

**POLİ(N,N-DİMETİLAKRİLAMİT-ko-AKRİLAMİT) VE POLİ(N-İZOPROPİLAKRİLAMİT-ko-AKRİLAMİT)/κ-KARRAGENAN
POLİMERLERİ KULLANILARAK LİPAZ ENZİMİNİN
İMMOBİLİZASYONU**

Nagihan KARACA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2006

**POLİ(N,N-DİMETİLAKRİLAMİT-ko-AKRİLAMİT) VE POLİ(N-İZOPROPİLAKRİLAMİT-ko-AKRİLAMİT)/κ-KARRAGENAN
POLİMERLERİ KULLANILARAK LİPAZ ENZİMİNİN
İMMOBİLİZASYONU**

Nagihan KARACA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2006
ANKARA**

Nagihan KARACA tarafından hazırlanan Poli(N,N-Dimetilakrilamit-ko-Akrilamit) ve Poli(N-İzopropilakrilamit-ko-Akrilamit)/κ-Karragenan Polimerleri Kullanılarak Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu adlı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.



Yrd.Doç.Dr. Hayrettin TÜMTÜRK
Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir

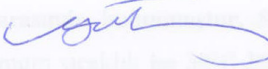
Başkan : Prof. Dr. Mehlika PULAT



Üye : Prof. Dr. Halil İbrahim ÜNAL



Üye : Prof. Dr. Mustafa Yiğitoğlu



Üye : Yrd. Doç. Dr. Haydar ALTINOK



Üye : Yrd. Doç. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK



Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.



**POLİ(N,N-DİMETİLAKRİLAMİT-ko-AKRİLAMİT) VE POLİ(N-İZOPROPİLAKRİLAMİT-ko-AKRİLAMİT)/κ-KARRAGENAN
POLİMERLERİ KULLANILARAK LİPAZ ENZİMİNİN
İMMOBİLİZASYONU**

(Yüksek Lisans Tezi)

Nagihan KARACA

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ocak 2006**

ÖZET

Sunulan bu çalışmada, lipaz enzimi (E.C. 3.1.1.3) Poli(N,N-dimetilakrilamit-ko akrilamit) ve Poli(N-izopropilakrilamit-ko-akrilamit)/κ-Karragenan polimerleri kullanılarak kovalent bağlanma ve hapsedme yöntemi ile immobilize edilmiştir. Serbest enzim için K_m ve V_{mak} değerleri sırasıyla 3,58 mM ve 10,72 mM . dakika⁻¹, immobilize enzimler için ise K_m değerleri 7,36 ve 5,77 mM ve V_{mak} değerleri 7,13 mM.dakika⁻¹ ve 11,31 mM.dakika⁻¹ arasında bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzim için, optimum pH 8, optimum sıcaklık ise 30°C-35°C olarak bulunmuştur. Enzimin tekrar kullanım sayısı, depolama ve termal kararlılığı immobilizasyon işlemi ile arttırılmıştır.

Bilim kodu : 201.1.117
Anahtar Kelimeler : Lipaz, İmmobilizasyon, Karragenan, Kovalent bağlanma, Hapsedme
Sayfa Adedi : 61
Tez Yöneticisi : Yrd.Doç.Dr. Hayrettin TÜMTÜRK

**IMMOBILIZATION OF LIPASE BY USING POLY(N,N-DIMETHYLACRYLAMIDE-co-ACRYLAMIDE) AND POLY(N-IZOPROPYLACRYLAMIDE-co-ACRYLAMIDE)/κ-CARRAGEENAN
POLYMERS
(M. Sc. Thesis)**

Nagihan KARACA

**UNIVERSITY OF GAZİ
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
JANUARY 2006**

ABSTRACT

In the present study, immobilization of lipase (E.C. 3.1.1.3) via covalent bonding and entrapment were carried out by using Poly(N,N-dimethylacrylamide-co-acrylamide) and Poly(N-izopropylacrylamide-co-acrylamide)/κ-Carrageenan. Maximum reaction rate (V_{mak}) and Michealis-Menten constant (K_m) values were found as 10,72 mM.min⁻¹, and 3,58 mM respectively. For immobilized enzymes these constants were also observed to be 7,13 mM.min⁻¹ and 11,31 mM.min⁻¹ and 7,36 mM and 5,77 mM respectively. For free and immobilized enzymes optimum pH were found to be 8 and the optimum temperature for free and immobilized enzymes were observed to be 30°C-35°C. Reuse number, storage and thermal stabiltiy of lipase was increased by immobilization procedure.

Secience code : 201.1.117
Key Words : Lipase, Immobilization, Carrageenan, Covalent Bonding, Entrapment
Page number : 61
Adviser : Asst.Prof.Dr. Hayrettin TÜMTÜRK

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince yardımını ve desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK' e, çalışmalarım süresince her türlü yardımları ile beni destekleyen arkadaşlarım Araş. Gör. Gökhan DEMİREL ve Ferat ŞAHİN' e arkadaşlıkları ile her zaman yanımda olan, destekleyen Araş. Gör. Ümmühan YILMAZ'a, Araş. Gör. Saliha ALYAR'a, Dr. Haşim YILMAZ'a, arkadaşlıkları ve yardımları için sevgili Filiz KARA'ya, Berrin AKKAYA'ya, Gül TUNÇ'a ve Ayşe YAHŞİ' ye, bugüne kadar ki öğrenim hayatım boyunca sabır ve anlayışla yanımda olan, maddi-manevi desteklerini esirgemeyen her şeyim olan aileme ve sevgili eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Enzimler ve Genel Özellikleri.....	2
2.2. Enzimatik Bir Tepkimenin Hızını Etkileyen Faktörler	3
2.3. Lipaz Enzimi.....	5
2.3.1. Lipazların kaynakları	6
2.3.2. Lipazların özellikleri.....	8
2.3.3. Lipazların sınıflandırılması	10
2.3.4. Lipazların katalizlediği reaksiyonlar	11
2.3.5. Lipazların endüstriyel kullanım alanları	12
2.4. Enzim İmmobilizasyonu.....	15
2.4.1. Taşıyıcı destek materyali	17
2.4.2. Polimerler.....	18
2.4.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	24
2.4.4. İmmobilize edilen enzimden beklenen özellikler.....	29

Sayfa

2.4.5. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması.....	29
3. DENEYSEL KISIM.....	32
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
3.2. Kullanılan Aletler.....	35
3.3. Kullanılan Çözeltiler	35
3.4. Enzim İmmobilizasyonu	35
3.4.1. P(DMAAm-ko-AAm) kullanılarak enzim immobilizasyonu	35
3.4.2. P(NİPA-ko-AAm)/κ-Karragenan kullanılarak enzim immobzasyonu..	38
3.5. p-Nitrofenil Palmitat Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması	39
3.6. Aktivlik Tayini	40
3.6.1. Serbest lipazın aktivlik tayini	40
3.6.2. İmmobilize lipazın aktivlik tayini.....	40
3.7. Aktivliğe pH'nın Etkisi.....	40
3.7.1. Serbest lipazın aktivliğine pH'nın etkisi.....	40
3.7.2. İmmobilize lipazın aktivliğine pH'nın etkisi	40
3.8. Aktivliğe Sıcaklığın Etkisi.....	41
3.8.1. Serbest lipazın aktivliğine sıcaklığın etkisi.....	41
3.8.2. İmmobilize lipazın aktivliğine sıcaklığın etkisi	41
3.9. Aktivliğe Substrat Derişiminin Etkisi	41
3.9.1. Serbest lipazın aktivliğine substrat derişiminin etkisi	41
3.9.2. İmmobilize lipazın aktivliğine substrat derişiminin etkisi	41
3.10. Depolanma Kararlılığı.....	42

Sayfa

3.10.1. Serbest lipazın depolanma kararlılığı.....	42
3.10.2. İmmobilize lipazın depolanma kararlılığı	42
3.11. Termal İnaktivasyon	42
3.11.1. Serbest lipazın termal inaktivasyonu	42
3.11.2. İmmobilize lipazın termal inaktivasyonu.....	42
3.12. İmmobilize lipazın tekrar kullanım sayısı.....	43
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA	44
4.1. Aktifliğe pH'nın Etkisi	44
4.2. Aktifliğe Sıcaklığın Etkisi.....	45
4.3. Aktifliğe Substrat Değişiminin Etkisi	47
4.4. Serbest ve İmmobilize Lipazın Depolanma Kararlılığı.....	49
4.5. Serbest ve İmmobilize Lipazın Termal Kararlılığı	50
4.6. İmmobilize Lipazın Tekrar Kullanılabilirliği	52
5. SONUÇLAR.....	54
KAYNAKLAR.....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	61

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Bazı lipaz enzimi örneklerinin özellikleri.....	9
Çizelge 2.2. Enzim immobilizasyonunda kullanılan destek materyalleri.....	18
Çizelge 2.3. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması	30
Çizelge 2.4. Serbest ve immobilize enzim özelliklerinin karşılaştırılması	31
Çizelge 4.1. Serbest ve immobilize lipazın kinetik parametreleri.....	48
Çizelge 4.2. Serbest ve immobilize lipazın termal kararlılığı	52

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Homicola lanuginosa</i> lipazının üç boyutlu yapısı	6
Şekil 2.2. Spesifik lipazların katalizlediği reaksiyonun denklemi	10
Şekil 2.3. 1,3-Spesifik lipazların katalizlediği reaksiyonun denklemi	10
Şekil 2.4. Yağ asiti spesifik lipazların katalizlediği reaksiyonun denklemi	11
Şekil 2.5. PNIPA hidrojelinin şişme oranının sıcaklıkla değişimi	21
Şekil 2.6. Karragenanın tekrarlanan birimlerinin yapısı.....	23
Şekil 2.7. κ-Karragenanın yapısı	23
Şekil 2.8. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması	25
Şekil 3.1. APS ile TEMED reaksiyonu sonucunda oluşan ortaklanmamış tek elektron içeren aktif TEMED molekülünün monomere katılması sonucu oluşan radikal	36
Şekil 3.2. Kimyasal yöntemle sentezlenen P(DMAAm-ko-AAm) polimerlerinin olası reaksiyon mekanizması.....	37
Şekil 3.3. P(DMAAm-ko-AAm) desteğinin epiklorhidrin ile aktifleştirilmesi	38
Şekil 3.4. p-nitrofenil palmitat kalibrasyon grafiği	39
Şekil 4.1. Serbest ve immobilize lipazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi	45
Şekil 4.2. Serbest ve immobilize lipazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi.....	47
Şekil 4.3. Serbest ve immobilize lipazın maksimum aktifliğinin substrat derişimi ile değişimi.....	49
Şekil 4.4. Serbest ve immobilize lipazın maksimum aktifliğinin depolanma süresi ile değişimi.....	50
Şekil 4.5. Serbest ve immobilize lipazın maksimum aktifliğinin zaman ile değişimi	52
Şekil 4.6. İmmobilize lipazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi ...	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
β	Beta
μm	Mikrometre
κ	Kappa
K_m	Michaelis sabiti
UV	Ultraviyole
V_{mak}	Maksimum hız
Kısaltmalar	Açıklama
AAm	Akrilamit
APS	Amonyum persülfat
BAAm	N,N-metilen-bis-akrilamit
ECH	Epiklorhidrin
NİPA	N-izopropil akrilamit
P	Poli
P(DMAAm-ko-AAm)	Poli(N,N-dimetilakrilamit-ko-akrilamit)
P(NİPA-ko- AAm)-κ-Karragenan	Poli(N-izopropilakrilamit-ko-akrilamit)-kappa-karragenan
p-NPP	para-nitrofenil palmitat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin

1. GİRİŞ

Enzimlerden günlük hayatta yararlanma olgusu oldukça eskidir. İnsanlar farkında olmadan enzimlerden; ekmek, peynir, bira, şarap vb. maddelerin yapımında ve ayrıca ilaç olarak yararlanmışlardır (1).

Enzimlerin yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamları dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkanını sağlamaktadır. Dolayısıyla enzimler başta biyokimya ve moleküler biyoloji olmak üzere fizikokimya, organik kimya, genetik, tıp, mühendislik gibi bilim dalları ile çeşitli endüstriyel alanlar için büyük önem taşımaktadır (1,2).

Enzimlerin kimyasal katalizörlere olan üstünlükleri son zamanlarda endüstride enzimlerin 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 tekrarlanabilir kullanımlara girmeleri özellikle ekonomik açıdan büyük önem taşır (1).

Bu çalışmada lipaz enzimi polimerik destekler üzerine kovalent bağlanma ve hapsedme yöntemleri ile immobilize edildi. Bu amaçla Poli(N,N-dimetilakrilamit-ko-akrilamit) ve Poli(N-izopropilakrilamit-ko-akrilamit)/κ-karragenan polimerleri hazırlandı. Poli(N,N-dimetilakrilamit-ko-akrilamit) epiklorhidrin ile aktifleştirildi. Immobilize ve serbest lipazın aktifliğine etki eden sıcaklık, pH, substrat derişimi, depolama süresi gibi çeşitli parametrelerin etkisi ve enzimin tekrar kullanılabilirliği incelendi ve sonuçlar birbiri ile karşılaştırıldı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler ve Genel Özellikleri

Enzimler, canlı hücrede meydana gelen kimyasal reaksiyonları katalizleyen veya düzenleyen protein yapısında biyolojik katalizörlerdir. Kendileri herhangi bir değişime uğramadan canlı sistemlerde oluşan kimyasal tepkimelerin hızını artırır. Organizmadaki organik moleküllerin yapımı, yıkımı, kas hareketleri ve solunum gibi fizyolojik olaylar enzimlerin yardımıyla yürütülmektedir (1,2).

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 herikisi de katalizde işlevseldir.

Enzimlerin katalizledikleri tepkimelerde tepkimeye giren bileşenler ‘substrat’ olarak adlandırılır. Enzimler, katalizör olarak kimyasal tepkimelerin dengeye ulaşmasını çabuklaştırır. 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 tepesini aşması gerekir. Eğer ara ürün enerji tepesini ya da engelini 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. İşte enzimler, kolaylaştırdıkları tepkimenin hızını onun aktivasyon enerjisini düşürerek artırır.

Enzimlerin üç boyutlu katlanmış protein moleküllerinden oluşan yapısında ancak özgün substrat moleküllerinin bağlanabildiği, katalizden sorumlu bir bölge vardır. Bu bölgeye enzimin aktif bölgesi denir. Bunlar, aminoasit kalıntılarından oluşmuş ve özel geometrisi olan yerlerdir. Bu nedenle enzimler özgünlüğü 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 (2).

Enzimlerin kimyasal katalizörlere göre üstünlükleri şu şekilde sıralanabilir:

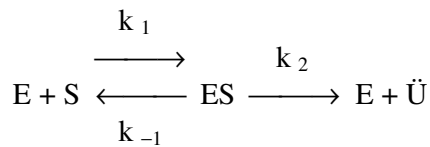
1. Kimyasal katalizörlere göre reaksiyonu 10^8 - 10^{11} kez daha hızlı gerçekleştirirler.
2. Enzimler reaksiyonun tipine ve substrata karşı son derece spesifiktir. Bu nedenle enzimatik reaksiyonlarda yan ürün oluşmaz. Verim %100' dür.
3. Enzimlerin çok çeşitli doğal kontrol mekanizmaları vardır. Enzimlerin aktivitesi içerisinde bulundukları şartlara göre düzenlenebilir. Ortamdaki kontrol edici küçük moleküllere göre de enzim aktivitesi azalabilir ya da artabilir.
4. Fizyolojik pH, sıcaklık ve basınçta (ılımlı koşullar) çalışabilmeyi sağlarlar. Ayrıca reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonu daha az enerjili ve düşük sıcaklıkta gerçekleştirirler (3).

2.2. Enzimatik Bir Tepkimenin Hızını Etkileyen Faktörler

- Sıcaklık: Diğer kimyasal tepkimelerde olduğu gibi, enzimatik tepkimelerde de sıcaklığın artması ile moleküller arası çarpışmanın artışına bağlı olarak genellikle tepkimenin hızı artmaktadır. Ancak, maksimum bir hıza ulaşıldıktan sonra sıcaklığın artışı ile hızda tekrar bir azalma gözlenmektedir. Maksimum hıza ulaşıldığındaki sıcaklığa optimum sıcaklık adı verilmektedir. Enzimler protein yapısında olduğu için bu sıcaklığın üzerinde denatürasyona uğramaktadırlar. Bundan, önce enzimin molekül yapısı etkilenir. Daha sonra enzimin aktif merkezide etkilenerek, tepkime hızı düşer.

- pH: Enzimlerin aktiviteleri, ortamın hidrojen iyon derişimine bağı olarak değışmektedir. Enzimatik tepkimenin hızının maksimum olduğı ve her enzim için değışik olan bir optimum pH değıeri bulunmaktadır. pH değışikliğı ile amino asit zincirinin iyonik özelliğı değıştiğı için denatüre olan enzimin katalitik aktivitesi kaybolmaktadır.
- 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 diğıer koşullar değışmediğinde tepkimenin hızı, başlangıçta substrat derişiminin artırılması ile doğrusal bir artış göstermektedir. Fakat substrat eklendikçe hız giderek daha az artmakta ve belirli bir substrat derişiminde maksimum hıza (V_{mak}) ulaşmaktadır. Substrat derişiminin daha fazla artmasına rağmen tepkime hızı değışmemektedir (4).

Enzim-substrat (ES) kompleksine ait tepkime,



Bu eşitlikte; E = enzim, S = substrat, ES = enzim-substrat kompleksi, $\ddot{U}$ = ürünü gösterir.

Enzim tepkime hızı Michaelis-Menten eşitliğı ile verilir.

$$V = \frac{V_{mak} \cdot S}{K_m + S} \quad \text{Michaelis-Menten Eşitliğı} \quad [2.1]$$

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

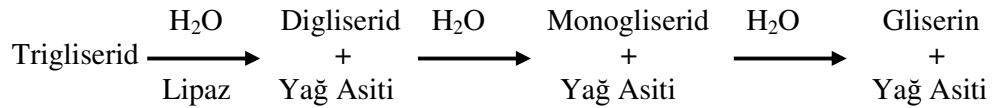
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\text{mak}}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\text{mak}}} \quad \text{Lineweaver-Burk Bağıntısı} \quad [2.2]$$

Bu eşitlikte; V = başlangıç hızı, V_{mak} = maksimum hız, K_m = Michaelis sabiti, S = substrat derişimi olarak belirtilir.

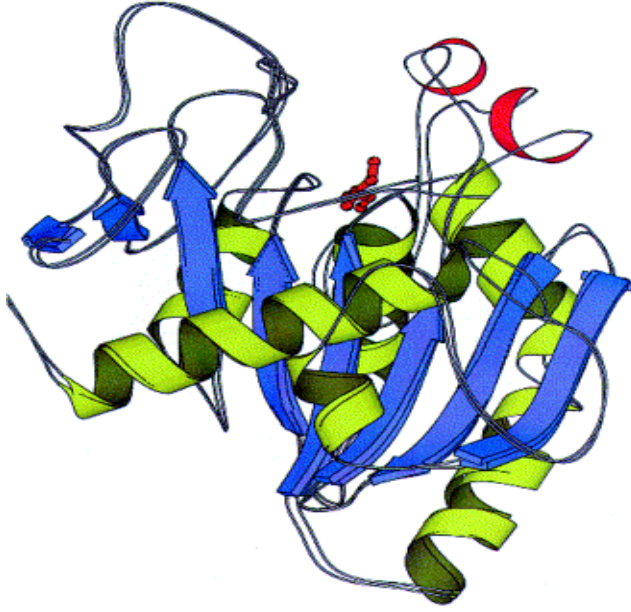
2.3. Lipaz Enzimi

Normal şartlar altında bitkisel ve hayvansal yağların tersinir hidrolizini kataliz eden enzimlerdir. Adlandırması ; E.C. 3.1.1.3 Triaçilgliserol Açıl Hidrolaz şeklindedir. Son 10 yıl içinde lipaz enzimi araştırmalarına olan ilgi artmıştır. Bu temel olarak lipazların benzersiz yapısal karakteristiklerine bağlı bir durumdur. Lipazlar çok çeşitli substratları kullanabilme yeteneğine sahiptir. 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 (5-9).

Etkin olduğu hidroliz reaksiyonu genel olarak şu şekilde verilmektedir (10).



Günümüzde enzimlerin üç boyutlu yapıları, ayrıntılı bir şekilde X-ışınları kristalografisi ile görüntülenebilmektedir. Şekil 2.1 lipaz enziminin tam bir yapısıdır. *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 (11,12).



Şekil 2.1. *Humicola lanuginosa* lipazının üç boyutlu yapısı

2.3.1. Lipazların kaynakları

Lipazlar hayvanlar, bitkiler ve mikrobiyolojik kaynaklardan elde edilebilirler. Bitkisel lipazlar; örneğin hint yağı bitkisi tohumu, gene otu gibi yağlı tohumlarda bulunur. Memelilerde, lipaz pankreas tarafından sentezlenir. Sentezlenen lipaz yardımıyla trigliseridler hidroliz edilir. Oluşan monogliseridler ve serbest yağ asitleri mukoza hücrelerinin epitelyum zarları tarafından hücre içine emilir ve hücre içinde yeniden trigliseridlere dönüştürülürler. Mikroorganizma kaynaklı lipazlar ise bakteri, maya ve mantarlardan elde edilmektedir (10).

Lipaz, doğada bulunuş şekline göre şöyle sınıflandırılabilir:

1. Hayvansal Lipazlar

a. Sindirim sistemi lipazları:

Pankreas lipazı

İnce bağırsak lipazı

b. Doku lipazları

Lipoprotein lipazı

Adipoz dokusu lipazı

Karaciğer lipazı

c. Süt lipazları

2. Bitkisel Lipazlar

Gene otu lipazı

Buğday, yulaf, mısır lipazları

3. Mikroorganizma Lipazları

a. Bakteriyel lipazlar

Pseudomonas spp.

Lactobacillus spp.

Streptococcus faecalis

b. Mantar türü lipazlar

Aspergillus niger

Candida cylindracea

Humicola lanuginosa

2.3.2. Lipazların özellikleri

Lipazın aktivasyon ve inhibisyonu

İyonların ve reaktiflerin lipaz aktivitesine olan etkilerinin incelenmesi sonucu, ağır metal iyonlarının lipaz aktivitesini inhibe ettiği bunun tersi olarak alkali metal iyonlarının ise artırdığı görülmüştür. Lipaz aktifliği üzerine en etkili iyon Ca^{2+} 'dır. Lipaz aktivitesini inhibe eden maddelere Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Sn^{2+} , boronik asitler ve dietil-p-dinitrofenil fosfat örnek olarak verilebilir. Çizelge 2.1'de örnek verilmiştir (13).

Optimum pH

Lipazlar belli pH değerlerinde katalitik olarak aktiftir. Lipazların çoğu için optimum pH 7-8 arası değişir. Mikrobiyolojik kaynaklı lipazlar pH= 6,0-7,5 civarında yüksek kararlılık gösterirler (14).

Optimum sıcaklık ve termal kararlılık

Genel olarak lipazların maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı 30-40°C dır. Hayvan ve bitki lipazları genellikle hücre dışı mikrobiyal (mantar ve bakteri) lipazlara göre daha az termal kararlılık gösterir. Pankreatik lipazlar 40°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda aktivitelerini kaybederler (14).

İzoelektrik nokta (pI)

Net yükü sıfır olan noktadır. pI civarında proteinler daha az çözünürken pI dan uzaklaştıkça daha fazla çözünürler. Çizelge 2.1'de örnek verilmiştir (14-16).

Çizelge 2.1. Bazı lipaz enzimi örneklerinin özellikleri

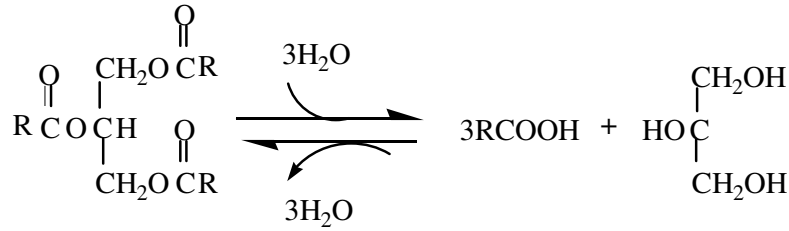
Kaynak	Spesifik pozisyonu	pI	İnhibitörler	Aktivatörler
Domuz pankreası	1,3 Spesifik	–	Ca^{2+} , Sr^{2+} Mg^{2+}	Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Versen, iyodin PCMB
<i>Phycomyces nitens</i>	–	5.9	Ag^+ , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , KmnO_4 , NBS	Mammalian Bile
<i>Aspergillus niger</i>	1,3 Spesifik	4.1	Ag^+ , 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+}

2.3.3. Lipazların sınıflandırılması

Lipazları özelliklerine göre üç ayrı grupta inceleyebiliriz (1):

Spesifik olmayan (Non-spesifik) lipazlar

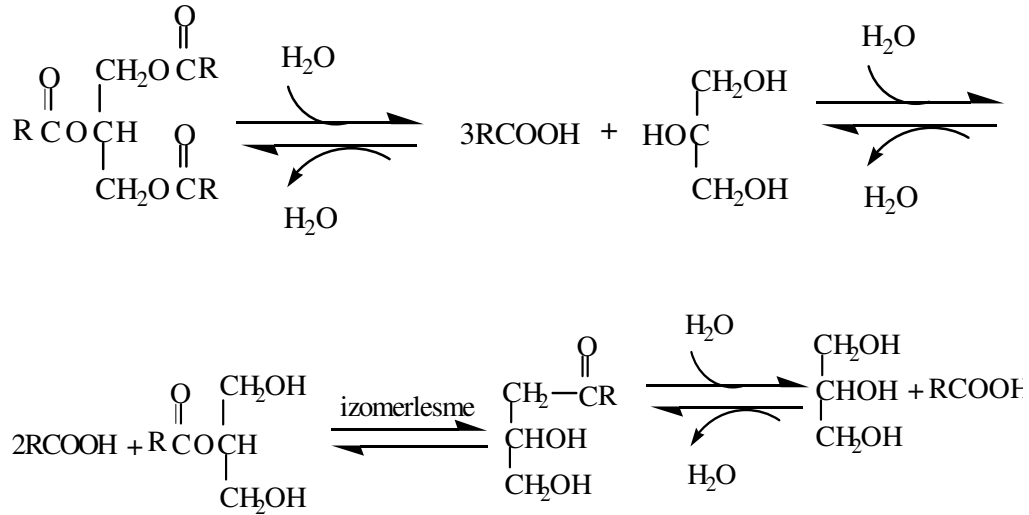
Bu gruba giren enzimler trigliseridlerin tüm pozisyonlarındaki açıl gruplarını koparabilme yeteneğine sahiptirler. Reaksiyonda ara ürün olarak diaçil ve monoaçilgliserinler oluşur. Trigliseridler gliserin ve yağ asitlerine parçalanırlar.



Şekil 2.2. Spesifik olmayan lipazların katalizlediği reaksiyonun denklemi

1,3 - Spesifik lipazlar

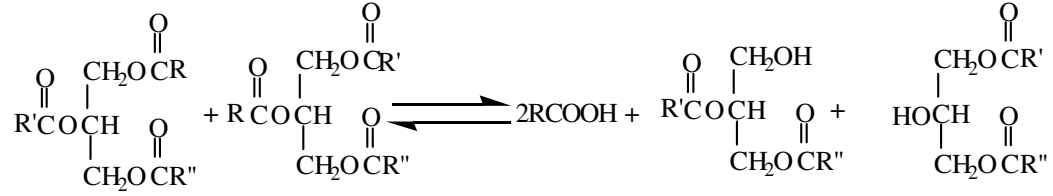
Bu gruba giren lipazlar nötral yağları eşdeğer konuma sahip olan 1 ve 3 pozisyonlarından spesifik olarak hidrolizlerler. Reaksiyon sonunda triağılgiserinlerden yağ asitleri, 1,2 (2,3)-diağılgiserinler ve 2-monoağılgiserinler oluşur. 1,2 (2,3)-diağılgiserinler ve özellikle 2-monoağılgiserinler kimyasal olarak kararsız olup sırasıyla 1,3-diağılgiserinlere ve 1(3)-monoağılgiserinlere izomerleşirler. Böylece oluşan izomerler enzim tarafından tekrar substrat olarak kullanılabilirler ve sonuçta 1,3-spesifik lipazlarda spesifik olmayan lipazlar gibi trigliseritleri gliserin ve serbest yağ asitlerine kadar parçalarlar. Pankreatik lipaz bu gruba girmektedir.



Şekil 2.3. 1,3-Spesifik lipazların katalizlediği reaksiyonun denklemi

Yağ asiti spesifik lipazlar

Bu grup lipazlar açilgliserinlerdeki bazı yağ asitlerine spesifik olup bu yağ asitlerinin oluşturduğu ester bağlarını parçalarlar.



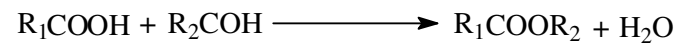
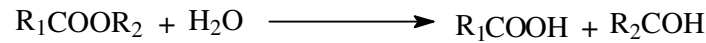
Şekil 2.4. Yağ asiti spesifik lipazların katalizlediği reaksiyonun denklemi

2.3.4. Lipazların katalizlediği reaksiyonlar

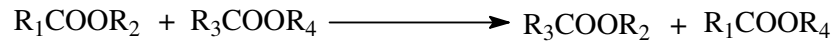
Lipazlar ester ve lipidlerin hidrolizini, esterleşme, trans-esterleşme ve tek kutuplu grup geçişleri gibi 4 farklı reaksiyonu kataliz ederler. Lipazlar hidrolazlar sınıfında olmakla beraber yağ asit esterlerinin hem hidrolizini hem de sentezini katalizleyebilirler. Katalizleme, su ile çözünmez substratın oluşturduğu ara yüzeyde gerçekleşir. Su ve yağın oluşturduğu bu ara yüzey enzim aktivitesi için gereklidir. Lipazın immobilizasyonu sırasında lipaz ile birlikte immobilize edilmiş olan su bu ara yüzeyin oluşmasını sağlar (8).

Lipaz tarafından kataliz edilen reaksiyonlar (9):

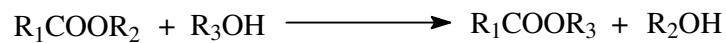
- Ester hidroliz-Ester sentez reaksiyonları



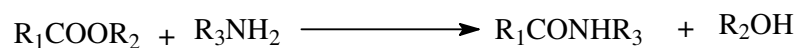
- Trans-esterleşme reaksiyonu



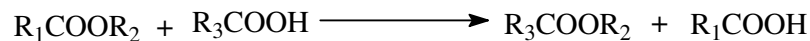
- Alkoliz reaksiyonu



- Aminoliz reaksiyonu



- Asidoliz reaksiyonu



2.3.5. Lipazların endüstriyel kullanım alanları

Lipazlar kataliz ettikleri çoklu reaksiyonlara bağlı olarak çok geniş uygulama çeşitliliğine sahiptir. 1989 yılında endüstriyel enzim pazarı 600 milyon \$ civarındaydı ve lipazlar pazarın %4'ünü oluşturmaktaydı. Ester bağlarının oluşumunda ve hidrolizinde katalizör olarak geniş uygulama alanlarından dolayı 1990' lardan itibaren lipazlar kimya ve ilaç endüstrisinde çok büyük ilgi çekmiştir (6,17).

Gıda endüstrisinde lipazlar

Günümüzde enzimlerin gıda endüstrisinde kullanılmaları çoğunlukla katkı maddelerinin üretimi ve yapı iyileştirilmesi yönündedir. Örneğin; meşrubat

berraklaştırılması, bira üretimi, düşük laktozlu süt üretimi, ekmek üretimi ve et yumuşatılması vb.

Gıda endüstrisinde kullanılan lipazlar özellikle mikrobiyal ve hayvansal kaynaklardan elde edilirler. Lipazların eklenmesi, esas olarak ekşi keskin tadın oluşumuna sebep olan kısa zincirli (C_4 ve C_6) yağ asitlerini açığa çıkarır; orta uzunluktaki (C_{12} ve C_{14}) yağ asitlerinin ortaya çıkması ise ürüne sabunumsu bir hal verir.

Lipaz enzimi peynir, tereyağı, salata sosu, çorba ve soslar gibi çeşitli ürünlerde geniş çapta kullanılmaktadır. İtalyan peynirlerinde tat oluşturma, işlenmiş küflü peynirde tat iyileştirme gibi işlemler lipaz enzimi yardımıyla başılır. Ayrıca süt endüstrisinde süt yağının hidrolizinde de lipaz enzimi kullanılır (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, selülaz ve proteaz enzimleri deterjandaki kimyasal bağların parçalanmasına katalizörlük yaparlar (18,19).

Deri endüstrisinde lipazlar

Deri üretimindeki post ve deri işleme işlemi gelenekseldir. Deri işleme, deri altı yağlarının kaldırılması, kılların ayıklanması ve doldurma işlemlerini gerektirir.

Proteazlar gibi diğer hidrolitik enzimlerle birlikte lipazlarında içeren bir enzim karışımı deri işlemede kullanılır (19).

Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde lipazlar

Kağıt endüstrisinde üretilen kağıt hamurundan katranı ayırmakta lipaz kullanılır. Katran, kağıt hamuru ve kağıt üretiminde ciddi sorunlara sebep olan trigliseridler ve balmumu olarak adlandırılan ağacın hidrofobik bileşenlerini tanımlamak için kullanılır.

Japonya'daki Nippon Kağıt Endüstrisi, trigliseridlerin %90'nına kadar olan kısmını hidroliz etmek için *Candida Rugosa*'dan elde edilen lipaz enzimini kullanarak bir katran-kontrolü yöntemi geliştirmiştir (18).

Biyosensör olarak lipazlar

Triaçilgliserollerin nicel olarak belirlenmesinin önemli olması nedeniyle lipazlar katı ve sıvı yağ sanayinde, yiyecek endüstrisinde ve klinik teşhislerde biyosensör olarak kullanılırlar. Biyosensörler kimyasal, biyolojik ve elektronik yapıda olabilirler ancak lipazların kullanımı daha ucuz ve daha az zaman alıcıdır. Lipazlar ayrıca kirlilik analizinde özellikle böcek ilacı kirliliği analizlerinde, ve yağ asitlerinin tespit edilmesi için yiyecek ve içecek endüstrisinde biyosensör olarak kullanılırlar.

Kozmetik ve parfüm endüstrisinde lipazlar

Lipazların kozmetik ve parfüm endüstrisinde kullanılmalarının nedeni kozmetik ve parfümlerin ana içeriğini oluşturan surfaktantlarda ve aroma üretimindeki aktiviteleridir. Örneğin, gliserolün lipaz katalizli esterifikasyonu ile hazırlanan monoaçilgliseroller ve diaçilgliseroller kozmetikte surfaktant olarak faydalıdır. Ayrıca 3,7-dimetil-4,7-oktadien-1-ol'ün mikrobiyal lipazlarla transesterifikasyonu

yoluyla parfüm endüstrisinde gülü okside eden önemli bir malzeme hazırlanmıştır (19).

Diğer uygulama alanları

Lipazlar ekmeğe bayatlamaz özellik kazandırmada, sindirim bozukluklarına ilişkin ilaçlarda etkin madde olarak, atık suların arıtılmasında ve kirli boruların temizlenmesinde de kullanılırlar (10).

2.4. Enzim İmmobilizasyonu

Kelime anlamı olarak immobilizasyon hareketi sınırlandırma demektir. Genel anlamda ise, enzim moleküllerinin suda çözünmeyen katı destek maddelerine bağlanması veya hapsedilmesidir. Enzimler polimer veya gözenekli taşıyıcılara bağlanarak, yine suda çözünmeyen yüzey aktif taşıyıcılarda adsorplanarak, biyofonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlanarak ve polimer matrikste, yarı geçirgen membran veya mikrokapsüllerde hapsedilerek immobilize edilirler ve böylece hareketleri sınırlandırılır. İmmobilizasyon sonucu genellikle enzim aktivitesi azalır. İmmobilizasyon sonucu enzimin üç boyutlu yapısı, dolayısıyla enzimin aktif bölgesi değişime uğrayabilir veya sterik engel nedeniyle aktivite de bir miktar azalma gözlemlenebilir. İmmobilize enzimler, proseslerin sürekli düzende çalışmasına olanak sağlar. Bu durumda sistemin denetimi kolaylaşır. 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 (1,10). Bununla birlikte immobilizasyonun dezavantajları da vardır.

- 1) İmmobilizasyon sırasında sıcaklık, pH değişimi, serbest radikaller oluşması gibi etkenler enzimin denatüre olmasına, dolayısı ile aktivitesini kaybetmesine sebep olur. Bu nedenle enzim immobilizasyonu sırasında aktif gruplar korunmalıdır. İmmobilizasyon çok ılıman koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir.
- 2) Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır.

3) Enzim taşıyıcılarının maliyeti yüksektir.

İmmobilizasyon sırasında enzim molekülleri konformasyonel değişikliğe uğrayabilir. İmmobilize enzimin zincir hareketleri çeşitli faktöre bağlıdır. Bunlar, immobilizasyonda kullanılan kimyasalların tipi, destekle enzimin karşılıklı etkileşmesi, aktifleştirici veya çapraz bağlayıcı kimyasallar ile enzimin etkileşmesi olarak belirtilebilir. Enzimler içinde bulundukları çevre tarafından etkilenirler. Enzimin katı destek üzerinde immobilizasyonu enzimin etrafındaki mikroçevreyi etkileyebilir, bu da enzimin görünen davranışları üzerinde aşağıda belirtildiği gibi bazı değişiklikler oluşturur (20).

- Bölme etkisi: Poliiyonik 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.
- Yapısal değişiklikler: Enzim immobilizasyonunda, enzim yapısının belli bir pozisyonda uzun süre korunması ile enzim ve destek materyali arasında çok sayıda bağlanma oluşabilir. Enzimin katalitik aktifliği yapısal değişmelere bağlı olduğundan K_m ve V_{mak} değerlerinde de farklılıklar, enzim aktifliğinde azalmalar olabilir.
- 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 yaklaşıp 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.

2.4.1. Taşıyıcı destek materyali

Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik destek materyali kullanılmaktadır. İdeal bir destekten beklenen özellikler şunlardır:

- Mekanik dayanıklılık
- Kimyasal dayanıklılık
- Ekonomik olması
- Isısal dayanıklılık
- Yüksek immobilizasyon kapasitesi
- Ürün inhibisyonunu azaltması
- pH'ı değiştirmemesi
- Tekrar kullanıma uygun olması
- Hidrofilik karakter
- Suda çözünmeme
- Gözenekli yapı
- Zehirsizlik

Çizelge 2.2. Enzim immobilizasyonunda kullanılan destek materyalleri

Sentetik Materyaller	Doğal Materyaller
P(AAm-ko-AA) esaslı polimerler	Agaroz
Dakron	Dekstran
Naylon	Selüloz
Poliamitler	Cam
Stiren esaslı polimerler	Kollajen
Akrilat esaslı polimerler	Silikajel

2.4.2. Polimerler

Polimerler, çok sayıda aynı veya farklı monomer denilen basit kimyasal maddelerin kovalent bağlarla oluşturduğu uzun zincirli makromoleküllerdir. Tek bir monomerden elde edilen polimere homopolimer, iki ayrı monomerden elde edilen polimere kopolimer adı verilir. Polimerler, günlük yaşantımızın her alanında yaygın olarak kullanılan plastik, kauçuk, lif, boya ve yapıştırıcı türündeki malzemelerin üretiminde yararlanılan girdilerdir.

Polimerler; hafif, ucuz, mekanik özellikleri çoğu kez yeterli, kolay şekillendirilebilen, değişik amaçlarda kullanıma uygun, dekoratif, kimyasal açıdan inert ve korozyona uğramayan maddelerdir. Bu üstün özelliklerinden dolayı, yalnız kimya açısından değil; tıp, biyokimya, biyofizik ve moleküler biyoloji açısından da polimerlerin önemi büyüktür (21,22).

Hidrojeller

Ağ yapılı polimer olarak bilinen hidrojeller, sulu ortamda şişebilen ve üç boyutlu çapraz bağlı hidrofilik özelliktedir. Hidrojeli oluşturan ağ yapı, çapraz bağlar ile birbirine bağlanmış polielektrolit zincirlerden oluşur. Bu zincirlerde süstitüe grup olarak genellikle karbosilik asit grupları bulunur. Polimer zincirleri üzerindeki negatif yükler birbirlerini iterler ve zincirin genişlemesine sebep olurlar. Karboksil

grupları ayrıca, hidrojen bağları ile suyla etkileşirler. Polimer zincirleri çözünmeden çapraz bağlar jelin şişmesini sağlar (23-25).

Hidrojellerin su absorplama içeriği kendi kütesinin % 100 kadarı veya daha fazlası ise; bu hidrojellere süper şişebilen hidrojeller denir (26).

Hidrojeller biyotıp alanında, kaplama uygulamalarında dikiş işlemleri için, elektrot yapımında ve elektroforez hücre yapımında kullanılmaktadır. Yine hidrojellerin, yapay organ yapımı, kornea, doğuştan gelen kemik hastalıklarının tedavisinde, homojen materyal olarak kulak zarı tıkacı, sentetik kırık, safra ve yemek borusu yapımı gibi biyotıp alanında çok yararlı uygulamaları vardır (27). Hidrojeller yüksek oranda su tutucu olmaları nedeniyle tarımsal alanda, gübrelerin denetimli salımlarında (28), tarımsal ilaçların denetimli salımlarında (29-32), endüstride yağ ve petrol içerikli sulu atıklardan saflaştırma işlemlerinde kullanılabilmektedir. Ayrıca suyun uzaklaştırılması işlemlerinde su tutucu olarak (33-35) ve hastane atıklarından suda çözünebilen ya da hidrojel ile uyumlu olarak soğurabileceği bazı fizyolojik (kan, üre vb.) sıvıların soğurulması (34-36) gibi çok yararlı uygulamaları bulunmaktadır.

Hidrojellerin duyarlılığı

Hidrojellerin en önemli özelliklerinden birisi sulu ortamda şişebilmesi, susuz ortamda ise büzüşmesidir. Bu özellik, bütün hidrojeller için ortaktır. Fakat sadece şişme ve büzüşme davranışı, hidrojellerle ilgilenmek için yeterli değildir. Son zamanlarda bir çok araştırmacı hidrojellere bazı fonksiyonlu gruplar takarak bir sinyale cevap verebilen (şişen, büzülen, bozulan) yeni hidrojeller hazırlanmıştır. Takılan fonksiyonel gruplarla birlikte bu hidrojeller, *akıllı jeller* olarak adlandırılmaktadır.

Doğada pek çok jel vardır. En iyi bilineni gıda maddesi olarak kullanılan jöle olup katı kısmı hayvansal bir protein olan jelatinden oluşmakta olup geri kalan % 97'lik kısmı ise sudur. Göz boşluğunu dolduran sıvı, kan damarlarının duvarları, mide,

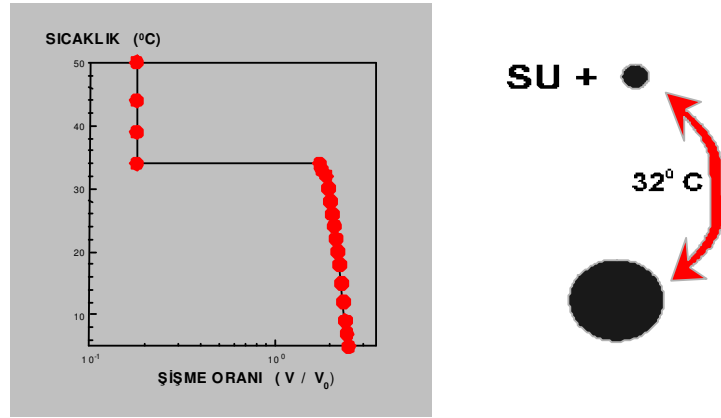
bağırsak ve akciğer yüzeyleri jellerle kaplı, ayrıca iskeletteki eklemlere hareket olanağı sağlayan akışkanda jel yapısındadır.

Hidrojellerin hacim değişmesine sebep olan çevresel faktörler; pH, sıcaklık, elektrik alanı, iyonik şiddet, çözücü dayanıklılığı, ışık, basınçtır.

Sıcaklığa duyarlı hidrojeller

Polimer zincirlerinin en önemli özellikleri dış etkendeki çok az bir değişiklik ile, örneğin ortam sıcaklığının çok az değişmesi ile aniden çok büyük boyut değişikliği göstermeleridir. 0.1 °C'lik bir sıcaklık değişimi ile çözelti içerisinde boyutları 100 misli değişebilen sıcaklığa duyarlı polimer zincirleri örnek olarak verilebilir. Bu ani hacim değişikliği birinci dereceden bir faz geçişinin sonucudur (26).

Sıcaklık duyarlı hidrojellere örnek olarak poli(N-izopropilakrilamit) PNIPA jelini verebiliriz (37). PNIPA, yan zincirlerine hidrofobik izopropil grupları ve hidrofilik amit grupların her ikisini birden bulundurmasından dolayı çapraz bağlanmış türlerin şişmiş hidrojellerini oluşturur. Bu hidrojel, sıcaklığa duyarlıdır ve suda 32-33 °C'de PNIPA'nın alt kritik çözünme sıcaklığında (AKÇS) belirgin bir faz geçişine sahiptir (Şekil 2.5). Bu sıcaklığın altında jel şişer, hidratlaşır ve AKÇS'nin üstünde jel büzülür, dehidratize olur ve ağ yapıda hidrofilik/hidrofobik dengesi hassaslığı hidrofobik durum sebebiyle yıkılır (38).



Şekil 2.5. PNIPAA hidrojelinin şişme oranının sıcaklıkla değişimi (39)

PNIPAA hidrojelleri son zamanlarda, hücrelerin ve enzimlerin immobilizasyonunda, ilaç salım sistemleri, yapay kas, ayırma işlemleri gibi alanlarda kullanıldığı gözlenmiştir. AKÇS'nın altında ve üstünde PNIPAA hidrojellerinin ısısal çevrimi, ürün molekülleri ve kütle transferlerinin zenginleştirilmesiyle ilgili hidrojellerdeki immobilize edilmiş biyokatalizörlerin verimliliğini artırır. PNIPAA hidrojel, ilaç taşıyıcısı olarak kullanıldığında, ilaç salımı sıcaklığın kontrolüyle olabilir (38).

Sıcaklık duyarlı NIPAA monomeri, akrilamid (AAm), akrilik asit (AA), metakrilamid (MAAm), itakonik asit (IA), N,N-dimetilakrilamid (DMAAm), N,N-dietilakrilamid (DEAAm) ve 2-akrilamit-2-metilpropan-sülfonik asit (AMPS), gibi çok çeşitli komonomerlerle çalışılmıştır.

Saf PNIPAA hidrojelinin gözenek boyutu küçüktür ve ısı duyarlılığı yavaştır. Süper gözenekli PNIPAA hidrojelleri, AKÇS'da hızlı hacimsel faz geçişi gösterdiğinden istenen uygulamalar için çok fazla tercih edilir. Bu nedenle saf PNIPAA ve onun çeşitli kopolimerlerine hidroksipropil-selüloz (HPC) ve polietilenglikol (PEG) gibi gözenek oluşturu katılarak bir çok çalışma yapılmıştır (26,38).

Hazırlama yöntemlerine göre 4 tür hidrojel bulunmaktadır:

- Homopolimerik hidrojeller: Tek bir hidrofilik monomerin çapraz bağlanması ile hazırlanır.
- Kopolimerik hidrojeller: İki komonomerin çapraz bağlanması ile hazırlanır. Ancak monomerlerden biri hidrofilik yapıda olmalıdır
- Çoklu polimerik hidrojeller: İki yada daha fazla komonomerin reaksiyonu ile oluşur.
- İç içe geçmiş ağ yapılı hidrojeller (IPN, İnterpenetrating network): Çapraz bağlı iki polimerik örgünün fiziksel olarak karışması ile hazırlanır.

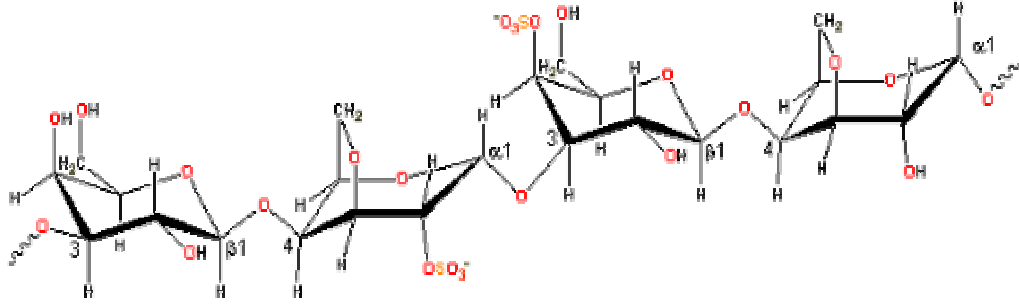
Doğal polimerler

Doğal polimerler, doğada kendiliğinden oluşan polimerlerdir ve insanlar her dönemde bu polimerleri değişik alanlarda kullanmışlardır. Çok farklı doğal polimerler vardır. Bitki ve ağaçların temel yapısını oluşturan selüloz doğada en bol bulunan polimerdir, pamuğun temel bileşeni de selülozdur. Selüloz gibi genelde doğal polimerlerin önemli bir kısmı canlıların yapısında yer alır. Yün, saç, tırnak protein yapısındaki doğal polimerlere örneklerdir. Proteinler (kollojen, jelatin, elastin, aktin vb.), polisakkaritler (selüloz, nişasta, dekstran, kitin vb.) ve polinükleotidler (DNA ve RNA) başlıca doğal polimerlerdir (22).

Doğal polimerler, sahip oldukları işlevsel özellikler nedeniyle değişik kullanım alanlarına sahiptirler. Kalınlaştırıcı, jel yapıcı, bağlayıcı, dağıtma ajanı, kayganlaştırıcı, yapıştırıcı ve biyomalzeme olarak kullanılabilirler (40).

Karragenan

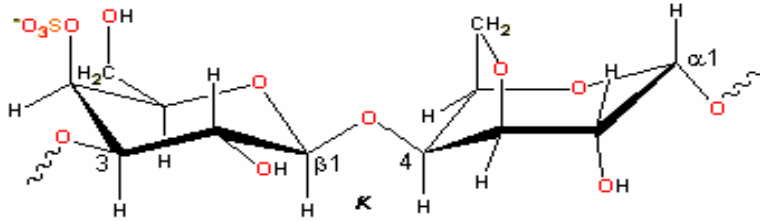
Karragenan en yaygın *Chondrus crispus* ve *Gigartina mamilliosa* adlı kırmızı alglerden elde edilen lineer bir polisakkarittir. 3-β-D-galaktopiranoz ve 4-α-D-galaktopiranoze birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşan bir polisakkarittir (41).



Şekil 2.6. Karragenanın tekrarlanan birimlerinin yapısı

Karragenanın 3 değişik formu bulunmaktadır. Bunlar *kappa* (κ), *iota* (ι) ve *lambda* (λ) karragenandır. κ -Karragenan en fazla bulunan ve kullanılan türüdür.

En fazla bulunan türü olan κ -karragenan (1,3)- β -D-galaktopiranoz-4-sülfat-(1,4)-3,6-anhidro- α -D-galaktopiranoz birimlerinin tekrarlanması ile oluşmuştur (42).



Şekil 2.7. κ -karragenanın yapısı

Karragenan ürünleri değişik proseslerle elde edilmektedir. Bunlar; alkolle ekstraksiyon, potasyum klorür ile jel baskısı yada çeşitli bazik ekstraksiyon prosesleridir.

Farklı deniz yosunlarından elde edilen karragenanlar farklı özellikler gösterirler. *kappa* (κ) ve *iota* (ι) tipi karragenanların soğuk suda çözünmeleri zordur ve ısıtma ile daha iyi çözünür hale gelebilirler. Fakat *lambda* (λ) karragenan tipi soğuk suda çok rahat çözünebilmektedir (43,44).

Karregen emülsiyon yapıcı, göğüs yumuşatıcı ve antikoagülan etki gösterir. Gıda sanayi; ekmek, dondurma ve konserve yapımı gibi geniş bir kullanım alanına sahiptir.

Sentetik polimerler

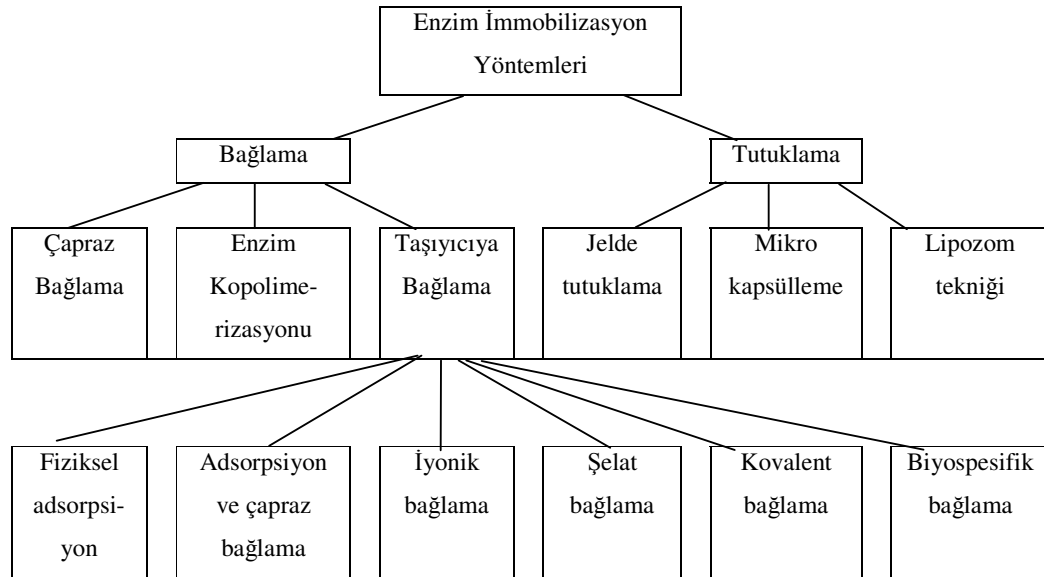
Sentetik polimerler ilk kez 19.yy. başlarında elde edilmişlerdir. Sentetik polimerler uygun monomer veya çıkış maddeleri kullanılarak hazırlanır. İçinde bulunduğumuz yüzyılın başlarında, bu tür maddeler, çeşitli amaçlarda kullanılmak üzere endüstriyel ölçülerde yapılmıştır. Ancak, sentetik yüksek polimerlerin oluşmasını düzenleyen temel bilimsel ilkeler 1925-1935 yıllarında bulunmuştur.

Bazı durumlarda, uygun işlemlerle doğal polimerlerin kimyasal yapıları değiştirilir ve başka özelliklere sahip polimerler hazırlanır. Örneğin, çözünmez karakterdeki selülozun hidroksil gruplarının tamamına yakınının asetillenmesiyle, çözünebilir selüloz triasetat elde edilir. Doğal polimerlerden çıkılarak yapılarının değiştirilmesi ile elde edilen bu tür polimerlere yarı-sentetik polimerler adı verilir.

Sentetik polimerler olarak bilinen sentetik lifler (fiberler), plastikler ve sentetik kauçuklar (elastomerler) endüstride çok çeşitli ve geniş uygulama alanı bulunan maddelerdir (21,22).

2.4.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilizasyonunda, fiziksel ve kimyasal bağlama yöntemleri kullanılır. Kimyasal yöntemlerde, enzim ve katı destek arasında, kovalent bağlar oluşturulur. Fiziksel yöntemlerde ise, enzimin desteğe daha zayıf bağlanması veya hapsedilmesi söz konusudur (1).



Şekil 2.8. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

Kimyasal yöntemler

Kovalent bağlanma

Bu yöntemin esası enzimi destek materyaline kovalent bağla bağlamaktır. Enzimin katalitik görevde yer almayacak kısımları destek materyaline kovalent bağla bağlanmada kullanılır. Böylece enzim aktivitesini yitirmemiş olur. Enzim üzerindeki aktif bölgeyi korumak için birkaç yöntem vardır. Bunlar:

- Enzimin aktif bölgesini yarışmalı inhibitörle inhibe ettikten sonra kovalent bağla destek materyaline bağlanması, sonrada inhibisyonun ortadan kaldırılarak enzimin aktifleştirilmesi,
- Enzimin ilk önce bir ara maddeye bağlanması, sonra bu ara maddenin destek katısına bağlanması,
- Zimojen (enzimin aktif yapıda olmadığı) yapıda destek ortamına bağlanması ve bağlanmadan sonra enzimin aktifleştirilmesi.

Bu yöntemde polimer destek olarak, doğal ve yapay organik polimerler(selüloz, karboksi metil selüloz gibi), inorganik destek olarak da cam tanecikleri, diatome toprağı kullanılabilir.

Çapraz bağlanma

Bu yöntem iki veya daha fazla fonksiyonel grup taşıyan enzim moleküllerinin birbirlerine çapraz bağlanması ve bu şekilde suda çözünmeyen bir kompleks oluşturması temeline dayanır. Bu yöntemde enzimleri birbirine bağlamak amacıyla glutaraldehit, diazobenzidin gibi maddeler kullanılır.

Bu yöntemin dezavantajları şunlardır:

- Reaksiyonu kontrol etmek zordur.
- Fazla miktarda enzime ihtiyaç vardır.
- Enzimin bağlanma sırasında aktivitesini kaybetme olasılığı fazladır.

Fiziksel yöntemler

Adsorpsiyon

Adsorpsiyon, fiziksel adsorpsiyon ve iyonik adsorpsiyon olmak üzere iki türdür.

Fiziksel adsorpsiyon

İmmobilize enzim hazırlamak için kullanılan en basit yöntemdir. Yöntem katı destek yüzeyine enzim moleküllerinin Van der Waals, hidrojen bağı gibi zayıf fiziksel kuvvetlerle bağlanmasıdır. 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. Enzim adsorpsiyonu için kullanılan destek materyaller alümina, silika, poröz cam, cam, seramik, kil, diatome toprağı ve bentoit gibi inorganik maddeler ya da selüloz, nişasta, aktif karbon gibi organik maddeler olabilir.

Yöntemin avantajı destek materyalinin pH, sıcaklık gibi etkiler sonunda tekrar kullanılabilmesidir.

İyonik adsorpsiyon

Bu yöntem, iyon değıştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. Bu şekilde enzimin katıya bağlanması fiziksel adsorpsiyondan 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 kaçışı söz konusudur.

Hapsetme

Hapsetme enzimi küçük bir hacimde durmaya zorlamaktır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebildiğı gibi yarı geçirgen membranlar içinde de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemde enzim molekülleri ile fiziksel veya kimyasal bağlanma söz konusu değildir.

Polimer matrikste hapsetme

Enzim hapsetme işlemi için Ca-aljinat, agar, poliakrilamid gibi polimerler matriks olarak kullanılır. Matriks tanecik, membran veya ipliksi yapıda olabilir. Polimer matriks içinde immobilizasyon 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.

Membran hapsedmenin özel bir şekli mikrokapsüllemedir. Bu yöntemde çapı 1-100 µm olan yarı geçirgen küresel zarlar kullanılır. Bu zarların gözenekleri substrat ve ürünün geçişine izin verecek ancak hapsedilmiş enzimin giriş çıkışına izin vermeyecek büyüklüktedir. Mekanik dayanıklılığı azdır. Substratla enzimin bu yöntemde etkileşme oranı büyüktür. Yöntemin uygulanması sırasında enzim inaktive olabilir. Ayrıca enzimin zarın içinden kaçma olasılığı fazladır; dolayısıyla enzim sarfıyatı fazladır. Bu yöntemin en büyük avantajı oldukça küçük bir hacimde enzim ile substratın etkileşme alanının göreceli olarak yüksek olmasıdır.

Hapsedme yönteminin avantajları:

- Yöntemin çok kolay uygulanması
- Gerçek bir fiziksel yöntem olması
- Çok az miktar enzimle gerçekleştirilebilmesi
- Nötral, suda çözünmeyen destek materyalleri kullanılması

Dezavantajları:

- Enzimlerin hapsedildiği kafeslerin çaplarından daha büyük substrat molekülünün enzim aktif merkezine ulaşmasının olanaksız olması
- Önemli difüzyon kısıtlamalarının olması (Bu kısıtlamalar kapsüllerin tanecik boyutları küçültülerek azaltılabilir).
- Enzimin zamanla çözeltiye sızması
- Enzimin hapsedildiği mikroçevredeki koşulların kontrol edilememesi nedeniyle enzimin aktiflik ve kararlılığının azalması.

2.4.4. İmmobilize edilen enzimden beklenen özellikler

- Yüksek kararlılık
- Tekrar kullanılabilirlik
- Sürekli üretime olanak vermesi
- Reaksiyon üretimine olanak vermesi
- Yüksek saflık
- Yüksek ürün yüzdesi
- Ekonomik olması

2.4.5. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması

Günümüze kadar birçok enzim için birçok farklı immobilizasyon yöntemi uygulanmış ve önerilmiştir. Ancak enzimlerin birbirlerinden çok farklı kimyasal karakteristikleri ve bileşenleri olması, ayrıca kullanılan substrat ve ürünün farklı kimyasal özellikleri olması nedeniyle bütün enzimler için ve bütün şartlarda uygulanabilecek kesin bir yöntem belirlemek mümkün değildir. Ayrıca her immobilizasyon yönteminin uygulama şartlarına göre avantajları ve dezavantajları vardır. Bu nedenle immobilizasyonu düşünülen farklı enzimler için farklı durumda bir veya birkaç değişik yöntem önerilebilir. Çizelge 3.3’de immobilizasyon yöntemlerinin birbirlerine karşı kıyaslanması gösterilmiştir (1).

Çizelge 2.3. İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması

Özellik	Fiziki Adsorpsiyon	İyonik Bağlanma	Çapraz Bağlanma	Kovalent Bağlanma	Hapsetme Yöntemi
Hazırlama	Kolay	Kolay	Zor	Zor	Zor
Bağlanma Gücü	Zayıf	Orta	Kuvvetli	Kuvvetli	Kuvvetli
Enzim Aktivitesi	Düşük	Yüksek	Orta	Yüksek	Yüksek
Desteğin Tekrar Kullanılabilirliği	Mümkün	Mümkün	İmkansız	Nadiren	İmkansız
İmmobilizasyon Maliyeti	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek	Düşük
Kararlılık	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Genel Uygulanabilirlik	Düşük	Orta	Düşük	Orta	Yüksek

Çizelge 2.4. Serbest ve immobilize enzim özelliklerinin karşılaştırılması

Serbest Enzim	İmmobilize Enzim
1. Reaksiyon sonunda ortamdan uzaklaştırılması güçtür.	1. Süzme ve santrifüjleme gibi basit yöntemlerle ortamdan kolayca ayrılır.
2. Ürünlerde azda olsa kirlilik yapar.	2. Tamamen ayrıldığından ürünlerle kirlilik söz konusu olamaz.
3. Çevre koşullarından daha kolay etkilenirler	3. Çevre koşullarına(sıcaklık, pH gibi) daha dayanıklıdır.
4. Her örnek bir kere ve kısa süre kullanılır.	4. Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
5. Karasız 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) minimuma indirgenir.

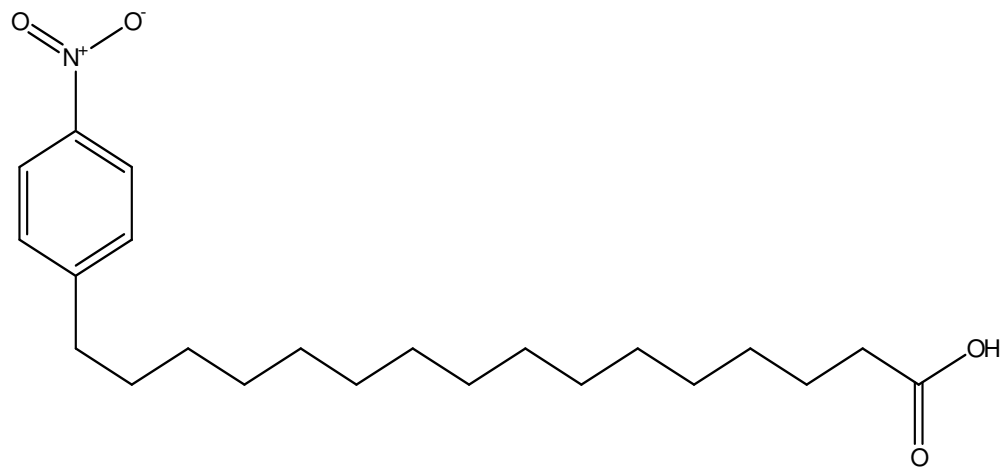
3. DENEYSEL KISIM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Lipaz (Triaçilgliserol Açı Hidrolaz E.C.3.1.1.3)

- p-Nitrofenil Palmitat (p-NPP) ($C_{22}H_{35}NO_4$)

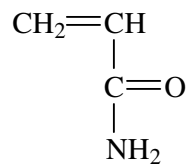
Sigma (St. louis USA) (Almanya) firmasından temin edildiler.



p-nitrophenylpalmitate

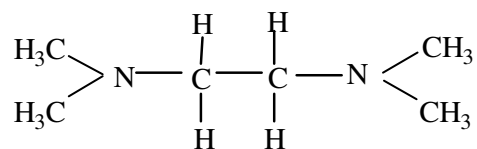
Molekül kütlesi: 377,5 g/mol

- Akrilamit (AAm)



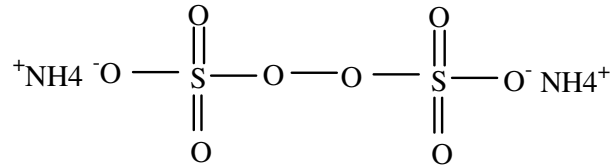
Molekül kütlesi : 198 g/mol

- N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED)



Molekül kütlesi : 116,2 g/mol

- Amonyum persülfat (APS)



Molekül kütlesi : 228 g/mol

Yoğunluğu : 1,98 g/mol

- Epiklorhidrin $\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}$

Molekül kütlesi : 92,53 g/mol

- Sodyum karbonat: Na_2CO_3

Molekül kütlesi:

- Fosforik asit : H_3PO_4

Molekül kütlesi: 97,99 g/mol

- Sodyum dihidrojen fosfat : $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Molekül kütlesi : 156,01 g/mol

- Disodyum hidrojenfosfat : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Molekül Kütlesi : 177,99 g/mol

- Sodyum hidroksit : NaOH

Molekül kütlesi: 40 g/mol

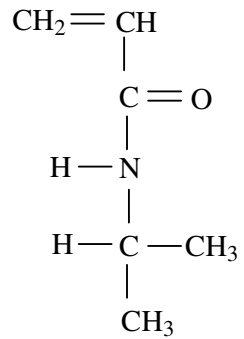
Merck(Almanya) firmasından temin edildiler.

- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)

Molekül kütlesi: 46,01 g/mol

Yoğunluğu: 0,79 g/mL

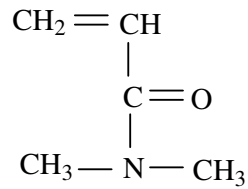
- N-İzopropilakrilamit (NIPA)



Molekül kütlesi: 113,16 g/mol

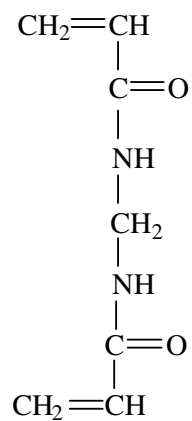
Yoğunluğu: 1,35 g/mL

- N,N- Dimetilakrilamit (DMAAm)



Molekül kütlesi: 99,13 g/mol

- N,N'-metilen-bis-akrilamit (BAAm)



Molekül kütlesi : 154,2 g/mol

Sigma Aldrich (Almanya) firmasından temin edildiler.

- κ-Karragenan Fluka (Almanya) firmasından temin edildi.

3.2. Kullanılan Aletler

Spektrometre	:UNICAM UV/Vis Spektrometre
pH metre	:Orion pH metre 420A
Çalkalamalı su banyosu	:ST 402 NÜVE marka sıcaklık kontrollü su banyosu

3.3. Kullanılan Çözeltiler

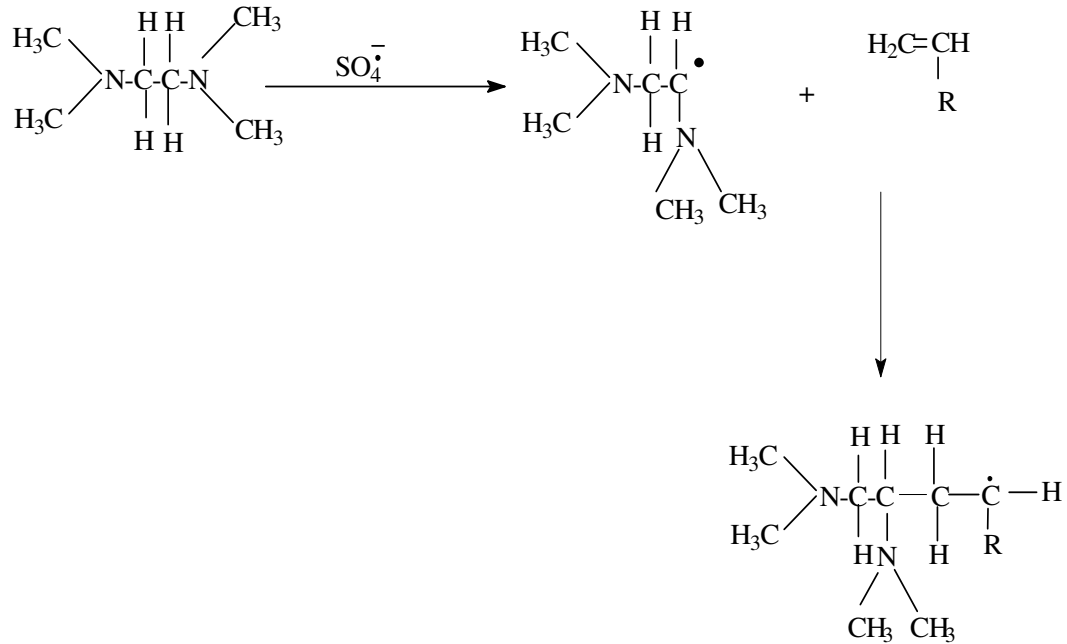
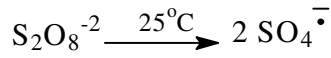
- Enzim çözeltisi: Saf su kullanılarak hazırlandı. (0,01 g/100 mL)
- p-nitrofenil palmitat (substrat) çözeltisi: Etanol çözeltisi kullanılarak hazırlandı. (0,005 g/1 mL)
- Fosfat tamponu çözeltisi: Saf su kullanılarak hazırlandı.
- Sodyum karbonat çözeltisi: Saf su kullanılarak hazırlandı. (1,32 g/50 mL)

3.4. Enzim İmmobilizasyonu

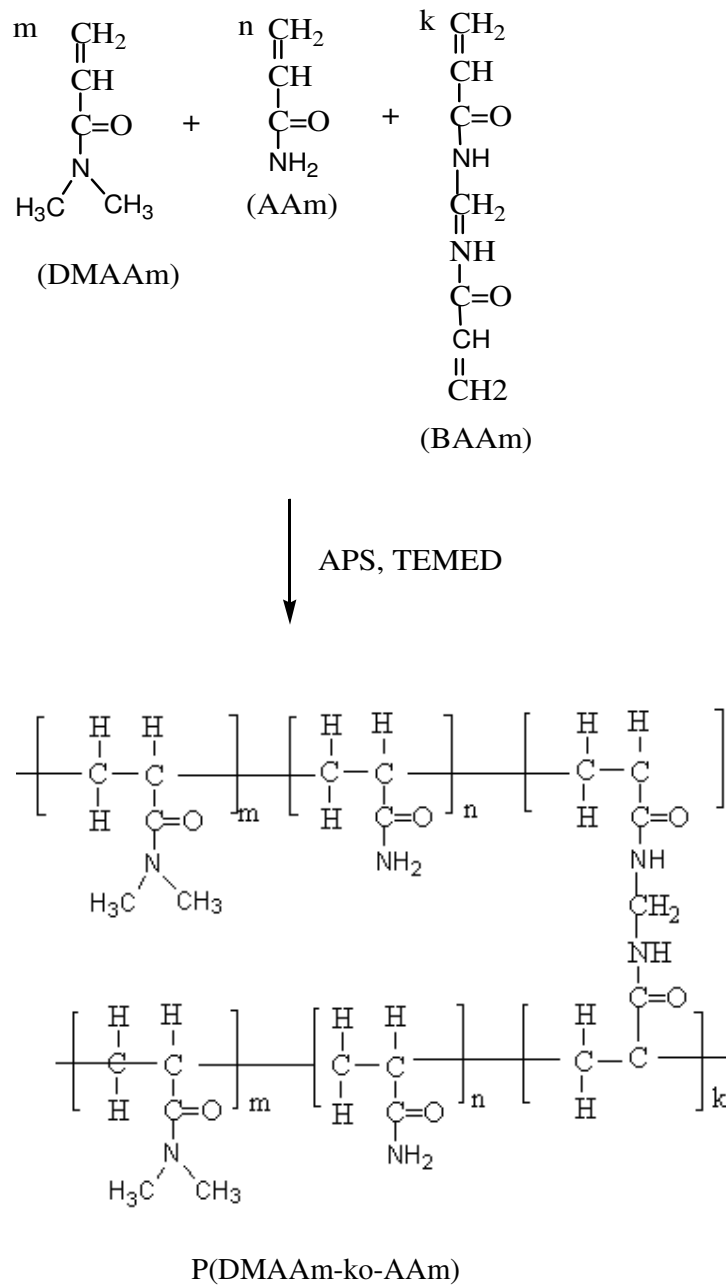
3.4.1. P(DMAAm-ko-AAm) kullanılarak enzim immobilizasyonu

Bu çalışmada, lipaz enziminin kovalent bağlanma yöntemi kullanılarak immobilizasyonu amacıyla öncelikle poli(N,N-dimetilakrilamit-ko-akrilamit) polimerleri aşağıdaki şekilde sentezlenmiş, daha sonra lipaz enzimi bu destek üzerine immobilize edilmiştir. Bu amaçla 3 mL N,N-dimetilakrilamit çözeltisi üzerine 17 mL saf su eklenmiştir. Oluşan çözeltiye 3 g akrilamit ilave edilip karıştırılmış ve üzerine 0,2 g BIS ve 10 mg APS eklenmiştir. Oluşan homojen karışım petri kabına alınmıştır. Daha sonra 1 mL TEMED yavaş yavaş damlatılarak ilave edilmiştir. Polimerizasyon işleminin gerçekleşmesi için petri kapları oda sıcaklığında 4 saat

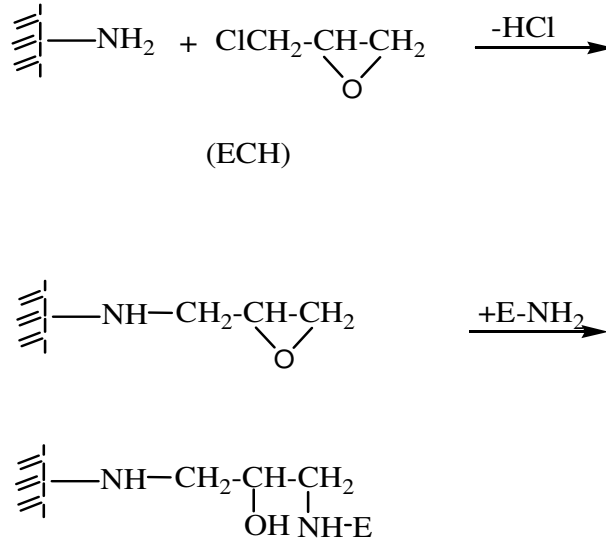
bekletilmiştir. Polimerizasyon gerçekleştirildikten sonra polimerler 5x5x5 mm³ boyutunda küp şeklinde kesilmiştir. Elde edilen P(DMAAm-ko-AAm) polimerleri epiklorhidrin (ECH) ile oda koşullarında 24 saat magnetik karıştırıcı üzerinde aktifleştirilmiştir. Epiklorhidrin (ECH) ortamdan uzaklaştırılmış ve polimerler saf su ile 4 kez yıkandıktan sonra ortama 100 mL (1 g) enzim çözeltisi ilave edilmiştir. Oda koşullarında 24 saat magnetik karıştırıcı üzerinde immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İmmobilize enzim kullanılmak üzere buzdolabında (4°C) enzim çözeltisi içinde bekletilmiştir.



Şekil 3.1. APS ile TEMED reaksiyonu sonucunda oluşan ortaklanmamış tek elektron içeren aktif TEMED molekülünün monomere katılması sonucu oluşan radikal



Şekil 3.2. Kimyasal yöntemle sentezlenen P(DMAAm-ko-AAm) hidrojellerinin olası reaksiyon mekanizması



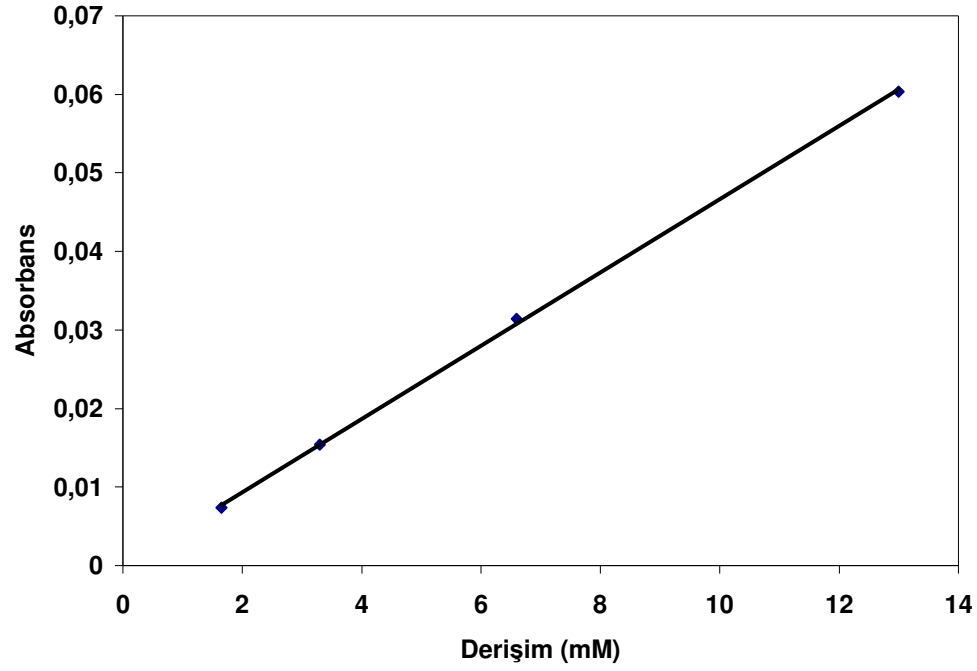
Şekil 3.3. P(DMAAm-ko-AAm) desteğinin epiklorhidrin ile aktifleştirilmesi

3.4.2. P(NİPA-ko-AAm)/κ-Karragenan kullanılarak enzim immobilizasyonu

Bu çalışmada, lipaz enzimi hapsedme yöntemi kullanılarak immobilize edilmiştir. Immobilizasyon işleminde kullanılan poli(N-izopropilakrilamit-ko-akrilamit)/κ-karragenan yarı iç içe geçmiş polimerik ağ yapıları (s-IPN) aşağıdaki şekilde sentezlenmiştir. 2,85 g N-izopropil akrilamit, 2,5 g akrilamit ve 0,7 g κ-karragenan 15 mL saf suda karıştırılarak çözülmüştür. Bu işlemi takiben çözelti ortamına 0,2 g BİS, 10 mg APS ve 7 mL enzim çözeltisi (1g/30mL) ilave edilerek karıştırılmaya devam edilmiştir. Oluşan homojen karışım petri kabına alınmıştır. Daha sonra yavaş yavaş 1,5 mL TEMED petri kaplarına damlatılarak ilave edilmiştir. Polimerizasyon işleminin gerçekleşmesi için petri kapları oda sıcaklığında 4 saat bekletilmiştir. Polimerizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra polimerler 5x5x5 mm³ boyutunda küp şeklinde kesilmiştir. Immobilize edilen enzimler kullanılabilecek kadar buzdolabında (4°C) saf suda bekletilmiştir.

3.5. p-Nitrofenil Palmitat Kalibrasyon Grafiği

Kalibrasyon grafiği hazırlamak amacıyla çeşitli derişimlerde (13 mM-1,65 mM) p-nitrofenil palmitat çözeltileri hazırlandı. p-nitrofenil palmitat derişimlerine karşı gelen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği çizildi (şekil 3.4.).



şekil 3.4. p-nitrofenil palmitat kalibrasyon grafiği

3.6. Aktivlik Tayini

3.6.1. Serbest lipazın aktiflik tayini

Reaksiyon balonuna 1 mL fosfat tamponu, 1 mL p-NPP (p- nitrofenil palmitat) (13 mM) ve 0,1 mL enzim çözeltisi konuldu ve reaksiyon başlatıldı. 30 °C’de 5 dakika su banyosunda çalkalandı. Su banyosundan alınan balon içerisine 2 mL sodyum karbonat (0,25 mM) ilave edildi. Oluşan çözelti 4500 rpm’de 15 dk satrifüj edildi. Berrak olan kısım alındı ve UV spektrofotometresi kullanılarak 410 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü (7).

3.6.2. İmmobilize lipazın aktiflik tayini

İmmobilize lipazın aktifliği kısım 3.6.1 de belirtilen yöntemle göre tayin edildi.

3.7. Aktifliğe pH’nın Etkisi

3.7.1. Serbest lipazın aktifliğine pH’nın etkisi

Serbest lipazın aktifliğine pH’nın etkisini incelemek amacı ile çeşitli pH’larda (5,0-11,0) hazırlanan fosfat tamponu çözeltisi, etanol ile hazırlanan p-nitrofenil palmitat (substrat) çözeltisi, saf su ile hazırlanan enzim ve sodyum karbonat çözeltileri kullanıldı. Kısım 3.6.1 de belirtilen yöntemle göre aktiflikler tayin edildi.

3.7.2. İmmobilize lipazın aktifliğine pH’nın etkisi

İmmobilize lipazın aktifliğine pH’nın etkisini incelemek amacı ile çeşitli pH’larda (5,0-11,0) fosfat tamponu çözeltileri hazırlandı ve kısım 3.6.1 de belirtilen yöntemle göre aktiflikleri tayin edildi.

3.8. Aktifliğe Sıcaklığın Etkisi

3.8.1. Serbest lipazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

Serbest lipazın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile çeşitli sıcaklıklarda (20°C - 45°C) kısım 3.6.1 de belirtilen yöntemle göre gerçekleştirilen reaksiyonlar yardımı ile aktiflikler tayin edildi.

3.8.2. İmmobilize lipazın aktifliğine sıcaklığın etkisi

İmmobilize lipazın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile çeşitli sıcaklıklarda (20°C - 45°C) kısım 3.6.1 de belirtilen yöntemle göre gerçekleştirilen reaksiyonlar yardımı ile immobilize lipazın aktifliği tayin edildi.

3.9. Aktifliğe Substrat Değişiminin Etkisi

3.9.1. Serbest lipazın aktifliğine substrat değişiminin etkisi

Serbest lipazın aktifliğine substrat değişiminin etkisini incelemek amacı ile çeşitli derişimlerde (13 mM-1,65 mM) hazırlanan substrat çözeltileri kullanılarak kısım 3.6.1 de belirtilen yöntemle göre aktiflikler tayin edildi.

3.9.2. İmmobilize lipazın aktifliğine substrat değişiminin etkisi

İmmobilize lipazın aktifliğine substrat değişiminin etkisini incelemek amacı ile çeşitli derişimlerde (13 mM-1,65 mM) hazırlanan substrat çözeltileri kullanılarak kısım 3.6.1 de belirtilen yöntemle göre aktiflikler tayin edildi.

3.10. Depolanma Kararlılığı

3.10.1. Serbest lipazın depolanma kararlılığı

Serbest lipazın depolanma kararlılığını incelemek amacı ile saf suda hazırlanan enzim çözeltisi buzdolabında 4°C de saklandı. Belirli aralıklarla enzim çözeltisinden alınan örnekler kullanılarak kısım 3.6.1 de belirtilen yöntemle göre aktiflikler tayin edildi.

3.10.2. İmmobilize lipazın depolanma kararlılığı

İmmobilize lipazın depolanma kararlılığını incelemek amacı ile buzdolabında 4°C de saklanan immobilize enzimlerden belirli aralıklarla alınan örnekler kullanılarak kısım 3.6.1 de belirtilen yöntemle göre aktiflikler tayin edildi.

3.11. Termal İnaktivasyon

3.11.1. Serbest lipazın termal inaktivasyonu

Serbest lipazın termal inaktivasyonunu incelemek amacı ile farklı sıcaklıklarda (40°C-45°C) ve farklı zaman aralıklarında (5-25 dakika) tutulan enzim çözeltileri kullanılarak kısım 3.6.1 de belirtilen yöntemle göre aktiflikler tayin edildi.

3.11.2. İmmobilize lipazın termal inaktivasyonu

İmmobilize lipazın termal inaktivasyonunu incelemek amacı ile farklı sıcaklıklarda (40°C-45°C) ve farklı zaman aralıklarında (5-25 dakika) tutulan immobilize enzim kullanılarak kısım 3.6.1 de belirtilen yöntemle göre aktiflikler tayin edildi.

3.12. İmmobilize Lipazın Tekrar Kullanım Sayısı

İmmobilize lipazın tekrar kullanım sayısını ölçmek amacı ile alınan immobilize enzim örneğinin kısım 3.6.1 de belirtilen metod kullanılarak arka arkaya gerçekleştirilen deneylerle aktiflikleri tayin edildi.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

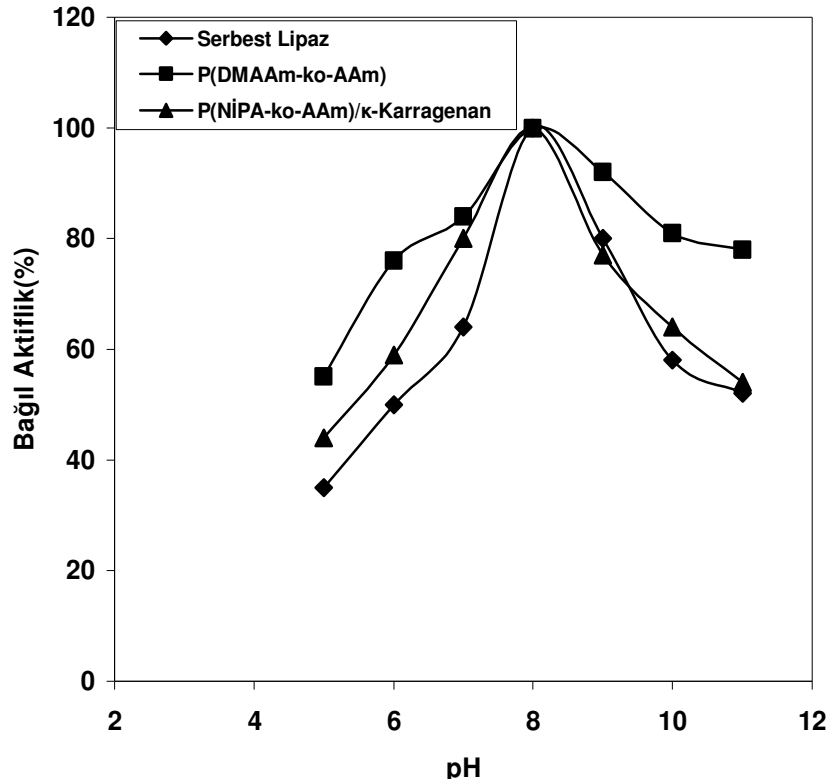
4.1. Aktifliğe pH'nın Etkisi

Serbest ve immobilize edilen lipazın aktifliğine pH'nın etkisini incelemek amacı ile kısım 3.6.1 de belirtilen yöntemle göre çeşitli pH'larda gerçekleştirilen reaksiyonlara ait bağıl aktiflik değerlerinin pH ile değişimi Şekil 4.1'de verilmiştir. Serbest ve immobilize edilen lipaz enzimi için optimum pH 8 olarak bulunmuştur.

Enzimler elektrolit karakterli oldukları için enzim aktifliği pH ile değişim gösterebilir. pH değişikliği ile enzim yapısındaki amino asit zincirinin iyonik özelliği değişir ve denatüre olan enzimin katalitik aktifliği kaybolur. Şekil 5.1'de görüldüğü gibi lipazın aktifliği asidik ve bazik bölgelere kaydıkça azalmıştır. Enzimlerin üç boyutlu yapısı immobilizasyon sürecinden etkilenmeyebilir. Bu nedenle immobilize enzimin optimum parametreleri serbest enzimin parametreleri ile aynı gözlenebilir. Grafikten de görüldüğü gibi hapsetme yöntemine göre immobilize edilen lipazın optimum pH'ında bir değişiklik görülmemiştir. Hapsetme yönteminde enzim ile destek materyali arasında bir etkileşim söz konusu değildir. Bu nedenle pH'nın değişmemesi beklenen bir durumdur. Kovalent bağlanma yöntemine göre immobilize edilen lipazın pH'ında bir değişim görülmemiştir. Bu da enzim yapısında immobilizasyon süresince konformasyonel bir değişim olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

Candida rugosa lipazı kitosan üzerine immobilize edildiğinde serbest lipaz için optimum pH 8 iken immobilize lipaz için optimum pH 9 bulunmuştur (7). *Candida Rugosa* lipazı poli(2-hidroksietil metakrilat) membranına kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest ve immobilize lipaz için optimum pH 7,5 bulunmuştur (45). Eudragit E 30D özel isimli akrilik-metakrilik polimer yapı üzerine hapsetme yöntemi ile pankreatik lipaz immobilize edildiğinde immobilizasyon sonucunda optimum pH'nın bazik ortama kaydığı görülmüştür (46). *Candida Rugosa* lipazı Poli(GMA-HEMA-EGDMA) mikro kürelerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest lipaz için optimum pH 7 iken

immobilize lipaz için pH 8 bulunmuştur (47). Lipaz enzimi PVC, kitosan, kitin, agaroz, sefaroze, ve trisakril üzerine immobilize edildiğinde serbest lipaz için optimum pH 7.5 iken immobilize lipaz için optimum pH 8.5 bulunmuştur (48). Isıya dayanıklı *Humicola Lanuginosa* lipazı Ca-alginat ve prepolimer reçine olan ENTP 4000 üzerine hapsedme yöntemi ile ve Amberlite XAD-7 reçinesi üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest ve her immobilize lipaz için optimum pH 7 bulunmuştur (49).



Şekil 4.1. Serbest ve immobilize lipazın bağıl aktifliğinin pH ile değişimi

4.2. Aktifliğe Sıcaklığın Etkisi

Serbest ve immobilize edilen lipazın aktifliğine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile kısım 3.6.1 de belirtilen yönteme göre çeşitli sıcaklıklarda gerçekleştirilen reaksiyonlara ait bağıl aktiflik değerlerinin sıcaklık ile değişimi Şekil 4.2 de verilmiştir.

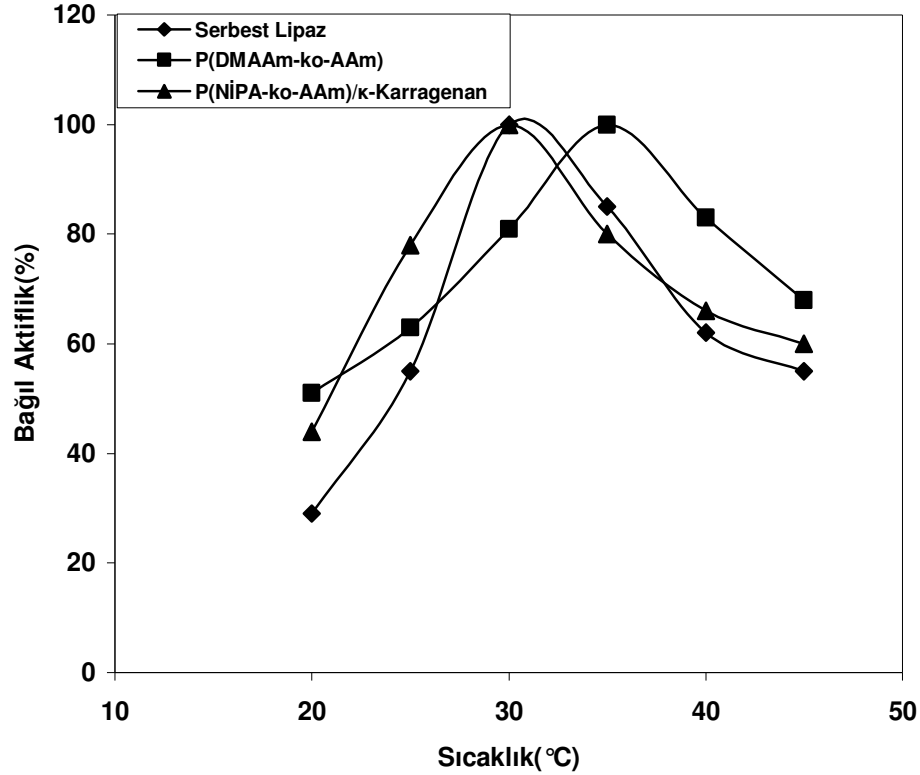
Serbest enzim için optimum sıcaklık 30°C bulunmuştur. Bilindiği gibi sıcaklığın artması ile moleküller arası çarpışma artmakta ve buna bağlı olarak da genellikle tepkimenin hızı artmaktadır. Enzimler protein yapısında oldukları için optimum sıcaklığın üzerinde denatürasyona uğrarlar. Sıcaklığın artması ile enzimin aktifliği azalır.

Grafikten de görüldüğü gibi hapsetme yöntemine göre immobilize edilen lipazın optimum sıcaklığında bir değişiklik görülmemiştir. Hapsetme yönteminde enzim ile destek materyali arasında bir etkileşim söz konusu değildir. Bu nedenle sıcaklığın değişmemesi beklenen bir durumdur. Kovalent bağlanma yöntemine göre immobilize edilen lipazın optimum sıcaklığı 30°C'den 35°C'ye kaymıştır.

Kovalent bağlanma sürecinde enzim ile destek materyali arasında iyonik etkileşimler ve enzim molekülünün kimyasal modifikasyonu söz konusudur. Ayrıca enzim ile destek materyali arasında kovalent bağlanma enzim hareketlerinde konformasyonel sınırlamaların doğmasına neden olabilir ve optimum sıcaklıkta bir artış gözlelenebilir.

Candida rugosa lipazı kitosan üzerine immobilize edildiğinde serbest ve immobilize lipaz için optimum sıcaklık 30°C bulunmuştur (7). *Candida Rugosa* lipazı poli(2-hidroksietil metakrilat) membranına kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde optimum sıcaklık 35°C den 45°C ye yükselmiştir (45). Eudragit E 30D özel isimli akrilik-metakrilik polimer yapı üzerine hapsetme yöntemi ile pankreatik lipaz immobilize edildiğinde immobilizasyon sonucunda enzimin ısısal kararlılığının arttığı ve optimum sıcaklığının değişmediği görülmüştür (46). *Candida Rugosa* lipazı Poli(GMA-HEMA-EGDMA) mikro kürelerine kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest lipaz için optimum sıcaklık 40°C iken immobilize lipaz için optimum pH 45°C bulunmuştur (47). Lipaz enzimi PVC, kitosan, kitin, agaroz, sefaroze, ve trisakril üzerine immobilize edildiğinde serbest lipaz için optimum sıcaklık 35°C iken immobilize lipaz için optimum sıcaklık 45°C bulunmuştur (48). Isıya dayanıklı *Humicola Lanuginosa* lipazı Ca-alginat ve prepolimer reçine olan ENTP 4000 üzerine hapsetme yöntemi ile ve

Amberlite XAD-7 reçinesi üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilize edildiğinde serbest ve Ca-alginatla immobilize edilen lipaz için optimum sıcaklık 50°C, ENTP 4000 ile immobilize edilen lipaz ile Amberlite XAD-7 üzerine immobilize edilen lipaz için optimum sıcaklık 60°C bulunmuştur (49).



Şekil 4.2. Serbest ve immobilize lipazın bağıl aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

4.3. Aktifliğe Substrat Derişiminin Etkisi

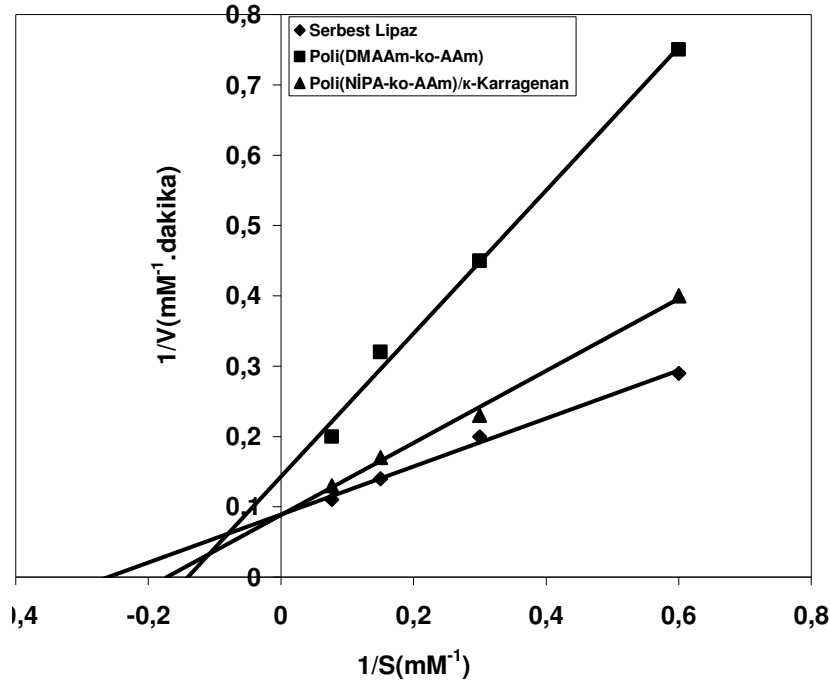
Serbest ve immobilize lipazın aktifliğine substrat derişiminin etkisini incelemek amacı ile kısım 3.6.1 de belirtilen yönteme göre çeşitli substrat derişimlerinde (13mM-1,65mM) gerçekleştiren reaksiyonlar ve kalibrasyon grafiğinden elde edilen eğim yardımıyla reaksiyon hızları hesaplandı. Elde edilen değ rlere göre Lineweaver-Burk grafiğı çizildi (Şekil 4.3). Grafikten K_m , V_{mak} değ rleri hesaplandı.

Çizelge 4.1. Serbest ve immobilize edilen lipazın kinetik parametreleri

Destek	K_m (mM)	V_{mak} (mM.dakika ⁻¹)
Serbest Lipaz	3,58	10,72
P(DMAAm-ko-AAm)	7,36	7,13
P(NİPA-ko-AAm)/κ-Karragenan	5,77	11,31

K_m değerindeki artış immobilize enzimin substrata olan ilgisinin az olduğunu gösterir. Enzimin yarı doygunluğa 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.

Candida rugosa lipazı kitosan üzerine immobilize edildiğinde serbest lipaz için K_m 1,67 mM; V_{mak} 92,5 U/mg-protein, immobilize lipaz için K_m 18,01 mM; V_{mak} 96,01 U/mg-protein olarak bulunmuştur (7). Başka bir çalışmada yine *Candida Rugosa* lipazı kitosan üzerine hidroksil gruplarının aktivasyonu ile immobilize edildiğinde serbest lipaz için K_m 0,013 (%); V_{mak} 3,98 (U/g-kitosan yada mL), immobilize lipaz için ise K_m 0,039 (%); V_{mak} (1,79 (U/g-kitosan yada mL) (kuru) ve K_m 1,669 (%); V_{mak} (U/g-kitosan yada mL) (ıslak) olarak bulunmuştur (50).



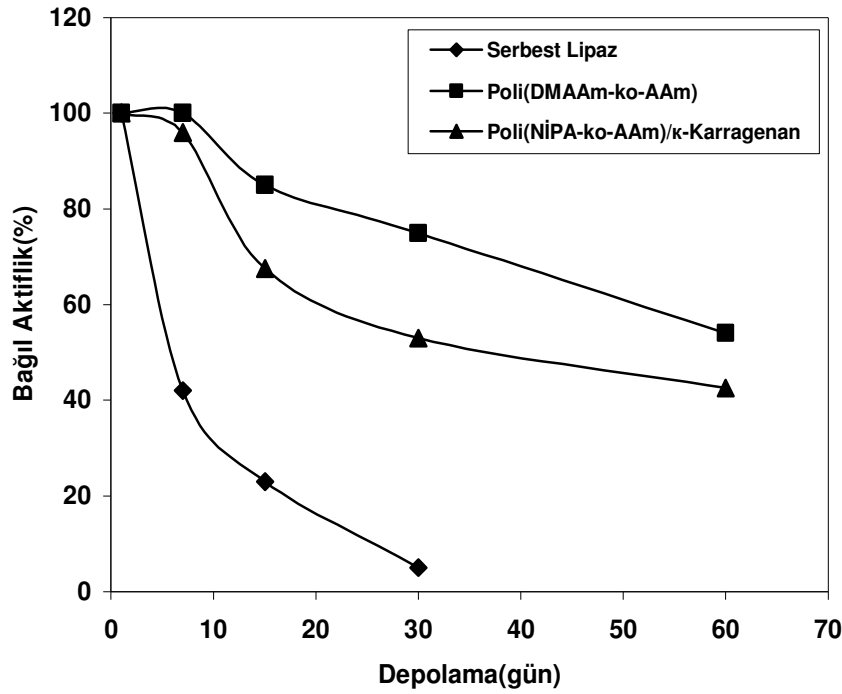
Şekil 4.3. Serbest ve immobilize lipazın Lineweaver-Burk grafiği

4.4. Serbest ve İmmobilize Lipazın Depolanma Kararlılığı

Serbest ve immobilize edilen lipazın aktifliğine depolanma süresinin etkisini incelemek amacı ile serbest ve immobilize enzim 4°C de buzdolabında saklanmıştır. Belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin kısım 3.6.1 de belirtilen yöntemle göre aktiflikleri tayin edilmiştir. Aktivite değerlerinin depolanma süresi ile değişimi Şekil 4.4'de verilmiştir. 60 günün sonunda serbest enzim, aktifliğinin %100 ünü kaybederken, hapsetme yöntemine göre immobilize edilen enzim %42,5, kovalent bağlanma yöntemine göre immobilize edilen enzimin %54 aktifliğini koruduğu görülmüştür.

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 4.4'de görüldüğü gibi immobilize enzimin aktifliği serbest enzimin aktifliğine göre daha fazla korunmuştur.

Candida cylindracea lipazı naylon destek üzerine immobilize edilmiş ve 72 gün sonra enzim aktivitesinin üçte birinin korunduğu görülmüştür (51). *Pseudomonas fluorescens* lipazı adsorpsiyon yöntemi ile glutaraldehit kullanılarak anyon değiştirici reçine üzerine immobilize edilmiştir. 90 günün sonunda enzimin %70 aktifliğini koruduğu görülmüştür (52). *Candida Rugosa* lipazı kitosan üzerine hidroksil gruplarının aktivasyonu ile immobilize edildiğinde 30 günün sonunda enzimin %54 aktifliğini koruduğu görülmüştür (50).



Şekil 4.4.Serbest ve immobilize lipazın bağıl aktifliğinin depolanma süresi ile değişimi

4.5. Serbest ve İmmobilize Lipazın Termal Kararlılığı

Serbest ve immobilize lipazın termal kararlılığını incelemek amacı ile serbest ve immobilize enzim çözeltileri farklı sıcaklıklarda (40°C-45°C) ve farklı zaman aralıklarında (5-25dakika) tutularak kısım 3.6.1 de belirtilen yöntemle göre aktiflikleri tayin edildi. Bağıl aktiflik değerlerinin zamanla değişimi Şekil 4.5 de

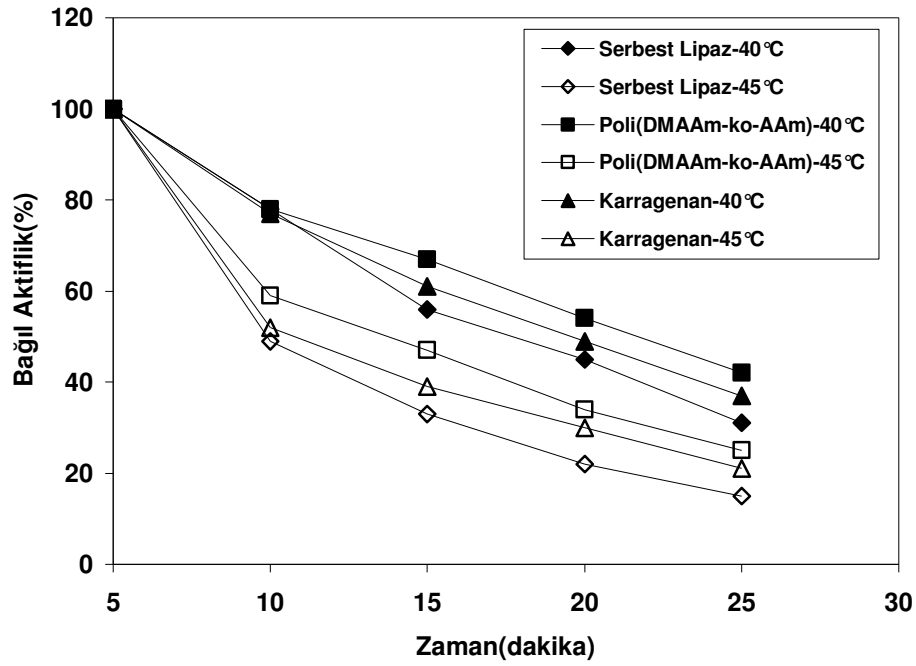
gösterilmiştir. Çizilen $\ln A-t$ grafiği yardımıyla hesaplanan farklı sıcaklıklardaki inaktivasyon sabitleri Çizelge 4.2’de verilmiştir. Serbest lipaz 40°C 25 dakika tutulduğunda aktifliğini %34, kovalent bağlanma yöntemine göre immobilize edilen lipaz aktifliğini %44, hapsetme yöntemine göre immobilize edilen lipaz aktifliğini %40 korumuştur. Serbest lipaz 45°C 25 dakika tutulduğunda aktifliğini %18, kovalent bağlanma yöntemine göre immobilize edilen lipaz aktifliğini %29, hapsetme yöntemine göre immobilize edilen lipaz aktifliğini %23 korumuştur.

Enzimler, sıcaklık ve süre değerleri arttıkça konformasyonel değişime uğrarlar ve buna bağlı olarak da aktifliklerinde azalma veya tümüyle yok olma gözlenebilir. Kovalent bağlanma yöntemi ile immobilizasyon sonucu enzim, kararlılığını daha fazla korumuştur. Kovalent bağlanma sürecinde enzim ile destek materyali arasındaki etkileşimlerin enzimin tersiyer yapısını koruduğu sanılmaktadır. Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi sıcaklık arttıkça k_i değerleri artmıştır. Immobilize edilen enzimlerin k_i değerleri serbest enzime göre azalmıştır. Immobilize edilen enzimler serbest enzime göre daha yavaş inaktive olmuştur.

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 gözlenmiştir (7) *Candida Rugosa* lipazı poli(2-hidroksietil metakrilat) membranına kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edildiğinde 60°C’de serbest ve immobilize lipaz için k_i değerleri sırasıyla 0,11 dakika⁻¹ ve 0,013 dakika⁻¹ bulunmuştur. Immobilize lipazın daha yüksek sıcaklıklarda daha yüksek termal kararlılık gösterdiği bildirilmiştir (45).

Çizelge 4.2. Serbest ve immobilize lipazın termal kararlılığı

	40°C $k_i(\text{dak}^{-1})$	45°C $k_i(\text{dak}^{-1})$
Serbest enzim	0,0558	0,0922
P(DMAAm-ko-AAm)	0,0406	0,0638
P(NİPA-ko-AAm)/κ-Karragenan	0,0504	0,0696



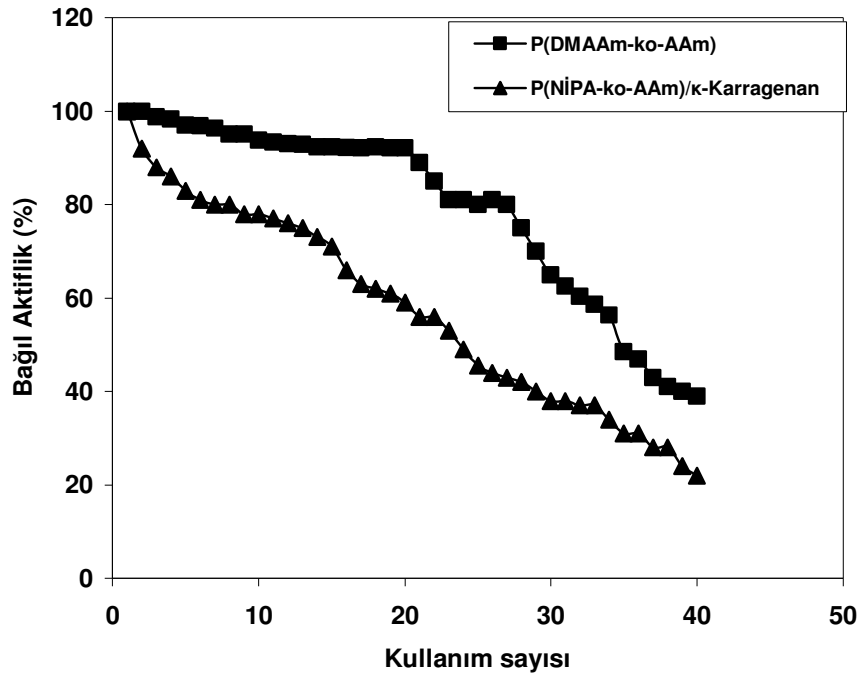
Şekil 4.5 Serbest ve immobilize lipazın termal inaktivasyonu

4.6. İmmobilize Lipazın Tekrar Kullanılabilirliği

İmmobilize edilen lipazın tekrar kullanım sayısını ölçmek amacıyla kısım 3.6.1. de 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. Hapsetme yöntemine göre immobilize edilen lipaz 10 kez kullanım sonunda %78,

25 kez kullanım sonunda %45,5 ve 40 kez kullanım sonunda %22 aktiflik gösterirken, kovalent bağlanma yöntemine göre immobilize edilen lipaz ise 10 kez kullanım sonunda %93,7, 25 kez kullanım sonunda %80 ve 40 kez kullanım sonunda %39 aktiflik göstermiştir.

Candida rugosa lipazı hidrofobik polimer destek üzerine adsorpsiyon yolu ile immobilize edildiğinde 15 kez kullanım sonunda enzim aktifliğinin %90'ının korunduğu bildirilmiştir (53). *Candida rugosa* lipazı kitosan üzerine immobilize edildiğinde 10 kez kullanım sonunda %74 aktiflik gösterdiği bildirilmiştir (7).



Şekil 4.6. İmmobilize lipazın bağıl aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

5. SONUÇLAR

Serbest ve immobilize lipaz enziminin aktifliğine etki eden çeşitli parametreler incelenmiş ve elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

- 1) Serbest lipaz için optimum pH değeri 8 olarak bulunmuştur. P(DMAAm-ko-AAm) ve P(NİPA-ko-AAm)/κ-Karragenan kullanılarak immobilize edilen lipaz için optimum pH değeri 8 olarak bulunmuştur.
- 2) Serbest lipaz için optimum sıcaklık değeri 30°C iken P(DMAAm-ko-AAm) ve P(NİPA-ko-AAm)/κ-Karragenan kullanılarak immobilize edilen lipaz için optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 35°C ve 30°C bulunmuştur.
- 3) Serbest lipaz için K_m değeri 3,58 mM, P(DMAAm-ko-AAm) ve P(NİPA-ko-AAm)/κ-Karragenan kullanılarak immobilize edilen lipaz için K_m değerleri sırasıyla 7,36 mM ve 5,77 mM olarak bulunmuştur.
- 4) Serbest lipaz için V_{mak} değeri 10,72 mM.dakika⁻¹ P(DMAAm-ko-AAm) ve P(NİPA-ko-AAm)/κ-Karragenan kullanılarak immobilize edilen lipaz için V_{mak} değerleri sırasıyla 7,13 mM.dakika⁻¹, 11,31 mM.dakika⁻¹ olarak bulunmuştur.
- 5) Serbest lipaz 4°C da depolandığında 60 günün sonunda aktifliğini %100 kaybederken, P(DMAAm-ko-AAm) ve P(NİPA-ko-AAm)/κ-Karragenan kullanılarak immobilize edilen lipaz ise aktifliğini sırasıyla %54, %42, korumuştur.
- 6) Serbest lipaz 40°C 25 dakika tutulduğunda aktifliğini %34, P(DMAAm-ko-AAm) kullanılarak immobilize edilen lipaz aktifliğini %44, P(NİPA-ko-AAm)/κ-Karragenan kullanılarak immobilize edilen lipaz aktifliğini %40 korumuştur. Serbest lipaz 45°C 25 dakika tutulduğunda aktifliğini %18, P(DMAAm-ko-AAm) %29, P(NİPA-ko-AAm)/κ-Karragenan kullanılarak immobilize edilen lipaz aktifliğini %23 korumuştur.

- 7) P(DMAAm-ko-AAm) 10 kez kullanım sonunda yaklaşık %94, 25 kez kullanım sonunda %80, 40 kez kullanım sonunda ise %39 aktiflik gösterirken; P(NİPA-ko-AAm)/κ-Karragenan 10 kez kullanım sonunda yaklaşık %43, 25 kez kullanım sonunda yaklaşık %46, 40 kez kullanım sonunda ise %22 aktiflik göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Telefoncu, A., “Enzimoloji”, *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi*, İzmir, 1-305 (1997).
2. Erarslan, A., Mayıs 414, *Bilim Teknik*, 35:16-18 (2002).
3. Wiseman, A., “Handbook of Enzyme Biotechnology 2nd edit.”, John Wiley&Sons Chcester, *England*, 12 (1986).
4. Kutay, F., “Enzimler”, İnsan Biyokimyası, Taner Onat, Kaya Emerk, Eser Y. Sözmen, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 197-202 (2002).
5. Paiva, A.L., Balcao, V.M., Malcata, F.X., “Kinetics and Mechanisms of Reactions Catalyzed by Immobilized Lipases”, *Enzyme and Microbial Technology*, 27:187-204 (2000).
6. Balcao, V.M., Malcata, F.X., “Lipase Catalyzed Modification of Milkfat”, *Biotechnology Advances*, 16(2):309-341 (1998).
7. Hung, T.C., Giridhar, R., Chiou, S.H., Wu, W.T., “Binary Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase on Chitosan”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26:69-78 (2003).
8. Zaitsev, S.Y., Gorokhova, I.V., Kashtigo, T.V., Zintchenko, A., Dautzenberg, H., “General Approach for Lipases Immobilization in Polyelectrolyte Complexes”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemmistry Engineering Aspects*, 221:209-220 (2003).
9. Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille, J., Haas, M.J., “Customizing Lipases for Biocatalysis: a Survey of Chemical, Physical and Molecular Biological Approaches”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9(4-6):113-148 (2000).
10. Koç, L., “Katı Yağların Serbest ve İmmobilize Lipazla Hidrolizi” Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 17-19 (1994).
11. Kraulis, P.J., “Molscript: A program to Produce Both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures”, *Journal. Application. Crystallography.*, 24:946-950 (1991).
12. Lawson, D.M., Brzozowski, A.M., Rety, S., Verma, C., Dodson, G.G., “Probing the Nature of Substrate Binding in *Humicola Lanuginosa* Lipase Through X-ray Crytallograpy and İntuivite Modelling”, *Protein Engineering*, 7:543-550 (1994).

13. Akoh, C.C., Min, D.B., "Microbial Lipases and Enzymatic Interesterification", *Food Lipids-Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, Marel Deccer, Inc., 641-698 (1998).
14. Fadiloğlu, S., "Kinetics of Olive Oil Hidrolysis by Free and Immobilized *Candida Rugosa* Lipase" Ph. D. Thesis, *Universtiy of Gaziantep*, 24-56 (1996).
15. Petersen, M.T.N., Fojan, P., Petersen, S.B., "How do Lipases and Esterases Work: The Electrostatic Contribution" *Journal of Biotechnology*, 85(2):115-147 (2001).
16. Whellcuright, S.M., "Protein Characteristics", Protein Purification: Design and Scale up of Downstream Processing, *Oxford University Pres*, New York, 26-40 (1991).
17. Bai, Z.W.,Zhou, Y.K., "A Novel Enzyme Support Derived from Aminated Silica Gel and Polysuccidimide: Preparation and Application for The Immobilization of Porcine Pancreatic Lipase", *Reactive&Functional Polymers*, 1-6 (2004).
18. Jaeger, K.E., Reetz, M.T., "Microbial Lipases from Versatile Tools for Biotechnology", *Trends in Biotechnology*, 16(9):396-403 (1998).
19. Pandey, A.,Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V.T., "The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29:119-131 (1999).
20. Gloger, M., Tischer, W., "Determination of Catalytic Activity of Immobilized Enzymes" In Methods of Enzymes Analysis, 2nd ed. , *Mc Graw Hill*, New York, 142-154, (1981).
- 21 Baysal, B., "Polimer Kimyası", *O.D.T.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi*, Ankara, 1-24 (1984).
22. Saçak, M., "Polimer Kimyası", *Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi*, Ankara, 1-63 (2004).
23. Qui, Y., Park, K., "Environment-sensitive Hydrogels for Drug Delivery", *Advanced Drug Deliver Reviews*, 53:321 (2001).
24. Jeang, B., Gutowska, A., " Lessons from nature : stimuli-responsive polymers and their biomedical applications ", *Trends Biotechnology*, 20:305-311 (2002).
25. Gupta, P.,Vermani, K., Garg, S.," Hydrogels from Controlled Release to pH-Responsive Drug Delivery" , *Drug Discov Today* , 7:569 (2002).
26. Wu, S. X., Hoffman , S. A. and Yager, P., " Senthesis and Characterization of Thermally Reversible Macroporous Poly (n-isopropylacrylamide) Hydrogels

- “*Journal of Polymer Science Part A, Polymer Chemistry*, 30:2121-2129 (1992).
27. Langer, R. S, Peppas, N. A, "Present and Future Applications of Biomaterials in Controlled Drug Delivery Systems", *Biomaterials*, 2:201214 (1981).
 28. Ohara, N., Sakai, N., "Water-Solvent Polymer Gels as Controlled Release Agrochemical Carriers", *Chemical Abstracts*, 103: 214P26q, 801 (1985).
 29. Carderilli, N. F, "Monolithic Elastomeric Materials", *Controlled Release Technologies*, CRC Press, Florida, 1:55-127 (1980).
 30. Allan, G. G., Beer, J. W., Cavis, M. J., Mikeles, R. A., "The Biodegradable Controlled Release of Pesticides from Polymeric Substrates", *Controlled Release Technologies*, CRC Press, Florida, 11:7-62 (1980).
 31. Haris, F. W., "Polymer Containing Pendent Pesticides Substituents", *Controlled Release Technologies*, CRC Press, Florida, 1:3-82 (1980).
 32. Roseman, T. J. and Cardarelli, N. F., "Monolithic Polymer Devices", *Controlled Release Technologies*, CRS Press, Florida, 11: 46-49 (1980).
 33. Okamoto, T., Saito, K, Toyama, S., "Treatment of Fabric Product", *Chemical Abstract*, 106: 68691p, 74 (1987).
 34. Shibana, T Ho. K, "Highly water-absorbing polymer", *Chemical Abstract*, 106: 33625t, 11 (1987).
 35. Tokuyama, T, Murata, M., Senba, K., "Studies on The Purification of Waste Oils with Highly Water-Absorbent polymers " *Chemical Abstract*, 102:169314r, 153 (1985).
 36. Chmelir, M., Dahmen, K., Hoffman, G., Werner, G., "Absorbents for Blood and Serous Body Fluids", *Chemical Abstract*, 98: 11379r, 391 (1983).
 37. Zhang, X. Z., Zhuo, R. X., "Preparation of Fast Responsive, Thermally Sensitive Poly (N-isopropyl acrylamide) Gel", *European Polymer Journal*, 36: 2301-2303 (2000).
 38. Zhang, X. Z., Wu, D. Q., Chu, C., "Effect of The Crosslinking Level on The Properties of Temperature-Sensitive Poly (N-isopropyl acrylamide) Hydrogels", *Journal of Polymer Science*, 41: 582-593 (2003).
 39. Özdoğan, A., "Effect of Charge Density on Spatial Inhomogeneity in Poly(acrylamide) and Poly(N-isopropylacrylamide) Gels", Yüksek lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, 25-26 (2004).

40. Tsuchida, E., Takeoka, S., "Interpolymer complexes and their ion-conduction", Macromolecular complexes in chemistry and biology, Eds: Dublin/Bock/Davis/Schuls/Thies, **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, 183-185 (1994).
41. Anderson, N.S., Campbell, J.W., Harding, M.M., Rees, D.A. and Samuel, J.W.B. "X-ray Diffraction Studies of Polysaccharide sulphates; Double Helix Model for κ -carrageenan and ι -carrageenans" **Journal of Molecular Biology**, 45: 85-99 (1969).
42. Meunier, V., Nicola, T. and Durand, D. "Structure and Kinetics of Aggregating κ -carrageenan Studied by Light Scattering" **Macromolecules** 33: 2497-2504 (2000).
43. Nickerson, M.T. and Paulson, A.T. "Rheological Properties of Gellan, κ -Carrageenan and Alginate Polysaccharides: Effect of Potassium and Calcium ions on Macrostructure Assemblages" **Carbohydrate Polymers** 58: 15-24 (2004).
44. Nickerson, M.T., Paulson, A.T. and Hallent, F.R. "Dilute solution Properties of κ -carrageenan Polysaccharides: Effect of Potassium and Calcium ions on Chain Conformation" **Carbohydrate Polymers** 58: 25-33 (2004).
45. Bayramoğlu, G., Kaçar, Y., Denizli, A., Arica, M.Y., "Covalent Immobilization of Lipase onto Hydrophobic group Incorporated Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Based Hydrophilic Membrane Matrix", **Journal of Food Engineering**, 52:367-374 (2002).
46. Telefoncu, A., Dinçkaya, E., Verlop, K.D., "Preparation and Characterization of Pancreatic Lipase Immobilized in Eudragit-Matrix", **Application Biochemistry Biotechnology**, 26(3): 311-317 (1990).
47. Bayramoğlu, G., Kaya, B., Arica, M.Y., "Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase onto Spacer-arm Attached Poly (GMA-HEMA-EGDMA) Microspheres", **Food Chemistry**, 1-8 (2004)
48. Shaw, J.F., Chang, R.C., Wang, F.F., Wang, Y.J., "Lipolytic Activities of a Lipase Immobilized on Six Selected Supporting Materials" **Biotechnology Bioengineering**, 35(2): 132-137 (1990).
49. Omar, I.C., Saeki, H., Nishio, N., Nagai, S., "Hydrolysis of Triglycerides by Immobilized Thermostable Lipase from *Humicola Lanuginosa*" **Agric. Biology Chemistry**, 52(1): 99-105 (1988).
50. Chiou, S.H., Wu, W.T., "Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase on Chitosan with Activation of the Hydroxyl Groups", **Biomaterials**, 25:197-204 (2004).

51. Carta, G., Gainer, J.L., Benton, A.H., "Enzymatic Synthesis of Esters Using an Immobilized Lipase", ***Biotechnology Bioengineering***, 37: 1004-1009 (1991).
52. Kosugi, Y., Tanaka, H., Tomizuka, N., "Continuous Hydrolysis of Oil Immobilized Lipase in a Countercurrent Reactor", ***Biotechnology Bioengineering***, 36(6): 617-622 (1990).
53. Ruchenstein, E., Wang, X., "Lipase Immobilized on Hydrophobic Porous Polymer Supports Prepared by Concentrated Emulsion Polymerization and Their Activity in the Hydrolysis of Triacylglycerides", ***Biotechnology Bioengineering***, 42(7): 821-828 (1993).

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Ankara’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara’da tamamladı. 2001 yılında Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldu. 2003’de Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümünde Yüksek Lisansa başladı.