

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***CANDIDA RUGOSA* LİPAZ ENZİMİNİN SPOROPOLLENİN ÜZERİNE
ADSORBSİYONU VE KARAKTERİZASYONU**

HAVVA TUTAR

**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
KONYA, 2009**

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

***CANDIDA RUGOSA* LİPAZ ENZİMİNİN SPOROPOLLENİN ÜZERİNE
ADSORBSİYONU VE KARAKTERİZASYONU**

HAVVA TUTAR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez, 27.01.2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu
ile kabul edilmiştir.**

**Prof. Dr. Erol PEHLİVAN
(Danışman)**

**Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
(üye)**

**Prof. Dr. Handan GÜLCE
(üye)**

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CANDIDA RUGOSA LİPAZ ENZİMİNİN SPOROPOLLENİN ÜZERİNE ADSORBSİYONU VE KARAKTERİZASYONU

HAVVA TUTAR

Selçuk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Erol PEHLİVAN
2009, 83 Sayfa

Jüri: Prof. Dr. Erol PEHLİVAN
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Prof. Dr. Handan GÜLCE

Lipazlar, triaçilgliserollerin yağ asidi ve gliserollere hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Organik sentez, ilaç geliştirilmesi, deterjan üretimi, peynir ve süt endüstrisi gibi birçok biyoteknolojik uygulamalarda geniş kullanım alanına sahiptir. Ancak kararlılık, aktivite ve tekrar kullanılabilirlik gibi özelliklerinden dolayı kullanım alanları sınırlanır. Bu nedenle immobilizasyon tekniği kullanılarak enzimlerin katalitik davranışını artırmaya yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Kovalent bağlanma, çapraz bağlanma, adsorbsiyon ve hapsetme teknikleri uygulanmaktadır.

Bu çalışmada, *Candida rugosa* lipaz enzimi adsorbsiyon tekniği ile *Lycopodium clavatum* kökenli sporopollenine immobilize edilmiştir. Bunun yanında enzim adsorbsiyon kapasitesi, aktivitesi ve immobilize enzimin kararlılık özellikleri incelenmiştir. Adsorbana % 79,2 protein bağlandığı belirlenmiştir. Immobilize enzimin optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 6,0 ve 40°C bulunmuştur. Immobilizasyon süresi 180 dk, immobilizasyon sıcaklığı 30 °C ve enzim/adsorban oranı 0,3 (w/w), en yüksek spesifik aktivite 16,30 U/mg protein olarak kaydedilmiştir. Immobilize enzimin V_{mak} ve K_m gibi kinetik parametreleri hesaplanmıştır. Maksimum reaksiyon hızı (V_{mak}) ve Michaelis-Menten sabiti (K_m) serbest enzim için sırasıyla; 115,0 U/mg-protein ve 0,44 mM olarak, immobilize enzim için ise 29,0 U/mg-protein ve 1,52 mM olarak hesaplanmıştır.

Anahtar kelimeler: Sporopollenin, *Candida rugosa* lipaz, immobilizasyon adsorbsiyon.

ABSTRACT**M. Sc. Thesis****ADSORPTION OF *CANDIDA RUGOSA* LIPASE ENZYME ONTO
SPOROPOLLENIN AND ITS CHARACTERIZATION****Havva TUTAR****Selcuk University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Chemical Engineering****Supervisor: Prof. Dr. Erol PEHLIVAN
2009, Pages: 83****Jury: Prof. Dr. Erol PEHLIVAN (Supervisor)
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Prof. Dr. Handan GÜLCE**

Lipase (triacylglycerol ester hydrolase, EC 3.1.1.3) is an efficient enzyme which catalyses the hydrolysis of triacylglycerol to glycerol and fatty acids. The enzyme has been widely used for enzymatic conversion in the various biotechnological applications such as organic synthesis, drug delivery, cheese-milk production. However, its widespread utilization is often limited by activity, stability and ability of reuse. Therefore, there have been many studies to enhance these catalytic behaviors by enzyme immobilization. Covalent binding, cross-linking, adsorption and encapsulation techniques have been performed.

In this study, *Candida rugosa* lipase has been immobilized by adsorption technique onto sporopollenin from *Lycopodium clavatum*. Besides this, the enzyme adsorption capacity, activity and thermal stability of immobilized enzyme have also been investigated. It has been observed that about 79,2% of protein content was immobilized onto the support. The pH and temperature of immobilized enzyme were optimized, which were 6,0 and 40°C, respectively. The other optimum immobilization conditions were as follows: immobilization time 180 min, immobilization temperature 30 °C, and enzyme/support ratio 0,3 (w/w); the highest specific activity obtained was 16,30 U/mg protein. Kinetic parameters V_{mak} and K_m were also determined for the immobilized lipase. Maximum reaction rate (V_{mak}) and Michaelis-Menten constant (K_m) values were found as 115,0 U/mg-protein and 0,44 mM, respectively. For immobilized enzyme these constants were also observed to be 29,0 U/mg-protein and 1,52 mM.

Keywords: Sporopollenin, *Candida rugosa* lipase, immobilization, adsorption.

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Erol PEHLİVAN yönetiminde hazırlanarak, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

Çalışmalarım esnasında yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm, her zaman destek olan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Erol PEHLİVAN'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmanın seçilmesinde, yürütülmesinde ve her türlü araştırma laboratuvar imkânlarının sağlanmasında ve sonuca ulaştırılmasında değerli katkılarını esirgemeyen ve tecrübeleri ile bana yol gösteren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Mustafa YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım süresince her konudaki fikir, destek ve yardımlarını gördüğüm Arş. Grv. Elif YILMAZ ÖZMEN'e teşekkür ederim.

Maddi manevi destekleriyle her zaman yanımda olan ve bana güvenen anne ve babama, ablalarım, kardeşime, nişanlıma ve tek dostuma en büyük teşekkürler...

Arş.Grv. Havva TUTAR
KONYA- 2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
KISALTMA VE SEMBOLLER.....	ix
1.GİRİŞ	1
1.1. Enzimler Ve Özellikleri	2
1.2. Enzim Kullanmanın Avantajları	3
1.3. Enzimatik Bir Tepkimenin Hızını Etkileyen Faktörler.....	4
1.4. Lipaz Enzimi	7
1.4.1. Lipazların Özellikleri	11
1.4.2. Lipazların Kaynakları.....	13
1.4.3. Lipazların Sınıflandırılması	14
1.4.4. Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar.....	16
1.4.5. Lipazların Endüstriyel Kullanım Alanları.....	17
1.4.5.1 Deterjan Endüstrisinde Lipazlar.....	19
1.4.5.2. Gıda Endüstrisinde Lipazlar.....	20
1.4.5.3. İlaç Endüstrisinde Lipazlar	20
1.4.5.4. Organik Sentezlerde Lipazlar.....	20
1.4.5.5. Kozmetik ve parfüm endüstrisinde lipazlar	20
1.4.5.6 Deri Endüstrisinde Lipazlar	20
1.4.5.7. Biyosensör Olarak Lipazlar.....	21
1.4.5.8. Oleokimyasal Endüstride Lipazlar.....	21
1.4.5.9. Kâğıt Hamuru ve Kâğıt Endüstrisinde Lipazlar.....	22
1.5. Enzim İmmobilizasyonu	22
1.5.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	26
1.5.2. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması.....	30
1.6 Adsorbsiyon	33
1.6.1. Adsorbsiyonu Etkileyen Faktörler	34

1.6.2. Adsorbsiyon Türleri	35
1.6.3. Adsorban ve Adsorbat Özellikleri.....	36
1.6.4 Adsorbsiyon Isısı.....	36
1.6.5. Adsorbsiyon Kinetiği	37
1.6.6. Adsorbsiyon İzotermi.....	38
1.6.6.1. Langmuir Adsorbsiyon İzotermi	38
1.6.6.2. Freundlich Adsorbsiyon İzotermi	41
1.7. Sporopollenin	42
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	45
3. MATERYAL VE METOD	51
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	51
3.2. Kullanılan Cihazlar	51
3.3. Deneysel Kısım	52
3.3.1. Enzim İmmobilizasyonu	52
3.3.2. Protein Miktarı	52
3.3.3. Standart p-NP(<i>p</i> -nitrofenol)- absorbans grafiği	53
3.3.4. Standart Aktivite tayini	54
3.3.5. İmmobilizasyondaki Hesaplamalar	54
3.3.6. Aktifliğe pH'nın Etkisi.....	55
3.3.7. Aktifliğe Sıcaklığın Etkisi.....	55
3.3.8. Aktifliğe Substrat Değişiminin Etkisi.....	55
3.3.9. Termal Kararlılık.....	55
3.3.10. Depolanma Kararlılığı.....	56
3.3.11. Tekrar kullanılabilirlik	56
3.3.12. TGA (Termal Gravimetrik Analiz) ve SEM (Taramalı Elektron.....	56
Mikroskopi).....	56
4. DENEY SONUÇLARI VE TARTIŞMA	57
4.1. İmmobilizasyon Parametreleri	57
4.2. Enzim ve Adsorban Oranının Aktivite Değerine Etkisi.....	59
4.3. Aktifliğe pH'm Etkisi.....	60
4.4. Aktifliğe Sıcaklığın Etkisi.....	61
4.5. Aktifliğe Substrat Değişiminin Etkisi.....	62

4.6. Termal Kararlılık.....	63
4.7. Serbest ve İmmobilize Lipazın Depolanma Kararlılığı	65
4.8. Tekrar kullanılabilirlik	66
4.9. TGA (Termal Gravimetrik Analiz) ve SEM (Taramalı Elektron Mikroskopi).....	67
4.10. Adsorbsiyon İzotermi.....	68
5. SONUÇ	72
6. KAYNAKLAR	74

ŞEKİLLER DİZİNİ**ŞEKİL****SAYFA**

Şekil 1.1. Michaelis-Menten Grafiği.....	5
Şekil 1.2. Lineweaver-Burk Grafiği.....	6
Şekil 1.3. Humicola lanuginosa lipazının üç boyutlu yapısı.....	9
Şekil 1.4. Candida rugosa lipazının üç boyutlu yapısı.....	10
Şekil 1.5. Candida rugosa lipazının açık ve kapalı formları	11
Şekil 1.6. Spesifik olmayan lipazların katalizlediği reaksiyonun denklemi	15
Şekil 1.7. 1,3-Spesifik lipazların katalizlediği reaksiyonun denklemi	15
Şekil 1.8. Yağ asiti spesifik lipazların katalizlediği reaksiyonun denklemi.....	16
Şekil 1.9. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması	26
Şekil 1.10. Sporopolleninin Karotenoidlerden Türetilmiş Yapısı.....	43
Şekil 2.1. Standart protein miktarı (mg/ml)- absorbans grafiği	53
Şekil 2.2. Standart p-NP(<i>p</i> -nitrofenol)- absorbans grafiği	53
Şekil 2.3. İmmobilizasyon İşleminde İnkubasyon pH'ının Aktiviteye Etkisi	57
Şekil 2.4. İmmobilizasyon İşleminde İnkubasyon süresinin Aktiviteye Etkisi	58
Şekil 2.5. İmmobilizasyon İşleminde İnkubasyon Hızının Aktiviteye Etkisi.....	59
Şekil 2.6. Serbest ve immobilize lipaza pH'ın etkisi	61
Şekil 2.7. Serbest ve immobilize lipazın bağıl aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.....	62
Şekil 2.8. Serbest ve immobilize lipazın termal kararlılık	64
Şekil 2.9. Serbest ve immobilize lipazın bağıl aktifliğinin depolanma süresi ile değişimi.....	66
Şekil 2.10. İmmobilize lipazın bağıl aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi	67
Şekil 2.11. Sporopollenin ve Spo-E'nin dTGA eğrisi	67
Şekil 2.12. SEM görüntüleri.....	68
Şekil 2.13. Langmuir Adsorbsiyon İzotermi.....	69
Şekil 2.14. Freundlich Adsorbsiyon İzotermi	70

TABLolar DİZİNİ

<u>TABLO</u>	<u>SAYFA</u>
Tablo 1.1. Farklı Kaynaklı Lipaz Enzimlerinin Özellikleri	13
Tablo 1.2. Kullanımı Yaygın Bazı Ticari Lipazlar	18
Tablo 1.3. Mikrobiyal Lipazların Endüstriyel Uygulamaları.....	19
Tablo 1.4. İmmobilizasyon Yönteminin Karşılaştırılması.....	31
Tablo 1.5. Serbest ve İmmobilize Enzim Özelliklerinin Karşılaştırılması	32
Tablo 1.6. R_L (Dağılma) Değerleri ve İzoterm Tipleri.....	40
Tablo 1.7. Serbest ve İmmobilize Lipaz Aktiviteleri.....	59
Tablo 1.8. Serbest ve İmmobilize Edilen Lipazın Kinetik Parametreleri	63
Tablo 1.9. İmmobilize Lipazın Langmuir ve Freundlich Parametreleri	70

KISALTMA ve SEMBOLLER

a_L	Adsorbsiyon enerjisine bağlı olan sabit
BSA	Bovin serum albumin
CRL	<i>Candida rugosa</i> lipazı
C_e	Adsorbsiyon sonrası çözeltide kalan maddenin konsantrasyonu
E	Enzim
E.C.	Enzyme Commission
ES	Enzim-substrat kompleksi,
K_F	Adsorbsiyon kapasitesi
K_L	Adsorbatın adsorplanma kapasitesine bağlı olan sabit
K_m	Michaelis sabiti
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
μm	Mikrometre
n	Adsorbsiyon yoğunluğu
nm	Nanometre
pI	İzoelektrik nokta
p-NPP	para-nitrofenil palmitat
q_e	Birim adsorban üzerinde adsorplanan madde miktarı
Q_{max}	Adsorbanın maksimum adsorplama kapasitesi
R_L	Dağılma sabiti
S	Substrat derişimi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
Spo	Sporopollenin
Spo-E	Lipaz immobilize edilmiş sporopollenin
U/mg	Spesifik aktivite
U	Aktivite
Ü	Ürün
V	Hacim
V_{mak}	Maksimum tepkime hızı

1.GİRİŞ

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan biyokatalizatörler olarak tanımlanırlar. Bununla beraber yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkânını ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle enzimlere ilişkin tüm özellikleri bir bütün olarak inceleyen enzimoloji bilim dalı, başta biyokimya ve moleküler biyoloji olmak üzere fizyokimya, bakteriyoloji ve mikrobiyoloji, genetik, botanik ve tarım farmakoloji ve toksikoloji, patoloji, fizyoloji, tıp, mühendislik, biyoteknoloji gibi bilim dalları ile çeşitli endüstriyel alanlar için büyük bir önem taşımaktadır.

Enzimlerden; ekmek, peynir, bira, şarap vb. maddelerin yapımında ve ayrıca ilaç olarak yararlanılmıştır. Enzimin hücre dışı bir aktivitesi olduğu ilk kez 1783 yılında Spallanzi tarafından atmaca mide suyunun eti çözünebildiği gösterilerek kanıtlanmıştır. Daha sonra 1811 yılında Kirchhof buğday nişastasının zamanla şekere dönüştüğünü saptadı. 1830 yılında amigdalinin acı badem tarafından hidroliz edildiği gösterildi ve 1833 yılında diastaz bulundu. 1834 yılında Schwann pepsini oldukça saf olarak elde etmeyi başardı. Enzimler için “ katalizatör” sözcüğü ilk kez 1838 yılında Berzelius tarafından, “enzim” sözcüğü ise 1878 yılında Kühne tarafından kullanılmıştır (Telefoncu 1997).

Enzimler konusundaki araştırmalarda diğer önemli bir adım 1926’da Summer’ in üreazı kristalize formda elde etmesiyle atılmıştır. Sonraki yıllarda ise Northop ve arkadaşları bazı proteolitik enzimlerin izolasyon-saflaştırma ve kristalizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. 1940’ların başında çok az sayıda enzim saflaştırılabilmişken bu rakam 1980’lerde 200 tane kristallendirilebilen ve 1500 tane yüksek düzeyde saflaştırılmış enzime ulaşmıştır ve gün geçtikçe enzim sayısı yükselmektedir (Dinçkaya 1996).

Enzimlerin kimyasal katalizörlere olan üstünlükleri son zamanlarda endüstride kullanımını yaygın hale getirmeye başlamıştır. Ancak yine de endüstriyel uygulamalarda kullanılan enzimler sınırlıdır. Çünkü enzimlerin pek çoğu kararsızdır. İzolasyonu ve arıtılması ekonomik değildir. Bu nedenle enzimlerin bir kez kullanımı yerine immobilize edilerek tekrar kullanılabilmesi ekonomik açıdan büyük önem taşır (Telefoncu 1997).

1.1. Enzimler ve Özellikleri

Enzimler, canlı hücrede meydana gelen metabolizma reaksiyonlarının pek çoğunu hızlandıran veya düzenleyen protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Kendileri herhangi bir değişime uğramadan canlı sistemlerde oluşan kimyasal tepkimelerin hızını artırır (Telefoncu 1997). Enzimler, doğal ortamları dışında yeterli koşullar sağlandığında dış ortamlarda da etkilerini gösterebilirler ve bundan dolayı pek çok alanda enzimlerden yararlanılabilmektedir. Bu nedenle enzimler, biyokimyasal reaksiyon işlevlerinin ortaya çıkarılmasında, etki mekanizmalarının ve kinetik özelliklerinin tüm ayrıntılarıyla incelenmesinde ve enzimlerin saflaştırılarak elde edilmesinde son yıllarda oldukça çok kullanılmaktadır.

Bütün enzimler protein yapısında olan moleküllerdir. Bununla birlikte bazıları katalitik etkinlik göstermek için yapısında protein olmayan bir bileşene de gereksinim duyarlar ki bu bileşen 'kofaktör' olarak adlandırılır. Böyle bir enzimde inaktif protein bileşeni 'apoenzim', kofaktörle birlikte aktif enzim ise 'holoenzim' olarak tanımlanır. Kofaktör, bir organik molekül (koenzim) ya da bir metal iyonu olabilir. Enzim molekülünde protein ve kofaktör bileşenlerinin her ikisi de katalizde işlevseldir.

Enzimlerin protein kısmı diğer doğal proteinlerde olduğu gibi peptid bağlarıyla birbirine bağlanmış 20 amino asitten oluşur. Ancak çoğu enzimde posttranslasyonel modifikasyonlar sonucu protein zincirinde yer alan amino asitlerin R-gruplarında bazı kimyasal değişiklikler meydana gelebilmektedir. Bunun yanı sıra yine posttranslasyonel modifikasyonlar sonucu protein zincirine karbonhidrat, lipid, çeşitli

organik moleküller veya metal iyonlarının bağlanması sözkonusu olabilmektedir (Dinçkaya 1996).

Enzimlerin katalizledikleri tepkimelerde tepkimeye giren bileşenler ‘substrat’ olarak adlandırılır. Enzimler, katalizör olarak kimyasal tepkimelerin dengeye ulaşmasını çabuklaştırırlar. Örneğin canlı bir sistemde, bir asit ve alkolden ester oluşum tepkimesinde dengeye ulaşma, ortamda enzim yokluğunda son derece yavaş olur. Asit ve alkol molekülleri (substratlar), ester oluşum tepkimesini verebilmek için, öncelikle kararlılığı düşük olan geçiş hali ürünü (enzim-substrat kompleksi) oluşturur. Ester oluşumu için bu ara ürünün, geçiş haline karşılık gelen bir enerji eşiğini aşması gerekir. Eğer ara ürün enerji tepesini ya da eşiğini aşacak yeterli enerjiye sahipse tepkime gerçekleşir. Bu enerji enzimatik tepkimenin “aktivasyon enerjisi” olarak tanımlanır. Aktivasyon enerjisi ne kadar küçükse tepkime o kadar kolay ve hızlı olur. Enzimler, kolaylaştırdıkları tepkimenin hızını, tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürerek artırır.

Enzimlerin üç boyutlu katlanmış protein moleküllerinden oluşan yapısında özgün substrat moleküllerinin bağlanabildiği, katalizden sorumlu bir bölge vardır. Bu bölgeye enzimin aktif bölgesi denir. Bunlar, amino asitlerden oluşmuş ve özel geometrisi olan yerlerdir. Bu nedenle enzimler spesifikliğı oldukça fazla olan katalizörlerdir. Her enzim, gösterdiği aktivite ile değerlendirilir. Enzim aktivitesi; tanımlanmış koşullarda, birim zamanda gerçekleşen kataliz ya da katalitik tepkimenin hızı olarak tanımlanır (Erarslan 2002).

1.2. Enzim Kullanmanın Avantajları

1. Enzimler, reaksiyonun tipine ve substrata karşı son derece spesifiktir. Doğal substratlarla sınırlı değildir ve organik bileşiklere de uygulanabilirler. Bu nedenle enzimatik reaksiyonlarda yan ürün oluşmaz. Verim %100’ dür. Proses basamaklarının sayısı daha azdır.
2. Kimyasal katalizörlere göre reaksiyonu 108-1011 kez daha hızlı gerçekleştirirler.

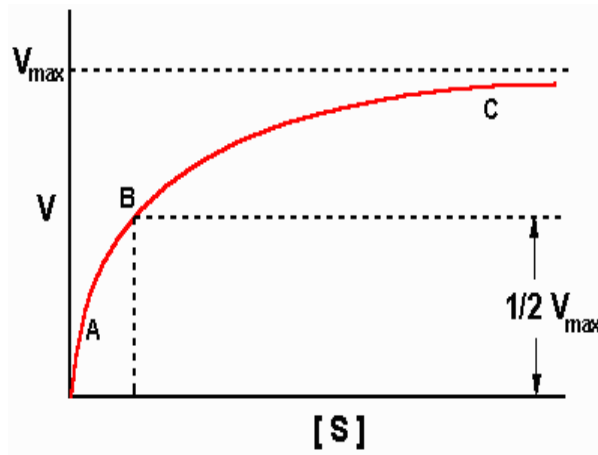
3. Enzimlerin çok çeşitli doğal kontrol mekanizmaları vardır. Enzimlerin aktivitesi, içerisinde buldukları şartlara göre düzenlenebilir. Ortamdaki kontrol edici küçük moleküllere göre de enzim aktivitesi azalabilir ya da artabilir.
4. Fizyolojik pH, sıcaklık ve basınçta çalışabilmeyi sağlarlar. Ayrıca reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonu daha az enerjili ve düşük sıcaklıkta gerçekleştirirler (Wiseman 1986).
5. Reaksiyon ortamından geri kazanılarak tekrar kullanılabilirler.
6. Kemoselektivite, regioselektivite, diastero-selektivite ve enantioselektivite gösterirler.

1.3. Enzimatik Bir Tepkimenin Hızını Etkileyen Faktörler

- **pH:** Enzimlerin aktiviteleri, ortamın hidrojen iyon derişimine bağı olarak değışmektedir. Enzimatik tepkimenin hızının maksimum olduğı ve her enzim için spesifik olan bir optimum pH değıeri bulunmaktadır. pH değıişikliğı ile amino asit zincirinin iyonik özelliğı değııştiğı için denatüre olan enzimin katalitik aktivitesi kaybolmaktadır.
- **Sıcaklık:** Enzimatik tepkimelerde sıcaklığın artması ile moleküller arası çarpışmanın artışına bağı olarak genellikle tepkimenin hızı artmaktadır. Ancak, maksimum bir hıza ulaşıldıktan sonra sıcaklığın artışı ile hızda tekrar bir azalma gözlenmektedir. Bu sıcaklığa optimum sıcaklık adı verilmektedir. Enzimler protein yapısında olduğı için optimum sıcaklığın üzerinde denatürasyona uğramaktadırlar. Önce enzimin moleköl yapısı etkilenir ve daha sonra enzimin aktif merkezide etkilenerek, reaksiyonun tepkime hızı düşer.
- **Enzim derişimi:** Enzimatik bir tepkime ortamında fazla miktarda substrat bulunması halinde tepkimenin hızı, enzim derişimi ile orantılı olarak artmaktadır. Denge halinde enzim derişiminin denge sabiti üzerine etkisi yoktur. Tepkime hızını etkileyen enzimler, hız ve denge sabitlerini değıştirmemektedirler.

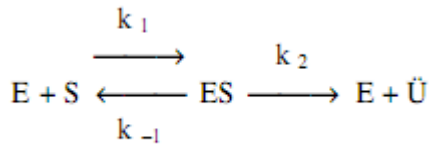
- **Substrat derişimi:** Ortamda bulunan enzim derişimi ve diğer koşullar değişmediğinde tepkimenin hızı, başlangığta substrat derişiminin artırılması ile doğrusal bir artış göstermektedir. Fakat substrat ilavesi ile reaksiyon hızı giderek daha az artmakta ve belirli bir substrat derişiminde maksimum hıza (V_{\max}) ulaşmaktadır. Substrat derişimi daha fazla artırılrsa dahi reaksiyon hızı sabit kalmaktadır (Kutay 2002).

Eğer enzimin reaksiyon hızı (V), substrat konsantrasyonuna (S) karşı grafiğe geçirilirse hiperbolik bir eğri ortaya çıkar. 1913 yılında Leonard MICHAELIS ve Maud MENTEN bu hiperbolik eğrinin matematiksel olarak nasıl ifade edileceğini bir formüle bağlamışlardır.



şekil 1.1. Michaelis-Menten Grafiği. (Artan substrat konsantrasyonuna karşı hızdaki değişim).

Enzim-substrat (ES) kompleksine ait tepkime,



Bu reaksiyonda;

E : enzim,

S : substrat,

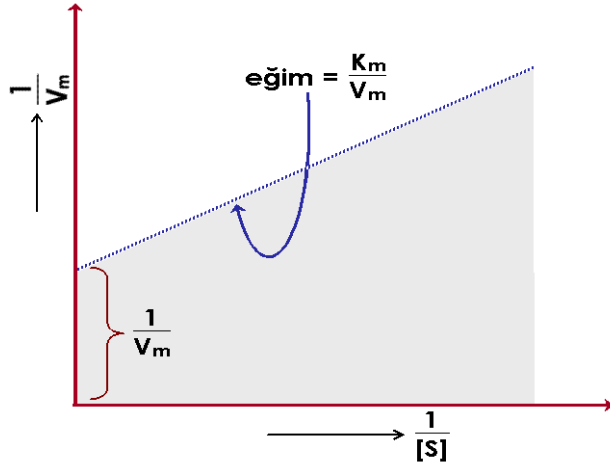
ES: enzim-substrat kompleksi,

Ü: ürünü gösterir.

Enzim tepkime hızı Michaelis-Menten eşitliği ile verilir.

$$V = \frac{V_{mak} \cdot S}{K_m + S} \quad (1.1)$$

V_{mak} 'ın değerini grafikten tam olarak tespit etmek zordur. Eğer Michaelis-Menten eşitliğinin her iki tarafı 1'e bölünürse Lineweaver-Burk eşitliği olarak adlandırılan bir doğru denklemi elde edilir. $1/S$ 'ye karşı $1/V$ grafiğe geçirilirse V_{mak} ve K_m değerleri kolaylıkla belirlenebilir.



Şekil 1.2. Lineweaver-Burk Grafiği

Michaelis-Menten eşitliğinin düzenlenmesi ile Lineweaver-Burk bağıntısı elde edilir.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{mak}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{mak}} \quad (1.2)$$

Bu eşitlikte;

V: başlangıç hızı,

V_{mak} : maksimum hız,

K_m : Michaelis-Menten sabiti,

S: substrat derişimi olarak belirtilir.

K_m değerlerinden, enzimlerin ayırıldılmesinde de yararlanılır. Fakat K_m sabitlerinin tayininde, çözeltilinin pH'ı, sıcaklığı gibi dış koşulların çok hassas bir şekilde sabit tutulması gerekmektedir. Aksi halde, farklı reaksiyon hızları bulunacağından buna göre hesaplanacak K_m değerleri de farklı olacaktır. K_m değerleri, enzimler ile substratlar arasındaki kompleksleşme ilgileri hakkında kalitatif de olsa bir fikir vereceğinden önem taşımaktadır. Ayrıca enzimatik bir reaksiyona ait K_m değerini bilmekle, böyle bir reaksiyonda maksimum hız elde edebilmek için alınması gerekli olan enzim konsantrasyonunun da hesaplanabilmesi mümkün olacaktır (Pekin 1978).

1.4. Lipaz Enzimi

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

Günümüzde enzimlerin kullanıldığı pek çok alanda lipazların önemi giderek artmaktadır. Lipazların enzim pazarındaki payının büyümesinde, bu enzimlerin enantiyo seçicilik, bölgesel seçiciliği ve geniş substrat aralığı gibi özellikleri etkili olmuştur. Lipazlar bitkisel, hayvansal ve de mikrobiyal kaynaklı olup, endüstriyel olarak daha çok mikrobiyal kaynaklı lipazlar tercih edilmektedir. Son zamanlarda üç boyutlu yapılarının belirlenmesine yönelik çalışmalar, lipazların yapı-işlev ilişkilerine ışık tutacak araştırmalara temel oluşturmaktadır (Akkuş 2006).

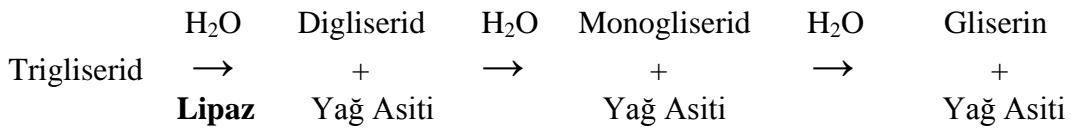
Lipazlar hidroliz, interesterifikasyon, esterifikasyon, asidoliz ve aminoliz gibi çeşitli biyodönüşüm reaksiyonlarını gerçekleştiren çok amaçlı biyolojik katalizörlerdir. İlaç, pestisit, kozmetik, biyosensörler ve deterjan sanayi gibi birçok alanda da lipazlar karşımıza çıkmaktadır (Wiseman 1986).

Lipazlar, triaçilgliserollerin ester hidrolizini sağlayan enzimlerdir. Bu enzimler, insan ve hayvansal organizmalarda, bazı bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunur. Buldukları ortamlar, çeşitli biyolojik sıvılar, hücreler, organlar ve çeşitli

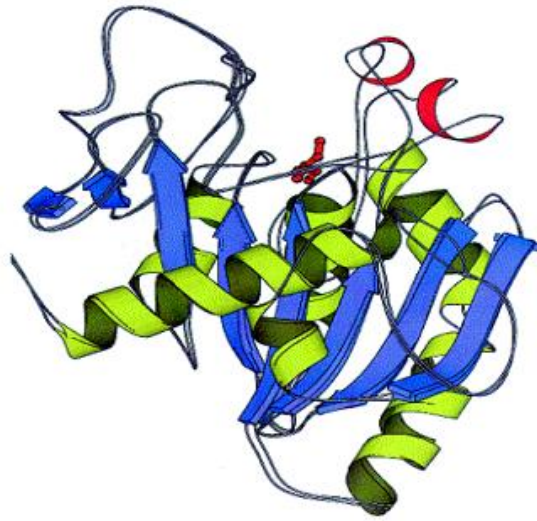
dokulardır (Fennema 1985). Lipazların endüstrideki uygulamaları deterjan sanayisinde, peynir üretiminde, cilt ve yüzey temizleyicilerde ve kağıt üretiminde kullanılan önemli rollere sahiptirler (Schmidt ve Verger 1998, Villeneuve ve ark. 2000, Manfred 2002, Yağız 2006).

Lipazlar normal şartlar altında bitkisel ve hayvansal yağların tersinir hidrolizini kataliz eden enzimlerdir. Adlandırması; E.C. 3.1.1.3 Triaçilgliserol Açıl Hidrolaz seklindedir. Son 10 yıl içinde lipaz enzimi araştırmalarına olan ilgi artmıştır. Bu temel olarak lipazların benzersiz yapısal karakteristiklerine bağlı bir durumdur. Çok yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde ve organik çözücülere karşı yüksek kararlılıktadır. Kimyasal olarak ürünlerine karşı yüksek seçiciliğe sahiptirler. Bu özellikler lipaz enzimlerine düşük sıcaklık ve basınçta reaksiyonları kataliz etme imkanı sağlamaktadır (Paiva ve ark. 2000, Villeneuve ve ark. 2000).

Lipazların etkin olduğu hidroliz reaksiyonu genel olarak şu şekilde verilmektedir;



Günümüzde enzimlerin üç boyutlu yapıları, ayrıntılı bir şekilde X-ışınları kristalografisi ile görüntülenebilmektedir. Şekil 1.3'te lipaz enziminin tam bir yapısı görülmektedir. *Humicola lanuginosa* lipazının kristal yapısı kullanılarak gösterilmiştir. β -tabakalı alt birimi mavi renkte, onu saran helezonik sarmallar yeşil renkte ve aktif serin kalıntıları ile kapak kırmızı renkte gösterilmiştir (Kraulis 1991, Lawson ve ark. 1994).



Şekil 1.3. *Humicola lanuginosa* lipazının üç boyutlu yapısı (Kraulis 1991, Lawson ve ark. 1994).

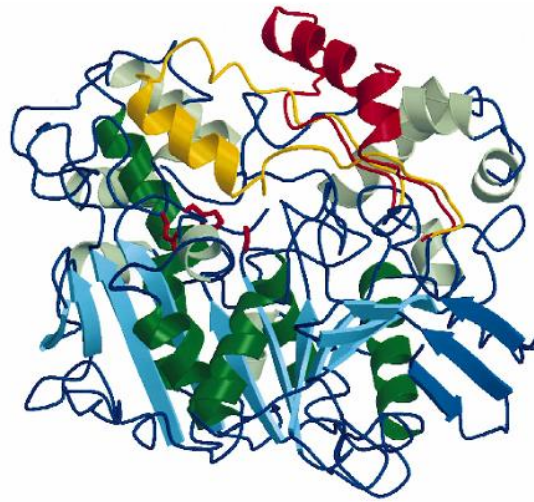
Son yıllarda yeni lipaz uygulamalarının kullanıldığı proseslerde, özellikle tutuklanmış hücrelerin kullanıldığı lipaz katalizli süreçlerin teknik uygulamalarına dair araştırmaların arttığı gözlenmektedir (Macrae ve Hammond 1985).

Lipazları kullanılabilir ve çekici kılan, öncelikle mükemmel bir kimyasal seçicilik, bölgesel seçicilik ve çift yönlü seçicilik göstermeleridir. İkinci olarak da fungi ve bakteriler gibi mikroorganizmalar tarafından yüksek verimlerle üretildiğinden büyük miktarlarda kullanılabilir olmalarıdır. Üçüncü olarak ise, çoğu lipazın kristal yapılarının sırları bilimsel araştırmalarla çözülmüş olmaları ve mühendislik stratejilerinin tasarımını oldukça kolaylaştırmalarıdır. Bütün bu özellikler, organik kimya sektöründe en çok kullanılan biyokatalizör olarak lipazların seçilmesinin nedenidir (Kamini ve ark. 2000).

Lipazlar, *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida antarctica* (Bornscheuer ve ark. 2002) ve *Rhizopus arrhizus* (Elibolve Dursun 2000) gibi bakteri hücrelerinden elde edildiği gibi, *Candida cylindracea* (Tomizuka ve ark. 1966), *Saccharomycopsis lipolytica* (Ota ve ark. 1982), *Geotrichum candidum* (Tsujisaka ve ark. 1973) ve *Trishosporon fermentas* (Chen ve ark. 1992) gibi maya hücrelerinden de elde edilebilir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen bu mikrobiyal

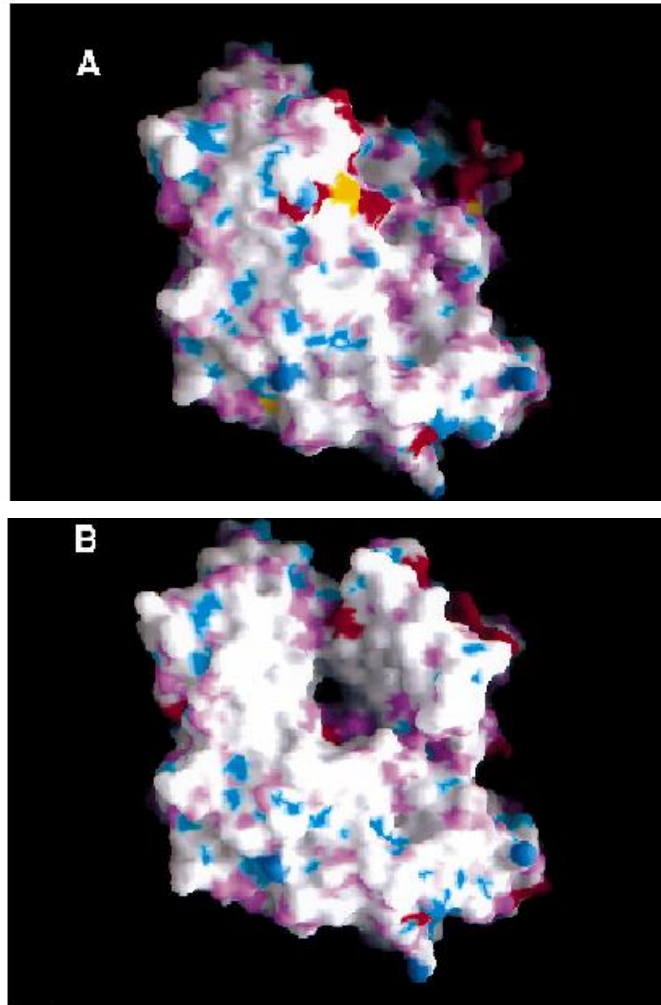
lipazlar, üretildiği mikroorganizmadan mikrobiyolojik işlemlerle izole edilip saflaştırılarak elde edilirler ve ilgili süreçlerde kullanılır hale getirilirler. Günümüze kadar doğal kaynaklar olan mikroorganizmalardan, hayvanlardan, bitkilerden izole edildiği bilinen 50'den fazla lipaz çeşidi vardır (Dumitriu, E., 2003).

Lipazlar açık ve kapalı form olmak üzere iki şekilde karşımıza çıkmaktadır (Cygler ve Schrag 1999). Aktif konumdaki katalitik üçlüyü kaplayan yapısal elementlerin (α -heliks) olduğu yapı aktif olmayan form, diğeri ise ara yüzey aktivasyonu sırasında bu kapağın açılması ile ara yüzey alanının artması ve böylece aktif konumun daha fazla substrat almak için substrata izin verdiği yapı; aktif formdur (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Açık ve kapalı kısımların da eklendiği *Candida rugosa* lipazının üç boyutlu yapısı^a (Jaeger ve Reetz 1998).

^a Açık mavi; merkezde her iki taraftan α -heliksler ile kaplanan hidrofobik β -düzlemini, koyu yeşil; merkez β -düzlemini kaplayan heliksleri, sarı; kapalı konformasyonu, kırmızı; açık konformasyonu göstermektedir.



Şekil 1.5. *Candida rugosa* lipazının açık ve kapalı formları a. Kapalı form b. Açık form (Cygler ve Schrag 1999).

1.4.1. Lipazların Özellikleri

a. Optimum pH

Yüksek pH'larda enzimler genelde etkinliklerini yitirirler. Enzimlerin en yüksek etkinlik ile çalıştıkları pH değeri "optimum pH" olarak adlandırılır. Pepsin gibi pH 1,8'de ya da arginaz gibi pH 10,0'da en yüksek etkinlik gösteren istisna enzimler de olduğu gibi, çoğu enzimler pH 4,5-8,5 aralığında en yüksek etkinliği gösterirler. Yüksek pH'larda yapılarındaki proteinlerin yapısının bozulması sebebi ile

enzim etkinliği, geri dönülemez olarak düşer (Fennema 1985). pH 7,0-9,0 aralığında ve 30-40°C sıcaklıkta en yüksek etkinliği göstermeleri, mikrobiyal lipazların en önemli karakteristik özelliklerindedir (Ollis ve ark. 1992).

Lipazlar belli pH değerlerinde katalitik olarak aktiftir. Çoğu için optimum pH 7,0–8,0 arası değişir. Mikrobiyolojik kaynaklı lipazlar pH 6,0–7,5 civarında yüksek kararlılık gösterirler (Fadıloğu 1996).

b. Optimum Sıcaklık ve Termal Kararlılık

Lipazların maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık genellikle 30-40°C'dır. Hayvan ve bitki lipazları, genellikle mikrobiyal (mantar ve bakteri) lipazlara göre daha az termal kararlılık gösterir (Fadıloğu 1996).

c. Lipazın Aktivasyon ve İnhibisyonu

Lipaz aktivitesine, iyonların ve reaktiflerin etkilerinin incelenmesi sonucu, ağır metal iyonlarının lipaz aktivitesini inhibe ettiği, alkali metal iyonlarının ise artırdığı görülmüştür. Lipaz aktifliği üzerine en etkili iyon Ca^{2+} 'dir. Lipaz aktivitesini inhibe eden maddelere Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Sn^{2+} ,nin bazı tuzları, boronik asitler ve dietil-p-dinitrofenil fosfat örnek olarak verilebilir (Akoh ve Min 1998).

d. İzoelektrik Nokta (pI)

Net yükü sıfır olan noktadır. pI civarında proteinler daha az çözünürken pI dan uzaklaştıkça daha fazla çözünürler. Tablo 1.1'de örnek verilmiştir (Kutay 2002, Whellcuright 1991).

Tablo 1.1. Farklı kaynaklı lipaz enzimlerinin özellikleri

Kaynak	Spesifik pozisyonu	pI	İnhibitörler	Aktivatörler
Domuz pankreası	1,3 Spesifik	-	Ca ²⁺ , Sr ²⁺ , Mg ²⁺	Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Versen, iyodin PCMB
<i>Phycomyces Nitens</i>	-	5.9	Ag ⁺ , Hg ²⁺ , Pb ²⁺ , Cu ²⁺ , KMnO ₄ , NBS	Mammalian Bile
<i>Aspergillus Niger</i>	1,3 Spesifik	4.1	Ag ⁺ , iyodasetamit	-
<i>Candida Rugosa</i>	Non-Spesifik	4.5	Hg ²⁺ , Fe ²⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Cu ²⁺ , Co ²⁺	-
<i>Candida cylindracea</i>	Non-Spesifik	4.0	-	-
<i>Humicola lanuginosa</i>	-	6.6	Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Cu ²⁺ , Sn ²⁺ , Hg ²⁺	K ⁺ , Ca ²⁺

1.4.2. Lipazların Kaynakları

Lipaz daha çok bakteri, mantar ve mayalardan oluşan mikrobiyal florada yer almaktadırlar. Lipazlar, domuz ve insan gibi memelilerde, kene otu tohumu (*Ricinus communis*) ve kolza tohumu (*Brassica napus*) gibi yüksek yapılı bitkilerde de bulunmaktadır. Biyoteknolojik alanda mikrobiyal lipazlar daha ilgi çekicidir. Lipazlarla yapılan endüstriyel uygulamalarda genellikle saflaştırılmış ticari enzimler tercih edilmektedir (Pandey ve ark.1999).

Lipazlar, doğada bulunuş şekline göre şöyle sınıflandırılabilir:

A. Mikroorganizma Lipazları

- Bakteriyel lipazlar

Pseudomonas spp. Lactobacillus spp.

Streptococcus faecalis

- Mantar türü lipazlar

Candida cylindracea

Humicola lanuginosa

B. Hayvansal Lipazlar

- Doku lipazları

Lipoprotein lipazı

Adipoz dokusu lipazı

Karaciger lipazı

- Sindirim sistemi lipazları

Pankreas lipazı

İnce bağırsak lipazı

- Süt lipazları

C. Bitkisel Lipazlar

Buğday, yulaf, mısır lipazları

1.4.3. Lipazların Sınıflandırılması

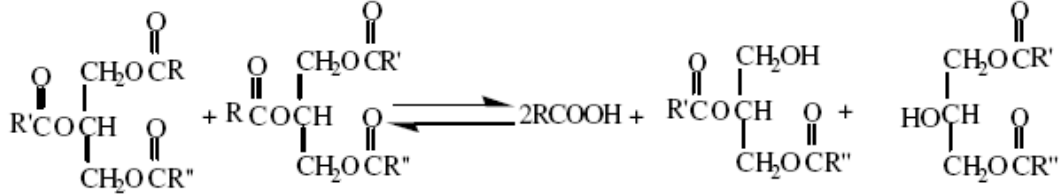
Lipazlar özelliklerine göre üç ayrı grupta incelenebilir (Telefoncu 1997);

- **Spesifik Olmayan (Non-Spesifik) Lipazlar**

Bu gruba giren enzimler trigliseridlerin tüm pozisyonlarındaki açil gruplarını koparabilme yeteneğine sahiptirler. Reaksiyonda ara ürün olarak diaçil ve monoaçilgliserinler oluşur. Trigliseridler gliserin ve yağ asitlerine parçalanırlar.

- **Yağ Asiti Spesifik Lipazlar**

Bu gruptaki lipazlar açilgliserinlerdeki bazı yağ asitlerine özgü olup bu yağ asitlerinin oluşturduğu ester bağlarını parçalarlar.



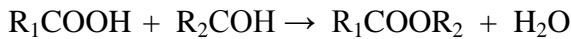
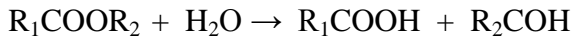
Şekil 1.8. Yağ asidi spesifik lipazların katalizlediği reaksiyonun denklemi (Telefoncu 1997).

1.4.4. Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar

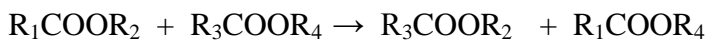
Lipazlar, esterleşme, ester ve lipitlerin hidrolizini, trans-esterleşme ve tek kutuplu grup geçişleri gibi reaksiyonları kataliz ederler. Lipazlar hidrolazlar sınıfında olmakla birlikte yağ asit esterlerinin hem hidrolizini hem de sentezini katalizleyebilirler. Katalizleme, su ile çözünmez substratın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

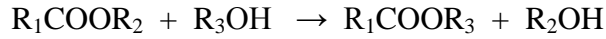
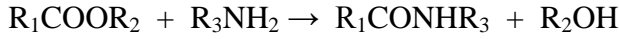
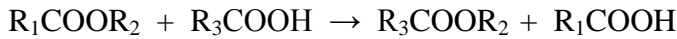
Lipaz tarafından kataliz edilen reaksiyonlar (Villeneuve ve ark. 2000):

a. Ester hidroliz-Ester sentez reaksiyonları



b. Trans-esterleşme reaksiyonu



c. Alkoliz reaksiyonu**d. Aminoliz reaksiyonu****e. Asidoliz reaksiyonu****Candida rugosa lipazı**

Candida rugosa sporsuz, tek hücreli, patojenik olmayan, yüksek verimli lipaz üretimi için ticari olarak tercih edilen bir mikroorganizmadır.

CRL, Serin, Glutamin ve Histidin katalitik üçlüsünden oluşan ve 31 amino asitten oluşan bir kapağı olan aktif bölgeye sahiptir. Kapağın aktif bölgeye bakan iç yüzeyi hidrofobik, dış yüzeyi hidrofilitir. Aktif bölgenin kapak tarafından kapatıldığı durumda enzimin aktivitesi düşüktür ve bu forma ‘kapalı form’ denir. Kapağın hidrofobik arayüzeyle etkileşerek açılması ile enzim aktivitesi önemli ölçüde artış gösterir. Kapağın açık olduğu bu forma ise ‘açık form’ denir (Benjamin ve Pandey 1998, Paiva ve ark. 2000).

CRL, özellikle farmasötiklerin rezolüsyonunda, deterjanlarda biyosüpfaktan olarak, biyosensörlerde, karbohidrat ester sentezinde, enantiyomerik saflıkta amin ve amidlerin üretiminde, deri endüstrisinde, kozmetik ve parfümeride kullanım alanları bulunmaktadır. CRL’nin ekonomik kullanımını sağlamak için immobilize enzimin ticari kullanımı daha yaygındır (Benjamin ve Pandey 1998, Bakkal 2006).

1.4.5. Lipazların Endüstriyel Kullanım Alanları

Endüstriyel alanlarda kullanılan enzimlerin çoğu mikrobiyal kaynaklı olmasına rağmen, bitkisel kaynaklı enzimler de endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır.

Lipazlar bir organizmadan diğerine ya da organizmalar içerisindeki lipidlerin biyodönüşümü için önem taşıyan enzimlerdir. Tablo 1.3’de mikrobiyal lipazların bazı uygulamaları verilmiştir. Kullanımı yaygın bazı ticari lipazlar (Jaeger ve Reetz 1998) Tablo 1.2’de verilmiştir.

Tablo 1.2. Kullanımı yaygın bazı ticari lipazlar

Tip	Kaynak	Uygulama alanı	Üretici firma
Fungal	<i>C. rugosa</i>	Organik sentez	Amano, Biocatalysts,Boehringer Mannheim,Fluka,Genzyme,Sigma
	<i>C. antarctica</i>	Organik sentez	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>T. lanuginosus</i>	Deterjan katkıları	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>R. miehei</i>	Gıda işlenmesi	NovoNordisk,Biocatalysts, Amano
Bakteriyel	<i>B. cepacia</i>	Organik sentez	Amano,Fluka,Boehringer Mannheim
	<i>P. alcaligenes</i>	Deterjan katkıları	Genencor
	<i>P. mendocina</i>	Deterjan katkıları	Genencor
	<i>Ch. Viscosum</i>	Organik sentezler	Asahi, Biocatalysts

Tablo 1.3. Mikrobiyal Lipazların Endüstriyel Uygulamaları

<u>Endüstri</u>	<u>Görevi</u>	<u>Ürün ya da Uygulama</u>
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

1.4.5.1 Deterjan Endüstrisinde Lipazlar

Enzimler deterjanlardaki istenmeyen kimyasalların azaltılmasını sağlar ve zararlı kalıntı bırakmadan biyolojik olarak ayrıştırılabilirler. Ayrıca daha düşük yıkama sıcaklığını sağlayarak enerji tasarrufuna katkıda bulunurlar. Günümüzde hidrolitik lipazların ticari olarak en önemli uygulama alanı ev ve sanayideki çamaşır yıkama ile evde bulaşık yıkama da kullanılan deterjanlara katılmalarıdır. Her sene tahmini olarak üretilen yaklaşık 13 milyar ton deterjana 1000 ton lipaz katılmaktadır. Deterjana suyun eklenmesi ile birlikte deterjandaki lipaz, amilaz, selüloz ve proteaz enzimleri deterjandaki kimyasal bağların parçalanmasına katalizörlük yaparlar (Jaeger ve Reetz 1998, Pandey ve ark. 1999).

1.4.5.2. Gıda Endüstrisinde Lipazlar

Lipazlar, triaçilgliserollerdeki yağ asidi zincirlerinin yerini değiştirmesiyle lipidlerinin özelliklerinin değiştirilmesini sağlar. Bu yol, nispeten ucuzdur ve çok az miktardaki lipidle daha yüksek bir değerdeki yağ değiştirilebilir (Undurraga ve ark. 2001).

1.4.5.3. İlaç Endüstrisinde Lipazlar

Kimyasal yollarla üretilmeyen yeni ilaçların sentezinde, kiral bileşiklerin elde edilmesinde lipazlardan yararlanır. Ayrıca angiotensin-I dönüştürücü enzimler, antiinflamatuvar ilaçlar ve β -blokerlerin üretiminde lipazlar kullanılır (Kierkels ve ark. 1990).

1.4.5.4. Organik Sentezlerde Lipazlar

Lipazlar kimyasal, bölgesel ve stereo seçici transformasyonların büyük bir bölümünde katalizör olarak kullanılmaktadır (Rubin ve Dennis 1997).

1.4.5.5. Kozmetik ve parfüm endüstrisinde lipazlar

Endüstride kozmetik ve kokulu bileşiklerin üretiminde lipazlar kullanılmaktadır. Kozmetik ve kokulu bileşiklerin üretiminde lipazların kullanıldığı literatür de belirtilmektedir (Snellman ve Colwell. 2004).

1.4.5.6. Deri Endüstrisinde Lipazlar

Deri üretimindeki post ve deri işleme işlemleri çok eski tarihlere dayanmaktadır. Deri işleme, kılların ayıklanması, deri altı yağlarının kaldırılması, doldurma gibi işlemlerden oluşur (Pandey ve ark. 1999).

1.4.5.7. Biyosensör Olarak Lipazlar

Katı ve sıvı yağ endüstrisinde, gıda teknolojisinde ve klinik uygulamalarda, triaçilgliserol miktarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Analiz için kullanılan kimyasal yöntemler pahalı ve zaman alan tekniklerdir. Son zamanlarda mikrobiyal lipazların biyosensör bileşeni olarak kullanımı, umut verici bir gelişme olarak kabul edilmektedir. Biyosensörler; biyolojik, kimyasal, biyokimyasal ve elektronik bileşenlerden oluşur. Biyosensörlerin bileşenleri arasında; enzimler, antikolar, proteinler, hücreler, hücre özütleri, immobilize ya da bağlı konumda uygun sinyal üreticileri yer alabilir. Uygulamalı tıpta bakteriyel 'biyoluminesanslı' biyosensörler yapılmıştır. Lipazların en önemli analitik kullanımları klinik amaçlar için lipitlerin belirlenmesidir. Lipazlar, triaçilgliserollerden gliserol eldesinde kullanılmakta, kimyasal ve enzimatik yöntemlerle ayrılan gliserol miktarı hesaplanabilmektedir.

Biyosensör bileşeni olarak lipazlar tıptaki uygulamaların yanı sıra, aynı zamanda gıda ve içecek endüstrisinde, kirlilik analizinde, pestisit kontaminasyonu izlenmesinde ve ilaç endüstrisinde de kullanılırlar (Pandey ve ark. 1999).

1.4.5.8. Oleokimyasal Endüstride Lipazlar

Oleokimyasal işlemlerde lipazlar, alkoliz, hidroliz ve gliseroliz esnasında termal dereceyi en aza indirmek ve enerjiyi korumak için kullanılır. (Vulfson 1994, Bornscheuer 2000). Lipazlar triaçilgliserollerde ester bağlarının hidrolitik olarak parçalanması için çok az sulu bir ortamda tersinir olarak bu reaksiyonu katalizler. İnteresterifikasyon olarak bilinen bu işlemde hidroliz ve esterleşme aynı anda gerçekleşebilir. Substratlara bağlı olarak, lipazlar asidoliz, alkoliz ve transesterifikasyonu katalizler (Balcão ve ark. 1996, Sökmen 2005).

1.4.5.9. Kâğıt Hamuru ve Kâğıt Endüstrisinde Lipazlar

Kâğıt endüstrisinde üretilen kâğıt hamurundan katranı ayırmakta lipaz kullanılır. Katran, kâğıt hamuru ve kâğıt üretiminde ciddi sorunlara sebep olan trigliseridler ve balmumu olarak adlandırılan ağacın hidrofobik bileşenlerini tanımlamak için kullanılır (Jaeger ve Reetz 1998).

1.5. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler kimya, biyoteknoloji ve birçok endüstri alanında kullanılmaktadır. Kullanılan enzimlerin pahalı ve ortam koşullarına dayanıksız olması, enzimlerin daha ekonomik ve kullanışlı hale getirilmesi için yapılan çalışmalara hız kazandırmıştır.

Farklı kaynaklardan izole edilen enzimlerin, aktivitelerini kaybetmeden reaksiyon ortamından geri kazanılmaları olanaksızdır. Bu durum enzimlerin çok spesifik ve pahalı katalizör olmalarına neden olur ve maliyeti yükseltir. Serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanmazlar. Söz konusu sebeplerden dolayı immobilizasyon tekniklerinin geliştirilmesi ve uygulanması enzimleri endüstride daha çekici ve kullanılabilir duruma getirebilir.

İmmobilizasyon, enzimlerin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanması, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılması ve suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklanmasıdır.

Her enzim için ideal taşıyıcı ve immobilizasyon yöntemi seçiminde bilimsel standartların oluştuğunu söylemek mümkün değildir. Taşıyıcı ve immobilizasyon yöntemi seçilirken hem immobilize enzimin karakteristikleri ve kullanılacağı alan hem de seçilen yöntem ile taşıyıcı kombinasyonunun sınırlamalarının ve özelliklerinin uyumuna dikkat edilmelidir.

Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir.

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıda aşağıdaki bazı özellikler bulunmalıdır.

- Suda çözünmeme,
- Hidrofilik karakter,
- Gözenekli (poröz) yapı,
- Mekanik stabilite ve uygun partikül formu,
- Kimyasal ve termal stabilite,
- Mikroorganizmaya karşı dirençlilik,
- Ucuzluk,
- Zehirsizlik
- Rejenere olabilme

İmmobilizasyon için seçilebilecek bazı taşıyıcı destek materyaline örnekler aşağıda verilmiştir (Telefoncu 1997).

<u>ANORGANİK POLİMER</u>	<u>DOĞAL POLİMER</u>	<u>SENTETİK POLİMER</u>
Kil, cam	Selüloz	Polistiren türevleri
Silikajel	Nişasta	Poliakrilamid
Bentonit	Dekstran	Naylon
Hidroksilapatit	Agar ve agaroz	Vinil ve alil polimerler
Titandioksit	Karragenan	Oksiranlar
Zirkonyumdioksit	Kollajen	Metakrilat
Nikeloksit	Kitin ve Kitozan	İyon değiştirici reçineler
Ponzataşı	Jelâtin	Maleik anhidrit polimerleri
Aktifkarbon	Albumin	
Metaller	İpek	
Metaloksitler		

İmmobilizasyon işleminin bu alanda getirdiği bazı avantajlardan aşağıda sözedilmiştir.

- Çok adımlı ardışık reaksiyonlar için uygundur. Reaksiyon sırasında ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir
- Doğal enzimlere göre daha kararludur.
- Bazı koşullarda serbest enzimden daha yüksek aktivite gösterebilir.
- Uzun süre ve birkaç kez kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilme özellikleri vardır.
- Reaksiyon sonunda ortamdaki kolayca uzaklaştırılabilir ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz
- Enzimin kendi kendini parçalaması (autolysis, self-digestion) olasılığı azalır.
- Çalkalama, karıştırma gibi işlemler (mekanistik) için uygundur.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.s.) karşı dayanıklıdır.

Genellikle immobilize enzimlerin işletme koşulları altında aktif olduğu süre, serbest enzime göre daha yüksektir. Böylece işlem süresi kısalmış ve daha fazla saf ürün elde edilir (Telefoncu 1997, Koç 1994). Bununla birlikte immobilizasyonun dezavantajları da vardır.

- 1) İmmobilizasyon sırasında sıcaklık, pH değişimi, serbest radikaller oluşması gibi faktörler enzimin denatüre olmasına, dolayısıyla aktivitesini kaybetmesine yol açar. Bu nedenle enzim immobilizasyonu sırasında aktif grupların korunması için immobilizasyon işlemi uygun koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir.
- 2) Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır.
- 3) Bazı enzim taşıyıcılarının maliyeti yüksektir.

İmmobilizasyon işleminde enzim yapısı konformasyonel değişikliğe uğrayabilir. Çeşitli sebepler immobilize enzimin zincir hareketlerini değiştirebilir. Bunlar, immobilizasyonda kullanılan kimyasalların tipi, taşıyıcı ile enzimin karşılıklı etkileşmesi, aktifleştirici veya çapraz bağlayıcı kimyasallar ile enzimin etkileşmesi olarak belirtilebilir.

Enzim immobilizasyonu enzimin etrafındaki mikroçevreyi etkileyebilir ve enzim davranışları üzerinde aşağıda belirtildiği gibi bazı değişiklikler oluşturur (Gloger ve Tischer 1981).

- **Yapısal Değişiklikler:** İmmobilizasyon işleminde, enzim yapısının belli bir pozisyonda uzun süre korunması ile enzim ve taşıyıcı arasında çok sayıda bağlanma oluşabilir. Enzimin katalitik aktifliği yapısal değişmelere bağlı olduğundan K_m ve V_{mak} değerlerinde de farklılıklar, enzim aktifliğinde azalmalar olabilir.

- **Bölme Etkisi:** Poliyonik destek kullanıldığında iyonik yapıya sahip substrat, tepkime ortamında homojen olarak dağılmaz yani enzim çevresinde kütle fazındakinden farklı derişimde bulunabilir. Ölçülen derişim değerleri genellikle kütle fazından yapılıdır. Bölme etkisi çok gözlenen bir durumdur. Ayrıca, çözünen madde ile polimerik destek arasında hidrofobik etkileşmeler de olabilir.

-**Difüzyon Sınırlaması:** Difüzyonel sınırlama, fiziksel büyüklük ile ilgilidir. Eğer polimer desteğinin gözenek çapı substrat molekülünden küçük ise substratın destek içine difüzlenmesi ve enzim ile temasa geçmesi engellenir ve bunun sonucu olarakta herhangi bir tepkime meydana gelmez.

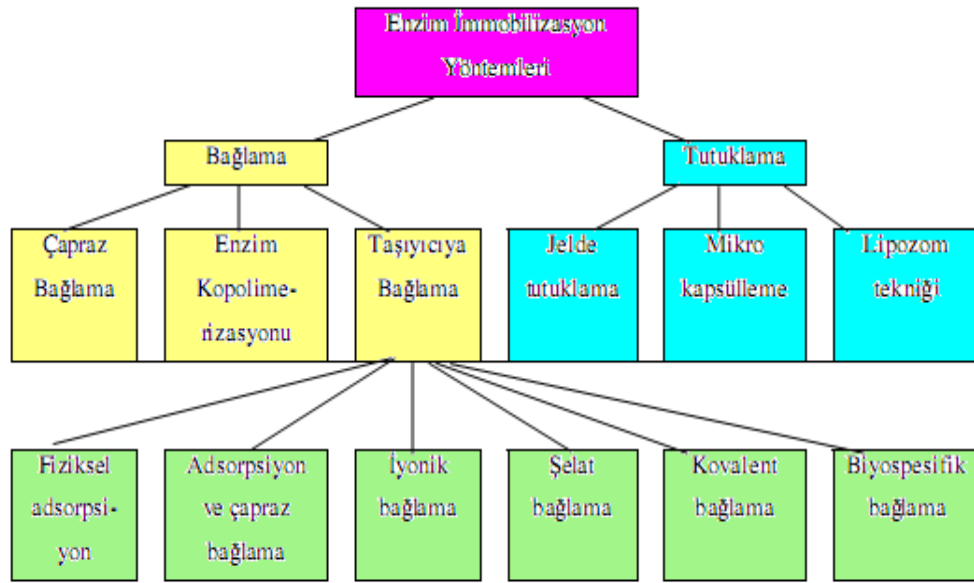
- **Sterik Sınırlamalar:** Eğer immobilize enzimin aktif uçları substrat molekülünün yaklaşmasına elverişli pozisyonda değil ise sterik problemler ortaya çıkar. Örneğin enzimin aktif grupları destek maddesine dönük ise substratın aktif merkeze yaklaşması engellenir. Enzim polimerik kafeste hapsedildiğinde, substrat moleküllerinin enzime yaklaşp direk temasa geçmesi matriks tarafından engellenebilir.

- **İnaktivasyon:** Zor tepkime şartlarında (örneğin yüksek pH, ortamda serbest radikallerin, oksitleyici reaktiflerin varlığı gibi) gerçekleşen immobilizasyon işlemleri enzimin bir kısmının veya tamamının aktifliğini yitirmesine sebep olabilir. Böylece immobilize edilmiş enzimin spesifik aktifliği, serbest enzimin

aktifliğinden oldukça düşük olabilir. Enzim herhangi bir konformasyonel değişim olmaksızın aktifliğini kaybedebilir (Karaca 2006).

1.5.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyon yöntemleri Şekil 1.9'daki gibi sınıflandırılabilir.



Şekil 1.9. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması (Telefoncu 1997).

A. Kimyasal yöntemler

— Kovalent Bağlanma

Kovalent bağlama, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya enzimin kovalent bağlarla tutturulmasıdır. Kovalent bağlama diğer yöntemlere göre daha karmaşık ve zor koşullar altında yapılır. Kovalent bağlama yönteminde taşıyıcı ile enzimin katalitik aktif bölgesindeki fonksiyonel gruplar arasında bağ oluşmaması gerekmektedir. Enzimin katalitik görevde yer almayacak kısımları taşıyıcıya kovalent bağla

bağlanmada kullanılır. Böylece enzim aktivitesini yitirmemiş olur. Enzim üzerindeki aktif bölgeyi korumak için birkaç yöntem vardır. Bunlar:

- a) Kovalent bağlama süresince yarışmalı inhibitör veya substrat varlığı
- b) Tersinir kovalent bağlanmış enzim-inhibitör kompleksi oluşumu
- c) Kimyasal olarak modifiye edilerek matris ile kovalent bağ yapabilecek yeni gruplar kazandırılmış enzim
- d) Zimojen ön belirteci (Kennedy 1995).

— Çapraz Bağlanma

Enzimlerin serbest amin ve karboksil gruplarıyla çok fonksiyonlu maddelerin kovalent bağlarla üç boyutlu çapraz bağlanarak enzim kümeleri oluşturmasıdır. Bu yöntemde enzimleri birbirine bağlamak amacıyla glutaraldehit, diazobenzidin gibi maddeler kullanılır. Enzimlerin çapraz bağlanması kolay olmasına rağmen, enzimin üzerindeki fonksiyonel gruplarla özel bağ yapan çapraz bağlama maddesinin seçimi zordur ve genellikle deneysel olarak belirlenir. Bağlanma sırasında, enzimin aktivitesini kaybetme olasılığı, reaksiyon kontrolünün zorluğu gibi faktörler de göz önünde bulundurulmalıdır.

B. Fiziksel yöntemler

— Adsorbsiyon

Adsorbsiyon, fiziksel adsorbsiyon ve iyonik adsorbsiyon olmak üzere iki türdür.

Fiziksel Adsorbsiyon

İmmobilizasyon için kullanılan en basit yöntemdir. Yöntem; yüzey aktif suda çözünmeyen bir adsorbanın, enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Bu yöntemin avantajı destek materyalinin pH, sıcaklık gibi etkiler sonunda tekrar kullanılabilmesidir. Sıcaklık ve zaman adsorpsiyonda önemli iki parametredir. Özellikle gözenekli taşıyıcılarda difüzyon önemli bir faktördür.

Eşdağılımlı enzim bağlayabilmek için kullanılan son teknik; karıştırmalı veya çalkalamalı bir banyoda, taşıyıcının enzim çözeltisine konulması ve karıştırılması veya sürekli çalkalanması ile gerçekleştirilir.

Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan Van der Waals kuvvetleridir. Adsorbanlar çok değişik türde olmakla birlikte iyi bir adsorpsiyon sağlayabilmek için genellikle adsorbanın bir ön işlemden geçirilmesi gerekmektedir. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan adsorbanlar; aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, CaCO₃, kül, kollodyum, silikajel, bentonit, hidrosiapatit, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır (Telefoncu 1986).

Adsorplanan enzimin aktif merkezi bu olaydan etkilenmez, enzim serbest haldeki aktifliğini korur. Ancak enzim, bağlanmada rol oynayan kuvvetlerin zayıf olması nedeniyle desorpsiyona uğrar. Bu nedenle yöntem dayanıksızdır.

Fiziksel adsorpsiyonda oluşan bağlardaki zayıflık nedeniyle kullanım sırasında desorpsiyon gerçekleşmektedir. Bu, aktivite kaybına ve üründe kirliliğe yol açabilmektedir. Yüksek tuz ya da substrat derişimleri enzim desorpsiyon hızını artırmaktadır. Özellikle küçük derişim aralıklarında aktivite gösterebilen bazı enzimler için dezavantajdır (Kennedy 1995).

İyonik Adsorbsiyon

Bu yöntemde, enzim molekülleri katı desteğin içerdiği iyon değıştirici kalıntılar ile iyonik bağ oluştururlar. İyonik bağlamada genellikle organik desteklerden yapılan iyon değıştirici reçineler kullanılır. İyonik bağlama ve fiziksel adsorpsiyon arasındaki temel fark enzim ile taşıyıcı arasındaki bağın, iyonik bağlamada çok daha kuvvetli olmasıdır. Bu şekilde enzimin katıya bağlanması fiziksel adsorbsiyondan daha güçlü bir bağlanmadır. İyonik bağlama çok ılıman koşullarda gerçekleştiğinden enzimin yapısında değışikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile destek arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçıışı söz konusudur.

— Hapsetme

Enzimin, substratın ulaşabileceği bir polimer ya da membran içinde fiziksel olarak alıkonması yöntemidir. Bu yöntem diğer tutuklama yöntemlerine göre, daha küçük substrat ve ürün molekülleri için uygundur.

Enzim bulunduğu ortamdan dışarı çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebildiği gibi yarı geçirgen membranlar içinde de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemde enzim molekülleri ile fiziksel veya kimyasal bağlanma söz konusu değildir.

Jel içerisine hapsetme

Jelde hapsetme yöntemi, çapraz bağlanmış suda çözünmeyen bir polimer zarın boşlukları içerisine enzimin hapsedilmesidir. İlk uygulamaları poliakrilamid jel içerisine tripsin, papain, β -amilaz ve D-fruktoz bifosfat aldolaz enzimleri ile Bernfeld ve Wan tarafından 1963 de yapılmıştır (Kennedy 1995).

Polimer Matrikste Hapsetme

Hapsetme işlemi için poliakrilamid, agar, Ca-aljinat gibi polimerler matriks olarak kullanılır. Matriks tanecik, membran veya ipliksi yapıda olabilir. Bu yöntem için, enzim çözeltisi polimer çözeltisiyle polimerleşmeden önce karıştırılır. Polimerleşme esnasında enzim molekülleri polimere bağlanmaz ama fiziksel olarak polimerin içinde kalır. Sıvı polimer-enzim karışımı ya uygun kalıplar kullanılarak, ya da uygun çaptaki deliklerden akıtılarak şekilli tanecikler haline getirilir. Molekül kütlesi 15000'den fazla olan enzimler bu amaçla kullanılır.

Membranda hapsedme

Bu yöntemde enzim membranla sarılmıştır. Enzim kimyasal bir bağlanma yapmaz. Naylon, selüloz, polisülfon, poliakrilat yaygın olarak kullanılan membranlardır.

Membranda hapsedme yönteminin özel bir şekli mikrokapsüllemidir. Enzim çözeltisinin yarıçapı 1-100 µm olan yarı geçirgen polimer membranla çevrelenerek hapsedilmesi yöntemidir. Enzimler fiziksel olarak substrat ve ürünlerin kolayca difüzlenebileceği bir membranla çevrilir. Substratla enzimin bu yöntemde etkileşme oranı büyüktür. Hapsedme yönteminin avantajları şöyle sıralanabilir; işlemin kolay uygulanması, çok az miktar enzimle çalışılabilmesi, suda çözünmeyen taşıyıcılar kullanılması.

Enzimin hapsedildiği koşulların kontrol edilememesi nedeniyle enzimin aktiflik ve kararlılığının azalması ve difüzyon engellerinin bulunması gibi olumsuz faktörler de yer almaktadır.

1.5.2. İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması

İmmobilizasyon yönteminin seçiminde: güvenilirlik, maliyet, aktivitenin korunması ve kararlılık gibi dört ana özellik göz önüne alınmalıdır. Bir enzimin immobilizasyonu için değişik yöntemler kullanılabilir. Bunların içinde enzimatik aktivitenin en yüksek düzeyde korunduğu yöntemin seçilmesi önemlidir (Telefoncu 1986).

Tablo 1.4 ve Tablo 1.5’te sırasıyla immobilizasyon yöntemlerinin ve serbest ve immobilize enzim özelliklerinin karşılaştırılması verilmiştir.

Tablo 1.4. İmmobilizasyon Yönteminin Karşılaştırılması (Telefoncu 1986).

Karakteristik	Kovalent Bağlama	Adsorbsiyon	İyonik Bağlama	Çapraz Bağlama Yöntemi	Tutuklama Yöntemi
Hazırlama	Zor	Kolay	Kolay	Zor	Zor
Enzim aktivitesi	Yüksek	Düşük	Yüksek	Orta	Yüksek
Substrat Spesifikliğı	Değişebilir	Değişmez	Değişmez	Değişebilir	Değişmez
Rejenerasyon	Mümkün Değil	Mümkün	Mümkün	Mümkün Değil	Mümkün Değil
Uygulanabilirlik	Orta	Düşük	Orta	Düşük	Yüksek
İmmobilizasyon Maliyeti	Yüksek	Düşük	Düşük	Orta	Düşük
Bağ Gücü	Kuvvetli	Zayıf	Orta	Kuvvetli	Kuvvetli

Tablo 1.5. Serbest ve immobilize enzim özelliklerinin karşılaştırılması (Karaca 2006)

Serbest Enzim	İmmobilize Enzim
1. Reaksiyon sonunda ortamdan uzaklaştırılması güçtür	1. Süzme ve santrifüjleme gibi basit yöntemlerle ortamdan kolayca ayrılır
2. Ürünlerde az da olsa kirlilik yapar	2. Tamamen ayrıldığından ürünlerde kirlilik söz konusu olamaz
3. Çevre koşullarından daha kolay etkilenirler	3. Çevre koşullarına daha dayanıklıdır
4. Her örnek bir kere ve kısa süre kullanılır	4. Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir
5. Kararsız ve dayanıksızdır	5. Daha dayanıklı ve kararlıdır
6. Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlarda kullanılamaz	6. Çok adımlı reaksiyonlara uygundur
7. Aktivitesini çabuk kaybeder	7. Bazı immobilizasyon yöntemleri aktiviteyi artırır
8. Kendi kendini parçalayabilir	8. Kendi kendini parçalama (otokataliz) minimumuma indirgenir

1.6. Adsorbsiyon

Atom, iyon ya da moleküllerin bir katı yüzeyinde tutunmasına adsorbsiyon denir. Katıya adsorblayıcı, katı yüzeyinde tutunan maddeye ise adsorblanan denilmektedir. Tutunan taneciklerin yüzeyden ayrılmasına desorpsiyon denir.

Sabit sıcaklık ve sabit basınçta adsorbsiyon kendiliğinden olduğunda, adsorbsiyon serbest enerjisi ΔG° daima eksi işaretlidir. ΔH° 'nın pozitif değerleri adsorpsiyon işleminin endotermik olduğunu gösterir. Diğer taraftan, gaz ya da sıvı ortamında daha düzensiz olan tanecikler katı yüzeyinde tutunarak daha düzenli hale geldiğinden dolayı adsorbsiyon sırasında entropi değişimi ΔS° daima eksi işaretlidir.

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (1.3)$$

Burada;

ΔG° : Serbest enerjideki değişim, kJ/mol

ΔH° : Entalpi değişimi, kJ/mol

ΔS° : Entropi değişimi, J/K.mol

Adsorbsiyon ısı; adsorbsiyon olayının ekzotermik oluşundan yani ısı vermesinden kaynaklanır. Adsorbsiyon ısı, katı yüzeyindeki doymamış kuvvetlerle adsorblanan tanecikler arasındaki etkileşimlerden doğmaktadır.

Adsorbsiyon ısı -20 kJ/mol civarında olan etkileşimler sonundaki tutunmalara fiziksel adsorbsiyon denir. -200 kJ/mol ya da daha fazla ise kimyasal adsorbsiyon denir. Fiziksel adsorbsiyon esnasında; atom, molekül ya da iyon şeklinde olabilen adsorblanan tanecikler ile katı yüzeyi arasında Van der Waals çekim kuvvetleri etkindir.

Adsorbsiyon bir ya da çok tabakalı olabilir. Kimyasal adsorbsiyonda taneciklerle yüzey arasında bir kimyasal bağ oluşur. Oluşan bu bağ genellikle kovalent bağlıdır. Kimyasal adsorbsiyon tek tabakalıdır (monomoleküler). Molekül adsorblayıcı yüzeyine doğru çekilirken önce fiziksel adsorbsiyonun gerçekleştiği bir ara hal oluşur. Bu esnada açığa çıkan ısı ΔH_f , fiziksel adsorbsiyon ısısına eşittir.

Fiziksel olarak adsorblanmış moleküller, yüzeye daha da yaklaştığında kimyasal adsorbsiyon gerçekleştiğinden potansiyel enerji büyük ölçüde düşmektedir. Adsorbsiyon sırasında molekül parçalanarak katı yüzey ile kimyasal tepkimeye girmektedir (Gürses ve Bayrakçeken 1996).

1.6.1. Adsorbsiyonu Etkileyen Faktörler

- Adsorplanacak maddenin molekül yapısı
- Adsorplanacak maddenin sudaki çözünürlüğü,
- Moleküle bağlı grupların yerleri,
- Adsorban yüzey alanı, gözeneklerin yapısı ve gözenek büyüklüğünün dağılımı,
- Tanecik büyüklüğü,
- Temas süresi,
- Ortamdaki diğer çözünmüş maddeler,
- pH,
- Sıcaklık'tır.

Hidrojen ve hidroksil iyonları kuvvetle adsorplandıklarından, diğer iyonların adsorbsiyonu çözeltinin pH'ından etkilenmektedir. Asidik ve bazik bileşiklerin iyonlaşma dereceleri, adsorbsiyonu etkilemekte ve adsorbsiyon işleminde farklı iyonların farklı pH değerlerinde adsorplama kapasiteleri farklı olmaktadır. Katyonik metal iyonlarının adsorplanması ancak özel pH değerlerinde önemli olurken, anyonik iyonların adsorbsiyonu ise daha ziyade düşük pH değerlerinde gerçekleşmektedir.

Adsorbsiyon işleminde sıcaklık önemli parametrelerin ikincisi olup adsorbsiyonun tipini karakterize etmektedir. Adsorbsiyon işlemi genellikle ekzotermik karakterde olduğu için adsorbsiyonun büyüklüğü azalan sıcaklık ile genellikle artmaktadır. Fiziksel adsorbsiyon için, entalpideki değişimlerin yoğunlaşma veya kristalizasyon reaksiyonları derecesinde olduğu bilinmektedir. Bu

nedenle sıcaklıktaki küçük değişimlerin, adsorbsiyon işleminde anlamlı bir değişim oluşturmayaacağı söylenebilmektedir.

1.6.2. Adsorbsiyon Türleri

Üç tip adsorbsiyon çeşidi vardır:

- ✓ Fiziksel
- ✓ Kimyasal
- ✓ Değişim (İyon değişimi gibi)

Fiziksel adsorbsiyonda Van der Waals kuvvetleri adsorbat ile adsorban arasındaki bağlantıyı sağlar. Adsorbanın yüzeyinde adsorbat birikir ve gevşek bir tabaka oluşturur. Proses esnasında açığa çıkan ısı 2-5 kcal/mol'dür. Burada bir aktivasyon enerjisi mevcut değildir, ancak elektostatik kuvvetler aracılık etmektedir. Fiziksel adsorbsiyon genellikle tersinirdir.

Kimyasal adsorbsiyonda adsorban ve adsorbat arasında kimyasal bağlanma olur. Genellikle adsorbat yüzey üzerinde bir molekül kalınlığında bir tabaka oluşturur, moleküller yüzey üzerinde hareket etmezler. Adsorban yüzeyinin tamamı bu monomoleküler tabaka ile kaplandığında, adsorbanın adsorplama kapasitesi bitmiş olur. Bu tür adsorbsiyon çok nadir olarak geri dönüşümlüdür (tersinmez). Açığa çıkan aktivasyon enerjisi 10-50 kcal/mol'dür. Bu nedenle yüksek sıcaklıkta kimyasal adsorbsiyon daha hızlı gerçekleşir. Bununla beraber oluşan bağlar fiziksel adsorbsiyondaki bağlardan kuvvetlidir.

Kimyasal adsorbsiyon, yalnızca bir tabakalı olabildiği halde, fiziksel adsorbsiyon bir tabakalı veya çok tabakalı olabilir. Fiziksel adsorbsiyon genellikle tersinir bir olaydır. İşlem şartlarının (derişim, P, T vb.) değiştirilmesi ile desorpsiyon meydana gelirken kimyasal adsorbsiyon, kuvvetli bağ oluşumu söz konusu olduğu için tersinmez bir işlemdir. Fiziksel adsorbsiyon genellikle sıcaklık yükseltilmesi ile azaldığı halde, kimyasal adsorbsiyon, adsorbsiyonun ekzotermik veya endotermik

olmasına ve aktivasyon enerjisine bağı olarak sıcaklık yükseltilmesi ile artış veya azalma gösterebilir (Smith 1981).

Değişim (iyon değişimi) adsorbsiyonu, adsorbat ile yüzey arasındaki çekim ile olmaktadır. Burada, zıt elektrik yüklerine sahip olan adsorbat ile adsorban yüzeyinin birbirlerini çekmesi önem kazanmaktadır. Küçük çaplı ve elektrik yükü fazla olan iyonlar daha iyi adsorbe olurlar. Birçok fiziksel, kimyasal ve biyolojik sistemlerde adsorbsiyon olayı tercih edilmektedir.

1.6.3. Adsorban ve Adsorbat Özellikleri

Adsorbsiyon işleminde tutulan maddeye adsorbat denilmektedir. Adsorbat'ın özellikleri, adsorbsiyonun hızı ve karakteristiğini belirlemede önemli rol oynar. Adsorbsiyonun büyüklüğü suda çözülmüş olan maddenin sudaki çözünürlüğü ile yakından ilgilidir. Suda az çözünen maddelerin adsorplanması daha az gerçekleşir. Yapısında hidrofilik ve hidrofobik gruplar içeren moleküllerde, molekülün hidrofobik ucu yüzeye tutunma eğilimi gösterecektir Ayrıca molekülün boyutu da adsorbsiyonu olumsuz etkileyen faktörlerdendir.

Adsorbsiyonun büyüklüğü, toplam yüzey alanının adsorbsiyon için uygun olarak tanımlanan özgül yüzey alanı ile doğru orantılıdır. Adsorbsiyon işleminde adsorblayan katıya adsorban denilmektedir. Gözenekli veya parçacıklı bir yapının sonucu olarak adsorbanın geniş bir yüzey alanına sahip olması tercih edilir (Şahan 2007).

1.6.4 Adsorbsiyon Isısı

Adsorbsiyon ısısı adsorplanan maddenin buharlaşma ısısı ile kıyaslanabilir bir değerdedir. Adsorbsiyon sıcaklıkla ters orantılıdır yani sıcaklığın artması adsorbsiyon miktarını önemli derecede azaltır. Eğer adsorplanan moleküller, yüzeyle kimyasal reaksiyona giriyorsa yani kimyasal bağlar oluşturuyorsa bu tür adsorbsiyon

kimyasal adsorbsiyon olarak adlandırılır. Kimyasal adsorbsiyonda bazı kimyasal bağlar kopar ve bazı yeni bağlar oluşur. Bu nedenle adsorbsiyon ısısı kimyasal reaksiyonlarınki ile kıyaslanabilir büyüklüktedir ve genelde bir kaç kilokaloriden 100 kilokaloriye kadar olabilir. Kimyasal adsorbsiyon hızı sıcaklıkla artar. Bu halde adsorplanmış tabaka mono moleküler bir tabakadır. Ayrıca; birçok durumda, kimyasal adsorbsiyon katının bütün yüzeyinde değil aktif merkez denilen bazı merkezlerde meydana gelir.

1.6.5. Adsorbsiyon Kinetiği

Adsorbsiyon kinetiğinin anlaşılması ile etkin adsorbat-adsorban temas süresi (alıkonma süresi) bulunur. Bir çözeltideki adsorbsiyon dört temel basamakta gerçekleşmektedir (Sawyer ve Mccarty 1978):

1. Film tabakası difüzyonu; Adsorbsiyon düzeneğinde belirli bir hareketlilik (karıştırma) olduğu için bu basamak çoğunlukla ihmal edilir.
2. Sınır tabakası difüzyonu: Adsorbat çözelti içinden adsorbanın gözeneklerine (yüzey sınır tabakasına) doğru ilerler.
3. Parçacık içi difüzyon; Adsorbat adsorbanın gözenek boşluklarına hareket ederek adsorbsiyonun meydana geleceği yüzeye doğru ilerler.
4. Sorpsiyon; adsorbatın adsorbanın gözenek yüzeyinde tutunmasıdır.

Adsorbanın bulunduğu faz hareketsiz ise, birinci basamak en yavaş ve adsorbsiyon hızını belirleyen basamak olmaktadır. Bu nedenle, eğer akışkan hareket ettirilirse, yüzey tabakasının kalınlığı azalacağı için adsorbsiyon hızı artacaktır. Son basamak ölçülemeyecek kadar hızlı olduğundan ve ilk basamak da iyi bir karıştırma olduğu düşünülerek adsorbsiyon hızına aksi bir etki yapmayacakları için 2. ve 3. basamaklar hız belirleyicidir (Chu ve Chen 2002, Keskinan ve ark. 2003). Sınır tabakası difüzyonu adsorbsiyon işleminin ilk birkaç dakikasında etkili olmaktadır, ama parçacık içi difüzyon ise daha fazla zaman almaktadır. Bu nedenle parçacık içi difüzyonun hız belirleyici ana basamak olduğu bildirilmektedir (Basibuyuk ve Forster 2003, Şahan 2007).

1.6.6. Adsorbsiyon İzotermi

Adsorplayıcı ve adsorplanan yanında sıcaklık da sabit tutulduğunda gaz fazından adsorpsiyon yalnızca basınçla, çözülden adsorpsiyon ise yalnızca derişime bağlıdır. Bu durumda, adsorplanan madde miktarının basınçla ya da derişimle değişimini veren çizgilere adsorpsiyon izotermi denir.

Adsorbsiyon, adsorban yüzeyinde biriken madde konsantrasyonu ve çözülden kalan madde konsantrasyonu arasında bir denge sağlanıncaya kadar devam eder. Adsorbsiyon dengesi kurulduktan sonra adsorbsiyon miktarında ve çözülden konsantrasyonunda bir değişiklik olmaz. Adsorbsiyon izotermi adsorplanan madde konsantrasyonu ile değişim gösteren fonksiyonlardır. Denge izotermi modellerin oluşturulmasında ve adsorbsiyon sistemlerinin tasarlanmasında çok önemli bir rol oynamaktadır.

Belli şartlardaki izoterm bir modele uyarken başka şartlarda aynı modele uymamaktadır. Genelde uygulanabilir tek bir model bulunmamaktadır. Bulunan modellerde bazı varsayımlar yapılarak yeni modeller geliştirilebilir. Günümüzdeki çalışmalar genellikle belirlenmiş modeller kullanılarak, bu modeller yardımıyla adsorban veya adsorplanan maddenin (adsorbat) değiştirilmesi üzerinedir. (Ng ve ark. 2003, Wong ve ark. 2004, Aksu ve Yener 2001, Aksu ve ark. 1999, Pehlivan ve ark. 2006). En genel kullanım gören izotermi Langmuir ve Freundlich denklemleridir.

1.6.6.1. Langmuir Adsorbsiyon İzotermi

Bu izoterm, Irving Langmuir (1918) tarafından bir takım varsayımlar yapılarak geliştirilmiştir:

- a. Adsorpsiyon yüzeyde tek bir tabaka (monomoleküler) üzerinde gerçekleşir.
- b. Adsorpsiyon dengesi dinamik bir dengedir yani belli bir zaman aralığında adsorplanan madde miktarı katı yüzeyden ayrılan madde miktarına eşittir.

- c. Adsorpsiyon hızı, sıvının konsantrasyonu ve katının örtülmemiş yüzeyiyle orantılıdır.
- d. Adsorbanın bütün yüzeyi adsorpsiyon için aynı aktiviteye sahip kabul edilir, aslında yüzeyde bazı alanlar aktif olup ortalama aktivite kullanılır.
- e. Adsorplanan moleküller arasında girişim yoktur.

Langmuir adsorpsiyon izotermi çoğunlukla fiziksel adsorpsiyon verilerine daha çok uyum sağlamaktadır.

Langmuir izoterminde adsorbsiyon, adsorbat başlangıç konsantrasyonu ile birlikte lineer olarak artar. Maksimum doyma noktasında, yüzey tek tabaka ile kaplanmakta ve yüzeye adsorbe olmuş adsorbat miktarı sabit kalmaktadır. Langmuir izotermine adsorbsiyon enerjisi tekdüzedir. Adsorbsiyon hızı adsorbat konsantrasyonu ve yüzey üzerinde bulunan boş adsorbsiyon alanları ile doğru orantılıdır. Desorpsiyon hızı ise yüzeydeki adsorplanmış molekül sayısı ile doğru orantılıdır.

Langmuir eşitliği şu şekilde gösterilmektedir:

$$q_e = \frac{Q_{mak} a_L C_e}{1 + a_L C_e} \quad (1.4)$$

C_e : Adsorbsiyon sonrası çözeltide kalan maddenin konsantrasyonu (mg/L)

q_e : Birim adsorban üzerinde adsorplanan madde miktarı (mg/g)

K_L : Adsorbatın adsorplanma kapasitesine bağlı olan sabit (L/g)

a_L : Adsorbsiyon enerjisine bağlı olan sabit (L/mg)

Q_{max} : Adsorbanın maksimum adsorplama kapasitesi (mg/g)

$$q_e = \frac{K_L C_e}{1 + a_L C_e} \quad (1.5)$$

Langmuir eşitliğini lineer formda yazacak olursak

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L} + \left(\frac{a_L}{K_L} \right) C_e \quad (1.6)$$

Burada C_e/q_e değerinin, C_e değerine göre değişiminin grafiği çizilmesiyle elde edilen doğrunun eğimi ve kesim noktası sırasıyla a_L/K_L ve $1/K_L$ sabitlerinin değerini verecektir. Q_{\max} (K_L/a_L) tek tabakalı adsorban kapasitesini göstermekle birlikte adsorbanın maksimum adsorplama kapasitesini temsil eder. Özellikle tek tabakalı adsorbsiyonun meydana geldiği heterojen adsorbsiyon sistemlerinde bu izoterm denge durumunu net olarak açıklayamaz. Langmuir izotermi homojen bir adsorbsiyon olduğu için her molekülün aktivasyon enerjisi uniformdur.

Adsorbsiyonun elverişliliğini bulmak için boyutsuz R_L (dağılma) sabiti hesaplanır (eşitlik 1.7) ve bu sabitin 0 ile 1 arasında değerler alması (Tablo 1.6) elverişlilik durumunun sağlandığına işaret eder (Aksu ve Yener 2001, Basibuyuk ve Forster 2003, Ho ve Wang 2004, Bayat 2002).

$$R_L = \frac{1}{1 + bC_0} \quad (1.7)$$

$$b = a_L$$

b : Langmuir sabiti (L/mg)

C_0 : Maddenin çözültideki başlangıç derişimi (mg/L)

Tablo 1.6. R_L (dağılma) değerleri ve izoterm tipleri

R_L Değerleri	İzoterm Tipi
$R_L > 1$	Elverişli Olmayan
$R_L = 1$	Lineer
$0 < R_L < 1$	Elverişli
$R_L = 0$	Tersinmez

1.6.6.2. Freundlich Adsorbsiyon İzotermi

Freundlich adsorbsiyon izotermi, adsorbsiyon olayını tanımlayan basit bir denklem geliştirmiştir. Freundlich' e göre bir adsorban yüzeyi üzerinde bulunan adsorbsiyon alanları heterojendir yani farklı türdeki adsorbsiyon alanlarından oluşmuştur. (Moon ve Lee 1983, Al-Duri ve Mckay 1988, Mckay ve ark. 1980, Pehlivan ve Arslan 2007). Freundlich izoterminde, Langmuir izoterminden yola çıkılarak, bazı varsayımlar ve türetmeler yapılarak bu eşitlik elde edilmiştir. Bu eşitlik Langmuir eşitliğinden farklı olarak düşük konsantrasyonlarda Henry kanununu uygulamaz ve dengeden sonra tam sabit bir adsorbat değeri elde edilemez. Bu izotermin en büyük dezavantajıdır. Freundlich, çözeltilerin adsorbsiyonunu açıklamak için eşitlik 1.8'i türetmiştir ;

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}} \quad (1.8)$$

C_e : Adsorbsiyon sonrası çözeltide kalan maddenin konsantrasyonu (mg/L)

q_e : Birim adsorban üzerinde adsorplanan madde miktarı (mg/g)

K_F : Deneysel olarak hesaplanır. Adsorbsiyon kapasitesi (L/g)

n : Adsorbsiyon yoğunluğu (birimsiz)

Freundlich izoterminde eşitlik 1.8'in her iki tarafının logaritması alınarak lineer hale getirilir (Eşitlik 1.9).

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (1.9)$$

$\log q_e$ 'nin $\log C_e$ 'ye göre değişiminin grafiğe dökülmesiyle K_F ve n sabitleri bulunur. Grafikten elde edilen doğrunun y eksenini kesim noktası $\log K_F$ 'yi ve eğimi de $1/n$ 'i verir. $n > 1$ değeri adsorbsiyon işleminin elverişli olduğunu göstermektedir (Chiou ve Li 2002).

Bir adsorbsiyonun hangi izotermle daha iyi açıklandığının bulunması için deneysel olarak elde edilen veriler tüm izoterm denklemlerine uygulanıp grafiğe dökülür. Verilerin doğrusal bir grafik oluşturduğu (korelasyon katsayısının bulunmasına yardımcı olur) izoterm çeşidi o adsorbsiyon için en uygun olanıdır. Ama adsorbsiyon bir veya daha fazla izoterme de uygun olabilmektedir (Şahan 2007).

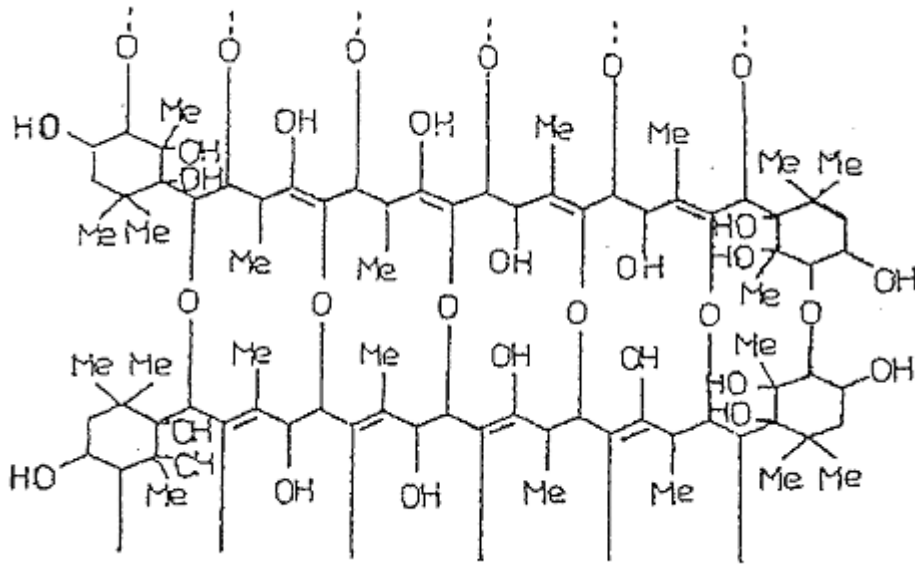
1.7. Sporopollenin

Sporopollenin birçok polen taneciklerinin ve mikro sporların dış yüzeyini oluşturan maddedir. Doğal bir madde olup dış etkilere karşı büyük bir dirence sahiptir. Sporopollenin spor kaynaklarının dış kısmında kalan zarar görmemiş hücre zarlarında olduğu gibi 500 milyon yıldan beri eskimiş tortular içerisinde yaşayan canlılardan meydana gelen fiziksel ve kimyasal dayanıklılığa sahip maddelerdir. Bu canlıların selülozdan meydana gelen intine ismi verilen iç katmanları boşalmıştır. Sporopollenin tabii olarak bitki duvarlarında bulunmaktadır. Spor duvarları hücrenin iç kısımlarını çevreleyen iç içe geçmiş iki ana duvardan oluşmuştur. Hücrenin iç duvarları selülozdan oluşan protein polisakkaritlerden meydana gelmiştir. Daha dıştaki duvarlar ise exine adı verilen sporopollenini oluşturan maddelerdir (Pehlivan 1991).

Sporopolleninin belli bir özelliği spor büyüklüğünün tanecikten taneciğe değişmemesidir. *Lycopodium clavatum* sporları 25 mikronluk bir çapa sahip olup düzgün bir yapıdadır. Sporopolleninin polen ve hücre duvarlarında mevcut olan kimyasal maddelerden meydana gelmiştir. *Lycopodium clavatum* yurdumuzda Trabzon A7 bölgesinde bulunan dağlık arazideki eğrelti otları familyasından olan kurt pençesi, kurt ayağı bitkilerinden elde edilebilir.

Brooks (1971) yılında sporopolleninin çok yüksek bir dirence sahip kimyasal madde olduğunu ve spor duvarlarını teşkil eden exosproim içerisinde olduğunu ileri sürmüştür (Pehlivan 1991).

Sporopollenin *Lycopodium clavatum*' dan elde edilen karbon, hidrojen ve oksijen ihtiva eden $C_{90}H_{144}O_{27}$ şeklinde bir stokiyometriye sahip kimyasal maddedir. Yapılan deneyler sporopolleninin karotenoidlerin oksitleyici polimerleşmesinden elde edildiğini göstermiştir.



Şekil 1.10. Sporopolleninin Karotenoidlerden Türetilmiş Yapısı (Pehlivan 1991).

Yapılan çalışmalarda sporopollenin karoteneoitlerin oksidatif polimerizasyonunun enzimatik olarak kontrol edilmesiyle üretildiğini ve aromatik çapraz bağlı kararlı bir yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. Sporopollenin organik ve sulu çözücüler içerisinde şişmeyen organik bir maddedir.

Sporopollenin'in Tercih Edilmesindeki Sebepler

Bu çalışmada sporopollenin'in tercih edilmesindeki sebepler şunlardır;

- i. Elde Edilebilirliği: Tabii olarak bitkilerde mevcut olmasından dolayı kolayca elde edilebilir ve pahalı değildir.

- ii. Kimyasal Kararlılığı: Sporopollenin büyük bir kimyasal kararlılığa sahip olup, çeşitli çözücülerle reaksiyona sokulduğunda bir çözünme görülmemiştir.
- iii. Fiziksel ve Isı Yönünden Kararlılığı: Sporopollenin fiziksel ve ısı yönünden kararlılığa sahip olan büyük molekül ağırlıklı çapraz bağlarla bağlı tabii bir polimerdir.
- iv. Tanecik Büyüklüğü: Sporopollenin 25 mikron çapında sabit çok ince tanecikli homojen bir yapıya sahiptir. Bu sabit mesh büyüklüğü sporopolleninin önemini artırır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Lipaz enzimi ilk olarak 1956 yılında H. Brandenberger tarafından kovalent bağlama yöntemi ile iyon değiştirici reçine üzerine immobilize edilmiş, ancak lipazın ester hidrolizinde veya ester sentezinde kullanılması ile ilgili uygulamaya yönelik çalışmalar Iwai ve arkadaşlarının (1964) çalışmalarıyla başlamıştır. Daha sonra lipaz enzimi farklı destekler üzerine tutturulmuş ve çeşitli özellikleri araştırılmıştır.

Literatürde farklı destek materyalleri kullanılarak lipaz immobilizasyonuna yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Pronk ve ark. (1988), yaptıkları bir çalışmada oyuklu elyaf zar üzerine *Candida rugosa* lipazını immobilize etmişler, kesikli ve sürekli üretim işlemlerindeki hidrolitik etkilerini incelemişlerdir. Immobilize enzimin 30°C’de en yüksek kararlılık gösterdiği ve 30°C’deki yarı ömrün 43 gün olduğu sonucuna varmışlardır.

Gillies ve ark. (1987), silikajel üzerine *Candida cylindracea* lipazını adsorplama yöntemi ile tutturarak n- heptan ve n- hekzan içeren substrat ortamlarında kokulu ester sentezi için kullanmışlardır. Söz konusu çalışma sonuçları substrat konsantrasyonunun arttırılmasının aktiviteyi bir miktar yükselttiğini; fakat tekrar kullanımlarda enzimin kararlılığını kaybettiğini göstermiştir. Immobilize enzim için optimum sıcaklığın 20°C ile 30°C arasında olduğunu ve daha yüksek sıcaklıklarda enzimin aktivitesinin düştüğü görülmüştür.

Shaw ve ark. (1990), lipazı polivinil klorür (PVC), kitosan, kitin, agaroz, sefaroze ve trisakril olmak üzere altı değişik katı desteğe immobilize etmişler ve immobilizasyondan sonra optimum pH’nın 7,5’den 8,5’a yükseldiğini ve optimum sıcaklığın da 35°C’den 45-55°C’ye yükseldiğini bulmuşlardır. PVC üzerine immobilize edilen enzimin ısıl kararlılığının daha yüksek olduğunu ve yarı ömrünün 30°C’de 400 saat olduğunu saptamışlardır.

Sağiroğlu ve ark. (2004), farklı destek maddeleri (Celite ve Amberlite IRA-938) üzerine *Candida cylindracea* lipazı ve domuz pankreatik lipazını immobilize ederek, serbest ve immobilize enzimin kinetik özelliklerini incelemişlerdir.

Yapılan diğer bir çalışmada, Akova ve ark. (1996), hint tohumu lipazını Celite 535 adsorbanına adsorpsiyon yöntemi ile immobilize etmişler ve farklı pH, sıcaklık

ve çözücü ortamında deneyerek en yüksek aktivite gösterdiği koşulları tespit etmişlerdir.

Chiou ve Wu (2004), *Candida rugosa* lipazını kitosan üzerine kovalent bağlama ile immobilize ederek, immobilize enzimin kinetik özelliklerini değiştirdiğini öne sürmüşlerdir.

Penreac'h ve Baratti (1999), polipropilen destek üzerine *Burkholderia cepacia* lipazını immobilize etmişler ve organik ortamda serbest enzim ile immobilize enzimin biyokatalitik özelliklerini karşılaştırmışlardır. İki lipazın da n-heptandaki p-nitrofenil esterlerinin hidrolizleme hızını kütle transfer ile ayırt etmişlerdir.

Farklı bir çalışmada, Ivanov ve Schneider (1997), *Pseudomonas fluorescens* lipazını beş farklı destek materyaline (celite, oktil-silika, aminopropil-silika, glutardialdehit ile aktive edilmiş silika ve Eupergit-C250L) immobilize ederek tasarlanan immobilize sistemlerin işlem kararlılıklarını ve aktivitelerini karşılaştırmışlardır. Çalışmada, en iyi işlem kararlılığı gösteren Eupergit-C250L'in birbirini izleyen 11 döngü sonunda başlangıç aktivitesinin %30'unu koruduğu gösterilmiştir.

Xu ve ark., (2005) lipaz immobilizasyonunda kullanılmak üzere geliştirilen kitosan bağlı poli(akrilonitril-co-maleik asit) hollow fiber membranları hazırlamışlardır. Bu çalışmada biyomimetik bir membran destek materyali hazırlanmış ve lipaz bağlama oranı $66,5 \text{ mg/m}^2$ olarak saptanmıştır. Fuentes ve ark. (2001), *Rhizomucor miehei* ve *Candida cylindracea* lipazlarını üç farklı polisilikat yapı üzerine (sepiolite, palygorskite, montmorillonite) immobilize etmişler ve ticari olarak kullanılan bir destek materyali olan Duolite-A 568 reçinesiyle geliştirdikleri immobilizasyon yöntemlerinin aktivitelerini karşılaştırmışlardır. Ölçülen aktivite ve seçicilik sonuçları, biyodönüşümlerde sıklıkla kullanılan, göreceli olarak düşük mol kütleli proteinlerin immobilizasyonu için sepiolite ve palygorskitin destek materyali olarak kullanılabilirliğini göstermiştir.

Panzavolta ve ark. (2005), hidrofobik polifenil asetilen polimerine *Candida rugosa* lipazı immobilize etmişlerdir. Immobilize enzim serbest enzime göre sıcaklık değişimlerine, pH değişimlerine ve organik çözücülere yüksek kararlılık gösterdiği çalışmada rapor edilmiştir.

Diğer bir çalışmada RD. Vecchia ve ark. (2005), 10 farklı kaynaktan lipaz enzimini karboksi metil selüloz, polivinil alkol ve karboksi metil selüloz/polivinil alkol sistemlerine immobilize ederek, organik ortamda n-pentanol ile laurik asidin esterifikasyonunda kullanmışlardır. Optimum sıcaklığın 37°C olduğu, 0,5 g destek materyali üzerine 50 mg enzimin tutulduğu çalışmada rapor edilmiştir. Aynı çalışmada 80 günlük bir depolama sürecinde immobilize enzimlerin aktivitesinde ve makroskobik özelliklerinde herhangi bir kaybın söz konusu olmadığı da belirtilmiştir.

Hidrofobik grup içeren poli(2-hidroksietilmetakrilat) temelli membran matrislerine lipazın kovalent immobilizasyonu Bayramoğlu ve ark. (2002) tarafından çalışılmıştır. Bu çalışmada 20 döngü sonunda enzim aktivitesinin %37 azaldığı saptanmış, buna ek olarak 60°C'de ısı kararlılık denemeleri gerçekleştirilerek, immobilize ve serbest lipaz preparatları için ısı kararlılık sabitleri sırasıyla, $1,1 \times 10^{-1}$ ve $1,2 \times 10^{-2}$ olarak hesaplanmıştır.

Bayramoğlu ve ark. (2005) epoksi grubu içeren poli(GMA-HEMA-EGDMA) mikrokürelerine *Candida rugosa* lipazının immobilizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada süspansiyon polimerizasyonu tekniği ile hazırlanan epoksi grubu içeren poli(GMA-HEMA-EGDMA) mikrokürelerine uzatıcı kol olarak 1,6-diaminohexan takılmış, ardından bağlama ajanı olarak glutarik dialdehit kullanılmıştır. Bu immobilizasyon yönteminde maksimum lipaz adsorpsiyon kapasitesi 28,3 mg/g polimer olarak bulunmuş ve immobilizasyon koşulları optimize edilerek, kinetik sabitler de hesaplanmıştır.

Öztürk (2006), lipaz immobilizasyonu için nano-boyutta, aktivasyon işlemi gerektirmeyen, enzimin doğrudan immobilize edilebildiği yeni bir hidrofobik destek materyali sentezlemiş ve lipaz immobilizasyonunda kullanmıştır.

Minovska ve ark. (2005), yağ hidrolizinde kullanılmak üzere 16 taşıyıcı destek maddesinden Amberlite IRC-50 ve Al_2O_3 'ü seçmişler ve bunlar üzerine *Candida rugosa* lipaz enzimini immobilize etmişlerdir. Immobilizasyon adsorpsiyon tekniğiyle gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesi, protein tayini, immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliğini incelemişler ve Amberlite IRC-50 reçinesiyle elde edilen immobilize enzimin, Al_2O_3 ile hazırlanan immobilize enzimden daha kararlı ve aktivitesinin daha yüksek olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Yapılan başka bir çalışmada Wu ve ark. (2007), *Candida rugosa*, *Mucor javanicus* ve *Rhizopus oryzae* orijinli lipaz enzimini Amberlite XAD-7 reçinesi üzerine 2-propanol içinde inkübasyonla adsorbe etmişlerdir. Söz konusu çalışmada immobilize *Candida rugosa* lipaz enzimi inkübasyon yapılmadan aktivite göstermemiş, ancak 4°C sıcaklıkta 24 saat inkübe edildikten sonraki adsorbsiyon kapasitesi 71,4 mg/g olarak bulunmuştur.

Perez ve ark. (2007), odundan elde edilen lignini (*Eucalyptus grandis* orijinli) çeşitli kimyasallarla (karbonildiimidazol, glutaraldehit, sodyum metaperiodat) modifiye edip, *Candida rugosa* lipazını kovalent bağlama metoduyla immobilize etmişlerdir.

Salis ve ark. (2008), sekiz farklı kaynaktan (*Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mucor javanicus*, *Pseudomonas Cepacia*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Penicillium camembertii*, *Rhizopus oryzae*), lipaz enzimini makrogözenekli polipropilene fiziksel adsorbsiyon metoduyla immobilize etmişlerdir. Çalışmada aynı taşıyıcıya farklı lipazların farklı adaptasyon durumları gözlenmiştir. Biyodizel elde etmek için tüm immobilize enzimlerin metanoliz reaksiyonları karşılaştırılmıştır.

Gao ve ark. (2009), *Candida rugosa* lipaz enziminin immobilizasyonu için yüksek porozite özelliğine sahip olan modifiye edilmiş silikayı tercih etmişlerdir. Immobilizasyon oda sıcaklığında fiziksel adsorbsiyon yöntemiyle yapılmış ve bunun için optimum sürenin oniki saat olduğu sonucuna varmışlardır. Çalışma sonucunda adsorbsiyon kapasitesini 67,4 mg/g; enzim aktivitesini 19,9 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (protein) olarak bulmuşlardır.

Enzimler, katalizör olarak kimyasal tepkimelerin dengeye ulaşmasını çabuklaştırırlar. Lipazlar hidroliz, interesterifikasyon, esterifikasyon, asidoliz ve aminoliz gibi çeşitli biyodönüşüm reaksiyonlarını gerçekleştiren çok amaçlı biyolojik katalizörlerdir. Bu özellikleri sayesinde çeşitli çalışmalar sonucunda sanayide katalizör olarak kullanım alanları artmıştır. Iso ve ark. (2001), Japonya ve Çin'de yürüttükleri çalışmalarında tutuklanmış lipaz kullanarak, susuz ortamda trigliserid ve alkolden biyodizel yakıt üretimi üzerine denemeler yapmışlardır.

Salis ve ark. (2005), İtalya'da Cagliari Üniversitesi'nde biyokatalizörlerle biyodizel üretimi üzerinde çalışmışlar ve *Candida antarctica B*, *Rizhomucor miehei*

ve *Pseudomonos cepacia* gibi farklı ticari tutuklanmış enzimlerle triolein ve bütanol kullanarak bütül oleat üretimi tepkimeleri test edilmiştir.

Bugüne kadar, maddelerin ayrılması ve saflaştırılmasında, zararlı bazı maddelerin giderilmesinde birçok adsorban kullanılmıştır. Çeşitli fonksiyonel grupların sporopollenine bağlanması ve Cu(II) ile meydana getirilen şelat reçine ile aminler, nükleositler ve nükleik asit bazlarının, amino asitlerin ayrılması ligand değiştirme mekanizması ile gerçekleştirilmiştir (Ersöz ve ark. 1989), nükleosidler ve nükleik asit bazlarının (Pehlivan ve ark. 1993, Pehlivan ve ark.1994), amino asitlerin (Ayar ve ark.,1995) ayrılması ligand değiştirme mekanizması ile gerçekleştirilmiştir. Fonksiyonel sporopollenin reçineleri ile, ağır metallerin sulu çözeltilerden tutulması, bu metallerin reçine ile şelat kompleks oluşturması ile gerçekleştirilmektedir (Göde ve Pehlivan, 2007)

Sporopollenin üzerinde John (1814) ve Braconot (1829) yıllarında çalışmalarda bulunmuşlar ve hücre duvarı bileşenlerinin kimyasal reaktiflere karşı dirençlerini incelemişlerdir. 1928 yıllarında Zetzsche bitki duvarlarını oluşturan *Lycopodium clavatum* sporları üzerinde çalışmış ve sporopolleninin polen ve hücre duvarlarında mevcut olan kimyasal maddelerden meydana geldiğini açıklamıştır. Daha sonraları Brook (1971) yılında sporopolleninin çok yüksek bir dirence sahip kimyasal madde olduğunu ve spor duvarlarını teşkil eden exosproim içerisinde olduğunu ileri sürmüştür. Göde ve Pehlivan (2007), karboksilli ve glioksimli metal-ligand kompleksi ile oluşturulan fonksiyonel *Lycopodium clavatum* ile meydana getirilen yeni bir değiştirici sistemin pH'nın fonksiyonu olarak sulu çözeltilerden ağır metallerin sorpsiyonunu araştırmışlardır.

Pehlivan ve ark., (1993) başka bir çalışmalarında da glioksim metal-ligand kompleksi ile modifiye edilmiş *Lycopodium clavatum* ile nükleositlerin ve nükleik asit bazlarının ligand değiştirme tekniği ile ayrılması üzerine çalışmışlardır.

Arslan ve ark. (2004), *Lycopodium clavatum*'dan elde edilen sporopollenini kullanarak sulu çözeltilerden Cd(II) metalini tutmuşlardır. Çalışmada adsorbsiyon süresi, sıcaklık, çözelti pH'ı ve Cd(II) konsantarsyonunun adsorbsiyon üzerine olan etkilerini incelemişlerdir.

Göde ve Pehlivan (2007), hazırladıkları CEP–sporopollenin (carboxylated epichlorohydrine sporopollenin) ve (b-DAEG–sporopollenin (bis-diaminoethyl

glyoxim-) reçinelerini metal sorpsiyon çalışmalarında kullanmak için, *Lycopodium clavatum* kökenli Sporopollenine çeşitli fonksiyonel gruplar bağlayarak adsorbsiyon etkisini artırmışlardır. Çeşitli Cr(III) konsantrasyonlarında adsorbsiyon parametrelerini, adsorbsiyon kinetiğini ve adsorbsiyon termodinamiğini incelemişlerdir.

Gezici ve ark. (2006), sporopollenin bazlı katı destek üzerine kristal violetin (CV) adsorpsiyon gücünü ölçmüşlerdir. Kolon şartları altında çalışma gerçekleştirilmiş ve break-through eğrileri elde edilmiştir.

Atkin ve ark., son yıllarda nükleik asit, protein ve peptidler gibi makromoleküllerin geliştirilmesindeki yükselen ilgiye dikkat çekerek, *Lycopodium clavatum*'dan elde edilen Sporopollenini çalışmalarında başlangıç maddesi olarak seçmişlerdir. *Lycopodium clavatum*'dan Sporopollenin dış kabuklarını ekstrakte etmişler ve oluşan boşluklara enkapsülasyon metoduyla seçilen makromolekülleri bağlamışlardır. Çalışmalar sonucunda; β -lactase, α -amylase, anti-AIDS drug, oligonucleotide gibi molekül ağırlıkları birbirinden farklı olan makromoleküllerin boş gözeneklere yerleşmiş halini "Confocal Microscopy" tekniğiyle görüntülemişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel süreçte kullanılan kimyasal maddeler ve markaları aşağıda verilmiştir:

- *Candida rugosa* Lipaz (toz halde) Sigma-chemical Co.
- *Lycopodium Clavatum* Fluka Chemicals
- Bovine Serum Albumin Sigma-chemical Co.
- Sodyum Karbonat Na₂CO₃ Merck
- p-Nitrofenil Palmitat (p-NPP) (C₂₂H₃₅NO₄) Sigma-chemical Co.
- Potasyum dihidrojenfosfat (KH₂PO₄) Merck
- Disodyum hidrojenfosfat (Na₂HPO₄.12H₂O) Merck
- Sodyum hidroksit (NaOH) Merck
- Etanol (C₂H₅OH) Merck
- Bradford Reagent Sigma-chemical Co.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar ve bu cihazların markaları aşağıda verilmiştir:

- Spektrometre: Unicam 160 A UV/Vis Spektrometre
- Çalkalamalı İnkübatör: Zhcheng ZHWY-200 B
- Soğutuculu Santrifüj: Sigma
- Liyofilizatör: Labconco
- Manyetik Karıştırıcı: Arex
- pH metre: Orion pH metre 420A
- Hassas Terazi: Denver
- Vakumlu Etüv: Binder
- TGA: Seteram Termogravimetrik Analiz cihazı
- SEM (Scanning Electronic Microscope, SEM, Jeol, JSM 5310, Japan)

3.3. Deneysel Kısım

Bu çalışmada, *Candida rugosa* lipaz enziminin adsorbsiyon yöntemi ile immobilizasyonu için adsorban madde olarak *Lycopodium clavatum* orijinli sporopollenin (25µm) seçilmiş ve hiçbir işlem görmeden orijinal haliyle kullanılmıştır.

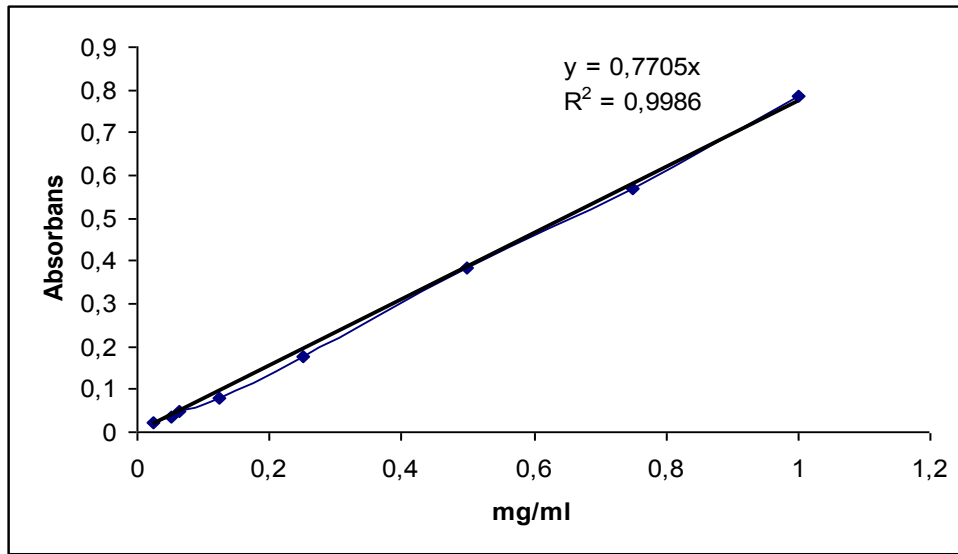
3.3.1. Enzim İmmobilizasyonu

Uygun enzim/adsorban madde oranı dikkate alınarak tartılan *Candida rugosa* lipazı belirli hacimdeki fosfat tamponunda (pH:7) çözüldü ve adsorban üzerine ilave edildi. 3 saat 30°C’de immobilizasyon işlemi (inkubatörde çalkalanarak) gerçekleştirildi. Vakumda süzöldü ve birkaç defa fosfat tamponu (pH:7) ile yıkandı. Yıkama suları protein tayini için ayrıldı. İmmobilize enzim liyofilizatörde -50 °C’de 1 saat kurutuldu ve buzdolabında (4°C) saklandı.

3.3.2. Protein Miktarı

Serbest ve immobilize lipaz içerisindeki protein miktarı Bradford metoduna göre tayin edildi. Bunun için standart olarak Bovine serum albumin (BSA)’in belirli konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanarak bu çözeltilerin 0,1 mL’si 3 mL Bradford reagent (Coomassie Brilliant Blue G-250) ile etkileştirilip 595 nm dalga boyundaki absorbansları UV-visible spektrofotometresinde ölçüldü. Standart olarak, absorbans-protein miktarı (mg/ml) grafiği çizildi (Şekil 2.1) ve yapılan bütün protein çalışmalarında bu grafik referans alındı.

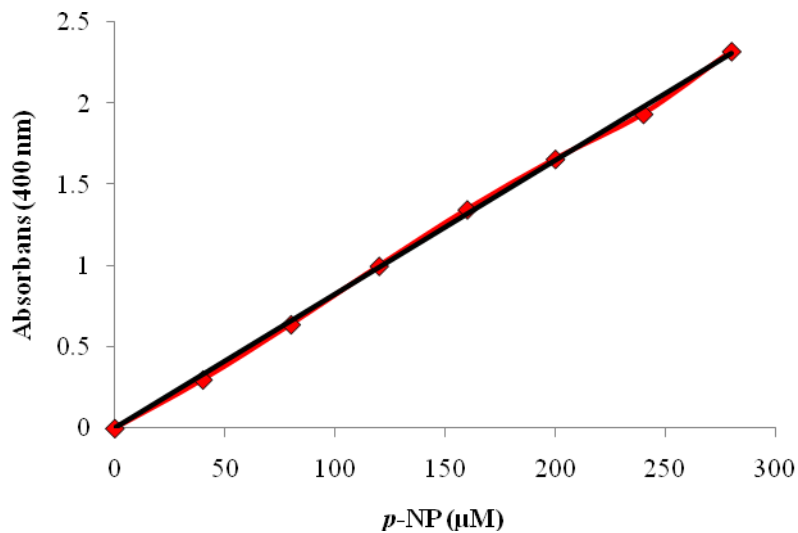
Adsorban üzerine bağlanan protein miktarı aşağıdaki grafikten hesaplandı:



Şekil 2.1. Standart protein miktarı (mg/ml)- absorbans grafiği ($\lambda_{max} = 595 \text{ nm}$)

3.3.3. Standart p-NP(*p*-nitrofenol)- absorbans grafiği

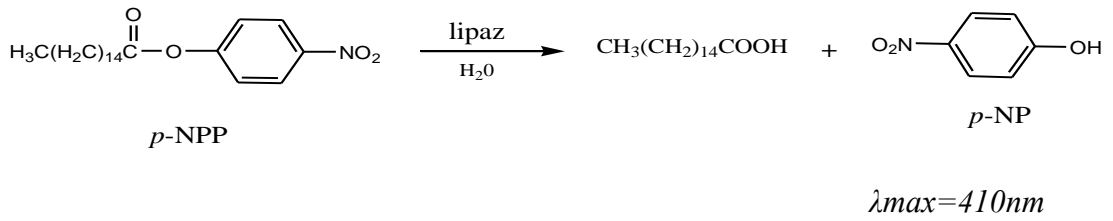
Kalibrasyon grafiği hazırlamak için çeşitli derişimlerde *p*-nitrofenil palmitat çözeltileri hazırlandı ve *p*-nitrofenol derişimlerine karşı gelen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Standart p-NP(*p*-nitrofenol)- absorbans grafiği ($\lambda_{max} = 410 \text{ nm}$)

3.3.4. Standart Aktivite tayini

1 mL, pH: 7,0 fosfat tampon çözeltisi içerisinde bulunan belirli miktarlardaki serbest lipaz veya immobilize lipaz karışımına 2-propanol içerisinde hazırlanan 14,4 mM 'lik *p*-NPP çözeltisinden 1 mL ilave edilerek oda sıcaklığında 5 dk karıştırıldı. Daha sonra reaksiyon 2 mL 0,25 M Na₂CO₃ ilavesiyle durduruldu. Karışım 10 dk santrifüj edilerek, enzimatik aktivite UV-visible spektrofotometresinde, açığa çıkan *p*-nitrofenol'ün (*p*-NP) 410 nm dalga boyundaki absorbansından bulundu. Bu absorbans değeri standart olarak çizilen *p*-NP (mol/litre) kalibrasyon grafiğinde (Şekil 2.2) yerine konularak açığa çıkan *p*-NP'ın miktarı tespit edildi. Lipazın 1 Unit (U)'i, dakikada 1µmol *p*-NPP hidroliz etmek için gerekli olan lipaz miktarıdır. Bu verilerden yararlanılarak serbest ve immobilize lipazların aktiviteleri belirlendi.



3.3.5. İmmobilizasyondaki Hesaplamalar

Spesifik aktivite = Unit/mg-protein (lipaz yada immobilize lipazda bulunan)

$$\text{İmmobilize edilen protein (\%)} = \frac{\text{Bağlanan protein miktarı} \times 100}{\text{Başlangıçtaki protein miktarı}}$$

$$\text{Bağlı aktivite (\%)} = \frac{\text{İmmobilize lipazın spesifik aktivitesi} \times 100}{\text{Serbest lipazın spesifik aktivitesi}}$$

3.3.6. Aktifliğe pH'nın Etkisi

Protein yapısına sahip olan enzimlerin 3 boyutlu yapısına etki eden tüm faktörler, enzimlerin kararlılıkları üzerine de etki ederler. Ortamın pH'sı da enzimin 3 boyutlu yapısı üzerine etkin bir faktördür.

Serbest ve immobilize enzim, farklı pH değerlerinde (pH 4,0-9,0) 50 mM sodyum fosfat tamponunda 1 saat inkübe edildikten sonra standart ölçüm koşullarında (pH: 7, 30°C), aktivite ölçümleri gerçekleştirildi .

3.3.7. Aktifliğe Sıcaklığın Etkisi

Serbest ve immobilize enzimin aktifliğine, sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile serbest ve immobilize enzim farklı sıcaklıklarda (25-60°C) fosfat tamponu içinde 20 dk karıştırılıp soğutuldu. Daha sonra aktivite tayin etme metoduna göre ölçümler gerçekleştirildi.

3.3.8. Aktifliğe Substrat Derişiminin Etkisi

Kinetik parametrelerin hesaplanabilmesi için Michaelis-Menten eşitliği kullanıldı. Serbest ve immobilize lipaz için maksimum tepkime hızı (V_{mak}) ve Michaelis-Menten sabiti (K_m) farklı p-NPP (5,0, 2,5, 1,25, 1,0, 0,5 ve 0,25 mM) konsantrasyonlarında ölçüldü. İmmobilize ve serbest lipazın kinetik parametreleri kesikli sistemde ve aynı deney koşulları uygulanarak gerçekleştirildi.

3.3.9. Termal Kararlılık

Serbest ve immobilize lipazın termal kararlılığını incelemek amacı ile serbest ve immobilize enzim çözeltileri 60 °C'de ve farklı zaman aralıklarında (20-120 dakika) tutularak yukarıda belirtilen yöntemle göre aktiflikleri tayin edildi.

3.3.10. Depolanma Kararlılığı

Depo kararlılığı uzun süre saklama durumunda aktivite kaybının bir ölçüsüdür. Bu süre içinde enzimin katalitik potansiyelinden yararlanılmaz. Genellikle immobilize enzimlerin depo kararlılıkları serbest enzimlerden iyidir. Immobilize enzim +4°C’de fosfat tampon çözeltisinde (pH:7) muhafaza edildi, standart ölçüm koşullarında (pH: 7, 30°C), periyodik aralıklarla aktivitelerindeki değişim gözlemlendi.

3.3.11. Tekrar kullanılabilirlik

İmmobilize enzimlerin endüstriyel kullanımları açısından önemli bir parametredir. Sporopollenin’de immobilize edilen lipaz standart ölçüm koşullarında (pH: 7, 30°C), arka arkaya 5 kez p-PNP (*p*-nitrofenol) hidrolizinde kullanıldı ve aktivitesindeki değişim gözlemlendi. İmmobilize lipazın tekrar kullanım sayısını ölçmek amacı ile kısım 3.3.4’de belirtilen metod kullanılarak arka arkaya gerçekleştirilen deneylerle aktiflikleri tayin edildi.

3.3.12. TGA (Termal Gravimetrik Analiz) ve SEM (Taramalı Elektron Mikroskopu)

TGA ölçümleri Seteram Termogravimetrik Analiz cihazında gerçekleştirildi. Sıcaklık artışı 10°C/dk, gaz akış hızı 20 ml/dk olacak şekilde argon gazı ortamında oda sıcaklığından 900°C’ye kadar çıkmıştır. Adsorbanın immobilizasyon öncesi ve sonrasındaki morfolojisi SEM ile aydınlatıldı.

4. DENEY SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Kolay elde edilebilirliği, fiziksel ve ısı yönünden gösterdiği kararlılık, kimyasal dirence sahip olması gibi özelliklerinden dolayı maliyeti düşük olan sporopollenin adsorban olarak seçildi ve lipaz enziminin immobilizasyonu gerçekleştirildi.

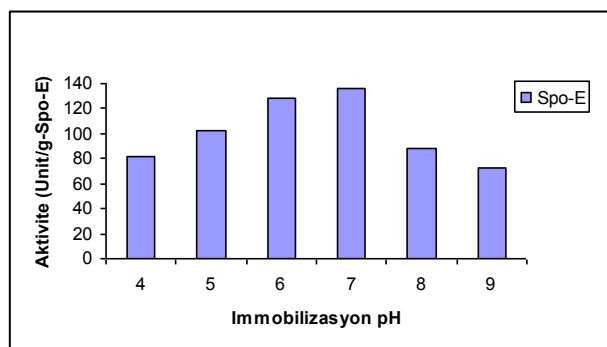
4.1. İmmobilizasyon Parametreleri

Seçilen adsorbana immobilizasyonun optimum şartlarda yapılabilmesi için farklı parametrelerde farklı deneyler yapıldı. Çalışmalarımız boyunca tekrarlanan deneylerde sabit tutacağımız inkubasyon pH'ı, inkubasyon süresi ve inkubasyon hız değerleri bulundu.

- **İnkubasyon pH'ı:**

İmmobilizasyon işlemlerinde çalkalama hızı (150 rpm) ve sıcaklığı (30 °C) sabit tutularak farklı pH 'lardaki tampon çözeltiler ile ayrı ayrı çalışıldı ve en yüksek aktivite pH 7 olarak tespit edildi. Şekil 2.3'de alınan aktivite sonuçları gösterilmiştir.

Çözeltinin pH'sının değişmesi enzimlerin aktif merkezlerinde bulunan gruplara etki ederek bunları belirli pH bölgelerinde iyonize hale geçirmektedir ve aktivite düşüşüne neden olmaktadır.

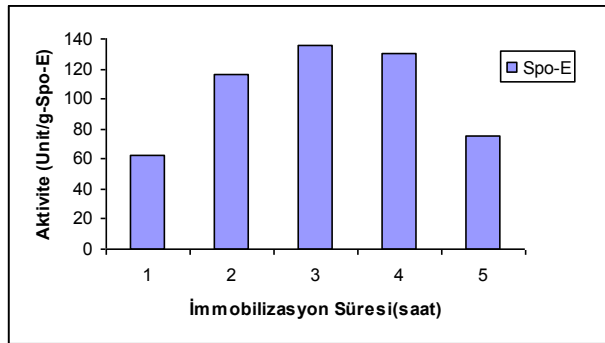


Şekil 2.3. İmmobilizasyon İşleminde İnkubasyon pH'nın Aktiviteye Etkisi (çalkalama hızı 150 rpm, T: 30 °C)

- **İnkubasyon Süresi :**

Adsorbsiyon proseslerinde temas süresinin etkili bir faktör olduğu göz önünde bulundurularak inkubasyon pH'ı (pH 7) ve çalkalama hızı (150 rpm) sabit tutularak farklı sürelerde immobilizasyon yapıldı ve ölçülen aktivite değerlerinden optimum sürenin yaklaşık olarak 3 saat olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

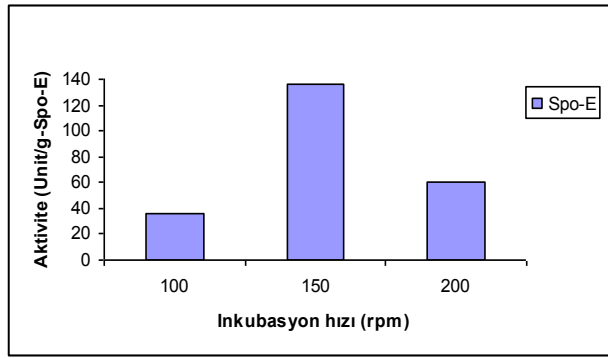
Literatürde uzun süreli inkubasyonlarda sıcaklıktan kaynaklanan denatürasyon 30°C'de bile başlamaktadır. Optimum sıcaklık inkubasyon süresine çok bağlıdır. Örneğin inkubasyon süresinin 30 dakikadan 60 dakikaya çıkarılması optimum sıcaklığın 10°C düşmesine neden olur (Telefoncu 1986).



Şekil 2.4. İmmobilizasyon İşleminde İnkubasyon süresinin Aktiviteye Etkisi (pH 7, çalkalama hızı 150 rpm)

- **Çalkalama Hızı :**

İnkubasyon pH'ı (pH 7) ve inkubasyon süresi (3 saat) sabit tutularak kullanılan çalkalamalı inkubatörün 100–150–200 rpm değerlerinde immobilizasyon işlemi yapıldı ve en uygun hızın 150 rpm olduğu gözlemlendi. Fazla hızlı karıştırılmalı inkübasyonlarda enzim desorpsiyonu ile aktivasyon oranlarında düşme olduğu gözlemlendi.



Şekil 2.5. İmmobilizasyon İşleminde İnkubasyon Hızının Aktiviteye Etkisi(pH 7, inkubasyon süresi 3 saat)

4.2. Enzim ve Adsorban Oranının Aktivite Değerine Etkisi

Tablo 1.7’de farklı oranlarda enzim/adsorban madde alındı ve aktivite, spesifik aktivite ve bağlanan protein miktarları kıyaslandı. Adsorban madde, yapılan immobilizasyon işlemlerinin hepsinde 1 g alınıp enzim miktarları 0,1-0,2-0,3-0,5 g olarak farklılandırılıp aktivite değerleri kıyaslandı.

Tablo 1.7. Serbest ve İmmobilize Lipazların Aktiviteleri

	Bağlanan Protein (mg protein/g-Spo-E)	Bağlanan Protein Verimi(%)	Lipaz Aktivitesi (U/g-Spo-E)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Aktivite Verimi (%)
Serbest lipaz	-	-	2,49 ^a	35,6	100,0
Spo-E (0.1)	3,5	99,0	46,8	13,4	37,7
Spo-E (0.2)	6,0	86,5	90,5	15,0	42,2
Spo-E (0.3)	8,3	79,2	135,6	16,3	45,8
Spo-E (0.5)	9,4	67,1	140,0	14,9	41,8

^a Ölçü U/mL

Tablo 1.7’de görüldüğü gibi en yüksek aktivite değeri enzim/adsorban oranı 0,3 alındığında gözlemlendi, bu oranın 0,5 olması durumunda bağlanan protein ve aktivite

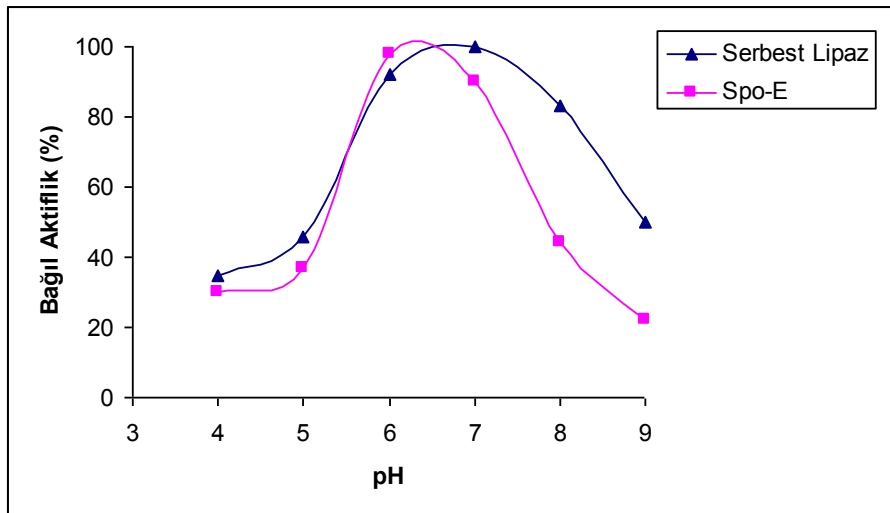
oranlarındaki artış çok fazla olmadığından standart deneylerde enzim/adsorban oranı 0,3 olarak alındı.

4.3. Aktifliğe pH'ın Etkisi

Serbest ve immobilize lipazın aktifliğine pH'nın etkisini incelemek amacı ile yukarıda belirtilen yöntemle göre çeşitli pH'larda gerçekleştirilen reaksiyonlara ait bağıl aktiflik değerlerinin pH ile değişimi Şekil 2.6'da verilmiştir

Enzimler elektrolit karakterli oldukları için enzim aktifliği pH ile değişim gösterebilir. pH'daki değişiklik enzimin yapısındaki amino asit zincirinin iyonik özelliğinin değişmesine ve denatüre olan enzimin katalitik aktifliğinin kaybolmasına neden olur. Şekil 2.6'de görüldüğü gibi serbest lipaz enzimi için optimum pH 7,0 immobilize enzim (Spo-E) için ise 6,0-7,0 aralığında gözlemlendi. Bu pH farklılığı ise lipazın konformasyonu, kullanılan bileşiklerin yapısı, immobilizasyon metodu ve lipaz yüzeyindeki yük yoğunluğu ile ilgilidir. pH'ın 6,0 olması immobilizasyondan sonra enzimdeki asidik grupların sayısının bir miktar artması ve polikasyonik bir görünüm kazanması ile izah edilebilir.

Literatürde de *Candida rugosa* lipazı kitosan üzerine immobilize edildiğinde serbest lipaz için optimum pH 8,0 iken immobilize lipaz için optimum pH'sı 9,0 olarak bulunmuştur (Hung ve ark. 2003). Basri ve ark.(1993) *Candida rugosa* lipazını amberlite XAD2, XAD4 ve XAD7 organik polimerlerine adsorbe etmişlerdir. Optimum adsorbsiyon pH aralığını 6,0-7,0 olarak rapor etmişlerdir.

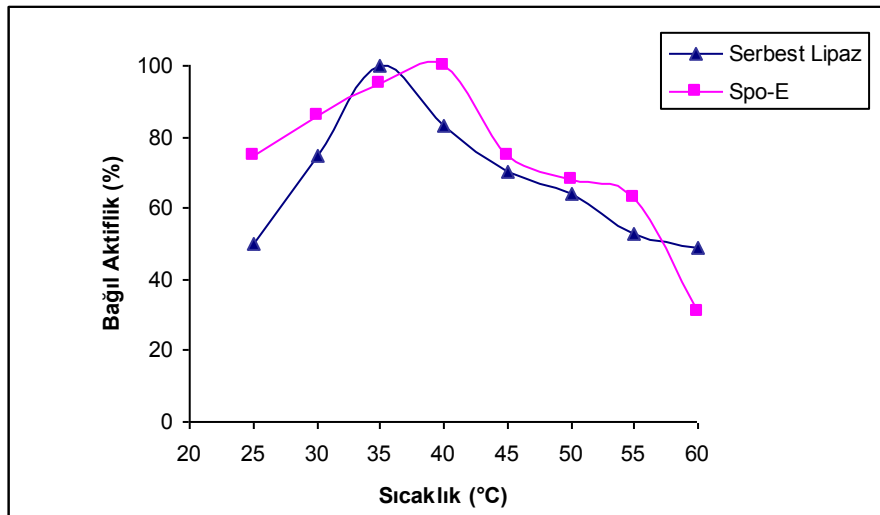


Şekil 2.6. Serbest ve immobilize lipazın aktifliğine pH'nin etkisi

4.4. Aktifliğe Sıcaklığın Etkisi

Tüm kimyasal reaksiyonlar gibi enzim katalizli reaksiyonlar da sıcaklığa bağımlıdır ve reaksiyon hızı sıcaklıkla artar. Sıcaklığın her 10°C artışı klasik kimyasal reaksiyonun hızını bir kat artırırken enzimatik reaksiyonun hızını 1,2–4 kat artırmaktadır. Fakat bu artış sürekli olmayıp özellikle 40°C üzerinde inkübasyon zamanına bağımlı olarak önce bir duraklama sonra da gerileme şeklinde kendini göstermektedir. Bilindiği gibi ana yapı olarak protein olan enzimler sıcaklıkla denatürasyona uğramaktadırlar. Proteinin üç boyutlu yapısını oluşturan sekonder bağların çözülmesi (denatürasyon) enzimatik aktivitenin azalması ve giderek kaybolması sonucunu doğurmaktadır (Telefoncu 1986).

Serbest lipaz ve immobilize edilen lipazın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile belirtilen yöntemle göre çeşitli sıcaklıklarda gerçekleştirilen reaksiyonlara ait bağıl aktiflik değerlerinin sıcaklık ile değişimi Şekil 2.7'de verilmiştir. Serbest enzim için optimum sıcaklık 35°C, Spo-E için ise 40°C olarak bulundu. Sıcaklığın artması ile moleküller arası çarpışma artmaktadır ve buna bağlı olarak da genellikle tepkimenin hızı artmaktadır. Enzimler protein yapısında oldukları için optimum sıcaklığın üzerinde denatürasyona uğrarlar dolayısıyla sıcaklığın artması ile enzimin aktifliği azalır.



Şekil 2.7. Serbest ve immobilize lipazın bağıl aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

Literatürde kitosan üzerine *Candida rugosa* lipazı immobilize edildiğinde serbest ve immobilize lipaz için optimum sıcaklık 30°C bulunmuştur (Hung ve ark. 2003). *Candida rugosa* lipazı kovalent bağlanma yöntemi ile poli(2- hidroksietil metakrilat) membranına immobilize edildiğinde optimum sıcaklık 35°C den 45°C ye yükselmiştir (Bayramoğlu ve ark. 2002). Poli(GMA-HEMA-EGDMA) mikro kürelerine *Candida rugosa* lipazı kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest lipaz için optimum sıcaklık 40°C iken immobilize lipaz için optimum pH 45°C bulunmuştur (Bayramoğlu ve ark. 2004). PVC, kitosan, kitin, agaroz, sefaroze, ve trisakril gibi farklı destekler üzerine Lipaz enzimi immobilize edildiğinde serbest lipaz için optimum sıcaklık 35°C iken immobilize lipaz için optimum sıcaklık 45°C bulunmuştur (Shaw ve ark. 1990). Farklı bir çalışmada Montero ve ark. (1993) *Candida rugosa* lipazını polipropilen üzerine adsorbe ettiklerinde enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığı 45°C olarak kaydetmişlerdir. Aynı çalışmada serbest enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık 37°C olarak bulunmuştur.

4.5. Aktifliğe Substrat Derişiminin Etkisi

Kinetik parametrelerin hesaplanabilmesi için Michaelis-Menten eşitliği kullanıldı. Serbest lipaz ve immobilize lipazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini

incelemek amacı ile kısım 3.3.11 de belirtilen yönteme göre çeşitli substrat derişimlerinde (5,0, 2,5, 1,25, 1,0, 0,5 ve 0,25 mM) gerçekleştirilen reaksiyonlar ve kalibrasyon grafiğinden elde edilen eğim yardımıyla reaksiyon hızları hesaplandı. Elde edilen değerlere göre Lineweaver-Burk grafiğı ve grafikten K_m , V_{mak} değerleri hesaplandı.

Tablo 1.8. Serbest ve immobilize edilen lipazın kinetik parametreleri.

	V_{mak} (U/mg-protein)	K_m (mM)
Serbest Lipaz	115,0	0,44
Spo-E	29,0	1,52

K_m değerindeki artış immobilize enzimin substrata olan ilgisinin az olduğunu gösterir (Tablo 1.8). Enzimin yarı doyunluğa ulaşması için daha fazla substrat derişimi gerekir. İmmobilizasyon sonucu enzim molekülünde bazı yapısal değışimler olabilir. Enzim ve substrat arasındaki etkileşim ve difüzyonel sınırlamalar da bu artışa sebep olabilir. Bu durum aktif bölgelerin sterik engellemelere maruz kalması, substrata bağlanması için enzimin hareketliliğinin azalması ya da partiküller arası taşınım olayı için difüzyona karşı gösterilen direnç gibi sebeplerle açıklanabilir (Hoshino ve ark. 1992).

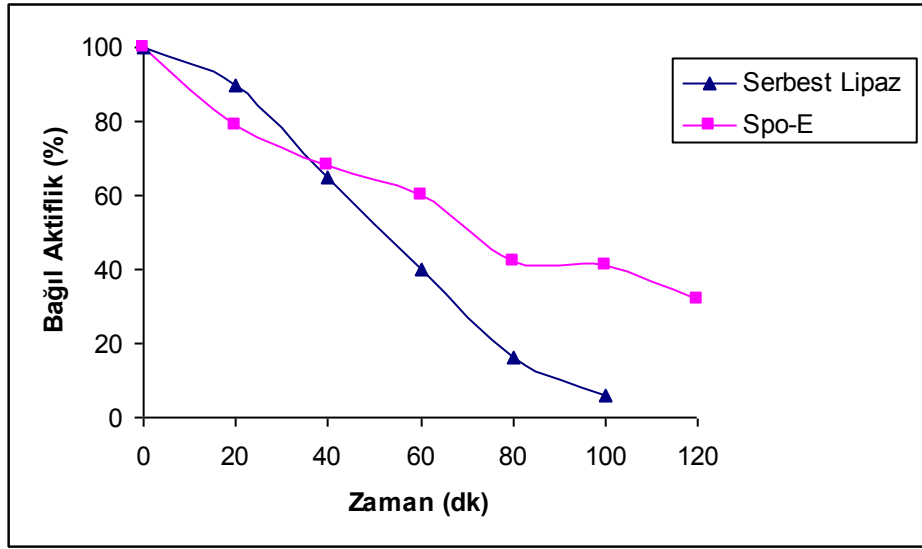
Buna alternatif, K_m değerindeki bu farklılık uygulanan immobilizasyon yönteminden dolayı enzimin yapısında meydana gelen yapısal değışiklikten yada immobilize enzimin aktif bölgelerine substratın yeterli düzeyde ulaşamamasından kaynaklanabilir. İmmobilizasyondan sonra lipazın K_m değerindeki artışı gösteren benzer bir çalışma literatürde mevcuttur (Palmieri ve ark. 1994).

4.6. Termal Kararlılık

Enzimler protein yapısında olduklarından, sıcaklık artışlarına karşı hassastırlar, bu nedenle enzimatik reaksiyonlar için yüksek sıcaklıklar tercih edilmez. Ancak enzimin termal kararlılığı geliştirilebilirse endüstriyel açıdan potansiyele sahip preparatlar hazırlanmış olur.

Serbest lipaz ve immobilize lipazın termal kararlılığını incelemek amacı ile serbest ve immobilize enzim çözeltileri 60°C’de ve farklı zaman aralıklarında

(20-120 dakika) tutularak yukarıda belirtilen yöntemle göre aktiflikleri tayin edildi. Bağlı aktiflik değerlerinin zamanla değişimi Şekil 2.8’de gösterilmiştir. Serbest lipaz 60 dakika tutulduğunda aktifliğinin % 40’ını, immobilize edilen lipaz (Spo-E) aktifliğinin %60’ını koruduğu gözlemlendi.



Şekil 2.8. Serbest ve immobilize lipazın termal kararlılığı

Enzimler, reaksiyon sıcaklığı ve süresi arttıkça konformasyonel değişime uğrarlar ve buna bağlı olarak da aktifliklerinde azalma veya tümüyle yok olma gözlemlenebilir. *Candida rugosa* lipazı kitosan üzerine immobilize edildiğinde serbest lipazın 30°C’nin üstünde yüksek aktiflik gösterdiği, immobilize lipazın ise 40°C’nin üstünde yüksek aktiflik gösterdiği bildirilmiştir. 60°C’de serbest lipazın %12, immobilize lipazın ise %23 aktifliğini koruduğu gözlemlenmiştir (Hung ve ark. 2003).

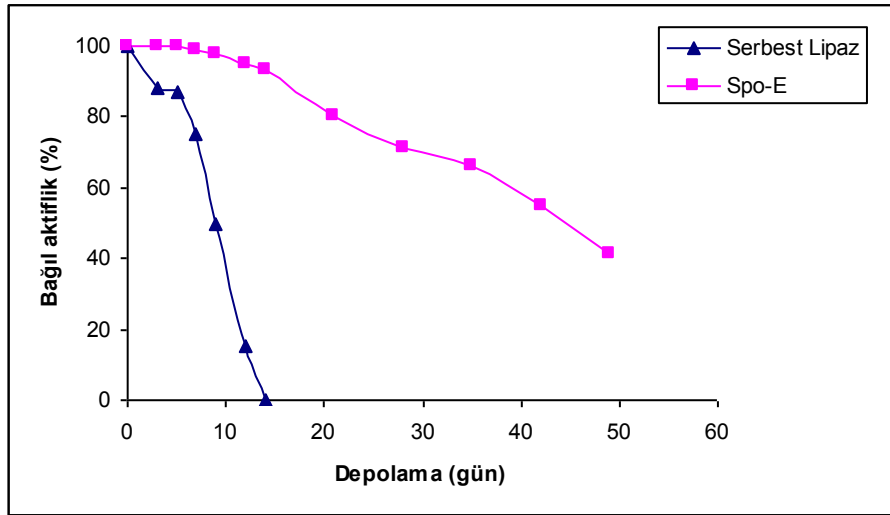
Eğer enzimlerin ısı kararlılıkları immobilizasyon ile artıyorsa, bu enzimlerin potansiyel uygulama alanları genişletilebilir. Bu anlamda termal kararlılık geliştirilen bir immobilizasyon yöntemi için oldukça önemlidir.

4.7. Serbest ve İmmobilize Lipazın Depolanma Kararlılığı

Serbest ve immobilize edilen lipazın aktifliğine depolanma süresinin etkisini incelemek amacı ile serbest ve immobilize lipaz 4°C de fosfat tampon çözeltisinde (pH:7,0) buzdolabında saklandı. Belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin kısım 3.3.4' de belirtilen yöntemle göre aktiflikleri tayin edildi. Aktiflik değerlerinin depolanma süresi ile değişimi Şekil 2.9'da verilmiştir. 14 gün sonunda serbest enzim, aktifliğinin %100 ünü kaybederken, Spo-E %93 koruduğu görüldü.

Enzimler çözelti içinde saklandıkları zaman yapısal değişime uğrarlar. Buna bağlı olarak da aktivitelerinde azalma veya tümüyle yok olma gözlenebilir. İmmobilizasyon işlemi ile enzim aktifliği iyileştirilebilir. Şekil 2.9'da görüldüğü gibi immobilize enzimin aktifliği serbest enzimin aktifliğine göre daha fazla korunmuştur. Bu da immobilize formun serbest forma göre başka bir üstünlüğüdür.

Candida rugosa lipazı kitosan üzerine hidroksil gruplarının aktivasyonu ile immobilize edildiğinde 30 günün sonunda enzimin %54 aktifliğini koruduğu görülmüştür (Chiou ve Wu 2004). *Candida rugosa* lipazı poli(N,N-dimetilakrilamit-ko-akrilamit) üzerine kovalent bağlama yöntemi ile poli(N-izopropilakrilamit-ko-akrilamit)/-karragenan üzerine hapsedme yöntemi ile immobilize edilmiştir, 60 günün sonunda serbest enzim, aktifliğinin %100 ünü kaybederken, hapsedme yöntemine göre immobilize edilen enzim %42,5, kovalent bağlanma yöntemine göre immobilize edilen enzimin %54 aktifliğini koruduğu görülmüştür (Karaca 2006).

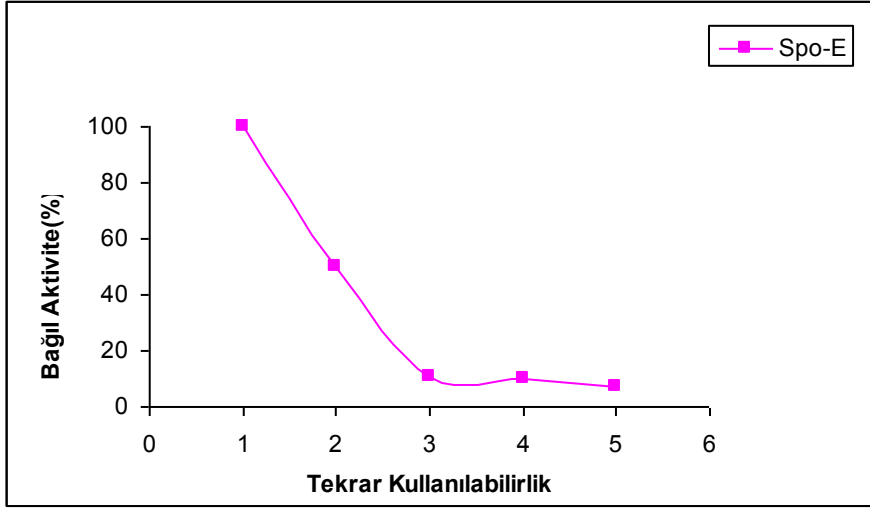


Şekil 2.9. Serbest ve immobilize lipazın bağlı aktifliğinin depolanma süresi ile değişimi

4.8. Tekrar Kullanılabilirlik

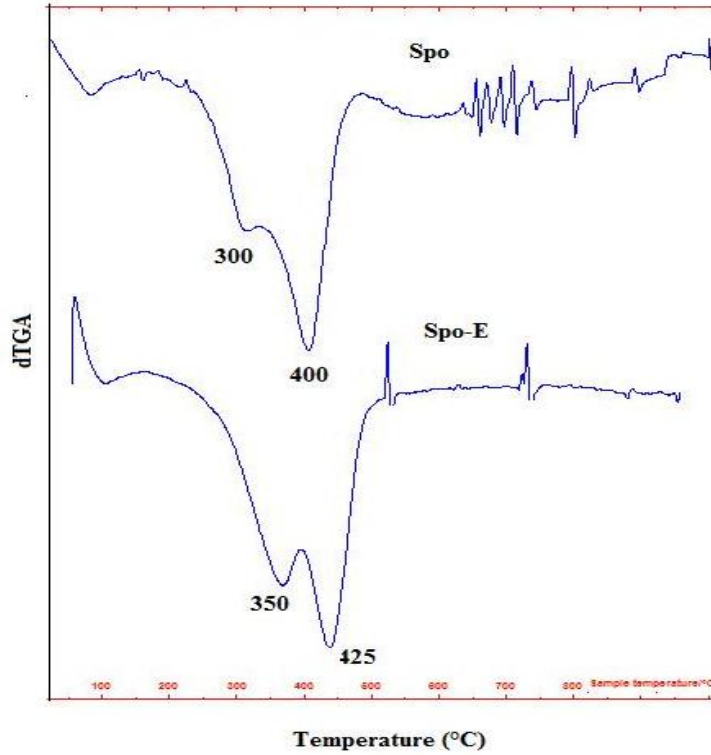
İmmobilize edilen lipazın tekrar kullanım sayısını ölçmek amacıyla yukarıda belirtilen metod kullanılarak aktiflikler tayin edildi. Serbest enzime göre immobilize enzim birçok kez ve uzun süre kullanılabilir. İmmobilize enzimin bu özelliği endüstriyel uygulamalarda çok önemlidir. Çünkü üretim maliyeti sürekli kullanıma bağlı olarak düşer. Sürekli kullanım ile enzim aktifliğinde bir değişim gözlenmiştir. Aktiflik değerlerinin değişimi Şekil 2.10'da verilmiştir. Çalışmalarımız sonucunda adsorpsiyon yöntemine göre immobilize edilen lipazın aktifliği 2 kez kullanımda %50'ye, 3 kez kullanım sonunda %18'e düşmüştür. Bu sonuç, adsorpsiyon yöntemine göre immobilizasyon yapıldığında lipaz ile sporopollenin arasında etkileşimler zayıf olduğundan tekrar kullanılabilirlik özelliğinin çok iyi sonuçlar vermeyeceğine işaret etmektedir.

Eğer enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa bu durumda desorpsiyon sonucu enzim serbest halde reaksiyon ortamına geçmektedir (Telefoncu 1986).



Şekil 2.10. İmmobilize lipazın bağıl aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

4.9. TGA (Termal Gravimetrik Analiz) ve SEM (Taramalı Elektron Mikroskopi)



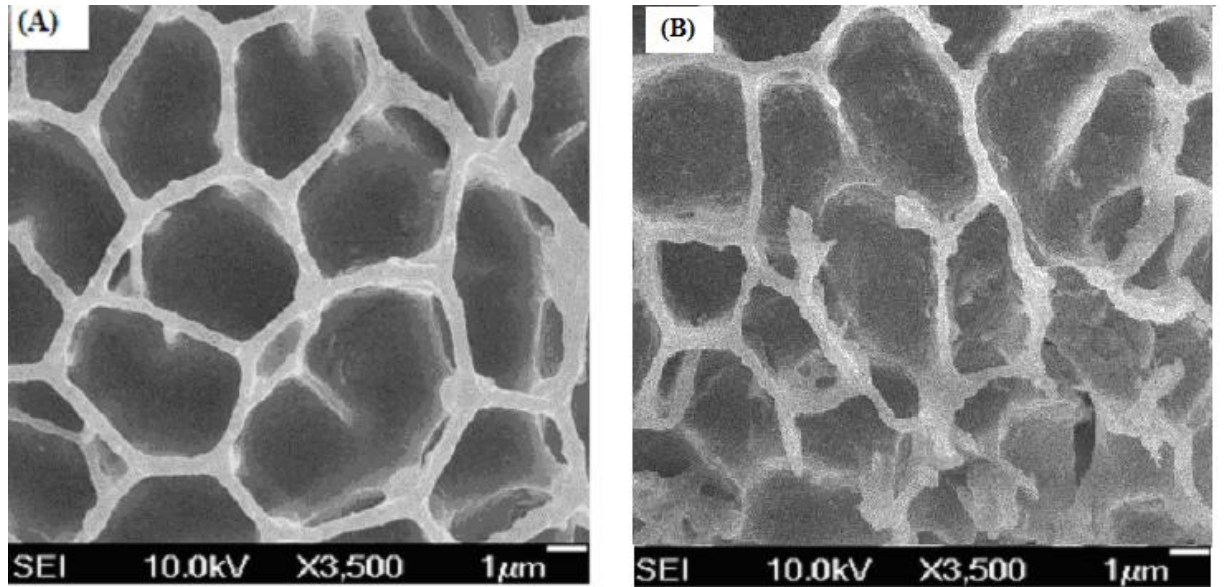
Şekil 2.11. Sporopollenin ve Spo-E'nin dTGA eğrisi

Sporopollenin, tanecikleri tek dağılımlı ve tüm tanecikleri yapısal ve boyutsal olarak birbirinin aynısı olan bir maddedir. Spor duvarları hücrenin iç kısımlarını

çevreleyen iç içe geçmiş iki ana duvardan oluşmuştur. Hücrenin iç duvarları selülozdan oluşan protein polisakkaritlerden meydana gelmiştir. Genelde yuvarlak şekilde olup 1-2 mikron kalınlığında iç boşluklara sahiptir.

Spo ve Spo-E'nin termal kararlılığı termal gravimetrik analiz (TGA) ile ölçülmüş ve birincil türevi Şekil 2.10'da verilmiştir. Yapılan analizdeki ısıl işlem sonucunda, adsorbana fiziksel olarak tutunan suyun uzaklaşmasından sonra görülen büyük kütle kaybı da 200-550°C arasında iki band halinde görülür. İmmobilize enzimin (Spo-E) orijinal sporopolleninden daha yüksek termal kararlılık gösterdiği görülmektedir.

İmmobilizasyon sonrasında adsorban maddedeki fiziksel değişimleri kanıtlamak için taramalı elektron mikroskopunda görüntüler alınmıştır. Şekil 2.12 Spo ve Spo-E'nin SEM görüntülerini içermektedir. İmmobilizasyon sonrasında sporopollenin boşluklarının enzim proteiniyle kaplandığı görülmektedir.



Şekil 2.12. SEM görüntüleri: (A) sporopollenin ve (B) Spo-E

4.10. Adsorbsiyon İzotermi

Adsorpsiyon izotermi sabit sıcaklıkta adsorban tarafından adsorplanan madde miktarı ile konsantrasyon arasındaki bağıntıdır. Adsorpsiyon izoterm modellerinin uygunluğu, seçilen destek materyalinin tek tabakalı veya çok tabakalı olmasına göre

değişir. Monomoleküler tabakadaki immobilizasyon Langmuir izotermi ile uyum gösterirken, çoklu tabakadaki immobilizasyon Freundlich izotermi ile uyum gösterir.

Çalışmamızda immobilizasyon sonrasında adsorban kapasitesini hesaplamak için adsorpsiyon izotermi deneysel olarak belirlendi. Adsorpsiyonu tanımlamak için Langmuir ve Freundlich izotermi kesikli sistemde yapılan denemelerden elde edilmiş ve sonuçlar Şekil 2.13 ve Şekil 2.14’de verilmiştir.

Langmuir adsorpsiyon izotermi eşitlik 1.6 ile gösterilmektedir.

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L} + \frac{a_L C_e}{K_L} \quad (1.6)$$

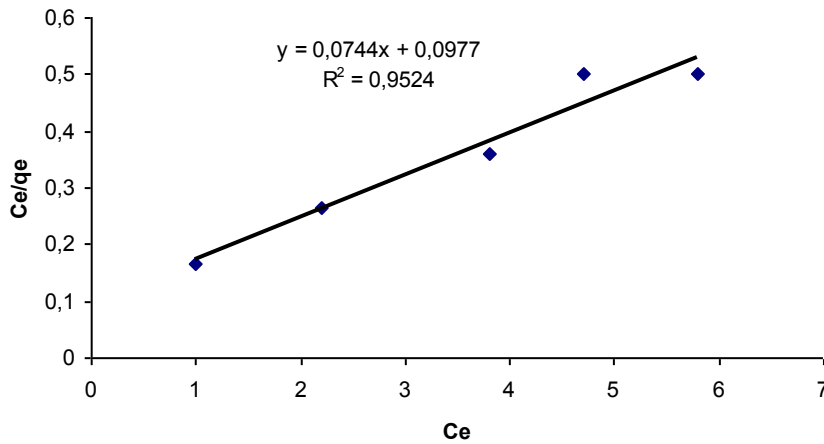
C_e : Adsorpsiyon sonrası çözültide kalan maddenin konsantrasyonu (protein mg/mL çözülti).

q_e : Birim adsorban üzerinde adsorplanan madde miktarı (protein mg/g support)

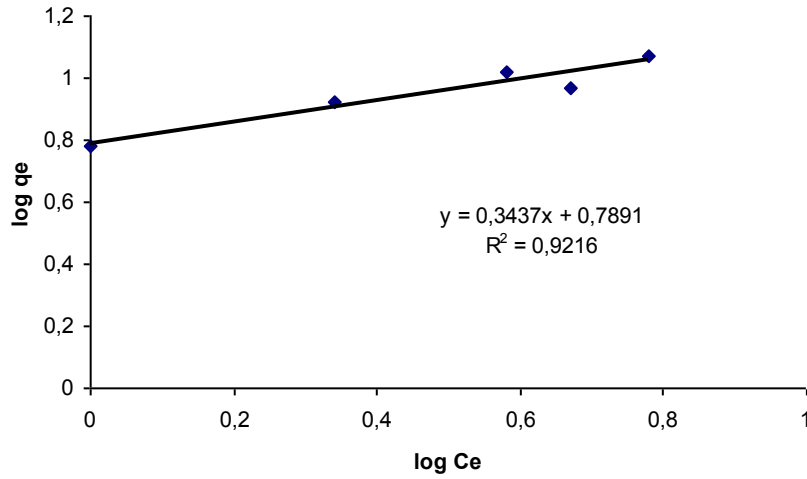
K_L : Adsorbatın adsorplanma kapasitesine bağlı olan sabit (mL/mg)

a_L : Adsorpsiyon enerjisine bağlı olan sabit (mL/mg)

Burada C_e/q_e değerinin, C_e değerine göre değişiminin grafiğe dökülmesiyle elde edilen doğrunun eğimi ve kesim noktası sırasıyla a_L/K_L ve $1/K_L$ sabitlerinin değerini verecektir. Q_{max} (K_L/a_L) tek tabakalı adsorban kapasitesini göstermekle birlikte adsorbanın maksimum adsorplama kapasitesini temsil eder.



Şekil 2.13. Langmuir adsorpsiyon izotermi



Şekil 2.14. Freundlich adsorbsiyon izotermi

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (1.9)$$

C_e : Adsorbsiyon sonrası çözültide kalan maddenin konsantrasyonu (protein mg/mL çözülti).

q_e : Birim adsorban üzerinde adsorplanan madde miktarı (protein mg/g support)

K_F : Deneysel olarak hesaplanır. Adsorbsiyon kapasitesi (mL/g)

n : Adsorbsiyon yoğunluğu (birimsiz)

$\log q_e$ 'nin $\log C_e$ 'ye göre değişiminin grafiğe dökülmesiyle K_F ve n sabitleri bulunur. Grafikten elde edilen doğrunun y eksenini kesim noktası $\log K_F$ 'yi ve eğimi de $1/n$ 'i verir. $n > 1$ değeri adsorbsiyon işleminin elverişli olduğunu göstermektedir (Chiou ve Li 2002). $1/n$ heterojenite faktörüdür ve 0-1 aralığında değerler alır. Yüzey ne kadar heterojense, $1/n$ değeri o kadar sıfıra yakın olur. Bu izotermin doğruluğu, heterojen adsorbsiyon sistemlerinde Langmuir izotermine göre daha iyidir.

Tablo 1.9. İmmobilize Lipazın Langmuir ve Freundlich Parametreleri.

Langmuir Sabitleri				Freundlich Sabitleri		
K_L (mL/g)	a_L (mL/mg)	K_L/a_L (mg/g)	R^2	K_F (mL/g)	$1/n$	R^2
10,24	0,76	13,47	0,9524	6,15	0,3437	0,9216

Tablo 1.9 Langmuir ve Freundlich sabitlerini göstermektedir. Tablo değerlerinden de görüldüğü üzere monomoleküler tabaka kapasitesi K_L/a_L (Q_{max}) 13,47 mg protein/g Spo-E'dir, boyutsuz olan R_L dağılma değeri 0,036 olarak bulundu. Freundlich izoterm denklemindeki heterojenite faktörü $1/n$ 0,3437 olarak hesaplandı.

İzotermelere göre korelasyon katsayıları Langmuir izotermi için 0,9524 Freundlich izotermi için 0,9216 olarak bulundu. Tüm bu deneysel veriler *Candida rugosa* lipazının sporopollenine immobilizasyonunun tek tabakalı adsorpsiyon şeklinde gerçekleştiği yönündeki varsayımımızı doğrulamaktadır. Bu durumda uygulanan adsorpsiyon işleminin Langmuir izotermi'ne daha uygun olduğunu söylemek mümkündür.

5. SONUÇ

Bu çalışmada, lipaz immobilizasyonu için ön işlem gerektirmeyen, enzimin doğrudan immobilize edilebildiği maliyeti düşük yeni bir adsorban seçilmiş ve lipaz immobilizasyonunda kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir;

- Tüm immobilizasyon işlemlerinden önce inkubasyon pH'ı, inkubasyon süresi, çalkalama hızı parametreleri üzerinde çalışılmış ve standart değerler, bulunan aktiviteler göz önünde bulundurularak sırasıyla pH:7,0, 3 saat ve 150 rpm olarak sabitlenmiştir. Enzim ve adsorban oranının aktivite değerine etkisini gözlemlemek amacı ile sabit miktarda alınan adsorbana farklı miktarda enzimler yüklenmiş ve bu oranlara göre aktivite değerleri kıyaslanarak en uygun enzim-adsorban oranının 0,3 olduğuna karar verilmiştir.
- Serbet lipaz için optimum pH değeri 7,0 olarak bulunmuştur. Sporopollenin kullanılarak immobilize edilen enzim için ise optimum pH 6,0-7,0 olarak saptanmıştır.
- Serbet lipaz için optimum sıcaklık değeri 35°C ölçülürken, immobilize edilen enzim için ise bu değer 40 °C olarak bulunmuştur.
- Serbest lipaz 60°C'de 60 dakika tutulduğunda aktifliğini %40, immobilize edilen lipaz aktifliğinin %60' ını korumuştur.
- Çalışmalar sonucunda adsorpsiyon yöntemine göre immobilize edilen lipaz 3 kez kullanım sonunda aktiflikleri %18'e düşmüştür.
- Serbest lipaz 4°C'de depolandığında 14 günün sonunda aktifliğini %100 kaybederken immobilize edilen enzim % 93 bağıl aktiflik göstermiştir. Bu da immobilize formun serbest forma göre başka bir üstünlüğüdür.
- İmmobilize lipazın K_m değeri (1,52 mM) serbest lipazın K_m değerinden (0,44 mM) daha yüksek bulunmuştur. İmmobilize lipazın V_{mak} değeri 29,0 U/mg-protein serbest lipazın V_{mak} değeri ise 115,0 (U/mg-protein) olarak hesaplanmıştır.
- İmmobilizasyon işleminden önce adsorbanın yalın hali (sporopollenin) ve immobilizasyon sonrasında immobilize enzimdeki (Spo-E) fiziksel değişimleri kanıtlamak için taramalı elektron mikroskopunda görüntüler

alınmıştır. Ayrıca her iki madde için de yüksek sıcaklıklardaki stabilite değerleri ve kütle kaybı değerlerine ulaşmak için termal gravimetrik analiz yapılmıştır.

- İmmobilize lipazın Langmuir and Freundlich parametreleri incelenmiştir. Langmuir Sabitleri için şu değerler; K_L :10,24 mL/g, a_L : 0,76 mL/mg, K_L/a_L : 13,47 (mg/g), R^2 : 0,9524 Freundlich Sabitleri için şu değerler; K_F : 6,15 (mL/g), $1/n$: 0,3437, R^2 :0,9216 elde edilmiştir. Kaydedilen bu sonuçlara göre immobilizasyonda kullanılan adsorbsiyonun Langmuir Adsorbsiyon İzotermine uyumluluğunun daha yakın olduğu sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak, sporopollenin immobilizasyon işlemi için adsorban madde olarak kullanılabilmesi noktasında incelenmeye değer olduğu görülmüştür. İmmobilize enzimin aktivitesi ve tüm stabil özellikleri açısından seçilen adsorban ve kullanılan yöntem avantajlar sağlasa da bağlanmada rol oynayan kuvvetlerin zayıf olması nedeniyle enzim desorpsiyona uğradığından endüstride tekrar kullanılabilirlik özelliğinin düşük olması göz önünde bulundurulmalıdır. Ancak, aşağıdaki önerilerin geliştirilmesi durumunda daha iyi sonuçlar elde edileceği düşünülmektedir:

-Yöntem uygulanmadan önce sporopollenin için çeşitli modifikasyon işlemleri yapılması.

-Literatürde aynı desteğe uygulanan farklı immobilizasyon tekniklerinin farklı verimler sağladığı sonuçlarına rastlanmasından yola çıkılarak, sporopollenin için farklı immobilizasyon tekniklerinin çalışılması, bu maddenin sınırlanan kullanım alanını iyileştirmeye gidecektir.

6. KAYNAKLAR

- Al-Duri, B., McKay, G., 1988, "Basic Dye Adsorption on Carbon using a Solid-Phase Diffusion Model", *The Chemical Engineering Journal*, 38: 23-31.
- Akova, A., Kıldiran, G., Turkay, S., Ustun, G., 1996, "İmmobilize Hint Tohumu Lipazının Hidroliz Aktivitesi", *UKMK-2 Bildiri Kitabı*. 9-13 Eylül 1996, İTÜ İstanbul, 1022-1027.
- Akoh, C.C., Min, D.B., 1998, "Microbial Lipases and Enzymatic Interesterification", *Food Lipids-Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, Marel Deccer, Inc., 641-698.
- Aksu, Z., Calık, A., Dursun, A. Y., Demircan, Z., 1999, "Biosorption of Iron(III)-Cyanide Complex Anions to *Rhizopus Arrhizus*: Application of Adsorption Isotherms", *Process Biochem.*, 34: 483-491.
- Aksu, Z., Yener, J., 2001, "A Comparative Adsorption/Biosorption Study of Monochlorinated Phenols onto Various Sorbents", *Waste Management*, 21: 695-702.
- Arslan, M., Temocin Z., Yigitoglu M., 2004, "Removal of Cadmium (II) from Aqueous Solutions Using Sporopollenin", *Fresenius Environmental Bulletin* 13 (7):616-619.
- Akkuş, P., 2006, "Lipaz Kullanılarak Şeker Esteri Sentezi", G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Gebze.
- Brook, J., 1971, "Sporopollenin", Academic Press, 305, London and New York.
- Brook, J, and Shaw, G., 1977, *Trans. Bose. Res. Inst.*, 40(2), London.
- Basri, M., Ampon, K., Yunus, W.M.Z.W., Razak C.N.A., Salleh, A.B., 1993, "Immobilization of Hydrophobic Lipase Derivatives on to Organic Polymer beads", *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 59: 37-44.
- Balcão, V.M., Paiva, A. L., Malcata, F. X., 1996, "Bioreactors with Immobilized Lipases: State of the Art", *Enzyme and Microbial Technology*, 18: 392-416.
- Benjamin, S. and Pandey, A., 1998, "*Candida rugosa* Lipases: Molecular Biology and Versatility in Biotechnology", *Yeast*, 14: 1069–1087.
- Bornscheuer, U.T., 2000, "Enzymes in Lipid Modification", Weinheim: Wiley-VCH.

- Bornscheuer, U.T., Bessler, C., Srinivas, R., and Krishna, S.H., 2002, “Optimizing Lipases and Related Enzymes for Efficient Application”, Trends in Biotechnol., 20: 433-437.
- Bayat, B., 2002, “Comparative Study of Adsorption Properties of Turkish Fly Ashes: I The Case of Nickel(II), Copper(II) and Zinc(II)”, Journal of Hazardous Materials, 95(3): 251-273.
- Bayramoğlu, G., Kaçar, Y., Denizli, A., Arıca, M.Y., 2002, “Covalent Immobilization of Lipase onto Hydrophobic group Incorporated Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Based Hydrophilic Membrane Matrix”, Journal of Food Engineering, 52:367-374.
- Basıbuyuk, M., Forster, C.F., 2003, “An Examination of Adsorption Characteristics of a Basic Dye (Maxilon Red BL-N) on to Live Activated Sludge System”, Process Biochem., 38: 1311-1316.
- Bayramoğlu, G., Kaya, B., Arıca, M.Y., 2004, “Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase onto Spacer –arm Attached Poly (GMA-HEMA-EGDMA) Microspheres”, Food Chemistry, 1-8.
- Bayramoğlu, G., Kaya, B., Arıca, M.Y., 2005, “Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto spacer-arm attached poly(GMA-HEMA-EGDMA) microspheres” Food Chem., 92: 261-268.
- Bakkal, M., 2006, “Tutuklanmış *Candida Rugosa* Lipazı İle Rasemik Naproksen Metil Esterden (S)-Naproksen Üretiminde Proses Parametrelerinin İncelenmesi”, A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Cygler, M., Schrag, J.D.,1999, “Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase”, Biochimica et Biophysica Acta, 1441, 205-214.
- Ceyhan, Ö., Baybaş, 2001, “Adsorption of Some Textile Dyes by Hexadecyltrimethylammonium” Bentonite, D., Turk J Chem, 25: 193-200, TÜBİTAK.
- Chiou, M.S., Li, H.Y., 2002, “Equilibrium and Kinetic Modeling of Adsorption of Reactive Dye on Cros Linked Chitosan Beads”, Chemosphere, 50: 1095-1105.

- Chu, H. C., and Chen, K. M., 2002, “Reuse of Activated Sludge Biomass: I. Removal of Basic Dyes from Wastewater by Biomass”, *Process Bio.*, 37: 595-600.
- Chiou, S.H., Wu, W.T., 2004, “Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups”, *Biometarials*, 25: 197-204.
- Dinçkaya, E., 1996, “Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu”, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, İzmir.
- Ersöz, M., Pehlivan, E., Yıldız S., 1989, “Ligand-exchange Chromatography of Nucleosides, Nucleic Acid Bases and Amines on Copper(II) Glyoximated-Lycopodium Clavatum with Refractive Index Detection”, *Anal. Lett.* 22: 1829.
- Elibol, M., Dursun, O., 2000, “Lipase Production by Immobilised *Rhizopus arrhizus*”, *Process Biochem.*, 36: 219–223.
- Erarslan, A., 2002, , *Bilim Teknik*, 414: 35: 16-18.
- Fennema, O.R., 1985, “Food Chemistry”, Second Edition, Mdi Dekker, Wisconsin, Madison, USA, 371-475.
- Fadıloglu, S., 1996, “Kinetics of Olive Oil Hidrolysis by Free and Immobilized *Candida Rugosa* Lipase” Ph. D. Thesis, Universtiy of Gaziantep, 24–56.
- Fuentes, I.E., Vıseras C.A., Ubialı D., Terrenı M., Alcantara A.R., 2001, *J of Mol. Cat. B: Enzymatic*, 11: 657–663.
- 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.
- Gillies, B., Yamazakı, H., Armstrong, D.W., 1987, “Production of flavor esters by immobilized lipase”, *Biotechnology Letters*, 9: 709-714.
- Gürses, A., Bayrakçeken, S., 1996, “Deneysel Fizikokimya”, Kültür ve Eğitim Vakfı Yayınları. s.20–38
- Gezici, O., Küçükosmanoglu M., Ayar A., 2006, “The Adsorption Behavior of Crystal Violet in Functionalized Sporopollenin-mediated Column Arrangements”, *Journal of Colloid and Interface Science* 304-307.

- Göde, F., Pehlivan, E., 2007, “Sorption of Cr(III) onto Chelating b-DAEG–Sporopollenin and CEP–Sporopollenin Resins”, *Bioresource Technology* 98: 904–911.
- Gao, S., Wang, Y., Wang, T., Luo, G., Dai Y., 2009, “Immobilization of Lipase on Methyl-Modified Silica Aerogels by Physical Adsorption”, *Bioresource Technology*, 100: 996–999
- Hoshino K., Taniguchi M., Katagiri M., Fujii M., 1992, “Properties of Amylase Immobilized on a New Reversibly Soluble–Insoluble Polymer and its Application to Repeated Hydrolysis of Soluble Starch”, *J Chem Eng Jap*, 25: 569-574.
- Hung, T.C., Giridhar, R., Chiou, S.H., Wu, W.T., 2003, “Binary Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase on Chitosan”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26:69-78.
- Ho, Y.S., Wang, C.C., 2004, “Pseudo-Isotherms for the Sorption of Cadmium Ion onto Tree Fern”, *Process Biochem.*, 39: 759-763.
- Iwai, M., Tsuyisaka, M., Fukumoto, J., 1964, “Lipase. II. Hydrolytic and Esterifying Actions of Crystalline Lipase of *Aspergillus Niger*”, *Genetic Applied Microbiology*, 10: 13-22.
- Ivanov A.E., Schneider M.P., 1997, “Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis” *J. of Mol. Cat. B. Enzymatic*, 3: 303–309.
- Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., and Shrestha, S., 2001, “Production of Biodiesel Fuel From Triglycerides and Alcohol Using Immobilized Lipase”, *J. Mol. Catal. B Enzymatic*, 16: 53–58.
- Jaeger, K.E., Reetz, M.T., 1998, “Microbial Lipases from Versatile Tools for Biotechnology”, *Trends in Biotechnology*, 16(9): 396-403.
- 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.
- Kraulis, P.J., 1991, “Molscript: A program to Produce Both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures”, *Journal. Application. Crystallography.*, 24: 946-950.

- Koç, L., 1994, “Katı Yağların Serbest ve İmmobilize Lipazla Hidrolizi” Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kennedy, J.F., 1995, “Handbook of Enzyme Biotechnology”, Third Edition, Ellis Horwood, 235-310, (Editör Allen Wisemann).
- 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.
- Kutay, F., 2002, “Enzimler”, İnsan Biyokimyası, Taner Onat, Kaya Emerk, Eser Y.Sözmen, Palme Yayıncılık, Ankara, 197–202.
- Keskinkan, O., Goksu, M.Z.L., Yuceer, A., Basıbuyuk, M., Forster, C.F., 2003, “Heavy Metal Adsorption Characteristics of A Submerged Aquatic Plant (*Myriophyllum spicatum*)”, *Process Biochem.*, 39(2): 179-183.
- 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.
- Lawson, D.M., Brzozowski, A.M., Rety, S., Verma, C., Dodson, G.G., 1994, “Probing the Nature of Substrate Binding in *Humicola Lanuginosa* Lipase Through X-ray Crytallograpy and İntuivite Modelling”, *Protein Engineering*, 7:543-550.
- Mckay, G., Otterburn, Ms., Sweeney, Ag., 1980. “The Removal of Clour from Effluent Using Various Adsorbents”, *Silica Rate Processes, Water Research*,14: 15-20.
- Moon, H., J.Lee, W.K., 1983, “Intraparticle Diffusion in Liquid-Phase Adsorption of Phenols with Activated Carbon in Finite Batch Adsorber”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 96: 162-171.
- Macrae, A.R., and Hammond, R.C., 1985, “Present and Future Applications of Lipases”, *Biotech. Genet. Eng.Rev.*, .3: 193-217.
- Montero, S., Blanco, A., Virto, M.D., Landeta, L.C., Agyd, I., Solozabal, R., Lascaray, J.M., Renobales, M., Serra, J.L., 1993, “İmmobilization of *Candida rugosa* lipase and Some Properties of the İmmobilised Enzyme”, *Enzyme Microbial. Technol.*, 15: 239-247.

- Manfred, T.R., 2002 “Lipases as Practical Biocatalysts”, *Current Opinion in Chemical Biology*, 6: 145-150.
- Minovska, V., Winkelhausen, E., and Kakuzmanova, S., 2005, “Lipase Immobilized by Different Techniques on Various Support Materials Applied in Oil Hydrolysis”, *J. Serb. Chem. Soc.* 70 (4): 609–624.
- Ng, J.C.Y., Cheung, W.H., McKay, G., 2003, “Equilibrium Studies for the Sorption of Lead from Effluents Using Chitosan”, *Chemosphere*, 52: 1021-1030.
- Ota, Y., Gomi, K., Kato, S., Sugiura, T., and Minoda, Y., 1982, “Purification and Some Properties of Cell-bound Lipase from *Saccharomyces Cerevisiae* Lipolytica”, *Agric. Biol. Chem.*, 46: 2885-2893.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolova, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J.L., Verscheuren, K.H.G., Goldman, A., 1992, “The α/β hydrolase fold”, *Protein Engineering*, 5: 197-211.
- Öztürk, N., 2006, “Hidroforik Nanoyapılarda *Candida Rugosa* Lipaz İmmobilizasyonu” A.M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- Pekin, B., 1978, “Fizikokimya Dersleri”, E.Ü Fen Fakültesi, Kayseri.
- Pronk, W., Kerkhof, P.J.A. M., Van Helden, C., Van't Riet, K., 1988, “The Hydrolysis of Triglycerides by Immobilized Lipase in a Hydrophilic Membrane Reactor”, *Biotechnology and Bioengineering*, 32: 512-518.
- Pehlivan, E., 1991, “*Lycopodium Clavatum*’dan Elde Edilen Ligand Değiştirici Reçinelerin Hazırlanması ve Sıvı Kolon Kromatografisinde Kullanılarak Nükleosid, Nükleik Asit Bazları, Aminlerin Ayrılması ve Kinetiğinin İncelenmesi”, S.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya.
- Palmieri G., Giardina P., Desiderio B., Marzullo L., Giamberrini M., Sanna G.A., 1994, “New Enzyme Immobilization Procedure Using Copper Alginate Gel: Application to a Fungal Phenol Oxidase”, *Enzyme Microb. Technol.*, 16:151-8.
- Pehlivan, E., Ersöz, M., Pehlivan, M., Yıldız, S., and Duncan, H.J., 1993, “The Effect of pH and Temperature on the Sorption of Zn(II), Cd(II) and

- Al(III) onto New Metal-Ligand Complexes of Sporopollenin”, *J. of Colloid and Interface Sci.* 168:000-000.
- Pehlivan, E., Ersöz, M., Yıldız, S., and Duncan, H.J., 1994, “Sorption of Heavy Metal Ions on New Metal-Ligand Complexes Chemically Derived from *Lycopodium Clavatum*”, *Separation Science and Technology*, 29(13): 1757-1768.
- 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.
- Pencreac’h, G., Baratti, J.C., 1999, “Properties of Free and Immobilized Lipase from *Bulkholderia Cepacia* in Organic Media”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52: 276-280.
- 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.
- Panzavolta F., Soro S., D’amato R., Palocci C., Cernia E., Russo M.V., 2005, “Acetylenic Polymers as New Immobilization Matrices for Lipolytic Enzymes”, *J of Mol. Cat. B: Enzymatic*, 3267–3276.
- Pehlivan, E., Cetin, S., Yanık, B. H., 2006, “Equilibrium studies for the sorption of zinc and copper from aqueous solutions using sugar beet pulp and fly ash”, *J. Hazard. Mater.* B135:193-199.
- Pehlivan, E., Arslan, G., 2007, “Removal of metal ions using lignite in aqueous solution-low cost biosorbents”, *Fuel Process. Technol.* 88: 99-106.
- Rubin, B., Dennis, E.A., 1997, “Lipases: Part B: Enzyme Characterization and Utilization, *Methods in Enzymology*”, 286, New York: Academic Press, 1-563.
- Perez, V.H, Grazielle S. da Silva, Fabr´ıcio M Gomes, Heizir F., 2007, “Influence of the Functional Activating Agent on the Biochemical and Kinetic Properties of *Candida Rugosa* Lipase Immobilized on Chemically Modified Cellulignin Castro”, *Biochemical Engineering Journal*, 34:13-19

- Sawyer, C. N., Mccarty, P.L., 1978, “Chemistry for Environmental Engineering”, McGraw Hill Inc., 519.
- Smith, J.M., 1981, “Chemical Engineering Kinetics”, McGraw-Hill International Book London.
- Shaw, J.F., Changı, R.C., Wang, F.F., Wang, Y.J., 1990, “Lipolytic Activities of a Lipase Immobilized on Six Selected Supporting Materials”, *Biotechnology and Bioengineering*, 35: 132-137.
- Schmidt, R.D., and Verger, R., 1998 “Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications”, *Agnew Chem. Int. Ed. Engl.*, 37: 1608-1633.
- Sağıroğlu, A., Kılınç, A., Telefoncu, A., 2004, “Preparation and Properties of Lipases Immobilized on Different Supports”, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 32: 625-636.
- 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.
- Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., and Solinas, V., 2005, “Biodiesel Production from Triolein and Short Chain Alcohols Through Biocatalysis”, *Journal of Biotech.*, 119(3): 291-299.
- Sökmen, B.B., 2005, “Kayısı (*Armeniaca Vulgaris Lam.*) Tohumlarından Lipazın Saflaştırılması Ve Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilize Edilmesi”, İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi , İstanbul.
- Stephen L. Atkin, S.L., Barrier, S., Beckett, S.T., Brown T., Mackenzie, G., Madden, L., “Encapsulation of Proteins and Oligonucleotides into Sporopollenin Exines and their Potential Application to Drug Delivery”, Department of Chemistry, University of Hull.
- Şahan, A., 2007, “Farmosetik Maddelerin Aktif Çamur Arıtma Prosesinde Abiyotik Gideriminin İncelenmesi”, Ç. Ü.Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., and Solinas, V., 2008, “Comparison among Immobilised Lipases on Macroporous Polypropylene toward Biodiesel Synthesis”, *J. of Mol. Catal. B: Enzymatic* 54: 19–26

- Tomizuka, N., Ota, Y., and Yamada, K., 1966, "Studies on Lipase from *Candida cylindracea* I, Purification and Properties", *Agric. Biol. Chem.*, 30: 576-584.
- Tsujisaka, Y., Iurai, M., Fukumoto, J., and Okamoto, Y., 1973, "Induced Formation of Lipase by *Geotrichum candidum* Link", *Agric. Biol. Chem.*, 37: 837-842.
- Telefoncu A., 1986, "Temel ve Uygulamalı Enzimoloji", *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı*, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- Telefoncu, A., Dinçkaya, E., Verlop, K.D., 1990, "Preparation and Characterization of Pancreatic Lipase Immobilized in Eudragit-Matrix", *Application Biochemistry Biotechnology*, 26(3): 311-317.
- Telefoncu, A., 1997, "Enzimoloji", Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, İzmir, 1-305.
- Undurraga, D., Markovits, A., Erazo, S., 2001, "Cocoa Butter Equivalent through Enzymic Interesterification Palm Oil Midfraction", *Process Biochemistry*, 36: 933-939.
- Vulfson, E. N., 1994, "Industrial Applications of Lipases, In: Wooley, P., Peterson, S. B., editors, "Lipases-their Structure Biochemistry and Applications", Cambridge University Pres, 271-288.
- 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.
- Vecchia R.D., Sebrao D., Nascimento M.G., Soldı V., 2005, "Carboxymethylcellulose and poly(vinyl alcohol) used as a film support for lipases immobilization" *Process Biochemistry*, 40: 2677-2682.
- Wiseman, A., 1986, "Handbook of Enzyme Biotechnology", 2nd Edition, Jon Wiley & Sons, Chicester, England.
- Whellcuright, S.M., 1991, "Protein Characteristics", *Protein Purification: Design and Scale up of Downstream Processing*, Oxford University Pres, New York, 26-40.

- Wong, Y. C., Szeto, Y. S., Cheung, W.H., Mckay, G., 2004, “Adsorption of Acid Dyes on Chitosan –Equilibrium Isotherm Analyses”, *Process Biochem.*, 39: 693-702.
- Wu, J.C., Lee, S:S, Mahmood, M.M.B., Yvonne Chow, Y., Talukder M.M.R., Choi, W.J., 2007, “Enhanced Activity and Stability of Immobilized Lipases by Treatment with Polar Solvents prior to Lyophilization”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 45: 108–112.
- Ye, P., Xu, Z.K., Che, A.F., Wu, Y.C., Seta, P.E, 2005, “Chitosan-Tethered Poly(acrylonitrile-co-maleic acid) Hollow Fiber Membrane for Lipase Immobilization”, *Biomaterials*, 26: 6394-6403.
- Yağız, F., 2006, “Hidrotalsit Ve Zeolit Üzerine Tutuklanmış Lipaz ile Yemeklik Atık Yağlardan Biyodizel Üretimi” K.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli.
- Zaitsev, S.Y., Gorokhova, I.V., Kashtigo, T.V., Zintchenko, A., Dautzenberg, H., 2003, “General Approach for Lipases Immobilization in Polyelectrolyte Complexes”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineering Aspects*, 221: 209-220.