T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİTOSAN BONCUKLARA LİPAZ İMMOBİLİZASYONU

Uğur BALKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman:

Doç. Dr. Hülya YAĞAR

EDİRNE-2013

KİTOSAN BONCUKLARA LİPAZ İMMOBİLİZASYONU

UĞUR BALKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANA BİLİM DALI

2013

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç Dr. Hülya YAĞAR
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri : İmza

Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU

Yrd. Doç. Dr. Hüsnüye DURMAZ

Doç. Dr. Hülya YAĞAR

Tarih: 31 / 01 / 2013

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

31 / 01 / 2013

Uğur BALKAN



Yüksek Lisans Tezi
Kitosan Boncuklara Lipaz İmmobilizasyonu
T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışma kapsamında, defne tohumlarından *(Laurus nobilis* L.) izole edilen lipaz enzimi kitosan boncuklara immobilize edildi, serbest ve immobilize enzimlerin bazı özellikleri belirlendi ve birbirleriyle karşılaştırıldı.

Çimlendirilen defne tohumlarından elde edilen lipaz enzimi kitosan boncuklara iki farklı yöntemle immobilize edildi. İlk yöntemde (K_1 yöntemi) damlatma çözeltisi olarak 0.05 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda hazırlanan pentasodyum trifosfat kullanıldı. Diğer yöntemde (K_2 yöntemi) eşit hacimdeki glioksal hidrat ve sodyum pirofosfat tetrabazik karışımından oluşan çözelti kullanıldı ve elde edilen boncuklar glutaraldehitle aktive edildi. İmmobilizasyon verimi K_1 yöntemi için % 78, K_2 yöntemi için % 64 olarak bulundu. Hidrolitik lipaz aktivitesi serbest enzim, K_1 ve K_2 boncuklar için sırasıyla; 1.79 U/mg protein, 12.6 U/mg protein ve 16 U/mg protein olarak belirlendi. İmmobilizasyonların optimizasyonlarında, K_1 yöntemi için; kitosan miktarı 250 mg, pentasodyum trifosfat konsantrasyonu % 0.4, enzim miktarı 2 mL, boncuk boyutu 2.9 mm, boncuk miktarı 0.25 g olarak bulundu. K_2 yöntemi için; kitosan miktarı 1.25 g, glioksal hidrat konsantrasyonu % 3 ve sodyum pirofosfat tetrabazik konsantrasyonu % 4, glutaraldehit konsantrasyonu % 0.2, enzim miktarı 1 mL, boncuk boyutu 2.7 mm, boncuk miktarı 0.5 g olarak belirlendi.

Optimum pH; serbest enzim, K_1 boncuk ve K_2 boncuk için, sırasıyla 7.0, 6.0 ve 8.0, optimum sıcaklık tümü için 40 °C olarak belirlendi. İmmobilizasyon işleminin defne lipazının termal kararlılığını iyileştirdiği görüldü. K_m ve V_{max} değerleri, serbest enzim, K_1 ve K_2 boncuk için sırasıyla 16.66 g ile 4.76 U/mg protein, 6.66 g ile 25 U/mg protein ve 1.56 g ile 14.28 U/mg protein olarak belirlendi. Yeniden kullanılabilirlik çalışmasında, K_1 ve K_2 boncukları 2 ve 3 döngü boyunca aktivitesini koruyabildi. Serbest enzim 16 gün, K_1 boncuk 30 gün ve K_2 boncuk 35 gün boyunca 4 °C'de aktivitesini korudu.

Yıl : 2013

Sayfa Sayısı : 76

Anahtar Kelimeler : Defne, lipaz, kitosan, enzim immobilizasyonu, pentasodyum trifosfat, sodyum pirofosfat tetrabazik

Master Thesis

Lipase Immobilization onto Chitosan Beads

Trakya University Institute of Natural Sciences

Chemistry

ABSTRACT

In this study, lipase enzyme isolated from laurel seeds (*Laurus nobilis* L.) was immobilized onto chitosan beads and some properties of free and immobilized enzymes were determined, and compared with each other.

Lipase enzyme isolated from germinated laurel seeds (*Laurus nobilis* L.) was immobilized onto chitosan beads by using two different methods. In the first method (K_1 method), pentasodium triphosphate prepared in 0.05 M Tris-HCl (pH 7.0) buffer solution was used as dropping solution. In the other method (K_2 method), the mixture contained equivalent volumes of glyoxal hydrate and sodium pyrophosphate tetrabasic was used as dropping solution and the obtained beads were activated with glutaraldehyde. Immobilization yields were found to be 78 % and 64 % for K_1 and K_2 methods, respectively. Hydrolytic lipase activities were determined as 1.79 U/mg protein, 12.6 U/mg protein and 16 U/mg protein for free enzyme, K_1 and K_2 beads, respectively. In the optimization of immobilizations, for K_1 method, chitosan amount was 250 mg, pentasodium triphosphate concentration was 0.4 %, enzyme amount was 2 mL, bead size was 2.9 mm, bead amount was 0.25 g. For K_2 method, chitosan amount was 1.25 g, glyoxal hydrate concentration was 3 %, sodium pyrophosphate tetrabasic concentration was 4 %, glutaraldehyde concentration was 0.2 %, enzyme amount was 1 mL, bead size was 2.7 mm, bead amount was 0.5 g.

Optimum pH's were determined as 7.0, 6.0 and 8.0 for free enzyme, K_1 and K_2 beads, respectively. Optimum temperatures of all enzyme samples were found to be 40 °C. Thermal stability of laurel lipase was improved by both immobilization treatments. K_m-V_{max} values were 16.66 g-4.76 U/mg protein, 6.66 g-25 U/mg protein and 1.56 g-14.28 U/mg protein for free enzyme, K_1 and K_2 beads, respectively. In the reusability assay, K_1 and K_2 beads saved their activities during 2 and 3 cycles, respectively. At 4 °C, free enzyme saved its activity for 16 days while K_1 and K_2 beads saved 30 and 35 days, respectively.

Year : 2013

Number of Pages : 76

Keywords : Laurel seeds, lipase, chitosan, enzyme immobilization, pentasodium triphosphate, sodium pyrophosphate tetrabasic

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisi ve tecrübesinden yararlandığım, insani değerlerini ve eğitimci kişiliğini örnek edindiğim, tez çalışmam boyunca öneri ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Hülya YAĞAR'a,

Çalışmanın her aşamasında yardımlarını ve katkılarını esirgemeyen bölüm hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemi sağlayan, maddi ve manevi her zaman yanımda olan aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Bu çalışma, TÜBAP 2011/157 no'lu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT iii
TEŞEKKÜR v
SİMGELER DİZİNİ ix
ŞEKİLLER DİZİNİ x
TABLOLAR DİZİNİ xii
BÖLÜM 1 1
GİRİŞ 1
BÖLÜM 2 3
GENEL BİLGİLER 3
2.1. Lipazlar 3
2.1.1. Lipaz Enziminin Üç Boyutlu Yapısı 4
2.1.2. Lipazların Katalizlediği Kimyasal Reaksiyonlar ve Seçicilikleri 6
2.1.3. Lipaz Kaynakları 8
2.1.4. Lipazların Kullanım Alanları 9
2.2. Çimlenme ve Lipaz Aktivitesi 10
2.3. Enzim İmmobilizasyonu 11
2.3.1. İmmobilizasyon Yöntemleri 13
2.4. Defne 15
2.5. Kitosan 18
2.6. Kaynak Araştırması 20
2.7. Tezde Kullanılan İmmobilizasyon Yöntemlerinin Esaslarına Bakış 22
BÖLÜM 3 28
MATERYAL VE METOTLAR 28
3.1. Materyaller 28
3.1.1. Kimyasal Maddeler 28
3.1.2. Kullanılan Cihazlar 28
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler 29
3.2. Metotlar 30

3.2.1. Defne Tohumundan Lipaz Enzimi İzolasyonu 30
3.2.1.1. Çimlendirme 30
3.2.1.2. Defne Lipazı Ekstraksiyonu 31
3.2.2. Kitosan Jelde İmmobilizasyon 31
3.2.3. Protein Tayini 32
3.2.3.1. Lowry Yöntemi ile Kantitatif Protein Tayini 32
3.2.4. Enzimatik Aktivite Tayini 33
3.2.5. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu 34
3.2.5.1. Kitosan Miktarı Optimizasyonu 34
3.2.5.2. Damlatma Çözeltisi Optimizasyonu 34
3.2.5.3. Glutaraldehit Konsantrasyonu Optimizasyonu 35
3.2.5.4. Enzim Miktarı Optimizasyonu 35
3.2.5.5. Boncuk Boyutu Optimizasyonu 35
3.2.5.6. Boncuk Miktarı Optimizasyonu 35
3.2.6. Defne Tohumu Lipazının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi 36
3.2.6.1. Optimum pH Çalışması 36
3.2.6.2. Optimum Sıcaklık Çalışması 36
3.2.6.3. Termal Kararlılık Çalışması 36
3.2.6.4. K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi 36
3.2.6.5. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği 37
3.2.6.6. İmmobilize Enzimin Depo Kararlılığı 37
BÖLÜM 4 38
DENEY SONUÇLARI VE BULGULAR 38
4.1. Defne Tohumlarının Çimlendirilmesi ve Lipaz İzolasyonu 38
4.2. Defne Lipazının Kitosan Boncuklara İmmobilizasyonu 38
4.3. Protein Tayini İçin Standart Grafiğin Hazırlanması 40
4.4. İmmobilizasyonun Koşullarının Optimizasyonu 41
4.4.1. Kitosan Miktarı Optimizasyonu 41
4.4.2. Damlatma Çözeltisi Optimizasyonu 42
4.4.3. Glutaraldehit Konsatrasyonun Optimizasyonu 45

4.4.4. Enzim Miktarı Optimizasyonu 45
4.4.5. Boncuk Boyutu Optimizasyonu 47
4.4.6. Boncuk Miktarı Optimizasyonu 49
4.5. Defne Tohumu Lipazının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi 50
4.5.1. Optimum pH Çalışması 50
4.5.2. Optimum Sıcaklık Çalışması 51
4.5.3. Termal Kararlılık Çalışması 52
4.5.4. K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi 54
4.5.5. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği 56
4.5.6. Serbest ve İmmobilize Enzimin Depo Kararlılığı 56
BÖLÜM 5 59
SONUÇLAR VE TARTIŞMA 59
KAYNAKLAR 66
ÖZGEÇMİŞ 76

SİMGELER DİZİNİ

BSA	: Sığır Serum Albumini (Bovine Serum Albumin)
K_1	: Defne lipazının immobilizasyonu için kullanılan yöntemlerden birincisi
K_2	: Defne lipazının immobilizasyonu için kullanılan yöntemlerden ikincisi
U	: Ünite
K_m	: Michaelis-Menten hız sabiti
PVA	: Polivinil alkol
V_{max}	: Maksimum hız

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Lipazların katalizlediği hidroliz reaksiyonu 3
Şekil 2.2. Domuz pankreatik lipazının 3 boyutlu yapısı 4
Şekil 2.3. Domuz pankreatik lipazının aktif üçlüsü 5
Şekil 2.4. Domuz pankreatik lipazının inaktif (kapalı) ve aktif (açık) formu 5
Şekil 2.5. Lipazların katalizlediği reaksiyonlar 6
Şekil 2.6. Lipaz katalizli interesterifikasyon reaksiyonunun mekanizması 7
Şekil 2.7. Endüstride kullanılan lipazların biyoçeşitliliği 8
Şekil 2.8. İmmobilize enzimdeki KOF ve KF arasındaki ilişki ve uygulaması 12
Şekil 2.9. Başlıca enzim immobilizasyon yöntemleri 13
Şekil 2.10. Defne yaprakları 16
Şekil 2.11. Defne tohumları 17
Şekil 2.12. Selüloz, kitin ve kitosanın yapısı 18
Şekil 2.13. Deniz kabuklusu artığından kitin, kitosan ve onların oligomer ve monomerlerinin ticari üretimi. 19
Şekil 2.14. Kitin ve kitosanın fonksiyonel bağlantı noktaları 20
Şekil 2.15. Tutuklama yöntemi ile gerçekleştirilen immobilizasyon işlemi 23
Şekil 2.16. Pentasodyum trifosfatın (tripolifosfat, TPP olarak da bilinir) yapısı 24
Şekil 2.17. Glioksal hidrat (A), Sodyum pirosfat tetrabazik (B) ve Glutaraldehit'in (C) kimyasal yapıları 24
Şekil 2.18. Çapraz bağlama (K_2) yöntemi ile gerçekleştirilen immobilizasyon işlemi 25
Şekil 2.19. K_2 yönteminin olası immobilizasyon mekanizması 27
Şekil 4.1. Alsarra ve ark. Metoduyla (K_1 yöntemi) gerçekleştirilen immobilizasyonda elde edilen boncuklar 39
Şekil 4.2. Altun ve Çetinus metoduyla (K_2 yöntemi) gerçekleştirilen immobilizasyonda elde edilen boncuklar 39
Şekil 4.3. Standart protein olarak sığır serum albümini çözeltisi kullanılarak Lowry yöntemiyle hazırlanan standart protein grafiği 40
Şekil 4.4. Kitosan miktarı optimizasyonu (K_1 yöntemi için) 41
Şekil 4.5. Kitosan miktarı optimizasyonu (K_2 yöntemi için) 42
Şekil 4.6. K_1 yönteminde kullanılan damlatma çözeltisi pentasodyum trifosfat çözeltisinin hazırlandığı 0.05 M Tris-HCl tamponun pH'ının optimizasyon grafiği 43

Şekil 4.7. K_1 yönteminde damlatma çözeltisi olarak kullanılan pentasodyum trifosfat çözeltisi konsantrasyonunun optimizasyon grafiği 43
Şekil 4.8. K_2 yöntemiyle gerçekleştirilen immobilizasyonda damlatma çözeltisi hazırlanmasında kullanılan glioksal hidrat yüzdesinin belirlenmesi 44
Şekil 4.9. K_2 yöntemiyle gerçekleştirilen immobilizasyonda damlatma çözeltisi hazırlanmasında kullanılan sodyum pirofosfat tetrabazik konsantrasyonunun belirlenmesi 44
Şekil 4.10. K_2 yöntemiyle gerçekleştirilen kitosan boncuklara lipaz immobilizasyonunda kullanılan glutaraldehit yüzdesinin belirlenmesi 45
Şekil 4.11. K_1 yöntemiyle lipaz immobilizasyonunda kullanılacak enzim miktarının belirlenmesi 46
Şekil 4.12. K_2 yöntemiyle lipaz immobilizasyonunda kullanılacak enzim miktarının belirlenmesi 47
Şekil 4.13. K_1 yöntemiyle yapılan boncuklar için boncuk boyutu optimizasyonu 48
Şekil 4.14. K_2 yöntemiyle yapılan boncuklar için optimum boncuk çapının belirlenmesi 48
Şekil 4.15. K_1 yöntemiyle elde edilen boncuklar için boncuk miktarı optimizasyonu ... 49
Şekil 4.16. K_2 yöntemiyle elde edilen boncuklar için boncuk miktarı optimizasyonu ... 49
Şekil 4.17. Serbest ve immobilize defne tohumu lipazının pH'a bağlı hidrolitik aktivitelerinin değişimi 51
Şekil 4.18. Serbest ve immobilize defne tohumu lipazının sıcaklığa bağlı hidrolitik lipaz aktivitelerinin değişimi 52
Şekil 4.19. Serbest enzime ait termal kararlılık grafiği 53
Şekil 4.20. K_1 boncuklarına ait termal kararlılık grafiği 53
Şekil 4.21. K_2 boncuklarına ait termal kararlılık grafiği 54
Şekil 4.22. Serbest ve immobilize defne tohumu lipazı aktivitesi için oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği 55
Şekil 4.23. Kitosan boncuklara immobilize edilmiş defne tohumu lipazının kesikli proseste yeniden kullanılabilirliği 56
Şekil 4.24. Serbest ve immobilize defne tohumu lipazının depo kararlılığı 57

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. Defne tohumu için en uygun çimlendirme süresinin belirlenmesi 38
Tablo 4.2. Kitosan boncuklara yapılan lipaz immobilizasyonun yüzdeleri ve enzim aktiviteleri 40
Tablo 4.3. K_1 yöntemi ile gerçekleştirilen immobilizasyon işleminin koşullarının optimizasyonu 50
Tablo 4.4. K_2 yöntemi ile gerçekleştirilen immobilizasyon işleminin koşullarının optimizasyonu 50
Tablo 4.5. Serbest ve immobilize defne tohumu lipazının kinetik değerleri 55
Tablo 4.6. Serbest ve immobilize enzimlerin bazı biyokimyasal özellikleri 58

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Enzimler, canlı hücrede meydana gelen metabolizma reaksiyonlarını hızlandıran veya düzenleyen protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Doğal ortamları dışında yeterli koşullar sağlandığında dış ortamlarda da etkilerini gösterebildikleri için pek çok alanda enzimlerden yararlanılabilmektedir. Enzimler bugün hücreden çıkmış ve artık çeşitli bakımlardan günlük ve ekonomik hayata girmiştir [1]. Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar kimyasal yöntemlere göre daha ucuz ve de daha basittir.

Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştiğinden katalizör olarak serbest enzim kullanıldığında enzimin katalitik aktivitesini yitirmeden reaksiyon ortamından geri kazanımı mümkün değildir. Aynı zamanda reaksiyon ortamından istenilen zamanda uzaklaştırılmama, reaksiyonu durdurmak için kullanılabilecek inhibitörün yaratacağı kirlilik unsuru, yeniden kullanılamama gibi etkenler enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizörler olmalarına neden olmakta, bu da endüstriyel üretim maliyetlerini artırmaktadır.

Karşılaşılan tüm bu sorunların çözümleyebilmek, enzimleri endüstriyel kullanımlarda daha çekici hale getirmek için yaklaşık 40 yıldan bu yana enzim immobilizasyonu üzerine araştırmalar yoğunlaşmıştır [2].

Lipazlar (EC.3.1.1.3, triaçilgliserol açil hidrolaz) hayvansal ve bitkisel yağların normal koşullar altında tersinir hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Bunun dışında esterifikasyon, transesterifikasyon gibi reaksiyonları da katalizlemektedir [3].

Lipaz tarafından katalizlenmiş olan reaksiyonlar doğal metabolik reaksiyonlara benzemesinden dolayı kimyasal reaksiyonlara oranla daha çevre dostu olarak tanımlanırlar.

Lipaz enzimi, gıda, temizlik, tıp, kağıt, eczacılık, kozmetik, biyodizel üretimi gibi çok çeşitli endüstriyel uygulama alanına sahiptir. Bu haliyle ticari büyüklük olarak geniş pazar payına sahip, en çok kullanılan enzimlerden biridir.

Serbest haliyle kıyaslandığında lipazları bir destek materyaline tutturmak, ürün kirlenmesini önler ve katalizörün reaksiyon ortamından alınıp başka reaksiyonlarda tekrar kullanımına olanak sağlar.

Kimyasal ve biyolojik materyallerin doğal taşıyıcı polimerlere tutuklanması bilimsel ve endüstriyel uygulamalarda oldukça geniş bir ilgiye sahiptir. Alginat, agaroz, karagenan, kitin ve kitosan gibi tutuklama teknolojisinde destek olarak kullanılan doğal polimerlerin toksik olmama, biyouyumluluk ve biyobozunabilirlik gibi avantajları vardır [4]. Bu önemli özelliklere sahip olmanın yanında kitosan, ucuz, zararsız, hidrofilik yapılı gözenekli yapısıyla enzim immobilizasyonunda sıkça kullanılan bir polimerdir [5]. Kitosan, enzime nispeten yüksek aktivite ve stabilite göstermesine neden olacak bir mikroçevre sağlar.

Lipazlar, hayvansal (pankreatik, gastrik), mikrobiyal (bakteriyel, mantar ve maya) veya bitkisel kaynaklı olabilir. Yüksek üretim maliyetleri, mikrobiyal lipazların endüstriyel uygulamalardaki geniş kullanımlarına rağmen sınırlayıcı bir etkendir. Bu sebeple diğer enzim kaynaklarının araştırılmasına olan ilgi artmıştır. Son yıllarda, yağlı tohumlardan izole edilen lipazlar çok ilgi çekmektedir. Bazı noktalarda, bu enzimler hayvansal ve mikrobiyal lipazlara kıyasla çeşitli avantajlara sahiptir. Bunlar; düşük fiyat, yüksek spesifiklik, saflaştırmanın kolaylığı ve bulunabilirliktir [6].

Defne (Akdeniz defnesi, *Laurus nobilis* L.) bir maki bitkisi olup, kışın yaprağını dökmeyen ve daima yeşil kalan bir ağaççıktır. Defne bitkisinin tohumları başlangıçta yeşil, olgunlaştıklarında siyah renklidir. Tohumlar yapraklardan daha fazla yağ ihtiva eder ve yağ oranı yaklaşık % 25-30 arasındadır.

Bu çalışmanın amacı; defne tohumu lipazını kitosana iki farklı yöntemle immobilize etmek, elde edilen immobilize enzimlerin ve serbest enzimin bazı biyokimyasal özelliklerini belirlemek ve karşılaştırmaktır.

Bu amaçla bu tez kapsamında, lipaz kaynağı olarak çimlendirilmiş defne tohumları kullanıldı. Elde edilen defne tohumu lipazı kitosan'a tutuklama ve çapraz bağlama yöntemleriyle immobilize edilerek her bir immobilizasyonun çalışma koşulları optimize edildi. Serbest ve immobilize enzimlerin optimum pH, optimum sıcaklık, K_m ve V_{max} kinetik değerleri belirlendi, enzimlerin termal kararlılığı, depo kararlılığı ve tekrar kullanılabilirliği araştırıldı ve birbirleriyle karşılaştırıldı.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

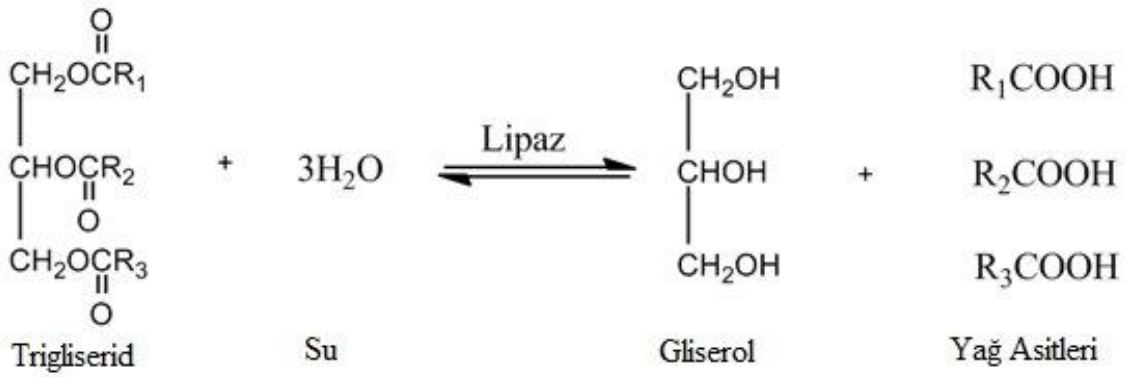
2.1. Lipazlar

Enzimler, biyolojik sistemdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan biyokatalizörler olarak tanımlanırlar. Bununla birlikte yeterli koşullar sağlandığında etkilerini gösterebiliyor olmaları, onlardan doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkanını ortaya çıkarmaktadır [2].

Lipidler insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Gelişmiş ökaryotlar ihtiyaç fazlası lipidlerini trigliserid şeklinde depolar. Bu nedenle beslenme ile alınan lipidlerin çoğu bu formda tutulur. Hidrofobik özelliklerinden dolayı, lipidler, sindirim ve emilimlerinde sorun teşkil etmektedirler. Vücut, lipaz enziminin trigliseridleri monomerlerine hidrolizlediği bir dizi reaksiyon sonrasında bu sorunun üstesinden gelebilmektedir [7, 8, 9].

Yağ asitleri, yapısında karboksilli asit bulunduran hidrokarbon zincirleridir. Doğada bulunan yağ asitleri genellikle çift karbonludur ve en bol bulunanları 14-24 karbon zincir uzunluğuna sahiptir. Triaçilgliseroller (trigliserid, triaçilgliserid olarak da bilinir) gliserolün üç yağ asidi ile esterleşmesinden oluşur [10].

Hidrolazlar ailesinin bir üyesi olan lipazlar (triaçilgliserolaçilhidrolaz, EC 3.1.1.3) karboksilik ester bağlarına etkirler. Lipazların temel biyolojik özelliği, trigliseridleri, digliseridlere, monogliseridlere, serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizlemesidir (Şekil 2.1) [11, 12, 13].

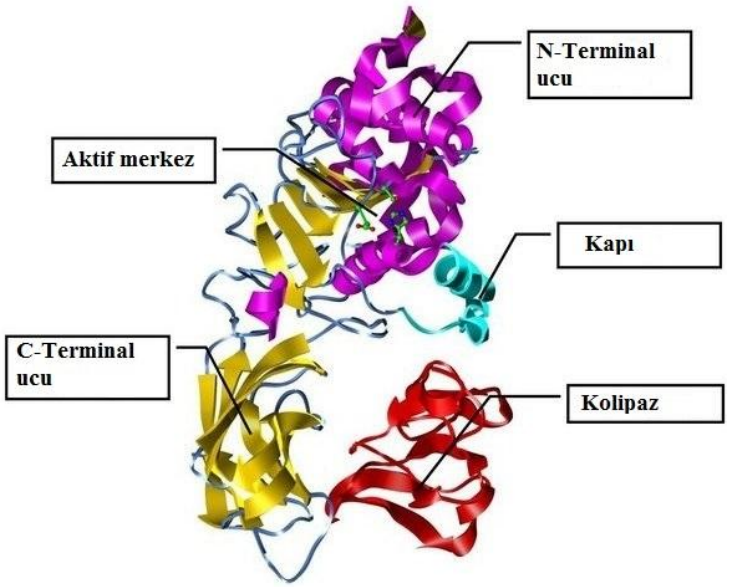


Şekil 2.1. Lipazların katalizlediği hidroliz reaksiyonu

2.1.1. Lipaz Enziminin Üç Boyutlu Yapısı

Lipazların reaksiyonları nasıl katalizlediği sorusu domuz pankreatik lipazı yapısının X-ışını kristallografisi ile belirlenmesiyle çözülmüştür.

Pankreatik lipazın yapısı katalitik fonksiyonunu yürütmek için oldukça uygundur. 449 amino asit içeren domuz pankreatik lipazı, 465 amino asitten oluşan insan pankreatik lipazına oldukça benzemektedir. Lipazın N-terminal ucu, iç içe geçmiş α-heliks ve β-tabakalardan oluşan, amino asit dizilimi 1'den 336'ya kadar kısımdır. C-terminal ucu ise çoğunlukla β-tabakalardan oluşur ve 337'den 449'a kadar olan amino asit kısmını içerir. Domuz pankreatik lipaznın 3 boyutlu yapısı Şekil 2.2'de gösterilmiştir [14].

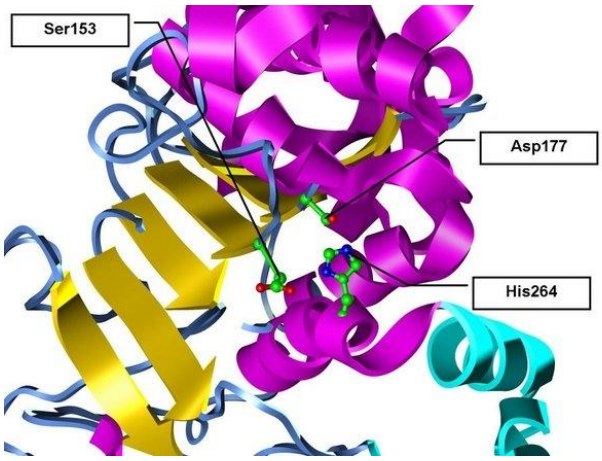


Şekil 2.2. Domuz pankreatik lipazının 3 boyutlu yapısı

Enzim, apolar lipid moleküllerine saldırabilmek için her iki ucun hidrofobik kısımları tarafından oluşan sepet benzeri form sergiler. İki hidrofobik ucun arasında kalan kısım aktif bölgedir. Pankreatik lipazın ester bağlarını hidrolizleme yeteneği "katalitik üçlü" olarak adlandırılan kısımdan kaynaklanır. Katalitik üçlünün parçaları Ser153, His264 ve Asp177'dir ve Şekil 2.3'te gösterilmiştir [15].

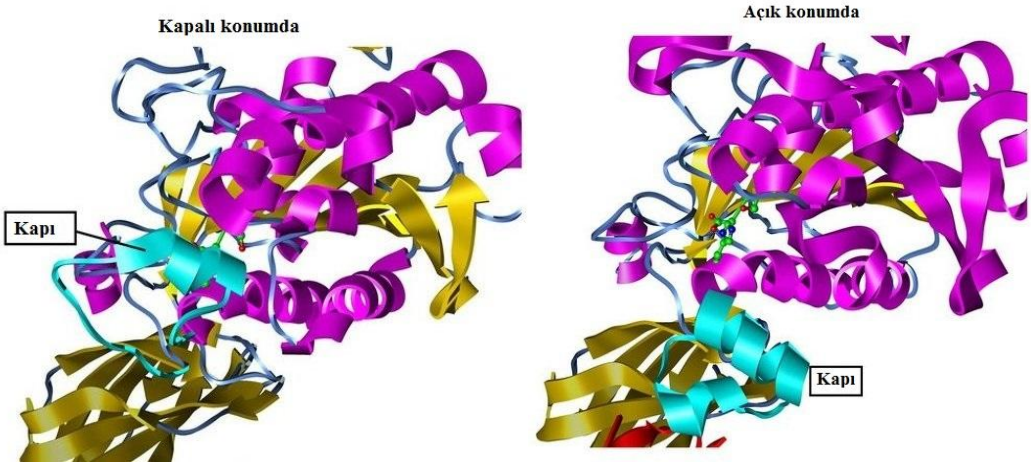
Lipaz, kofaktörü ile aktif edilmediği sürece, kolipaz, aktif bölgenin üzerini kapatan bir heliks parçası tarafından herhangi bir substratın girişini önler. Bu koruma, "kapı" olarak adlandırılan N-terminal ucunun bir parçası ile sağlanır. Bu koruma lipid

sindirimini düzenleyen geri-beslemeli inhibisyonun önemli bir parçasıdır. Uygun koşullar oluşana kadar, lipaz aktif bölgesi kapalı yani inaktif durumda kalır. Özellikle misellerin varlığı, lipaz/kolipaz kompleksi oluşumuna izin verir.



Şekil 2.3. Domuz pankreatik lipazının aktif üçlüsü

Lipaz, kolipaz tarafından yüzeysel aktivasyona uğradığında, elektron bulutları enzimin inaktif konformasyonunu değiştirir. Kapı heliksi pozisyon değiştirir ve Cys238 ve Cys262 arasında bir disülfit bağı meydana gelir. Bu yeni kovalent etkileşim kapı heliksini hidrofobik kısımdan uzaklaştırır ve aktif bölgeye erişme olanağı sağlar. Kapı heliksi açıldığında, enzim misellerdeki trigliseridlere karşı hidrolitik aktivitesini yürütür [3, 9]. Domuz pankreatik lipazının aktif [16] ve inaktif [17] formu Şekil 2.4'te gösterilmiştir.

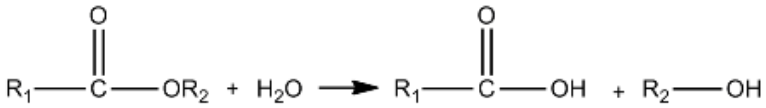


Şekil 2.4. Domuz pankreatik lipazının inaktif (kapalı) ve aktif (açık) formu

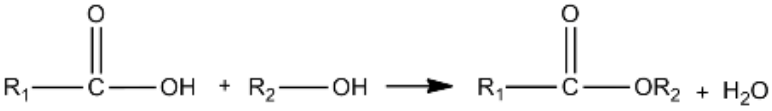
2.1.2. Lipazların Katalizlediği Kimyasal Reaksiyonlar ve Seçicilikleri

Lipazlar su varlığında hidroliz reaksiyonlarını katalizlemelerinin yanı sıra, susuz ortamlarda esterifikasyon, interesterfikasyon, transesterifikasyon alkoliz, asidoliz ve aminoliz reaksiyonlarını da katalizler. Lipazların katalizlediği başlıca reaksiyonlar Şekil 2.5'de verilmiştir.

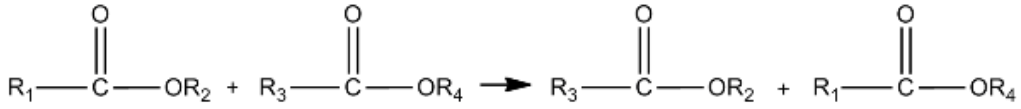
Hidroliz



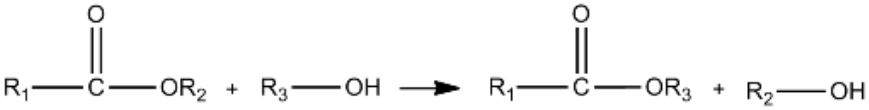
Esterifikasyon



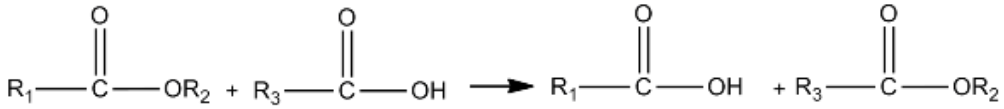
Transesterifikasyon



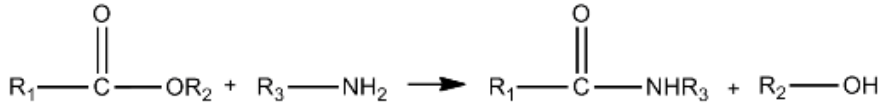
Alkoliz



Asidoliz

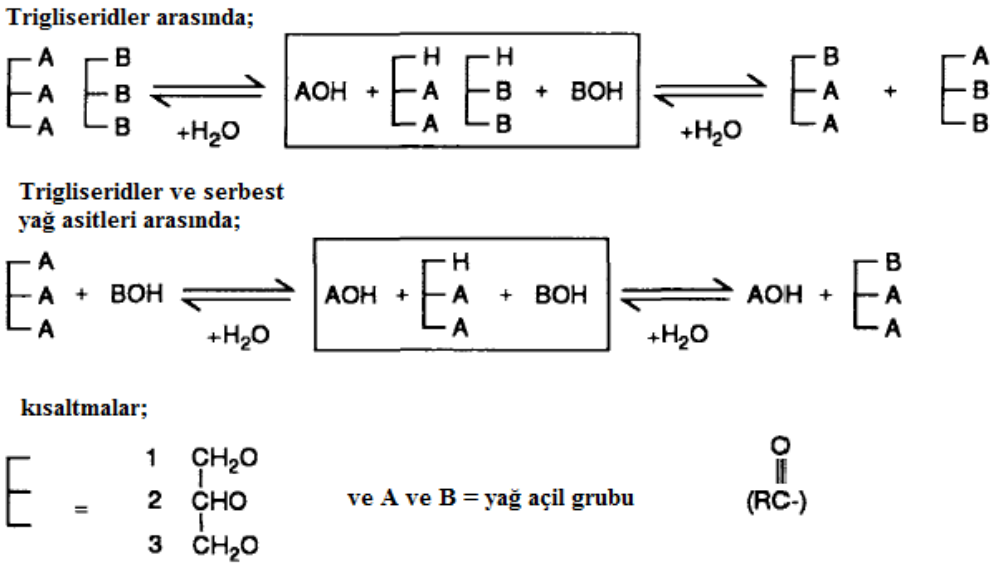


Aminoliz



Şekil 2.5. Lipazların katalizlediği reaksiyonlar

Lipaz reaksiyonları tersinir olarak katalizler bu nedenden dolayı, enzimler yağ ile inkübe edildiğinde gliseridlerin hem hidrolizi hem de sentezi meydana gelir. Bu da trigliseridlerdeki yağ asidi gruplarının değişimi ile sonuçlanan interesterifiye ürünlerin oluşumuna sebep olur. Böyle bir reaksiyon mekanizması Şekil 2.6'da verilmiştir [18].



Şekil 2.6. Lipaz katalizli interesterifikasyon reaksiyonunun mekanizması

Enzimleri kimyasal reaksiyonlardan ayıran en önemli özellikleri seçicilikleridir. Değişik kaynaklardan elde edilen lipazların farklı reaksiyon seçicilikleri vardır. Lipaz seçiciliği üç temel grupta toplanır; konum, substrat ve stereo seçicilik. Bazı lipazlar kısa zincirli yağ asitlerine (bütirik, kaprik, dekanoik asit vb.), bazıları doymamış yağ asitlerine (oleik, linoleik asit vb.) karşı ilgi gösterirler ve diğer birçoğunun ise seçiciliği yoktur ve trigliseridlerdeki yağ asitlerini rastgele keserler. Lipazlar sulu ve susuz faz ara yüzeyinde çalışmak gibi benzersiz bir özelliğe sahiptirler.

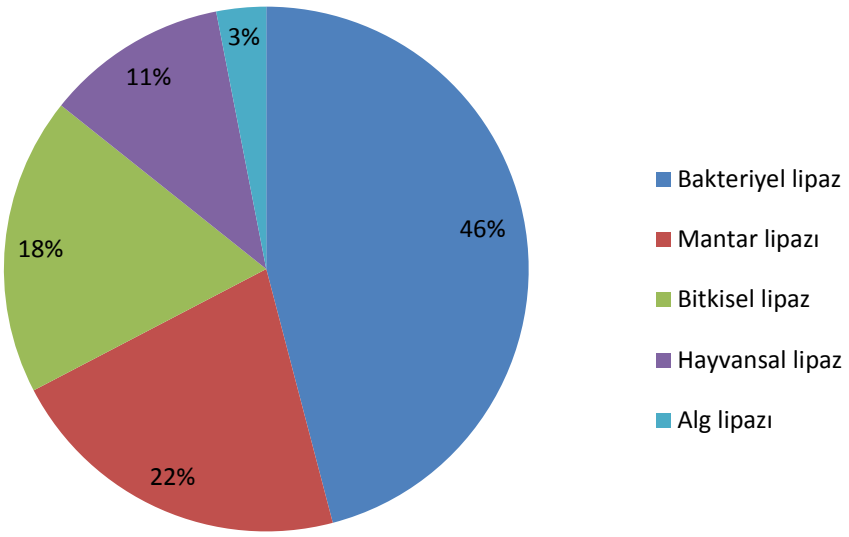
Lipazların substrat seçicilikleri, trigiliserid modifikasyonu katalizi işlemi için önemlidir. Enzimler yağ asitleri ve trigiliserollerin gliserol kısımlarının her ikisine de spesifite gösterebilirler. Ancak, çoğu lipaz, yemeklik katı yağ sanayiinde ham materyaller olarak kullanılan sıvı ve katı yağlarda bulunan yağ asidi gruplarına yüksek bir spesifiklik göstermez, reaksiyon oranları zincir uzunluğuna ve doymamış yağ asidi derecesi ve pozisyonuna göre değişebilir.

Bazı lipazlar, özellikle her iki dış pozisyondaki gliserolün (1- ve 3-) hidrolizini katalizler. Bu enzimler, konum seçici enzimler olarak adlandırılır. Bu spesifite, geleneksel kimyasal yollarla elde edilmesi güç olan trigliseridlerin üretiminde tercih edilir. Konum seçici lipazlar reaksiyonları her iki 1 ve 3 pozisyondan da seçimli katalizleyerek ticari üretimlerde oldukça kullanışlıdırlar.

2.1.3. Lipaz Kaynakları

Lipaz kaynakları; bakteriler, mantarlar, bitkiler, hayvanlar ve algler olarak 5 ayrı grupta toplanabilir. Mikrobiyal lipazlar ucuz üretim maliyeti, yüksek stabilitesi ve diğer kaynaklardan daha fazla ulaşılabilir olmasından dolayı ticari olarak önemlidir. Birçok bakteriyel lipaz hayvansal ve bitkisel kaynaklardan elde edilenlere kıyasla daha çok çalışılmıştır. Lipazların temel kaynak dağılımı Şekil 2.7'de verilmiştir [12].

Organizmalar karbon (yağ, şeker ve çeşitli karbon kaynakları), azot, fosfor ve mineral tuzlarının bulunduğu besi ortamında normal olarak büyüme göstermesine rağmen lipazların üretimi genellikle trigliserid, safra tuzları ve gliserol gibi indükleyicilere bağlıdır. *Pseudomonas*'tan elde edilen lipaz ilk çalışılan lipazdır ve endüstride önemli role sahiptir [3, 7, 12, 18, 19].



Şekil 2.7. Endüstride kullanılan lipazların biyoçeşitliliği

Gerekli spesifiteye sahip olmaya ek olarak, trigliseridlerin modifikasyonunda katalizör olarak kullanılan lipazlar, uygulanan reaksiyon koşullarında aktif ve stabil olmalıdırlar. Lipazlar genellikle desteğe immobilize edilirler. Bu durumda katalizleme aktivitesi ve stabilitesi sadece lipaza değil, aynı zamanda immobilizasyon için kullanılan desteğe de bağlıdır [18].

2.1.4. Lipazların Kullanım Alanları

Lipazlar, gıda, kozmetik, deterjan, deri, tekstil, ilaç, kağıt sanayii ve biyodizel üretimi gibi çok çeşitli geniş kullanım alanına sahiptir. Proteazların ve karbohidrazların ardından lipazlar, endüstriyel satış miktarları en yüksek üçüncü enzim grubudur. Lipazların ticari kullanımı, çok çeşitli farklı uygulamalarla 1 milyar doları bulan bir sektördür [8].

Son yıllarda doğal ürünlere olan ilginin artmasıyla birlikte gıda sanayinde geleneksel kimyasal işlemler yerine enzimlerin kullanımı gündeme gelmiştir. Günümüzde lipazlar peynir, tereyağı, sos ve çorba gibi birçok ürünün üretiminde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Lipazların gıdalarda kullanıma örnek olarak, kakao yağına benzer özellikte yağ elde etmedeki kullanımı verilebilir. Kakao yağı ekonomik değeri yüksek bir yağ olup, palmitik ve stearik asit içerir ve erime noktası yaklaşık 37 °C'dir. Kakao yağının ağızda erimesi, çikolata gibi ürünlerin tüketiminde oldukça beğenilen hoş bir his yaratır. Kakao yağının az bulunması fiyatının oldukça yüksek olmasına neden olur. Hidroliz ve sentez reaksiyonlarını içeren lipaz bazlı teknoloji, daha az tüketilip daha bol bulunan bazı yağların kakao yağına benzer bir yapıya dönüştürülüp onun yerine kullanılmalarına olanak sağlar [3, 20].

İmmobilize lipazlar, triaçilgliserollerin belirlenmesinde hızlı, etkili, doğru ve kesin sonuçlar veren biyosensörlerin yapımında da kullanılırlar. Bu uygulama, besin endüstrisinde, ilaç endüstrisinde ve klinik tanıda oldukça kullanışlıdır. Lipazları biyosensör olarak kullanmanın temel yöntemi, triaçilgliserolden gliserol oluşturmak ve oluşan bu gliserolü kimyasal veya enzimatik olarak belirlemektir [8].

Yağları hidrolizleme özelliklerinden dolayı lipazlar, endüstriyel ve evsel deterjanların üretiminde oldukça geniş yere sahiptir. Deterjanlarda kullanılan lipazların; düşük substrat spesifitesi (herhangi bir seçicilik göstermeksizin yağları hidrolizlemeleri), nispeten zorlu yıkama koşullarına dayanabilme yeteneği (pH 10-11, 30-60 °C), çeşitli sürfaktant ve enzimlere dayanabilme yeteneği (lineer alkil benzen sülfonat (LAS) ve proteaz vb.) gibi özelliklere sahip olmalarının yanı sıra deterjanların içeriğinde bulunan çeşitli maddelere ve yıkama koşullarına karşı dirençli olmaları istenir [20].

İlaç sanayiinde lipazlarla biyokatalizin, kimyasal sentezlerde birçok avantajı vardır. Enantiyoseçicilik ve konum seçicilik bu avantajlardan biridir. İzomerizasyon, rasemik karışımlar, epimerizasyon ve yeniden düzenlenme reaksiyonları ılımlı şartlarda gerçekleştirilebilir. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği proseslerin ekonomik olmasına katkı sağlar.

Lipazların, tek enantiyomer sentezleyerek rasemik karışımları giderme yetenekleri, ilaç endüstrisi tarafından ilaç üretiminde çokça kullanılır. Gerçekte ilacın sadece bir enantiyomeri terapötik etkiye sahiptir ve rasemik karışıma oranla böyle optikçe saf karışımlarda, ilaç kullanımı esnasında daha az yan etki gözlemlenir [11].

2.2. Çimlenme ve Lipaz Aktivitesi

Bitkilerde lipazlar genellikle tohumun besin depolayan dokularında ya da özellikle yüksek miktarda triaçilgliserol bulunduran kısımlarında bulunurlar. Bitki tohumları çimlenme sırasında, embriyonik gelişim için karbon ve enerjiye ihtiyaç duyar. Bu ihtiyaçlar tohumun trigliserid depolarından karşılandığından çimlenme sırasında lipaz aktivitesi artarak trigliseridleri hidrolizler ve gerekli yerlerde kullanılmasına imkan sağlar.

Tohum; tohumlu bitkilerde döllenme sonrasında yumurta hücresinden oluşan ve yeni bir bitki oluşmasını sağlayan tanedir.

Basit olarak yağlı tohumlar iki ana parçadan oluşurlar: kabuk ve çekirdek. Çekirdeği kaplayan dış katman kabuk olarak adlandırılır. Çekirdek, çimlenme sırasında yeni bireyi oluşturacak olan embriyo ve gelişimin ilk evrelerinde embriyo için gerekli besini sağlayan besi doku yani endospermden oluşur.

Tahıllar genellikle enerji kaynağı olarak protein ve yapısına göre nişasta veya triaçilgliserol içerirler. Çimlenme sırasında bu önemli üç bileşen, sırasıyla proteazlar, amilazlar ve lipazlar tarafından hidrolizlenirler.

Yağlı tohumun kuru ağırlığının yaklaşık % 20 ile % 50 arası depoladığı triaçilgliserollerdir. Çimlenme sırasında yağ deposundaki triaçilgliseroller, embriyonik büyüme için gerekli, şeker, amino asitler (başlıca; asparagin, aspartat, glutamin ve glutamat) ve karbon zincirlerin sentezinde gerekli enerjiyi sağlamak için hızlıca yıkılırlar [6, 12, 21].

Sonuç olarak yağlı tohumların çimlenmesi sırasında, artan enerji ihtiyaçlarını karşılamaları için enzimatik aktiviteleri ve dolayısıyla lipaz aktiviteleri de artar.

2.3. Enzim İmmobilizasyonu

Hidroliz ve reesterifikasyon basamakları ile triaçilgliserole istenilen bir pozisyondan belirli bir açil grubunun bağlanması lipazlar tarafından katalizlenen asidoliz reaksiyonu ile gerçekleşir. Bu reaksiyonlar düşük sıcaklıkta ve çözücüsüz ya da organik çözücülü bir ortamda kesikli sistemlerde sürekli gerçekleştirilen bir işlemdir. Bu yönden bakıldığında lipazların yüksek fiyatı nedeniyle enzimlerin biyokataliz işleminde tekrar kullanılabilirliği ilgi çekmektedir. İmmobilizasyon, lipaz enzimini fiziksel olarak reaksiyon ortamından geri kazanma ve tekrar kullanma olanağı sağlamaktadır. Buna ek olarak, pH ve sıcaklığa karşı kararlılık, kolay geri kazanım, oluşan ürünlerin meydana getirdiği inhibisyonun azalması ve özellikle sürekli sistemlerin kurulmasına imkan sağlaması açısından endüstriyel uygulamalar için çeşitli faydalar sağlamaktadır [22].

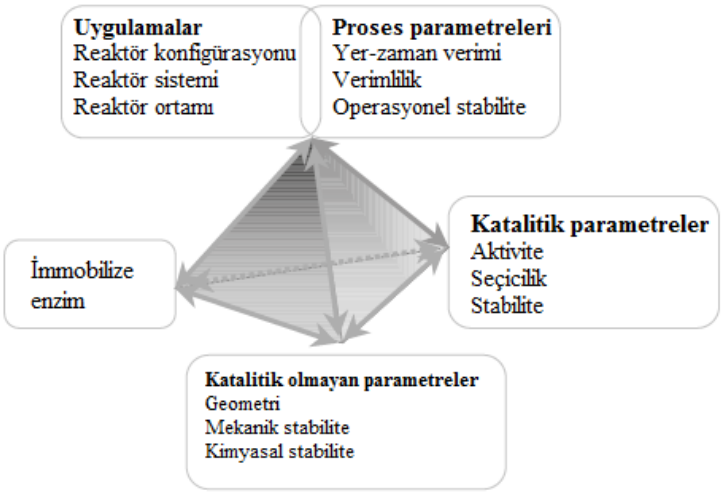
Geçen yüzyılın ikinci yarısından beri, çeşitli uygulamalarda kullanılmak üzere immobilize enzim geliştirilmesi için çok sayıda araştırma yapılmıştır. Enzim immobilizasyon teknikleri hakkında bazıları patentli, 5000'den fazla yayın bulunmaktadır. Farklı formlarda yüzlerce enzim immobilize edilmiştir ve amino açilaz, penisilin G açilaz, çeşitli lipazlar, proteaz, nitrilaz, amilaz ve invertaz gibi yaklaşık bir düzine enzim endüstriyel işlemlerde sürekli artan bir uygulama sahasına sahiptir [23].

Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklamakla immobilize edilirler. İmmobilizasyonun kelime anlamı hareketi sınırlandırma demektir [2].

İmmobilize enzimlerin serbest enzime üstünlükleri aşağıdaki gibi sıralanabilir [2].

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.s.) karşı dayanaklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirinin izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalamaması olasılığı azalır.
- Mekanistik çalışmalar için uygundur.

İmmobilize enzimler bir bütün olarak düşünüldüğünde, yapısı ve nasıl hazırlanmış olduğu önemli olmaksızın, katalitik fonksiyona (KF) ve katalitik olmayan fonksiyona (KOF) sahiptirler. Katalitik olmayan fonksiyonları, katalizörü reaksiyon ortamından izole etmek, tekrar kullanılabilirliğini sağlamak ve prosesin kontrol altında tutulmasına imkan vermektir. Katalitik fonksiyonu ise, substratı istenilen ürüne dönüştürmesini katalizlemektedir (Şekil 2.8) [23].

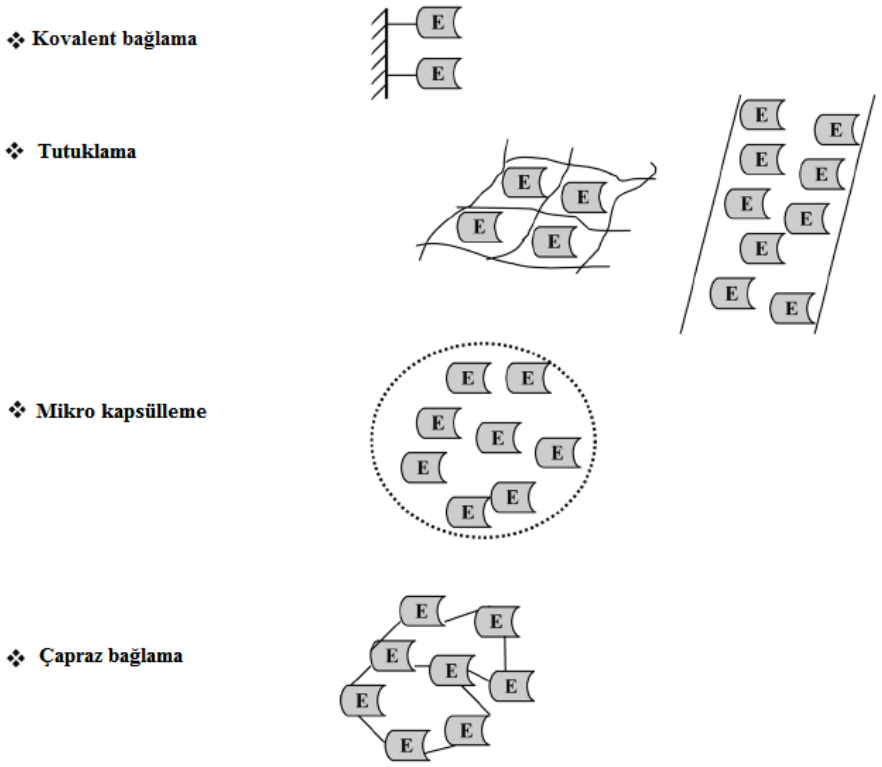


Şekil 2.8. İmmobilize enzimdeki KOF ve KF arasındaki ilişki ve uygulaması

İmmobilizasyon materyali olarak kullanılacak matriksin karakteristiği, immobilizasyon sistemlerinin performansında yüksek öneme sahiptir. İdeal destek materyalinin sahip olması gereken özellikler, fiziksel direnç, hidrofilik özellik, inert yapı, biyouyumluluk, mikrobiyal saldırılara karşı direnç ve uygun fiyat olarak sıralanabilir. Destekler kimyasal yapılarına göre organik veya inorganik olarak sınıflandırılabilirler. Organik desteklerin, doğal ve sentetik olarak iki formu bulunur.

2.3.1. İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzim immobilizasyon yöntemleri basit olarak birkaç farklı yöntem altında kategorize edilebilir; adsorpsiyon, kovalent bağlama, tutuklama, mikro kapsülleme ve çapraz bağlama (Şekil 2.9). Bu orijinal yöntemler temel alınarak yüzlerce yöntem geliştirilmiştir. Buna bağlı olarak, farklı fiziksel ve kimyasal özellikleri olan birçok taşıyıcı da dizayn edilmiştir. İmmobilizasyon işlemi bir kez yapıldığı zaman, enzimin biyolojik aktivitesi ve destek materyalinin kimyasal yapısı bozulmadan birbirlerinden ayrılamazlar [24].



Şekil 2.9. Başlıca enzim immobilizasyon yöntemleri

Kovalent bağlama ile immobilizasyon en çok kullanılan yöntemdir. Bu yöntemin bir avantajı, enzim ve destek arasındaki bağın sağlam yapısından dolayı enzim kullanılan çözeltiye salınmaz [24]. Ancak, enzimin taşıyıcıya bağlanması sırasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir. Taşıyıcıya kovalent bağlama enzim zincirlerindeki amino asitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir [2].

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değillerse yardımcı bir reaktif ile aktive edilmeleri gerekir. İmmobilizasyon çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir. Taşıyıcı suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofobik karakterli de olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik kararlı olmalıdır. Bu tür taşıyıcıların seçiminde enzim-taşıyıcı bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözgenlere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilir [2].

Adsorpsiyon, enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Yöntem; yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin rol oynayan Van der Waals kuvvetleridir.

Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan adsorbanlar; aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, $CaCO_3$, kül, kollodyum, silikajel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, glüten ve kalsiyum fosfattır. Bir enzimin suda çözünmeyen taşıyıcıda adsorpsiyonu pH, çözgen, iyon şiddeti, enzim-adsorban oranı ve sıcaklık gibi faktörlere oldukça bağımlıdır [2].

Çapraz bağlamada, küçük moleküllü bi- veya multi- fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH'ya ve immobilize edilecek enzime çok bağımlıdır. İntermoleküler bağlanmalar yanında intramoleküler bağlanmalar da söz konusudur.

Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu dört farklı şekilde gerçekleştirilir. Bunlar; enzimin yalnız bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu, enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu, enzimin suda çözünen bir taşıyıda

adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu, enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonu.

En çok kullanılan çapraz bağlanma reaktifleri; glutaraldehit, klorformat ve karbonildiimizadol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsulfonlar, p-benzokinon, transizyon metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir [2].

Tutuklama yöntemi, enzimin kendisinin korunduğu fakat substratın ve oluşan ürünlerinin içinden geçebildiği polimerik bir matrikse hapsedilmesine dayalı, bir yöntemdir. Bu yöntem, enzimin destek materyaline fiziksel veya kimyasal olarak bağlanmaması sebebiyle diğer bağ oluşumuna dayalı yöntemlerden farklıdır [24]. Destek materyali olarak, alginat, karagenan, agaroz, poliakrilamid, pektin, jelatin, kitin veya kitosan kullanılabilir [25].

Polimerizasyon ve çapraz bağlanmanın oluştuğu ortamda enzim de bulunduğu takdirde enzim çapraz bağlama sonucu oluşan odacıklarda tutuklanmaktadır. Tutuklama, bir poliiyonik polimer materyali ile enzimin karıştırılması ve sonra enzim veya hücreleri tutuklayan kafes dokuyu oluşturmak üzere iyon değiştirici bir reaksiyonla multivalent katyonlarla polimerin çapraz bağlanması ile gerçekleştirilir.

Tutuklama yönteminin bazı üstünlükleri vardır. Enzimler, aktif merkezlerinde engelleme yaratacak kimyasal ve yapısal bir modifikasyona uğramadıklarından aktivitelerinde kayıp olmaksızın immobilize edilirler. Denatürasyon genellikle engellenir. Farklı enzimlerin aynı anda, tek adımda immobilizasyonunu ve çapraz bağlama gibi diğer metodlarla kombine edilme imkanını sağlar. Tutuklama yöntemi, geniş uygulanabilirliği olan genel bir tekniktir. Substrat ve enzimin etkileşimi için geniş spesifik bölge sağlar. Biyouyumluluk, örnek olarak kalsiyum alginat ve kitosanın toksik olmadığı bildirilmiştir. Kolay, basit ve düşük fiyatlı bir yöntemdir [26].

2.4. Defne

Defnegiller *(Lauraceae), Laurales* takımına ait bir bitki familyasıdır. Çoğu tropikal bölgelerde yayılmış, bir kısmı da subtropikal ve ılıman bölgelerde yayılmış 30-35 cins ve 2500 kadar tür ihtiva eder. Türkiye'de *Laurus nobilis* (Akdeniz defnesi) adlı bir tür bulunur [27].

Akdeniz Defnesi çoğunlukla ağaççık, bazen 3-10 metreye kadar boylanabilen yuvarlak tepeli, sık dallı, sarıçiçekli, herdem yeşil bir ağaçtır. Gövdenin koyu gri

düzgün kabuğu vardır. Kök ve kütük sürgünü verme kabiliyeti yüksektir. Bazı kaynaklarda çok uygun şartlarda 15-20 metreye kadar boylanabildiği ifade edilmektedir. Akdeniz iklimine özgün maki denilen bitki örtüsünün karakteristik bir türüdür. Hatay'dan başlayarak Kuzeydoğu Karadeniz'e kadar Türkiye'nin bütün kıyı şeridinde doğal olarak bulunur [28, 29, 30].

Yaprakları dar eliptik bir yapıda 5-10 cm uzunlukta, 2-3 cm genişlikte basit derimsi kenarları dalgalı ve kısa saplıdır ve her iki uca doğru sivrilmektedir. Üst yüzü parlak koyu yeşildir. Yapraklarının kısa ve kalın bir sapı vardır. Taze yapraklar ince, açık yeşil damarlı, kırmızıya çalan sarı renkte, daha sonra açık yeşil renklidir. Taze sürgünler yeşil, sonraları kırmızı siyah ve tüysüzdür (Şekil 2.10) [31].



Şekil 2.10. Defne yaprakları

Yapraklarında tanen, acı madde, alkaloitler (retikulin, boldin vs.), flavonoidler ve uçucu yağ bulunur. Uçucu yağda sineol (% 35-50), ögenol, geraniol, linalool ve pinenler mevcuttur. Bu bitkinin yapraklarında *(FoliumLauri)* hoş kokulu uçucu yağ *(AetheroleumLauri)* vardır. Yapraklardaki uçucu yağ oranı % 0.5-4.69 arasında olup, yağın kalitesi bölgelere göre değişmektedir [32].

Bir tespih tanesi büyüklüğünde ve yumurta biçiminde olan üzümsü meyveleri önceleri yeşil, olgunlaşınca koyu siyah renktedir. Uzunluğu en fazla 2 cm'ye ulaşır. Meyveler Eylül sonu ve Ekim ayı içerisinde olgunlaşır ve parlak mavimtırak siyah bir renk alır (Şekil 2.11) [28, 33].

Meyvelerin % 28'i et, % 72'si çekirdektir. Meyvelerin bileşiminde, sabit yağ (% 25-30), su (% 27), protein (% 7), nişasta, serbest ekstrakt (% 10), ham elyaf (% 25), kül (% 3.5) ve uçucu yağ vardır.

Sabit yağ en fazla meyvenin etli kısmında bulunmakta olup, bunu çekirdek ve kabuk izlemektedir. Sabit yağ, tereyağı kıvamında olup, içindeki klorofil maddesi sebebiyle sarımsı açık yeşil renkli, özel-hoş kokulu ve acı lezzetlidir. Tohumun yağ asidi bileşenleri, laurik asit, miristik asit, palmitik asit, stearik asit, oleik asit ve linolenik asittir [28, 32, 34].



Şekil 2.11. Defne tohumları

Defnenin hem yapraklarından hem de meyvesinden yararlanılır. Defne yaprakları kuru meyvelerin ambalajlanmasında, balık ve konservede, kuru halde et yemeklerinde ve toz halde baharat olarak kullanılmaktadır. Defnenin parfümeri, sabun, gıda, ilaç ve cila ile kimya sanayiinde geniş bir kullanımı bulunmaktadır. Toplam defne üretiminin % 20'si sabun sanayiinde kullanılmaktadır. Kozmetik sanayisinde cilt nemlendirici olarak kullanılır. Şifalı ot olarak romatizma, deri kızarıklıkları ve kulak ağrıları için kullanılır. Tıbbi literatürde defne yaprağının antioksidan, analjezik, antienflamatuar ve antikonvulsant (antiepileptik) yararlarının olduğu belirtilmektedir.
Defnenin en önemli ürünü, yağı ve esansıdır. Defne yağı defne meyvelerinden; defne esansı ise, defne yaprağı ve meyvesinden çıkartılan yağdan elde edilir [29].

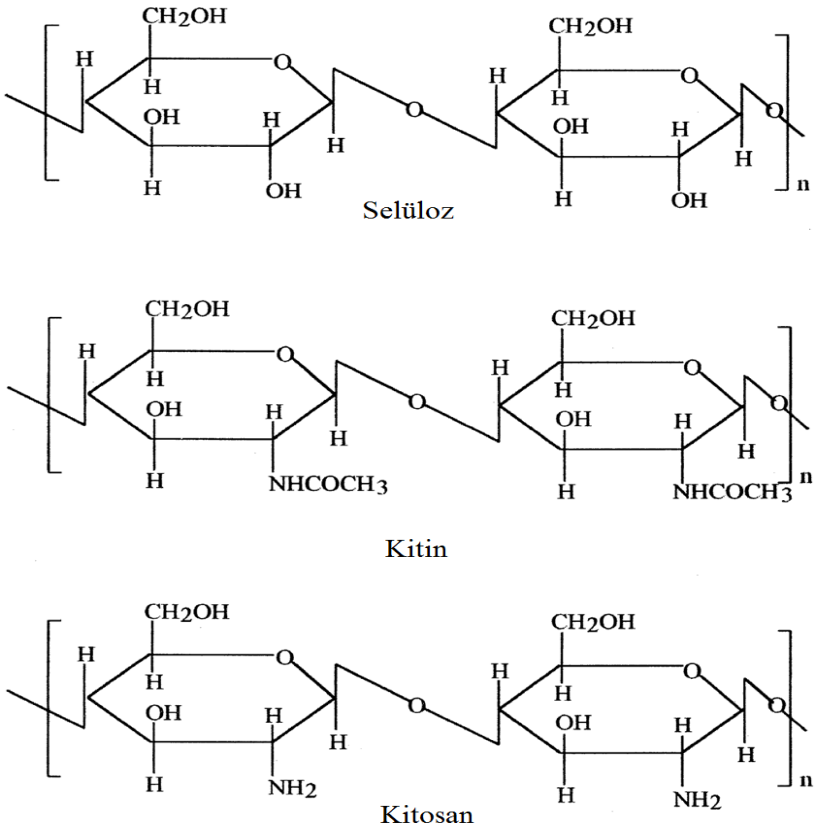
Defne Türkiye'nin tarım ihracatında önemli bir paya sahiptir. Dünya defne yaprağı ticaretinin en önemli bölümünü Türkiye elinde tutmakta olup, gerek kalite, gerek miktar ve gerekse fiyat olarak pazarda en yüksek yere sahip bulunmaktadır.

Dünyanın başlıca tüketici ülkeleri gereksinimlerinin % 90'ını Türkiye'den karşılamaktadırlar. Türkiye'nin doğal bitki ihracatı içindeki payı ise % 10'dur [28].

2.5. Kitosan

Kitin ve kitosan, eşsiz yapıları, çok boyutlu özellikleri, son derece gelişmiş fonksiyonları ile biyomedikal ve diğer endüstri alanlarında oldukça geniş kullanım alanına sahip doğal aminopolisakkaritlerdir [35].

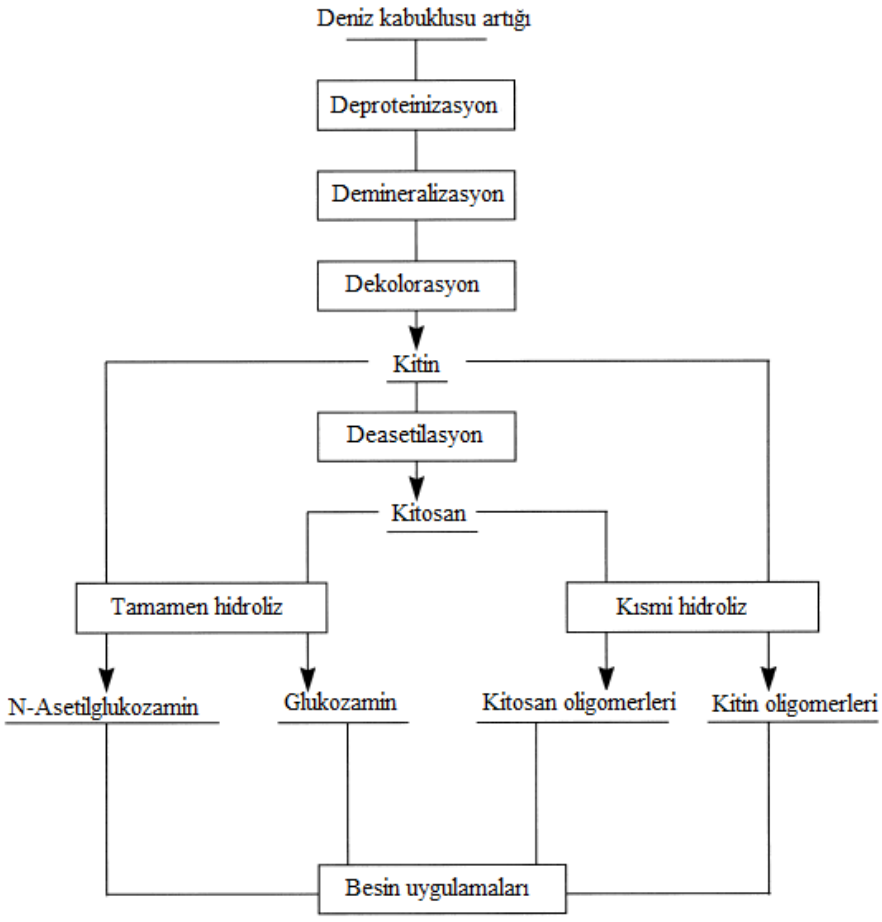
Kitin selülozdan sonra doğada en çok bulanan doğal biyopolimerdir. 2-amino-2-deoksi-β-D-glukoz [N-asetilglukoazamin (NAG)] monomerlerinin birbirlerine β(1→4) bağlarıyla eklenmesiyle oluşan kitinin kimyasal yapısı selüloza benzemektedir. Kitin, selülozun ikinci karbonunda bulunan -OH grubunun -$NHCOCH_3$ grubu ile yer değiştirmiş türevi olarak düşünülebilir. Kitosan ise kitinin deasetile formu olup kitinde olmayan asidik çözeltilerde çözülebilme özelliğine sahiptir. Selüloz, kitin ve kitosanın yapısı Şekil 2.12'de verilmiştir [36].



Şekil 2.12. Selüloz, kitin ve kitosanın yapısı

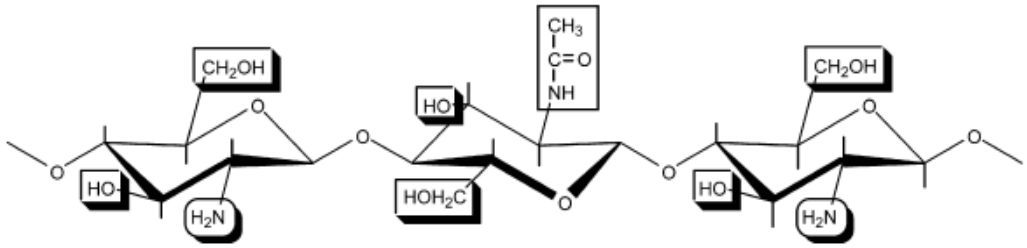
Selüloz gibi kitinin de çözünürlüğü yoktur ve düşük kimyasal reaktiviteye sahiptir. Kitin, beyaz, sert, elastik olmayan, azotlu bir polisakkarittir. Mantar hücre duvarının, kabuklular (yengeç, ıstakoz, karides gibi) ve karıncalarla kelebeklerin dahil olduğu böcekler gibi eklembacaklıların dış iskeletinin, yumuşakçaların radulalarının (dişli dil) ve ahtapotla mürekkepbalığının dahil olduğu kafadan bacaklıların ağız kısmının ana bileşenidir.

Kitin, yengeç ve karides kabuklarından ve Mycelia mantarından Şekil 2.13'de gösterildiği gibi kolayca elde edilebilmektedir [35, 36, 37, 38, 39].



Şekil 2.13. Deniz kabuklusu artığından kitin, kitosan ve onların oligomer ve monomerlerinin ticari üretimi.

Kitosan amino grubu bulundurması sebebiyle ilgi çekici bir polisakkarittir. Bu ona, modifiye edildiğinde arzu edilen özellikler ve çözünürlük gibi farklı biyolojik fonksiyonlar kazandırılmasını sağlar. Amino grupları dışında, çözünürlüğü kimyasal modifikasyonla artırmaya uygun fonksiyonel hidroksil grubuna sahiptir. Kitosanın olası reaksiyon bölgeleri Şekil 2.14'te verilmiştir [35].



Şekil 2.14. Kitin ve kitosanın fonksiyonel bağlantı noktaları

Günümüzde polimerlerin çoğu sentetik materyallerdir ve bu sentetik materyallerin doğal polimerler olan selüloz, kitin, kitosan ve bunların türevlerinden daha sınırlı biyouyumluluk ve biyobozunabilirlikleri vardır. Ancak, bu doğal materyallerin ise işlenebilirliklerinde ve reaktivitelerinde bir kısıtlama vardır. Kitosan, biyouyumluluğu, biyobozunabilirliği, toksik olmaması, fiziksel olarak inert olması, hidrofilik yapısı, proteinlere karşı olan affinitesi ve yüksek mekanik direnci ile dikkat çekici benzersiz özelliklere sahiptir. Bu kayda değer biyolojik ve kimyasal karakteri kitosanı, enzim immobilizasyonu için beğenilen bir biyomateryal yapmıştır [4].

Kitosan sahip olduğu hidroksil ve amino grupları sayesinde enzimlerle bağlantı ve glutaraldehit ile çapraz bağlantı kurabilir. Kütle taşınımı ve iç porlarına emilen reaktif boya hacmine göre kitosan boncuk şeklinde hazırlandığında iki kat daha fazla enzim tutabildiği görülmüştür [5].

2.6. Kaynak Araştırması

Mikrobiyal lipazlar başta olmak üzere çeşitli kaynaklardan elde edilen lipazlar endüstriyel potansiyellerinin araştırılması amacıyla çeşitli desteklere farklı metodlarla immobilize edilmiş bazı biyokimyasal ve endüstriyel özellikleri araştırılmıştır. En çok

çalışılan lipazlar *Candida rugosa*, *Rhizomucor mihei*, *Candida antarctica*, *Rhizopus nigricans* ve domuz panreatik lipaz enzimidir.

Candida rugosa lipazını, Foresti ve ark. polipropilene fiziksel adsorpsiyonla [40], Won ve ark. kalsiyum alginat boncuklara tutuklamayla [41], Betigeri ve Neau agaroz, alginat ve kitosan polimerlerine tutuklamayla [42], Vaidya ve ark. labaratuvarda sentezledikleri yüzeyinde epoksi grubu bulunan polimere çapraz bağlamayla [43], Yılmaz ve ark. glutaraldehitle aktive edilmiş aminopropile kovalent bağlama ile [44] immobilize etmişlerdir.

Toral ve ark. *Candida antarctica* lipazını polipropilene adsorbsiyon ve çapraz bağlanma ile [45], Öztürk ve Kılınç domuz panreatik lipazının çapraz bağlı polivinil alkole (PVA) kovalent bağlama ile [46], Palla ve ark. *Rhizomucor miehei* lipazının kitosana adsorpsiyon ile [22], Podgorska ve ark. poliüretan köpüklere adsorpsiyon ile immobilizasyonunu gerçekleştirmişler ve serbest *Rhizopus nigricans* lipazının fumarik asit üretimini [47] çalışmışlardır.

Ticari olarak satılan ve hayvansal kaynaklardan izole edilen lipazlara ek olarak çeşitli bitkisel kaynaklardan da lipaz enzimi izole edilmiş ve bazı bitkisel lipazlar çeşitli desteklere immobilize edilmişlerdir. Bazı araştırmacılar tarafından lipaz aktivitesinin arttırılması amacıyla yağlı tohumların çimlendirmesi de çalışmıştır.

Sadeghipour ve Bhatla ayçiçeği tohumunun (*Heliantus annus L.*) çimlenme sırasında depo lipidlerindeki azalma ile tohum proteinleri arasındaki ilişkiyi [48], Sağıroğlu ve Arabacı ayçiçeği tohumundan (*Heliantus annus L.*) izole ettikleri lipazın biyokimyasal özelliklerini [49], Sana ve ark. çimlendirdikleri kanola tohumlarından (*Brassica napus* L.) izole ettikleri lipaz enziminin saflaştırılmasını ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesini [50], Lin ve ark. kanola tohumu (*Brassica napus L.*) lipazının farklı substratlara karşı olan aktivitesini [51], Ejedegba ve ark. hindistan cevizinden (*Cocos nucifera linn*) izole edip yarı saflaştırdıkları lipaz enziminin fiziksel-kimyasal özelliklerini [52], Wanasundara ve ark. çimlendirdikleri susam tohumundan (*Sesamum inducum L.*) izole ettikleri lipazın lipolitik aktivitesini [53], Kubicka ve ark. çimlendirdikleri arpa tohumundan (*Hordeum vulgare*) izole ettikleri lipaz enziminin biyokimyasal özelliklerini [54] çalışmışlardır.

Ucuz, toksik olmama, biyouyumluluk gibi çeşitli avantajlara sahip olan kitosan enzim imobilizasyonu için oldukça uygun ve kullanışlı bir materyaldir. Destek materyali olarak birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır.

Alsarra ve ark. hazırlama koşullarının, kitosan hidrojel boncuklara immobilize edilmiş *Candida rugosa* lipazı özellikleri üzerindeki etkilerini [55], Altun ve Çetinus pepsinin kitosan boncuklara immobilizasyonunu [56], Foresti ve Ferreira kitosana immobilize ettikleri *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Candida antarctica* B lipazının yağ asidi esterifikasyonunu [57], Chiou ve Wu hidroksil grupları aktive edilmiş kitosana *Candida rugosa* lipazının immobilizasyonunu [58], Chang ve Juang eşit miktardaki aktif kil ve kitosanın karıştırılmasıyla hazırladıkları ve glutaraldehit ile çapraz bağlama yaptıkları boncuklara β-glukozidaz immobilizasyonunu [5] çalışmışlardır.

Türkiye'de tarımı yapılan defne bitkisi ile ilgili araştırmalar incelendiğinde, Acar'ın Türkiye'de yayılış gösteren Akdeniz defnesinin yaprak kalitesi [59], Nurbaş ve Bal'ın defne tohum ve yapraklarından sabit ve uçucu yağların ekstraksiyonu [60], Kılıç'ın defne uçucu yağındaki koku kalitesini belirleyen bileşikler [34], Parlak'ın defnenin tohumla ve çelikle üretimi hakkındaki araştırmaları [61] ve Çevre ve Orman Bakanlığı Ege Ormancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün "Defne" adında bir el kitabı çalışması [28] bulunmaktadır.

İşbilir ve ark. defne tohumundan lipaz enzimini izole ederek bazı biyokimyasal özelliklerini belirlemişlerdir [62].

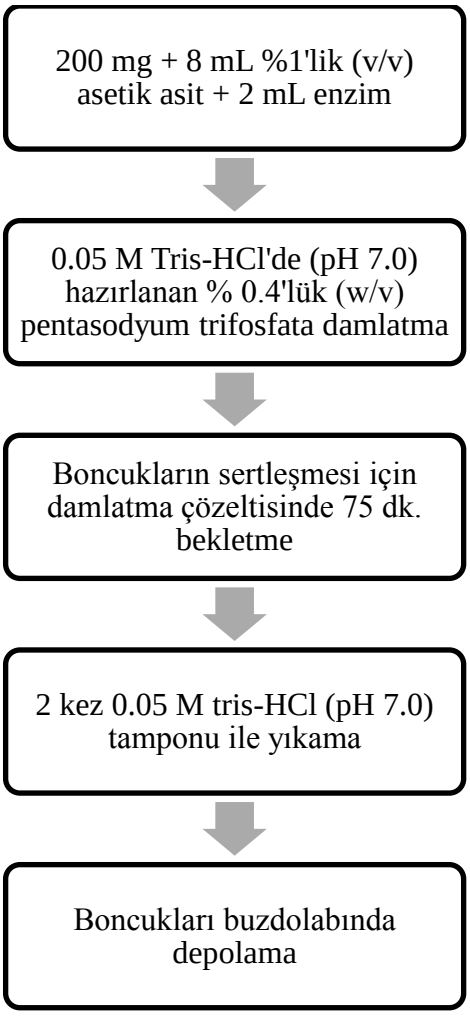
2.7. Tezde Kullanılan İmmobilizasyon Yöntemlerinin Esaslarına Bakış

Bu çalışma kapsamında immobilizasyon desteği olarak kitosan kullanılmış, defne lipazı kitosana tutuklama ve çapraz bağlama olmak üzere iki farklı yöntemle immobilize edilmiştir.

Kitosan kitinin deasetile formudur ve kitinde olmayan asidik çözeltilerde çözülebilme özelliğine sahiptir. Organik asitlerde kitosanın çözünebiliyor olması kitosandan jel, membran veya boncuk yapmaya imkan sağlar [63]. Bu amaçla bu tezde her iki immobilizasyon yönteminde kitosanı çözünürleştirmek için asetik asit kullanılmıştır.

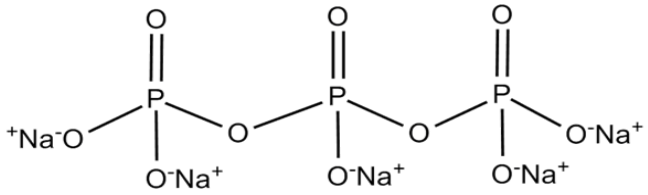
Tezde kullanılan tutuklama yönteminde kitosan asetik asit çözeltisinde çözüldükten sonra elde edilen jel karışımına defne lipazı ilave edildi, homojen karışım elde edilinceye kadar karıştırıldı ve oluşan hava kabarcıkları giderilinceye kadar buzdolabında bekletildi.

Defne lipazını içiren kitosan jeli, Tris-HCl tamponunda hazırlanan pentasodyum trifosfat çözeltisine enjektör yardımıyla damlatıldı ve oluşan boncuklar sertleşinceye kadar bekletildi. Defne lipazının kitosan desteğe tutuklama yöntemiyle immobilizasyonunun deneysel uygulamasının akış şeması Şekil 2.15'te verilmiştir.



Şekil 2.15. Tutuklama yöntemi ile gerçekleştirilen immobilizasyon işlemi

Damlatma çözeltinde kullanılan pentasodyum trifosfatın kimyasal formülü Şekil 2.16'da görülmektedir.



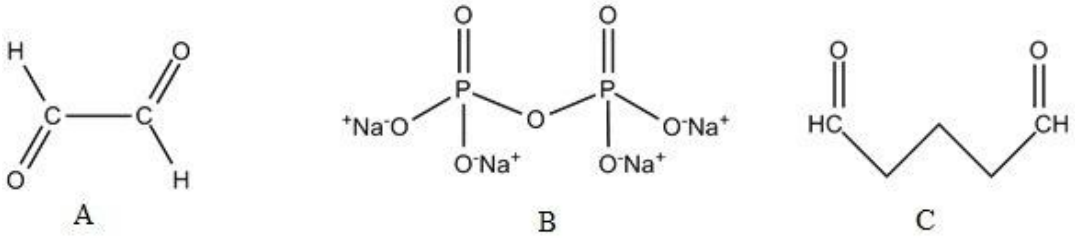
Şekil 2.16. Pentasodyum trifosfatın (tripolifosfat, TPP olarak da bilinir) yapısı

Asetik asitte hazırlanmış olan bu kitosan çözeltisi damlatma çözeltisi pentasodyum trifosfata (TPP) damlatıldığında, pozitif yüklü kitosanla negatif yüklü pentasodyum trifosfat arasında elektrostatik etkileşim nedeniyle jelleşmiş küreler oluşur [55].

Çapraz bağlamanın iyonik doğası nedeniyle, jelin hazırlama koşullarında kitosan ve pentasodyum trifosfatın yük yoğunluğunun boncuk oluşumunu etkileyeceği için bu bileşenlerin konsantrasyonları önemlidir. Bu tez kapsamında, defne lipazının tutuklama yöntemiyle immobilizasyonunda pentasodyum trifosfat konsantrasyonu, jelleşme ortamının pH'ı gibi parametreler de diğer immobilizasyon parametrelerinin yanında optimize edildi.

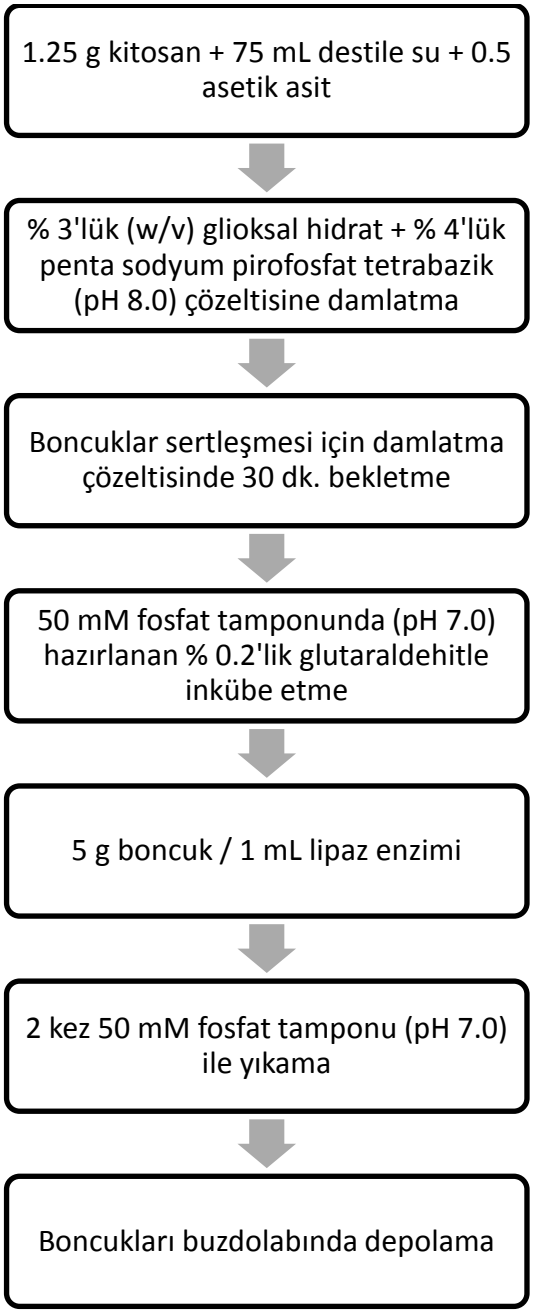
Tezde uygulanan ikinci immobilizasyon yöntemi olan çapraz bağlama yönteminde ise kitosan su ve asetik asitle manyetik karıştırıcıda karıştırıldığında elde edilen kitosan jeli glioksal hidrat ve sodyum pirofosfattan oluşan damlatma çözeltisine enjektör yardımıyla damlatılarak kitosan boncuklar elde edildi, sertleşmesi için bir süre bekletildi. Elde edilen boncuklar glutaraldehit ile oda koşullarında inkübe edildikten sonra defne lipazı ilave edilerek immobilizasyon için bekletildi.

Damlatma çözeltisinin bileşenleri glioksal hidrat, sodyum pirofosfat tetrabazik ve glutaraldehitin kimyasal formülleri Şekil 2.17'de verilmiştir.



Şekil 2.17. Glioksal hidrat (A), Sodyum pirosfat tetrabazik (B) ve Glutaraldehit'in (C) kimyasal yapıları

Defne lipazının kitosan boncuklara çapraz bağlama yöntemi ile immobilizasyonun akış şeması Şekil 2.18'de verilmiştir.



Şekil 2.18. Çapraz bağlama (K_2) yöntemi ile gerçekleştirilen immobilizasyon işlemi

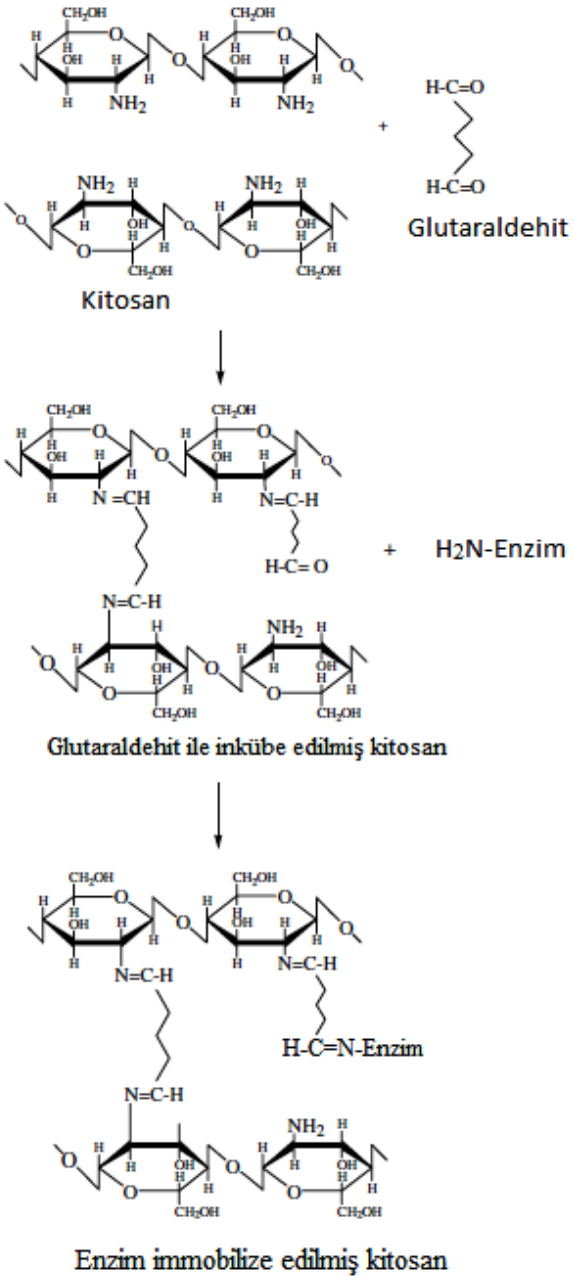
Kitosanın asidik çözeltilerde çözünür olması nedeniyle, asidik ortamlarda yürütülen enzim ve hücre immobilizasyonlarında kitosan boncukların kullanımında genel bir problem söz konusudur. Karşıt iyon çöktürmesi aracılığıyla oluşturulan kitosan boncukların sürekli aside maruz kalması, jel yumuşaması ve boncuk bozulmasıyla sonuçlanabilir.

Bu nedenle, kimyasal olarak çapraz bağlı boncukların hazırlanmasında kullanılan diğer yöntem; asidik kitosan çözeltisinin difosfat ve glioksal karışımına ilavesi temeline dayanır.

Kitosan ve glioksal arasında oluşan Schiff bazı tersinirdir, asidik koşullar altında boncukların sürekli uzayan işlemlerde kullanımı glioksalın basamaklı sızıntısıyla sonuçlanır. Glutaraldehit Shiff bazı vasıtasıyla boncuklara tersinmez şekilde çapraz bağlanır ve kimyasal olarak çapraz bağlı kitosan boncukların yüksek operasyonal kararlılığı göstermesine neden olur [64].

Bu tez kapsamında da kullanılan, bu yöntemde elde edilen "glioksal çapraz bağlı boncuklar" operasyonal kararlılığının iyileştirilmesi amacıyla glutaraldehit çözeltisine maruz bırakılmıştır.

Glutaraldehitin kullanım nedenlerinden biride; kitosan boncuklar üzerinde enzim molekülü için bağlantı kolları oluşturmaktır. Glutaraldehitin kitosanın -NH_2 grupları ile Shiff bazı oluşturmasına ait olası mekanizma Şekil 2.19'de görülmektedir [56].



Şekil 2.19. K_2 yönteminin olası immobilizasyon mekanizması

Literatürde çimlendirilmiş defne tohumundan lipaz enzimi izolasyonu ve immobilizasyonu hakkında herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tezde, çimlendirilmiş defne tohumundan lipaz enziminin izolasyonu, bu lipazın kitosana iki farklı yöntemle immobilizasyonu ve immobilize ve serbest defne lipazının bazı biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve birbirleriyle karşılaştırılması hedeflenmiştir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOTLAR

3.1. Materyaller

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Aseton (Merck), etanol (Merck), asetik asit (Riedel-de Haen), glioksal hidrat (Fluka), glutaraldehit (Sigma), gum arabik (Sigma), hidroklorik asit (Merck), kalsiyum klorür (Merck), kitosan (Sigma; medium molecular weight), pentasodyum trifosfat (Merck), sığır serum albümini-BSA (Sigma), sodyum deoksikolat (Sigma), sodyum hidroksit (Merck), sodyum karbonat (Merck), sodyum pirofosfat tetrabazik (Merck),tris (Merck), Folin reaktifi (Sigma), maleik anhidrit (Sigma), monopotasyum fosfat (Riedel-de Haen), disodyum fosfat (Riedel-de Haen), zeytin yağı (Hoşköy/Tekirdağ'da yerel üreticilerden temin edildi)

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

- Spektrofotometre (Rayleigh)
- Çalkalamalı su banyosu (Wisebath)
- Otomatik titratör (Metrohm, 665 dosimat)
- Isıtıcı ve manyetik karıştırıcı (Chiltern)
- pH metre (Wtw, pH 330i)
- Vortex (Whırlı mixer)
- Terazi (Precisa)
- Dağıtıcı ve mikro pipetler (Eppendorf)
- Blender (Waring)
- İnkübatör (Enolab MB80)
- Orbital çalkalayıcı (Wiseshake)
- Etüv (Wiseven)
- Buzdolabı ve bulaşık makinası (Arçelik, ev tipi)

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler

İmmobilizasyon için gerekli çözeltiler;

- % 1'lik Asetik asit çözeltisi (v/v)
- % 0.4'lük Pentasodyum trifosfat çözeltisi (w/v)
- % 4'lük Sodyum pirofosfat tetrabazik çözeltisi (pH 8.0) (w/v)
- 50 mM'lık soğuk fosfat tamponunda (pH 7.0) hazırlanan % 0.2'lik Glutaraldehit çözeltisi (v/v)
- % 3'lük Glioksal hidrat çözeltisi (w/v)

Tampon hazırlamak için gerekli çözeltiler;

- 0.2 M Tris çözeltisi
- 0.1 N HCl çözeltisi
- 0.2 M Maleik anhidrit çözeltisi
- 0.2 N NaOH çözeltisi
- 0.05 M Tris çözeltisi
- 0.05 M HCl çözeltisi
- 0.05 M KH_2PO_4 çözeltisi
- 0.05 M Na_2HPO_4 çözeltisi
- 1/15 M KH_2PO_4 çözeltisi
- 1/15 M Na_2HPO_4 çözeltisi

Protein tayini için gerekli çözeltiler;

- % 0.1'lik sığır serum albümini (w/v)
- 0.1 N NaOH çözeltisi
- 0.1 N NaOH içinde hazırlanmış % 2'lik Na_2CO_3 çözeltisi (w/v)
- % 1'lik $CuSO_4.5H_2O$ çözeltisi (w/v)
- % 2'lik Na-K tartarat çözeltisi (w/v)
- Folin reaktifi

Alkali bakır ayıracı: 100 mL 0.1 N NaOH'ta hazırlanan % 2'lik Na_2CO_3 çözeltisine 1 mL % 1'lik $CuSO_4.5H_2O$ ve 1 mL % 2'lik Na-K tartarat çözeltilerinin karıştırılmasıyla hazırlandı.

Hidrolitik lipaz aktivitesi tayini için gerekli çözeltiler;

- % 10 Gum arabik (w/v)
- % 1.6'lık Sodyum deoksikolat (w/v)
- 0.1 N NaOH çözeltisi
- 0.01 N NaOH çözeltisi
- 0.01 N $CaCl_2$ çözeltisi

Substrat emülsiyonu: 10.5 g zeytin yağı, 90 mL % 10'luk gum arabik çözeltisi ve 2.5 mL destile sudan hazırlanmış 3 adet buz parçasının 15 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmasıyla hazırlandı.

3.2. Metotlar

3.2.1. Defne Tohumundan Lipaz Enzimi İzolasyonu

Çalışmada Hatay'daki bir aktardan satın alınan defne tohumları kullanıldı. Tohumlardaki enzimatik aktivitenin ve dolayısıyla lipaz aktivitesinin artması için çimlendirme işlemi uygulandı.

3.2.1.1. Çimlendirme

Çimlendirme işleminde Sammour ve Hellyer yöntemlerinin modifiye edilmiş hali kullanıldı [65, 66].

Defne tohumları % 1'lik NaClO çözeltisinde orbital çalkalayıcıda 175 rpm'de 30 dakika üzerindeki kirliliklerin giderilmesi ve sterilizasyon için bekletildi. Daha sonra tohumlar alınıp üzerindeki NaClO çözeltisi kalıntılarını uzaklaştırmak için destile su ile birkaç kez yıkandı. Yıkanan tohumlar 25 °C'deki destile suda 175 rpm'de 2 saat bekletildi. Süre sonunda tohumlar alındı. İçerisinde pamuk bulunan petri kaplarına belirli miktarda defne tohumu yerleştirildi ve üzerleri pamukla örtüldü. Hazırlanan bu

petri kaplarına Tohum:Destile su oranı 1:1 (w/v) olacak şekilde destile su ilave edildi ve inkübatörde 25 °C'de 3 gün çimlendirildi.

3.2.1.2. Defne Lipazı Ekstraksiyonu

25 °C'de 3 gün çimlendirme sonrasında inkübatörden alınan tohumların kabukları soyuldu ve kağıt havlu yardımıyla kurulandı. Daha sonra Waring blender ile öğütüldü. Elde edilen defne tohumu tozu, buz banyosunda Tohum:Tampon oranı 1:7 (w/v) olacak şekilde 0.2 M Tris-HCl tamponu (pH 7.4) ile manyetik karıştırıcıda 1 saat karıştırıldı. Daha sonra 3 kez tülbentten süzüldü. Elde edilen çözelti ham ekstrakt olarak isimlendirildi ve çalışmalarda lipaz kaynağı olarak kullanıldı [62].

3.2.2. Kitosan Jelde İmmobilizasyon

Defne lipazının kitosan boncuklara immobilizasyonu, Alsarra ve ark. [55] ve Altun ve Çetinus [56] yöntemlerine göre iki farklı şekilde yapıldı.

Alsarra ve ark.'nın yöntemine göre 200 mg kitosan 8 mL % 1'lik asetik asit içerisinde çözüldü ve üzerine 2 mL defne lipazı çözeltisi ilave edildi. Bu karışım yaklaşık yarım saat 4 °C'de buzdolabında bekletildi. Çözelti bir enjektör yardımı ile 0.05 M Tris-HCl tamponunda (pH 7.0) hazırlanan % 0.4'lük pentasodyumtrifosfat damlatma çözeltisine damlatıldı. Oluşan boncuklar sertleşmeleri için oda sıcaklığında, 75 dakika bu damlatma çözeltisinde bekletildi. Sertleşen boncuklar süzüldü ve 2 kez 0.05 M Tris-HCl tamponu (pH 7.0) ile yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları protein tayini için toplandı. Oluşan boncuklar bir petri kabının içerisine konularak kullanılıncaya kadar buzdolabında 4 °C'de saklandı. Tezin bundan sonraki bölümlerinde bu yöntem "K_1 yöntemi", immobilize boncuklar da "K_1 boncuk" olacak şekilde kısaltılarak kullanıldı.

Altun ve Çetinus yöntemine göre, 1.25 g kitosan 75 mL destile suyun üzerine eklenerek manyetik karıştırıcıda 10 dakika karıştırıldı. Sonra 0.5 mL glasial asetik asit eklenip karıştırmaya oda sıcaklığında 3 saat devam edildi. Çözelti hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edildi ve 1 hafta içerisinde kullanıldı. Damlatma çözeltisi için % 3 (w/v) glioksal hidrat 80 °C'de çözülünceye kadar karıştırıldı ve oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Çözelti eşit hacimdeki % 4'lük (w/v) sodyum pirofosfat tetrabazik (pH

8.0) ile karıştırıldı. Çözelti aynı gün içerisinde kullanıldı. Kitosan çözeltisi bir enjektör yardımıyla, oda sıcaklığında, damlatma çözeltisine damlatıldı. Kitosan çözeltisi:Damlatma çözeltisi oranı 1:5 (v/v) olarak uygulandı. Boncuklar 30 dakika sertleşmesi için bekletildi ve 3 kez aynı hacimdeki 0.05 M fosfat tamponu ile yıkandı (pH 7.0). Hazırlanmış taze boncuklar 50 mM'lık soğuk fosfat tamponunda (pH 7.0) hazırlanan % 0.2'lik (w/v) glutaraldehit çözeltisinde 1 saat inkübe edildi. Boncuklar birkaç kez 50 mM soğuk fosfat tamponu (pH 7.0) ile yıkandı. Oluşan boncuklar bir behere konularak 5 g boncuğa 1 mL olacak şekilde lipaz enzimi ilave edildi ve 5 saat boyunca inkübe edildi. Sonra boncuklar süzüldü ve 2 kez 50 mM soğuk fosfat tamponu (pH 7.0) ile yıkandı. Süzüntü ve yıkama suları protein tayini için toplandı. Boncuklar petri kabının içerisinde buzdolabında depolandı. Tezin bundan sonraki bölümlerinde bu yöntem "K_2 yöntemi", immobilize boncuklar da "K_2 boncuk" olacak şekilde kısaltılarak kullanıldı.

3.2.3. Protein Tayini

Çalışmada defne tohumundan izole edilen lipaz çözeltisinin, bu enzimin immobilize edildiği kitosan boncukların, immobilizasyon sırasında kullanılan, tutunmayan proteinlerin geçtiği damlatma çözeltilerinin ve yıkama sularının protein içeriklerini belirlemek için Lowry yöntemi ile protein tayini yapıldı.

3.2.3.1. Lowry Yöntemi ile Kantitatif Protein Tayini

Protein konsantrasyonunun belirlenmesinde en doğru yöntem muhtemelen, asit hidrolizini takiben yapılan aminoasit analizleridir. Diğer birçok yöntem proteinin amino asit içeriğine duyarlıdır ve kesin konsantrasyon belirlenememektedir [67].

Protein konsantrasyonunun belirlenebilmesi için günümüze kadar çok çeşitli direkt ve indirekt teknikler geliştirilmiştir. Bu yöntemler Kjeldahl metodundan infrared spektroskopisine, turbidimetreden flourimetreye, refraktometreden polarimetreye kadar geniş yelpazeye sahiptir. Ancak günümüzde, protein tayinleri daha çok, UV-spektrofotometrik temelli ya da görünür bölgede absorbsiyon veren renkli bir ürün oluşturulmasına dayalı kimyasal esaslı yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Lowry yöntemi de görünür bölgede çalışılan bu yöntemlerden biridir [68].

Lowry yönteminin hassasiyeti proteinin yapısına göre değişebilir. Protein karışımları ve ham ekstrakt gibi hemen hemen her durumda, tamamen kabul edilebilir hassas sonuç veren, yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

Yöntemin esasında, alkali ortamda Cu^{+2} iyonu proteinlerdeki peptid bağları ile kompleks oluşturur ve Cu^{+1}'e indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerde yer alan tirozin, triptofan ve sistein aminoasitleri Folin reaktifini indirgeyerek renk oluşumuna neden olur. Oluşan rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Absorbanslar 500 nm'de okunur [67, 69].

Lowry yöntemi ile protein analizleri aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Standart protein grafiği hazırlamak için standart protein olarak % 0.1' lik sığır serum albümini kullanıldı.

Protein içerikleri belirlenecek olan defne lipazı çözeltisi, damlatma ve yıkama sularından 100'er µL alınarak destile su ile 500 µL'ye tamamlandı. Standart protein grafiği oluşturmak için ise 25, 50, 75, 100, 150, 200 ve 250 µL sığır serum albümini çözeltisi alınarak her biri 500 µL'ye destile su ile tamamlandı. Tüm örneklere 3 mL alkali bakır ayıracı eklendi. Tüpler vortekste karıştırılarak 10 dakika oda koşullarında bekletildi. Üzerlerine 100 µL Folin reaktifi ilave edildi. Tekrar vorteksle karışıtırılarak 30 dakika daha oda koşullarında bekletildi. Tüm örneklerin absorbansları UV-VIS spektrofotometrede 500 nm'de okundu. Şahit olarak 500 µL destile su kullanıldı.

Artan sığır serum albümini örneklerinin absorbansları ve örnek konsantrasyonları arasında çizilen standart protein grafiği yardımı ile ham defne lipazı, yıkama suları ve damlatma çözeltilerinin protein miktarları belirlendi.

3.2.4. Enzimatik Aktivite Tayini

Defne tohumundan elde edilen lipazın ve kitosan boncuklara immobilize defne lipazının hidrolitik lipaz aktiviteleri titrimetrik yöntemle belirlendi [70].

Aktivite tayini için; K_1 yöntemiyle elde edilen immobilize enzimden 0.25 g, K_2 yöntemiyle elde edilen immobilize enzimden 0.5 g, serbest enzimden 0.5 mL alındı. Şahit çalışma için 0.5 mL destile su kullanıldı. Aktivite tayinlerinde çalışma tamponu olarak 0.2 M Tris-maleat tamponu kullanıldı. K_1 yöntemiyle elde edilen immobilize enzim için pH'ı 7.0, K_2 yöntemiyle elde edilen immobilize enzim için pH'ı 6.0 ve serbest defne lipazı için pH'ı 8.0 olan 0.2 M Tris-maleat tamponundan 4 ml alındı,

üzerine, 2 mL % 1.6'lık sodyum deoksikolat çözeltisi, 2 mL 0.01 N'lik $CaCl_2$ çözeltisi ve 10 mL substrat emülsiyonu ilave edildi. Çalkalayıcıda 40 °C'de 200 rpm de 15 dakika karıştırıldı. Süre sonunda aseton-etanol (v/v, 1:1) karışımından 10 mL ilave edilip, 0.01 N'lik NaOH çözeltisi ile pH 10 oluncaya kadar titre edildi.

1 hidrolitik lipaz ünitesi; bu koşullarda 1 dakikada 1 mikromol yağ asidini hidrolizleyen enzim miktarı olarak tanımlandı. Titrasyonda harcanan NaOH miktarından aşağıdaki formüller kullanılarak defne lipazının hacimsel aktivitesi ve spesifik aktivitesi belirlendi.

$$Hacimsel\ Aktivite \quad H.A. \quad = \frac{\text{Harcanan NaOH'ın mikromolü/dk}}{\text{Kullanılan enzim çözeltisi hacmi} \quad \text{mL}} = \frac{U}{mL}$$

$$Spesifik\ Aktivite \quad S.A. \quad = \frac{\text{Hacimsel aktivite}}{\text{Enzim çözeltisi protein miktarı} \quad \text{mg/mL}} = \frac{U}{mg}$$

3.2.5. İmmobilizasyon Koşullarının Optimizasyonu

İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu çalışmalarında optimize edilecek parametrenin dışında diğer bütün parametreler sabit tutuldu.

3.2.5.1. Kitosan Miktarı Optimizasyonu

K_1 yöntemiyle gerçekleştirilen immobilizasyonda kitosan miktarı optimizasyonu için; 150, 200 ve 250 mg kitosan kullanılarak 3 farklı kitosan miktarında çalışıldı.

K_2 yöntemiyle gerçekleştirilen immobilizasyonda kitosan miktarı optimizasyonu için; 0.4, 0.8, 1.25 ve 1.5 g kitosan miktarları kullanılarak gerçekleştirildi.

Her iki yöntem için de en uygun kitosan miktarı belirlenerek çalışmanın bundan sonraki kısımlarında bu miktar kullanıldı.

3.2.5.2. Damlatma Çözeltisi Optimizasyonu

K_1 yöntemiyle gerçekleştirilen immobilizasyonun damlatma çözeltisinin optimizasyonu için, pH'ı 6.5, 7.0 ve 7.5 olan 0.05 M'lık Tris-HCl tamponu ve değişik

konsantrasyonlarda [% 0.3, 0.4 ve 0.5 (w/v)] hazırlanan pentasodyum trifosfat ile çalışıldı. En yüksek aktivitenin gözlendiği değerler belirlendi.

K_2 yöntemiyle gerçekleştirilen immobilizasyonda; % 3, 4 ve 5'lik (w/v) glioksal hidrat ve % 2, 3, 4, 5 ve 6'lık (w/v) sodyum pirofosfat tetrabazik (pH 8.0) kullanıldı. İmmobilize boncukların en yüksek aktivite gösterdiği konsantrasyonlar belirlendi.

3.2.5.3. Glutaraldehit Konsantrasyonu Optimizasyonu

K_2 yöntemiyle gerçekleştirilen immobilizasyonda glutaraldehit kullanıldı. Bu amaçla % 0.1, % 0.2 ve % 0.3 (v/v) olmak üzere 3 farklı glutaraldehit konsantrasyonunda çalışıldı. En iyi aktiviteyi gösteren glutaraldehit konsantrasyonu belirlendi.

3.2.5.4. Enzim Miktarı Optimizasyonu

K_1 yöntemi ile hazırlanan kitosan çözeltisine sırasıyla 1 mL, 2 mL ve 3 mL enzim çözeltisi ilave dildi.

K_2 yöntemiyle hazırlanan kitosan çözeltisi damlatma çözeltisine damlatıldı. Elde edilen boncuklar % 0.2'lik (w/v) glutaraldehit çözeltisinde 1 saat bekletildi. Daha sonra bu boncuklardan 5'er g alınarak sırasıyla 1 mL, 2 mL ve 3 mL enzim ile inkübe edildi.

Her iki yöntem için de en uygun enzim miktarı belirlendi.

3.2.5.5. Boncuk Boyutu Optimizasyonu

Boncuk boyutu optimizasyonu için; iki farklı boyuttaki enjektör ucu ve pastör pipeti kullanıldı. K_1 ve K_2 yöntemine göre hazırlanan kitosan çözeltilerinin her biri kendi damlatma çözeltilerine, bu iki farklı enjektör ucu ve pastör pipeti ile damlatılarak 3 farklı boyutta boncuk elde edildi. Boncukların çapları bir kumpas yardımı ile ölçüldü. Her iki yöntem için en iyi aktivitenin görüldüğü boncuk boyutu belirlendi.

3.2.5.6. Boncuk Miktarı Optimizasyonu

K_1 ve K_2 yöntemleri ile gerçekleştirilen immobilizasyonlar için yukarıda belirlenen optimum koşullarda kitosan çözeltileri ve damlatma çözeltileri ile belirlenen

enjektörle boncuklar hazırlandı. Her iki yöntemde de aktivite tayinleri için 0.25 g, 0.5 g ve 1 g boncuk kullanıldı. En yüksek aktivitenin belirlendiği boncuk miktarı optimum boncuk miktarı olarak tanımlandı.

3.2.6. Defne Tohumu Lipazının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.6.1. Optimum pH Çalışması

Serbest ve immobilize enzimlerin pH 5.0-9.0 arasında 0.2 M Tris-maleat tamponları kullanılarak, termostatlı çalkalayıcıda 200 rpm'de 15 dakikada 40 °C'de zeytin yağını hidrolizleme aktivitesi tespit edildi. En yüksek aktivitenin belirlendiği tampon pH'ı optimum pH olarak belirlendi.

3.2.6.2. Optimum Sıcaklık Çalışması

Serbest ve immobilize enzimlerin termostatlı çalkalayıcıda 30, 40 ve 50 °C'lerde hidrolitik aktiviteleri belirlendi. Enzimlerin en iyi aktiviteyi gösterdiği sıcaklık tespit edildi.

3.2.6.3. Termal Kararlılık Çalışması

Serbest ve immobilize enzimlerin termal kararlılığını belirlemek için, serbest enzim ve kitosana immobilize K_1 ve K_2 boncukları için; 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C ve 80 °C sıcaklıklarda 30 dakika ve 60 dakika süreyle bekletildi. Daha sonra serbest ve immobilize enzimlerin aktivite tayinleri yapıldı yapıldı ve termal kararlılıkları belirlendi.

3.2.6.4. K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize enzimlerin K_m ve V_{max} değerlerini belirlenmek için, 0.2 M Tris-HCl tamponu (pH 7.2) ve immobilize enzimler için 0.25-0.75 g, serbest enzim için ise 0.75-1.25 g zeytin yağı kullanılarak hazırlanan substrat emülsiyonlarıyla aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen aktivite değerleri yardımıyla Lineweaver-Burk grafikleri çizildi ve K_m ve V_{max} kinetik sabitleri belirlendi.

3.2.6.5. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği

İki farklı yöntemle hazırlanan immobilize enzimlerden 1'er gram alınarak aktivite tayini yapıldı. 15 dakika sonunda reaksiyon etanol-aseton karışımı ile durdurulmayıp boncuklar reaksiyon ortamından süzülüp alındıktan sonra reaksiyon durduruldu ve aktivite tayinleri yapıldı. Boncuklar destile su ile birkaç kez yıkanıp 1 saat buzdolabında bekletildi ve tekrar aktivite tayini yapıldı. Boncuklarda hiç aktivite görülmeyinceye kadar aktivite tayinlerine bu şekilde devam edildi.

3.2.6.6. İmmobilize Enzimin Depo Kararlılığı

Serbest ve immobilize enzimlerin depo kararlılığını belirlemek için; buzdolabında bekletilen serbest ve kitosana immobilize enzimlerin belirli zaman aralıklarında serbest enzim için 16 gün, immobilize enzimler için maksimum 35 gün boyunca aktivite tayinleri yapıldı ve aktivitelerini koruyabilecekleri süre tespit edildi.

BÖLÜM 4

DENEY SONUÇLARI VE BULGULAR

4.1. Defne Tohumlarının Çimlendirilmesi ve Lipaz İzolasyonu

Hatay'dan alınan defne tohumları Bölüm 3.2.1'de açıklandığı gibi çimlendirildi ve çimlendirilmiş bu tohumlardan lipaz enzimi izole edildi. Elde edilen lipaz çözeltisi kullanılıncaya kadar buzdolabında saklandı. Bu çözelti serbest enzim çözeltisi olarak isimlendirildi ve kitosan boncuklara immobilizasyonda kullanıldı.

Çimlendirme işlemi 5 gün sürdürüldü ve her gün aktive ve protein tayini yapılarak çimlendirme süreci takip edildi.

Tablo 4.1. Defne tohumu için en uygun çimlendirme süresinin belirlenmesi

Günler	Spesifik aktivite (U/mg protein)
Çimlendirilmemiş tohum	0.76
1. gün	1.14
2. gün	1.41
3. gün	1.79
4. gün	1.80
5. gün	1.83

Tablo 4.1'de görüldüğü gibi, defne tohumunda çimlenme öncesinde de lipaz aktivitesi bulunduğu, bu aktivitenin çimlenme ile birlikte arttığı, 4. ve 5. günlerde 3. gündeki aktiviteyi yaklaşık olarak koruduğu gözlendi. Çalışmada çimlendirme işlemini 3 günlük periyotla yapıldı.

4.2. Defne Lipazının Kitosan Boncuklara İmmobilizasyonu

Defne lipazının kitosan boncuklara immobilizasyonu Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi Alsarra ve ark. ve Altun ve Çetinus metoduna göre iki farklı yöntemle yapıldı. Elde edilen kitosan boncuklara uygulanan lipaz immobilizasyonlarında belirlenen immobilizasyon yüzdeleri ve boncuklardaki hidrolitik lipaz aktiviteleri Tablo 4.2'de verildi.

Her iki immobilizasyon yöntemiyle elde edilen boncuklar Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de görülmektedir.



Şekil 4.1. Alsarra ve ark. metoduyla (K_1 yöntemi) gerçekleştirilen immobilizasyonda elde edilen boncuklar



Şekil 4.2. Altun ve Çetinus metoduyla (K_2 yöntemi) gerçekleştirilen immobilizasyonda elde edilen boncuklar

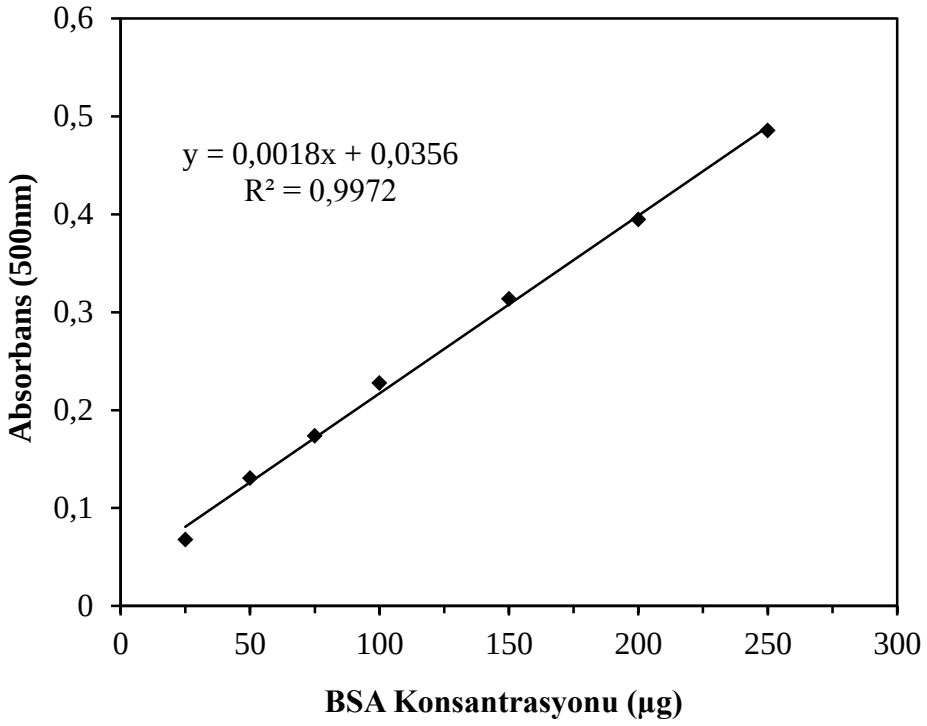
Tablo 4.2. Kitosan boncuklara yapılan lipaz immobilizasyonun yüzdeleri ve enzim aktiviteleri

Yöntem	İmmobilizasyon yüzdesi (%)	Spesifik aktivite (U/mg protein)
Alsarra ve ark.(K_1)	78	12.6
Altun ve Çetinus(K_2)	64	16

4.3. Protein Tayini İçin Standart Grafiğin Hazırlanması

Kantitatif protein tayini Lowry yöntemi ile yapıldı. Standart grafiğin hazırlanmasında 25, 50, 75, 100, 150, 200 ve 250 µg/mL'lik 7 farklı konsantrasyonda hazırlanan sığır serum albümini çözeltisi kullanıldı.

Serbest enzim ve yıkama sularında protein miktarları; örneklerin alkali bakır çözeltisi ile karıştırılarak 10 dakika, üzerine 0.1 mL Folin reaktifi eklenerek 30 dakika bekletilmesi ve 500 nm deki absorbansları okunmasıyla belirlendi. Örneklerin içerdiği protein miktarları çizilen standart grafiği denklemi yardımıyla belirlendi.

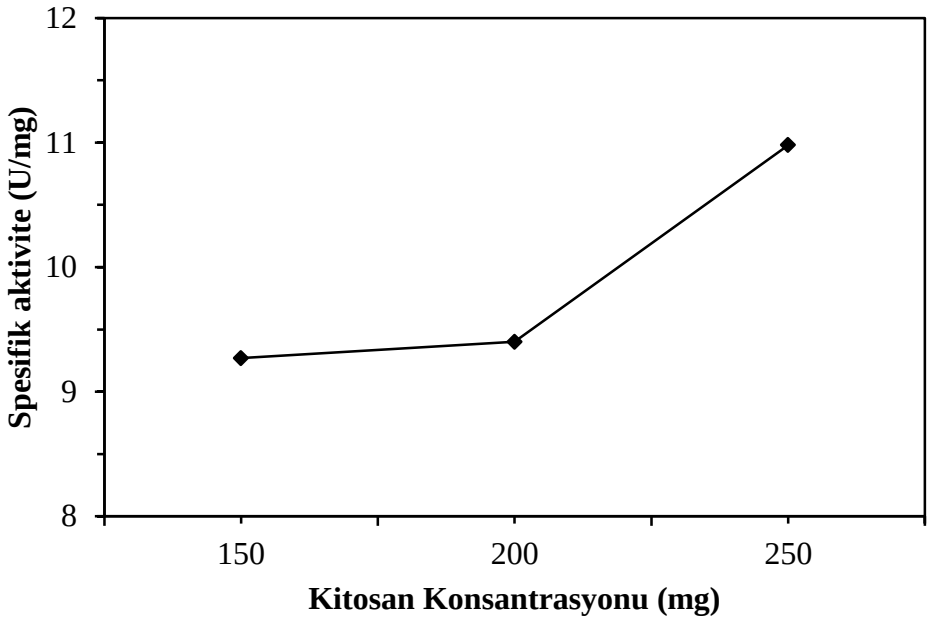


Şekil 4.3. Standart protein olarak sığır serum albümini çözeltisi kullanılarak Lowry yöntemiyle hazırlanan standart protein grafiği

4.4. İmmobilizasyonun Koşullarının Optimizasyonu

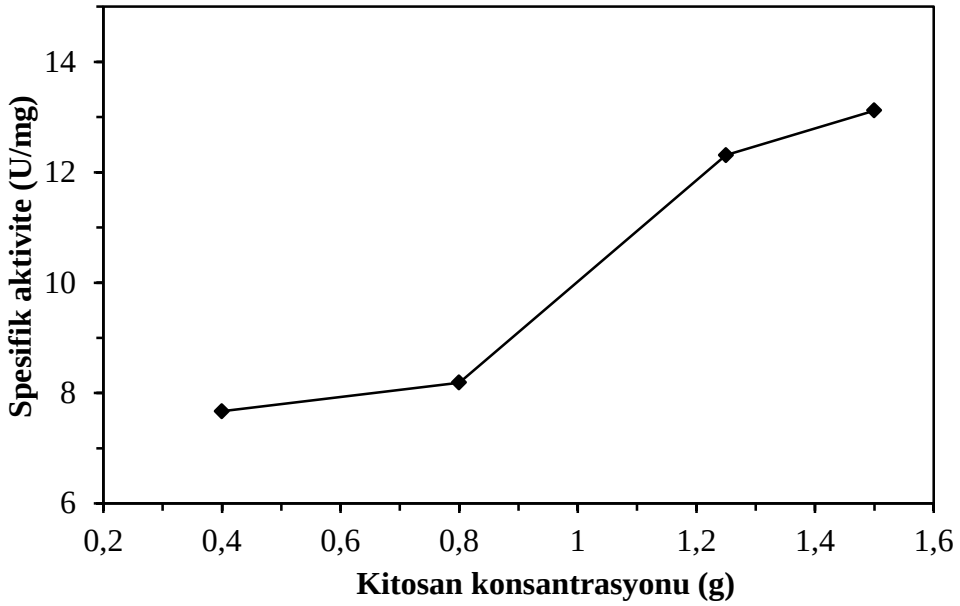
4.4.1. Kitosan Miktarı Optimizasyonu

K_1 ve K_2 yöntemi ile yapılan immobilizasyon işlemleri Bölüm 3.2.2'de, kitosan miktarı optimizasyon işlemi ise Bölüm 3.2.5.1'de belirtildiği gibi yapıldı.



Şekil 4.4. Kitosan miktarı optimizasyonu (K_1 yöntemi için)

Şekil 4.4'de görüldüğü gibi K_1 yöntemi ile yapılan immobilizasyon işleminde en yüksek aktivite 250 mg kitosan kullanılarak hazırlanan boncuklarda görüldü. Fakat 250 mg kitosan kullanılarak hazırlanan çözeltinin yoğun kıvamı çözeltinin damlatılmasında sorun oluşturdu, bu nedenle K_1 yöntemi ile yapılan immobilizasyonlar 200 mg kitosan kullanılarak gerçekleştirildi.



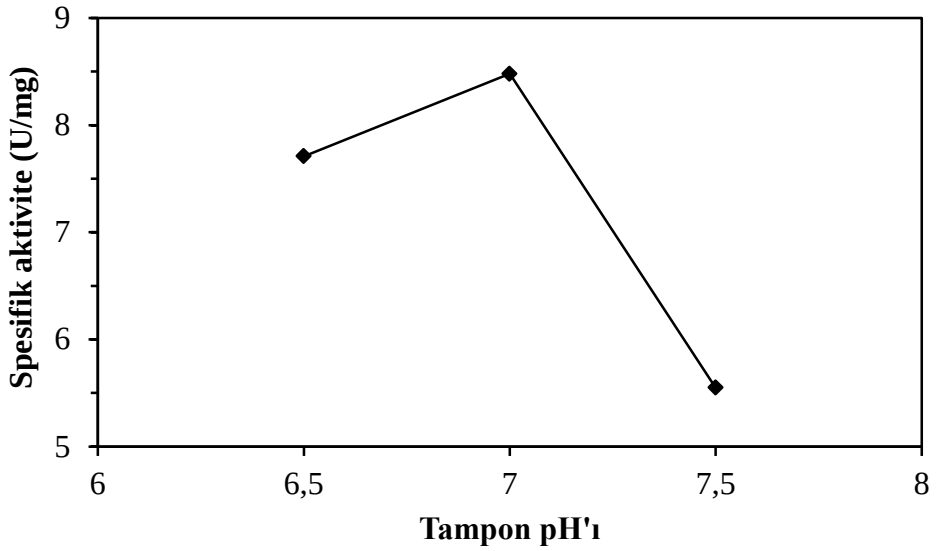
Şekil 4.5. Kitosan miktarı optimizasyonu (K_2 yöntemi için)

Şekil 4.5'de görüldüğü üzere K_2 yöntemiyle gerçekleştirilen immobilizasyonda en yüksek aktivite 1.5 g kitosan kullanılarak elde edilen boncuklarda görüldü. Ancak 1.5 g kitosan kullanıldığında da damlatma güçlüğü oluştu ve 1.25 g kitosan kullanılarak boncuk yapılmasına karar verildi.

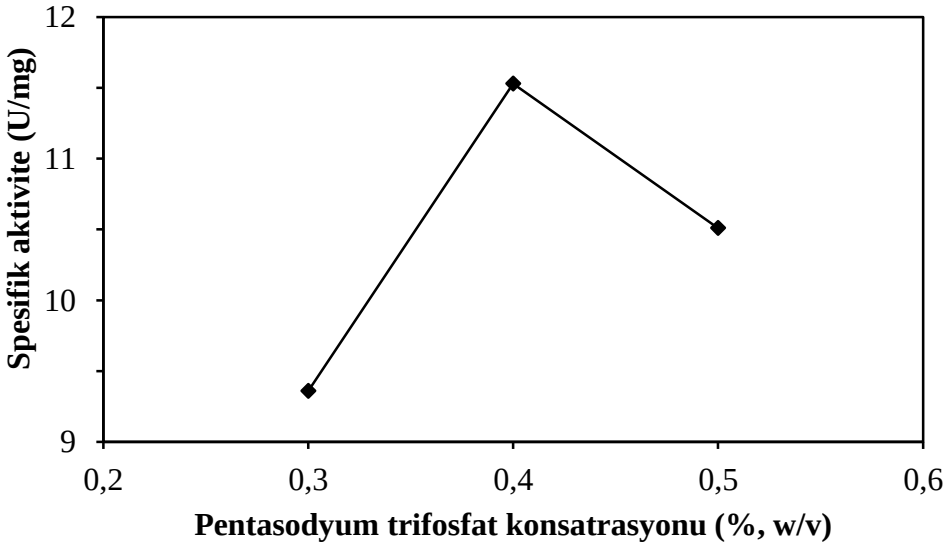
4.4.2. Damlatma Çözeltisi Optimizasyonu

K_1 ve K_2 yöntemlerinin damlatma çözeltisi optimizasyonu Bölüm 3.2.5.2'de belirtildiği gibi yapıldı. Elde edilen sonuçlardan oluşturulan grafikler Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de görülmektedir.

K_1 yöntemiyle gerçekleştirilen immobilizasyon işleminin damlatma çözeltisinin optimizasyonunda, Şekil 4.6'da görüldüğü gibi en yüksek aktivite pentasodyum trifosfat çözeltisi 0.05 M Tris-HCl tamponunda (pH 7.0) hazırlandığında ve pentasodyum trifosfat konsantrasyonu % 0.4 olduğunda gözlendiği belirlendi (Şekil 4.7).

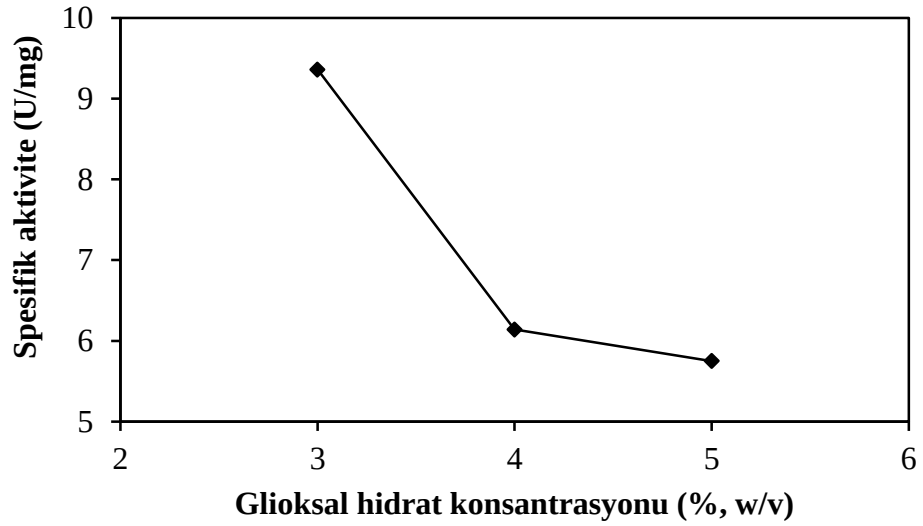


Şekil 4.6. K_1 yönteminde kullanılan damlatma çözeltisi pentasodyum trifosfat çözeltisinin hazırlandığı 0.05 M Tris-HCl tamponun pH'ının optimizasyon grafiği

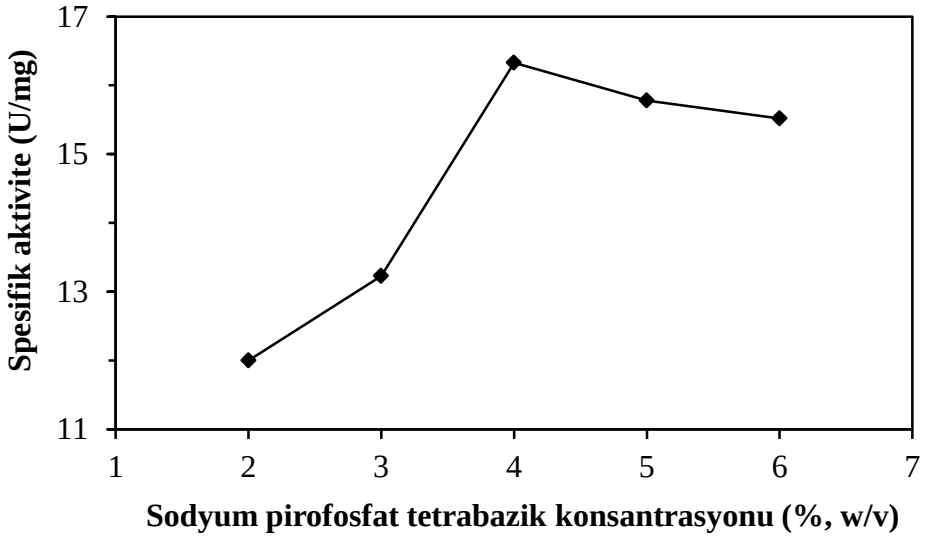


Şekil 4.7. K_1 yönteminde damlatma çözeltisi olarak kullanılan pentasodyum trifosfat çözeltisi konsantrasyonunun optimizasyon grafiği

K_2 yöntemiyle gerçekleştirilen immobilizasyonda; damlatma çözeltisi olarak kullanılan glioksal hidrat ve sodyum pirofosfat tetrabazik konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmaların sonuçları Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da görülmektedir.



Şekil 4.8. K_2 yöntemiyle gerçekleştirilen immobilizasyonda damlatma çözeltisi hazırlanmasında kullanılan glioksal hidrat yüzdesinin belirlenmesi

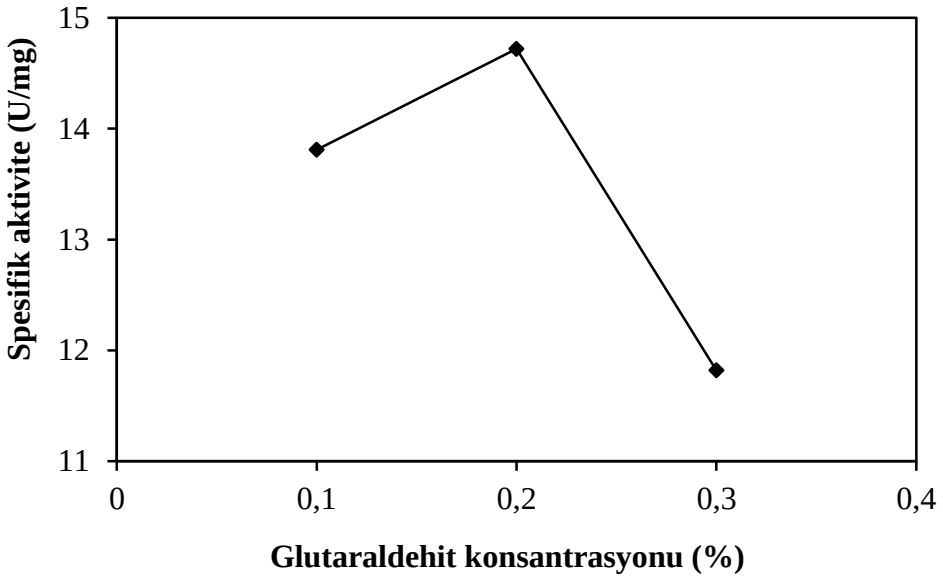


Şekil 4.9. K_2 yöntemiyle gerçekleştirilen immobilizasyonda damlatma çözeltisi hazırlanmasında kullanılan sodyum pirofosfat tetrabazik konsantrasyonunun belirlenmesi

K_2 yönteminde kullanılan damlatma çözeltisinin optimizasyonu amacıyla gerçekleştirilen çalışmada, glioksal hidrat konsantrasyonunun % 3 (w/v), sodyum pirofosfat tetrabazik konsantrasyonunun % 4 (w/v) olduğu koşullarda hazırlanan boncukların en yüksek lipaz aktivitesini gösterdiği belirlendi (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).

4.4.3. Glutaraldehit Konsatrasyonun Optimizasyonu

Glutaraldehit sadece K_2 yöntemiyle gerçekleştirilen lipaz immobilizasyonunda kullanıldı. Glutaraldehit miktarının optimizasyonu Bölüm 3.2.5.3'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 4.10. K_2 yöntemiyle gerçekleştirilen kitosan boncuklara lipaz immobilizasyonunda kullanılan glutaraldehit yüzdesinin belirlenmesi

Şekil 4.10'da görüldüğü gibi K_2 yöntemiyle gerçekleştirilen kitosan boncuklara lipaz immobilizasyonunda en yüksek enzim aktivitesi glutaraldehit miktarı % 0.2 (v/v) olduğunda görüldü.

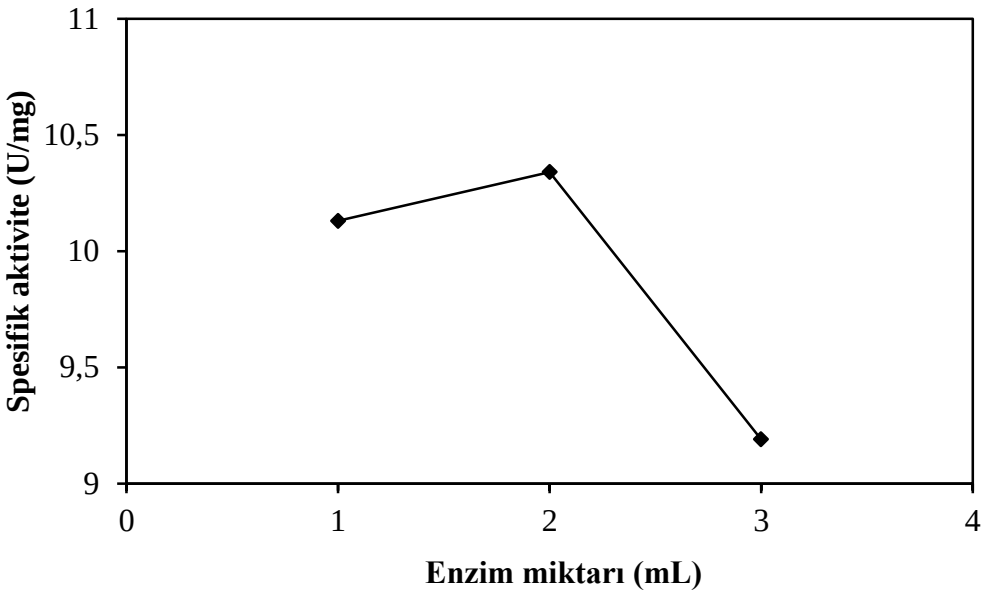
4.4.4. Enzim Miktarı Optimizasyonu

Kitosan boncuklara lipaz immobilizasyonlarında kullanılacak olan enzim miktarlarının belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.2.5.4'de belirtildiği gibi gerçekleştirilen

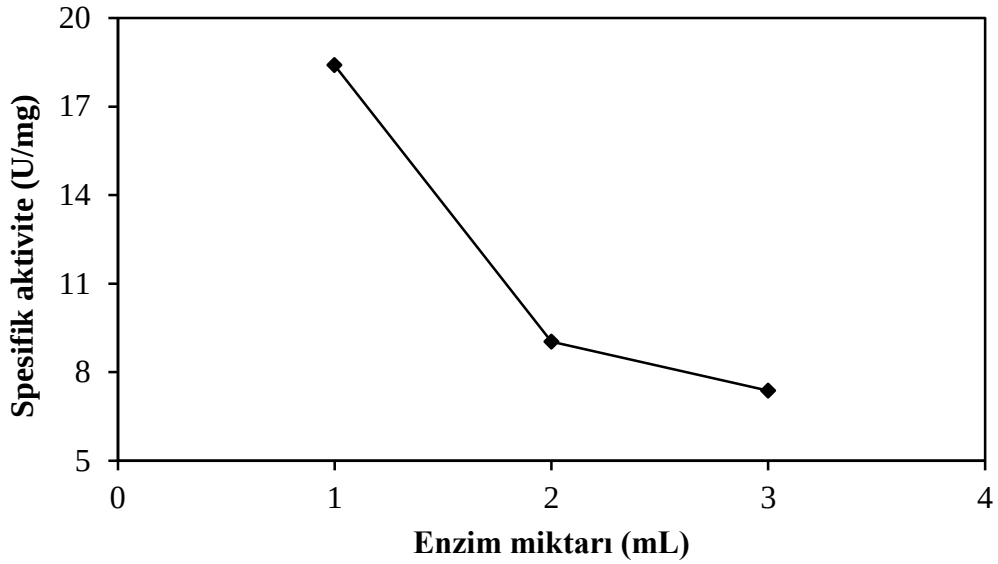
çalışmanın sonuçlarından elde edilen grafikler K_1 yöntemi için Şekil 4.11'de, K_2 yöntemi için Şekil 4.12'de verildi.

K_1 yöntemiyle immobilizasyonda enzim çözeltisi kitosan çözeltisi ile karıştırılıp boncuklar daha sonra oluşturuldu. K_2 yönteminde ise ilk önce boncuklar oluşturuldu, daha sonra enzim ile inkübe edildi.

Elde edilen sonuçlara göre; K_1 yöntemiyle immobilizasyonda kullanılacak optimum enzim miktarı 2 mL, K_2 yöntemiyle immobilizasyonda ise optimum enzim miktarı 1 mL olduğu belirlendi (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12).



Şekil 4.11. K_1 yöntemiyle lipaz immobilizasyonunda kullanılacak enzim miktarının belirlenmesi



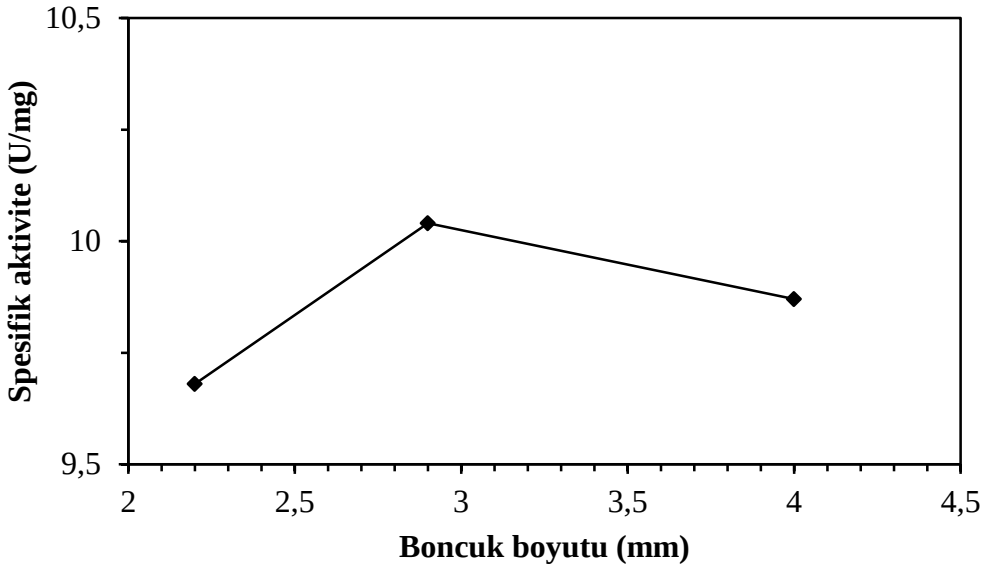
Şekil 4.12. K_2 yöntemiyle lipaz immobilizasyonunda kullanılacak enzim miktarının belirlenmesi

4.4.5. Boncuk Boyutu Optimizasyonu

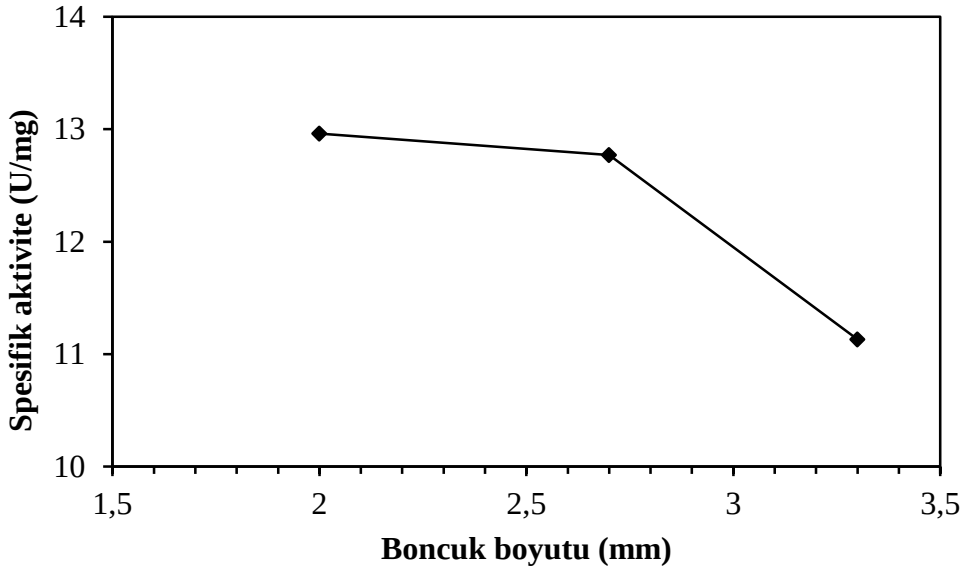
Boncuk boyutu optimizasyonu çalışmaları Bölüm 3.2.5.5'de belirtildiği gibi yapıldı. Kitosan boncukların hazırlanmasında 3 farklı enjektör kullanıldı. Bu amaçla; kahverengi uçlu enjektör (çap: 0.45 mm), yeşil uçlu enjektör (çap: 0.80 mm) ve pastör pipeti (çap: 2 mm) kullanıldı. Elde edilen boncukların boyutları kumpas yardımıyla belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te verildi.

En yüksek aktivite, K_1 yöntemiyle yapılan boncuklarda yeşil renkli uçla yapılan 2.9 mm çaplı boncuklarda (Şekil 4.12), K_2 yöntemi ile yapılan boncuklarda ise kahverengi enjektör ucuyla hazırlanan 2 mm çaplı boncuklarda olduğu görüldü (Şekil 4.13).

K_2 yöntemiyle gerçekleştirilen immobilizasyonda en yüksek aktivite kahverengi uç kullanıldığında elde edilen boncuklarda görülmesine rağmen, enjektör çapının küçük olması nedeniyle damlatma işlemi esnasında sorun ile karşılaşıldı ve bu nedenle K_2 yöntemiyle gerçekleştirilen immobilizasyonda da yeşil uçlu enjektör (2.7 mm çaplı boncuklar) kullanılmasına karar verildi.



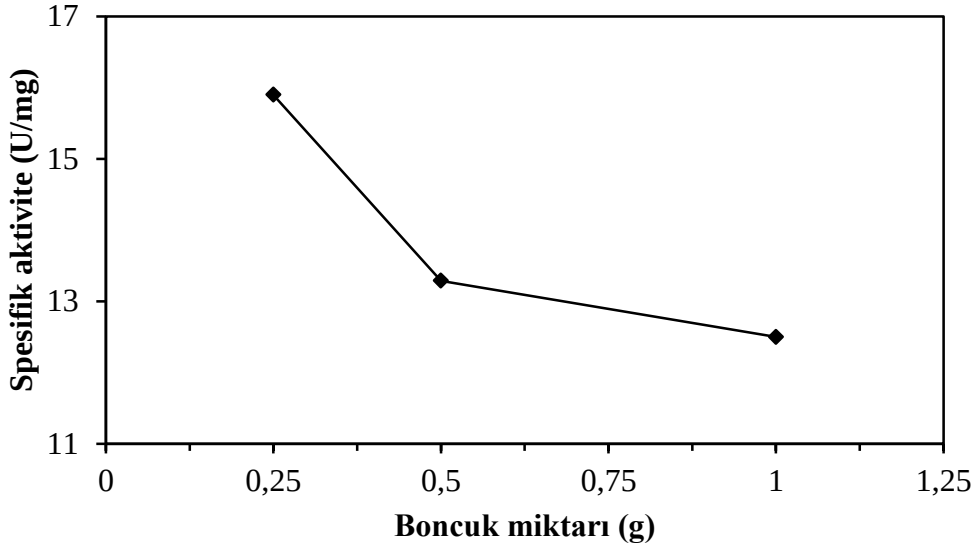
Şekil 4.13. K_1 yöntemiyle yapılan boncuklar için boncuk boyutu optimizasyonu



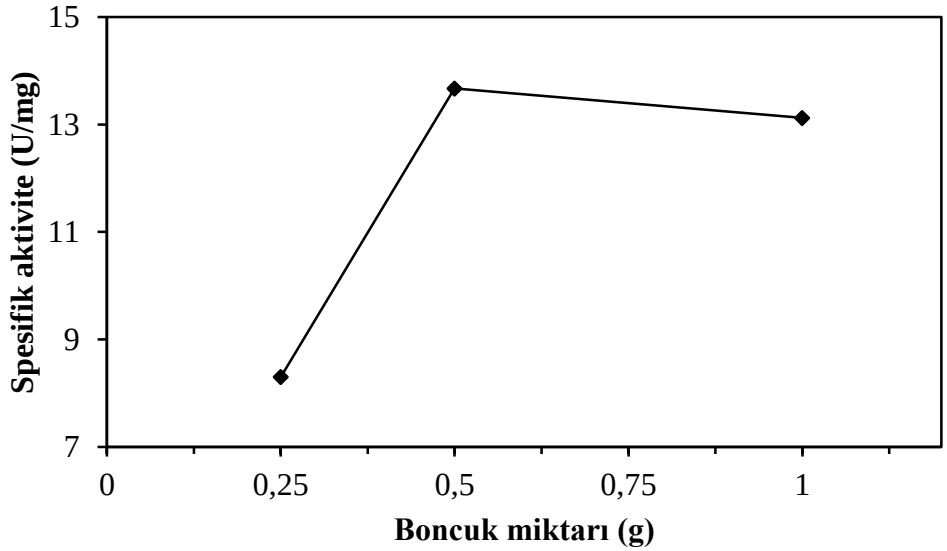
Şekil 4.14. K_2 yöntemiyle yapılan boncuklar için optimum boncuk çapının belirlenmesi

4.4.6. Boncuk Miktarı Optimizasyonu

Hidrolitik lipaz aktivitesi tayininde kullanılacak boncuk miktarın optimizasyonu Bölüm 3.2.5.6'da belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Yapılan çalışmalar sonucunda K_1 yöntemiyle elde edilen boncuklar için optimum boncuk miktarı 0.25 g boncuk, K_2 için optimum miktar 0.5 g boncuk olarak bulundu (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).



Şekil 4.15. K_1 yöntemiyle elde edilen boncuklar için boncuk miktarı optimizasyonu



Şekil 4.16. K_2 yöntemiyle elde edilen boncuklar için boncuk miktarı optimizasyonu

İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonu çalışmalarının sonuçları toplu olarak K_1 yöntemi için Tablo 4.3'te, K_2 yöntemi için Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.3. K_1 yöntemi ile gerçekleştirilen immobilizasyon işleminin koşullarının optimizasyonu

Kitosan miktarı (mg)	Tris-HCl tampon pH'ı	Pentasodyum trifosfat miktarı (%, w/v)	Enzim miktarı (mL)	Boncuk boyutu (mm)	Boncuk miktarı (g)
200	7	0.4	2	2.9	0.25

Tablo 4.4. K_2 yöntemi ile gerçekleştirilen immobilizasyon işleminin koşullarının optimizasyonu

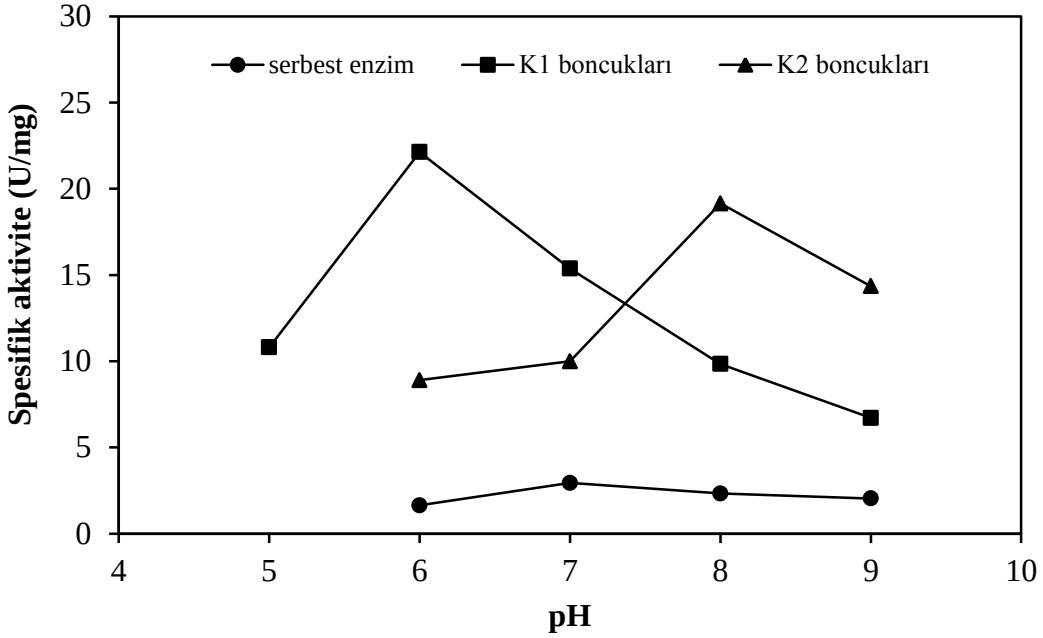
Kitosan miktarı (g)	Glioksal hidrat miktarı (%, w/v)	Sodyum pirofosfat tetrabazik miktarı (%, w/v)	Glutaraldehit miktarı (%, v/v)	Enzim miktarı (mL)	Boncuk boyutu (mm)	Boncuk miktarı (g)
1.25	3	4	0.2	1	2.7	0.5

4.5. Defne Tohumu Lipazının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi

4.5.1. Optimum pH Çalışması

Serbest ve immobilize defne tohumu lipazının maksimum aktivite gösterdiği pH'ı belirlemek için farklı pH değerlerinde (5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0) 0.2 M'lık Tris-maleat tamponları hazırlandı. Çalışma Bölüm 3.2.6.1'de belirtildiği şekilde yürütüldü. Elde edilen aktivite sonuçlarından spesifik aktivite-pH grafikleri oluşturuldu (Şekil 4. 17).

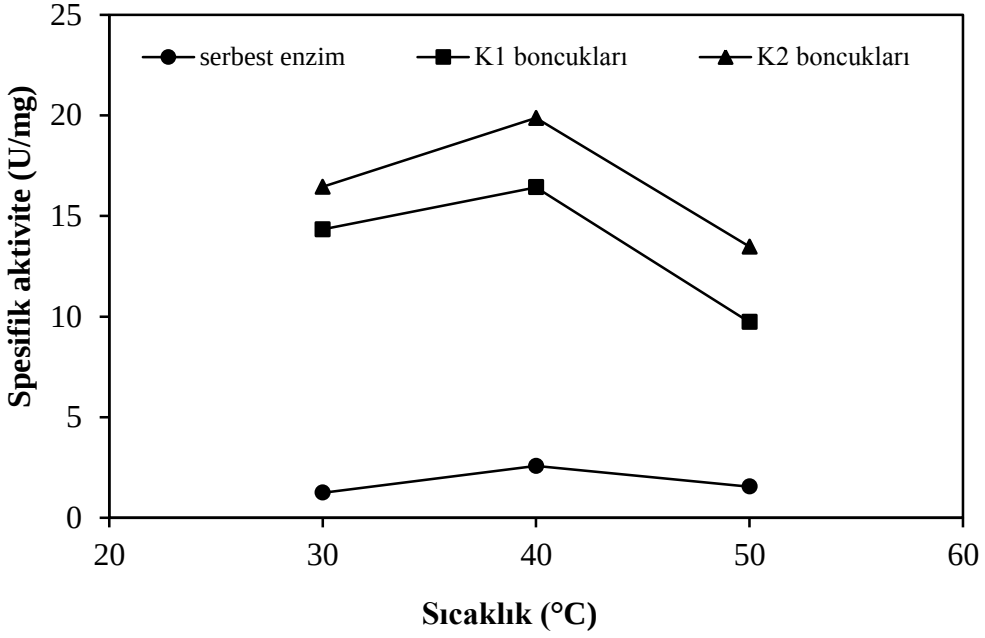
En yüksek hidrolitik lipaz aktivitesi serbest enzim için pH 7.0, K_1 için pH 6.0 ve K_2 için pH 8.0'da belirlendi.



Şekil 4.17. Serbest ve immobilize defne tohumu lipazının pH'a bağlı hidrolitik aktivitelerinin değişimi

4.5.2. Optimum Sıcaklık Çalışması

Serbest ve immobilize enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığı bulmak için aktivite tayini çalışması 30 °C, 40 °C ve 50 °C olmak üzere 3 farklı sıcaklıkta yürütüldü. Yapılan aktivite tayini sonrasında hem serbest hem de her iki immobilize defne tohumu lipazının optimum sıcaklığı 40 °C olarak belirlendi (Şekil 4.18).

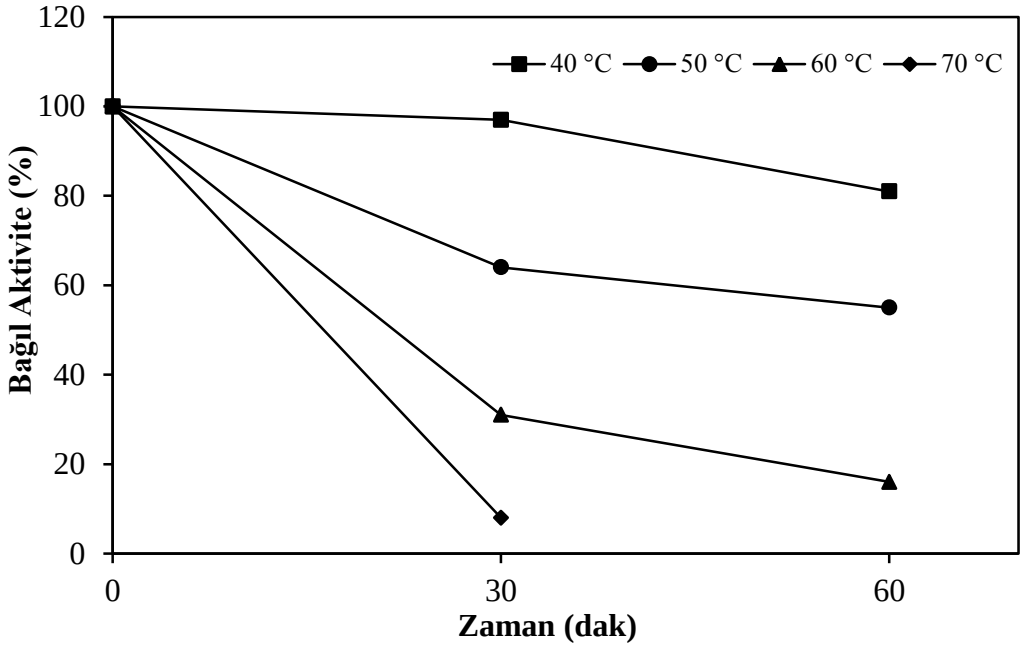


Şekil 4.18. Serbest ve immobilize defne tohumu lipazının sıcaklığa bağlı hidrolitik lipaz aktivitelerinin değişimi

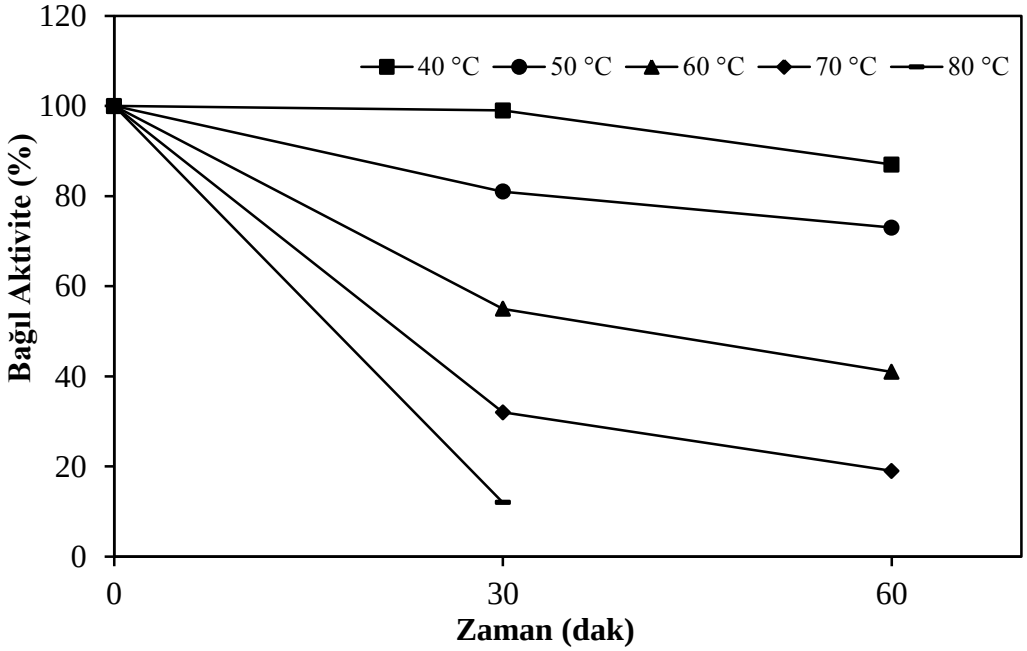
4.5.3. Termal Kararlılık Çalışması

Termal kararlılık çalışması Bölüm 3.2.6.3'de belirtildiği gibi yürütüldü. 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C ve 80 °C sıcaklıklarda serbest ve immobilize enzimler örnekleri 30 ve 60 dakika bekletildikten sonra buz banyosuna alınarak lipaz aktiviteleri çalışıldı. Oluşturulan zaman ve bağıl aktivite grafiklerinden immobilizasyon uygulamasının serbest enzime göre enzimin termal kararlılığını iyileştirdiği görüldü (Şekil 4.19, 4.20 ve 4.21).

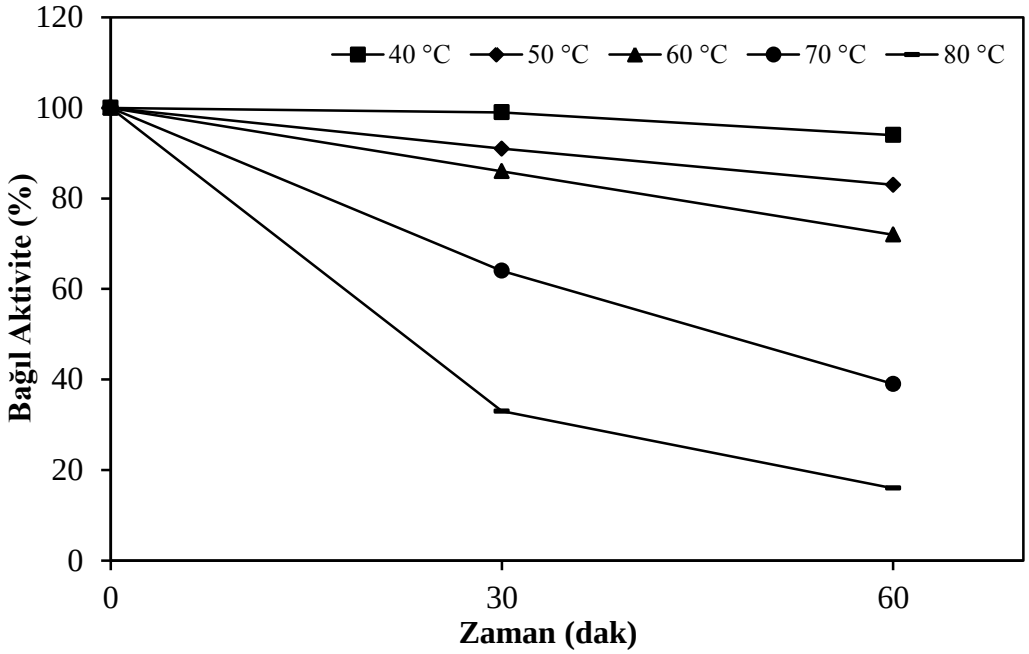
30 dakikanın sonunda 70 °C'de serbest enzim aktivitesini yitirmesine rağmen K_1 yöntemiyle tutuklanmış defne lipazı aktivitesinin yaklaşık % 30'unu korurken K_2 yöntemiyle tutuklanmış enzim ise yaklaşık % 60'ını koruduğu gözlendi. K_1 boncuklar, 80 °C'de 30 dakika bekletme sonunda aktivitesinin yaklaşık % 10'unu korurken 60 dakika sonunda aktivitesinin kalmadığı görüldüğü. K_2 boncuklar, 80 °C'de 30 dakika bekletme sonrası aktivitesinin yaklaşık % 30'unu korurken, 60 dakika sonra aktivitesinin yaklaşık % 15'ini koruduğu gözlendi. Hidrolitik aktivitelerin % 50'sini korunduğu sıcaklık serbest enzim için 50 °C, K_1 boncuklar için 60 °C ve K_2 boncuklar için 70 °C olarak belirlendi.



Şekil 4.19. Serbest enzime ait termal kararlılık grafiği



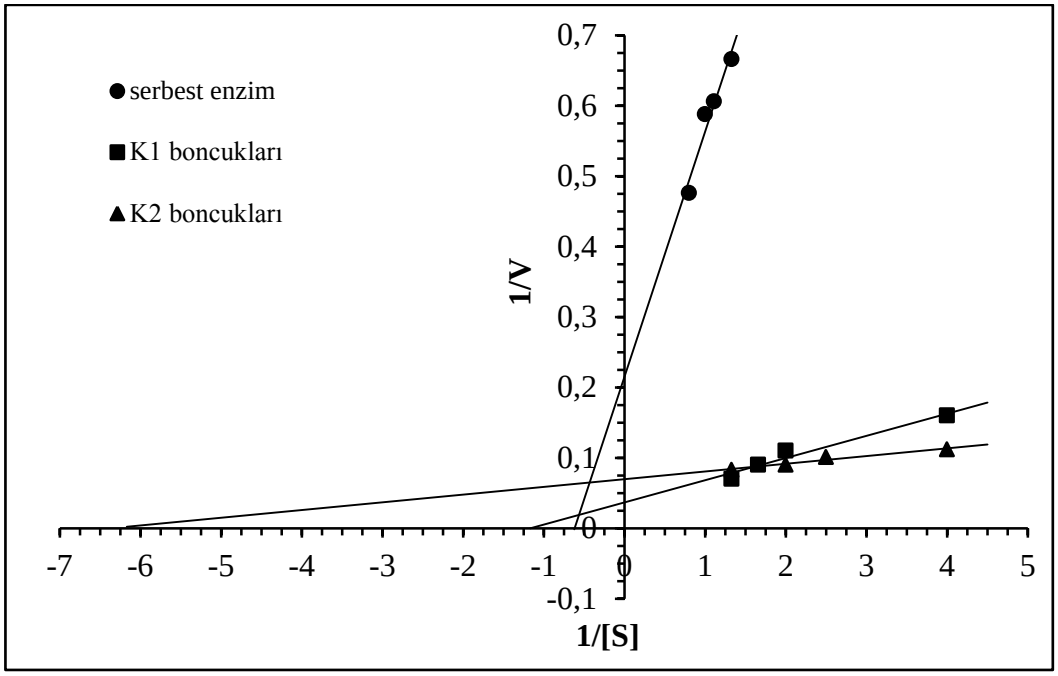
Şekil 4.20. K_1 boncuklarına ait termal kararlılık grafiği



Şekil 4.21. K_2 boncuklarına ait termal kararlılık grafiği

4.5.4. K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize defne tohumu lipazının K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla serbest enzim için 0.75, 0.9, 1.0 ve 1.25 g zeytin yağı, K_1 için 0.25, 0.5, 0.6 ve 0.75 g zeytin yağı ve K_2 için 0.25, 0.4, 0.5 ve 0.75 g zeytin yağı kullanılarak hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki substrat çözeltileri yardımıyla aktivite tayini yapıldı. Spesifik aktivite-Substrat konsantrasyonu arasında oluşturulan Linewear-Burk grafikleri yardımıyla K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Serbest ve immobilize defne tohumu lipazı aktivitesi için oluşturulan Lineweaver-Burk grafiği

Serbest, K_1 boncuklar ve K_2 boncuklar için K_m ve V_{max} değerleri Tablo 4.5'te verildi. Serbest enzim, K_1 boncuklar ve K_2 boncuklar için K_m değerleri sırasıyla 16.66 g, 6.66 g ve 1.56 g, V_{max} değerleri sırasıyla 4.76 U/mg, 25.0 U/mg ve 14.28 U/mg olarak bulundu.

Tablo 4.5. Serbest ve immobilize defne tohumu lipazının kinetik değerleri

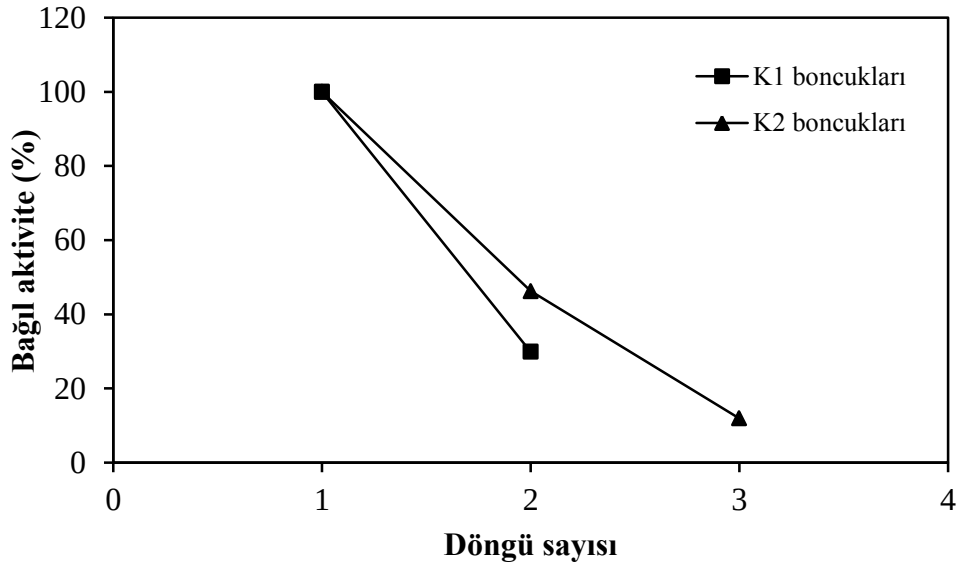
	K_m (g)	**V_{max} (U/ mg)**	**V_{max}/K_m**
Serbest enzim	16.66	4.76	0.28
K_1 boncuk	6.66	25.0	3.75
K_2 boncuk	1.56	14.28	9.15

4.5.5. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanılabilirliği

İmmobilize defne tohumu lipazının tekrar kullanılabilirliği çalışmaları Bölüm 3.2.6.5' de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

K_1 yöntemi ile yapılan boncuklarla 2, K_2 yöntemi ile yapılan boncuklarla ise 3 döngü boyunca çalışılabildi (Şekil 4.23). K_1 yönteminde 2. döngüde boncukların aktivitesinin yaklaşık % 30'unu koruyabildiği, 3. döngüde ise aktivitesinin kalmadığı belirlendi.

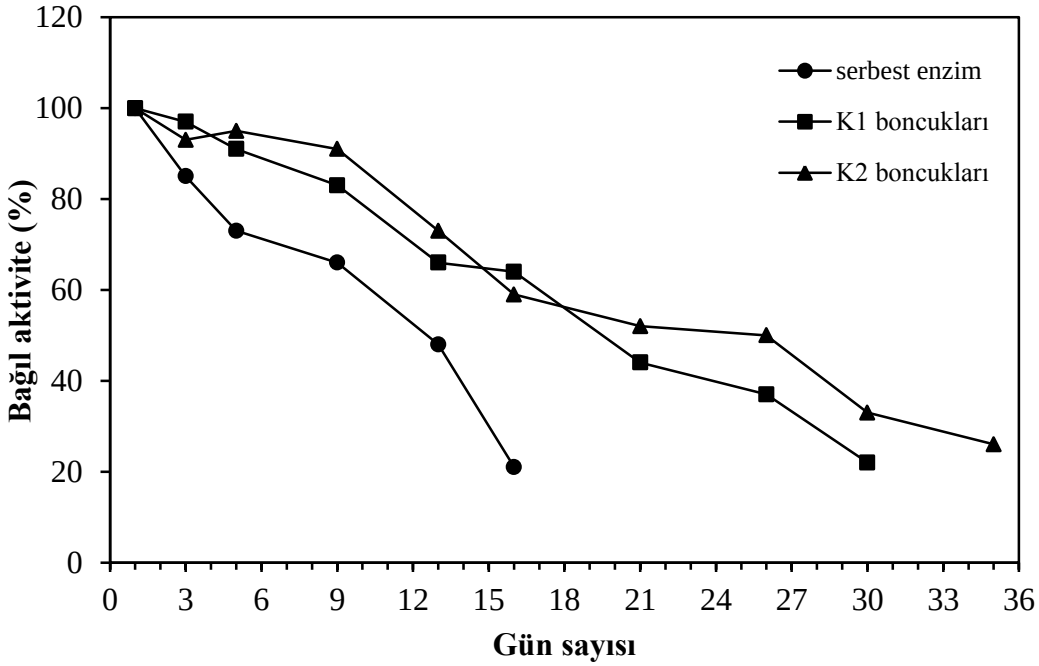
K_2 yöntemi ile yapılan boncuklarda ise 2. döngü sonrasında yaklaşık % 46'sını 3. döngü sonrasında % 16'sını koruduğu 4. döngü de ise aktivitesinin kalmadığı görüldü.



Şekil 4.23. Kitosan boncuklara immobilize edilmiş defne tohumu lipazının kesikli proseste yeniden kullanılabilirliği

4.5.6. Serbest ve İmmobilize Enzimin Depo Kararlılığı

Serbest ve immobilize defne tohumu lipazının depo kararlılığını belirlemek amacıyla aktivite tayinleri belirli gün aralıklarıyla gerçekleştirildi. Serbest enzimin 16 gün, K_1 boncukların 30 gün ve K_2 boncukların 35 gün boyunca aktivitesini koruduğu görüldü (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Serbest ve immobilize defne tohumu lipazının depo kararlılığı

Serbest enzimin 13 gün depolama sonrasında aktivitesinin yaklaşık % 50'sini kaybettiği, K_1 boncukların 21 günlük depolama sonrasında aktivitelerinin yaklaşık % 50'sinden fazlasını kaybettiği ve K_2 boncukların 26 günlük depolama sonrasında aktivitelerinin yaklaşık % 50'sini kaybettiği görülmüştür.

Serbest ve immobilize enzimlerin belirlenen bazı özellikleri Tablo 4.6'da toplu halde verilmiştir.

Tablo 4.6. Serbest ve immobilize enzimlerin bazı biyokimyasal özellikleri

		Serbest enzim	K_1 yöntemi	K_2 yöntemi
Optimum pH		7	6	8
Optimum sıcaklık (°C)		40	40	40
Termal kararlılık (60 °C'deki kalan % bağıl aktivite değerleri)	**30 dk**	31	55	86
	60 dk	16	41	72
V_{max}/K_m		0.28	3.75	9.15
Tekrar kullanılabilirlik (döngü sayısı)		-	2	3
Depo kararlılığı (aktivitesininin % 50'sini koruduğu gün)		12	19	26

BÖLÜM 5

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çok çeşitli endüstriyel işlemlerde (gıda, temizlik, tıp vb.) katalizör olarak kullanılan lipazların, mikrobiyal, hayvansal ve bitkisel kaynaklardan izolasyonu, immobilizasyonu ve bazı biyokimyasal ve endüstriyel özelliklerinin tayini ile ilgili araştırmalara literatürde sıklıkla rastlanmaktadır. Bu tez kapsamında da; çimlendirilmiş defne tohumlarından lipaz enzimi izolasyonu, izole edilen defne tohumu lipazının kitosan desteğe iki farklı yöntemle immobilizasyonu, serbest ve immobilize enzimin bazı özelliklerinin belirlendi ve birbirleriyle karşılaştırıldı.

Lipaz enziminin son yıllarda giderek artan ticari kullanımı ile ilişkili olarak enzimin izole edilebileceği kaynaklar ilgi çekici konuma gelmiştir. Her ne kadar çeşitli avantajlara sahip olması nedeniyle mikrobiyal kaynaklar daha çok tercih ediliyor olsalar da, günümüzde bitkisel kaynaklardan lipaz enzimi izolasyonu ile ilgili araştırmalar da yapılmaktadır. Ayçiçeği (*Heliantus annus* L.) [48, 49], kanola (Brassica napus L) [50, 51], Barbados fındığı (*Jatropha curcas* L.) [71, 72], acı bakla (*Lupinus luteus* L.) [73], susam (*Sesamum inducum* L.) [53], arpa (*Hordeum vulgare*) [54], keten tohumu (*Linum usitatissimum* L.) [65], Hindistan cevizi (*Cocos nucifera*) [52] ve pirinç (*Oryza sativa*) [74] gibi çeşitli yağlı tohumlardan bitkisel lipaz izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Defne tohumundan (*Laurus nobilis L.*) lipaz izolasyonu da İşbilir ve ark. [62] tarafından çalışılmış olup literatürde defne lipazının immobilizasyonuna dair bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada kullanılan defne tohumları Hatay'dan temin edildi. Defne tohumları 3 gün çimlendirildikten sonra lipaz izolasyonları gerçekleştirildi.

Literatürde, yağlı tohumların enzimatik aktivitelerinin çimlenme ile birlikte arttığına dair çalışmalar [6, 65] bulunmaktadır. Staubmann ve ark.'ları *Jatropha curcas* L. tohumlarının lipaz ve esteraz aktivitesini incelemişlerdir [72]. Yaptıkları çalışmada çimlenmemiş tohumlarda lipaz aktivitesinin olmadığını, aktivitenin ancak 2 günlük çimlenme periyodundan sonra tespit edilebildiğini, 4 günlük bir çimlenme işlemi sonrasında lipaz aktivitesinin maksimuma ulaştığını ve bunun 6. günden sonra azaldığını belirlemişlerdir.

Bu tez çalışmasında defne tohumlarına 5 günlük bir periyotta çimlendirme işlemi uygulandı. Çimlenmemiş, 1. gün, 2. gün, 3. gün, 4. gün ve 5. gün'lük tohumlar için hidrolitik lipaz spesifik aktivitesi sırasıyla, 0.76, 1.14, 1.41, 1.79, 1.80 ve 1.83 U/mg protein olarak bulundu (Tablo 4.1). Defne tohumunda çimlenme öncesinde de lipaz aktivitesi bulunduğu, bu aktivitenin çimlenme ile birlikte arttığı, çimlenmenin 3. gününde ulaşılan aktivitenin 4. ve 5. günlerde de yaklaşık olarak korunduğu gözlendi. 3. günde ulaşılan bu aktivite artışının yanı sıra çimlendirme süresi uzadıkça ortamda gelişen mikrobiyal üreme de çimlendirme süresinin 3 gün olarak seçilmesine neden oldu.

Enzimlerin endüstriyel kullanım alanları genişledikçe, enzimlerin yapılarından kaynaklanan bazı sorunlar ticari kullanımlarında kısıtlamalar getirmektedir. Her ne kadar enzimler uygun koşullar sağlandığında doğal ortamlarının dışında da aktivite gösteriyor olsalar da, pH ve sıcaklık gibi çeşitli inhibisyon etkilerine açık olmaları, reaksiyon ortamından kolayca uzaklaştırılamamaları, reaksiyon sonrasında tekrar kullanımlarının olmamaları gibi çeşitli zorluklarla karşılaşılmaktadır. Bu sorunların üstesinden gelebilmek için enzimler uygun destek materyallerine immobilize edilmektedirler.

İmmobilizasyon için çeşitli yöntemler ve destekler bulunmaktadır. İmmobilizasyon işleminde uygulanan yönteme uygun destek seçilerek immobilizasyon gerçekleştirilir.

Bu çalışmada tercih edilen immobilizasyon yöntemleri K_1 yöntemi için tutuklama yöntemi, K_2 yöntemi için çapraz bağlama yöntemi olup destek materyali olarak kitosan seçildi.

Tutuklama yöntemi lipaz imobilizasyonu için sıklıkla kullanılan immobilizasyon yöntemlerindendir. Desai ve ark. [75], Manfred ve ark. [76], Pirozzi ve ark. [77], Won ve ark. [41] ve Kim ve ark. [78] çeşitli kaynaklardan izole edilen lipazları tutuklama yöntemiyle immobilize eden araştırmacılardan bazılarıdır. Enzim immobilizasyonunda tercih edilen yöntemlerden biri de çapraz bağlamadır. Yılmaz ve ark. [44], Gray ve ark. [79], Kensingh ve ark. [80], Hung ve ark. [81] çapraz bağlama yöntemini tercih eden araştırmacılardan bazılarıdır.

Kitosan, biyouyumluluğu, biyobozunabilirliği, toksik olmaması, fiziksel olarak inert olması, proteinlere karşı olan affinitesi ve yüksek mekanik direnci ile enzim

immobilizasyonu için beğenilen biyomateryallerdendir. Altun ve Çetinus [56], Alsarra ve ark. [55], Foresti ve Ferreira [57], Huang ve ark. [4], Chiou ve Wu [58], Palla ve ark. [22] ve Amorim ve ark. [82] kitosanı çeşitli enzimlerin immobilizasyonlarında destek materyali olarak kullanan bazı araştırmacılardır.

Bu tez kapsamında, kitosan boncuklara immobilizasyon işlemi 2 farklı yöntemle yürütüldü. Bunlardan bir Alsarra ve ark.'nın yöntemi [55] (K_1 yöntemi) diğeri Altun ve Çetinus'un [56] (K_2 yöntemi) yöntemidir. Protein tayinleri Lowry metodu ile yapıldı. Standart protein çözeltisi olarak sığır serum albümini kullanıldı ve standart grafiği çizildi (Şekil 4.3). Serbest enziminin, damlatma çözeltilerinin ve yıkama sularının protein miktarları bu standart grafikten yararlanılarak belirlendi. K_1 yönteminde elde edilen boncukların spesifik aktivitesi 12.6 U/mg protein, K_2 yönteminde elde edilen boncuklarınki ise 16 U/mg protein olarak bulundu. İmmobilizasyon verimleri ise K_1 için % 78, K_2 için % 64'tür (Tablo 4.2). Serbest enzimin spesifik aktivitesi (3 günlük çimlenme; 1.79 U/mg protein) ile kıyaslandığında K_1 boncukların aktivitesinin yaklaşık 7 kat, K_2 boncukların aktivitesinin yaklaşık 9 kat arttığı görüldü. Benzer olarak Chiou ve Wu'da [58] hidroksil grupları aktivite edilmiş kitosana immobilize ettikleri *Candida rugosa* lipazının aktivitesinin serbestten yaklaşık 5 kat fazla olduğunu belirtmişlerdir.

İmmobilizasyonda enzim aktivitesini etkileyen çeşitli etkenler vardır. Bunlardan bazıları; destek materyalinin konstrasyonu, damlatma çözeltisinin konsantrasyonu, enzim miktarı, boncuk boyutu ve boncuk miktarıdır. Alsarra ve ark. immobilizasyon koşullarının optimizasyonunun, immobilizasyon veriminin maksimum seviyelere ulaşmasını sağlayacağını, enzim yüklü boncukların tekrar kullanılabilirliğinin ve kararlılığının artacağını bildirmiştir [55].

Bu çalışmada immobilizasyon parametreleri olarak kitosan miktarı, damlatma çözeltilerinin pH ve konsantrasyonu, defne lipazı miktarı, boncuk boyutu ve boncuk miktarı optimize edildi.

Kitosan miktarı optimizasyonunda; K_1 yöntemi için 150, 200 ve 250 mg kitosan, K_2 yöntemi için 0.4, 0.8, 1.25 ve 1.5 g kitosan kullanılarak denemeler yapıldı. Optimum kitosan miktarı K_1 için Şekil 4.4'de görüldüğü gibi 250 mg olarak bulundu. En yüksek hidrolitik lipaz aktivitesi bu miktar kullanılarak belirlenmiş olmasına rağmen, 250 mg kitosan kullanılarak hazırlanan çözeltinin yoğun kıvamı damlatmaya engel teşkil ettiğinden optimum kitosan miktarı olarak 200 mg tercih edildi. K_2 yöntemi için

bulunan değerler Şekil 4.5'te verildi. K_1 yöntemine benzer olarak, en yüksek aktivite 1.5 g kitosan kullanılarak hazırlanan çözeltide görülmesine rağmen çözeltinin yoğun kıvamından dolayı 1.25 g kitosan kullanılmasına karar verildi.

Damlatma çözeltisi optimizasyonunda; K_1 yöntemi için pentasodyumtrifosfat konsantrasyonları ve 0.05 M'lık Tris-HCl tamponu pH'ları, K_2 için glioksal hidrat ve sodyum pirofosfat tetrabazik konsantrasyonları çalışıldı. K_1 yönteminde pentasodyumtrifosfat % 0.3, 0.4 ve 0.5 (w/v) olarak, 0.05 M Tris-HCl tamponu pH 6.5, 7.0 ve 7.5 olarak çalışıldı. Pentasodyumtrifosfat için optimum değer % 0.4 (Şekil 4.7), tampon pH'ı da 7.0 (Şekil 4.6) olarak bulundu. K_2 yönteminde glioksal hidrat % 3, 4 ve 5 (w/v) olarak, sodyum pirofosfat tetrabazik ise % 2, 3, 4, 5 ve 6 (w/v) konsantrasyonlarında çalışıldı. Optimum konsantrasyonlar glioksal hidrat için % 3 (w/v) (Şekil 4.8), sodyum pirofosfat tetrabazik için ise % 4 (w/v) (Şekil 4.9) olarak bulundu.

K_2 yönteminde boncuklar enzimden önce glutaraldehitle ile inkübe edildi. Glutaraldehit konsantrasyonu % 0.1, 0.2 ve 0.3 (v/v) olarak çalışıldı. Optimum değer % 0.2 (v/v) olarak bulundu (Şekil 4.10).

Enzim miktarı optimizasyonunda K_1 ve K_2 yöntemlerinin her ikisinde de 1, 2 ve 3 mL olmak üzere 3 farklı enzim miktarı ile çalışıldı. K_1 yönteminde optimum miktar 2 mL (Şekil 4.11), K_2 yönteminde 1 mL (Şekil 4.12) olarak bulundu.

Boncuk boyutu optimizasyonunda çapı 0.45 mm olan kahverengi uçlu enjektör, çapı 0.8 mm olan yeşil uçlu enjektör ve 2 mm çaplı pastör pipeti kullanıldı. K_1 yönteminde oluşan boncukların çapları sırasıyla 2.2, 2.9 ve 4 mm olarak ölçüldü. En yüksek aktivite 0.8 mm çapa sahip yeşil renkli enjektör ucu ile yapılan 2.9 mm çapa sahip boncuklarda görüldü (Şekil 4.13). K_2 yönteminde oluşan boncukların çapları 2.2, 2.7 ve 3 mm olarak ölçüldü. En yüksek aktivite 2.2 mm çapa sahip olan boncuklarda görülmesine rağmen, 0.45 mm çapa sahip kahverengi enjektör ucu ile kitosan çözeltisinin damlatılmasında zorluk yaşandı ve bu sebepten dolayı 2.7 mm çapa sahip boncuklar tercih edildi (Şekil 4.14). Boncuk miktarı optimizasyonunda her iki yöntem için de 0.25, 0.5 ve 1 g boncuk kullanıldı. Optimum boncuk miktarları K_1 için 0.25 g, K_2 için 0.5 g olarak bulundu (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).

İmmobilizasyon koşullarının optimizasyonundan sonra serbest enzim, defne lipazının immobilize edildiği K_1 ve K_2 boncuklar için optimum pH, optimum sıcaklık,

termal kararlılık, K_m ve V_{max} değerleri belirlendi, K_1 ve K_2 boncukları için tekrar kullanılabilirlik ve depo kararlılığı gibi bazı özellikleri çalışıldı.

İmmobilizasyon işlemi enzimin çalışma koşullarını daha ılımlı hale getiren bir yöntemdir ve enzimin pH çalışma aralığı değiştirilebilir veya genişletilebilir. Optimum pH belirleme çalışmasında tampon olarak 0.2 M'lık Tris-maleat tamponu kullanıldı. En yüksek hidrolitik lipaz aktivitesinin görüldüğü optimum pH serbest enzim için pH 7.0, K_1 boncuklar için pH 6.0, K_2 boncuklar için pH 8.0 olarak belirlendi (Şekil 4.17). Ting ve ark., kitosana immobilize edilmiş *Candida rugosa* lipazının soya fasülyesi yağını hidrolizme aktivitesine pH'ın (pH 5.0-11.0) etkisini inceleyip en yüksek hidrolitik aktivitenin görüldüğü pH'ı belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmada kitosana immobilize ettkileri lipazın optimum pH'ını 8.0 olarak bulmuşlardır [83]. Hung ve ark., *Candida rugosa* lipazını kitosana immobilize etmişler ve optimum pH değerini serbest enzim için 8.0, immobilize enzim için 9.0 olarak bulmuşlardır [81]. Pereira ve ark. kitosana immobilize ettikleri *Candida rugosa* lipazının optimum pH'ını 6.0 olarak [84], Sağıroğlu ve Arabacı çalışmalarında ayçiçeğinden izole ettikleri lipazın optmimum pH'ını 7.5 [49], İşbilir ve ark. defne tohumundan izole ettikleri lipazın optimum pH'ını 8.0 [62] olarak belirlemişlerdir.

Optimum sıcaklık belirleme çalışmasında serbest ve immobilize enzimlerin hidrolitik lipaz aktivite çalışması 30 °C, 40 °C ve 50 °C'de yürütüldü. Serbest enzim, K_1 boncuklar ve K_2 boncuklar için optimum sıcaklık 40 °C olarak belirlendi (Şekil 4.18). Enujiugha ve ark. *Pentaclethra macrophylla* Benth'den izole ettikleri lipazın optimum sıcaklık değerini 30 °C [85], Pereira ve ark. kitosana immobilize ettikleri *Candida rugosa* lipazının optimum sıcaklığının 50 °C [84] olarak bulmuşlardır.

Termal kararlılık çalışmasında, serbest enzim ve immobilize boncuklar 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C ve 80 °C'de 30 dakika ve 60 dakika bekletildi, buz banyosuna alındı ve sonra hidrolitik lipaz aktiviteleri belirlendi (Şekil 4.19, Şekil 4.20 ve Şekil 4.21). 60 °C'de 30 dakika bekletme sonrasında serbest enzimin aktivitesinin yaklaşık % 30'unu, K_1 boncukların aktivitesinin yaklaşık % 50'sini ve K_2 boncukların aktivitesinin yaklaşık % 80'ini koruduğu görüldü. 70 °C'de 30 dakika bekletme sonrasında serbest enzimin aktivitesinin % 10, K_1 boncukların aktivitelerinin % 30, K_2 boncukların aktivitelerini % 60 kadarını koruduğu belirlendi. Chiou ve Wu hidroksil grupları aktive edilmiş kitosana immobilize ettikleri *Candida rugosa* lipazının ve serbest *Candida*

rugosa lipazının termal kararlılığını çalışmışlardır. Çalışmalarını 1 saat süreyle 25-60 °C arasında yürütmüşlerdir. İmmobilize enzimin aktivitesinde 40 °C'ye kadar bir düşüş olmadığını, serbest enzimin ise 30 °C'ye kadar kararlı kalabildiğini, 60 °C'de serbest enzim aktivitesinin yaklaşık % 20'sini korurken immobilize enzimin yaklaşık % 60'ını koruduğunu belirlemişlerdir [58].

V_{max} reaksiyon hızı ve K_m Micheals Menten sabiti Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak bulundu (Şekil 4.22). Serbest ve immobilize defne tohumu lipazının K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla serbest için 0.75 g, 0.9 g, 1.0 g ve 1.25 g zeytin yağı, K_1 boncuklar için 0.25, 0.5 g, 0.6 g ve 0.75 g zeytin yağı ve K_2 boncuklar için 0.25 g, 0.4 g, 0.5 g ve 0.75 g zeytin yağı kullanılarak hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki substrat çözeltileri yardımıyla aktivite tayini yapıldı. Serbest enzim, K_1 boncuk ve K_2 boncuk için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla, 16.66 g ve 4.76 U/mg protein, 6.66 g ve 25.0 U/mg protein, 1.56 g ve 14.28 U/mg protein olarak bulundu. İşbilir ve ark. defne tohumundan izole ettikleri lipazın K_m ve V_{max} kinetik değerlerini sırasıyla 0.975 g ve 1.298 U/mg protein olarak [62], Sağıroğlu ve Arabacı ayçiçeği tohumundan izole ettikleri lipazın K_m ve V_{max} kinetik değerlerini sırasıyla 1.33 mM ve 555 U/mg protein olarak [49], Hung ve ark. kitosana immobilize ettikleri *Candida rugosa* lipazının K_m ve V_{max} kinetik değerlerini serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 1.67 mM ve 92.5 U/mg protein ve 18.01 mM ve 96.1 U/mg protein olarak [81] belirlemişlerdir.

Tekrar kullanılabilirlik çalışmasında immobilize boncuklardan 1'er g alınarak aktivite tayini yapıldı. K_1 boncukların 2. döngü sonunda aktivitelerinin % 30'unu, K_2 boncukların 3. döngü sonunda aktivitelerinin % 16'sını koruyabildiği, daha sonraki döngülerde boncuklarda hidrolitik aktivite belirlenemedi (Şekil 4.23). Huang ve ark. kitosan-PVA karışımına immobilize ettikleri *Candida rugosa* lipazının tekrar kullanılabilirlik çalışmasında, immobilize enzimin 10 döngü sonunda aktivitesinin % 46 kadarının korunduğunu belirlemişlerdir [4].

Serbest ve immobilize enzimin depo kararlılığını belirlemek için belirli gün aralıklarında buzdolabı koşullarında 4 °C'de depolanarak aktiviteleri takip edildi. Serbest enzimin 16 gün, K_1 boncukların 30 gün ve K_2 boncukların 35 gün boyunca aktivitesini koruduğu görüldü (Şekil 4.24). Serbest enzimin 13 gün boyunca, K_1 boncukların yaklaşık 16 gün boyunca, K_2 boncukların 21 gün boyunca aktivitelerinin %

50'sini koruduğu görüldü. Hung ve ark. kitosana immobilize ettikleri *Candida rugosa* lipaz ve serbest enzimin 25 °C'de 7 gün boyunca bekletilip aktiviteleri karşılaştırıldığında immobilize enzimin bağıl aktivitesinin (% 67) serbest enzimin bağıl aktivitesinden (% 35) yüksek olduğunu bulmuşlar ve immobilizasyon işleminin *Candida rugosa* lipazına depo kararlılığı kazandırdığını belirtmişlerdir [81]. Chiou ve Wu hidroksil grupları aktive edilmiş kitosana immobilize ettikleri *Candida rugosa* lipazının depo kararlılığı çalışmasında serbest enzimin 5 gün sonrasında aktivitesinin önemli ölçüde azaldığını (yaklaşık % 65) buna karşı immobilize enzimin 30 gün sonrasında bile aktivitesini % 90'ın üzerinde koruduğunu belirlemişlerdir [58].

Bu tez kapsamında, serbest ve kitosan boncuklara immobilize defne lipazının belirlenen bazı biyokimyasal özellikleri Tablo 4.6'da özetlenmiştir. Sonuç olarak Tablo 4.6'da görüldüğü gibi kitosana iki farklı yöntemle immobilize edilen çimlendirilmiş defne tohumu lipazının her iki immobilizasyon yöntemiyle birlikte spesifik aktiviteleri yükselmiş, termal kararlılığı ve depolama kararlılığını yüksek oranda gelişmiştir. Çapraz bağlama ile elde edilen K_2 boncukların termal kararlılığı, tekrar kullanılabilirliği ve depo kararlılığı tutuklama yöntemiyle elde edilen K_1 boncuklardan daha iyi olduğu görülmüştür. Enzimin çalışma pH'ı ve çalışma sıcaklığında immobilizasyonla belirgin bir değişiklik gözlenmezken, immobilize enzim preparatlarının tekrar kullanılabilirliğinin çok yüksek olmadığı görülmüştür.

KAYNAKLAR

[1] Engin M. Gözükara, ***Biyokimya***, (Ofset Repromat Ltd. Şti., Ankara, 1989)

[2] Azmi Telefoncu, ***Enzimoloji***, Aydın: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, (1997)

[3] B. Öztürk, ***Lipaz Enzimi: Yapısal Özellikleri ve Uygulama Alanları***, Gıda Mühendisliği Dergisi, 12, 20-23, (2002)

[4] X. J. Huang, D. Ge ve Z.-K. Xu, ***Preparation and Characterization of Stable Chitosan Nanofibrous Membrane for Lipase Immobilization***, Auropean Polymer Journel, 43, 1, 3710-3718, (2007)

[5] M. Y. Chang ve R.-S. Juang, ***Use of Chitosan-Clay Composite as Immobilization Support for Improved Activity and Stability of β-glucosidase***, Biochemical Engineering Journal, 35, 93-98, (2007)

[6] M. Barros, L. F. Fleuri ve G. A. Macedo, ***Seed Lipases: Sources, Aplications and Properties - A Review***, Brazilian Journal of Chemical Engineering, 27, 1, 15-29, (2010)

[7] F. Hasan, A. A. Shah ve A. Hameed, ***Industrial Applications of Microbial Lipases***, Enzyme and Microbial Technology, 39, 2, 235-251, (2006)

[8] A. Ray, ***Application of Lipase in Industry***, Asian Journal of Pharmacy and Technology, 2, 2, 33-37, (2012)

[9] M. Fromer ve M. Merolla, ***Pancreatic Triacylglycerol Lipase***, http://maptest.rutgers.edu/drupal/?q=node/50, (14 Aralık 2012 tarihinde erişilmiştir)

[10] R. Sæmundsdóttir, ***Chemoenzymatic Synthesis of Enantiopure Structured Triacylglycerols and Palm Olein Alcoholysis by Lipase***, Science Institute, University of Iceland, Reykjavik, Iceland, (2010)

[11] A. Houde, A. Kademi ve D. Leblanc, ***Lipases and Their Industrial Applications: An Overview***, Applied Biochemistry and Biotechnology, 118, 1, 155-170, (2004)

[12] K. J. Patil, M. Z. Chopda ve R. T. Mahajan, ***Lipase Biodiversity***, Indian Journal of Science and Technology, 4, 971-982, (2011)

[13] M. K. Pierozan, R. J. Costa, O. A. Antunes, E. G. Oestreicher, J. V. Oliveira, R. L. Cansian ve D. D. Oliveira, ***Optimization of Extraction of Lipase from Wheat Seeds (Triticum aestivum) by Response Surface Methodology***, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 9716-9721, (2009)

[14] M. Fromer ve M. Merolla, ***Molecular Anatomy Project***, http://maptest.rutgers.edu/drupal/files/oldimages/images/stories/author/merolla/Lipase/whole_enzyme_2.jpg, (16 Aralık 2012 tarihinde erişilmiştir)

[15] M. Fromer ve M. Merolla, ***Molecular Anatomy Project***, http://maptest.rutgers.edu/drupal/files/oldimages/images/stories/author/merolla/Lipase/active_site_label_1.jpg, (16 Aralık 2012 tarihinde erişilmiştir)

[16] M. Fromer ve M. Merolla, ***Molecular Anatomy Project***, http://maptest.rutgers.edu/drupal/files/oldimages/images/stories/author/merolla/Lipase/open_shot_1.jpg, (16 Aralık 2012 tarihinde erişilmiştir)

[17] M. Fromer ve M. Merolla, ***Molecular Anatomy Project***, http://maptest.rutgers.edu/drupal/files/oldimages/images/stories/author/merolla/Lipase/closed_shot_1.jpg, (16 Aralık 2012 tarihinde erişilmiştir)

[18] B. P. Staff, B. Currell ve R. C. V. D. Mieras, ***Biotechnological Innovations in Chemical Synthesis***, Elsevier Science & Technology Books, 1997

[19] R. Gupta, N. Gupta ve P. Rathi, ***Bacterial Lipases: An Overview of Production, Purification and Biochemical Properties***, Applied Microbiology and Biotechnology, 64, 763-781, (2004)

[20] R. Sharma, Y. Chisti ve U. C. Banerjee, ***Production, Purification, Characterization,and Applications of Lipases***, Biotechnology Advances, 19, 627-662, (2001)

[21] M. Sarıbaş, ***Bazı Bitki Tohumlarında Çimlenmenin Aktivsyonu***, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 24, 579-584, (2000)

[22] C. A. Palla, C. Paheco ve M. E. Carrin, ***Peparation and Modification of Chitosan Particles for Rhizomucor m iehei Lipase Immobilization***, Biochemical Engineering Journal, 55, 199-207, 2011.

[23] L. Cao ve R. D. Schmid, ***Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design***, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, (2005)

[24] B. M. Brena ve F. Batista-Viera, ***Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells***, (Humana Press Inc., Totowa, 2006)

[25] D. T. Wadiack ve R. G. Carbonell, ***Kinetic Behavior of Microencapsulated Galactosidase***, Biotechnology and Bioengineering, 17, 1157-1181, (1975)

[26] J. M. Guisan, ***Immobilization of Enzymes and Cells Second Edition***, (Humana Press, New Jersey, USA, 2006)

[27] ***Wikipedia***, http://tr.wikipedia.org/wiki/Defnegiller, (14 Ekim 2012 tarihinde erişilmiştir)

[28] Ege Ormancılık Araştırma Müdürlüğü Yayınları, ***Defne (Laurus nobilis L.)***, (T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı Ege Ormancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir)

[29] İ. Şafak ve T. Okan, ***Kekik, Defne ve Çam Fıstığının Üretimi ve Pazarlaması,*** Journal of DOA (Doğu Akdeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi), 10, 101-129, (2004)

[30] İ. Acar, ***Defne (Laurus nobilis L.) Yapragı ve Yaprak Eterik Yağının Üretilmesi ve Değerlendirilmesi***, Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, 186, (1985)

[31] ***Enerjiport***, http://www.enerjiport.com/wp-content/uploads/2012/10/defne-1-1.jpg, (12 Aralık 2012 tarihinde erişilmiştir)

[32] Ü. Erden, ***Akdeniz Defnesi (Laurus nobilis L.)'nde Mevsimsel Varyabilite ve Optimal Kurutma Yöntemlerinin Araştırılması***, (Çukurova Üniversitesi, Adana, 2005)

[33] ***Kalitelihayat***, http://www.kalitelihayat.com/images/news/73190.jpg, (24 Kasım 2012 tarihinde erişilmiştir)

[34] A. Kılıç, ***Defne (Laurus nobilis L.) Uçucu Yağında Koku Kalitesini Belirleyen Bileşikler***, (Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2002)

[35] C. Pillai, W. Paul ve C. P. Sharma, ***Chitin and Chitosan Polymers: Chemistry, Solubility and Fiber Formation***, Progress in Polymer Science, 34, 641-678, (2009)

[36] N. V. Majeti ve R. Kumar, ***A review of chitin and chitosan applications***, Reactive & Functional Polymers, 46, 1, 1-27, (2000)

[37] F. Shahidi, J. K. V. Arachchi ve Y. J. Jeon, ***Food applications of chitin and chitosans***, Trends in Food Science & Technology, 10, 1, 37-51, (1999)

[38] P. K. Dutta, J. Dutta ve V. S. Tripathi, ***Chitin and Chitosan: Chemistry, Properties and Applications***, Journal of Scientific & Industrial Research, 63, 1, 20-31, (2004)

[39] J. Kumirska, M. X. Weinhold, J. Thöming ve P. Stepnowski, ***Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials-Influence of Physicochemical Properties Apart from MolecularWeight and Degree of N-Acetylation***, Polymers, 3, 1875-1901, (2011)

[40] M. L. Foresti, A. Errazu ve M. L. Ferreira, ***Effect of Several Reaction Parameters in the Solvent-Free Ethyl Oleate Synthesis Using Candida rugosa Lipase Immobilised on Polypropylene***, Biochemical Engineering Journal, 25, 69-77, (2005)

[41] K. Won, S. Kim, K. J. Kim, H. W. Park ve S. J. Moon, ***Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads***, Process Biochemistry, 40, 6, 2149-2154, (2005)

[42] S. S. Betigeri ve S. H. Neau, ***Immobilization of Lipase Using Hydrophilic Polymers in the Form of Hydrogel Beads***, Biomaterials, 23,17, 3627-3636, (2002)

[43] B. K. Vaidya, G. C. Ingavle, S. Ponrathnam, B. Kulkarni ve S. N. Nene, ***Immobilization of Candida Rugosa Lipase on Poly(allyl glycidyl ether-co-ethylene glycol dimethacrylate) Macroporous Polymer Particles***, Bioresource Technology, 99, 9, 3623–3629, (2008)

[44] E. Yılmaz, K. Can, M. Sezgin ve M. Yılmaz, ***Immobilization of Candida rugosa Lipase on Glass Beads for Enantioselective Hydrolysis of Racemic Naproxen Methyl Ester***, Bioresource Technology, 102, 2, 499-506, (2011)

[45] A. R. Toral, A. P. D. L. Ríos, F. J. Hernández, M. H. Janssen, R. Schoevaart, F. V. Rantwijk ve R. A. Sheldon, ***Cross-linked Candida antarctica Lipase B is Active in Denaturing Ionic Liquids***, Enzyme and Microbial Technology, 40, 5, 1095-1099, (2007)

[46] T. K. Öztürk ve A. Kılınç, ***Immobilization of Lipase in Organic Solvent in the Presence of Fatty Acid Additives***, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 67, 214-218, (2010)

[47] E. Podgórska, M. Kasprzak ve D. Szwajgier, ***Fumaric Acid Production by Rhizopus Nigricans and Rhizopus Oryzae Using Apple Juice***, Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 13, 47-50, (2004)

[48] H. R. Sadeghipour ve S. C. Bhatla, ***Light-enhanced Oil Body Mobilization in Sunflower Seedlings Accompanies Faster Protease Action on Oleosins***, Plant Physiology and Biochmesitry, 41, 4, 309-316, (2003)

[49] A. Sağıroğlu ve N. Arabacı, ***Purification and Characterization of Lipase from Sunflower Seed***, Preparative Biochemistry and Biotechnology, 35, 37-51, (2005)

[50] N. K. Sana, I. Hossin, E. M. Haque ve R. K. Shaha, ***Identification, Purification and Characterization of Lipase from Germinating Oil Seeds (Brassica napus L.)***, Pakistan Journal of Biological Sciences, 7, 2, 246, (2004)

[51] Y. H. Lin, C. Yu ve A. H. Huang, ***Substrate specificities of Lipases from Corn and Other Seeds***, Archives of Biochemistry and Biophysics, 244, 346-356, (1986)

[52] B. O. Ejedegba, E. C. Onyeneke ve P. O. Oviasogie, ***Characteristics of Lipase Isolated from Coconut (Cocos nucifera linn) Seed Under Different Nutrient Treatments***, African Journal of Biotechnology, 6, 723-727, (2007)

[53] P. Wanasundara, U. Wanasundara ve F. Shahidi, ***Lipolytic Activity of Enzymes from Germinating Seeds of Sesame (Sesamum indicum L.)***, Journal of Food Lipids, 8, 2, 75-84, (2001)

[54] E. Kubicka, J. Grabska, L. Jedrychowski ve B. Czyz, ***Changes of Specific Activity of Lipase and Lipoxygenase During Germination of Wheat and Barley***, International Journal of Food Science and Nutrition, 51, 4, 301-304, (2000)

[55] I. A. Alsarra, S. H. Neau ve M. A. Howard, ***Effects of Preparative Parameters on the Proporties of Chitosan Hydrogel Beads Containing Candida rugosa Lipase***, Biomaterials, 25, 2645-2655, (2004)

[56] G. D. Altun ve S. A. Cetinus, ***Immobilization of Pepsin on Chitosan Beads***, Food Chemistry, 100, 964-971, (2007)

[57] M. L. Foresti ve M. L. Ferreira, ***Chitosan-Immobilized Lipases for the Catalysis of Fatty Acid Esterifications***, Enzyme and Microbial Technology, 40, 769-777, (2007)

[58] S. H. Chiou ve W. T. Wu, ***Immobilization of Candida Rugosa Lipase on Chitosan with Activation of the Hydroxyl Groups***, Biomaterials, 25, 197, (2004)

[59] M. Acar, ***Türkiye'deki Yayılışı İçersinde Akdeniz Defnesi (Laurus nobilis L)'nin Yaprak Kalitesi Üzerine Araştırmalar***, Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları - Teknik Bülten Serisi, 202, Ankara, (1988)

[60] Y. B. M. Nurbaş, ***Recovery of Fixed and Volatile Oils from Laurus Nobilis L.Fruit and Leaves by Solvent Extraction Method***, Engineering and Architecture Faculty, Eskişehir Osmangazi University, 18, 2, (2005)

[61] S. Parlak, ***Defne (Laurus nobilis L.)'nin Tohumla ve Çelikle Üretimi Esaslarının Belirlenmesi Üzerine Araştırmalar***, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, (2007)

[62] S. S. Isbilir, H. M. Ozcan ve H. Yagar, ***Some Biochemical Properties of Lipase from Bay Laurel (Laurus nobilis L.) Seeds***, Journal of the American Oil Chemists' Society, 85, 227-233, (2008)

[63] Ş. A. Çetinus ve H. N. Öztop, **Immobilization of Catalase into Chemically Crosslinked Chitosan Beads**, Enzyme and Microbial Technology, 32, 889-894, (2003)

[64] A. Freeman ve Y. Dror, **Immobilization of "Disguised" Yeast in Chemically Crosslinked Chitosan Beads**, Biotechnology and Bioengineering, 44, 9, 1083-1088, (1994)

[65] R. H. Sammour, ***Purification and Partial Characterisation of an Acid Lipase in Germinating Lipibody Linseedling***, Turkish Journal of Botany, 29, 177-184, (2005)

[66] S. A. Hellyer, I. C. Chandler ve J. A. Bosley, ***Can the Fatty Acid Selectivity of Plant Lipases be Predicted from the Composition of the Seed Triglyceride***, Biochimia et Biophysica Acta, 1440, 215-224, (1999)

[67] H. R. M. Jakob H. Waterborg, ***The Lowry Method for Protein Quantitation***, (The Protein Protocols Handbook, Humana Press, 1996)

[68] E. Dinçkaya, ***Genel Metotlar, Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu***, (Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Çeşme-İzmir, 1996)

[69] O. Lowry, N. Rosenbrough, A. Farr ve R. Randall, ***Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent,*** Journal of Biological Chemistry, 193, 265-275, (1951)

[70] A. Hoppe ve R. R. Theimer, ***Titrimetric test for Lipase Activity Using Stabilized Triolein Emulsions***, Phytochemistry, 42, 973-978, (1996)

[71] R. D. Abigor, P. O. Uadia, T. A. Foglia, M. J. Haas, K. Scott ve B. J. Savary, ***Partial Purification and Properties of Lipase from Germinating Seeds of Jatropha curcas L.***, Journal of the American Oil Chemists' Society, 79, 1123-1126, (2002)

[72] R. Staubmann, I. Ncube, G. Gübitz, W. Steiner ve J. Read, ***Esterase and Lipase Activity in Jatropha curcas L. Seeds***, Journal of Biotechnology, 75, 117-126, (1999)

[73] L. C. Sanz ve J. M. Olias, ***Characterization of Lupin Seed Lipase***, Food Chemistry, 37, 3, 221-228, (1990)

[74] B. Borgston ve H. L. Brockman, ***Lipases***, (Amsterdam, 2004)

[75] P. D. Desai, A. M. Dave ve S. Devi, ***Entrapment of Lipase into K-carrageenan Beads and Its Use in Hydrolysis of Olive Oil in Biphasic System***, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 31, 143-150, (2004)

[76] M. T. Reetz, A. Zonta, V. Vijayakrishnan ve K. Schimossek, ***Entrapment of Lipases in Hydrophobic Magnetite-Containing Sol-Gel Materials: Magnetic Separation of Heterogeneous Biocatalysts***, Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 134, 251-258, (1998)

[77] D. Pirozzi, E. Fanelli, A. Aronne, P. Pernice ve A. Mingione, ***Lipase Entrapment in a Zirconia Matrix: Sol–Gel Synthesis and Catalytic Properties***, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 59, 116-120, (2009)

[78] M. H. Kim, S. An, K. Won, H. J. Kim ve S. H. Lee, ***Entrapment of Enzymes into Cellulose–Biopolymer Composite Hydrogel Beads Using Biocompatible İonic Liquid***, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 75, 68-72, (2012)

[79] C. J. Gray, J. S. Narang ve S. A. Barker, ***Immobilization of Lipase from Candida cylindraceae and Its Use in the Synthesis of Menthol Esters by Transesterification***, Enzyme and Microbial Technology, 12, 10, 800-807, (1990)

[80] P. Kensingh, W. Chulalaksananukul ve S. Charuchinda***, Lipase Immobilization on Scirpus Grossus L.F. Fiber Support by Glutaraldehyde-Crosslinked Technique for Biodiesel Synthesis***, Journal of Biotechnology, 150, 163, (2010)

[81] T. C. Hung, R. Giridhar, S. H. Chiou ve W. T. Wu, ***Binary Immobilization of Candida rugosa Lipase on Chitosan***, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 26, 69-78, (2003)

[82] R. Amorim, E. Melo, M. Carneiro-da-Cunha, W. Ledingham ve G. Campos-Takaki, ***Chitosan from Syncephalastrum Racemosum Used as a Film Support for Lipase Immobilization***, Bioresource Technology, 89, 35-39, (2003)

[83] W. Ting, K. Tung, R. Giridhar ve W. Wu, ***Application of Binary Immobilized Candida rugosa Lipase for Hydrolysis of Soybean Oil***, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 42, 32-38, (2006)

[84] E. B. Pereira, H. F. D. Castro, F. F. D. Moraes ve G. M. Zanin, ***Kinetic Studies of Lipase from Candida rugosa***, Applied Biochemistry and Biotechnology, 91, (2001)

[85] V. N. Enujiugha, F. A. Thani, T. M. Sanni ve R. D. Abigor, ***Lipase Activity in Dormant Seeds of the African Oil Bean (Pentaclethra macrophylla Benth)***, Food Chemistry, 88, 405-410, (2004)

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Edirne'de doğdum. Ortaöğretimi Edirne Yıldırım Beyazıt Anadolu Lisesinde tamamladım. 2009 yılında T. Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldum. 2010 yılında T. Ü. Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde Yüksek Lisans eğitimime başladım.