olan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanan poliakrilamittir [28]. Bu yöntem, yüksek düzeyde çapraz bağlanma ile oluşan bir polimerin enzim içinde oluşturulması temeline dayanır. Polimerleşme sonrasında enzim molekülleri çapraz bağlar arasında tutuklanır ve bundan dolayı ortama geçmeleri önlenir, çapraz bağ yüzdesi çok iyi ayarlanmalıdır. Biyokatalizör molekülleri tutuklanabilmeli fakat substrat moleküllerinin biyokatalizör moleküllerine ulaşmasına engel olmamalıdır. Çapraz bağ yüzdesinin fazla olursa bu durum hem substratın enzimin aktif merkezine

ulaşmasını engel olur hem de enzimin zincir yapısının da bozulmasına yol açarak aktivite kaybına sebep olabilir [28]. Bu yüzden bir çapraz baē yüzdesi ayarlamaya dikkat edilmelidir. Çapraz baē yüzdesi enzime ve taşıyıcıya baēlıdır. Bu metodla immobilize olacak enzimin substratının daha küçük moleküllü olması gerekir.

Kafes yönteminin avantajları; çok basit uygulanabilmesi, fiziksel bir yöntem olması ve aynı zamanda fazla miktarda enzimle gerçekleştirilmesine gerek olmamasıdır. Suda çözünmeyen taşıyıcılarla da immobilizasyon uygulanmaktadır. Yöntemin dezavantajları ise; immobilizasyon uygulanırken aktivite kaybının deney koşullarına baēımlı oluşu ve immobilize enzimin yalnız küçük moleküllü substratlara iyi aktivite göstermesidir [28].

#### 1.8.2.7. Mikrokapsülleme Yöntemi

Mikrokapsül yönteminde biyokatalizör yarı geçirgen polimer zar içerisinde tutuklanır. Bu yöntemin avantajları substrat ve enzime geniş yüzey alanı saēlayabilmesi ve aynı zamanda birçok türde enzimin de hemen hemen aynı şekilde immobilize edilebilmesidir. Yöntemin dezavantajları ise yüksek molekül aēırlıklı substratlarda gerçekleştirilememesi, bazı durumlarda enzimin aktivitesini kaybetmesi, zarın duvarına yapışması veya mikrokapsüllerden damlamasıdır [42].

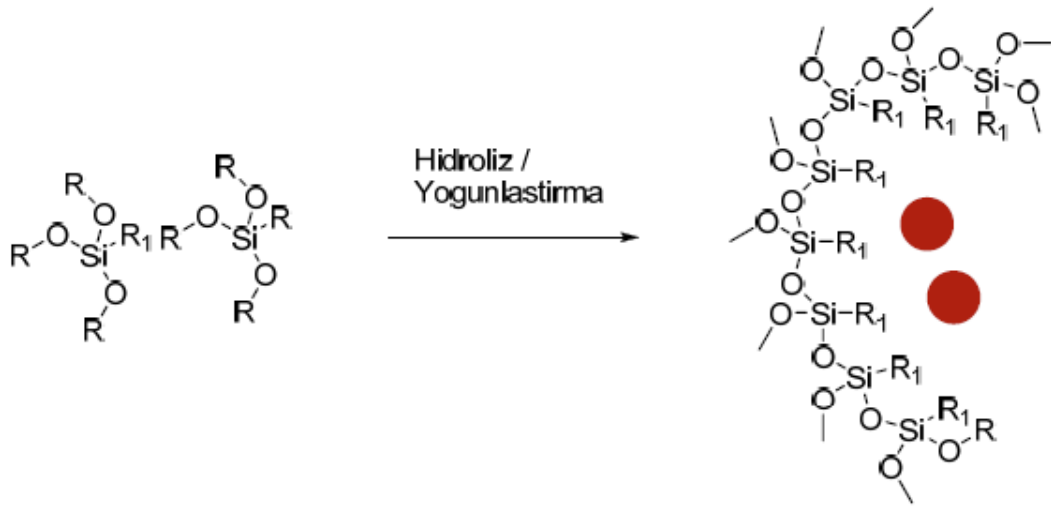


şekil 1.10. Enzimin Bir Kapsül İçerisinde Tutuklanması

### 1.8.2.8. Sol-jel Tutuklama

Enzim immobilizasyonu için inorganik sol-jel fiziksel tutuklama yöntemi 1950 yılından itibaren bilinmekle birlikte kullanımı 1990 yılından bu yana önem kazanmıştır [43]. Dickey ilk defa biyolojik aktivitenin bir miktar silika asit türevli camlarda kimi enzimlerin tutuklanabildiğini ispatlamıştır [44]. Sonraki 30 yılda tutuklanmış biyokatalizörlerin hazırlanması amacıyla bu yöntemin kullanıldığını belirten birkaç çalışma bulunmaktadır [45, 46].

Jel tutuklama yöntemi, bir enzimin çapraz bağlı suda çözünmeyen bir polimer zarın boşluklarına hapsedilmesi yöntemidir. Sol-jel yöntemiyle tutuklanmış bir enzimin dayanıklılığı, enzim miktarı, pH, iyonik güç ve diğer immobilizasyon koşullarına bağlıdır [47]. Matrikste hapsedilmiş enzimin miktarının artmasıyla enzim termal kararlılığının artmasını sağlar. Bilinen tutuklamanın dezavantajları tutuklanan biyokatalizörlerin tümü muhtemelen katalitik olarak inaktiftir [48]. Matriks içerisindeki bazı enzim molekülleri tutuklanma süreci sırasında aktivite kaybına uğrayabilir.



Şekil 1.11. Sol-jel matrikste enzim tutuklanması [40]

## BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Çeşitli bitkisel kaynaklı lipazların optimum sıcaklıkları incelendiğinde; Abigor ve arkadaşları Palm yağı (*Elaeis guineensis*)’ndan saflaştırılan lipazın optimum sıcaklığını 30°C olarak bulmuştur [49], Sanz ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada acı bakladan saflaştırılan lipazın optimum sıcaklığını 25°C olduğunu belirtmiştir [50].

Etçi, Sol jel tutuklama metoduyla manyetik nanopartiküllere *C. rugosa* lipaz enziminin immobilizasyonunu gerçekleştirerek optimum pH’sını 7, optimum sıcaklığını 50°C olarak gözlemlemiştir [22].

Yılmaz, kovalent bağlama metoduyla *C. rugosa* lipazının cam boncuklara yapmış olduğu lipaz immobilizasyonu sonucu lipazın optimum pH’sını 5, optimum sıcaklığını 45°C, ayrıca sol jel tutuklama metoduyla gerçekleştirdiği immobilizasyonda ise immobilize lipazın optimum pH’sını 6, optimum sıcaklığını 50°C olarak bulmuştur [51].

Turgut lipaz enzimini armut kabuğu, akasya yaprağı ve kaolin üzerine yapmış olduğu immobilizasyonu sonucu immobilize lipazın optimum pH’sının 9, optimum sıcaklığının 40°C olduğu sonucuna ulaşmıştır.

Şengül yapmış olduğu çalışmada *C. Rugosa* lipazının kovalent bağlama metoduyla Glutaraldehit ara kolu üzerinden manyetik nanopartiküllere immobilizasyonu sonucu optimum pH’sını 7, optimum sıcaklığını 40°C olarak belirlemiştir.

Aslan ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada Amberzyme üzerine kovalent bağlama yöntemi uygulayarak *Pseudomonas fluorescens* lipazının immobilizasyonu sonucu optimum pH’sını 9 bulmuştur [52].

Beisson ve arkadaşları ayçiçek tohum lipazının optimum pH'sı 8-9 olarak saptamıştır [53], Prabhu ve arkadaşları pirinç kepeği lipazının optimum pH'sını 7-7,5 olarak bildirmişlerdir [54]. Kestane tohumu lipazının pH stabilitesi incelendiğinde pH 9'da enzimin yüksek olduğu görülmektedir.





## BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

### 3.1. Materyal

#### 3.1.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı: Arçelik

Destile Su Cihazı: Nüve-NS-108

Etüv: Binder

pH Metre: Butech

UV-VIS Spektrofotometre: T80+PG Instruments

Terazi: Shimadzu AUx220

Hassas Terazi: Sartorius

Su Banyosu: Memmert

Otomatik Pipetler: Brand Pipetleri, Dragon Lab.

Manyetik Karıştırıcı: Chiltern Hotplate HS 31

Vorteks: Velp Scientifica

Rotary Evaporatör: Büchi Rotavapor R-200

Liyofilizatör: Operon (Freeze Dryer -86 °C)

#### 3.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Protein miktar tayininde; standart olarak sığır serum albumini (Merck 112018), Lowry metoduna göre protein miktar tayininde kullanılan Folin ayırıcının hazırlanmasında  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck 106398),  $\text{NaOH}$  (Merck 6462), dipotasyum tartarat (Merck 5160),  $\text{CuSO}_4$  (J.T. Baker 0105),  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck 6673), % 85  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Merck 4967293), derişik  $\text{HCl}$  (Merck 100314) ve brom (Merck 1945) kullanıldı.

Enzim immobilizasyonunda Kieselgel 60 (Fluka 69740), cam boncuk (Merck 104014, çapı 2 mm), cam boncuk (Sigma G-9143, çapı 212-300 $\mu$ ), alumina (Sigma A-8753), alumina (Fluka 50512), Amberlite IRA-900 (Sigma IRA-900), deniz kumu

(Merck 107711), glutaraldehit (Merck 820603), 3-aminopropiltrietoksi silan (Merck 821619),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Merck 106345),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck 6345),  $\text{NaCl}$  (Merck 106404),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Riedel de H  en), toluen (Merck 8323),  $\text{NaOH}$  (Merck 6462), aseton (Merck 100013) ve  $\text{HCl}$  (Merck 100314) kullanıldı.

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Lowry Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

##### 3.2.1.1. Ayıraçlar

A ayıracı: 0,1 N  $\text{NaOH}$  içinde     n     % 2  $\text{Na}_2\text{CO}_3$     eltisi

B ayıracı: % 0,5  $\text{CuSO}_4$  'ın % 1 dipotasyum tartarat'taki    eltisi

Folin ayıracı: 1500 mL'lik yuvarlak dipli balona 100 g sodyum tungstat ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 25 g sodyum molibdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 700 mL distile su, 50 mL % 85  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ve 100 mL deri ik  $\text{HCl}$  kondu. Geri soğutucu altında 10 saat kaynatıldı. Karışıma 150 g lityum sülfat, 50 mL distile su ve birkaç damla brom ilave edildi. Brom'un fazlasını ortamdan uzaklaştırmak için  eker ocakta 15 dakika kaynatıldı, soğutuldu ve hacmi distile su ile balon jojede 1000 mL'ye tamamlandı.

Folin  alı ma    eltisi: Folin ayıracı 1 / 3 oranında distile su ile seyreltildi.

C ayıracı (Alkali bakır    eltisi): 50 mL A ayıracına 1 mL B ayıracı ilave edildi [55].

##### 3.2.1.2. Deneyin Yapılışı

Bir deney tüpüne, protein miktarı tayin edilecek    eltiden 0,5 mL kondu, üzerine 2,5 mL C ayıracı ilave edilerek iyice karıştırıldı. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 0,25 mL seyreltik Folin ayıracı ilave edildi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Oluşan mavi-mor renkli    eltinin absorbansı spektrofotometrede, 500 nm'de ayıraç k r ne karşı okundu. Okunan bu absorbans değerinin sığır serum albumini ile çizilen standart grafiğe uygulanmasıyla, protein miktarı % mg olarak saptandı.

### 3.2.1.3. Bovin Serum Albumini Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi

Bovin serum albuminin distile sudaki % 100 mg'lık çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden uygun seyreltmeler ile % 2 mg, % 4 mg, % 6 mg, % 8 mg, % 10 mg, % 20 mg, % 30 mg, % 40 mg, % 50 mg, % 60 mg, % 70 mg, % 80 mg ve % 90 mg'lık konsantrasyonlardaki çalışma çözeltileri hazırlandı. Elde edilen standart çözeltilere Lowry deneyi uygulandı. Deney 10 kez tekrarlandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler metodu uygulanarak serum albumini regresyon denkleminde standart grafiği çizilerek protein miktarları hesaplandı.

### 3.2.2. Lipaz Aktivitesi Tayini

Lipaz enzimi esteraz ve hidrolaz olmak üzere iki farklı aktiviteye sahiptir. Çalışmamızda papatya bitkisinin lipaz aktivitesi, esteraz aktivitesi tayin yöntemine göre spektrofotometrik olarak yapıldı [56].

#### 3.2.2.1. Esteraz Aktivitesi Tayini

##### 3.2.2.1.1. Ayıraçlar

0,050 M Sodyum asetat tampon çözeltisi (pH=5,0): 0,6804 g  $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  destile suda çözülerek balon jode 100 mL'ye tamamlandı. 0,050 M asetik asid çözeltisi ile pH'sı 5,0'e ayarlandı. Dimetilsulfoksit (DMSO) Substrat çözeltisi: 18 mg p-nitrofenil asetat (p-NFA) 1 mL DMSO'te çözüldü ve 99 mL 0,050 M  $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  tamponu ilave edildi. Substrat çözeltisi günlük olarak hazırlandı ve 1 saat içerisinde kullanıldı. 0,500 M Tris-HCl tamponu (pH=7,4) çözeltisi: 6,55 g Tris destile suda çözülerek balon jode 100 mL'ye tamamlandı. 0,500 M HCl çözeltisi ile pH'sı 7,4'e ayarlandı.

##### 3.2.2.1.2. Deneyin Yapılışı

Esteraz aktivitesi, Erlanson'a göre substrat olarak p-NFA kullanılarak spektrofotometrik yöntemle tayin edildi [56]. Bir deney tüpüne substrat ve enzim

çözeltilerinden 0,5'er mL konarak, 0,5 mL 0,5 M Tris-HCl tamponu ilave (pH=7,4) edildi. Karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Çözeltinin absorbansı spektrofotometrede, 400 nm'de, 60 mM sodyum fosfat tamponuna karşı (pH=7,0) karşı okundu. Bu absorpsiyon değerinin p-nitrofenol regresyon denkleminde uygulanmasıyla enzim tarafından, oda sıcaklığında, 1 dakikada açığa çıkarılan p-nitrofenol miktarı  $\mu\text{mol/dakika}$  olarak belirlendi. Bir ünite enzim aktivitesi; 1 dakikada açığa çıkan p-nitrofenol'ün miktarıdır ( $\mu\text{mol/dakika}$ ).

### **3.2.3. Papatya Lipazının İmmobilizasyonu**

Çalışmamızda lipazın immobilizasyonu için kovalent bağlama, adsorpsiyon ve iyonik bağlama yöntemleri kullanıldı.

#### **3.2.3.1. Kovalent Bağlama ile İmmobilizasyon**

##### **3.2.3.1.1. Papatya Lipazının Kieselgel 60, Deniz Kumu ve Gözenekli Cam Boncuklara İmmobilizasyonu**

Önce reaktif olmayan silikajel, deniz kumu ve gözenekli cam, aşağıda belirtildiği gibi ayrı ayrı aktive edildi. Bunun için 5 g Kieselgel 60 (60-120 mesh) 3-aminopropiltrietoksi silanın toluendeki çözeltisine (20 mL 3-aminopropiltrietoksi silan + 180 mL toluen) ilave edildi. 120 °C'de yağ banyosunda, 12 saat, geri soğutucu altında kaynatıldı. Cam filtreden süzüldü ve aseton ile birkaç kez yıkandı, vakum desikatöründe kurutuldu. Deniz kumu ve gözenekli cam boncuk da aynı şekilde aktive edildi.

1 g aktive edilmiş Kieselgel 60, 1 g deniz kumu ve 1 g gözenekli cam boncuk ayrı ayrı alınarak enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Bunun için aktive edilmiş üç taşıyıcı sırasıyla 0,5 N NaOH ve su ile yıkandı. 24 mL 0,05 M (pH = 7,0) fosfat tamponu ve 2 mL glutaraldehit (% 25 w/w) ilave edildi, oda sıcaklığında 2 saat mekanik olarak karıştırıldı. Taşıyıcılara bağlanmayan glutaraldehit atıklarını uzaklaştırmak için 10 mL tampon ile yıkandı ve cam süzgeçten filtre edildi.

Glutaraldehit ile kovalent bağlanmış üç farklı taşıyıcıya 5'er mL kestane tohumundan elde edilen lipaz çözeltisi ilave edilerek, oda sıcaklığında 2 saat mekanik karıştırıcıda karıştırıldı. Taşıyıcılara kovalent olarak bağlanmamış enzimleri uzaklaştırmak için 1 M NaCl içeren tampon ile bir kaç kez yıkandı. Cam filtreden süzöldü ve su trompunda 15 dakika kurutuldu, bir gece vakum desikatöründe bekletildi, derin dondurucuda saklandı. Yıkama sularında protein tayini yapıldı. Preparatların aktivite ölçümleri ve tutuklu enzim miktarları tayin edildi [57].

### **3.2.4. Adsorpsiyon Yöntemi ile İmmobilizasyon**

Çalışmada papatyadan saflaştırılan lipaz alümina ve cam boncuklara adsorpsiyon yöntemi ile belirtilen şekilde immobilize edildi.

#### **3.2.4.1. Papatya Lipazının Alümina'ya İmmobilizasyonu**

Alümina, alüminyum oksitten oluşan, çözünürlüğü organik ve inorganik açıdan ihmal edilecek kadar az olan bir taşıyıcıdır. Protein moleküllerini zayıf adsorbsiyonla bağlayabildiğinden immobilizasyonlarda inorganik taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Alümina ile immobilizasyon yapılmadan önce, nem çekici özelliği nedeniyle alümina 100 °C'de kurutuldu. Papatya lipazının taşıyıcı olarak seçilen alüminaya adsorbsiyon yöntemi ile immobilize olup olamayacağını araştırmak amacıyla 2,5 mL (mg protein/mL) papatya lipaz çözeltisi 2,5 g alümina ile +4 °C'de yarım saat bir cam bagetle karıştırıldı. Bu karışımın üzerine 7,5 mL soğuk aseton yavaş yavaş eklenerek karıştırmaya devam edildi. Karışım bir saat buzdolabında zaman zaman karıştırılmak suretiyle bekletildikten sonra vakumlu filtrasyon uygulandı. Soğuk asetonla (yaklaşık 15 mL) yıkandı. Yıkama sularındaki aseton rotarotaevaporatörde uçurulduktan sonra kalan artık, bidestile su ile 10 mL'ye tamamlandı. Enzim preparatı vakumlu desikatörde kurutulup derin dondurucuda saklandı. Yıkama sularında protein tayinleri yapıldı [56].

#### **3.2.4.2. Papatya Lipazının Cam Boncuklara İmmobilizasyonu**

Gözenekli olmayan cam boncuklar enzim immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan taşıyıcılardır. İmmobilizasyon öncesinde cam boncukların içerdiği olası safsızlıklar giderildi. Bu amaçla cam boncuklar 4 M HCl çözeltide 30 dakika karıştırıldı, asidin uzaklaştırılması için sonrasında bidestile su ile yıkandı ve 120 °C’de 2 saat kurutuldu. Kurutulan cam boncuklar ayrıca kloroform:metanol (1:1) çözücü sistemi ile yıkanarak 150°C’de kurutuldu. Bu aşamadan sonra cam boncuklar immobilizasyona hazır hale getirilmiş oldu. 1 g yıkanmış cam boncuklar 2 mL papatya lipaz çözeltisi ile oda sıcaklığında karıştırıldı ve süzüldü. Süzülen cam boncuklar önce asetonla sonra 0,1 M fosfat tamponu ile yıkandı. Enzim preparatı vakumlu desikatörde kurutulup derin dondurucuda saklandı. Yıkama sularında protein miktarı tayin edildi [56].

#### **3.2.5. İyonik Bağlama Yöntemi ile İmmobilizasyon**

Papatya lipazı, anyon değiştirici reçine Amberlite IRA-900’e iyonik bağlama yöntemi ile immobilize edildi. Amberlite IRA-900 makroporöz yapıda, 25000-30000 Å çapında gözenek aralığına sahip 16-50 mesh partikül büyüklüğünde olan bir anyon değiştirici reçinedir. Sıvı hidrokarbonlar, aseton, alkoller, eterler ve diğer birçok organik çözücülerdeki çözünürlüğü ihmal edilecek kadar azdır. Destek meteryali olarak sık kullanılan bir reçinedir [56].

Papatya lipazı anyon değiştirici reçine Amberlite IRA-900’e iyonik bağlama yöntemi ile immobilize edildi. 2 mL papatya lipazı üzerine 1 g Amberlite IRA-900 ilave edilip karıştırıldıktan sonra derin dondurucuda donduruldu. Kurutulmuş olarak elde edilen immobilize enzimler aseton ile iyice yıkanarak tutuklanmayan veya zayıf tutuklanan enzimler uzaklaştırıldı. Vakumlu desikatörde kurutulduktan sonra derin dondurucuda saklandı. Yıkama sularında protein tayinleri yapıldı.

### **3.2.6. Lipazın Çeşitli Taşıyıcılardaki % Tutuklanmaları**

İmmobilizasyon yöntemlerinde anlatıldığı şekilde çeşitli taşıyıcılara immobilize edilen lipaz çözeltisinin immobilizasyonları sonucu biriktirilen yıkama sularındaki protein içerikleri, immobilizasyondan hemen sonra Lowry yöntemine göre tayin edildi [55]. Yıkama suları tamamen rotaevaporatörde destile edildi. Kalan kısım bidestile su ile 10 mL'ye tamamlandı. Yıkama sularındaki protein miktarları protein standart eğri denkleminde yararlanılarak hesaplandı. Başlangıçta ortama katılan protein miktarından yıkama sularında tespit edilen protein miktarı arasındaki fark tutuklanmış enzim miktarını vermektedir.

### **3.2.7. İmmobilize Papatya Lipazının Esteraz Aktivitesine Göre Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi**

### **3.2.8. İmmobilize Papatya Lipazının Esteraz Aktivitesi ve Protein Miktar Tayini**

İmmobilize lipaz enziminin aktivite tayini için 10 mg immobilize enzim (enzim + taşıyıcı) 2,5 mL destile su ile bir deney tüpünde 1 dakika çalkalandı, süzgeç kağıdından süzüldü. Elde edilen çözeltide (İmmobilize enzim çözeltisi) esteraz aktivitesi tayini spektrofotometrik yöntemle yapıldı. İmmobilize lipaz enzimlerinde protein tayinleri Lowry yöntemine göre yapıldı [55].

### **3.2.9. İmmobilize Lipazın Esteraz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisinin İncelenmesi**

Papatyadan elde edilen lipazın optimum pH'sını belirlemek amacıyla enzimin pH = 4-12 aralığında gösterdiği esteraz aktivitesi ölçüldü. pH=4-5 aralığında asetat tamponu, pH=6-8 aralığında fosfat tamponu, pH=9-10 aralığında glisin-NaOH tamponu, pH=11-12 aralığında ise  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$  tamponu kullanıldı. Aktivite tayini, son hacim 0,3 mL olacak şekilde p-NFA'nın 0,1 mL sulu çözeltisine, 0,1 mL enzim çözeltisi ve 0,1 mL 0,5 M Tris-HCl tamponu (pH=7,4) ilavesiyle oluşturuldu. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve 5 dakika sonunda serbest kalan p-

nitrofenol, 400 nm’de 60 mM sodyum fosfat tamponuna (pH=7,0) karşı spektrofotometrede okundu.

Tüm denemeler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Denemeler 10 kez yapılarak ortalamaları alındı. Değişik pH değerlerinde elde edilen esterase aktivitesi ordinata, pH değerleri apsise konarak optimum pH eğrisi çizildi.

#### **3.2.10. Esteraz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi**

3.2.3’te anlatıldığı şekilde hazırlanan immobilize enzim çözeltisinden 4’er mL alınarak 10-70 °C arasında, sıcaklık her defasında 10 °C artırılarak, su banyosunda 30 dakika süre ile tutuldu. Oda sıcaklığına getirilen çözeltilerde esterase aktivitesi tayini Erlanson yöntemine göre yapıldı. Denemeler 10 kez tekrarlanarak ortalamaları alındı. Sıcaklık değerleri apsise, elde edilen enzim aktivite değerleri ordinatta olmak üzere optimum sıcaklık eğrisi çizildi. Oda sıcaklığında yapılan denemenin aktivitesi 100 kabul edilerek (kontrol) her bir sıcaklık için % aktivite değerleri hesaplandı.

#### **3.2.11. Immobilize Lipazın Esteraz Aktivitesine Zamanın Etkisi**

Sıcaklık ve pH sabit tutularak (oda sıcaklığı, pH 7,4) immobilize lipaz çözeltisinin p-NFA substratı ile 1, 5, 10, 15 ve 20. dakikalardaki esterase aktivitesi tayin edildi.



## BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Lipazın Çeşitli Taşıyıcılardaki % Tutuklanmaları

Çeşitli taşıyıcılara farklı immobilizasyon yöntemleri ile immobilize edilen lipazın bu taşıyıcılardaki % tutunmaları Tablo 4.1’te gösterildi. Lipaz enziminin 98,12 oranında kovalent bağlama yöntemine göre, silikajele immobilize edildiği görüldü. Adsorpsiyon metoduna göre yapılan immobilizasyon yönteminde, lipaz enziminin en düşük oranda aluminaya adsorplandığı bulundu.

**Tablo 4.1.** Çeşitli Taşıyıcılara Immobilize Edilmiş Lipaz Enziminin % Tutuklanmaları

| Taşıyıcı          | İmmobilizasyon Şekli | % Tutuklanma |
|-------------------|----------------------|--------------|
| Alumina           | Adsorpsiyon          | 16,71        |
| Deniz kumu        | Kovalent             | 98,44        |
| Cam Boncuk        | Kovalent             | 23,80        |
| Silika jel        | Kovalent             | 32,81        |
| Cam boncuk        | Adsorpsiyon          | 13,70        |
| Amberlite IRA-900 | İyonik               | 11,50        |

### 4.2. İmmobilize Lipazın Kinetik Özellikleri

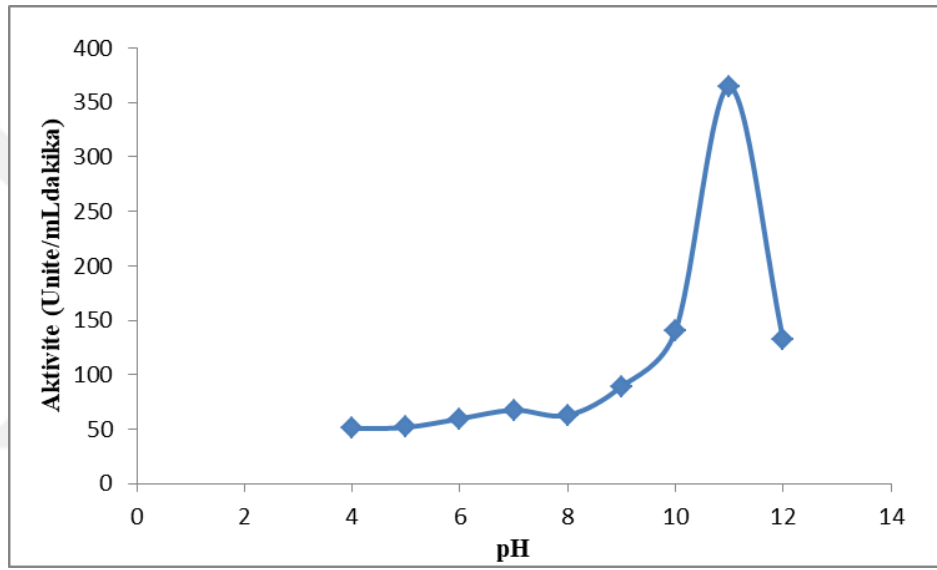
#### 4.2.1. İmmobilize Lipaz Esteraz Aktivitesine pH’nın Etkisi

Çeşitli taşıyıcılar üzerine immobilize edilen lipazın optimum pH değerleri Tablo 4.2; grafleri ise Şekil 4.1-4.21’de verildi. Buna göre immobilize lipazların optimum pH değerlerinin yaklaşık 10 civarında olduğu görüldü. Bu çalışmada papatya lipazının da optimum pH değerinin değeri 9 olarak bulunmuştu (Şekil 4.7). İmmobilizasyon işleminin optimum pH değerini daha bazik alana kaydırıldığı saptandı.

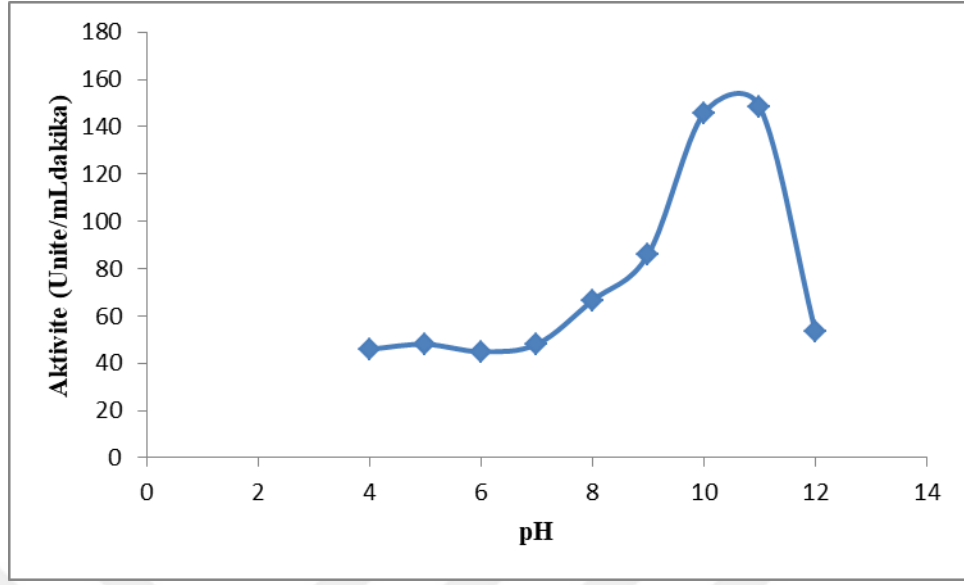
**Tablo 4.2.** İmmobilize ve Serbest Enzimin Optimum pH ve Sıcaklık Değerleri

|                | İmmobilizasyon Türü | Optimum pH | Optimum Sıcaklık (°C) |
|----------------|---------------------|------------|-----------------------|
| Papatya lipazı | -----               | 9          | 50                    |

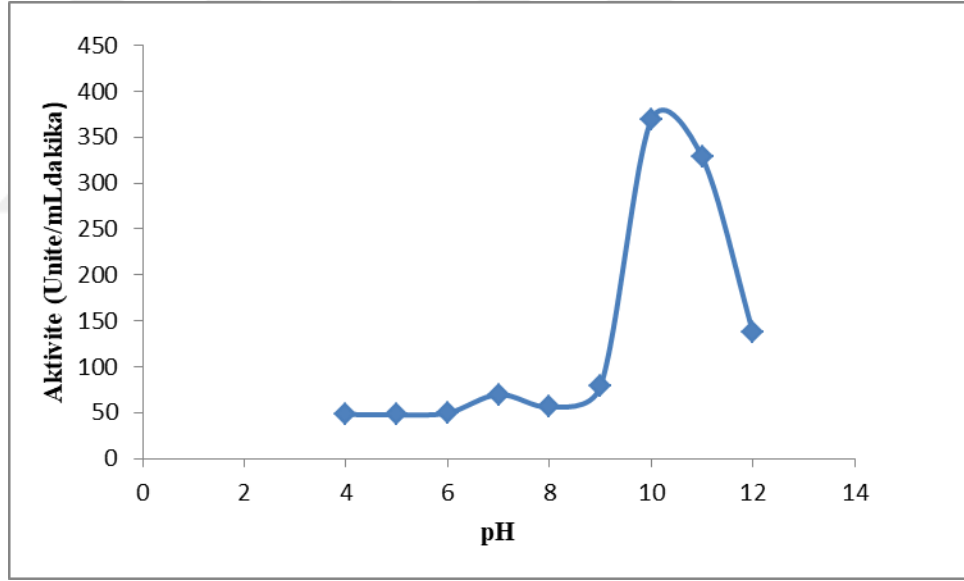
|                   |             |    |    |
|-------------------|-------------|----|----|
| Cam boncuk-enzim  | Kovalent    | 10 | 40 |
| Cam boncuk-enzim  | Adsorpsiyon | 10 | 40 |
| Silikajel         | Kovalent    | 10 | 40 |
| Deniz kumu        | Kovalent    | 10 | 40 |
| Alumina           | Adsorpsiyon | 10 | 40 |
| Amberlite IRA-900 | İyonik      | 10 | 40 |



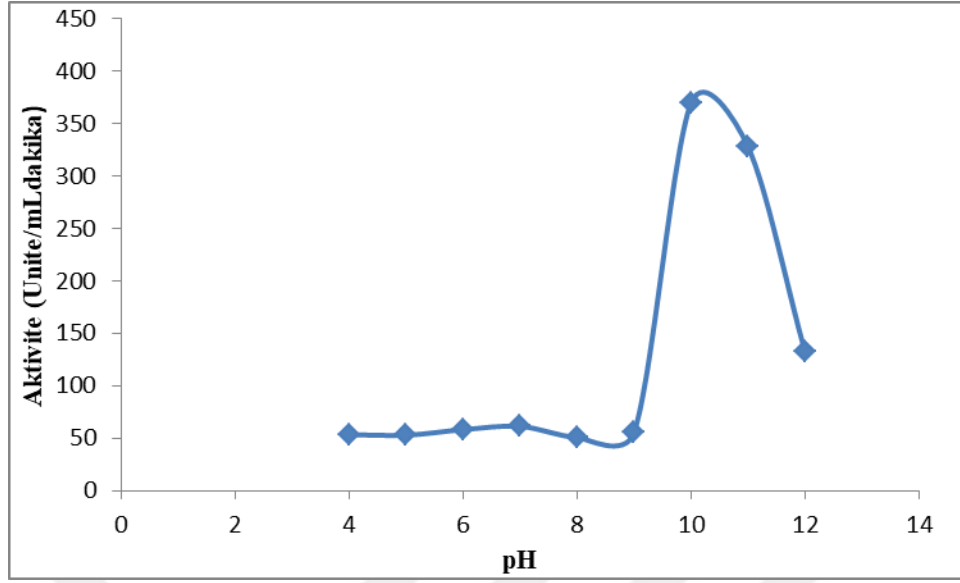
Şekil 4.1. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Silikajel'e İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği



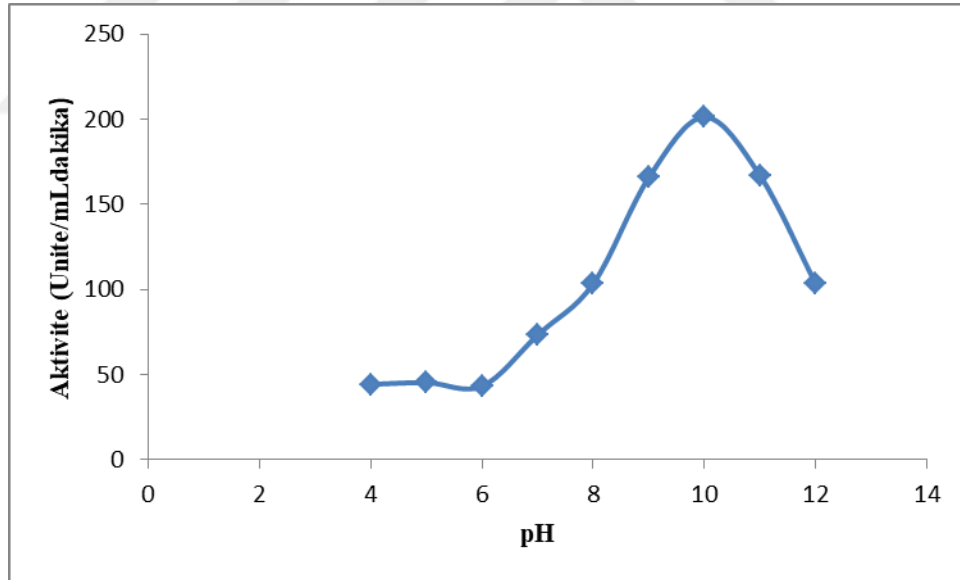
Şekil 4.2. Adsorpsiyon Yöntemi İle Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği



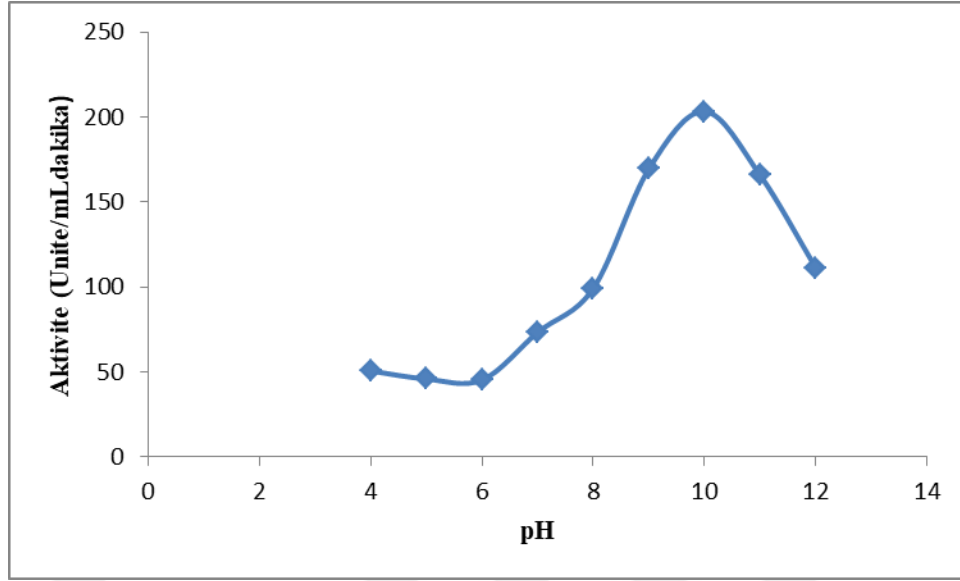
Şekil 4.3. Kovalent Olarak Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği



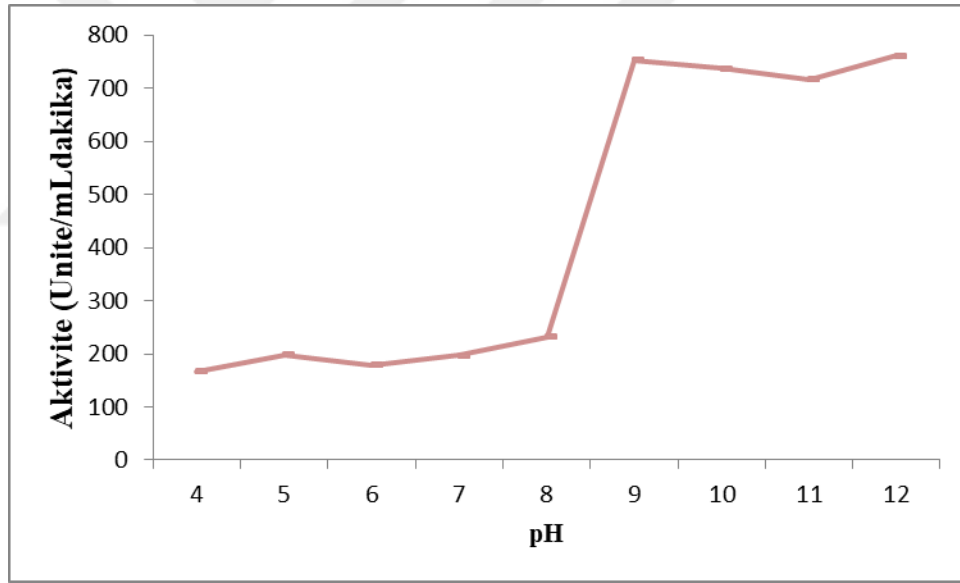
Şekil 4.4. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Deniz Kumuna İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği



Şekil 4.5. İyonik Bağlama Yöntemi ile Amberlite'e İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği



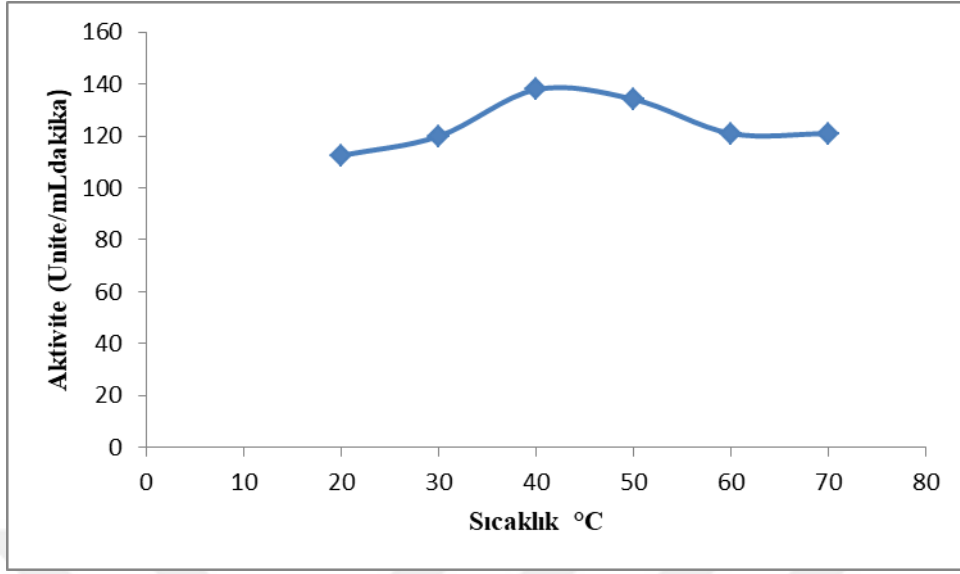
Şekil 4.6. Adsorpsiyon Yöntemi ile Aluminaya İmmobilize Edilen Lipazın Optimum pH Grafiği



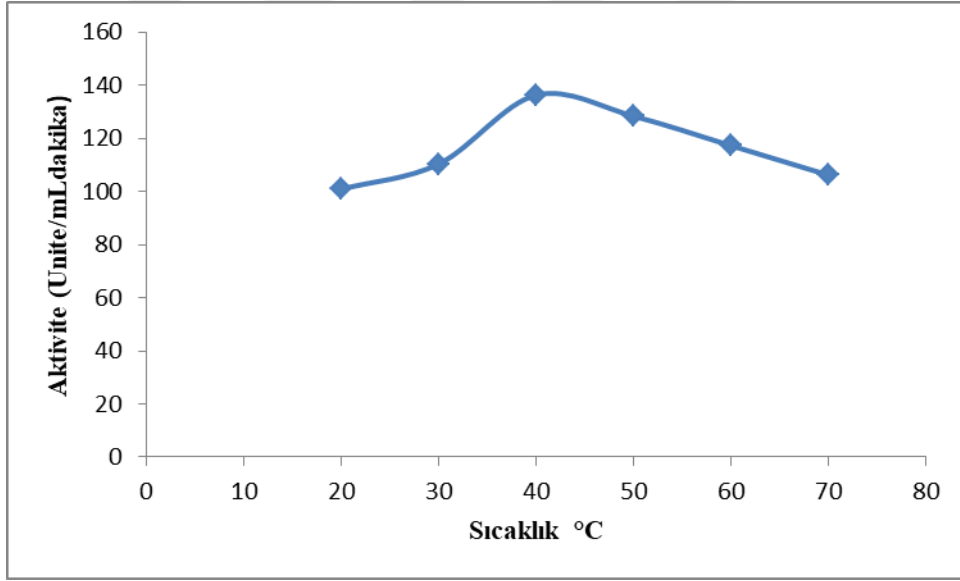
Şekil 4.7. Papatya Lipazının Optimum pH Grafiği

#### 4.2.2. İmmobilize Lipaz Esteraz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

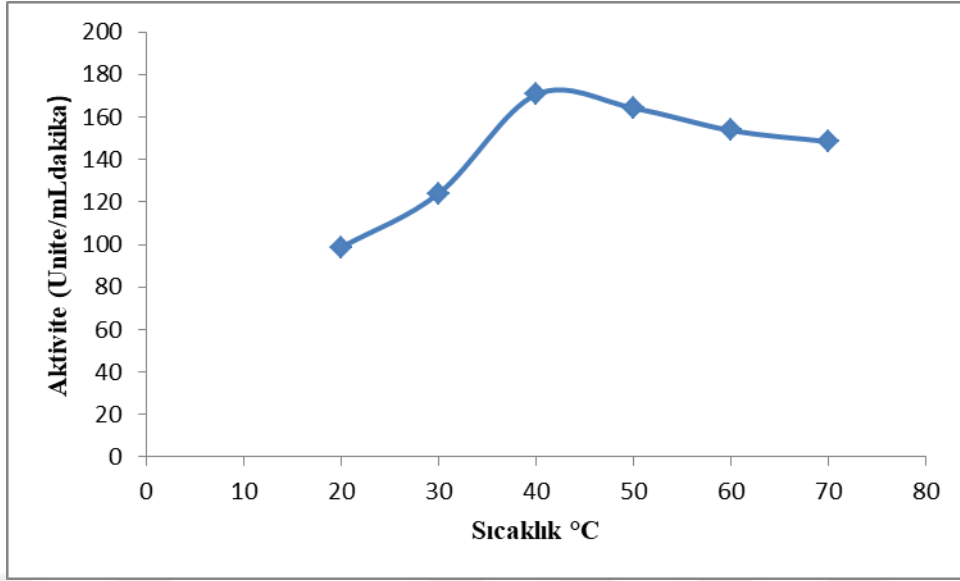
İmmobilize lipazların optimum sıcaklığının 40 °C olduğu bulundu (Şekil 4.8-4.14). Saflaştırılan lipaz enziminin ise optimum sıcaklık değerinin 50 °C olduğu bulunmuştu.



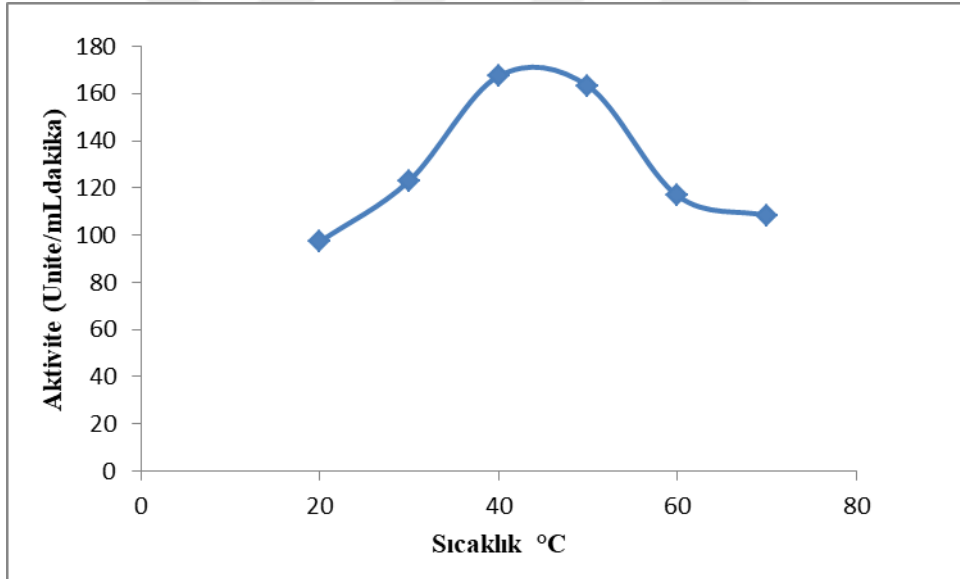
Şekil 4.8. Alüminaya İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği



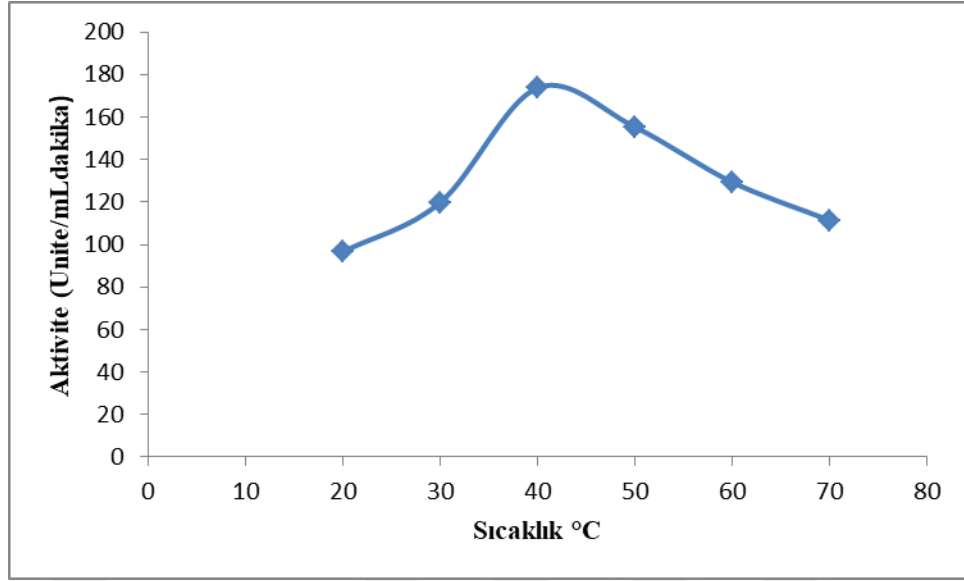
Şekil 4.9. İyonik Bağlama Yöntemiyle Amberlite'e İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği



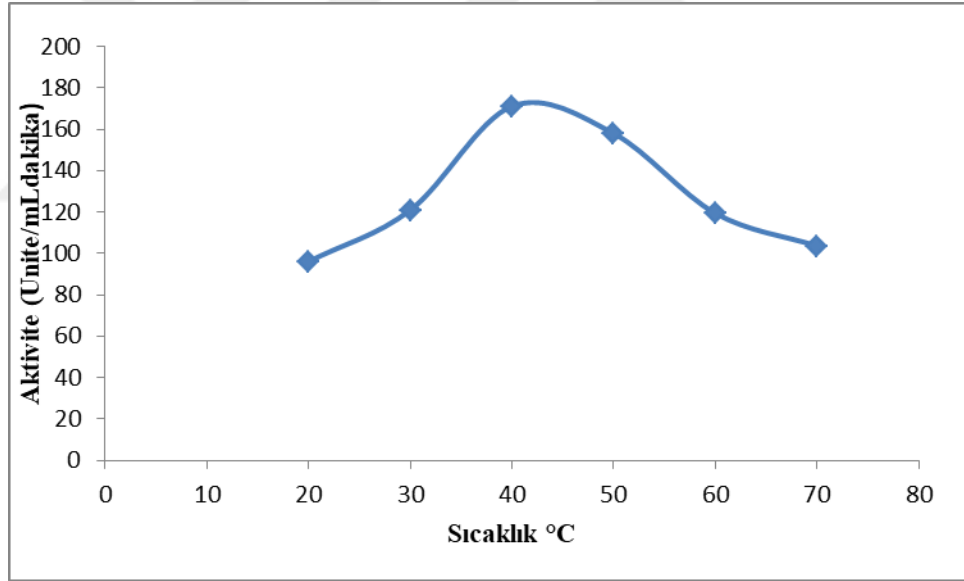
Şekil 4.10. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Deniz Kumuna İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği



Şekil 4.11. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Silikajel 60'a İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği

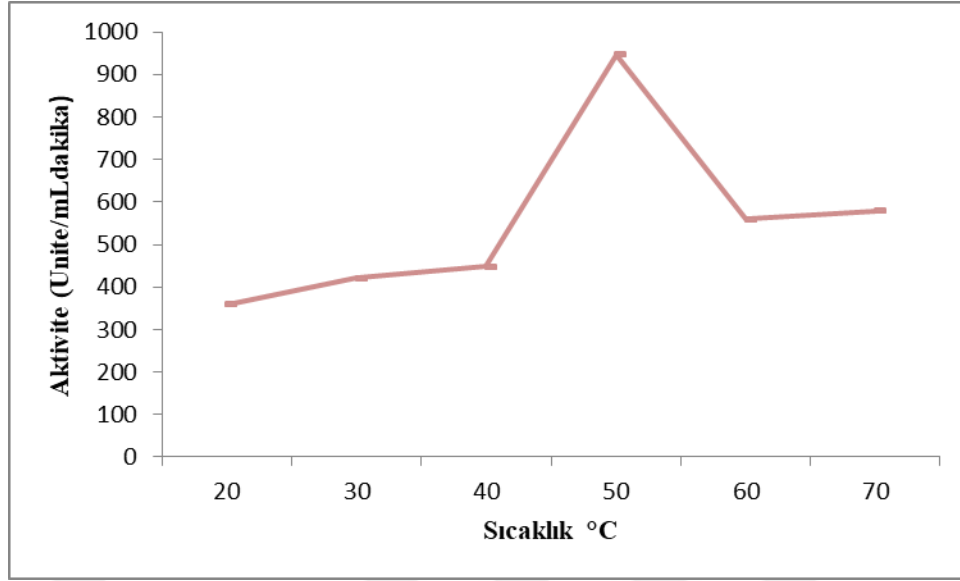


Şekil 4.12. Adsorpsiyon Yöntemi ile Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği



Şekil 4.13. Kovalent Olarak Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipazın Optimum Sıcaklık Grafiği

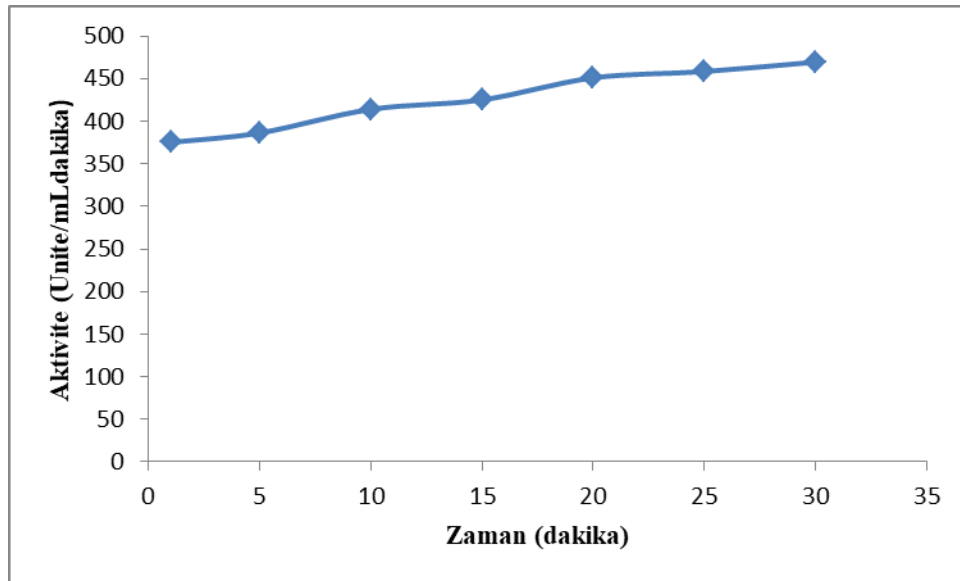




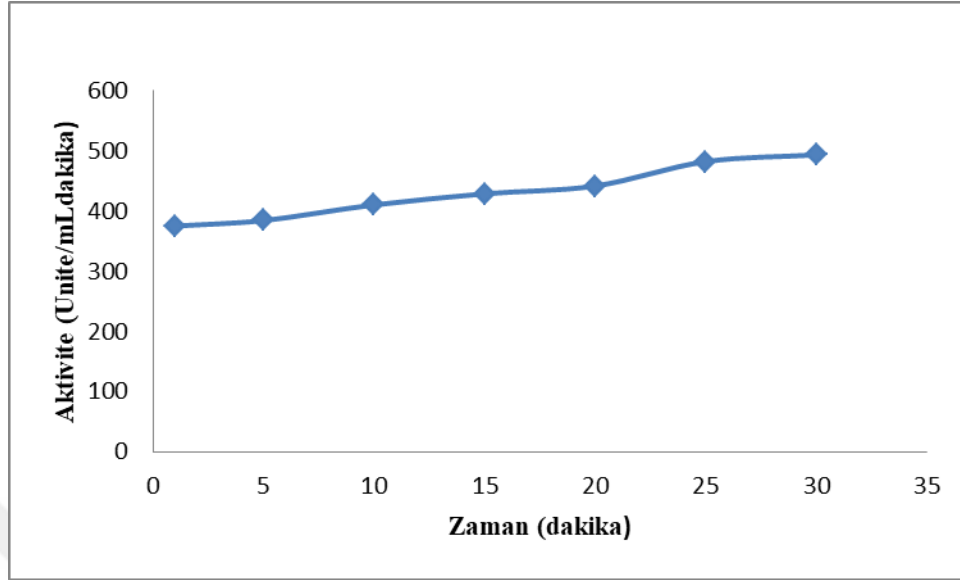
Şekil 4.14. Papatya Lipazının Optimum Sıcaklık Grafiği

#### 4.2.3. İmmobilize Lipazın Esteraz Aktivitesine Zamanın Etkisi

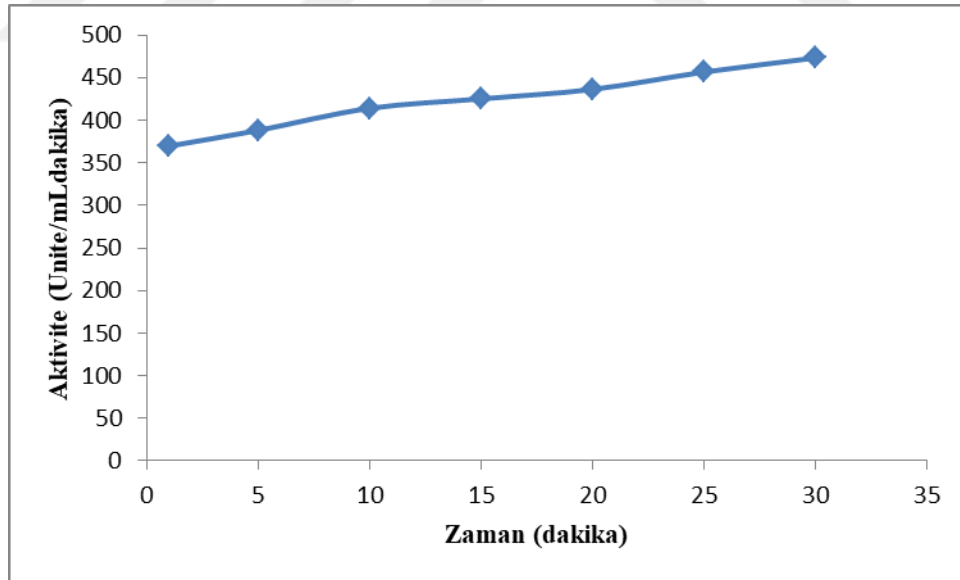
Lipazın esteraz aktivitesi üzerine zamanın etkisi incelendiğinde, esteraz aktivitesinde zamana bağlı olarak az bir artış olduğu bulunurken; doğal enzimde bu değerin 5. dakikadan sonra daha fazla oranda olduğu saptandı. İmmobilizasyon işleminin enzim aktivitesini daha kararlı hale getirdiği görüldü (Şekil 4.15-4.21).



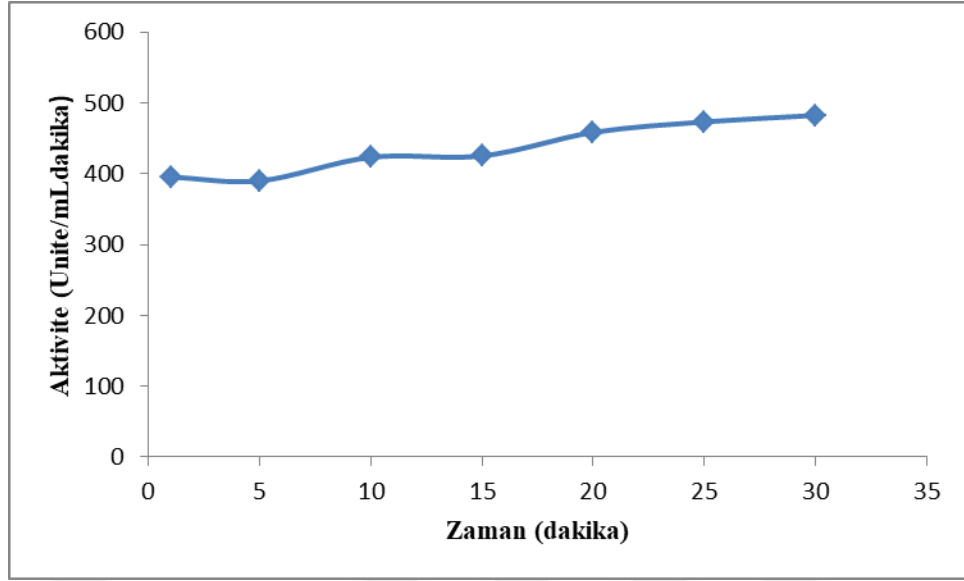
Şekil 4.15. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Deniz Kumuna İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine Zamanın Etkisi



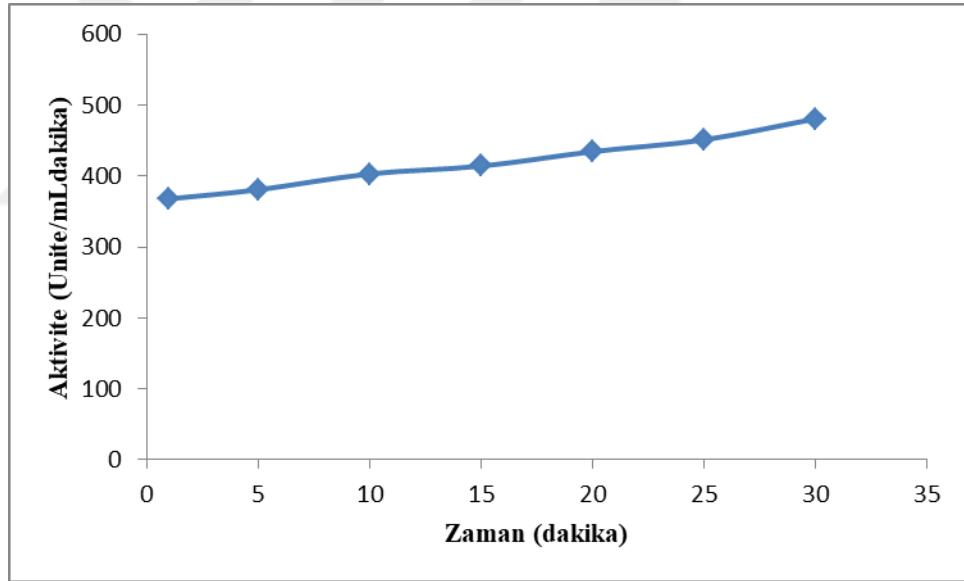
Şekil 4.16. Kovalent Bağlama Yöntemi ile Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipaz Aktivitesine Zamanın Etkisi



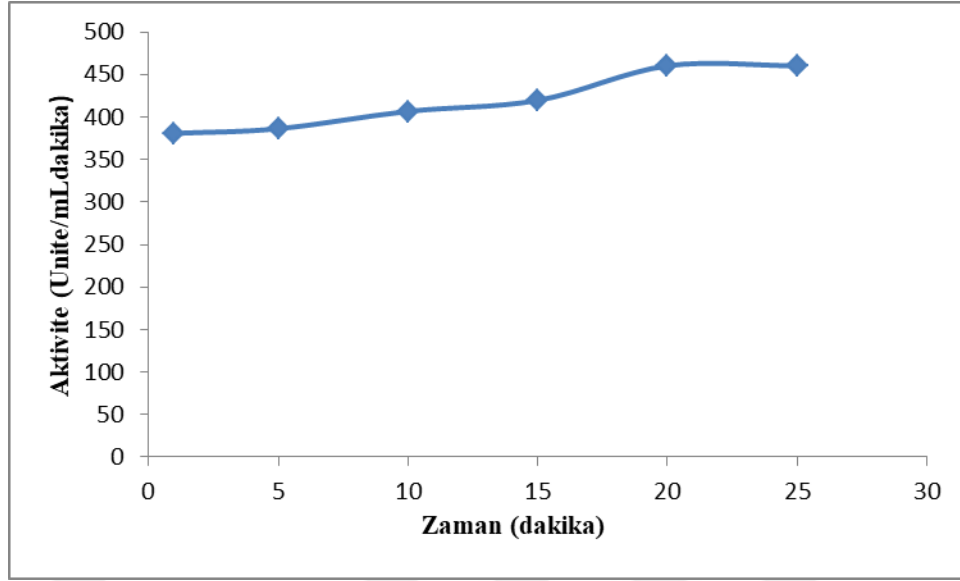
Şekil 4.17. Kovalent Bağlama ile Silikajele İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine Zamanın Etkisi



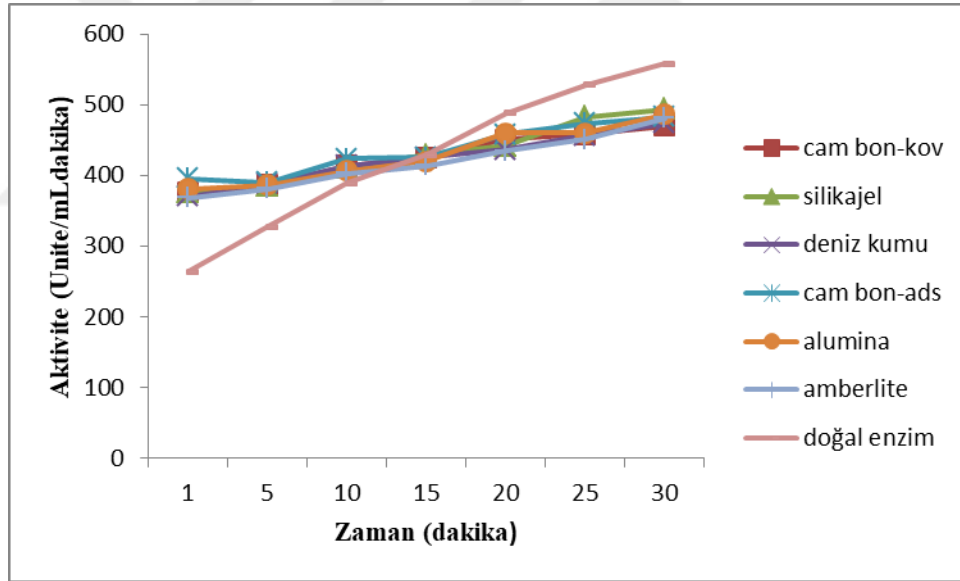
Şekil 4.18. Adsorpsiyon Yöntemi ile Cam Boncuğa İmmobilize Edilen Lipazın Aktivitesine Zamanın Etkisi



Şekil 4.19. İyonik Bağlama Yöntemi ile Amberlite'e İmmobilize Edilen Lipaz Aktivitesine Zamanın Etkisi



Şekil 4.20. Adsorpsiyon Yöntemi ile Aluminaya İmmobilize Edilen Lipaz Aktivitesine Zamanın Etkisi



Şekil 4.21. İmmobilize ve Doğal Lipaz Aktivitesine Zamanın Etkisi

## BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Lipazlar, süt ve yağ endüstrisi, deterjan ve gıda endüstrisi, saf kimyasalların ve ilaçların sentezi, kağıt ve kozmetik endüstrisi, eczacılık ve tekstil gibi çeşitli endüstriyel alanlarda kullanım alanlarına sahip olup; fungus, alg, bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan saflaştırılmış ve bazı kinetik özellikleri incelenmiştir. Lipazın papatya bitkisinden saflaştırılması ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, papatya lipazı ilk kez saflaştırılmış, bazı kinetik özellikleri ve çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu incelenmiştir.

Papatya lipazının pH stabilitesi incelendiğinde pH 9-10 civarında enzimin dayanıklılığının en yüksek olduğu görülmektedir. Saflaştırılan enzimin optimum pH değerinin ve dayanıklılığının pH=9-10 olması nedeni ile, bu enzimin karakterli yapıda bir enzim olduğu söylenebilir.

Papatya lipazının sıcaklık stabilitesi incelendiğinde enzimin 20-70°C arasında farklı inkübasyon sürelerinde dahi kararlı olduğu (fazla bir aktivite kaybının olmadığı) görülmüştür.

Çalışmamızda ilk kez saflaştırılmış papatya lipazı çeşitli taşıyıcılar üzerine farklı yöntemlerle immobilize edilerek bazı kinetik özellikleri incelenmiştir.

İmmobilizasyon tekniği ile enzimlerin kararlılığı arttırılmakta ve bu özellikleri nedeniyle enzimler çeşitli endüstri alanlarında uzun süre kullanılabilir. Bu çalışmada iyonik, kovalent ve adsorpsiyon yöntemi ile papatya lipazı farklı taşıyıcılar üzerine immobilize edilmiş ve özellikleri incelenmiştir. Papatya lipazı, en yüksek oranda (% 98,44 oranında) kovalent bağlama yöntemi ile deniz kumuna tutuklanmış; bunu kovalent bağlı olarak tutuklanan silikajel izlemiştir (% 32,81). Tutuklanma en düşük oranda iyonik bağlama yöntemi ile Amberlite IRA-900 üzerine (11, 56) yapılmıştır. Enzimin aktif merkezi etkilenerek üç boyutlu yapısında değişiklik

meydana geldiği için substrata olan ilgi azalmıştır. Bu nedenle aktivitenin azaldığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda % tutuklanma oranı yüksek olan 6 taşıyıcı seçilmiş ve immobilize lipazın kinetik özellikleri bunlar üzerinde incelenmiştir. İmmobilize papatya lipazları için yapılan pH çalışmalarında immobilize lipazların optimum pH'ları, 10; serbest enziminki ise 9 civarında belirlenmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin optimum pH'larının 9-10 civarında olması, enzimin bazik karakterli bir enzim olduğunu göstermektedir.

İmmobilize enzime ait sıcaklık-aktivite değerleri verilmiştir. İmmobilizasyon sonucu lipazın optimum sıcaklığı pratik olarak değişmiştir. İmmobilize enzime ait sıcaklık-aktivite eğrisinin serbest enzime göre 60°C genişlemiş olması, immobilize lipazın nispeten yüksek aktiviteye sahip olduğunu ve termal kararlılığının arttığının bir kanıtıdır. Lipazın alginata immobilize edilmesiyle de immobilize lipazlarda aynı sonuçlar bulunmuştur [58] Serbest ve bağlı enzimlerin esteraz aktivitesinin zamanla etkisi incelendiğinde; doğal enzimde 5. dakikadan sonra görülen aktivite artışı, immobilize lipazlarda görülmemiştir. Başka bir çalışmada da immobilizasyon işleminin, lipazı daha kararlı hale getirdiği görülmektedir [58, 59]. İmmobilize lipazlar üzerine çeşitli maddelerin etkileri incelendiğinde; serbest enzimlerde olduğu gibi, yapılarında azot bulunan bileşikler immobilize enzimlerin aktivitelerinde artışa neden olmuştur.

Elde edilen sonuçlardan, ülkemizde yetişen papatya bitkisinden lipaz enziminin saflaştırılıp farklı immobilizasyon işlemleriyle çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılabileceği kanısına varıldı.

## KAYNAKLAR

- [1] Telefoncu, A., 1997, “Enzimoloji”, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, İzmir, 1-305.
- [2] Dinçkaya, E., 1996, “Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu”, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, İzmir.
- [3] Wiseman, A., 1986, “Handbook of Enzyme Biotechnology”, 2nd Edition, Jon Wiley & Sons, Chicester, England.
- [4] Kutay, F., 2002, “Enzimler”, İnsan Biyokimyası, Taner Onat, Kaya Emerk, Eser Y.Sözmen, Palme Yayıncılık, Ankara, 197–202.
- [5] Akkuş, P., 2006, “Lipaz Kullanılarak Şeker Esteri Sentezi”, G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Gebze.
- [6] Fennema, O.R., 1985, “Food Chemistry”, Second Edition, Mdi Dekker, Wisconsin, Madison, USA, 371-475.
- [7] Schmidt, R.D., and Verger, R., 1998 “Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications”, Agnew Chem. Int. Ed. Engl., 37: 1608-1633.
- [8] Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille, J., Haas, M.J., 2000, “Customizing Lipases for Biocatalysis: a Survey of Chemical, Physical and Molecular Biological Approaches”, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 9(4-6):113-148.
- [9] Manfred, T.R., 2002 “Lipases as Practical Biocatalysts”, Current Opinion in Chemical Biology, 6: 145-150.
- [10] Yağız, F., 2006, “Hidrotalsit Ve Zeolit Üzerine Tutuklanmış Lipaz ile Yemelik Atık Yağlardan Biyodizel Üretimi” K.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli.
- [11] Paiva, A.L., Balcao, V.M., Malcata, F.X., 2000, “Kinetics and Mechanisms of Reactions Catalyzed by Immobilized Lipases”, Enzyme and Microbial Technology, 27:187-204.
- [12] Macrae, A.R., and Hammond, R.C., 1985, “Present and Future Applications of Lipases”, Biotech. Genet. Eng.Rev., .3: 193-217.
- [13] Kamini, N.R., Fujii, T., Kurosu, T., and Iefuji, H., 2000, “Production, Purification and Characterization of an Extra Cellular Lipase from The Yeast *Cryptococcus sp.S-2*”, Process Biochemistry, 36: 317-324.

- [14] 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  $\beta$  hydrolase fold", *Protein Engineering*, 5: 197-211.
- [15] Fadiloglu, S., 1996, "Kinetics of Olive Oil Hidrolysis by Free and Immobilized *Candida Rugosa* Lipase" Ph. D. Thesis, Universtiy of Gaziantep, 24–56.
- [16] Akoh, C.C., Min, D.B., 1998, "Microbial Lipases and Enzymatic Interesterification", *Food Lipids-Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, Marel Deccer, Inc., 641-698.
- [17] Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V.T., 1999, "The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29:119-131.
- [18] Jaeger, K.E., Reetz, M.T., 1998, "Microbial Lipases from Versatile Tools for Biotechnology", *Trends in Biotechnology*, 16(9): 396-403.
- [19] Undurraga, D., Markovits, A., Erazo, S., 2001, "Cocoa Butter Equivalent through Enzymic Interesterification Palm Oil Midfraction", *Process Biochemistry*, 36: 933-939.
- [20] Kierkels, J.G.T., Vleugels, L.F.W., Kern, J.H.A., Meijer, E.M., Kloosterman, M., 1990, "Lipase Kinetics: On-line Measurement of the Interfacial Area of Emulsions", *Enzyme and Microbial Technology*, 12: 760-763.
- [21] Rubin, B., Dennis, E.A., 1997, "Lipases: Part B: Enzyme Characterization and Utilization, *Methods in Enzymology*", 286, New York: Academic Pres, 1-563.
- [22] Snellman, E. A., Colwell, R. R., 2004, "Acinetobacter Lipases: Molecular Biology, Biochemical Properties and Biotechnological Potential", *J. of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31: 391-400.
- [23] Koç, L., 1994, "Katı Yağların Serbest ve İmmobilize Lipazla Hidrolizi" Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [24] Gloger, M., Tischer, W., 1981, "Determination of Catalytic Activity of Immobilized Enzymes" In *Methods of Enzymes Analysis*, 2nd ed. , Mc Graw Hill, New York, 142-154.
- [25] Karaca, N., 2006, "Poli(N,N-Dimetilakrilamit-Ko-Akrilamit) ve Poli(N-İzopropilakrilamit-Ko-Akrilamit)/K-Karragenan Polimerleri Kullanılarak Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu" G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.



- [26] Krajewska, B. 2004, Application of Chitin- and Chitosan-based Materials for Enzyme Immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 126–139.
- [27] Immobilized Enzymes, 2004. <http://www.lib.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/IMMOB/Immobilized.htm>.
- [28] Telefoncu A., 1997, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- [29] Telefoncu A., 1986, “Temel ve Uygulamalı Enzimoloji”, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- [30] Kennedy, J.F., 1995, Handbook of Enzyme Biotechnology, Third Edition, Editör Allen Wisemann, EllisHorwood, 235-310.
- [31] Karaca, N., 2006, Poli(N,N-Dimetilakrilamit-Ko-Akrilamit) ve Poli(N-İzopropilakrilamit-Ko-Akrilamit)/K-Karragenan Polimerleri Kullanılarak Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006, 1-73.
- [32] Goldstein, L., and Manecke, G., 1976, *Applied Biochemistry And Bioengineering*, Academic Press, New York, 123-125.
- [33] Mosback, K., 1976, Immobilized Enzymes, Methods In Enzymology, Academic Press, New York, 44.
- [34] Guisan, J. M., 2006, Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells, Second Edition, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 92-100.
- [35] Gao, X., 2004, Immobilization of Lipases via Sol-Gel Procedures and Application of the Immobilized Lipases in Oleochemical Reactions, Ph.D., University of Nebraska, Lincoln, NE, 40-49.
- [36] Knezevic, Z., Milosavic, N., Bezbradica, D., Jakovljevic, Z., Prodanovi, R. 2006, Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Eupergit C supports by Covalent Attachment. *Biochemical Engineering Journal*, 30: 269–278.
- [37] Gemeiner, P. 1992, Materials for enzyme engineering. In: Gemeiner P (Ed) *Enzyme Engineering*. Ellis Horwood, pp 13-119, New York.
- [38] Mattiasson, B., Kaul, R. 1991, Determination of Coupling Yields and Handling of Labile Proteins in Immobilization Technology. In: *Protein immobilization*.

- Fundamentals and Applications (Taylor, R. F., ed.), Marcel Dekker, pp 161–179, New York, NY.
- [39] Scouten, W.H. 1987, A Survey of Enzyme Coupling Techniques. In: Methods in Enzymology, volume 135, (Mosbach, K., ed.), Academic Press, pp 30–65, London.
- [40] Yılmaz, E. 2010, Farklı Teknikler Kullanarak Değişik Destek Materyallerine Lipaz İmmobilizasyonu ve Bir Anti-inflammatör olan S-naproksenin Oluşumunda Kullanılması, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 1-261.
- [41] Öztürk, N., 2006, Hidrofobik Nanoyapılarda *Candida Rugosa* Lipaz İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 1-128.
- [42] Enzyme Immobilization, 2004.  
<http://alfa.ist.utl.pt/~fidel/enzymatic/appendix/immob.html>.
- [43] Braun S., Rappoport S., Zussman R., Avnir D. and Ottolenghi M., 1990, Sol-gel based enzyme immobilization, *Materials Letters*, 10, 42-49.
- [44] Dickey, F.H., 1955, Specific adsorption, *The Journal of Physical Chemistry*, 59; 695–707.
- [45] Venton, DL., Cheeseman, KL., Chatterton, RT., Anderson, TL., 1984, Entrapment of highly specific antiprogesterone antiserum using polysiloxane copolymers, *Biochimica et Biophysica Acta*, 797, 343–347.
- [46] Glad, M, Norrloew, O., Sellergren, B., Siegbahn, N., Mosbach, K., 1985, Use of silane monomers for molecular imprinting and enzyme entrapment in polysiloxanecoated porous silica, *Journal of Chromatography*, 347, 11–23.
- [47] Arica, O, Suzuki, T, Sano Y, Murakami, Y., 1996, Immobilization of a thermostable enzyme using a sol–gel preparation method, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82, 341–345.
- [48] Jin, W., Brennan, J.D. 2002, Properties and Applications of Proteins Encapsulated within Sol–gel Derived Materials. *Analytica Chimica Acta*, 461: 1–36.
- [49] Abigor, D. R., Opute, F. I., Opoku, A. R., Osagie, A. U., 1985, Partial Purification and Some Properties of the Lipase Present in Oil Palm (*Elaeis*

- Guineensis) Mesocarp, Journal of the Science of Food and Agriculture, 36: 599-606.
- [50] Sanz, L. C., Olais, J. M., 1990, Characterization of Lupin Seed Lipase, Food Chemistry, 37: 221-228.
- [51] Chibata, I., Tosa, T., Sato, T., Mori, T., Matuo, Y. 1972. Fermentation technology. pp.383-389.
- [52] Katchalski-Katzir, E., Silman, I., Goldman, R. 1971. Effect of The Microenvironment on The Mode of Action of Immobilized Enzymes. Advances In Enzymology and Related Areas of Molecular Biology 34: pp.445-536.
- [53] Beisson, F., Tiss A., Riviere, C., Verger, R. 2000, Methods for Lipases Etection and Assay: A Critical Review. European Journal of Lipid Science and Technology 102: 133-153.
- [54] Prabhu, V. A., Tambe, S. P., Gandhi, N. N., Sawant, S. B., Joshi, J. B., 1999, Rice Bran Lipase: Extraction, Activity and Stability, Biotechnology Progress, 15:1083-1089.
- [55] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein Measurement With Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275.
- [56] Erlanson, C., 1970, p-Nitrophenyl acetate as a substrate for a carboxyl-ester hydrolase in pancreatic juice and intestinal content, Scandinavian Journal of Gastroenterology, 5: 333-336.
- [57] Aydemir, T., 1989, İmmobilize stereospesifik lipaz ile yağ interesterifikasyonu, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü-Ege Üniversitesi, İzmir.
- [58] Kılınç, A., 1990, *Alginatta immobilize edilmiş lipazın bazı özelliklerinin incelenmesi*, Yüksek Lisans, Fen bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi.
- [59] Aydemir, T., Telefoncu, A., 1994, Lipase immobilization on different supports for interesterification of fats, *Indian Journal of Chemistry*, 33B, 387-390.

## ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Trabzon’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon Fatih İlköğretim Okulu’nda; lise öğrenimini Trabzon Fatih Lisesi’nde tamamladı.2009 yılında Giresun Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliğini kazanıp, 2013 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesinden mezun oldu. 2013 yılında girdiği Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Yüksek Lisans programına halen devam etmektedir.

