

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RHIZOMUCOR MIEHEI LİPAZININ ÇEŞİTLİ TAŞIYICILARA
İMMOBİLİZE EDİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Ece ÖZDEMİR BABAVATAN

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Danışman

Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL

Eş Danışman

Doç. Dr. Barış BİNAY

Ağustos, 2020

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RHIZOMUCOR MİEHEİ LİPAZININ ÇEŞİTLİ TAŞIYICILARA
İMMOBİLİZE EDİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Ece ÖZDEMİR BABAVATAN tarafından hazırlanan tez çalışması 10.08.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Doç. Dr. Barış BİNAY
Gebze Teknik Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Özlem ÖZSOY SAÇAN, Üye
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Doç. Dr. Mesut KARAHAN, Üye
Üsküdar Üniversitesi

Doç. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL sorumluluğunda tarafımda hazırlanan *Rhizomucor miehei* Lipazının Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilize Edilmesi ve Karakterizasyonu başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Ece ÖZDEMİR BABAVATAN

İmza

Canım aileme

ve

Sevgili eşime

TEŞEKKÜR

Yükseköğrenimim boyunca bilgi ve yardımlarını benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL'e, doktora öğrenimim boyunca bana akademik destek sağlayan eş danışmanım Sayın Doç. Dr. Barış BİNAY'a, doktora çalışmalarını yürütürken bilimsel ve akademik bilgilerinden fazlaca yararlandığım hocam Sayın Doç. Dr. Deniz YILDIRIM'a, sabır ve itina ile manevi desteklerini benden esirgemeyen babam Fuat ÖZDEMİR, annem Canan ÖZDEMİR, ablam Elif ÖZDEMİR, eşim Recep BABAVATAN'a ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ece ÖZDEMİR BABAVATAN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.1.1 <i>Rhizomucor miehei</i> Lipazı ile İlgili Yakın Zamanda Yapılmış İmmobilizasyon Çalışmaları.....	3
1.2 Tezin Amacı.....	8
1.3 Hipotez.....	9
2 ENZİMLER	10
2.1 Enzimlerin Genel Özellikleri.....	10
2.2 Enzimlerin Sınıflandırılması.....	12
2.3 Enzimatik Kataliz.....	14
2.4 Enzimlerin Düzenlenmesi.....	21
2.5 Enzim İmmobilizasyonu.....	22
2.5.1 Enzim İmmobilizasyonunda Yöntem Seçimi.....	25
2.5.1.1 Taşıyıcıya Bağlama.....	26
2.5.1.2 Tututklama.....	30
2.5.1.3 Çapraz Bağlama.....	34
2.5.2 Enzim İmmobilizasyonunda Taşıyıcı Seçimi.....	36

2.5.2.1 Organik Taşıyıcılar.....	38
2.5.2.2 İnorganik Taşıyıcılar.....	41
3 LİPAZLAR	45
3.1 Lipazların Genel Özellikleri.....	45
3.1.1 Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar.....	46
3.1.2 Lipazların Sınıflandırılması.....	48
3.1.3 Lipazların Endüstriyel Kullanım Alanları.....	50
3.1.4 Lipazların Yapısal Özellikleri ve Katalitik Etki Mekanizmaları.....	52
3.1.5 <i>Rhizomucor miehei</i> Lipazı.....	54
3.2 Lipaz İmmobilizasyonu.....	56
4 MATERYAL VE METOD	60
4.1 Materyal.....	60
4.1.1 Kullanılan Cihazlar.....	60
4.1.2 Kullanılan Kimyasallar.....	60
4.1.3 Kullanılan Malzemeler.....	62
4.2 Metod.....	62
4.2.1 RML'nin Montmorillonit K-10'a İmmobilizasyonu.....	62
4.2.2 RML'nin Polivinil Alkol Jel İçinde İmmobilizasyonu.....	63
4.2.3 Protein İçeriği Tayini.....	63
4.2.4 İmmobilizasyon Verimi Tayini.....	64
4.2.5 Serbest ve İmmobilize RML Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi.....	66
4.2.6 Serbest ve İmmobilize RML Üzerine Tampon Çözelti Konsantrasyonunun Etkisi.....	66
4.2.7 Serbest ve İmmobilize RML'nin Depolama Kararlılığı.....	66
4.2.8 Serbest ve İmmobilize RMLnin Termal Kararlılığı.....	67

4.2.9 İmmobilize RML'nin Tekrar Kullanılabilirliği.....	67
4.2.10 Serbest ve İmmobilize RML'nin Aktivitesi Üzerine Katyonların ve Deterjanların Etkisi.....	67
4.2.11 Serbest ve İmmobilize RML'nin Aktivasyon Enerjileri.....	68
4.2.12 Serbest ve İmmobilize RML'nin Kinetik Parametreleri.....	68
4.2.13 İmmobilize RML'lerin Taramalı Elektron Mikroskopisi (Scanning Electron Microscopy-SEM).....	69
5 SONUÇ VE ÖNERİLER	70
5.1 Sonuçlar.....	70
5.1.1 Protein Standart Eğrisi.....	70
5.1.2 İmmobilizasyon Verimleri.....	70
5.1.3 Lipaz Aktivite Tayini.....	71
5.1.4 Serbest ve İmmobilize RML Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi.....	72
5.1.5 Serbest ve İmmobilize RML Üzerine Tampon Çözelti Konsantrasyonunun Etkisi.....	74
5.1.6 Serbest ve İmmobilize RML'nin Depolama Kararlılığı.....	75
5.1.7 Serbest ve İmmobilize RML'nin Termal Kararlılığı.....	76
5.1.8 İmmobilize RML'nin Tekrar Kullanılabilirliği.....	80
5.1.9 Serbest ve İmmobilize RML'nin Aktivitesi Üzerine Katyonların ve Deterjanların Etkisi.....	81
5.1.10 Serbest ve İmmobilize RML'nin Aktivasyon Enerjileri.....	88
5.1.11 Serbest ve İmmobilize RML'nin Kinetik Parametreleri.....	89
5.1.12 İmmobilize RML'lerin Taramalı Elektron Mikroskopisi.....	91
KAYNAKÇA	99
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	109

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
$\text{\AA}$	Ångström
$\text{\AA}^2$	Ångström kare
β	Beta
g	Gram
μ	Mikro
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μmol	Mikromol
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
®	Tescilli
%	Yüzde
$\pm$	Artı-eksi

KISALTMA LİSTESİ

A	Absorbans
AOT	Aerosol sodium-bis-2-(etilheksil) sülfosüksinat
APTES	3-aminopropil trietoksisilan
a_w	Su aktivitesi
BSA	Sığır serum albümini
CALA	<i>Candida antarctica</i> lipaz A
CALB	<i>Candida antarctica</i> lipaz B
CHI	Kitosan
CLEA	Çapraz bağlı enzim agregatları
CLEC	Çapraz bağlı enzim kristalleri
CMC	Karboksimetil selüloz
CN-Br	Siyanojen bromür
CS/CNWs	Kitin-kitosan nano kristal flamanlar
CTAB	Hekzadesiltrimetilamonyum bromür
DEAE	Dietilaminoetil
DTT	Ditiyotritol
Epoxy-IDA	İminodiasetik asit ile aktifleştirilmiş epoksi
Gx	Gliksil
Gx-DTT	Gliksil ditiyotritol
E_a	Aktivasyon enerjisi
E.C.	Enzim Komisyonu
EDS	Enerji Dağıtıcı Spektroskopisi
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESTHER	Proteinlerin alfa/beta-hidrolaz katlanma süper ailesinin veritabanı
HMC	Hidroksipropil metilselüloz
IU	Enzim ünitesi
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
IUPAC	Uluslararası Biyokimya Birliği Adlandırma Komitesi
K_m	Michaelis Konstantı
LEU	Fosfolipaz Lesitaz Ultra

MMT	Montmorillonit
NP	Nano gözenek
NP	Nitrofenol
NPP	Nitrofenil palmitat
OCGLX	Oktil-glioksil agaroz
OCGLXR	İndirgenmiş oktil-glioksil agaroz
PCMC	Protein kaplı mikro kristaller
PEI	Polietilen imin
PLGA	Poli (laktik asit-ko-glikolik asit)
PVA	Polivinil alkol
<i>p</i> -NPB	<i>para</i> -Nitrofenil bütirat
<i>p</i> -NPP	<i>para</i> -Nitrofenil palmitat
RM	<i>Rhizomucor miehei</i>
RML	<i>Rhizomucor miehei</i> lipaz
SBA-15	Silika nanoporöz materyal
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliekrilamid jel elektroforezi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SF	Stabilizasyon faktörleri
TLL	<i>Themomyces lanuginosus</i> lipaz
Triton X-100	<i>p</i> -(1,1,3,3-tetrametilbütıl)fenil-polietilenglikol
Tween 80	Polioksietilensorbat monooleat
$t_{1/2}$	Yarılma ömrü
U	Ünite
U/g	Ünite/gram
V	Hız
V_{max}	Maksimum hız
XRD	X-Işını difraktometresi
ZIF	Zeolit-imidazol iskeleti

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Enzim-substrat reaksiyonu.....	19
Şekil 2.2 Lineweaver-Burk grafiği.....	20
Şekil 2.3 Başlıca immobilizasyon metodları.....	26
Şekil 2.4 Taşıyıcıya bağlama yöntemleri	27
Şekil 2.5 Kovalent bağlama yöntemi ile taşıyıcıya enzim immobilizasyonu	27
Şekil 2.6 Kovalent bağlamada kullanılan fonksiyonel gruplar	28
Şekil 2.7 Adsorpsiyon yöntemiyle enzim immobilizasyonu	29
Şekil 2.8 Polimerik destek içinde enzimin tutuklanması	31
Şekil 2.9 Enkapsülasyon tekniği ile enzim immobilizasyonu	33
Şekil 2.10 Lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu	33
Şekil 2.11 Lipozomun yapısı.....	34
Şekil 2.12 Çapraz bağlı enzimin şematik gösterimi.....	35
Şekil 2.13 Enzim immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan taşıyıcılar	38
Şekil 2.14 Kısmi hidrolizli (A) ve tamamen hidrolizli (B) PVA	41
Şekil 2.15 MMT'nin yapısının şematik gösterimi	44
Şekil 2.16 MMT'nin mikro yapısının şematik gösterimi.....	44
Şekil 3.1 Lipaz enziminin ester bağı hidrolizi reaksiyonu	46
Şekil 3.2 Lipazların katalizlediği reaksiyonlar	47
Şekil 3.3 Lipaz katalizli transesterifikasyon (a) ve esterifikasyon (b)	47
Şekil 3.4 Biyodizel üretiminin temel özeti	48
Şekil 3.5 Transesterifikasyon reaksiyonunun sitokiyometrisi.....	48
Şekil 3.6 Endüstride kullanılan lipazların biyoçeşitliliği	50
Şekil 3.7 Lipazların α -sarmal ve β -yaprak yapılarının şematik gösterimi.....	53
Şekil 3.8 α/β hidrolazların standart katlanması.....	53
Şekil 3.9 Lipazlar tarafından katalizlenen ester bağlarının hidroliz mekanizması	54
Şekil 3.10 <i>Rhizomucor miehei</i> lipazının X-ışını difraksiyonu.....	55
Şekil 3.11 Transesterifikasyon ile kakao yağı analoglarının üretimi	56
Şekil 3.12 Hidrofobik yüzeye lipaz immobilizasyonu	57
Şekil 3.13 İki lipaz molekülünün arayüzey aktivasyonu	57

Şekil 3.14	Lipazın hidrofobik desteğe adsorpsiyonu ile hiperaktivasyonu	58
Şekil 5.1	Protein standart eğrisi.....	70
Şekil 5.2	Serbest ve immobilize RML üzerine pH'ın etkisi.....	73
Şekil 5.3	Serbest ve immobilize RML üzerine sıcaklığın etkisi	74
Şekil 5.4	Serbest ve immobilize RML üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi	75
Şekil 5.5	Serbest ve immobilize RML'nin depolama kararlılığı	76
Şekil 5.6	Serbest RML'nin termal kararlılığı.....	77
Şekil 5.7	MMT-RML'nin termal kararlılığı.....	78
Şekil 5.8	PVA-RML'nin termal kararlılığı.....	79
Şekil 5.9	İmmobilize RML'nin tekrar kullanılabilirliği	80
Şekil 5.10	Serbest RML'nin aktivitesi üzerine katyonların etkisi	83
Şekil 5.11	MMT-RML'nin aktivitesi üzerine katyonların etkisi	84
Şekil 5.12	PVA-RML'nin aktivitesi üzerine katyonların etkisi	85
Şekil 5.13	Serbest RML'nin aktivitesi üzerine deterjan etken maddelerinin etkisi86	
Şekil 5.14	MMT-RML'nin aktivitesi üzerine deterjan etken maddelerinin etkisi...	87
Şekil 5.15	PVA-RML'nin aktivitesi üzerine deterjan etken maddelerinin etkisi.....	88
Şekil 5.16	MMT (a-c) ve MMT-RML'nin (d-f) SEM görüntüleri.....	91
Şekil 5.17	MMT'nin EDS analiz sonuçları	92
Şekil 5.18	MMT-RML'nin EDS analiz sonuçları	93

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Temel immobilizasyon yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları.....	36
Tablo 3.1 Lipazların endüstriyel kullanım alanları	51
Tablo 4.1 Tezde kullanılan cihazlar	60
Tablo 4.2 Tezde kullanılan kimyasallar	61
Tablo 5.1 İmmobilizasyon verimleri	71
Tablo 5.2 Serbest ve immobilize enzimlerin aktivasyon enerjileri.....	89
Tablo 5.3 Serbest ve immobilize enzimlerin kinetik parametreleri	90

***Rhizomucor miehei* Lipazının Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilize Edilmesi ve Karakterizasyonu**

Ece ÖZDEMİR BABAVATAN

Kimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL

Eş-Danışman: Doç. Dr. Barış BİNAY

Bu tez kapsamında, reaksiyon çeşitliliği nedeniyle endüstriyel uygulamalarda sıklıkla kullanılmakta olan fakat doğası gereği çözünür formda kullanımında kısıtlanmalar meydana gelen *Rhizomucor miehei* lipazının çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı olarak doğal bir kil olan montmorillonit K-10 ve polivinil alkolden oluşan jel tercih edilmiştir. Sonuçlar lipaz enziminin hidrolitik aktivitesini ölçümleyerek üç denemenin ortalaması olarak verilmiştir. Serbest enzim, montmorillonit K-10'a adsorbe edilmiş enzim (MMT-RML) ve polivinil alkol jelde enkapsüle edilmiş olan enzim (PVA-RML) için K_m değerleri sırasıyla 3,9, 0,22 ve 4,0 mM olarak bulunmuştur. V_{max} değerleri ise sırasıyla 0,35, 0,47 ve 0,4 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular immobilizasyon sonrası enzimin kinetik özelliklerinin geliştiğini göstermektedir. İmmobilizasyon sonrası termal olarak daha kararlı hale gelen enzim tekrar kullanılabilirlik özelliğini kazanmıştır. Serbest enzim için optimum pH değeri 7,5

iken immobilize enzimler için bu değer 7,0 olarak bulunmuştur. Buna göre serbest enzime göre, immobilize enzimler daha asidik ve nötr koşullarda çalışmaya daha elverişlidir. Ayrıca serbest enzimin optimum pH değerinden daha alkali değerlerde, immobilize enzimler daha yüksek aktivite göstermektedir. MMT-RML, serbest enzime göre daha geniş sıcaklık aralığında aktivitesini kaybetmeden çalışabilir ve tampon çözelti konsantrasyonu değişikliklerinden daha az etkilenir hale gelmiştir. Ayrıca aktivasyon enerjileri değerlendirildiğinde adsorpsiyon sonrası substratın enzimin aktif bölgesine daha kolay ulaştığı görülmüştür. PVA-RML'nin optimum sıcaklık değerinin serbest enzime göre 10 °C daha yüksek olması ısı işlem gerektiren uygulamalarda bu tekniğin kullanılabilirliğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Rhizomucor miehei* lipaz, immobilizasyon, montmorillonit K-10, polivinil alkol.

Immobilization and Characterization of *Rhizomucor miehei* Lipase to Various Carriers

Ece ÖZDEMİR BABAVATAN

Department of Chemistry

Doctor of Philosophy Thesis

Advisor: Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL

Co-advisor: Assoc. Prof. Dr. Barış BİNAY

Within the scope of this thesis, *Rhizomucor miehei* lipase, which is frequently used in industrial applications due to the variety of reactions, but whose nature has restrictions in soluble form, has been immobilized to various carriers. As the carrier, a natural clay consisting of montmorillonite K-10, and a gel of polyvinyl alcohol, was preferred. The results are given as the average of three trials by measuring the hydrolytic activity of the lipase enzyme. K_m values for free enzyme, enzyme (MMT-RML) adsorbed to montmorillonite K-10 and encapsulated enzyme (PVA-RML) in polyvinyl alcohol gel were found to be 3.9, 0.22 and 4.0 mM, respectively. V_{max} values were calculated as 0.35, 0.47 and 0.4 U/mg protein, respectively. The results show that the kinetic properties of the enzyme develop after immobilization. The enzyme, which became thermally more stable after immobilization, gained reusability. While the optimum pH value for free enzyme is 7.5, this value was found to be 7.0 for immobilized enzymes. Accordingly, immobilized enzymes are more suitable to work under acidic conditions than free enzyme. In addition, immobilized enzymes show

higher activity at alkaline values than the optimum pH value of the free enzyme. MMT-RML can operate without losing its activity in a wider temperature range than the free enzyme and has become less affected by changes in buffer solution concentration. In addition, when activation energies were evaluated, it was seen that the substrate reaches the active site of the enzyme more easily after adsorption. The optimum temperature value of PVA-RML is 10 °C higher than the free enzyme, shows the usability of this technique in applications requiring heat treatment.

Keywords: *Rhizomucor miehei* lipase, immobilization, montmorillonite K-10, polyvinyl alcohol.

1.1 Literatür Özeti

Lipazlar (E.C. 3.1.1.3) global enzim piyasasında önemli bir grup olan ester bağlarını hidrolizleyen ve sentezleyen biyokatalizörlerdir (Kotogán, ve diğerleri, 2018). İnteresterifikasyon, alkoliz, aminoliz ve asidoliz lipazların diğer reaksiyonlarıdır (Öztürk, Pollet, Phalip, Güvenilir, & Avérous, 2016; Rajasekar, Tambe, & Datla, 2013). Lipazlar, kataliz ettikleri reaksiyonların zenginliği, karışmayan organik ve sulu fazları içeren reaksiyonları kataliz edebilme ve katalitik etkinliklerini organik çözücüler içinde muhafaza edebilme özellikleri nedeniyle; özellikle gıda sanayisinin süt, çikolata, yağ endüstrilerinde aroma geliştirici olarak kullanılır (Ulker, Gokalp, & Guvenilir, 2016). Lipazlar ayrıca ekonomik olarak enerji tasarrufu sağladığı için bölgesel ve enantiyoselektif sentez ve biyodizel üretimi alanlarında hidroliz reaksiyonlarını ortam sıcaklığında kataliz edebilmeleri yetenekleri nedeniyle pek çok endüstriyel uygulamada kullanılmaktadır (Gholamzadeh, Mohammadi Ziarani, & Badiei, 2017). Endüstriyel öneme sahip bu enzimler ayrıca, deterjan, eczacılık alanlarında; kozmetik, deri ve kağıt endüstrilerinde geniş bir uygulama alanına sahiptir (de Albuquerque, ve diğerleri, 2016; Salis, Sanjust, Solinas, & Monduzzi, 2005).

Enzimin geri kazanımı ve tekrar kullanılabilirliği, yüksek ekonomik etkiye sahip teknolojilerde yer alan enzimatik süreçler için immobilizasyon ile sağlanabilir (Sarmah, ve diğerleri, 2018). Biyokatalizde en çok kullanılan enzimler arasında olan lipazlar bazı durumlarda, endüstriyel biyokatalizör olarak kullanılmadan önce, hareketsizleştirme, stabilizasyon ve saflaştırma işlemlerine tabi tutulurlar (Fernandez-Lopez, ve diğerleri, 2016). Enzimin geri kazanımı ve tekrar kullanılabilirliği, yüksek ekonomik etkiye sahip teknolojilerde yer alan enzimatik süreçler için immobilizasyon ile sağlanabilir (Salis, Sanjust, Solinas, & Monduzzi,

2005). Biyoteknolojik uygulamalarda sıklıkla kullanılan bu enzimlerin immobilizasyonu hem maliyetinin azaltılması hem de sürekli süreçlerde kullanılabilirlikleri geliştirilmiştir (de Albuquerque, ve diğerleri, 2016; Salis, Sanjust, Solinas, & Monduzzi, 2005). Lipazların sulu ve sulu olmayan çözücülerde ekonomik ve verimli bir şekilde kullanılması için aktiviteleri, seçicilikleri ve kararlılıkları immobilizasyonla değiştirilebilir (Ulker, Gokalp, & Guvenilir, 2016).

Hala yeterince yaygın kullanımı olmamasına rağmen ve yüksek maliyet gibi nedenlerle eksikleri de olsa yeni immobilizasyon teknolojileri, yeni taşıyıcı ve metodlarla geliştirilmektedir (Ke, Fan, Su, & Xu, 2018). Lipazlar çok çeşitli desteklerde farklı immobilizasyon teknikleri ile başarılı şekillerde immobilize edilmiştir (Yücel, Demir, Dizge, & Keskinler, 2014). Ekstrem üretim koşulları altında lipazın erken inaktivasyonu sorunu tuzaklama, adsorpsiyon, kovalent veya çapraz bağlama gibi immobilizasyon teknolojilerindeki çeşitli ilerlemeler ile çözülebilir. Bu, enzimlerin kolay geri kazanılmasını ve yeniden kullanılmasını sağlar (Abdul Manan, Attan, Widodo, Aboul-Enein, & Wahab, 2018). En yaygın enzim immobilizasyon tekniklerinden biri olan adsorpsiyon ile immobilizasyon yönteminde, enzim genellikle inorganik katı bir taşıyıcıya fiziksel olarak adsorbe edilir (Öztürk, Pollet, Phalip, Güvenilir, & Avérous, 2016; Ulker, Gokalp, & Guvenilir, 2016). Literatürde, adsorban taşıyıcı olarak montmorillonit, bentonit, amberlit gibi doğal kil materyallerinin kullanıldığı görülmüştür (Öztürk, Pollet, Phalip, Güvenilir, & Avérous, 2016; Sanjay & Sugunan, 2008; Karakuş, Özler, & Pekyardimci, 2008; Önal & Telefoncu, 2003). Enzim immobilizasyonunda kullanılan bu doğal adsorbanların avantajlarından bazıları; yüksek mekanik dayanıklılık, yüksek özgüllük ve geniş yüzey alanı, şişme ve yüksek katyon değişim kapasitesidir (Sanjay & Sugunan, 2008; Ganguly, Dana, Mukhopadhyay, & Parya, 2011).

Enkapsülasyon, enzim immobilizasyonunda kullanılan avantajlı tekniklerden biridir. LentiKats® adı verilen polivinil alkol (PVA) lens teknolojisi, yaklaşık 20 yıl önce keşfedilen bir kapsülleme tekniğidir (Rebroš, ve diğerleri, 2013). Bu teknik, polivinil alkolün hidroksil grupları arasındaki hidrojen bağlarının jelasyonuna bağlı olarak yüksek elastik ve stabil hidrojeller üretmektedir (Gómez de Segura, ve diğerleri, 2003). Oda sıcaklığında oluşan PVA kapsüllerinin şekli, reaksiyon

ortamından kolay ayrışmanın yanı sıra çok düşük bir difüzyon sınırlaması, yüksek bir reaksiyon oranı ve biyomateryallerin matrikslere dağılımı gibi birçok avantaja sahiptir (Gómez de Segura, ve diğerleri, 2003; Hronská, Mastihuba, Tokořová, & Rosenberg, 2016).

1.1.1 *Rhizomucor miehei* Lipazı ile İlgili Yakın Zamanda Yapılmış İmmobilizasyon Çalışmaları

Zhang ve diğerleri (2017), RML'yi çapraz bağlı enzim agregatları haline getirerek manyetik nano parçacıklarla birleştirmiş ve yüzey aktif maddelerle arayüzey aktivasyonuna sokmuşlardır. Bu çalışmada çöktürme işlemi için amonyum sülfat, çapraz bağlama için ise %1,6 (v/v) glutaraldehit ile çalışılmıştır. Optimum enzim:nano parçacık oranı denenmiş ve 1:1 lipaz:(3-aminopropil)trioksilan-Fe₃O₄ (APTES-Fe₃O₄) olarak bulunmuştur. Maksimum aktivite 4 mM aerosol sodyum bis-2-(etilheksil)sülfosüksinat (AOT) ile elde edilmiştir. 2-fenil etanol ve vinil asetatın transesterifikasyonu reaksiyonuyla aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullar altında immobilize enzim serbest enzime göre yaklaşık 20 kat daha yüksek aktivite göstermiştir. Ayrıca immobilize RML'nin biyodizel üretimi için verimi %93 olup 5. döngüden sonra aktivitesinin %84'ünden fazlasını koruduğu görülmüştür.

Yağ asidi metil esterlerini sentezletmek üzere hidroksipropil metil selüloz (HMC) ve kitosandan (CHI) yapılmış selülozik kopolimerlerin biyoyumlu hibrid harmanlarının (HMC:CHI) denendiği bir çalışmada RML'nin tutuklama yöntemiyle immobilizasyonu (HMC:CHI:RML) 30°C'de gerçekleştirilmiştir. Enzimin hidrolitik aktivitesi 405 nm'de *para*-nitrofenil bütirat ile (*p*-NPB) ölçülmüştür. İmmobilizasyon verimi %87,71 olarak hesaplanmıştır. Serbest enzim için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 7,34±0,14 mM ve 65,79±0,42 µmol/mg/dakika olarak bulunmuştur. İmmobilize enzim için ise bu değerler sırasıyla 6,36±0,06 mM ve 80,65±0,30 µmol/mg/dakikadır. İmmobilizasyon sonrası katalitik etkinlik %141,45'e yükselirken yarılanma ömrü 1,44±0,04 günden 16,65±1,12 güne çıkmıştır (Badgujar, Badgujar, Yeole, & Bhanage, 2017).

Abdul Manan ve diğerleri (2018), RML'nin kitin-kitosan nano kristal flamanlarında (CS/CNWs) kovalent immobilizasyonunu gerçekleştirmiştir. Lipaz aktivitesi

eugenol(4-allil-2-metoksifenol) ve benzoik asidin esterifikasyon reaksiyonuna dayandırılmıştır. İmmobilizasyon sonrası RML'nin spesifik aktivitesindeki %137'lik artış, desteğe çok noktalı bağlandığından lipazın aktif konformasyonunu koruyabileceği ve erken denatürasyona direnebileceği yargısını desteklemiştir. Optimum reaksiyon koşulları 50 °C'de 3 mg/mL enzim ilavesiyle 5 saat olarak bulunmuştur. İmmobilize enzimin serbest RML'ye göre öjenil benzoat üretiminde 2 kat artış gösterdiği ve optimum reaksiyon koşullarında 8. döngüden sonra bile başlangıç aktivitesinin yaklaşık %50'sini koruyabildiği saptanmıştır. Enzimlere ait termal inaktivasyon çalışmaları 30-70 °C aralığında denenmiş ve 50 °C'de % dönüşüm oranları serbest RML ve RML-CS-CNWs için sırasıyla %20,1 ve %55,8 bulunmuştur. 70 °C'de serbest enzim inaktive olurken immobilize enzimin % dönüşüm oranı %42,6'ya inmiştir.

Adnan ve diğerleri (2018), X-şekilli zeolit imidazol iskeletlerini (ZIF-8) sentezlemek ve RML'yi immobilize etmek için (RML@ZIF-8) tek aşamalı bir enkapsülasyon tekniği çalışmıştır. İmmobilizasyon için optimum protein miktarı denenmiş ve bu amaçla taşıyıcıya 15-27 mg RML yüklemesi yapılmıştır. 25 mg RML ile yaklaşık %24 aktivite artışı tespit edilmiş ve artan protein miktarlarında substratın enzime ulaşılabilirliğinin ve immobilizasyon veriminin azaldığı tespit edilmiştir. Kapsülleme süresi optimizasyonunda ise 20 dakikayı aşan sürelerde aktivitede azalma görüldüğünden yaklaşık %25 aktivite artışı tespit edilen 20 dakika optimum kapsülleme süresi olarak belirlenmiştir. İmmobilizasyonun optimum sıcaklık koşulu olarak buldukları 30 °C'de RML@ZIF-8 için aktivite yaklaşık 26 kat artış göstermiştir. RML@ZIF-8'in soya fasulyesi yağından biyodizel üretimi verimi %96,5 olarak bulunmuştur. RML@ZIF-8'in biyodizel üretiminde tekrar kullanılabilirliği çalışılmış ve 10. döngüden sonra immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin %84,7'sine sahip olduğu görülmüştür.

Çeşitli fonksiyonel gruplara karşı oldukça reaktif olan amino grupları ile aktifleştirilmiş silika ve silika nanoporöz materyal (SBA-15) üzerine 25 °C ve pH 7'de RML'nin immobilizasyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada 1'er g silika-NH₂ ve SBA-NH₂ taşıyıcıları üzerine sırasıyla 150 ve 200 mg protein yüklenmiştir. İmmobilize enzimler için immobilizasyon verimleri %95-100 aralığında

bulunmuştur. 348 nm'de *p*-NPB'ın hidrolizi ile aktivite tayini yapılmış ve serbest enzim için optimum pH değeri 7 olarak bulunurken her iki immobilize enzim için pH 8 olarak tespit edilmiştir. Enzimlerin termal kararlılıkları çalışmasında enzimler 45, 50, 55, 60 ve 65 °C'lerde 2 saat inkübe edilmiştir. 45 °C'de her üç enzim için de herhangi bir aktivite kaybı gözlenmezken 65 °C'ye çıkıldığında serbest enzimin tamamen inaktive olduğu, SBA-RML'nin başlangıç aktivitesinin %62'sini ve silika-RML'nin ise %28'ini koruduğu gözlenmiştir. Rasemik ibuprofen ile esterifikasyonuna ait tekrar kullanılabilirlik çalışması dönüşüm derecesi açısından incelenmiş ve silika-RML'nin 4. kullanım sonrası %50, SBA-RML'nin ise 3. kullanım sonrası %7 aktivite sergilediği görülmüştür (Mohammadi, Habibi, Gandomkar, & Yousefi, 2018).

Yildirim ve diğerleri (2019), RML'nin altıgen olarak hazırlanmış nanoporöz alüminyum oksit membranlarına (RML-Al₂O₃-NP) adsorpsiyon yoluyla ve mikro boyutlu potasyum sülfat kristalleri üzerinde RML'nin eş zamanlı olarak çökeltilmesi yoluyla protein kaplı mikrokristaller (RML-PCMC'ler) üzerinde immobilizasyonunu gerçekleştirmiştir. RML aktiviteleri *p*-nitrofenil palmitatın (*p*-NPP) hidrolizi izlenerek gerçekleştirilmiş ve bazı aroma esterlerin sentezi açısından esterleşme aktiviteleri incelenmiştir. RML-Al₂O₃-NP ve RML-PCMC için immobilizasyon verimleri sırasıyla %33,8 ve %25,1 olarak bulunmuştur. Hidrolitik aktivite açısından incelenen katalitik aktiviteler ise serbest enzime göre sırasıyla 2,3 ve 3,9 kat olarak hesaplanmıştır. RML-Al₂O₃-NP ve RML-PCMC'ler, 10 tekrar kullanımdan sonra, başlangıçtaki hidrolitik aktivitelerinin sırasıyla %84 ve 86'sını korumuştur. Bu sonuçlar, nano gözenekli alüminyum oksit üzerine adsorpsiyon yoluyla ve protein kaplı mikrokristaller olarak RML'nin immobilizasyonunun oldukça kararlı, katalitik olarak daha aktif ve tekrar kullanılabilir lipaz preparatlarının alınmasına yol açtığını göstermektedir.

Arana-Peña ve diğerleri (2019), RML, *Candida antarctica* lipaz B (CALB) ve fosfolipaz Lesitaz Ultra (LEU) enzimlerinin sodyumborhidrit ile indirgenmiş oktilglioksil agaroz (OCGLXR) taneciklerine immobilizasyonunu gerçekleştirmiştir. Immobilizasyon sonrası aktiviteler incelendiğinde CALB'nin stabilitesinin en yüksek olduğu görülmüştür. Immobilize RML'nin (OC-RML) 50, 55 ve 60 °C'lerde termal

inaktivasyonu denemeleri sonucunda 90. dakikadan sonra her bir sıcaklık için sırasıyla başlangıç aktivitesinin yaklaşık %70, %40 ve %20'sini koruduğu görülmüştür. Aynı zamanda deterjan ile inaktivasyonu ölçümlemek adına OC-RML, %4'lük (v/v) *p*-(1,1,3,3-tetrametilbütıl)fenil-polietilenglikol (Triton X-100) ve %4'lük (v/v) hegzadesiltrimetilamonyum bromür (CTAB) ile 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. 30. dakika sonunda Triton X-100 ve CTAB ile muamele edilen RML için sırasıyla başlangıç aktivitelerinin yaklaşık % 50 ve %40'ını koruduğu görülmüştür. Çoklu immobilizasyonun (ko-immobilizasyon) stabilite üzerine etkisini denemek amacıyla aynı destek materyallerine RML ve CALB enzimlerinin bikombi-immobilizasyonu yapılmıştır. 60 °C'de 120 dakika boyunca inkübasyon sonunda OCGLX-CALB başlangıç aktivitesinin neredeyse tamamını korumaktadır. OCGLX-RML için bu değer %30 iken CALB-RML başlangıç aktivitesinin %75'ini korumuştur. Enzimlerin tekrar kullanılabilirliği çalışmalarında her bir preparat için 5 kez kullanım uygundur. Ancak daha fazla CALB'nin bulunduğu ilk döngüde daha yüksek aktivitenin bulunmasının sebebi non-kovalent olarak immobilize olan CALB'nin ilk yıkamada ortamdan uzaklaşmasıdır. CALB, RML ve LEU'nun üçlü ko-immobilizasyonunda 4. kez tekrar kullanımı gerçekleştirilmiştir. Bu immobilizasyon daha kararlı olan enzimin tekrar kullanılabilirliğine izin vermiştir.

Shahedi ve diğerleri (2019), CALB ve RML'yi epoksi ile fonksiyonelleştirilmiş silika jele birlikte immobilize etmişlerdir. 1 gram taşıyıcıya 4-15 mg aralığında 6 saat süresince protein yükleme yapılmış ve CALB:RML oranları 4:1, 2,5:1, 2:1 ve 1:1 olacak şekilde çalışılmıştır. Enzimlerin termal kararlılığı artan CALB ile doğru orantılı olarak ko-immobilizasyon sonrası artış gösterirken spesifik aktivitelerde azalma görülmüştür. CALB'nin RML'ye oranının arttırılmasıyla immobilize enzim miktarı azalmıştır. Immobilizasyonun doğal bir sonucu olarak belirtilen α -heliks yapısının bozulması sonucu CALB'nin tekli immobilizasyonunda spesifik aktivitesi 49,5 U/mg'dan 8,8 U/mg'a inmiştir. RML'nin ise tekli immobilizasyonu sonrası spesifik aktivite değeri 43,5 U/mg'dan 9,6 U/mg'a düşmüştür. CALB'nin RML'ye oranına göre ko-immobilizasyonda (4:1, 2:1, 2,5:1 ve 1:1) spesifik aktivite değerleri 6,1, 5,1, 4,9 ve 5,1 U/mg olarak hesaplanmıştır.

Yousefi ve diğerkleri (2020), ham özütten arayüzey adsorpsiyon teknolojisi ile saflaştırdıkları RML ve kimyasal aminasyona tabi tuttıkları RML'nin (NH₂-RML) immobilizasyonunu kovalent bağlama ile denemişlerdir. Çalışmada kullanılan taşıyıcılar glioksil sefaroze (Gx), glioksil sefaroze ditiotreitol (Gx-DTT), siyanojen bromür ile aktive edilmiş sefaroze (CNBr) ve iminodiasetik asit ile kısmi olarak modifiye edilmiş heterofonksiyonel epoksi (epoxy-IDA) olmak üzere dört tanedir. RML'nin iki farklı kimyasal çeşidi ve dört farklı immobilizasyon taşıyıcısı için yapılan çalışmalarda immobilizasyon verimleri %11 ila %88 arasında değişmektedir. Tüm immobilizasyonlar için spesifik aktivite değerkleri 0,5 ila 1,9 IU/mg aralığındadır. Gx-DTT-RML ve epoxy-IDA-RML örnekleri termal kararlılıklarının tespiti için 70 °C sıcaklığa maruz bırakıldıklarında başlangıç aktivitelerinin sırasıyla %49 ve %37'sini korumuştur. Örneklerin aktiviteleri 5. tekrar kullanımdan sonar başlangıç aktivitelerinin %50-91 aralığında bulunmuştur.

Arana-Peña ve diğerkleri (2020a), *Candida antarctica* lipaz A (CALA), CALB, RML, *Thermomyces lanuginosus* lipaz (TLL) ve LEU enzimlerini kullanarak katman immobilizasyonu gerçekleştirmiştir. İlk lipazın immobilizasyonu sonrası polietilen imin (PEI) ile kaplama gerçekleştirilmiştir. Enzimin kaçışını önlemek için enzim ile PEI arasında çapraz bağlama gerçekleştirilmiş ve yeni lipaz katmanı eklenmiştir. Dietil *p*-nitrofenil fosfat kullanılarak önceden inaktive edilen biyokatalizörlerin SDS-PAGE ile elektroforezi sayesinde immobilizasyonların başarılı bir şekilde gerçekleştiği kanıtlanmıştır. Enzimlerin aktiviteleri *p*-nitrofenil bütirat (*p*NPB), R- ve S-metil mandelat substratları kullanılarak ölçülmüştür.

Arana-Peña ve diğerklerinin (2020b) yapmış olduğu benzer bir çalışmada, CALA, CALB, TLL ve RML'nin çok katlı immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Enzimler ilk olarak oktil-agaroz tanecikleri üzerinde ara yüz aktivasyonu yoluyla immobilize edilmiştir. PEI ile muamele edildikten sonra yeni bir enzim katmanı, oktil-enzim-PEI bileşiğı üzerinde, oktil-enzim-PEI-enzim biyokatalizörleri şeklinde immobilizasyona devam edilmiştir. LEU kullanımı dışında, iki katmanlı biyokatalizörler olduğunda, yeni bir PEI grubu eklenmesiyle PEI ile immobilize edilmiş enzimin büyük bir yüzdesinin geri salındığı görüldüğünden glutaraldehit çapraz bağlanması ile kaçış önlenmiştir. Bu enzim modifikasyonunun bazı

durumlarda enzimin aktivitesini olumsuz etkilediği görülmüştür. Enzim, arayüzey aktivasyonu veya iyon değişimi ile immobilize edildiğinde bu olumsuz etkilerin ortadan kalkması söz konusudur. Ancak, yeni enzim tabakaları eklendikçe alt katmanlarda bulunan enzimlere substratın ulaşması için gereken yol arttığından substrat difüzyon problemleri meydana gelmiştir. Bu problemi ortadan kaldırmak için bir sonraki çalışmada glutaraldehit modifikasyonlarının uzatılması önerilmektedir.

Sodyum fosfat pH 7'nin destabilize edici etkisinin incelendiği bir çalışmada, oktil agaroz üzerine arayüzey aktivasyonu ile immobilize edilmiş *Candida antarctica* (A ve B), *Candida rugosa* ve *Rhizomucor miehei* lipazları kullanılmıştır. 100 mM pH 7 sodyum fosfat tamponunun destabilize edici etkisi glutaraldehit kullanıldığında azalmaktadır. pH 5-9 arası 1 M NaCl kullanıldığında fosfatın bu olumsuz etkisinin azaldığı görülmüştür. Sodyum fosfatın immobilize lipazlar üzerindeki olumsuz etkisi immobilizasyon protokolü ve inaktivasyon koşulları ile azaltılabilmektedir (Kornecki, ve diğerleri, 2020).

Ticari olarak satılan immobilize RML formları ile ilgili yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır (Niezgoda & Gliszczynska, 2019; Aljawish, Heuson, Bigan, & Froidevaux, 2019; Marín-Suárez, Méndez-Mateos, Guadix, & Guadix, 2019). Bu da RML'nin immobilizasyonunun gelecekteki kullanımının giderek artacağını göstermektedir.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez kapsamında enzimlerin endüstride kullanım alanlarının artması ve immobilize enzimlerin serbest enzimlere üstünlükleri göz önünde bulundurularak endüstriyel öneme sahip lipaz enziminin farklı taşıyıcılara, farklı yöntemlerle immobilize edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla *Rhizomucor miehei* lipazının (RML) doğal bir kil olan montmorillonit K-10'a adsorpsiyon tekniğiyle immobilizasyonu ayrıca polivinil alkol lens teknolojisi ile enkapsülasyonu çalışılacaktır. Elde edilen immobilize enzimin pH, sıcaklık, tampon çözelti konsantrasyonu etkisi gibi önemli parametrelerinin immobilizasyon sonrası geliştiğini gözlemleyebilmek adına serbest ve immobilize enzimlerin karakterizasyonları yapılacaktır. Ayrıca serbest ve immobilize RML'nin aktivitesi üzerine çeşitli katyonların ve deterjan etken

maddelerinin etkisi incelenecek, enzimlere ait aktivasyon enerjileri, K_m , V_{max} değerleri, katalitik aktiviteleri ve yarılanma ömürleri hesaplanarak taşıyıcıların ve enzimin taşıyıcıya immobilizasyonundan sonraki görüntüleri Taramalı Elektron Mikroskopisi (Scanning Electron Microscopy-SEM) ile incelenecektir. Elde edilen sonuçlara ve yapılan literatür taramalarına göre immobilizasyon teknikleri kıyaslanarak immobilizasyon metodlarının düşük maliyet, minimum toksisite, kolay uygulanabilirlik, depolama, tekrar kullanılabilirlik gibi açılardan geliştirilmesi planlanmaktadır.

1.3 Hipotez

Yapılan deneysel çalışmalarla *Rhizomucor miehei*'den üretilmiş olan lipaz enziminin immobilizasyon sonrası kinetik özellikleri arttırılarak, enzime tekrar kullanılabilirlik kazandırılacaktır. Ayrıca immobilizasyon ile enzimin termal kararlılığı arttırılarak ısı işlem gerektiren uygulamalar için uygun bir immobilizasyon tekniği elde edilecektir. Enzimin hidrolitik aktivitesinin pH, sıcaklık, tampon konsantrasyonu değişikliklerinden; iyon ve deterjanlardan minimum düzeyde etkilenmesi sağlanarak uzun süre depolanabilir immobilize lipaz enzimi elde edilecektir.

2.1 Enzimlerin Genel Özellikleri

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları katalizleyen ve herhangi bir yan ürün oluşmasına izin vermeden %100'lük bir verim ile çalışan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin (ribozimler) küçük bir kısmı hariç olmak üzere, enzimlerin tümü protein yapısında olduğundan proteinlere ait tüm yapısal özellikleri göstermektedir ve amino asitlerin polimeri olarak sınıflandırılırlar (Keha & Küfrevioğlu, Biyokimya, 2018). Fosfodiester bağlarının yıkımı ve sentezinde enzimler gibi davranan ribozimlere enzimlerden daha az rastlanır (Bastem, 2019). Ribozimlerde çok sayıda protein altbirimleri ve büyük ribozomal RNA molekülleri bulunmaktadır (Murray, Bender, Botham, Rodwell, & Weil, 2015).

Enzim terimi ilk olarak 1876'da Kühne tarafından "maya" ismiyle ortaya atılmıştır. 1783'te Spallanzani'nın yapay ortamda hazırlanan mide suyunun eti sindirebildiğini göstermiş; 1836'da ise Schwann, pepsin enzimini tanımlamıştır. 1930'lu yıllarda Northrop, pepsin ve kristal proteolitik olan enzimleri izole ederek, enzimlerin protein yapısında olduğunu kanıtlamıştır. Ancak hücre içi enzimlerin izolasyonu ve karakterizasyonunun güç olması sebebiyle 1940'lı yıllarda saf olarak hızlı ve ucuz protein eldesine duyulan ihtiyaçla protein saflaştırma teknikleri geliştirilmeye başlanmıştır (Aydın Karaağaç, 2019).

Bilinen 2000'den fazla enzim bulunmaktadır fakat genellikle bir enzim sadece bir kimyasal reaksiyonu veya aynı özellikte benzer reaksiyonları katalizler. Örneğin, proteolitik enzimler peptid bağlarının hidrolizini gerçekleştirirler. Buna bağ spesifikliği ismi verilir (Liu, 2017).

Kimyasal tepkime katalizörleri olan enzimler bir veya birkaç substrata özgüllük göstermektedir. Genel olarak enzimler bir substrat molekülünün en azından bir kısmına karşı mutlaka optik spesifite göstermektedirler. Örnek olarak etkisini α -

glikozitler üzerinde gösteren maltaz enzimi, β -glikozitlere etki etmemektedir (Karahan, 2019). Benzer şekilde bir enzim sadece belirli bir kimyasal grup üzerine etkilidir. Buna enzimlerin grup spesifikliğı ismi verilir. Örneğın glikozidaz sınıfı enzimler glikozitlere, alkol dehidrogenaz sınıfı enzimler ise sadece alkol üzerine etki etmekte, pepsin ve tripsin enzimi ise peptid bağlarının parçalanmasını katalize etmektedirler (Karahan, 2019; Bastem, 2019).

Enzimlerin substrat özğüllükleri de birbirinden farklıdır. Örneğın tripsin, sadece lisin veya arginin rezidülerinin karbonil grubu tarafındaki peptid bağlarını parçalar (Keha & Küfrevioğlu, Biyokimya, 2018). Bazı enzimler ise daha ileri grup özğüllüğü göstermektedirler. Örneğın karboksi peptidaz, proteinin karboksil ucuna yakın olan, aminopeptidazlar ise amino ucuna yakın olan peptid bağlarının yıkılımını katalize etmektedirler (Karahan, 2019). Birçok enzimin streospesifiklik özelliğı de vardır. Bazı enzimler substrat molekülünün D- formunu ürüne çevirirken, bir kısmı da L- formunu ürüne dönüştüren tepkimeyi katalizlemektedir. Örneğın, glutamat dehidrogenaz L-glutamat, laktat dehidrogenaz ise L-laktat üzerinde aktive olmaktadır (Keha & Küfrevioğlu, Biyokimya, 2018).

Doğal yollarla yalnızca canlı metabolizmalar tarafından sentezlenen enzimler hücre içerisinde meydana gelen tepkimelerin hızını ve özğüllüğünü düzenlerken çoğı zaman hücre dışında da etkinliklerini korumaktadırlar (Bastem, 2019). Hücre içi enzimlerin çok az miktarda kana veya diğır vücut sıvılarına geçmelerinin sebebi büyük molekül kütleleri nedeniyle hücre zarından geçememeleridir. Az miktarlarda sentezlenen bu katalizörlerden pıhtılaşma faktörleri ve sindirim enzimleri hücre dışına salgılandıktan sonra fonksiyon gösterirler. Bununla beraber tanısıl açıdan önemli enzimlerin çoğı sentezlendikleri hücre içinde aktiflerdir (Karahan, 2019).

Diğır proteinler gibi enzimler de basit ve bileşik olarak sınıflandırılabilir. Bazı enzimler sadece proteinlerden meydana gelirken, bazıları konjuge protein yapısındadır. Enzimlerin katalitik etkisini gösteren kısmı polipeptid zinciridir (Bastem, 2019).

Bazen bir metal iyonu (Zn^{2+} gibi) veya koenzim olarak bilinen bir organik molekül (Nikotinamid adenin dinükleotit-NAD⁺, Flavin adenin dinükleotit-FAD, Koenzim A gibi suda çözünen vitamin türevi bileşikler) enzimin aktivitesi için gerekli

olabilmektedir (Karahana, 2019). Enzimlerin aktiviteleri için gerekli olan ve genellikle ısıya dayanıklı, protein yapılmayan bu iyon veya moleküllere kofaktör adı verilir (Karahana, 2019; Bastem, 2019). Kofaktör olarak metal iyonu kullanan enzimlere metaloenzim denmektedir. Metal iyonları asit-baz katalizi, kovalent kataliz veya enzimin yapısal konformasyonunda değışiklik yaparak substratın bağlanmasını kolaylaştırmaktadır (Bastem, 2019). Eğer enzim ile kofaktör arası bağlanma yeterince güçlü değilse kofaktöre koenzim adı verilmektedir (Karahana, 2019). Bu tip koenzimler genellikle diyaliz yöntemiyle enzimden ayrılırlar. Koenzimlerin yapısında sıklıkla rastlanan B vitaminleri, özel hücresel fonksiyonların yerine getirilmesinden sorumludur. Enzim-kofaktör kompleksinin kovalent bağlarla birbirine sıkı şekilde bağlandığı durumlarda ise bu kofaktörlere prostetik grup ismi verilir. Bazen de enzim, aktivite gösterebilmesi için hem kofaktöre hem de koenzime ihtiyaç duyabilir. Koenzimler spesifik elektron, proton veya fonksiyonel grupların taşınmasında önemli rol oynarlar. Örneğin süksinat dehidrogenaz FAD'a gerek duyar (Bastem, 2019). Eğer enzim koenzimi veya kofaktörü ile birlikte ve katalitik bakımdan tamamen aktif durumda ise, enzimin bu formuna "holoenzim" adı verilir (Liu, 2017).

Bir canlı türünde farklı kimyasal yapıya sahip olmasına rağmen aynı reaksiyonu katalizleyen enzimlere izoenzim (izozim) adı verilmektedir. Bu enzimlerin aktiviteleri farklı olabilirken, substrat, kofaktör ve inhibitörlere karşı ilgileri de birbirinden farklı olabilmektedir (Keha & Küfrevioğlu, Biyokimya, 2018). İzoenzimler farklı sayıda yüklü amino asit içerdiğinden elektroforezle birbirlerinden ayrılabilir (Champe & Harvey, 1997).

2.2 Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler tarafından ürüne dönüşen maddelere substrat adı verilir. Enzimler önceleri, enzimin etki ettiği substratın adının sonuna -az eki getirilerek (üreaz, lipaz, fosfataz vb.) veya enzimi keşfeden kişinin verdiği adlarıyla (pepsin, tripsin gibi) isimlendirilmiştir. Günümüzde ise Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından yapılan sistematik sınıflandırmaya göre isimlendirilmektedirler (Blanco & Blanco, 2017). Bu sistematik sınıflandırmaya göre enzimler altı ana sınıfa ayrılmıştır. Bunlar sırasıyla; oksidoredüktazlar,

transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlardır. Her enzime dört rakamlı sistematik kod numarası (Enzyme Commision-E.C.) verilmiştir. E.C. harflerinden sonra gelen ilk rakam bu ana sınıftan hangisine ait olduğunu gösterirken, ikinci rakam bu ana sınıfın alt, üçüncü rakam alt sınıfın alt sınıfını (alt-alt sınıf) göstermektedir. Dördüncü rakam ise enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasında hangi sırada olduğunu belirtmektedir (Çakmak, 2019; Keha & Küfrevioğlu, 2018).

Ana sınıfların sırasıyla genel özellikleri şöyledir: (Keha & Küfrevioğlu, 2018; Kalaycıoğlu, Serpek, Nizamlioğlu, Başpınar, & Tiftik, 2013)

- **Oksidoredüktazlar:** İki substrat arasında indirgenme-yükseltgenme reaksiyonlarını katalizlerler. Dehidrogenazlar, oksidazlar, redüktazlar, oksijenazlar ve peroksidazlar gibi geleneksel isimlendirmelere sahip enzimler bu sınıfta yer alır. Kod numarasında bulunan ikinci rakam redükleyici hidrojen veya elektron vericisini, üçüncü rakam ise hidrojen veya elektron akseptörünü temsil eder.
- **Transferazlar:** İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini gerçekleştirirler. Fosforil grubu transferini sağlayan kinazlar bu sınıftandır. Bu sınıftaki enzimlerde ikinci rakam transfer edilen grubu, üçüncü rakam ise akseptörü belirtir.
- **Hidrolazlar:** Bazı bağlara su molekülünün katılmasıyla gerçekleşen hidrolitik reaksiyonları katalize ederler. Hidroliz ettikleri bağın türüne göre karboksilik asit hidrolazlar, tiyol esteraz hidrolazlar, fosforik diester hidrolazlar gibi isimler alırlar. İkinci rakam hidrolize edilen, üçüncü rakam ise hidrolize olan bağı temsil eder.
- **Liyazlar:** Substrattan grupların hidrolitik olmayan yollarla ayrılmasını ve burada çift bağ oluşumunu sağlayan sınıftır. Hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimler bu sınıftandır. İkinci rakam yıkılan bağı, üçüncü rakam ise ayrılan grubu belirtir.
- **İzomerazlar:** Bir molekül içindeki yapısal ve geometrik değişikliklerle izomerlerin birbirine dönüşümünü kataliz eden enzimler bu sınıftandır.

İkinci rakam reaksiyon tipini, üçüncü rakam ise izomerizasyona uğrayan molekül çeşidini gösterir.

- **Ligazlar:** Genellikle ATP olmak üzere trifosfatlardaki pirofosfatı hidrolize ederek iki molekül arasında bağ oluşumunu katalizlerler. İkinci rakam sentezlenen bağı, üçüncü rakam ise şekillenen bağı gösterir.

2.3 Enzimatik Kataliz

Enzimle katalizlenen reaksiyonlar, enzim üzerinde aktif merkez olarak tanımlanan bir bölgede meydana gelmektedir. Enzimin aktif merkezinden substratına bağlanması ile ilgili olarak iki ayrı hipotez mevcuttur. Bunlardan ilki Emil Fischer tarafından 1894'te ileri sürülen anahtar-kilit modelidir. Bu modelde enzim ile substratın üç boyutlu uzayda geometrik yapıları birbiri üzerine tam örtüşebildiğinden enzimler, substratlarını dış yüzeyinden etkiler. Substratın parçalanarak bir veya iki ürüne dönüşmesi söz konusudur (Aydın Karaağaç, 2019; Bastem, 2019). Bu model enzim-substrat özgülüğünü açıklamada başarılı olsa da geçiş durumlarının enzim tarafından stabilizasyonunu açıklamada kısmen yetersiz kalabilmektedir (Bastem, 2019).

Enzim-substrat bağlanmasıyla ilgili ortaya atılan ikinci hipotez ise 1958'de Daniel Koshland tarafından ileri sürülen indüklenmiş uyum modelidir. Bu hipotezde, enzimler esnek yapıları oldukları için aktif merkezin şekli enzimin substrat ile uygun biçimde bağlanacak şekilde kısmi değişikliklere uğraması söz konusudur (Aydın Karaağaç, 2019; Bastem, 2019). Substrat parçalandıktan sonra enzim reaksiyondan değişmeden ayrılmaktadır (Bastem, 2019).

Aktivasyon enerjisi, reaktanları ürünlere dönüştürmek için gerekli olan toplam enerjidir. Aktivasyon enerjisi tepkime hızı ile ters orantılıdır, yani aktivasyon enerjisi ne kadar yüksekse tepkime o kadar yavaş ilerlemektedir. Sıcaklığın yükseltilmesi ile moleküllerin kinetik enerjileri ve buna bağlı olarak uyarılmış durumdaki tanecik sayısının artırılmasıyla aktivasyon enerjileri düşürülebilir yani tepkime hızlandırılabilir. Ancak yüksek sıcaklık proteinlerin yapısını bozacağından canlı organizmaya zarar vermektedir. Bu nedenle reaksiyon ortamındaki katalizörün etkisi ile yani enzim varlığında gerçekleşen reaksiyonlarda aktivasyon enerjisinin azaltılması mümkündür (Aydın Karaağaç, 2019).

Enzimle katalizlenen reaksiyonlar, enzim kullanılmadan gerçekleşen reaksiyonlara göre yaklaşık 10^8 kat daha hızlı gerçekleşmektedir (Yadav, Narang, Chhillar, & Pundir, 2018).

Enzimle katalizlenen reaksiyonların hızları bazı faktörlerden etkilenmektedir. Bunlar:

Enzim konsantrasyonu: Ortamda yeteri kadar substrat varlığında enzim konsantrasyonu arttıkça enzimle katalizlenen reaksiyonun hızı da artmaktadır. Ancak substrat miktarında zamana bağlı meydana gelen azalma sonucunda reaksiyon hızı da azalacaktır.

- **Substrat konsantrasyonu:** Tüm enzim aktif bölgeleri substratla doyana kadar sabit bir enzim konsantrasyonunda, substrat konsantrasyonu arttıkça enzimle katalizlenen reaksiyonun hızında artış meydana gelmektedir. Reaksiyon ortamında aşırı miktarda substratın bulunması enzimin substrata ulaşmasına engel olacağından substrat konsantrasyonunun aşırısı enzim aktivitesini olumsuz yönde etkiler.
- **pH:** Enzimin en aktif olduğu pH değerine optimum (en uygun-optimal) pH denir. Enzimlerin aktivitesi pH değişiminde çok hassastır. Optimum pH değeri dışında enzimli reaksiyonun hızı yavaşlar veya reaksiyon durur.
- **Sıcaklık:** Enzimli reaksiyonun en yüksek aktiviteyi gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık denir. İnsan metabolizma enzimleri genellikle vücut ısısı olan 37°C civarında optimum hızda çalışırlar. Enzimler sıcaklıkta meydana gelen 1-2 derecelik farktan %10-20 oranında etkilenirler. Genellikle pek çok reaksiyonda olduğu gibi enzimle katalizlenen reaksiyonun hızları sıcaklık artışıyla artarken 40°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda metabolizma proteinleri denatüre olurlar.
- **Zaman:** Reaksiyonda oluşan ürünlerin kendi arasında etkileşerek ters yönde reaksiyon oluşturmaları, enzimin inaktive olması, inhibitör maddelerin oluşması ve substratın tükenmesi gibi nedenlerle enzimli reaksiyonun hızı maksimuma ulaştıktan sonra zaman geçtikçe azalmaya başlar.
- **Substrat yüzeyi:** Sindirim enzimleri gibi enzimlerin katalizlediği reaksiyonlarda substrat yüzeyinin giderek artmasına bağlı olarak enzimin

substrata ulaşması kolaylaşacağından enzimli reaksiyonun hızına etki etmektedir.

- **Radyasyon:** Protein molekülündeki sistein, triptofan, histidin gibi amino asitlerin fotokimyasal reaksiyona girmesi sonucu enzim inaktive olur. Bu nedenle amino asitleri içeren enzimlerin ışıktan korunması gerekmektedir.

İnhibitör ve aktivatörler: İnhibitör, engelleyen veya önleyen maddeler demektir. Enzim inhibitörleri enzim-substrat ilişkisini bozarak enzimli reaksiyonun hızını azaltıcı ya da reaksiyonu durdurucu etkiye sahiptir. Aktivatörler ise aktifleştirici veya etkinleştirici maddelerdir. Enzim aktivatörleri enzimli reaksiyonun hızını arttırıcı etki gösterir (Aydın Karaağaç, 2019; Kalaycıoğlu, Serpek, Nizamlioğlu, Başpınar, & Tiftik, 2013; Aktümsek, Gökalp, Çakmak, & Zengin, 2018).

Bir enzimin katalitik hızını düşüren inhibitörlerin enzim aktivitesi üzerine etkisi geri dönüşümlü (reversibl) ve geri dönüşümsüz (irreversibl) olmak üzere ikiye ayrılır. Geri dönüşümlü inhibisyonunda, inhibitör etken ortadan kalktığında enzim aktivitesi eskiye dönerken geri dönüşümsüz inhibisyonunda, inhibitör madde enzimin aktif bölgesine kovalent olarak bağlandığından enzimin kalıcı olarak inaktive olmasına neden olur. İyodoasetamid ve penisilin geri dönüşümsüz inhibitörlerdendir (Hames & Hooper, 2006).

Geri dönüşümlü inhibisyon; yarışmalı (kompetitif), yarı-yarışmalı (unkompetitif) ve yarışmasız (nonkompetitif) olmak üzere üçe ayrılır: (Kalaycıoğlu, Serpek, Nizamlioğlu, Başpınar, & Tiftik, 2013)

Yarışmalı inhibisyonunda, yapısal olarak substrata benzer özellikte bir inhibitör varlığı söz konusudur. Bu inhibitör enzime aktif bölgeden bağlanarak enzim-inhibitör kompleksini meydana getirir. Substrat ve inhibitör enzime aynı aktif bölgeden bağlanacağı için yüksek substrat konsantrasyonu inhibitörün etkisini yok edebilir (Kalaycıoğlu, Serpek, Nizamlioğlu, Başpınar, & Tiftik, 2013). İlaç preparatlarının yaklaşık % 60'ının çalışma prensibi yarışmalı inhibisyon üzerine kuruludur (Aktümsek, Gökalp, Çakmak, & Zengin, 2018).

Yarışmasız inhibisyonunda, inhibitör enzime substrat ile aynı bölgeden bağlanmayacağından ya enzime ya da enzim-substrat kompleksine bağlanır.

Substratın enzime bağlanmasına engel olmayan bu inhibisyon türünde enzim-substrat-inhibitör üçlü kompleksi meydana geleceğinden enzim katalizli reaksiyon yavaşlar ya da durur. Substrat konsantrasyonundaki değişiklik yarışmasız inhibisyona etki etmez. Kurşun, cıva, gümüş gibi ağır metal zehirlenmelerinin temelinde yarışmasız inhibisyon yatar (Aktümsek, Gökalp, Çakmak, & Zengin, 2018).

Genellikle multi substrat sistemlerde görülen yarı-yarışmalı inhibisyonda ise inhibitör yalnızca enzim-substrat kompleksine bağlanarak enzimin katalitik etkinliğini azaltır (Kalaycıoğlu, Serpek, Nizamlıoğlu, Başpınar, & Tiftik, 2013).

Enzimlerin etki mekanizması, enzimlerin aktivasyon enerjisini azaltarak reaksiyon hızını arttırma yeteneğine bağlıdır. Reaksiyon sırasında enzim (E), substrata (S) bağlanır ve geçici bir enzim-substrat kompleksi (ES) oluşturur. Reaksiyonun sonunda, ürün ya da ürünler meydana gelirken enzim değişmeden kalır ve başka bir substratı bağlayabilir. Enzimler metabolizmada birçok kez reaksiyona girebilir (Blanco & Blanco, 2017).

Enzim aktivitesi, belirli bir sürede oluşan ürün miktarı veya bir reaksiyonda tüketilen substrat ölçülerek belirlenir. Bir enzim ünitesi (U), tanımlanan optimum pH ve sıcaklık koşulları altında dakikada 1 µmol substrat dönüşümünü katalize eden enzim olarak ifade edilir. Molar aktivite veya devir sayısı substrat doygunluğu koşulları altında, enzim molekülü başına birim zamanda ürüne dönüştürülen substrat molekülleri olarak tanımlanır. Spesifik aktivite ise, numunede bulunan miligram protein başına denk gelen enzim ünite değeridir (Blanco & Blanco, 2017).

Spesifik aktivite, aktivitenin mg cinsinden protein miktarına bölünmesi ile hesaplanabilir. Aktivite ise dakikada mililitredeki ürünün mmol cinsinden miktarı olarak ifade edildiğinde spesifik aktivite için eşitlik;

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{\text{Aktivite}}{\text{mg protein}} = \frac{\text{mmol ürün}}{\text{mg protein} \times \text{dakika} \times \text{mL}} \quad (2.1)$$

denklem (2.1) gibi olur. Eğer enzimin molekül ağırlığı biliniyorsa denklem;

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{\text{Aktivite}}{\text{mmol protein}} = \frac{\text{mmol ürün}}{\text{mmol protein} \times \text{dakika} \times \text{mL}} \quad (2.2)$$

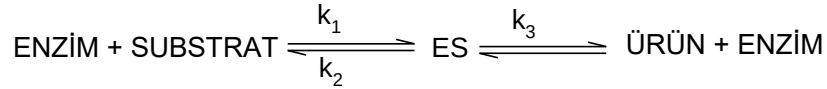
(2.2)'deki gibi düzenlenebilir (Liu, 2017).

Uluslararası Biyokimya Birliği Adlandırma Komitesi (IUPAC), Systeme International (SI) birimlerine uymak için reaksiyon hızının saniyede mol cinsinden ifade edilmesi gerektiğini önermiştir. Katal terimi de SI ile uyumlu yeni bir enzim aktivitesi birimi olarak önerilmektedir (Vogel, 2018).

Enzimatik reaksiyon hızı, numunede bulunan enzim miktarı ile doğru orantılıdır. Ayrıca düşük substrat konsantrasyonu ve ortamın sabit koşulları altında enzim aktivitesi substrat konsantrasyonundaki artışla hızla artar. Daha yüksek substrat seviyelerinde, etkinlik yavaşça artar ve maksimuma ulaşma eğilimindedir. Etki hiperbolik bir işlevi takip eder; düşük substrat konsantrasyonunda reaksiyon birinci derecedir; yüksek substrat konsantrasyonunda reaksiyon substrata göre sıfırıncı mertebededir. Michaelis sabiti (K_m), maksimum reaksiyon hızının yarısına ulaştığı substrat konsantrasyonudur. Verilen pH ve sıcaklık koşulları altında, K_m değeri her bir enzim için ayırt edicidir ve onu karakterize etmek için kullanılır. Çoğu enzim için, K_m değeri, enzimin substratına olan afinitesi ile ters ilişkilidir. Afinite ne kadar yüksek olursa, K_m o kadar düşük olur (Blanco & Blanco, 2017).

Enzimatik reaksiyonun hızı, koşullar sabit tutularak, reaksiyonun başlangıç hızı bilinmek suretiyle enzim aktivitesi ve enzim konsantrasyonu arasında çizilen grafik sonucu elde edilen eğri üzerinden belirlenebilir. Değişen substrat konsantrasyonları altında enzim aktivitesi incelendiğinde ise hiperbolik bir eğri elde edilir. Düşük substrat konsantrasyonlarında, enzim aktivitesi substrat konsantrasyonu ile doğrusal olarak artar. Bu birinci dereceden bir reaksiyonu yansıtır. Substrat arttıkça enzim hızı da artar ancak, tüm enzim molekülleri substrata doyduğunda substrat konsantrasyonu artmaya devam etse bile aktivitenin artmadığı bir tepe noktası oluşur. Eğri, enzimin maksimum hızına (V_{max}) karşılık gelen bir noktada yatay olma eğilimindedir. Bu hiperbolik eğri, tek substratın dahil olduğu reaksiyonları temsil etmektedir. İki substrat reaksiyona katıldığında ise ikinci substratın aşırı konsantrasyonu kullanılırsa, bunlardan biri için hiperbolik bir eğri elde edilebilir.

Substrat-aktivite ilişkisi, Michaelis ve Menten'in ilk kez tanımladığı 20. yüzyılın başlarından beri iyi bilinen bir kavramdır. En basit durumda, substrat geri dönüşümlü bir reaksiyonda enzime hızla bağlanır. Oluşan kompleks, birinci reaksiyondan daha yavaş ayrışır ve enzim, ürünü yeniden serbest bırakır Şekil 2.1'de enzim-substrat kompleksinden ürün oluşumu reaksiyonu gösterilmiştir (Blanco & Blanco, 2017).



Şekil 2.1 Enzim-substrat reaksiyonu

Enzim-substrat kompleksinin oluştuğu bu denklemde enzim-substrat etkileşimine ait hız sabiti k_1 'dir. ES kompleksi k_2 hız sabitiyle tekrar enzim ve substrata ayrışabilir veya k_3 hız sabitiyle ürüne dönüşebilir. k_3 , enzimin saniyede etki ettiği substrat molekülü sayısını (turnover sayısı) göstermektedir. Enzimli reaksiyonların katalizleme derecesi turnover sayısı olarak tanımlanmaktadır (Çakmak, 2019).

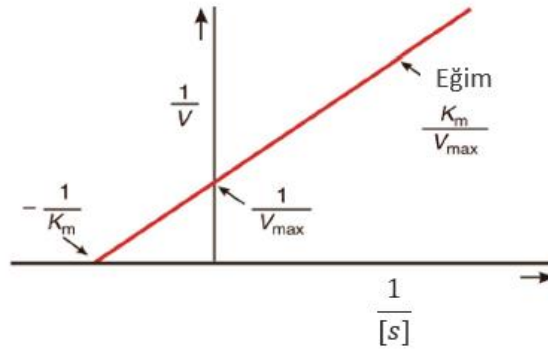
$V_{\max}$ değeri teorik bir değer olup sonsuz substrat konsantrasyonu için geçerlidir. Başlangıç hızı ve substrat konsantrasyonu arasında kesin bir ilişki kurmak için tanımlanan K_m sabiti, reaksiyon hızının maksimumun yarısına eşit bir değere ulaştığı substrat konsantrasyonuna karşılık gelir (Blanco & Blanco, 2017).

Hiperbolik enzim-substrat doygunluğu, Michaelis ve Menten tarafından türetilen denklem (2.3) ile açıklanmaktadır:

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (2.3)$$

Burada V , başlangıç substrat konsantrasyonu olan $[S]$ 'ye karşılık gelen başlangıç hızı; $V_{\max}$, maksimum reaksiyon hızı olmak üzere; K_m , spesifik substrat için Michaelis sabitini gösterir. $[S]$, K_m 'nin altında olduğunda, reaksiyon hızı, substrat konsantrasyonuna bağlıdır, yani denklem birinci derecedendir. $[S]$, K_m değerinden çok daha yüksekse, başlangıç hızı neredeyse maksimumdur. $[S]$ 'nin K_m 'ye eşit olduğu durumda ise reaksiyon hızı maksimum hızın yarısına eşit olur (Blanco & Blanco, 2017).

Michaelis-Menten denkleminin tersi alındığında denklem (2.4)'teki Lineweaver-Burk denklemi elde edilir ki bu denklem doğrusal bir grafiğe karşılık gelmektedir. Böylelikle çeşitli substrat konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümlerinde K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi kolaylaşmaktadır. Şekil 2.2'de Lineweaver-Burk grafiği verilmiştir (Blanco & Blanco, 2017).



Şekil 2.2 Lineweaver-Burk grafiği

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.4)$$

Biyokimyasal araştırmalarda enzimlerle ilgili yapılan çalışmalar oldukça büyük öneme sahiptir. Belli bir enzim üzerindeki ilk çalışma 1830'lu yıllarda İsveçli kimyager S. S. Berzelius tarafından gerçekleştirilmiştir. L. Pasteur ise fermantasyonun enzimlerce katalizlendiğini keşfetmiştir. Enzimoloji çalışmalarında dönüm noktası ise Amerikalı bilim adamı James'in Jack Bean bitkisinden üreaz enzimini saflaştırmasıyla gerçekleşmiştir. Günümüzde yaklaşık 4000 civarında enzimin izolasyonu gerçekleşmiştir (Bastem, 2019).

Enzim aktivite ölçümleri bazı hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır (Karahan, 2019). Örneğin kan üretimi yetersizliği gibi rahatsızlıklarda meydana gelen hücre harabiyeti sonucu bazı enzimlerin plazmaya sızdığı bilinmektedir. Plazmadaki bu enzimlerin aktivitelerinin ölçümü ile hastalıkların tanı ve tedavisi gerçekleşmektedir (Bastem, 2019). Birçok ilaç, biyolojik etkilerini enzimlerle girdiği reaksiyonlar sonucunda göstermektedir. Enzimler ayrıca kimya endüstrisinde, yiyecek hazırlanmasında ve ziraatte de kullanılan biyolojik katalizörlerdir (Karahan,

2019). Özellikle amilaz, lipaz, selülaz, katalaz, glikoz oksidaz gibi enzimler, lif ve kumaş işlemeden çamaşır deterjanlarına ve atık su arıtımına kadar, tekstil işlemedeki hemen hemen tüm üretim aşamalarına uygulanabilmektedir (Soares, ve diğerleri, 2011).

2.4 Enzimlerin Düzenlenmesi

Metabolizmanın sağlıklı bir şekilde işleyebilmesi için birden çok enzim bir arada uyum içinde çalışmaktadır. Bazı enzimler sistematik bir şekilde işleyiş göstermektedir. Bu tip sistemlere multi enzim sistemleri adı verilir. Multi enzim sisteminde birinci enzimin ürünü, sonraki enzimin substratı olacak şekilde organize olmuştur. Bu organizasyon üç şekilde gerçekleşebilir. İlk organizasyon biçiminde multi enzim sistemindeki enzimler sitoplazmada çözünmüş ve birbirinden bağımsız halde yer almaktadırlar. İkinci multi enzim organizasyon sisteminde birbirleriyle fiziksel anlamda birleşmiş halde bulunan enzim kompleksi fonksiyonlarını beraber gerçekleştirmektedir. Üçüncü tip multi enzim organizasyonunda ise enzimler membran veya ribozom gibi yapıların üzerine dizilidir. Muti enzim sisteminde yer alan en yavaş enzimatik reaksiyon o multi enzim sistemi için sınırlayıcıdır. Metabolik faaliyetlerin yerinde gidebilmesi için birbiriyle uyum içinde çalışmak zorunda olan bu multi enzim sistemlerinin düzenlenmesi esastır. Bunun için bir düzenleyici enzime ihtiyaç duyulmalıdır. Multi enzim sistemlerinde düzenleyici enzimler genellikle sistemin ilk enzimidir (Keha & Küfrevioğlu, Biyokimya, 2018). Bu düzenleyici enzimler metabolizmada oluşan bazı sinyallere cevaben enzim sisteminin aktifliğini arttırıcı ya da azaltıcı etki göstermelidir. Böylece hücrenin değişen ihtiyaçlarına karşılık verilmiş olur. Düzenleyici enzimlerin aktiflikleri farklı şekillerde kontrol altına alınmaktadır. Düzenleyici enzimlere kovalent olmayan bağlanmalarla bağlanan allosterik moleküller sayesinde enzim konformasyonel değişikliğe uğrar. Allosterik modülatör denen bu moleküllerin enzim üzerine etkisi baskılayıcı ya da uyarıcı olabilmektedir (Nelson & Cox, 2013).

Üç tip allosterik enzim bulunmaktadır. Bunlar; homotropik, heterotropik ve homotropik-heterotropik allosterik enzimlerdir (Keha & Küfrevioğlu, Biyokimya, 2018). Homotropik allosterik enzimlerde substrat ile modülatör terimleri eşdeğerdir yani substrat konsantrasyonu aktiviteyi arttırıcı etki göstermektedir

(Keha & Küfrevioğlu, Biyokimya, 2018; Nelson & Cox, 2013). Heterotropik allosterik enzimlerde enzim aktivitesine substrattan başka bir modölatör molekül etki etmektedir. Homotropik-heterotropik allosterik enzimler ise multivalan allosterik enzimlerde görülür ve iki veya daha fazla sayıdaki modölatörden birisi o enzimin substratı görevini görmektedir (Keha & Küfrevioğlu, Biyokimya, 2018).

Allosterik enzimlerde allosterik olmayan enzimlere göre aktif bölgeye ilaveten modölatörün bağlanması için düzenleyici bölge ya da allosterik bölge bulunmaktadır. Birden fazla modölatöre sahip allosterik enzim için düzenleyici bölge sayısı artış göstermektedir. Allosterik enzimlerin oluşturduğu enzimatik basamaklar son ürünün birikimiyle metabolizmanın istediği cevabı alması sonucunda geri beslemeli inhibisyona uğrar (Nelson & Cox, 2013). Non-kovalent bağlanmalarla meydana gelen allosterik enzim düzenlenmesine karşın kovalent düzenlenme de enzimlerin bir diğer kontrol mekanizmasıdır. Düzenlenecek olan enzime, başka enzimler tarafından küçük bir molekül grubu kovalent olarak takılır (Keha & Küfrevioğlu, Biyokimya, 2018). Ekstrasellüler ortamda gerçekleşen bir düzenlenme sistemi olan zimojen aktifleşmesinde inaktif ön bileşikleri halinde salgılanan bazı proteinlerde bulunan bir veya birden çok peptid bağının proteolitik enzimlerle kırılarak aktifleştirilmesi söz konusudur. Aktif hale gelen bu bileşik bir enzim ise inaktif haline proenzim adı verilmektedir (Keha & Küfrevioğlu, Biyokimya, 2018; Nelson & Cox, 2013).

Metabolizmada bulunan bazı enzimlerin fizyolojik kontrolü söz konusudur. Örneğin süt bezlerindeki laktozun sentezini gerçekleştiren laktoz sentetaz enzimi vücutta hormonal düzenlenme altına alınmıştır (Keha & Küfrevioğlu, Biyokimya, 2018).

2.5 Enzim İmmobilizasyonu

Son on yılda enzimlerin uygulama alanlarında yüksek oranda artış meydana gelmiştir. Endüstride enzim kullanılmasının en önemli avantajları biyolojik ve kimyasal tepkimelerde yüksek reaksiyon oranları, stereo ve enantiyo seçicilik göstermeleri, saf ürün eldesi ve çevre dostu uygulamalardır. Bu avantajların yanında enzim üretiminin ve saflaştırılmasının maliyetleri unutulmamalıdır (Cacicedo, ve diğerleri, 2019).

Enzimin doğası dışındaki ortamlarda aktivitesinin ve stabilitesinin azalması, yüksek substrat veya ürün konsantrasyonlarında inhibisyona uğraması serbest enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kullanımını kısıtlamaktadır (Cacicedo, ve diğerleri, 2019). Enzimlerin stabilitesini arttırmak yüksek stabiliteye sahip enzimleri üreten mikroorganizmaların kullanılması, stabilizatör maddelerin ilavesi, protein mühendisliği, modifikasyon teknikleri ve immobilizasyon ile mümkün kılınmaktadır (Baykal, Vardar, Attar, & Altıkatoglu Yapaoz, 2020). Enzimlerin biyokataliz sonrası nihai ürün ortamından ayrılmasında oluşan zorluklar, endüstriyel uygulamalarda enzim immobilizasyonunu öncelikli hale getirmiştir (Salgın, Çakal, & Salgın, 2020).

Enzim immobilizasyonunun keşfi 1916 yılında Nelson ve Griffin tarafındandır (Sneha, Beulah, & Murthy, 2019). 1940'lardan beri gıda, biracılık, tıbbi, farmasötik, tekstil, tarım, çevre, biyokimyasal ve kimyasal endüstriyel uygulamalarda kullanılan enzimler endüstriyel uygulamalardaki potansiyellerini yükseltmek ve kullanım alanlarını genişletmek üzere immobilize edilmektedir (Hettiarachchy, Feliz, Edwards, & Horax, 2018).

İmmobilize enzim, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya, destek malzemesine veya taşıyıcıya fiziksel olarak bağlı bir enzimdir (Hettiarachchy, Feliz, Edwards, & Horax, 2018). Enzim immobilizasyonunun amacı, uzun ömürlü olmayan ve zorlu çalışma koşulları altında çalışabilen sağlam bir biyokatalizör geliştirmektir. Endüstriyel uygulamalarda immobilize enzimlerin tercih edilmesinin nedenlerinden bazıları immobilizasyon ile K_m ve V_{max} gibi kinetik parametrelerin azalması, enzim aktivitesinin stabilitesinin arttırılması ve hatta bazı durumlarda hiperaktivite sergilemesidir (Cacicedo, ve diğerleri, 2019). Enzim immobilizasyonu, enzimin termal kararlılık ve aktivitesini geliştirirken, reaksiyon ürünleri tarafından enzimin inhibisyona uğrama riskini azaltmaktadır. Ayrıca immobilizasyon, doğal olmayan substratlara karşı enzimin seçiciliğini arttırır, enzimlerin endüstriyel kullanımını sağlar (Yadav, Vadgama, Kavadia, Odaneth, & Lali, 2019). Endüstriyel uygulamalarda enzimler, tüm bu avantajlardan yararlanabilmek için ve operasyonel maliyetleri azaltmak adına bir destek malzemesi üzerinde hareketsizleştirilir (Jacob & Suthindhiran, 2019). İmmobilize enzimler günümüzde endüstriyel uygulamaların dışında laboratuvar ölçeğinde organik sentezlerde, analitik uygulamalarda biyosensör

olarak ve medikal alanda teşhis (ELISA testleri) ve tedavi amaçlı (yapay organlar) kullanılmaktadır (Telefoncu, 1997).

İmmobilizasyon işlemiyle immobilize enzimin, çözünür enzime göre birçok avantajı bulunmaktadır. Bu avantajlar aşağıda listelenmiştir (Telefoncu, 1997; Ulutürk, 2012).

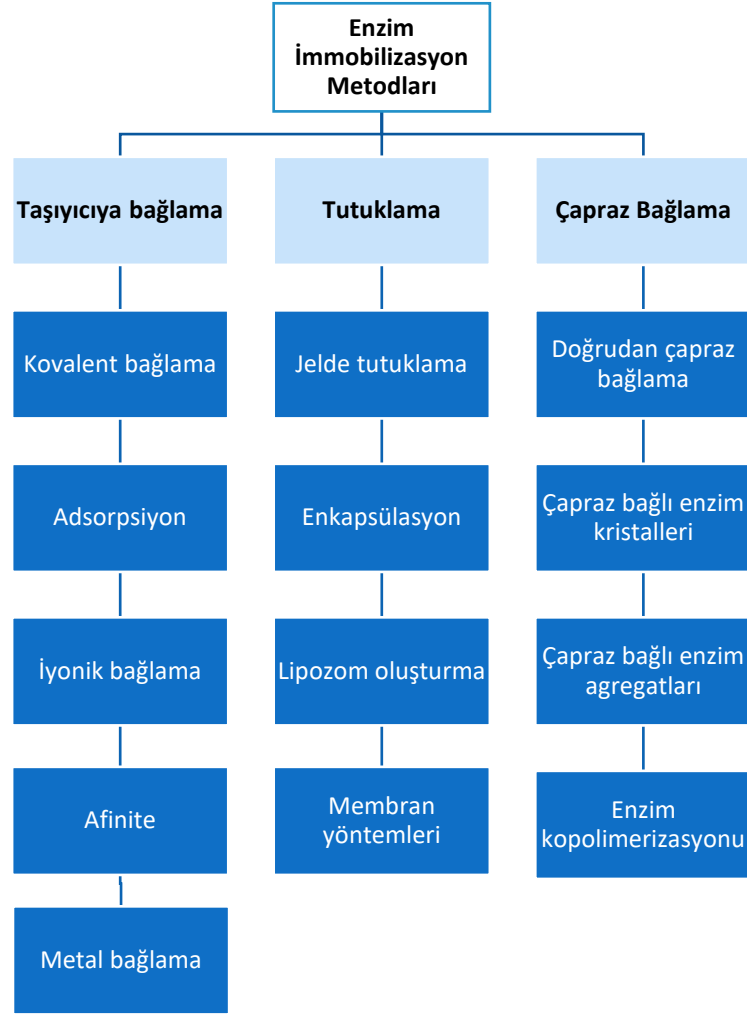
- Immobilize enzim birçok kez ve uzun süre kullanılabilmekte bu da maliyeti düşürmektedir.
- Immobilize enzim reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme vb.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz. Böylelikle reaksiyonun hızlı bir şekilde durdurulması sağlanabilir.
- Immobilize enzim çevre koşullarına (pH, sıcaklık vb.) karşı daha dayanıklıdır.
- İmmobilizasyonla enzimin kararlılığı artmaktadır.
- Immobilize enzim sürekli işlemlerde kullanılabilir.
- Immobilize enzim kullanılarak ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Immobilize enzim birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Immobilize enzim kullanımıyla atık sıvı miktarı azalmaktadır.
- Bazı durumlarda immobilize enzim serbest enzimden daha yüksek aktivite gösterebilir.
- İmmobilizasyonla enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır.
- Immobilize enziminin yarılanma ömrü uzamaktadır.
- Immobilize enzim mekanistik çalışmalar için uygundur.

Bununla beraber çözünür formda enzime göre kurulmuş proseslerden immobilize enzime göre sistemin adapte edilmesi, kimi zaman immobilize enzimlerin maliyetlerinin serbest enzime göre yüksek olması sistemin maliyeti açısından dezavantaj oluşturmaktadır. İmmobilizasyon boyunca enzim aktivitesinin azalması ya da tamamen tükenmesi ve enzimin çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde kararlılığının sınırlanmış olması immobilizasyonun olası dezavantajlarından (Tunç, 2006).

2.5.1 Enzim İmmobilizasyonunda Yöntem Seçimi

Enzimin fiziksel olarak hapsedilmesi, biyokatalizör ile seçilen taşıyıcı arasındaki farklı etkileşimler veya enzimin kendi kendine agregasyonu ile geliştirilebilir. Enzim immobilizasyon teknikleri farklı şekillerde sınıflandırılabilmeyle birlikte en basit sınıflandırma tekniği taşıyıcı kullanılan immobilizasyon ve taşıyıcısız immobilizasyondur. Taşıyıcı kullanılan immobilizasyon tekniklerinde enzim destek materyalinin yüzeyine bağlanabildiği gibi taşıyıcı içine de hapsedilebilmektedir (Cacicedo, ve diğerleri, 2019). Bir diğer enzim immobilizasyonu sınıflandırma şekli dönüşümlü ve dönüşümsüz immobilizasyondur. Dönüşümlü immobilizasyonda enzim taşıyıcıdan geri kazanılabilir. Bu yöntemler, adsorpsiyon ve disülfid bağları ile bağlanmadır. Geri dönüşümsüz immobilizasyon ise kovalent bağlama, tutuklama ve çapraz bağlama olarak üçe ayrılır (Guisan, 2013).

Enzim immobilizasyonu, farklı sınıflandırma yöntemleri olmasına rağmen, genellikle enzim ve taşıyıcı arasında meydana gelen kimyasal etkileşime dayanarak sınıflandırılmaktadır (Guisan, 2013). Şekil 2.3'te enzim immobilizasyonunda kullanılan en yaygın sınıflandırma biçimi verilmiştir (Yıldırım, 2010). Bazı durumlarda, enzim immobilizasyon protokolleri çeşitli immobilizasyon yöntemlerinin kombinasyonuna dayanmaktadır (Guisan, 2013).



Şekil 2.3 Başlıca immobilizasyon metodları

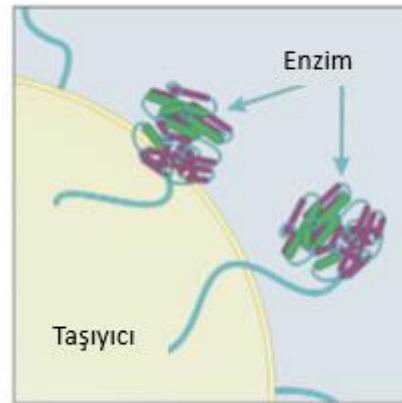
2.5.1.1 Taşıyıcıya Bağlama

Taşıyıcıya bağlanma yönteminde enzim molekülünün yüzeyindeki ve taşıyıcıdaki fonksiyonel gruplar (iyonik, polar ve hidrofobik gruplar) bağlanmada rol oynarlar. İnorganik ve organik kökenli birçok materyal taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Şekil 2.4'te taşıyıcıya bağlanma yöntemlerinin şematik gösterimi verilmiştir (Yıldırım, 2010).



Şekil 2.4 Taşıyıcıya bağlama yöntemleri

- **Kovalent bağlama:** Kovalent immobilizasyonda diazo bağlayıcılar, izoüre, alkilleyici ajanlar, peptidler gibi bifonksiyonel reaktifler enzim veya taşıyıcı üzerine bağlanarak yüksek verimli enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmektedir Şekil 2.5'te kovalent bağlama yöntemi ile taşıyıcıya enzimin immobilizasyonu gösterilmiştir (Zaitsev, Savina, & Zaitsev, 2019).

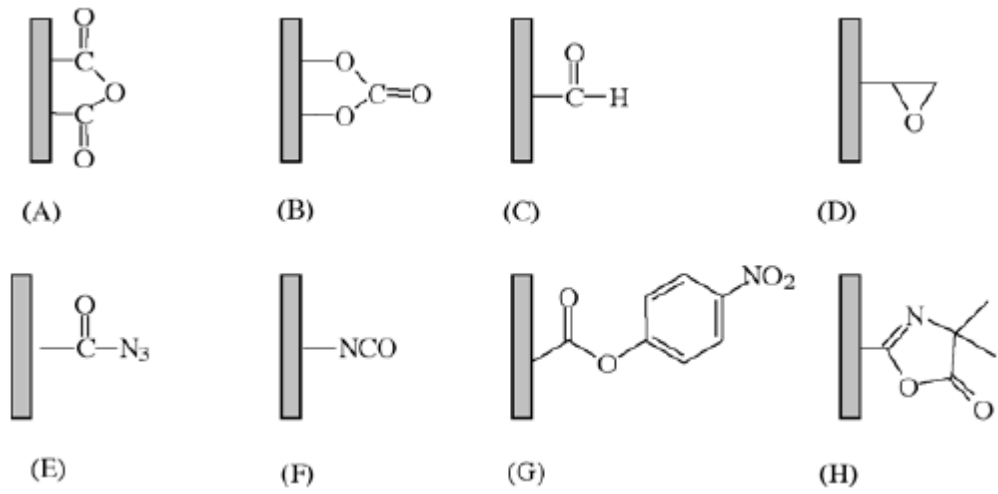


Şekil 2.5 Kovalent bağlama yöntemi ile taşıyıcıya enzim immobilizasyonu

Enzimin amino asitlerine çok noktali olarak bağlanan bu bifonksiyonel reaktifler aynı zamanda enzim ile taşıyıcı arasında bir köprü vazifesi görerek enzimin dinamik yapısını koruyarak enzimatik aktivitenin artmasını

sağlamaktadır. Kovalent bağlanma tekniğinde kullanılan toksik reaktiflerin uzaklaştırılması için ek saflaştırma işlemi gerektirmesi, enzime bağlanacak olan bifonksiyonel reaktifin doğru seçimi için enzimin yapısının iyi bilinmesi gerekliliği bu immobilizasyon yönteminin dezavantajlarından (Cacicedo, ve diğerleri, 2019).

Şekil 2.6'da kovalent bağlamada kullanılan fonksiyonel gruplar gösterilmiştir (Yıldırım, 2010). Şekilde, A anhidrit, B karbonat, C aldehit, D epoksit, E açilazid, F izosiyanat, G karboksilli asit fenil ester, H ise lakton kimyasal yapılarını göstermektedir.

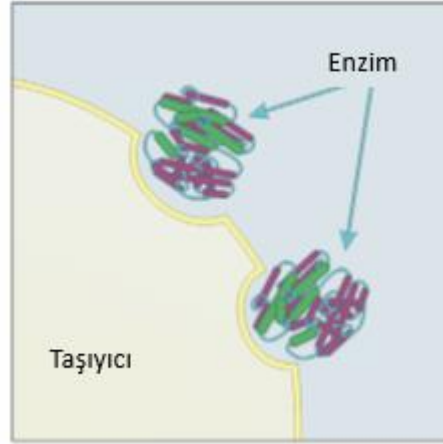


Şekil 2.6 Kovalent bağlamada kullanılan fonksiyonel gruplar

Enzim ile taşıyıcı arasında disülfid köprülerinin oluştuğu farklı bir benzersiz kovalent bağlama yöntemi de mevcuttur. Taşıyıcı ve enzim arasında kararlı bir kovalent bağ oluşmasına rağmen, bu bağ hafif koşullar altında ditiyotritol (DTT) gibi uygun bir ajan ile reaksiyona sokularak kırılabilmektedir. Disülfid bağ oluşumunu içeren yöntemlerin aktivite verimi genellikle yüksektir (Guisan, 2013).

- **Adsorpsiyon:** Non-kovalent bir immobilizasyon tekniği olan adsorpsiyon, ilave kimyasal reaksiyon gerektirmeyen kolay bir prosedür olmasına rağmen immobilize materyalin stabilitesi çevre koşullarından etkilenmektedir. Adsorpsiyonda enzimin taşıyıcı ile etkileşimi van der Waals, dipol etkileşimler, London kuvvetleri gibi düşük enerjili etkileşimlerle oluşur

(Cacicedo, ve diğ erleri, 2019). Adsorpsiyon yöntemiyle taşıyıcıya enzim immobilizasyonu Şekil 2.7’de verilmiştir (Zaitsev, Savina, & Zaitsev, 2019).



Şekil 2.7 Adsorpsiyon yöntemiyle enzim immobilizasyonu

Zayıf fiziksel kuvvetler kullanılarak enzimin taşıyıcı yüzeyine bağlanması için en sık kullanılan tekniklerden biri adsorpsiyondur. Aktivitenin neredeyse tamamının korunabildiğı bu teknikte enzim aktif bölgesinin korunması tekniğın avantajlarını oluştururken enzimin destek materyali y zerinden desorpsiyonu özellikle kuvvetli hidrodinamik kuvvetlerin varlığında dezavantajdır. Glutaraldehitin bazı proteinleri denatüre edici etkisi göz önüne alınarak adsorpsiyon, glutaraldehit ile çapraz bağlama kullanılarak sabitleştirilebilir. Bu teknikte alümina, silika, gözenekli cam, seramik, diatomlu toprak, kil ve bentonit gibi inorganik maddeler veya selüloz (CMC, DEAE-selüloz), nişasta, aktif karbon, Amberlite, Sephadex ve Dowex gibi iyon değıştirici reçineler kullanılmaktadır. Adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyonda bağlanma verimini arttırmak için kimi zaman destek materyalinin yüzeyi kimyasal veya fiziksel olarak aktifleştirilebilmektedir (Liu, 2017).

- ** yonik bağlama:**  yonik bağlamada enzim ile taşıyıcı arasında yüksek enerjili iyonik etkileşimler meydana gelmektedir (Cacicedo, ve diğ erleri, 2019).  yonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleşmesine rağmen kovalent bağlanma kadar güçlü bir bağlanma olmadığından enzim kaçışı görülebilmektedir (Yıldırım, 2010). Özellikle iyon değışim

kromatografilerinde kullanılan bu teknikte çok çeşitli enzimleri ve tüm hücreleri bağlamak için polietilenimin kullanımına çok sık rastlanmaktadır. Bu teknikteki bir diğer sınırlama ise yüksek derecede yüklü taşıyıcıların kullanılmasıyla enzimin optimum pH'ından uzaklaşmaya neden olmasıdır (Guisan, 2013).

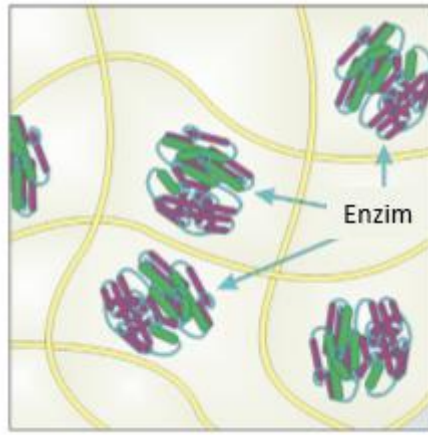
- **Afinite:** Tamamlayıcı biyomoleküller arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanarak gerçekleştirilen bu seçici immobilizasyon tekniğinde lektinler veya antikorlar gibi maliyetli bir ligandın taşıyıcıya kovalent bağlanması söz konusudur (Yıldırım, 2010; Guisan, 2013).
- **Metal bağlama:** Geçiş metallerinden özellikle titanyumun ve zirkonyumun tuzları veya hidroksitleri kullanıldığı bu immobilizasyon tekniğinde metalin tuzu veya hidroksit formu destek yüzeyine (selüloz, kitin, alginik asit, silikat gibi) ısıtma veya nötralizasyon yöntemi ile çöktürülür. Metalin boş d orbitali ile enzim molekülündeki artık amino asit grupları arasında immobilizasyon gerçekleşir. Basit bir immobilizasyon tekniği olan şelat bağlamada enzim aktivitesinin %30-80'ini koruyabilmektedir. Ancak, metalin destek yüzeyinden kaçmasından dolayı immobilizasyonda tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek zordur (Yıldırım, 2010). Ayrıca sterik faktörler nedeniyle, taşıyıcının metalin tüm koordinasyon pozisyonlarını işgal etmesi imkansızdır. Adsorpsiyon bölgelerinin oluşumunun kontrolünü geliştirmek için şelatör ligantları, stabil kovalent bağlar vasıtasıyla katı destekler üzerinde hareketsizleştirilebilir (Guisan, 2013).

2.5.1.2 Tutuklama

Tutuklama yöntemleri, substratın ve ürünlerin geçmesine izin veren ancak enzimi tutan polimerik bir ağ içinde bir enzimin tuzaklanmasına dayanır. Yani membranlar veya jeller yoluyla kütle transferi engellenmektedir. Bu yöntemde, enzim taşıyıcıya veya membrana bağlanmış halde değildir. Enzim tutuklanması kullanıldığında, enzimin kendisi hiçbir kimyasal reaksiyona girmez. Ayrıca bu yöntemlerde taşıyıcıya yüklenen enzim miktarı oldukça fazladır. Enzimler sentetik polimerler, biyolojik olarak bozunabilir polimerler (laktik ve glikolik asit, aljinat, kitosan, vb. türetilmiş polimerler ve kopolimerler), lipozomlar hatta kırmızı kan hücreleri gibi

diğer biyouyumlu materyalleri temel alan polimerlerin içine koyulabilir. Bununla birlikte, olası difüzyon bariyerleri sistemlerin performansını kısıtlayabilir (Guisan, 2013).

- **Jelde tutuklama:** Bu yöntemde enzimi içeren monomer ve ko-monomer çözeltisinde monomer ve ko-monomerin polimerleştirilmesi sonucu enzimin polimer içerisinde tutuklanması söz konusudur. Akrilamid, akrilik asit ve glisidilakrilat, 2-hidroksietilmetilakrilat, N-vinilpirolidon, 2-hidroksi propilamid, polietilen glikol metilakrilat bu yöntemde sıklıkla kullanılan monomerlerdendir (Yıldırım, 2010). Şekil 2.8’de polimerik jel içinde enzimin tutuklanması gösterilmiştir (Zaitsev, Savina, & Zaitsev, 2019).

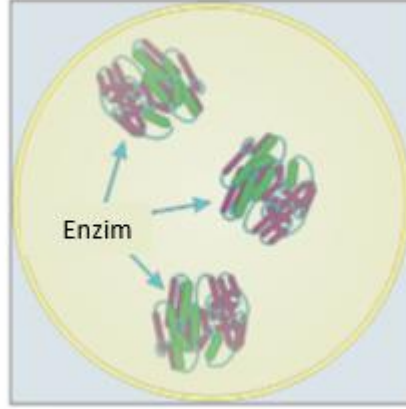


Şekil 2.8 Polimerik destek içinde enzimin tutuklanması

Polimerleşme N,N'-metilenbisakrilamid gibi çapraz bağlama ajanları kullanılarak ya da fiziksel olarak gerçekleştirilebilmektedir. Fiziksel olarak gerçekleştirilen çapraz bağlamada ortamın pH'ının, sıcaklığının veya iyonik şiddetinin değiştirilmesi söz konusudur (Yıldırım, 2010).

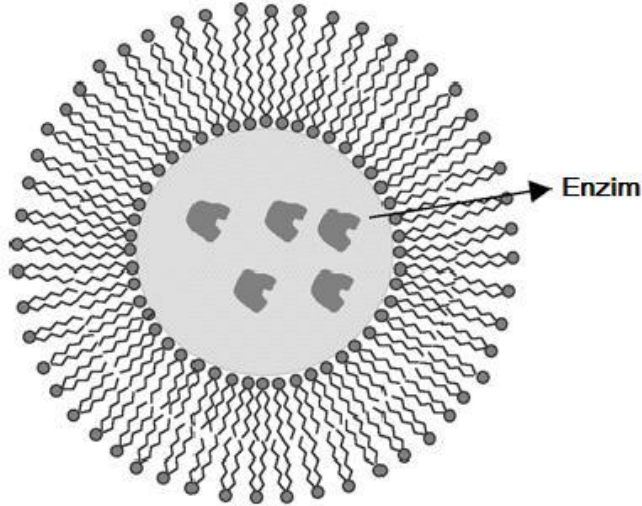
- **Enkapsülasyon:** Enkapsülasyon bir maddenin diğer bir madde içerisinde tutunması prosesi olarak tanımlanabilir (Tunç Odabaş, 2019). Enzim kapsülleme tekniği, enzimin taşıyıcısının kapsüllerinin boyutlarına göre mikro veya nano-enkapsülasyon olarak gerçekleştirilmektedir (Cacicedo, ve diğerleri, 2019). Eğer bu işlem birkaç nanometreden birkaç milimetreye kadar yapılıyorsa o zaman mikro-enkapsülasyon olarak tanımlanır (Tunç

Odabaş, 2019). Basit bir immobilizasyon yöntemi olan enkapsülasyon tekniğinde enzimin protein yapısının dış ortamın etkilerinden korunması sağlanmaktadır. İlaç endüstrisinde sıklıkla kullanılan bu teknikte enzim homojen dağılım göstermektedir. Enzim enkapsülasyonunda kullanılan iki yaygın teknikten ilki enzimin taşıyıcı çözeltisine ilavesi sonrası polimerizasyon işlemine tabi tutulmasıdır. Bu teknikte aljinatlar, pektinler, silanlar, poli (laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA), akrilik türevleri, naylon gibi polimerik malzemeler kullanılmaktadır. Enkapsülasyonun bir diğer tekniği ise polimerize taşıyıcıya enzim ilavesidir. Bu teknikte ortamın fiziksel özellikleri, enzimin moleküler özellikleri ve taşıyıcının fiziksel ve kimyasal özellikleri önem arz etmektedir (Cacicedo, ve diğerleri, 2019). Yüksek raf ömrü ve adsorpsiyon kapasitesi nedeniyle jelatin, yüksek stabilite nedeniyle de aljinatın çapraz bağlı taşıyıcıları enkapsülasyonda tercih edilen destek materyalleri olmasını sağlamıştır. İyon değiştirici polimerler, amberlit ve dietilaminoetil (DEAE) selüloz, polietilen glikol, glutaraldehit, polivinil klorür, siklodekstrin glukoziltransferaz, polivinil alkol, hekzametil diizosiyanat, fumarik asit, polilolonil gibi sentetik taşıyıcılar da kapsülleme tekniği ile enzim immobilizasyonunda kullanılmaktadır (Kaur, Choudhar, Chaudhari, Jayant, & Joshi, 2019). Bu iki teknik haricinde emülsifikasyon, iyonik çapraz bağlama, elektrostatik kapsülleme, katman katman biriktirme, dondurarak kurutma, süperkritik sıvılar, termal jelleşme, solventin buharlaşması, püskürtmeyle kurutma, vakum kapsülleme gibi enkapsülasyon prosedürleri de bulunmaktadır (Cacicedo, ve diğerleri, 2019). Şekil 2.9'da enzimin enkapsülasyon tekniğiyle immobilizasyonu verilmiştir (Zaitsev, Savina, & Zaitsev, 2019).



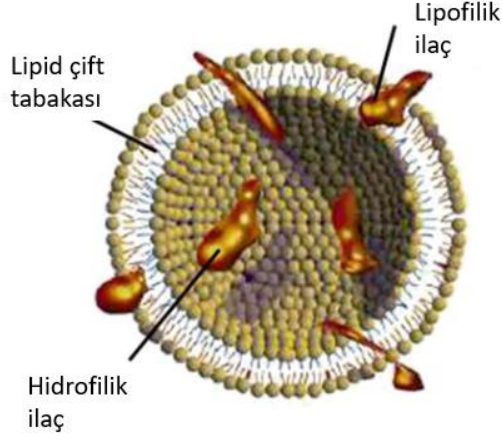
Şekil 2.9 Enkapsülasyon tekniği ile enzim immobilizasyonu

- **Lipozom tekniği:** Lipozomlar, nanometrik aralıkta fosfolipid çift katmanları tarafından oluşturulan veziküllerdir (Guisan, 2013). Şekil 2.10'da lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu gösterilmiştir (Yıldırım, 2010).



Şekil 2.10 Lipozom tekniği ile enzim immobilizasyonu

Bu yöntem son yıllarda özellikle ilaç salınım sistemlerinde kullanılmaktadır. Lipozomlar, hidrofilik ilaçları, iç sulu boşluklarına kapatır ve böylece in vivo dolaşım süresini arttırır. Lipofilik ilaçlar ise fosfolipid membran içine hapsedilir. Şekil 2.11'de bir lipozomun yapısı verilmiştir (Guisan, 2013).



Şekil 2.11 Lipozomun yapısı

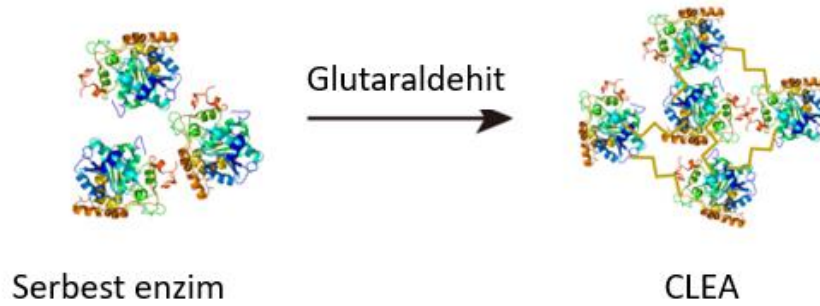
- **Membran yöntemleri:**

Bu yöntemde enzim, çok yarı geçirgen bir zarla çevrelenir ve enzime geniş bir hareket alanı kalmaktadır. Yarı geçirgen özellik gösteren oyuk elyaf membranları ve ultrafiltrasyon membranların kullanımı enzimlerin çözünür formda immobilizasyon yöntemlerinden biridir. Son derece kolay bir yöntem olan oyuk elyaf membranlar ile ultrafiltrasyon membranları ile enzim immobilizasyonunda substrat ve ürünün geçişine izin verir; fakat enzim membrandan ayrılamaz. Enzimin desteğe bağlanmasına gerek olmadığından enzimin herhangi bir fiziksel veya kimyasal özelliği immobilizasyondan etkilenmez. Substratın enzime ulaşmasındaki engel bu yöntemin en önemli dezavantajıdır. Küçük substrat molekülleriyle bu engel azaltılabilir ve böylelikle enzimin etkinliği arttırılabilir (Yıldırım, 2010).

2.5.1.3 Çapraz Bağlama

- **Doğrudan çapraz bağlama:** Bu yöntemde enzimin yüzeyindeki reaktif amino grupları ile glutaraldehitin çapraz bağlanması söz konusudur. Bu yöntemin dezavantajları, elde edilen immobilize enzimin serbest enzime göre düşük aktivite göstermesi ve mekanik stabilitesinin düşük olmasıdır. Ayrıca immobilizasyon veriminin azlığı doğrudan çapraz bağlama ile immobilizasyon yöntemindeki bir diğer dezavantajdır (Yıldırım, 2010).

- **Çapraz bağlı enzim kristalleri ve çapraz bağlı enzim agregatları:** Bifonksiyonel reaktiflerle taşıyıcı kullanılmadan çapraz bağlı enzim kristalleri (cross-linked enzyme crystals-CLEC) veya çapraz bağlı enzim agregatları (cross-linked enzyme aggregates-CLEA) olarak adlandırılan oto-immobilizasyon işlemi de gerçekleştirilebilmektedir (Cacicedo, ve diğerleri, 2019). Profesör Roger A. Sheldon tarafından geliştirilen bu teknikte glutaraldehit, glikoksal, epiklorohidrin, trimetilpropan triglisidil eter gibi bifonksiyonel reaktiflerle enzimin kendi içinde çapraz bağlanması gerçekleştirilmektedir (Cacicedo, ve diğerleri, 2019). Çapraz bağlı enzimlerin oluşumu Şekil 2.12’de verilmiştir (Zhong, ve diğerleri, 2020). CLEA hazırlama tekniğinde etkili çapraz bağlama için amino grupları sağlayan sığır serum albümini (BSA) gibi proteinli bir besleyici kullanılmaktadır (Nair & Chellapan, 2020). Basit bir teknik olan çapraz bağlı enzim preparatlarının en büyük dezavantajı katalitik işlem sırasında enzimin konformasyonel durumlarındaki kısıtlama ile substratların ve ürünlerin difüzyon sınırlamasıdır. Aynı zamanda saflaştırma ve kristallendirme işlemleri bu teknik için dezavantaj oluşturmaktadır (Cacicedo, ve diğerleri, 2019).



Şekil 2.12 Çapraz bağlı enzimin şematik gösterimi

- Birden fazla enzimi içeren, metabolik yola benzeyen çoklu bir biyo-dönüşüm süreci yaratan çapraz bağlı enzim agregatları da (combi-CLEA) oluşturularak bu sınırlandırmalar ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır (Cacicedo, ve diğerleri, 2019).

- **Enzim kopolimerizasyonu:** Bu yöntemde enzim bir kopolimerizasyon reaksiyonunun monomerlerinden biri olarak matrikse bağlanır. Enzim kaçışını önlemesi bu yöntemin avantajlarından (Yıldırım, 2010).

En sık kullanılan enzim immobilizasyon yöntemlerine ait özet Tablo 2.1’de verilmiştir (Guisan, 2013).

Tablo 2.1 Temel immobilizasyon yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları

Yöntem	Bağlanma	Avantajı	Dezavantajı
Fiziksel adsorpsiyon	Zayıf bağlanma: Hidrofobik, Van der Waals, iyonik etkileşimler	Kolay Ucuz	Desorpsiyon Seçici olmayan adsorpsiyon
Afinite	Afinite bağı	Kolay Olağanüstü seçicilik	Pahalı
Kovalent bağlama	Enzim ve taşıyıcının fonksiyonel grupları arasında kimyasal bağ	Enzim kaçışı yok Enzim stabilizasyonu	Geri dönüşümsüz Aktivite kaybı
Tutuklama	Polimerik ağ içinde enzimin tutuklanması	Geniş uygulama alanı	Kütle aktarımı sınırlanması Enzim kaçışı
Çapraz bağlama	Fonksiyonel kimyasal ile enzimin çapraz bağlanması	Enzim stabilizasyonu	Kütle aktarımı sınırlanması Aktivite kaybı

2.5.2 Enzim immobilizasyonunda Taşıyıcı Seçimi

Enzim immobilizasyonunda enzim ile taşıyıcı arasında herhangi bir bağlanma söz konusu ise ya bu bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği taşıyıcılar seçilmeli ya da immobilizasyon işlemi sırasında enzimin aktif merkezi korunmalıdır (Telefoncu, 1997). Enzimleri immobilize etmek için pek çok destek materyali kullanılmaktadır. Taşıyıcı olarak isimlendirilen bu destek materyalleri organik,

inorganik veya sentetik olabilmektedir. Seramikler, süngerimsi cam, selüloz, kum, sentezlenmiş polimerler, odun kömürü, metal oksitler, paslanmaz çelik ve polimerik jel enzim immobilizasyonunda en sık kullanılan taşıyıcılardandır. İmmobilizasyon sonrası enzimde istenilen özelliklerin geliştirilmesi adına destek materyalinin doğru seçilmesi önem arz etmektedir (Hettiarachchy, Feliz, Edwards, & Horax, 2018).

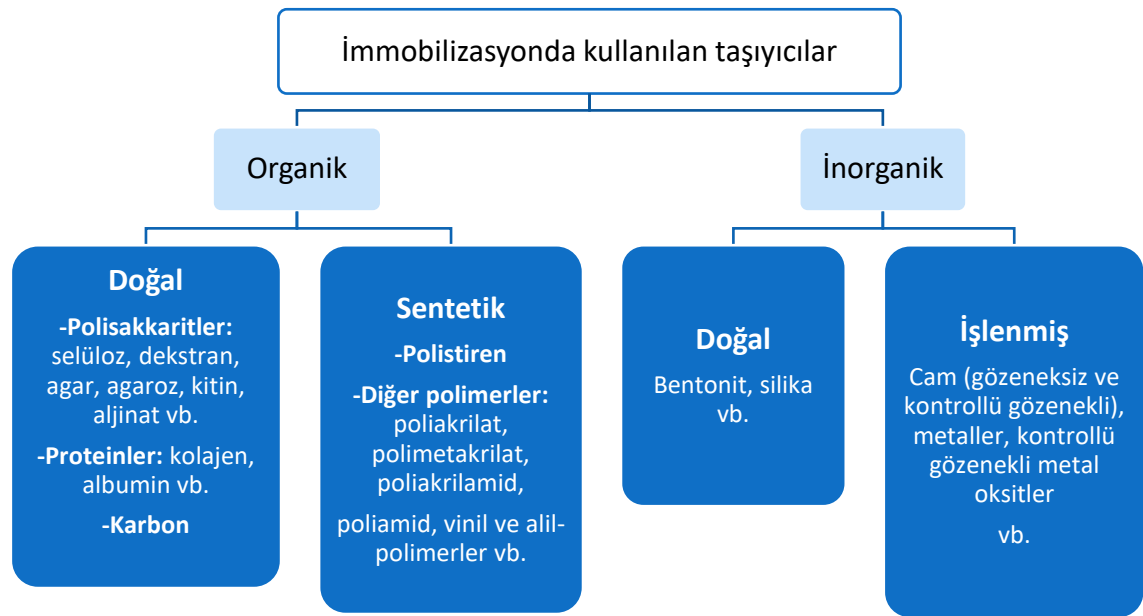
Enzim immobilizasyonunda taşıyıcı seçiminde immobilizasyon yöntemi, substratın yapısı, reaktör tipi ve mekanik özellikler dikkate alınmalıdır. Tüm enzimler ve enzim uygulamaları için genel bir taşıyıcı bulunmamasına rağmen, taşıyıcı olarak kullanılacak maddelerde aranılan birçok özellik vardır. Bunlar;

- Proteinlere karşı yüksek ilgi,
- Kimyasal modifikasyonlar ve enzimle direkt olarak reaksiyona girebilmesi için gerekli fonksiyonel grupların varlığı,
- Hidrofiliklik (suya karşı hidrofobik, proteinlere karşı hidrofilik olmak),
- Yenilenebilirlik,
- Mekanik kararlılık,
- Seçilen biyotransformasyon için farkı geometrik şekillerde ve istenilen yüzey alanlarında hazırlanabilme kolaylığı,
- Geniş yüzey alanı,
- Kimyasal kararlılığın yüksek olması,
- Uygun tanecik çapı/boyutu (0,2-1 mm/30-60 nm),
- İyon değiştirebilme kapasitesinin yüksek olması,
- Şişme kabiliyetinin düşük olması,
- Mikrobiyal kararlılığının yüksek olması,
- İnsan ve çevre sağlığına zarar vermemesi,
- Elastikiyetinin yeterli olması,
- Maliyetinin düşük olmasıdır (Telefoncu, 1997).

İmmobilizasyon yönteminin seçiminde yöntemin güvenilirliği, maliyetin düşüklüğü aktivitenin korunması ve enzimin kararlılığı göz önünde bulundurulmalıdır. Üretimde optimal koşulların saptanması yalnızca enzim için değil taşıyıcı için de önemlidir (Telefoncu, 1997). İmmobilize enzimlerin kullanıldığı proseslerdeki temel problemin sebebi, kullanılan destek maddelerinin özellikleridir. Destek olarak

kullanılacak ideal materyal iyi bir biyo-uyumluluğa, yani üç boyutlu poröz yapı ve kimyasal gruba sahip olmalıdır. Bütün bu özellikler mekanik dayanıklılığı artırır ve geniş bir sıcaklık, pH, iyonik kuvvet ve organik çözücü aralığında enzimi stabil yapar. Buna rağmen, formu, şekli, por büyüklüğü, şişme kapasitesi ve yük gibi fiziksel özellikler de çok önemlidir; çünkü bunlar prosesin kinetiğini etkiler. İmmobilize enzimlerin reaksiyon verimleri, enzimatik aktivite, enzimin aktif bölgelerine substratın ulaşabilme kapasitesi, yüklenen enzim miktarı, substrat konsantrasyonu ve difüzyon kapasitesine bağlıdır (Fang, Wang, Zhao, & Wang, 2012).

Şekil 2.13'te enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar sınıflandırılmıştır (Guisan, 2013).



Şekil 2.13 Enzim immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan taşıyıcılar

2.5.2.1 Organik Taşıyıcılar

Doğal polisakkaritlerin enzim immobilizasyonunda kullanılan en bilinen örnekleri aljinat, kitosan ve kitin, karagenan, kollajen, jelatin, selüloz, nişasta, pektin ve sefarozdur (Kaur, Choudhar, Chaudhari, Jayant, & Joshi, 2019). Aljinatlar kahverengi alglerden türetilir ve iki değerlikli katyonik çapraz bağlayıcılar kullanılarak yumuşak jelleşme koşulları nedeniyle enzim immobilizasyonu için çok yaygın olarak

kullanılır. Çapraz bağlı aljinat taşıyıcıları stabilitelelerini arttırır ve dolayısıyla enzim kapsülleme için tercih edilir (Kaur, Choudhar, Chaudhari, Jayant, & Joshi, 2019).

Doğada keşfedilen tek katyonik polimer kitosan olup pek çok immobilizasyon çalışmasında kullanılmış ve kullanılmaktadır (Cacicedo, ve diğerleri, 2019; Kaur, Choudhar, Chaudhari, Jayant, & Joshi, 2019). Kitinden üretilen kitosanda enzimlere kolayca bağlanabilen hidroksil ve amino grupları yer almaktadır. Aynı zamanda kitosan iyi gözeneklilik ve hidrofilitiklik sağlamaktadır (Kaur, Choudhar, Chaudhari, Jayant, & Joshi, 2019). Neredeyse tüm uygulamaları için bir engel oluşturan kısıtlı mekanik stabilitesini arttırmak adına kitosan ile nanokompozitler oluşturmak için nano malzemelerin eklenmesi, fiziksel ve kimyasal çapraz bağlama işlemleri için mevcut yüzey alanını arttırmak maksadıyla porojenler kullanılması kitosanın enzim immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan çalışmaları arasındadır (Wahba, 2020). Kitosandaki amino grupları ile aldehit grupları içeren dekstran gibi çapraz bağlayıcılarla arasında imin oluşumu reaksiyonu ile kitosanın işlevselliği arttırılabilir (Baykal, Vardar, Attar, & Altıkatoglu Yapaoz, 2020). Kitosan ile manyetik partiküllerin kombinasyonları kullanılarak immobilizasyon için ideal taşıyıcılar elde edilmektedir (Dal Magro, ve diğerleri, 2019). Literatürde kitosan ile çeşitli kil materyallerinin karıştırılmasıyla da doğayla uyumlu immobilizasyon destek materyalleri elde edildiği görülmektedir (Cacciotti, Lombardelli, Benucci, & Esti, 2019).

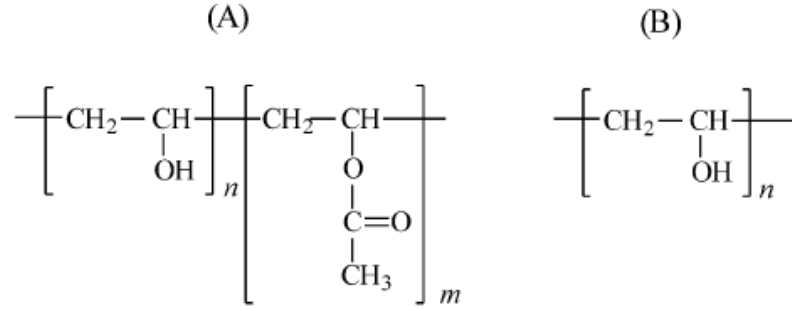
Karajenan, psödo-plastik özelliklerine sahip sülfatlanmış bir polisakkarit olup lipaz ve alfa glukozidaz gibi enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmıştır. Selülozlar, galaktozidaz, tirozinaz, lipaz, α -amilaz, glukoamilaz, mantar lakkazı ve penisilin G asilaz gibi pek çok enzimin immobilizasyonu için en yaygın kullanılan doğal polimerlerdendir. Ağırlığının on katına kadar emme kapasitesine sahip doğal polimer olan jelatin, bu özelliğinden dolayı enzim kapsülleme tekniğinde sıklıkla kullanılan taşıyıcılardandır. Pektin de papain immobilizasyonu için kullanılan polisakkarit esaslı doğal bir polimerdir. Sefaroz gözenekli yapısından dolayı amilaz ve glukoamilaz gibi enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmaktadır (Kaur, Choudhar, Chaudhari, Jayant, & Joshi, 2019).

Nanoteknolojinin gelişmesiyle tel, tüp, çubuk, tabaka ve lif gibi çeşitli yapılarda nano parçacıklar enzim immobilizasyonunda kullanılmaya başlamıştır. Kimyasal özelliklerine göre genel olarak karbon esaslı veya metalik olmak üzere iki gruba ayrılan nano malzemeler ayrıca silika, kitosan ve selüloz esaslı da olabilmektedir (Liu & Dong, 2020). Özellikle manyetik nanopartiküllerin enzim immobilizasyonunda kullanılması, enzime manyetik alan uygulanmasıyla ortamdan uzaklaştırılması kolaylığını sağladığı için sıklıkla kullanılmaktadır (Sharifi, ve diğerleri, 2019).

İyon değiştirici polimerler, dietilaminoetil (DEAE) selüloz, polietilen glikol, glutaraldehit, polivinil klorür, siklodekstrin glukoziltransferaz, polivinil alkol, hekzametil diizosiyanat, fumarik asit, polilonil gibi taşıyıcılar ise enzim immobilizasyonunda kullanılan organik bazlı sentetik polimerlerdendir. Bu polimerik malzemelerin enzim kapsülleme için kullanıldığı bilinmektedir (Kaur, Choudhar, Chaudhari, Jayant, & Joshi, 2019).

- **Polivinil alkol**

Jel oluşturan polimerler, örneğin polivinil alkol (PVA), yüksek su içeriği ve elastik doğası gereği insan yumuşak dokusuna benzemesi sebebiyle kontakt lens ve yapay eklem kıkırdığı gibi uygulamalarda kullanılır. Şeffaflığı sayesinde yara onarımını izlemeye imkan verir. Bu polimerler ayrıca vücut dokularıyla geçirgen ve hidrofilik arayüzey oluşturduğundan ilaç salınım sistemlerinde kullanılmaktadır (Singh & Singh, 2012). Toksisite değerlerinin çok düşük olması PVA'nın gıda endüstrisinde kullanımını da sağlamaktadır (DeMerlis & Schoneker, 2003). PVA, özel bir polimerdir çünkü vinil alkolün polimerizasyonu ile hazırlanmaz, transesterifikasyon ile polivinil asetatın hazırlanır ve vinil alkol ünitelerinin yanı sıra asetil grupları içermektedir (Sakurada, 1985; U.S/Washington, DC Patent No. 6,960,627, 2005). PVA, sadece bir zikzak zincir konfigürasyonuna sahip değildir ayrıca zincir üzerinde rastgele sağ ve sol konumlara yerleşik hidroksil grupları barındırmaktadır (Bunn, 1948). Ampirik formülü $(C_2H_4O)_n(C_4H_6O_2)_m$ olan PVA'nın kimyasal yapısı Şekil 2.14'te verilmiştir (DeMerlis & Schoneker, 2003).



Şekil 2.14 Kısmi hidrolizli (A) ve tamamen hidrolizli (B) PVA

PVA hidrojel, tek başına veya jelatin gibi çok fonksiyonlu biyopolimerlerle kombinasyon halinde kullanıldığında jelle daha fazla elastikiyet sağlayan hidrojen bağları oluşumu gerçekleştirir (Singh & Singh, 2012). Bununla birlikte, bugün tarif edilen tekniklerin çoğu, spesifik enzim için uygun taşıyıcıyı seçmek için rasyonel kavramlardan yoksundur. Aslında, üç boyutlu yapı ve amino asit bileşimi sadece birkaç enzimde tanımlanmıştır. Yeşil kimya açısından değerli olan ve yüksek yapısal ve kimyasal çeşitliliğe sahip, saflaştırılması ucuz ve kolay, doğada bol miktarda bulunan biyopolimerler immobilizasyonda endüstriyel işlemlerin maliyetini azaltmaktadır. Son yirmi yılda polistiren, polivinil alkol, eupergit, akrilatlar ve türevleri gibi sentetik taşıyıcılardan alginatlar, kollajen, pektinler, selüloz, ipek fibroin ve benzeri gibi doğal polimerlere ve DEAE türevleri gibi hibrit yapıda gibi farklı fizikokimyasal ve biyolojik özellikte, farklı boyut ve şekle sahip, hidrofiliklik/hidrofobiklik oranlarını değiştiren çeşitli fonksiyonel grupları içeren taşıyıcılar keşfedilmiş ve enzim immobilizasyonunda kullanılmaktadır. PLGA, alginatlar, pektinler ve ipek fibroin gibi bazı biyopolimerler enzim immobilizasyonu için keşfedilen taşıyıcılardandır. Hidrokolloidler enzim immobilizasyonu için tercih edilen biyopolimerlerdir (Cacicedo, ve diğerleri, 2019).

2.5.2.2 İnorganik Taşıyıcılar

Termal kararlılık, uygun mekanik kalite ve organik reaktiflere ve mikrobiyal kontaminasyon ataklarına karşı oldukça dayanıklı olan bu taşıyıcılar genellikle organik taşıyıcılara göre düşük reaktif özelliktedir. Metaller ve oksitleri, gözeneksiz

karakteristikleri nedeniyle çok az bağlayıcı yüzey içerir. Bu taşıyıcılar genellikle uygun fiyatlıdır (Hettiarachchy, Feliz, Edwards, & Horax, 2018). Seramik gibi inert moleküller enzim immobilizasyonu için ideal taşıyıcılardandır. Zeolitler gözenekli kristalin yapıları ve seçici özellikleri nedeniyle adsorpsiyonda kullanılan taşıyıcılardandır. Heterojen yüzeyli zeolitler, enzim destek etkileşimi için elverişli olan birçok adsorpsiyon bölgesine sahiptir. Doğada bol miktarda bulunan inorganik taşıyıcılardan biri de silikadır. Nano boyutlu silika yapılar yüksek yüzey alanına ve kimyasal ve mekanik kuvvetlere karşı daha yüksek stabiliteye sahiptir. Viskoz bir sıvı olan cam ve fonksiyonelleştirilmiş formları yenilenebilir ve sağlam yapıları nedeniyle immobilizasyonda yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek emiş kapasitesi ve enzimlerle geniş bir temas bölgesine sahip olan aktif kömür, enzim immobilizasyonunda kullanılan diğer inorganik taşıyıcılardandır (Kaur, Choudhar, Chaudhari, Jayant, & Joshi, 2019).

Son yıllarda enzim immobilizasyonunda kil minerallerinin kullanımı yaygınlaşmıştır. Kimyasal olarak inert olmaları, doğada bol miktarda bulunduklarından ekonomik olmaları, sıcaklığa karşı dayanıklı olmaları, kimyasal yapılarının iyi bilinmesi ve iyon değiştirici özellikleri inorganik destek materyali olan kil minerallerinin immobilizasyonda kullanılmasının en önemli sebeplerindendir (Cacciotti, Lombardelli, Benucci, & Esti, 2019). Son birkaç on yılda montmorillonit gibi silikat içeren kil minerallerine proteinlerin bağlandığı görülmüştür. Bununla beraber proteinlerin maksimum absorpsiyonunun izoelektrik noktasına (pI) yakın bir pH değerinde maksimuma ulaştığı bilinmektedir (Math, Kambiranda, Yun, & Ghebreiyessus, 2020).

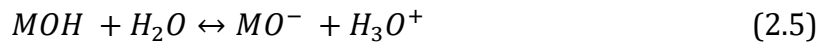
- **Montmorillonit**

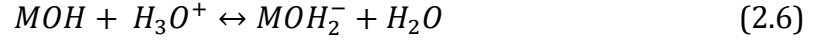
Kristal yapılarına göre kaolinit grubu, smektit grubu, illit grubu, klorit grubu olmak üzere dört ana gruptan oluşan kil mineralleri oktahedral veya tetrahedral atomik kristal yapıya sahip olabilir. Oktahedral yapı üçer oksijen ya da hidroksilden oluşan iki tabaka arasında iyice paketlenmiş katyon (alüminyum, demir ya da magnezyum) atomu modelidir. Silikat kil mineralleri, oktahedral ve tetrahedral tabakalardan oluşur (Kıraşan, 2015). Tetrahedral yapıda, merkezde bulunan silisyumun etrafında yapıya düzgün

dörtüzlü şeklini veren dört oksijen atomu yer almaktadır. Bir oksijen atomu iki silisyum ile bağlandığında katman denilen tabakalı yapıyı oluşturur. Çevresinde dört ya da altı oksijen atomunun bulunduğu alüminyum atomu ile oktahedral yapı meydana gelir ve şekil düzgün sekizyüzlüdür. Oksijen atomu iki alüminyum ile bağlandığında tabakalı yapıyı meydana getirmektedir (Ahanibarough, 2016).

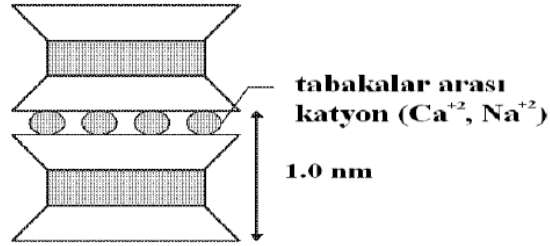
Organokillerin en çok kullanılanlardan biri olan montmorillonitin genel kimyasal yapısı $[Al_{1,67}Mg_{0,33}(Na_{0,33})]Si_4O_{10}(OH)_2$ şeklindedir. Montmorillonit (MMT), Fransa'nın Montmorillon bölgesi yakınlarında keşfedildiğinden bu ismi almıştır (Kıranşan, 2015). Montmorillonit, ekstrakte edildiği kil olan bentonit olarak da anılmaktadır (Ahanibarough, 2016). Dünya bentonit rezervinin yaklaşık %20'sine sahip olan ülkemizde işletilen bentonitlerin X-Işını Difraktometresi (XRD) analizleri sonucu çoğunluğunda montmorillonit mineraline rastlanmaktadır. Bu kil ham olarak yurtdışına satılıyor olmakla beraber Türkiye'deki işletmelerde mühendislik uygulamaları, hayvan yemi, kedi kumu ve deterjan üretimi gibi çok çeşitli sektörlerde değerlendirilmektedir (Bakır, Akbulut, Kapkaç, Karahan, & Çetin, 2012). Silikat içeriğine göre MMT'nin rengi kiremit kırmızısından soluk sarıya ya da mavi-yeşil bir renge dönüşebilir (Kıranşan, 2015). Yüksek şişme kapasitesine sahip MMT'nin spesifik yüzey alanı 750-800 m²/g arasındadır (Kıranşan, 2015; Ahanibarough, 2016). Bazal boşluğunda bulunan katyonlar, büyük boyutlu organik bileşiklerle yer değiştirebildiği için farmasötik alanında ilaç olarak ya da ilaç taşıyıcısı olarak kullanılmaktadır (Çiftçi, 2019).

Kildeki yüksek değerlikli katyonlarla düşük değerlikli katyonların yer değiştirmesi ve süspansiyon ortamındaki iyonik şiddet ve pH değişimlerine karşı tabaka köşelerindeki katyonların koordinasyonu sonucu olarak denklem (2.5) ve (2.6)'da verilen tepkimelerde gösterildiği gibi H₃O⁺, H₂O ve OH⁻ gibi fonksiyonel grupların oluşmasıyla doğal olarak negatif yüklü olan MMT'de elektriksel yükler meydana gelir (Çiftçi, 2019).

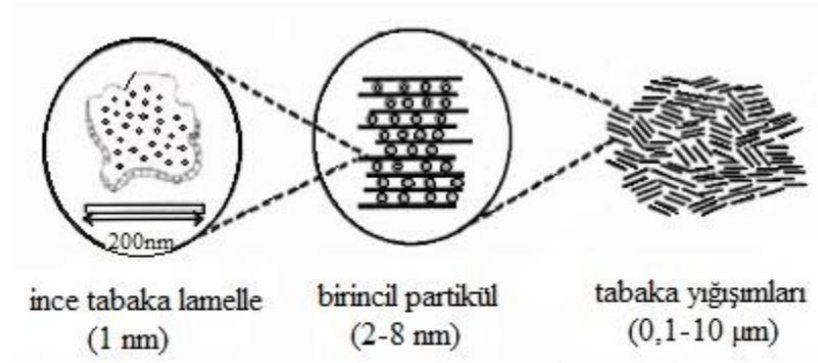




Montmorillonit kil, sodyum ve kalsiyum diye iki türe ayrılır (Ahanibarough, 2016). MMT'nin şematik olarak gösterimi Şekil 2.15'te verilmiştir (Kıraşan, 2015). Şekil 2.16 ise MMT'nin nano ve mikro ölçekte incelenen yapısının şematik gösterimidir (Kıraşan, 2015).



Şekil 2.15 MMT'nin yapısının şematik gösterimi



Şekil 2.16 MMT'nin mikro yapısının şematik gösterimi

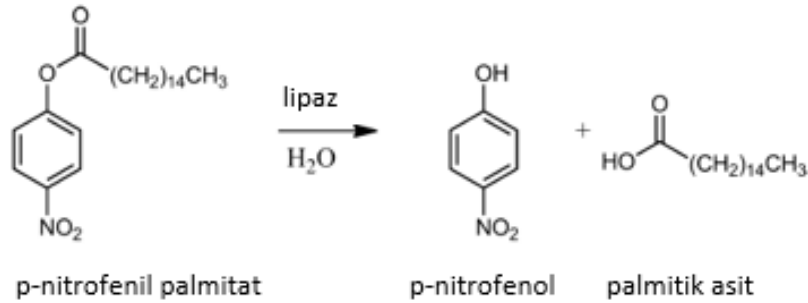
3.1 Lipazların Genel Özellikleri

Lipazların keşfi 1834'de Eberle tarafından pankreastan izole ile gerçekleştirilmiştir. Lipazlar, amilaz ve proteazlarla birlikte bilinen ilk üç ana sindirim enziminden biri olmuştur (İskender, 2019). Enzim sınıflandırma sisteminde sırasıyla hidrolazlar (E.C.3), ester bağlarını parçalayanlar (E.C.3.1), karboksilik ester hidrolazlar (E.C.3.1.1) ve triaçilgliserol hidrolazlar (E.C.3.1.1.3) içinde yer alan lipazlar; triaçilgliserolün, gliserol ve yağ asitlerine parçalanmasını katalize eden enzimdir (İskender, 2019; Öztürk, Pollet, Phalip, Güvenilir, & Avérous, 2016; Rajasekar, Tambe, & Datla, 2013; Jacob & Suthindhiran, 2019). Bununla birlikte, in vitro koşullarda lipazlar; esterleşme, transesterifikasyon ve asidoliz gibi doğal rolleriyle ilişkili olan çok sayıda reaksiyonu etkili bir şekilde katalize etmek için kullanılmıştır (Rodrigues, ve diğerleri, 2019). Genel olarak lipaz enzimi, pH aralığı 2,2-6,8 olan ve yüksek sıcaklıkta dahi yüksek stabiliteye sahip, geniş bir substrat yelpazesi olan ve yüksek substrat konsantrasyonlarında dahi çalışabilen, yalnızca sulu ortamda değil organik solventlerde de aktivite gösterebilen, ticari ulaşılabilirliği yüksek hidrolaz sınıfı enzim ailesindendir (Jacob & Suthindhiran, 2019; Rodrigues, ve diğerleri, 2019; Öztürk, Pollet, Phalip, Güvenilir, & Avérous, 2016; Rajasekar, Tambe, & Datla, 2013). Bu nedenle lipazlar biyoteknolojik uygulamalarda sıklıkla tercih edilen endüstriyel biyokatalizörlerdendir (Jacob & Suthindhiran, 2019). Lipazların endüstriyel uygulamalarda tercih edilmelerinin bir diğer sebebi ise substratlara karşı farklı seçicilikte olmasından ileri gelmektedir. Bunlardan ilki, hem yağ asidi hem de lipid sınıflarına karşı gösterdiği seçicilik olan kemo-seçiciliktir. Lipazlar lipid sınıflarından triaçilgliserol (TAG), diaçilgliserol (DAG) ve monoaçilgliserollere (MAG) karşı hidroliz spesifitesine sahiptir. Enantiyo seçicilik ise rasemik bir karışımdaki enantiyomerler arasında ayırım yapabilen lipazların varlığından ileri gelmektedir. Son olarak bölgesel (regio) spesifiklik ise lipazların TAG'ların tam

hidrolizini gliserol ve serbest yağ asitlerine rastgele bir şekilde katalize eden spesifik olmayan lipazlar ve TAG'ları sadece sn-1 ve sn-3 pozisyonlarında hidrolize eden spesifik 1,3-lipazlar olarak ikiye ayırmaktadır (Borrelli & Trono, 2015).

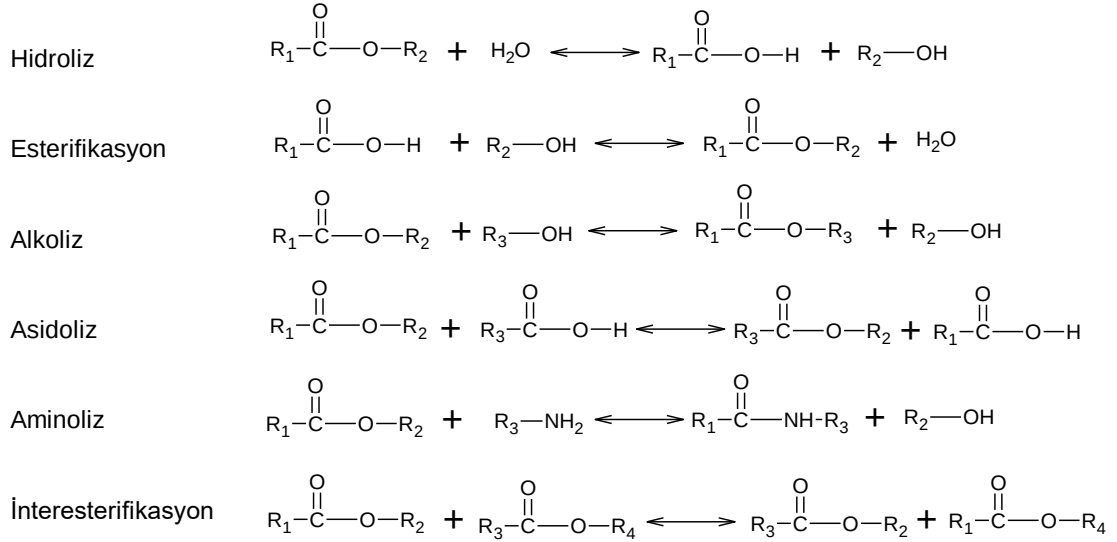
3.1.1 Lipazların Katalizlediği Reaksiyonlar

Aşırı su varlığı gibi doğal koşullar altında lipazlar organik-sulu arayüzeylere etki ederek hidroliz reaksiyonlarını katalizlerler. Karboksilat ester bağlarının hidrolizi sonucu serbest yağ asitleri ve organik alkol meydana gelir (Borrelli & Trono, 2015). Lipazlar tarafından gerçekleştirilen ester bağı hidrolizinin şematik gösterimi Şekil 3.1'de verilmiştir (Subinya, Steudle, Jurkowski, & Stubenrauch, 2015).



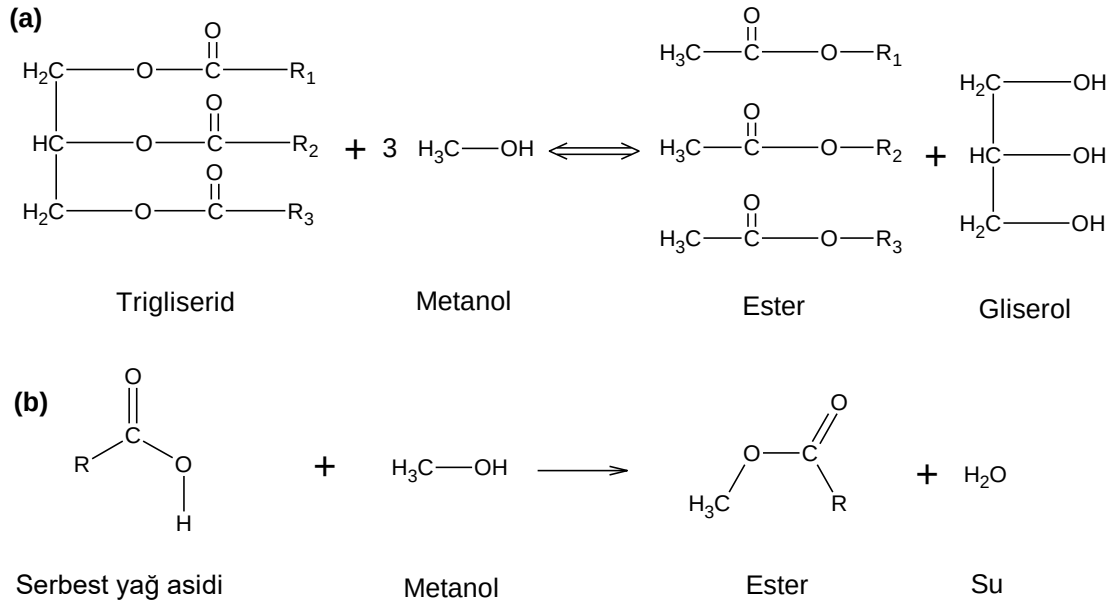
Şekil 3.1 Lipaz enziminin ester bağı hidrolizi reaksiyonu

İleri ve geri reaksiyonlar arasındaki denge, su aktivitesi (a_w) tarafından kontrol edildiğinden, sınırlayıcı su koşulları altında ters reaksiyon yani esterleşme meydana gelebilir. Düşük su aktivitesi varlığında, farklı transesterifikasyon reaksiyonları da elde edilebilir. Transesterifikasyon terimi, bir ester ve bir alkol (alkoliz), bir ester ve bir asit (asidoliz), bir ester ve bir amin (aminoliz) arasında veya iki ester arasında (interesterifikasyon) meydana gelebilir Şekil 3.2'de lipazların katalizlediği reaksiyonlar gösterilmiştir (Borrelli & Trono, 2015).



Şekil 3.2 Lipazların katalizlediği reaksiyonlar

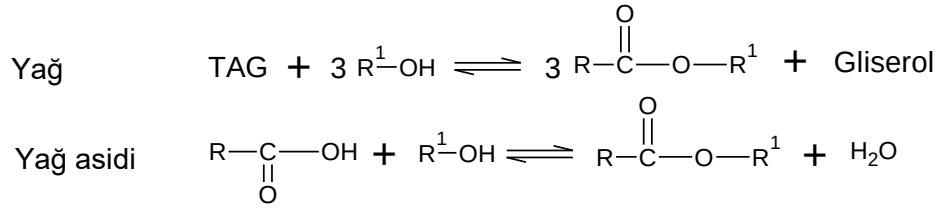
Şekil 3.3'te lipazların katalizlediği transesterifikasyon ve esterifikasyon reaksiyonları verilmiştir (Elgharbawy, Riyadi, Alam, & Moniruzzaman, 2018).



Şekil 3.3 Lipaz katalizli transesterifikasyon (a) ve esterifikasyon (b)

Lipaz katalizörü varlığında, yağ asidi metil esterlerinin (Fatty acid methyl esters-FAME) karışımlarını üretmek için karboksilik asit esterlerinin alkol ile reaksiyona girmesi işlemine ise transesterifikasyon denir. Bu reaksiyon kullanılarak biyodizel

üretimi gerçekleştirilmektedir. Biyodizel üretiminin özeti Şekil 3.4'te verilmiştir (Elgharbawy, Riyadi, Alam, & Moniruzzaman, 2018).



Katalizörler:

Kimyasal (alkali, asidik)

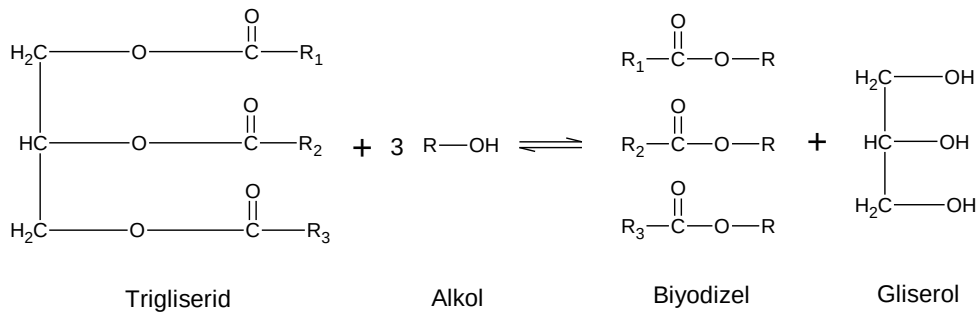
Biyokatalizörler (enzimler, hücreler)

Açıl reseptörler:

Alkoller

Şekil 3.4 Biyodizel üretiminin temel özeti

Transesterifikasyon reaksiyonunda 3 mol FAME ve 1 mol gliserol üretmek için mol başına 3 mol metanol gerekmektedir. Reaksiyon kütlece yaklaşık %90 yağ ve %10 metanol içeren bir karışımla başlar ve benzer oranda biyodizel ve gliserol ile biter. Transesterifikasyon reaksiyonunun sitokiyometrisi Şekil 3.5'te gösterilmiştir (Chen, ve diğerleri, 2018).



Şekil 3.5 Transesterifikasyon reaksiyonunun sitokiyometrisi

3.1.2 Lipazların Sınıflandırılması

Lipazlar; memeli lipazları, bitki lipazları, bakteriyel lipazlar, maya lipazları ve mantar lipazları olmak üzere beşe ayrılır: (Borrelli & Trono, 2015)

Memeli lipazları pankreatik lipaz gen ailesi (hepatik, endotelyal, lipoprotein, pankreas lipazı ile ilişkili protein 1-3) ve diğer lipazlar (hormona duyarlı lipaz ve safra tuzu ile uyarılan lipaz) olmak üzere ikiye ayrılır (Borrelli & Trono, 2015).

Bitkilerde lipazlar, yağlı tohumların yağ gövdelerinde, tahıl ve fasulye tohumlarında bulunur. Tohumlarda, fide büyümesi için enerji ve karbon sağlamak üzere serbest bırakılması gereken depolanmış yağ asitlerinin mobilizasyonu için lipolitik enzimlere ihtiyaç vardır. Bu nedenle, lipaz aktivitesi genellikle aşılammamış tohumlarda yoktur, ancak çimlenmeden sonra hızla ortaya çıkar. Lateks olarak bilinen kauçuk, ağaçların ürettiği sütlü öz suda lipaz aktivitesi mevcuttur (Borrelli & Trono, 2015).

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan lipazlar genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikrobiyal enzimlerin bitkisel ve hayvansal enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır (Gül, 2013). Kolay ve düşük maliyetli geri kazanım gibi biyoteknolojik avantajları nedeniyle, mikrobiyal lipolitik enzimler küresel hidrolaz pazarının yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. Bu enzimler daha az ham madde, kimyasal bileşikler, su ve enerji kullanarak aynı veya daha iyi kalitede ürünlerin üretilmesini sağlayarak endüstrilerin maliyetlerini düşürmekte ve daha az atık oluşturarak çevreye zarar vermeden istenen aynı ürün verimini elde etmektedir. Sürdürülebilir çevre ve enerji tasarrufu sağlayan yeşil strateji olarak sadece lipidleri değil, aynı zamanda hidrokarbonlar, sentetik plastikler ve pestisitleri de ayrıştırma yetenekleriyle bilinen mikrobiyal lipazlar sürecin yan ürünleri olarak katma değerli bileşiklerin üretimini de sağlamaktadır. Bunlara ek olarak, modifiye ve immobilize enzimlerin kullanılması lipid ve diğer hedef atığın arıtılması için geliştirilen stratejilerdendir. İmmobilizasyon ile enzimler, genellikle pahalı olan bu biyokatalizörlerin yeniden kullanılmasını sağlayan farklı destekleyici malzeme üzerinde tutulabilir. Enzimlerin immobilizasyonu aynı zamanda, hedef biyokatalizörün bazı içsel özelliklerinin iyileştirilmesini de sağlamaktadır (Kumar, ve diğerleri, 2020).

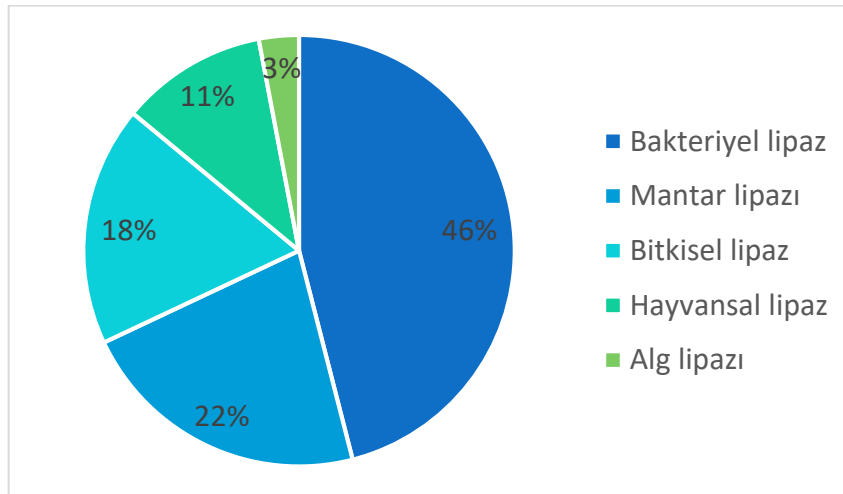
Bakteriyel lipazlar, sekiz aileden oluşan bakteriyel lipolitik enzimlerin I numaralı ailesindendir. Bu I numaralı aile, yapısal özellikler, salgılama mekanizması türleri ve diğer enzim aileleri ile ilişkiler açısından kendi içinde yedi alt aileye ayrılmıştır. Arpigny ve Jaeger sınıflamasına göre, II ila VIII aileleri esterazları içerir ve şu anda

ESTHER veri tabanının bir parçası olan XVI lipolitik enzim ailesi vardır (Borrelli & Trono, 2015).

Günümüzde sadece bakteriyel değil aynı zamanda maya, mantar ve memeli lipazlarını da içeren Lipaz Mühendislik Veri Tabanı'nda yeni bir sınıflandırma daha bildirilmiştir. Bu sınıflandırma lipazları üç sınıfa ayırır: GX, GGGX ve Y. Ayrıca bu sınıflandırma, amino asit dizisi benzerliklerine göre maya lipazları ve mantar lipazlarını, ikisi GX sınıfında, ikisi GGGX sınıfında ve biri Y sınıfında olmak üzere beş farklı alt sınıfa ayırmaktadır (Borrelli & Trono, 2015).

3.1.3 Lipazların Endüstriyel Kullanım Alanları

Lipazlar, reaksiyon çeşitliliği, organik ve sulu çözücülerde reaksiyona girebilme yeteneği, enantiyo-selektif özellikleri, enerji tasarrufu sağlama gibi pek çok yeteneklerinden dolayı endüstriyel uygulamalarda sıklıkla tercih edilmektedir (Kotogán, ve diğerleri, 2018; Ulker, Gokalp, & Guvenilir, 2016; Gholamzadeh, Mohammadi Ziarani, & Badiei, 2017). Lipazların endüstriyel uygulamadaki biyoçeşitliliği Şekil 3.6'da verilmiştir (Mehdizade, 2019).



Şekil 3.6 Endüstride kullanılan lipazların biyoçeşitliliği

Lipazlar, oleo-kimyasallar, süt, çay gibi gıda endüstrilerinden, ilaç, zirai kimyasal, deterjan, kozmetik, deri ve çeşitli çevresel iyileştirme (biyoremediasyon) süreçlerine kadar endüstriyel uygulamaların ayrılmaz bir parçasını oluşturur (Verma, Thakur, & Bhatt, 2012). Tablo 3.1'de lipazların katalizledikleri reaksiyonlara göre endüstride kullanım alanları verilmiştir (Gül, 2013).

Tablo 3.1 Lipazların endüstriyel kullanım alanları

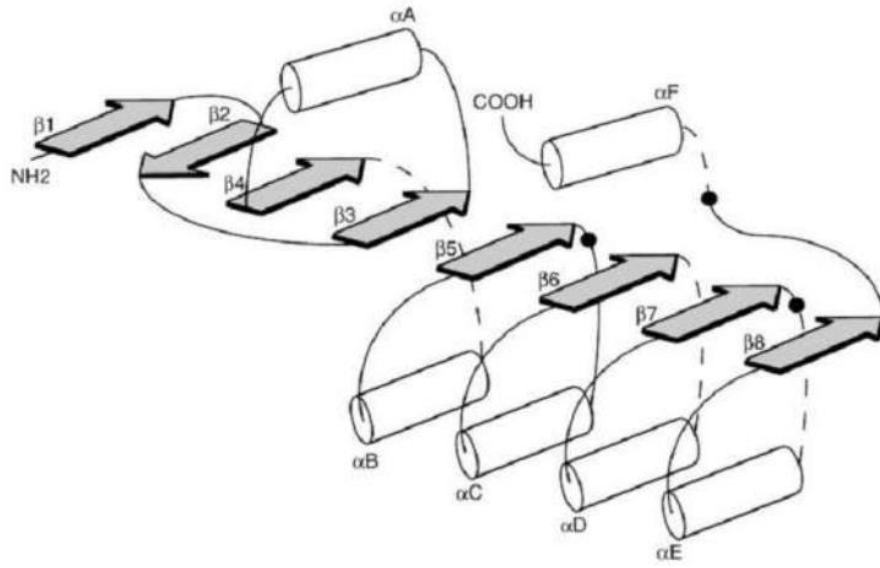
Endüstri alanı	Reaksiyon	Ürün uygulama alanları
Süt	Süt, yağ ve peynir hidrolizi	Peynir ve tereyağı aroması
İçecekler	Aroma arttırıcı	Alkollü içkiler
Sağlıklı yiyecekler	Transesterifikasyon	Sağlıklı yiyecekler
Et ve balık	Aroma arttırıcı	Yağı uzaklaştırılmış et ve balık ürünleri
Katı ve sıvı yağlar	Transesterifikasyon, hidroliz	Kakao yağı, margarin, gliserol, mono ve digliseritler
Kozmetik	Esterifikasyon	Deri ve güneş kremleri, güneş yağları
Temizlik	Biyoparçalayıcı suşları azaltma	Gıyceklerin temizliği
Zirai kimyasallar	Esterifikasyon	Herbisitler
Farmasötikler	Alkollerin hidrolizi	İlaç yapımında kullanılan ara ürünlerin üretimi
Petrol endüstrisi	Transesterifikasyon	Biyodizel üretimi
Kirlilik kontrolü	Hidroliz, yağların transesterifikasyonu	Zararlı suşların uzaklaştırılması ve atık yağların hidrolizi

Lipaz enziminin en önemli uygulama alanlarından birisi deterjan endüstrisidir. Deterjanlarda kullanılacak lipazların aktivitesini sergileyebilmesi için, ısıya, alkali pH'lara ve şelatlama ajanlarına karşı dirençli olması gerekmektedir. Enerji tasarrufu açısından düşük sıcaklıkta dahi etkili deterjan üretimi giderek önem kazanan endüstriyel uygulamalardandır. (Şengel, 2007). Lipazların endüstriyel uygulama alanlarından olan deterjan sanayii, aynı zamanda gıda ve kozmetik gibi endüstri dallarında da uygulama alanı bulunmaktadır. Gıda endüstrisinde deterjanlarla temizleme işlemi dezenfeksiyon öncesi uygulanan bir yöntemdir. Dezenfeksiyon öncesi uygulanan dekontaminasyon yönteminde ve dezenfeksiyonda alkali, asidik,

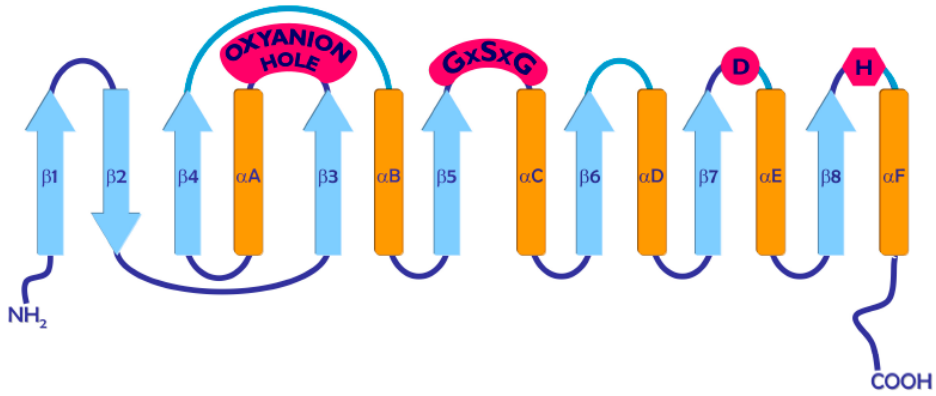
nötral karakterli bileşikler; Ca ve Mg birikmelerini önlemek amacıyla şelat oluşturan bileşikler; bakteri, mantar ve protozoalara karşı etkili olduğu bilinmesiyle yaygın bir kullanımı olan kuaterner amonyum bileşikler kullanılarak deterjan sınıflarındandır. Temizlik ürünlerinin temel bileşeni olan alkali bileşikler, proteinleri etkili bir şekilde çözme yeteneğine sahiptir. Deterjanlarda kullanılan başlıca alkali bileşiklere NaOH, Na₂CO₃, KOH, NH₄OH örnek verilebilir (Karagözlü & Karagözlü, 2004). Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Ag⁺, Mn²⁺, Hg²⁺, Cd²⁺ gibi metal tuzlarının lipaz enziminin aktivitesini azalttığı hatta enzimi inhibe ettiği keşfedilmiştir. Narin kumaşları, insan sağlığını ve çevreyi koruma adına enzimler genel amaçlı üretilen deterjanlarda bulunmaktadır. Genel temizlik amacıyla üretilen deterjanlarda daha iyi bir yıkama performansı için non-iyonik ve anyonik yüzey aktif maddelerin kullanımı tercih edilmektedir (Şengel, 2007). Deterjanlarda bulunan yapı oluşturuucu maddeler genellikle sodyum, şelat oluşturuucu maddeler amino grubu içerir. Ayrıca deterjanlarda çeşitli tuzlar, elektrolitler ve boyalar da bulunmaktadır (Gündüz Balpetek & Gülümser, 2016).

3.1.4 Lipazların Yapısal Özellikleri ve Katalitik Mekanizmaları

Lipazların molekül boyutları, tiplerine göre değişiklik göstermektedir. 19,4 kDa kadar küçük boyutlu lipazlar olmasına rağmen her bir altbirimi yaklaşık 50 kDa olan 300 kDa'dan daha büyük oligomerik yapıya sahip lipazlar da bulunmaktadır. Lipazların primer dizilerdeki amino asit sayılarında farklılık olmakla beraber bütün lipazların aktif bölgesinde serin, aspartat, glutamat ve histidin amino asitleri bulunmaktadır. Lipazların α -sarmal ve β -yaprak yapıları Şekil 3.7'de şematik olarak gösterilmiştir (İskender, 2019). Şemada silindirler α -sarmallarını, oklar β -yapraklarını simgelemektedir. Aktif bölge kalıntıları ise (Ser, Asp/Glu, His) siyah yuvarlak halinde gösterilmiştir. Lipazların üç boyutlu yapılarındaki ortak benzerlik birbirine paralel sekiz β -sheet ve bunları çevreleyen α -helikslerdir (İskender, 2019). α/β hidrolazların standart katlanması Şekil 3.8'de verilmiştir (Borrelli & Trono, 2015).

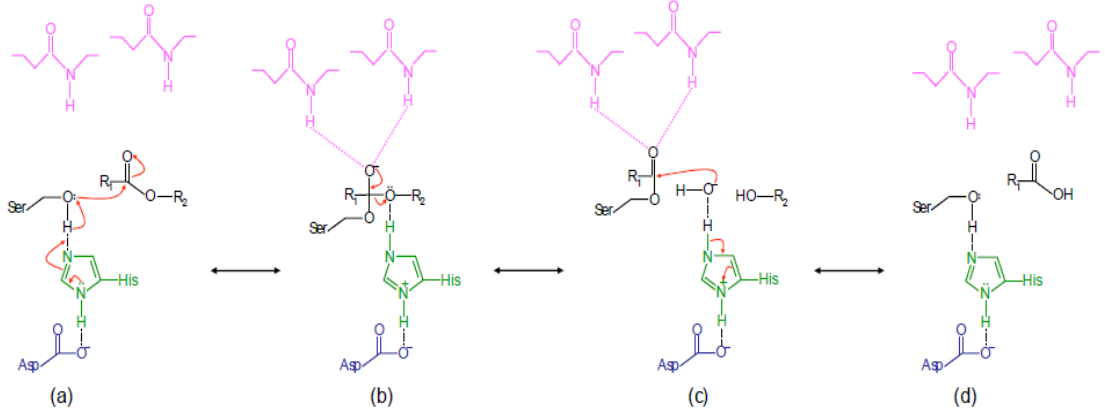


Şekil 3.7 Lipazların α -sarmal ve β -yaprak yapılarının şematik gösterimi



Şekil 3.8 α/β hidrolazların standart katlanması

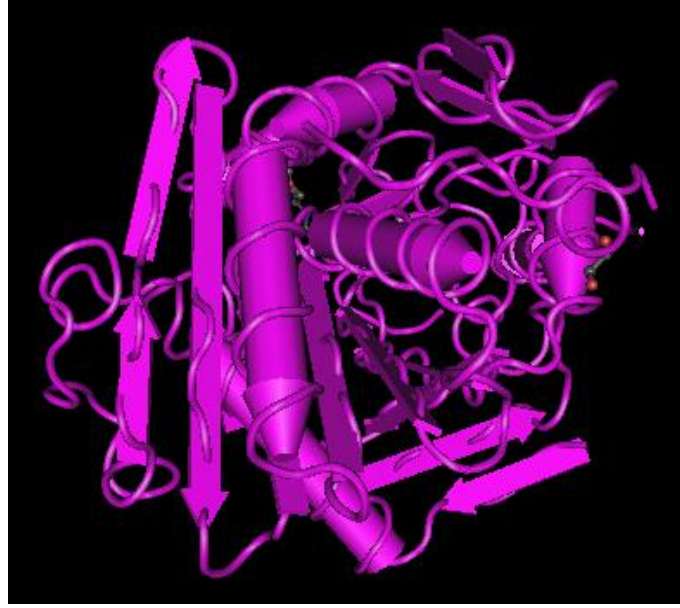
Şekil 3.9 'da mavi ve yeşil renklerle gösterilenler sırasıyla aspartat ve histidin; siyah renkte gösterilenler serin, substrat ve su molekülleridir. Oksyanyon deliği kalıntıları mor ile gösterilmiş olup, (a) duyarlı ester bağının karbonil karbonuna serin hidroksilin nükleofilik saldırısı; (b) tetrahedral ara ürün; (c) açıl-enzim ara maddesi, salınan alkol ve su ile nükleofilik saldırı; (d) serbest enzim ve serbest bırakılmış açıl ürününü göstermektedir (Borrelli & Trono, 2015).



Şekil 3.9 Lipazlar tarafından katalizlenen ester bağlarının hidroliz mekanizması

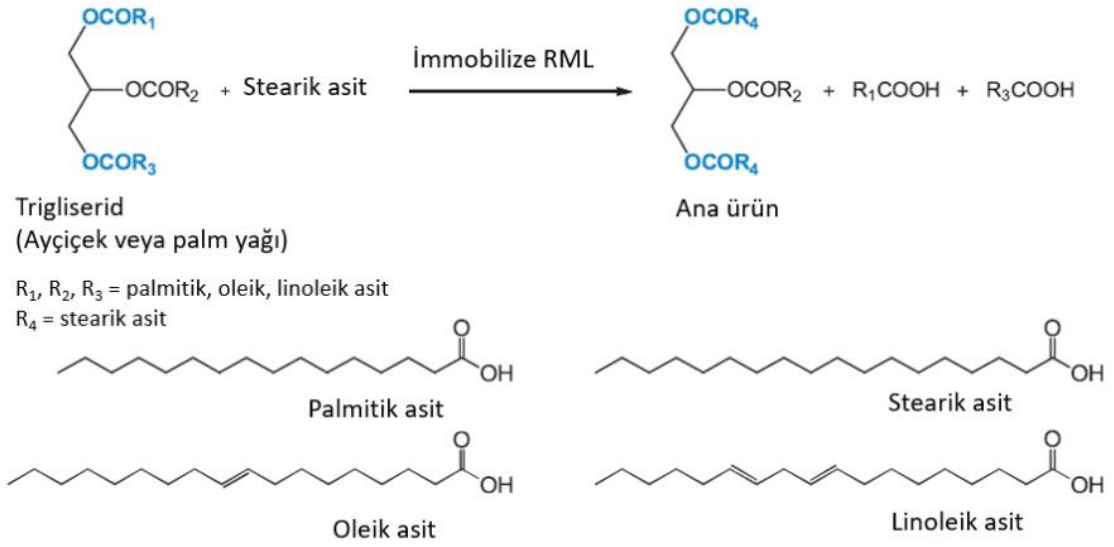
3.1.5 *Rhizomucor miehei* Lipazı

Bir mantar olan *Rhizomucor miehei*'den elde edilen *Rhizomucor miehei* lipazı (RML), yapısal lipidlerin ve biyodizelin hazırlanması, kiral ilaçların enantiyomerik ayrılmasında yaygın olarak kullanılan bir biyokatalizördür (Huang, ve diğerleri, 2020). Bu enzim 31.600 Da moleküler ebadı ve 3,8 izoelektrik noktası olan kararlı bir enzimdir. RML'de 35 adet aspartik ve glutamik kalıntısı ve 10 lizin parça kalıntısı vardır (Zhong, Chen, Liu, & Chen, 2019). RML'nin X-Işını Difraksiyonu Şekil 3.10'da verilmiştir (National Center for Biotechnology Information, 2019).



Şekil 3.10 *Rhizomucor miehei* lipazının X-ışını difraksiyonu

Gıda endüstrisinde yaygın bir kullanıma sahip olan RML, çözünür ve immobilize formlarda ticari olarak satılmaktadır. Şekil 3.11’de RML’nin gıda endüstrisinde kullanımına örnek bir reaksiyon verilmiştir (Basso & Serban, 2019). Bu reaksiyonda su içermeyen sistemde *Rhizomucor miehei*’den elde edilmiş 1,3 seçici immobilize lipaz tarafından katalize edilen transesterifikasyon reaksiyonu ile kakao yağı analoglarının üretimi gerçekleştirilmektedir. Bu lipaz yağ/su arayüzlerinde, aktif bölgenin girişindeki tüm yüzeyi değiştirerek, onu daha hidrofobik hale getiren ve böylece lipid bağlama özelliklerini değiştiren önemli konformasyonel değişiklikler gösterir. Farklı çözücüler RML’nin dinamiği üzerindeki önemli etkiler sergilemektedir. RML’nin özgülüğünde, farklı yağ asitleri kullanılarak da değişiklikler meydana gelmektedir (Verdasco-Martín, Garcia-Verdugo, Porcar, Fernandez-Lafuente, & Otero, 2018). *Rhizomucor miehei*’den elde edilen lipazın aktif bölgeyi kapatan kısmının arayüzey aktivasyonu sonrası 7 Å’den fazla hareket ettiği ve hidrofobik yüzeyinin 750 Å² kadar arttığı keşfedilmiştir (Urrutia, ve diğerleri, 2018). RML’nin farklı sıcaklıklarda ve farklı hidrofilik ve hidrofobik çözücülerle yapılan dinamiklerinin analizi çalışmalarında yüksek sıcaklık ve hidrofobik çözücüler varlığında bu enzimin stabilitesinde azalmalar meydana geldiği gözlenmiştir. Bu dezavantajları ortadan kaldıracı için immobilizasyonu önerilir (Peters, Toxvaerd, Ande, & Svendsen, 1999).

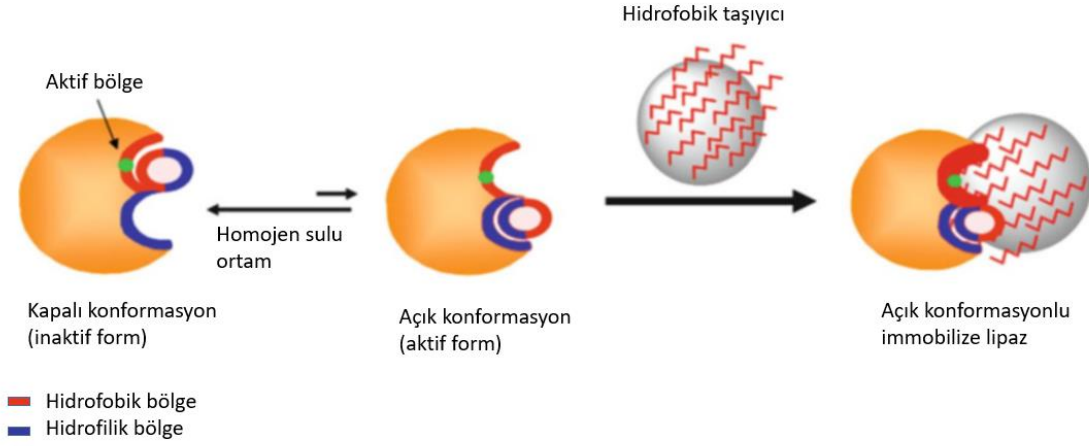


Şekil 3.11 Transesterifikasyon ile kakao yağı analoglarının üretimi

Maliyet, RML'nin büyük ölçekli uygulamasını sınırlayan anahtar faktör olmaya devam etmektedir. RML verimindeki artış ve üretim maliyetindeki azalma önemli hedeflerdir (Huang, ve diğerleri, 2020). Bu nedenle endüstriyel ölçekte maliyet azaltmada RML'nin immobilizasyonu önem arz etmektedir.

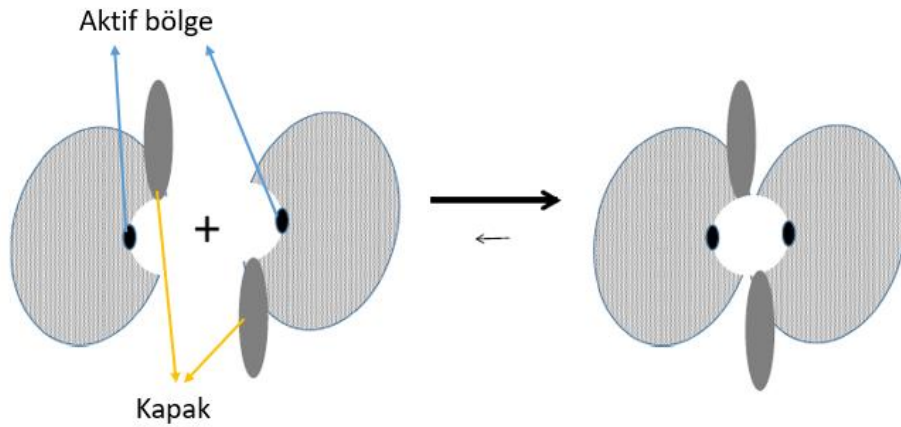
3.2 Lipaz İmmobilizasyonu

Lipaz molekülünün aktif merkezi, kapak olarak bilinen bir polipeptid zinciri ile kapalıdır (Liu, Ma, & Shi, 2020). Bu kapak, enzimi organik ortamlarda reaksiyon katalizine uygun hale getirir (Kumar, ve diğerleri, 2020). Bu kapağın enzimin reaksiyonu katalizleyebilmesi için immobilizasyon sırasında ortadan kalkması gerekmektedir (Yadav, Vadgama, Kavadia, Odaneth, & Lali, 2019). Bu ise arayüzey aktivasyon mekanizması yoluyla gerçekleşir (Jacob & Suthindhiran, 2019). Lipazın arayüzey aktivasyonu lipaz immobilizasyonunda anahtar bir faktördür (Liu, Ma, & Shi, 2020). Bir hidrofobik destek malzemesi üzerine bağlanma lipazın moleküler yapısını daha aktif bir forma dönüştürür (Jacob & Suthindhiran, 2019). Hidrofobik bir yüzey varlığında, lipaz açık form olarak sabitlenir ve aktif merkez kataliz için tamamen açığa çıkar (Yadav, Vadgama, Kavadia, Odaneth, & Lali, 2019). Hidrofobik bir taşıyıcıya lipaz enziminin immobilizasyonuna ait şematik gösterim Şekil 3.12'de verilmiştir (Guisan, 2013).



Şekil 3.12 Hidrofobik yüzeye lipaz immobilizasyonu

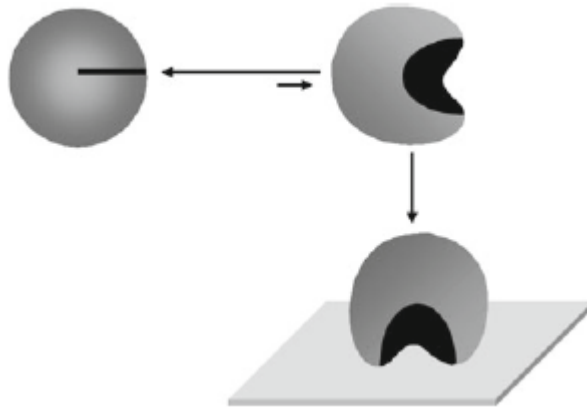
Ayrıca, iki açık lipaz molekülü, lipazın aktif merkezini çevreleyen büyük hidrofobik yüzey yoluyla birbirleriyle etkileşime girerek arayüzeyler aktivasyona uğrayabilir (Yıldırım, Baran, Ates, Yazıcı, & Tukel, 2019). Arayüzey aktivasyonu Şekil 3.13'te gösterilmiştir (Rodrigues, ve diğerleri, 2019).



Şekil 3.13 İki lipaz molekülünün arayüzey aktivasyonu

Lipazların hidrofobik destek üzerine immobilizasyonu klasik bir hidrofobik immobilizasyondan farklıdır. Bu fark, immobilizasyonun düşük iyonik güçte gerçekleşmesi gerekliliğinden ileri gelmektedir. Bu strateji, lipazların diğer enzimlerden pürifikasyonunu da mümkün kılmaktadır. Yüksek iyonik mukavemetin kullanılması, lipaz immobilizasyonunu iyileştirmekten çok, onu yavaşlatır ve bu immobilizasyon yoluyla elde edilen saflaştırmanın etkinliğini azaltır (Rodrigues, ve

diğerleri, 2019). Lipaz immobilizasyonu için uygulanan yöntemler arasında, hidrofobik taşıyıcılar üzerinde adsorpsiyon en kritik ve yararlı tekniklerden biri olarak kabul edilir. Bağlanma kuvvetleri zayıf olmasına rağmen, lipaz hidrofobik desteğe kümülatif olarak sıkıca tutunur; böylelikle doğal yapı ve aktivite korunur (Yadav, Vadgama, Kavadia, Odaneth, & Lali, 2019). Ayrıca hidrofobik destek üzerine immobilizasyonda aktif merkezin açığa çıkması arayüzey aktivasyonu açısından da önemlidir. Şekil 3.14'te hidrofobik desteğe lipaz adsorpsiyonuyla aktif merkezin açığa çıktığı ve enzimin aktivitesinin arttığı gösterilmektedir (Guisan, 2013).



Şekil 3.14 Lipazın hidrofobik desteğe adsorpsiyonu ile hiperaktivasyonu

Tüm lipazlar belirli bir destek için aynı afiniteye sahip değildir. Hidrofobik özelliği fazla olan destek üzerine immobilize edilemeyen ancak daha az hidrofobik bir başka destek üzerinde immobilize edilmiş bazı lipaz örnekleri bulunmaktadır (Rodrigues, ve diğerleri, 2019).

Fiziksel adsorpsiyon, destek materyalinin aktifleştirilmesine gerek olmadığı için basit bir tekniktir. Adsorpsiyonda enzimin konformasyonu korunarak immobilize enzimin katalitik aktivitesi nispeten artmaktadır. Enzim özütlemesi, farklı reaksiyon koşullarında hareketsizleştirilmiş enzimin kullanımını sınırlandıran kritik bir sorundur. Bu sorunu çözmek için polimer içinde enzimin tuzaklanması sağlanır. Böylece operasyonel stabilite artırılır, enzim sızıntısı azaltılır, enzim konformasyonları korunur ve yüksek katalitik aktiviteler sağlanır. Kimyasal yöntemlerle de immobilize edilebilen lipaz için en sık kullanılan kimyasal immobilizasyon yöntemleri arasında kovalent ve çapraz bağlama yer alır. Lipazın

kimyasal yöntemle de kimyasallarla modifiye edilmiş destek üzerine bağlanması enzim kaçıışı en aza indirilmekte ve çok noktalı bağlanma ile operasyonel stabilitede artış sağlanmaktadır (Liu, Ma, & Shi, 2020).

Saflaştırıldıkları farklı mikroorganizmaların cins ve türünden kaynaklı olarak lipaz metodolojilerini standardize etmek zordur. Genel olarak lipazın aktif bölgesi bir serin, bir aspartat veya glutamat ve bir histidinden oluşur (Binhayeeding, Yunu, Pichid, Klomklao, & Sangkharak, 2020).

4.1 Materyal**4.1.1 Kullanılan Cihazlar**

Tezde kullanılan cihazların isim, marka ve model bilgileri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1 Tezde kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka ve Modeli
Hassas terazi	Sartorius Extend ED224S ve LE623S
Vortex	IKA MS3 Basic vorteks
Mikrosantrifüj	Hettich EBA-20
Spektrofotometre	Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS
Buzdolabı	Bosch
Derin dondurucu	Uğur
Manyetik ısıtıcı	Chiltern Hotplate HS31
Çalkalamalı su banyosu	GFL 1086
Distile su cihazı	ELGA LA620
pH metre	Sartorius PB-11
Etüv	Memmert UFB 400

4.1.2 Kullanılan Kimyasallar

Tezde kullanılan kimyasallar Merck, Fluka, Sigma-Aldrich ve RIEDEL-de Haën firmalarından temin edilmiştir. Tüm kimyasallar analitik saflıkta olup kimyasalların isim, marka ve katalog numaraları Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2 Tezde kullanılan kimyasallar

Kimyasalın Adı	Markası	Katalog Numarası
Alüminyum klorür hekzahidrat	Merck	1084.1000g
Amonyum sülfat	Fluka	09978-1KG
Asetik asit	Sigma-Aldrich	33034
BSA	Fluka	05470-1g
Bakır (II) sülfat pentahidrat	Merck	1.02787.1000g
Çinko sülfat heptahidrat	Merck	1.08881.1000g
Demir (II) sülfat heptahidrat	Merck	1.03965.0500g
Demir (III) klorür	Fluka	44943-50g
Folin & Ciocalteu Fenol Reaktifi	Sigma-Aldrich	F9252-100ML
Glisin	Merck	1.04169.0250g
Hidroklorik asit	Sigma-Aldrich	07102-2.5L
Kalsiyum klorür dihidrat	RIEDEL-de Haën	12022-1kg
Magnezyum sülfat heptahidrat	Fluka	1.05886.1000g
Mangan (II) sülfat	Sigma-Aldrich	M7634-100G
Montmorillonit K-10 (yüzey alanı 220-270 m ² /g)	Sigma-Aldrich	281522-100G
Mowiol 28-99	Sigma-Aldrich	10849-250G
n-Hekzan	Sigma-Aldrich	208752-2.5L
<i>Rhizomucor miehei</i> lipaz (20.000 U/g)	Sigma-Aldrich	L4277-50ML
Sodyum asetat	Merck	1.06268.1000g
Sodyum karbonat	RIEDEL-de Haën	13418-1kg
Sodyum fosfat dibazik	Sigma-Aldrich	S7907-100G
Sodyum fosfat monobazik	Sigma-Aldrich	S-0751-100g

Tablo 4.2 Tezde kullanılan kimyasallar (devamı)

Sodyum dodesil sülfat	Merck	1.13760.0100g
Sodyum hidroksit	Merck	1.06462.1000g
Sodyum klorür	Merck	1064060050g
Sodyum tartarat	Sigma-Aldrich	S.2377-1KG
Tris(hidroksimetilaminometan)	Merck	1.08383.0500g
Triton X-100	Fluka	93426-100ml
Tween-80	Fluka	93780-100ml
4-nitrofenil palmitat	Sigma-Aldrich	N2752-5G

4.1.3 Kullanılan Malzemeler

Tezde temel laboratuvar malzemeleri olarak tartım kabı, spatül, pens, beher, erlen, balon joje, huni, kimyasal şişesi, vakumlu cam desikatör, vakum pompası, deney tüpü, santrifüj tüpü, manyetik balık, saat camı, mikropipet ucu, Pasteur pipeti, Falcon tüp, polistiren plaka, tek kullanımlık polistiren küvet, piset, pipet, puar, adi süzgeç kağıdı ve parafilm kullanılmıştır.

4.2 Metod

4.2.1 RML'nin Montmorillonit K-10'a İmmobilizasyonu

Rhizomucor miehei lipaz (RML), montmorillonit K-10 (MMT) üzerine immobilize edildi. 0,05 M, pH 6 sodyum-fosfat tamponu içinde hazırlanan 0,5 mL enzim çözeltisi (1 mg/mL), 1 g montmorillonit K-10'a ilave edildi ve su banyosunda 15 °C'de çalkalanarak gece boyunca (15 saat) bekletildi. Daha sonra taşıyıcı filtrasyon ile ayrıldı ve bağlanmayan enzimi uzaklaştırmak için 250 mL distile su ile yıkandı. Taşıyıcı kurutuldu ve +4 °C'de saklandı.

4.2.2 RML'nin Polivinil Alkol Jel İçinde İmmobilizasyonu

PVA hidrojel kapsüllerinde RML'nin immobilizasyonu Rebroš ve diğerlerine göre yapıldı (Rebroš, ve diğerleri, 2013). 10 g PVA (Mowiol 28-99), 80 mL distile suya ilave edildi ve karışım, PVA'yı eritmek için su banyosu içinde 90 °C'de ısıtıldı. 25 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, 5 mL PVA çözeltisine 1 mg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde 50 mM pH 7,5 sodyum-fosfat tamponu ile seyreltilmiş 1 mL RML çözeltisi eklendi. PVA-RML karışımından 0,1 mL'lik bir örnek alındı ve bir polistiren plakanın yüzeyine düzgün ve hızlı bir şekilde damlatıldı. İmmobilize örnekler oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra +4 °C'de saklandı.

4.2.3 Protein İçeriği Tayini

Protein tayini Lowry testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951). Bu testte alkali ortamda proteinlerdeki peptid bağları ile Cu^{2+} iyonları kompleks oluşturarak Cu^{+1} iyonlarını meydana getirir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan tirozin, triptofan ve sistein amino asitleri Folin-Ciocalteu reaktifini indirgeyerek mavi renk oluşumuna neden olur. Oluşan bu rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve 750 nm'de polistiren küvetlerle spektrofotometrik olarak ölçülür.

Protein miktar tayininde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları aşağıda verilmiştir:

A çözeltisi: %2'lik sodyum karbonat çözeltisi (0,1 N sodyum hidroksit çözeltisi içinde çözünerek hazırlandı).

B çözeltisi: % 1'lik bakır sülfat çözeltisi ile %2'lik sodyum potasyum tartarat çözeltisi eşit hacimde (1:1) karıştırılarak hazırlandı. Her defasında taze hazırlanan karışım kullanıldı.

C çözeltisi: 50 mL A çözeltisi ve 1 mL B çözeltisi karıştırılarak taze olarak hazırlandı.

Folin & Ciocalteu Fenol Reaktifi: Kullanım öncesi 1:1 oranda distile su ile seyreltildi.

Protein Standart Çözeltileri: Protein standart çözeltileri 0,0175-0,035-0,07-0,14-0,28 mg/mL BSA içerecek şekilde distile su ile seyreltilerek hazırlandı.

MMT-RML'nin yıkama suyunun 1 mL'si ve protein içeriği tespit edilebilmek için deforme edilmiş bir adet PVA-RML ile üzerine 3 mL C çözeltisi eklendi ve vorteksle

karıştırılarak oda ısısında 10 dakika bekletildi. Örneklerin protein tayini için numune ile aynı şekilde muamele edilen distile su (1 mL) boş referans olarak kullanıldı. Her bir tüpe 0,3 mL Folin reaktifi eklenip vorteks ile karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. 750 nm'de köre karşı spektrofotometrede absorbanslar okundu. Numunelere ait protein değerleri, çalışma standart çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri ile çizilen grafik kullanılarak hesaplandı. MMT-RML için tüm numuneye yüklenen protein miktarından yıkama suyunda bulunan toplam protein miktarı çıkarılarak adsorbe olmuş olan protein miktarı hesaplandı. PVA-RML için ise bir lense bağlanan protein miktarı toplam lens sayısı ile çarpılarak enkapsülenmiş enzim miktarı hesaplandı.

4.2.4 İmmobilizasyon Verimi Tayini

İmmobilizasyon verimleri destek materyaline immobilize olmuş protein miktarı ile toplam yüklenen protein miktarı arasındaki oranın yüzdesidir. MMT-RML ve PVA-RML için immobilizasyon verimleri denklem (4.1) ile hesaplandı.

$$\text{İmmobilizasyon verimi} = \frac{\text{Bağlanan protein miktarı}}{\text{Yüklenen toplam protein miktarı}} \times 100 \quad (4.1)$$

Lipazın hidrolitik aktivitesi Pencreac'h ve Baratti (1996) metoduna göre 410 nm dalga boyunda *p*-nitrofenil palmitatın (*p*-NPP) hidrolizi ile belirlendi. Yönteme göre 5 mg immobilize lipazın üzerine 1 µL sodyum-fosfat tamponu (50 mM, pH 7,5) eklendi. Reaksiyon, 35 °C'de hekzan içinde çözülmüş 5 mM 0,5 mL *p*-NPP ilavesiyle başlatıldı. Serbest enzim kullanıldığında, hekzan içinde hazırlanmış 5 mM 0,5 mL *p*-NPP, sodyum-fosfat tamponu (50 mM, pH 7,5) içinde hazırlanan 20 µL serbest lipaz çözeltisine (1 mg/mL) 35 °C'de eklendi. Karışım 2 dakika 100 rpm'de çalkalandı. Reaksiyon distile su ile hazırlanmış 0,1 M 4 mL NaOH çözeltisi eklenerek durduruldu ve oluşan *p*-NP miktarı bir spektrofotometre ile 410 nm'de ölçüldü. MMT-RML örnekleri, 410 nm'de absorbans değerleri ölçülmeden önce 2 dakika boyunca 10.000 rpm'de santrifüj edildi.

Numunelerin hidrolitik lipaz aktivitesi Pencreac'h ve Baratti metoduna göre hesaplandı (Pencreac'h & Baratti, 1996). Yöntemde, lipaz standartlarının ve

numunelerin 410 nm'de absorbanlarının değişimi 2 ila 5 dakika boyunca izlenmiş ve reaksiyon hızı, *p*-nitrofenol için $12,75 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ 'lük bir görünür molar sönme katsayısı kullanılarak, absorbanın zamana bağlı eğrisinin eğiminden hesaplanmıştır.

Lipaz aktivitesi (IU) 35 °C'de ve pH 7,5'ta 1 dakikada 1 mikromol *p*-nitrofenilpalmitatın hidroliz ürünü olan *p*-nitrofenolü oluşturmak için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanır (Seghal Kiran, Nishanth Lipton, Kennedy, Dobson, & Selvin, 2014).

ϵ , molar sönme katsayısı, b , ışık yolu, c konsantrasyon olmak üzere, aktivite değerlerini hesaplamak üzere Lambert-Beer eşitliği'nden yararlanıldı (4.2).

$$A = \epsilon \times b \times c \quad (4.2)$$

Denklem (4.2), aktivite hesaplamak için düzenlendiğinde; ϵ değeri $12,75 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ ve b değeri 1 cm olmak üzere;

$$A = \frac{12,75 \times 10^6 \text{ cm}^2}{\text{mol}} \times 1 \text{ cm} \times c \quad (4.3)$$

denklem (4.3) elde edilir. Bu denklem konsantrasyon üzerinden düzenlenirse,

$$c = \frac{A}{12,75 \times 10^6 \text{ cm}^3/\text{mol}} \quad (4.4)$$

halini alır. Denklem (4.4) üzerinde cm^3 ile mL dönüşümü uygulandığında ise denklem,

$$c = A \times \text{mol} / 12,75 \times 10^6 \text{ mL} \quad (4.5)$$

(4.5) olur. Bu denklemde mol birimi $10^6 \mu\text{mol}$ ile değiştirilirse denklem;

$$c = \frac{A}{12,75} \mu\text{mol} / \text{mL} \quad (4.6)$$

(4.6)'teki gibi düzenlenebilir.

p-nitrofenol için, ϵ , molar sönme katsayısı, V ml cinsinden hacim, t dakika cinsinden reaksiyon süresi olmak üzere; U/mg cinsinden aktivite, denklem (4.7) kullanılarak hesaplandı (Junior, ve diğerleri, 2020).

$$Aktivite (U/mg protein) = \frac{Absorbans}{\epsilon} \times \left(\frac{V_{substrat}}{V_{enzim}} \right) \times \left(\frac{1}{t} \right) \quad (4.7)$$

4.2.5 Serbest ve İmmobilize RML Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi

Serbest ve immobilize edilmiş lipaz aktivitesi üzerindeki sıcaklığın etkisi, pH 7,5'te 25 ila 65 °C arasında değişen farklı sıcaklıklarda çalışıldı. pH'ının serbest ve immobilize lipaz aktivitesi, 4 ila 10 arasında değişen pH değerlerinde ve optimum sıcaklıkta gerçekleştirildi. Kullanılan tamponlar arasında 0,05 M sodyum-asetat tamponu (pH 4,0-5,5), 0,05 M sodyum-fosfat tamponu (pH 6,0-7,5), 0,05 M Tris-HCl tamponu (pH 8,0-9,5) ve 0,05 M Glisin-NaOH tamponu (pH 10,0) bulunmaktadır. Bağlı lipaz aktiviteleri, maksimum enzim aktivitesinin yüzdesi (%) olarak hesaplandı ve sonuçlar üç denemenin ortalaması olarak verildi.

4.2.6 Serbest ve İmmobilize RML Üzerine Tampon Çözelti Konsantrasyonunun Etkisi

Serbest ve immobilize edilmiş lipaz aktivitesi üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi incelendi. 35 °C'de pH 7,5 sodyum-fosfat tamponunun 25-100 mM konsantrasyon aralığında lipaz aktivite tayini gerçekleştirildi. Bağlı lipaz aktiviteleri, maksimum enzim aktivitesinin yüzdesi (%) olarak hesaplandı ve sonuçlar üç denemenin ortalaması olarak verildi.

4.2.7 Serbest ve İmmobilize RML'nin Depolama Kararlılığı

Polivinil alkol lens (PVA) teknolojisiyle ve montmorillonit K-10'a (MMT) adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilen RML +4 °C'de kurutuldu (Rebroš, ve diğerleri, 2013). Tamamen kuruyan PVA-RML ve MMT-RML'nin aktivitesinin ölçüldüğü ilk gün 0. gün olarak kabul edildi. +4 °C'de depolanan serbest ve immobilize enzimlerin haftalık periyotlarla aktivite tayinleri optimum koşullarında gerçekleştirilerek depolama kararlılıkları tespit edildi. Bağlı lipaz aktiviteleri, maksimum enzim aktivitesinin yüzdesi (%) olarak hesaplandı ve sonuçlar üç denemenin ortalaması olarak verildi.

4.2.8 Serbest ve İmmobilize RML'nin Termal Kararlılığı

RML'nin termal kararlılığını incelemek üzere serbest ve immobilize edilmiş lipaz örnekleri 5-65 °C aralığındaki sıcaklıklarda 30 dakika boyunca bekletildi ve her 5 dakikada bir örnek alındı. Alınan örneklerin optimum koşullarda lipaz aktivite tayinleri yapıldı. Bağlı lipaz aktiviteleri, maksimum enzim aktivitesinin yüzdesi (%) olarak hesaplandı.

4.2.9 İmmobilize RML'nin Tekrar Kullanılabilirliği

Tekrar kullanılabilirlik, immobilize edilmiş RML'lerin hidrolitik aktivitesi açısından araştırıldı. İmmobilize edilmiş lipaz numunelerinin 20 mg'ına substrat çözeltisi olan *p*-nitrofenil palmitattan (hekzan içinde 5mM *p*-NPP) 4,5 mL eklendi. 35 °C'de 15 dakikalık reaksiyondan sonra, her bir immobilize lipaz numunesi karışımdan ayrıldı ve oluşan *p*-nitrofenolün (*p*-NP) ekstrakte edilmesi için karışıma 4 mL NaOH (su içinde 0,1 M) eklendi. Sulu tabakanın absorbansı 410 nm'de okundu. Aktivite ölçümleri Pencreac'h ve Baratti (1996) metoduna göre yapıldı. İmmobilize edilmiş lipaz numuneleri distile suyla durulandı ve +4 °C'de saklandı. Bir sonraki döngüde, 4,5 mL substrat çözeltisi ilave edildi ve bu işlemler dört defa tekrarlandı. Bağlı lipaz aktiviteleri, maksimum enzim aktivitesinin yüzdesi (%) olarak hesaplandı.

4.2.10 Serbest ve İmmobilize RML'nin Aktivitesi Üzerine Katyonların ve Deterjanların Etkisi

Serbest ve immobilize edilmiş lipaz aktivitesi üzerine çeşitli katyonların etkisi incelendi. Bunun için +1 değerlikli katyonlardan amonyum ve sodyum; +2 değerlikli katyonlardan demir, bakır, çinko, kalsiyum, magnezyum ve mangan; +3 değerlikli katyonlardan alüminyum ve demir seçildi. Bunun için lipaz örneklerine belirlenmiş katyonların 0,5, 1, 2 ve 3 M'lık konsantrasyonlarından 20'şer µL ilave edildi. Örneklerle 35 °C'de 30 dakikalık reaksiyondan sonra 500 µL substrat çözeltisi (hekzan içinde 5mM *p*-NPP) eklendi. Reaksiyon distile su ile hazırlanmış 0,1 M 4 mL NaOH çözeltisi eklenerek durduruldu ve oluşan *p*-NP miktarı spektrofotometre ile 410 nm'de ölçüldü. Tüm lipaz örnekleri, absorbans değerleri ölçülmeden önce 2 dakika boyunca 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Lipaz aktivitesi

(IU) 35 °C'de ve pH 7,5'ta 1 dakikada 1 mikromol *p*-NPP'nin hidroliz ürünü olan *p*-NP'yi oluşturmak için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanır.

Serbest ve immobilize lipazların aktiviteleri üzerine deterjan etken maddelerinin etkisi araştırıldı. Deterjan etken maddelerinin lipaz aktiviteleri üzerine etkisini incelemek üzere sodyum dodesil sülfat (SDS), Triton X-100 ve Tween 80 (Polioksietilensorbat monooleat) ile çalışıldı. Tüm lipaz örneklerine %1 (w/w)'lık deterjan etken maddeleri ilave edildikten sonra 35 °C'de 30 dakikalık reaksiyondan sonra 500 µL *p*-NPP (hekzan içinde 5mM) eklendi. Reaksiyon distile su ile hazırlanmış 0,1 M 4 mL NaOH çözeltisi eklenerek durduruldu ve oluşan *p*-NP miktarı spektrofotometre ile 410 nm'de ölçüldü. Tüm lipaz örnekleri, absorbans değerleri ölçülmeden önce 2 dakika boyunca 10.000 rpm'de santrifüj edildi.

4.2.11 Serbest ve İmmobilize RML'nin Aktivasyon Enerjileri

Serbest ve immobilize RML'lerin aktivasyon enerjilerini (E_a) hesaplamak üzere serbest ve immobilize RML'lerin optimum sıcaklıktaki aktivite değerlerinin (U/mL) logaritmasının $1/T$ 'ye (K^{-1}) göre çizilen grafiğinin eğiminden ve Arrhenius denkleminde yararlanıldı. Aktivasyon enerjileri, $R = 1,987 \text{ kal.mol}^{-1}.K^{-1}$ olmak üzere, denklem (4.8)'den hesaplandı.

$$\text{Log } A = - (E_a / 2,303 \times R) \times (1/T) \quad (4.8)$$

4.2.12 Serbest ve İmmobilize RML'nin Kinetik Parametreleri

Michaelis-Menten kinetik sabitleri (K_m) ve maksimum hız ($V_{\max}$) değerleri, her bir numunenin optimum pH ve sıcaklığında farklı *p*-NPP (0,25-10 mM) konsantrasyonlarında başlangıç hızları ölçülerek belirlendi. K_m ve $V_{\max}$ değerlerini bulmak için Michaelis Menten denkleminde göre SigmaPlot Enzim Kinetiği Modülü (SigmaPlot sürüm 12.0, Systat Yazılımı, San Jose, CA) kullanıldı. Reaksiyon hızı denklem (2.3) kullanılarak hesaplandı. Deneylerin üçerli tekrarı ile sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapmalar olarak verildi.

Serbest ve immobilize edilmiş enzimlerin yarılanma ömrü çalışmalarını gerçekleştirmek için, numuneler belirli zaman aralıkları için (0-24 saat) 35 °C'de tutuldu. Her belirli zaman aralığının sonunda, numunelerin aktiviteleri ölçüldü. Serbest ve immobilize numunelerin sıfır zamandaki aktivitesi % 100 olarak alındı

ve bağıl aktiviteler maksimum enzim aktivitesinin yüzdesi (%) olarak hesaplandı. Birinci derece inaktivasyon sabiti (k_i) Sadana ve Henley (1987), tarafından önerilen doğrusal olmayan bozunma modeline göre hesaplandı. Serbest ve immobilize lipaz preparatlarının yarılanma ömür ($t_{1/2}$) değerleri denklem (4.9)'den faydalanılarak hesaplandı:

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{k_i} \quad (4.9)$$

Denklemde kullanılan 0,5 değeri aktivitenin % 50'sini belirtmektedir. Stabilizasyon faktörleri (SF'ler), 35 °C'de immobilize lipazın yarılanma ömrünü serbest lipazın aktivitesine bölerek hesaplandı. Tüm deneyler üç kez tekrarlandı.

4.2.13 İmmobilize RML'lerin Taramalı Elektron Mikroskopisi (Scanning Electron Microscopy-SEM)

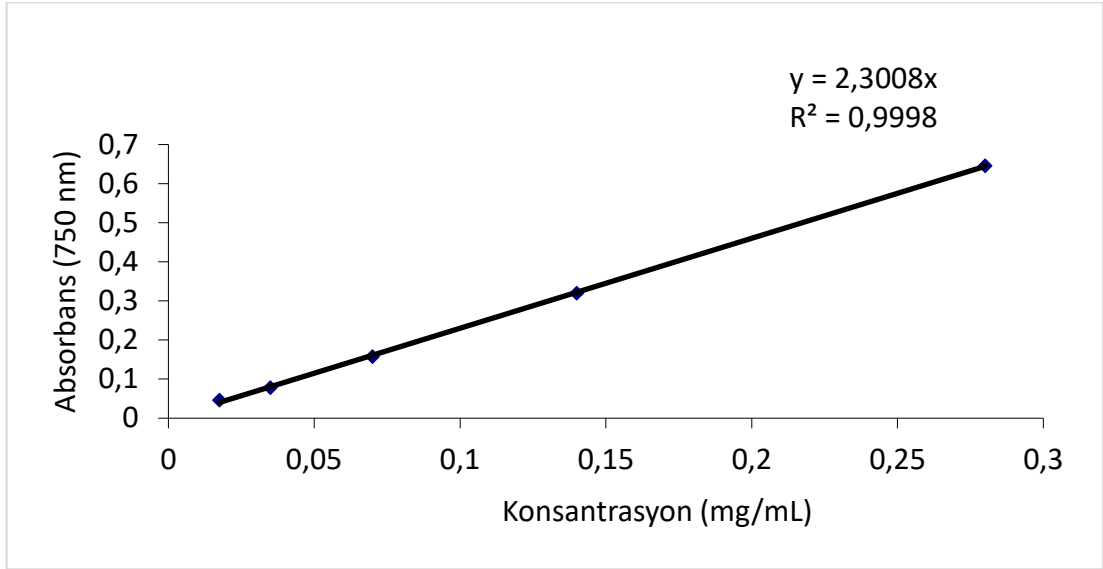
Saf montmorillonit K-10 ve MMT-RML'nin yüzey morfolojisi, bir enerji dağıtıcı X-ışını spektroskopisi detektörü (SEM-EDAX, Philips XL30 SFEG, Eindhoven, Hollanda) ile donatılmış elektron mikroskobunun taranması ile karakterize edildi. Şarj etkilerini en aza indirmek için örnekler bir altın tabaka ile kaplandı. SEM, 15 kV'da çalıştırıldı ve örneklerin görüntüleri, 1000 ila 50000 arasında değişen farklı büyütme oranlarında kaydedildi. İmmobilizasyon öncesi ve sonrasında montmorillonit K-10'daki morfoloji değişiklikleri, SEM ile birleştirilmiş enerji dağıtıcı spektroskopisi (EDS) ile de karakterize edildi.

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

5.1.1 Protein Standart Eğrisi

0,0175-0,035-0,07-0,14-0,28 mg/mL konsantrasyon değerlerinde hazırlanan BSA çözeltilerinin Lowry yöntemine göre 750 nm’de absorbanlarıyla çizilen grafik Şekil 5.1’de verilmiştir.



Şekil 5.1 Protein standart eğrisi

Eğri denkleminde yararlanılarak immobilizasyonda bağlanan protein miktarları belirlenerek immobilizasyon verimleri hesaplanmıştır.

5.1.2 İmmobilizasyon Verimleri

İmmobilizasyon verimlerini hesaplamak üzere protein standart eğrisinin eğiminden yararlanılarak MMT-RML’nin yıkama suyu ve bir adet PVA-RML için protein miktarları belirlendi. Taşıyıcılara yüklenen protein miktarları, immobilize olan protein miktarları ve bu protein miktarlarıyla elde edilen immobilizasyon verimleri

Tablo 5.1’de verilmiştir. Lowry metodu ile ölçülen protein miktarlarına göre MMT’ye immobilizasyon için yüklenen proteinlerin %76,5’inin bağlandığı görüldü. Standart 8 mg PVA-RML için ise direkt olarak bağlanan protein miktarı hesaplandı ve tüm proteinlerin %44’ünün immobilize olduğu hesaplandı. Immobilizasyon veriminin MMT-RML örneğinde PVA-RML’ye göre daha yüksek olarak bulunmasının nedeni kilin gözenekli ve hidrofobik yapısının enzimin adsorpsiyonunu kolaylaştırmış olmasıyla açıklanabilir.

Tablo 5.1 Immobilizasyon verimleri

	Yüklenen protein (mg)	İmmobilize olan protein (mg)	Protein miktarı üzerinden immobilizasyon verimi (%)
MMT-RML	2	1,53	76,5
PVA-RML	1	0,44	44

Badjugar ve diğerleri (2017), hidroksipropil metilselüloz ve kitosan harmanına RML’nin tutuklama ile immobilizasyonunu gerçekleştirmiş ve immobilize preparattaki protein miktarı %87,71 olarak bulunmuştur. Mohammadi ve diğerleri (2018), 25 °C ve pH 7’de amine edilmiş silika ve SBA-15 taşıyıcıları üzerine RML’nin immobilizasyonu çalışmasında immobilizasyon verimlerini %95-100 aralığında bulmuşlardır. Yildirim ve diğerleri (2019), nanoporöz alüminyum oksit ve mikro boyutlu potasyum sülfat kristallerine RML’nin immobilizasyonunu gerçekleştirmiş ve immobilizasyon verimleri sırasıyla %33,8 ve %25,1 olarak bulunmuştur.

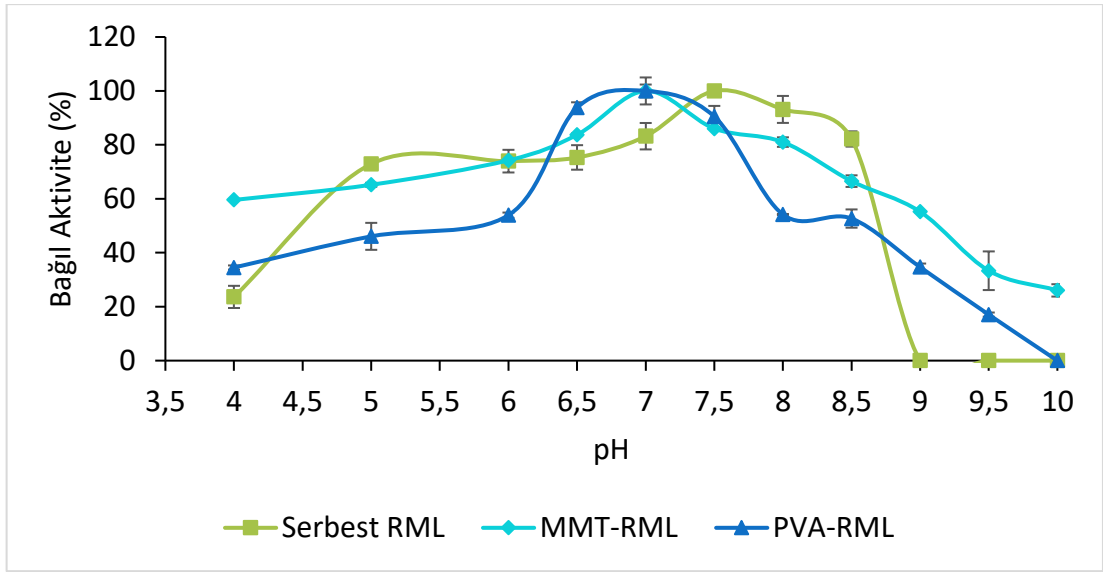
5.1.3 Lipaz Aktivite Tayini

Serbest RML, MMT-RML ve PVA-RML için aktivite değerleri reaksiyon ürünü olan *p*-nitrofenolün 410 nm’deki absorbansından ve lipaz standart eğrisinin eğiminden yararlanılarak denklem (4.7) kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar U/mg cinsinden elde edildi. İmmobilize enzimlerin serbest enzime üstünlüğünün araştırılması adına aktivite değerleri, her bir parametre için optimum koşullarda en yüksek spesifik aktivite değerinin %100 olarak kabul edilmesiyle bağıl aktivite cinsinden verildi.

Optimum reaksiyon koşullarında MMT-RML için aktivite değeri %99,42 iken PVA-RML için %79,3 olarak bulunmuştur. Optimum koşullardaki bu farklılığın nedeni enzimin hidrofobik taşıyıcı ile etkileşimi sonucu enzimin aktif bölgesini kapatan kısmının hareket etmesi sayesinde arayüzey aktivasyonu ile açık forma sabitlenmesi ve enzimin hidrofobik yüzeye kümülatif olarak tutunması olarak ifade edilebilir. Zincir üzerinde rastgele yerleşmiş hidroksil grupları nedeniyle hidrofilik bir polimer olan PVA, yüksek su içeriği nedeniyle RML ile immobilizasyonunda MMT-RML'ye göre daha düşük aktiviteye sahiptir. Shahedi ve diğerleri (2019), epoksi fonksiyonelleştirilmiş silika jele RML'nin immobilizasyonunu gerçekleştirmiş ve immobilizasyon sonrası RML'ye ait spesifik aktivite değeri 43,5 U/mg'dan 9,6 U/mg'a düşmüştür.

5.1.4 Serbest ve İmmobilize RML Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi

Serbest ve immobilize lipazın karakterizasyonu farklı pH değerlerinde gerçekleştirildi. Optimum pH değerleri, bağıl aktivitenin yüzdesine karşı çizilen pH grafiğinden gösterildi. Şekil 5.2'de görüldüğü gibi optimum pH değerleri serbest enzim için 7,5 ve immobilize enzimler için 7,0 olarak bulundu. Bu sonuç, enzim ve destekler arasındaki etkileşimlerin, enzimin konformasyonunu korumaktan sorumlu moleküler kuvvetleri etkilediğini ve dalgalanan pH koşulları altında daha yüksek stabiliteye yol açtığını göstermektedir. Montmorillonit K-10'a glikoz oksidaz adsorpsiyonunda, montmorillonitin yapısındaki pozitif grupların varlığı nedeniyle, serbest enzimin optimum pH'ının 5,5'ten 4'e kaydığı bildirilmiştir (Seleci, ve diğerleri, 2012).

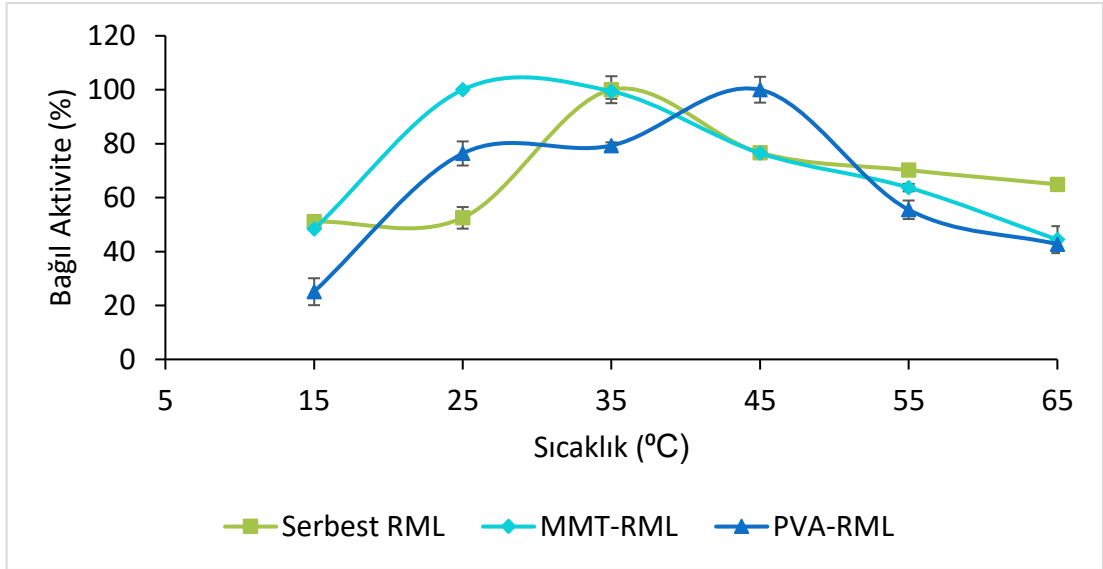


Şekil 5.2 Serbest ve immobilize RML üzerine pH'ın etkisi

Wu ve diğerleri (1996), zeytinyağı substratı ile pH'ı 3-10 olan farklı tampon sistemleri kullanarak pH'ın RML'nin hidrolitik aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek için çalışmış ve RML'nin optimum pH'ı 8 olarak bulmuşlardır. Mohammadi ve diğerleri (2015), serbest RML'nin optimum pH'ının 7,0 olduğunu, aldehit ile fonksiyonelleştirilmiş silika nanopartikülleri (SBA-RML) ve aldehit ile fonksiyonelleştirilmiş silika (silika-RML) üzerinde hareketsizleştirilen RML'lerin optimum pH değerlerinin sırasıyla 7,5 ve 8,0 olduğunu bildirmiştir. Takó ve diğerleri (2017), saflaştırılmış RML'nin, *p*-NPP'nin hidrolizi için 6,8 ila 7,4 arasında bir pH optimumuna sahip olduğunu bildirmiştir. Mohammadi ve diğerleri (2018), aminlenmiş silika ve SBA-15 taşıyıcıları üzerine RML'nin immobilizasyonunu gerçekleştirmiş ve serbest RML için 7 olan optimum pH değerinin immobilizasyon sonrası pH 8'e çıktığını tespit etmişlerdir.

Serbest ve immobilize enzimler arasında sıcaklık yönünden karşılaştırmalı bir çalışma yapılmıştır. Serbest ve immobilize lipazların aktiviteleri farklı sıcaklıklarda belirlenmiştir. Sıcaklık-aktivite ilişkileri, bağıl aktivitenin yüzdesine karşı çizilen sıcaklık grafiğinde gösterilmiştir Şekil 5.3'te görüldüğü gibi optimum sıcaklıklar, serbest enzim için 35 °C, MMT-RML için 25 °C, PVA-RML için ise 45 °C olarak bulunmuştur. MMT-RML'nin serbest enzimden daha geniş bir sıcaklık aralığında çalıştığı söylenebilir. Ayrıca MMT-RML oda sıcaklığında en iyi aktiviteye sahiptir. 45

°C'de serbest enzim ve MMT-RML sırasıyla % 76,63 ve % 76,46 aktivite göstermesine rağmen, PVA-RML % 100 aktivite göstermiştir. Bu sonuç PVA-RML'nin ısı işlem gerektiren uygulamalar için uygun bir immobilizasyon tekniği olduğunu göstermektedir. MMT-RML'nin aktivitesinin yüksek sıcaklıklarda azalmasının sebebi kilde meydana gelen fizikokimyasal ve mineralojik değişikliklerle açıklanabilir.



Şekil 5.3 Serbest ve immobilize RML üzerine sıcaklığın etkisi

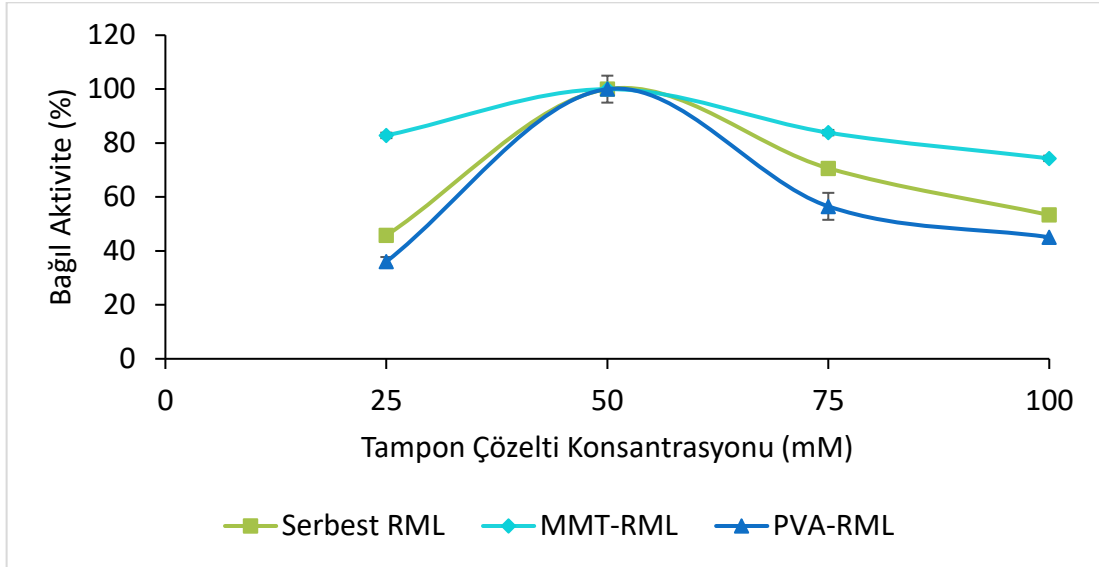
Han ve diğerleri (2009), serbest RML'nin optimum sıcaklığını 40 °C olarak belirlemiştir. de Vasconcellos ve diğerleri (2012) ise, serbest ve farklı zeolitik destekler üzerindeki immobilize RML'lerin optimum sıcaklığını 44 °C olarak belirlemiştir. Abdul Manan ve diğerleri (2018), kitin-kitosan nano kristal flamanlarında RML'nin kovalent immobilizasyonunu gerçekleştirmiş ve immobilizasyon sonrası optimum sıcaklık değerini 50 °C olarak bulmuşlardır.

5.1.5 Serbest ve İmmobilize RML Üzerine Tampon Çözelti

Konsantrasyonunun Etkisi

Serbest ve immobilize RML üzerine tampon çözelti konsantrasyonunun etkisi Şekil 5.4'te verilmiştir. Optimum pH ve sıcaklıkta hem serbest hem de immobilize RML'ler için optimum fosfat tamponu konsantrasyonu 50 mM olarak belirlendi. MMT-RML'nin aktivitesinin serbest ve PVA-RML'ye göre tampon çözelti konsantrasyonu değişiminden daha az etkilendiği görüldü. PVA-RML'nin ise tampon çözelti

konsantrasyonu değişiminden serbest enzime göre daha çok etkilendiği saptandı. MMT-RML'nin değişen tampon çözelti konsantrasyonlarından PVA-RML'ye göre daha az etkileneşinin sebebi kilin sahip olduğu katyon değişim kuvveti ile açıklanabilir.

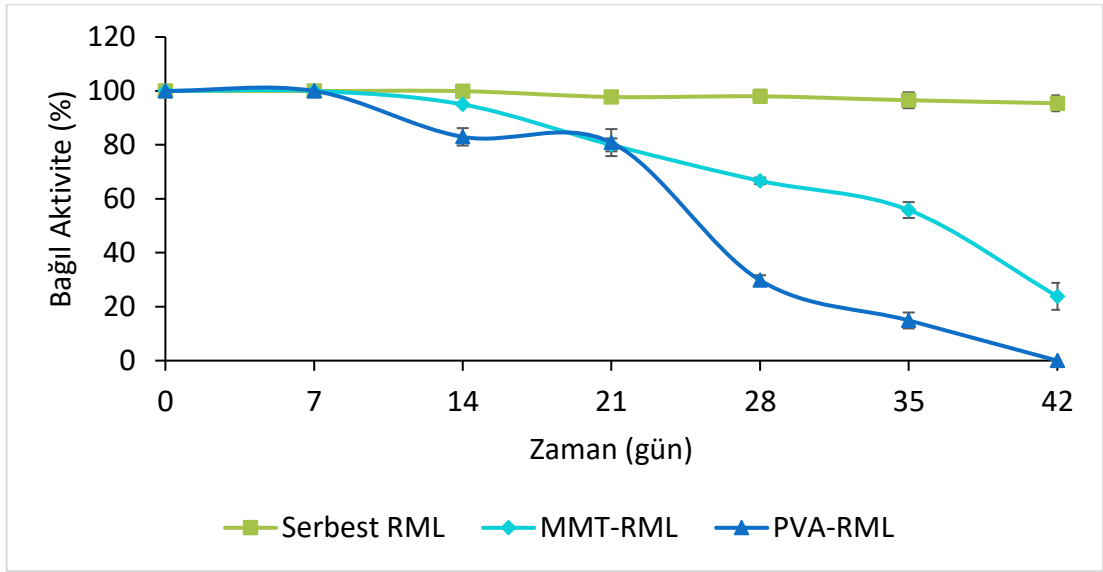


Şekil 5.4 Serbest ve immobilize RML üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi

Kronecki ve diğerleri (2020), oktil agaroz üzerine arayüzey aktivasyonu ile RML'nin immobilizasyonunu gerçekleştirmiş ve 1 M pH 7 sodyum-fosfat tamponunun destabilize edici etkisini incelemiştir. pH 5-9 arası 1 M NaCl kullanıldığında sodyum-fosfatın bu olumsuz etkisinin giderildiğini tespit etmişlerdir.

5.1.6 Serbest ve İmmobilize RML'nin Depolama Kararlılığı

+4 °C'de depolanan RML, PVA-RML ve MMT-RML'nin aktiviteleri optimum koşullarda ölçüldü. 0. gün yerine başlangıç aktivitesi 100 olarak kabul edildi. 7 günde bir alınan örneklerde aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Serbest ve immobilize RML'lerin depolama kararlılıkları Şekil 5.5'te verilmiştir.



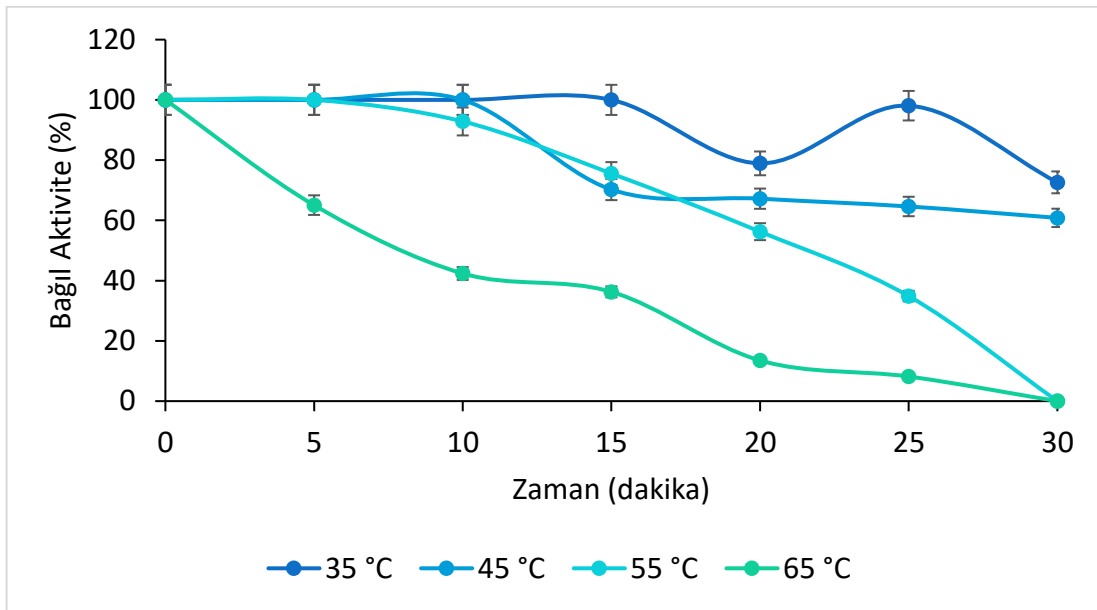
Şekil 5.5 Serbest ve immobilize RML'nin depolama kararlılığı

Serbest enzim ticari olarak hazırlanmış preparattan kullanıldığı için yüksek saflıktadır ve aktivitesini koruyucu maddeler içerdiğinden ölçüm süresi boyunca yüksek depolama kararlılığına sahiptir. İmmobilizasyon işlemi sırasında enzimde bulunan stabilizatörlerin desteğe bağlanmaması nedeniyle depolama süresi boyunca immobilize enzimlerin aktivitesinde azalmaların meydana gelmesi beklenen bir sonuçtur. 21. günde her iki immobilize form için de aktivitenin %80'lik kısmını korudukları görüldü. 42. günde PVA-RML'nin aktivitesi tükenirken MMT-RML %23,83 aktivite gösterdi. Depolama süresi boyunca MMT-RML'nin PVA-RML'ye göre daha uzun süre başlangıç aktivitesini korumasının sebebi, enzim moleküllerinin kilin gözeneklerine tutunması sayesinde kaçışının önlenmesi olarak açıklanabilir. Adsorpsiyon tekniğinde bağlanma kuvvetleri zayıf olmasına rağmen, lipazın hidrofobik desteğe kümülatif olarak sıkıca tutunmasından dolayı başlangıç aktivitesinin daha uzun süre korunduğu düşünülmektedir. Michaux ve diğerleri (2010), mezoporöz silika materyaline immobilize ettikleri RML'nin +4 °C'de depolama kararlılığını incelemiş ve 4 ay sonunda başlangıç aktivitesinin %47'sini koruduğunu belirtmişlerdir.

5.1.7 Serbest ve İmmobilize RML'nin Termal Kararlılığı

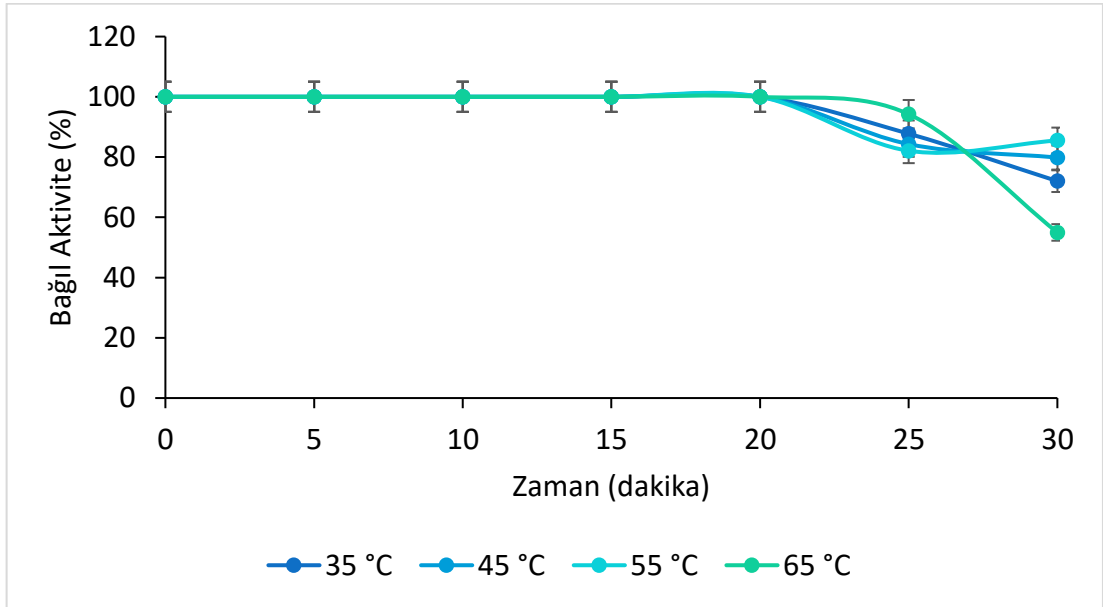
Serbest RML'nin termal kararlılığı Şekil 5.6'da verilmiştir. Serbest RML'nin termal kararlılığı çalışmalarında 35 °C'de ilk 15 dakikada, 45 °C'de ilk 10 dakikada, 55 °C'de

ise ilk 5 dakikada aktivitede değişiklik olmazken, 65 °C’de 15. dakikanın sonunda aktivitenin başlangıç aktivitesinin yaklaşık %36’sına indiği görüldü. Serbest enzim 30 dakikanın sonunda, 55 ve 65 °C’lik sıcaklıklarda aktivitesinin tamamını kaybetmiştir. 35 ve 55 °C sıcaklıklarda ise bu değer yaklaşık %73 ve %61 olarak hesaplanmıştır. Serbest halde bulunan enzimin sıcaklık değişikliklerinden kolayca etkilenecek aktif bölge konformasyonunun bozulduğu bilinmektedir. Bunun sonucu olarak substratı ile etkileşememesi nedeniyle aktivitesinin sıcaklıkla azaldığı ve hatta denatüre olduğu bilinmektedir. de Vasconcellos ve diğerleri (2012), tüm zeolit enzim komplekslerinin, başlangıç aktivitelerinin yaklaşık % 100’ünü koruyarak aynı davranışı gösterdiğini, ancak serbest RML’nin, 5 saatlik inkübasyon süresinden sonra başlangıç aktivitesinin %40’ını kaybettiğini bildirilmiştir. Mohammadi ve diğerleri (2015), serbest RML’nin, 50 °C’de 24 saatlik inkübasyondan sonra başlangıç aktivitesinin %85’ini kaybettiğini bildirmiştir. Diğer yandan, kovalent olarak immobilize edilmiş RML preparatlarının 50 °C’de stabilitesinin iyi olduğu tespit edilmiş ve aktivitesinin tamamını 24 saatlik inkübasyondan sonra korumuştur. Abdul Manan ve diğerleri (2018), serbest RML’nin 70 °C’de inaktif olduğunu, Mohammedi ve diğerleri (2018), silika-RML ve SBA-RML’nin 65 °C’de aktivitelerinin sırasıyla %28 ve %62’sini koruyabildiğini, serbest enzimin ise inaktif olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 5.6 Serbest RML’nin termal kararlılığı

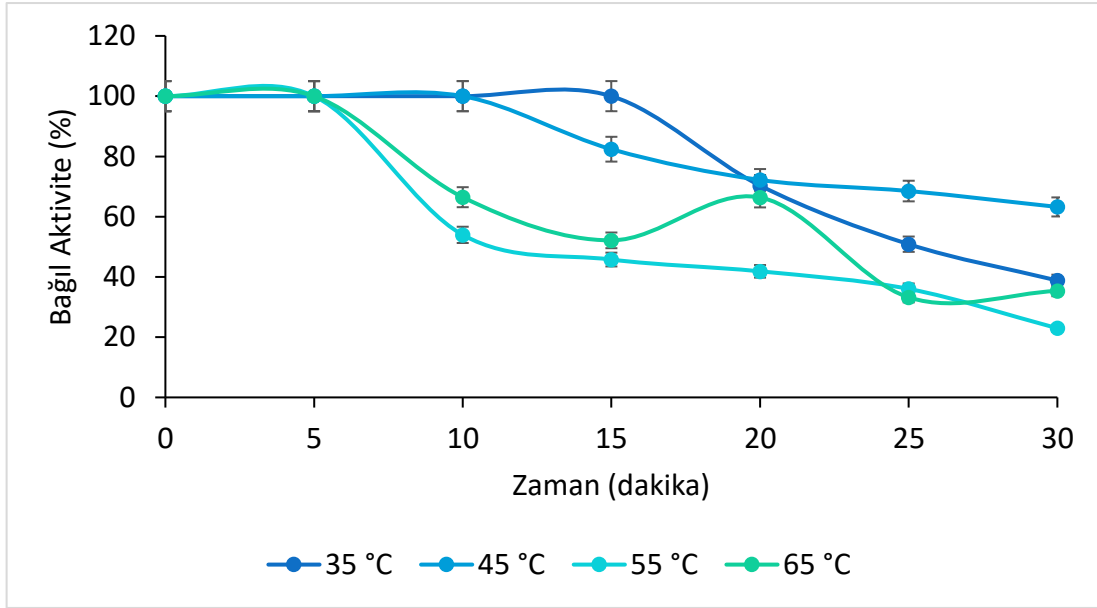
Şekil 5.7’de MMT-RML’nin termal kararlılığı grafiğine göre çalışılan tüm sıcaklıklarda ilk 20 dakikada enzim aktivitesinde herhangi bir değişiklik olmazken 30. dakikanın sonunda 35, 45 ve 55 °C’lerde elde edilen aktivite değerleri sırasıyla başlangıç aktivitesinin yaklaşık %72, %80, %86 ve %55’i olarak hesaplanmıştır. Artan sıcaklıklara rağmen enzim aktivitesinde önemli bir değişiklik olmamasının sebebi, immobilizasyon ile enzimin aktif bölgesinin korunması ile açıklanabilir. Aynı zamanda artan sıcaklıklarda kilde bulunan şişme suyu, gözenek suyu ve adsorplanmış olan suyun dehidratasyona ve yapıya bağlı kristal suyun dehidroksilasyona uğraması nedenleriyle kilin yapısında meydana gelen fizikokimyasal değişikliklerle hidrofobikliği artmıştır. Sıcaklıkla artan özgül yüzey alanı, özgül gözenek hacmi, gözenek boyut dağılımı gibi adsorplama özellikleri de değişmektedir (Yalçın, 2010).



Şekil 5.7 MMT-RML’nin termal kararlılığı

Şekil 5.8’de verilen PVA-RML’nin termal kararlılığı grafiğine göre 35 °C’de ilk 15 dakika, 45 °C’de ilk 10 dakika, 55 ve 65 °C’lerde ise ilk 5 dakikada immobilize enzimin aktivitesi korunmuştur. PVA-RML için optimum sıcaklık değeri olan 45 °C’de, 30 dakika inkübasyon süresi sonunda dahi enzimin başlangıç aktivitesinin yaklaşık %63’ünü koruduğu görülmüştür. 30 dakika sonunda 35, 45 ve 55 °C’lerde bu değerler sırasıyla yaklaşık %40, %23 ve %35 olarak hesaplanmıştır. PVA jelleri

yüksek sıcaklıklarda ve sulu ortamda hazırlanan hidrofilik jellerdir. PVA-RML'nin aktivitesinin azalması yüksek sıcaklıklarda jelden enzim kaçıyla aktif bölgesinin daha az aktif konformasyona geçişiyle açıklanabilir.



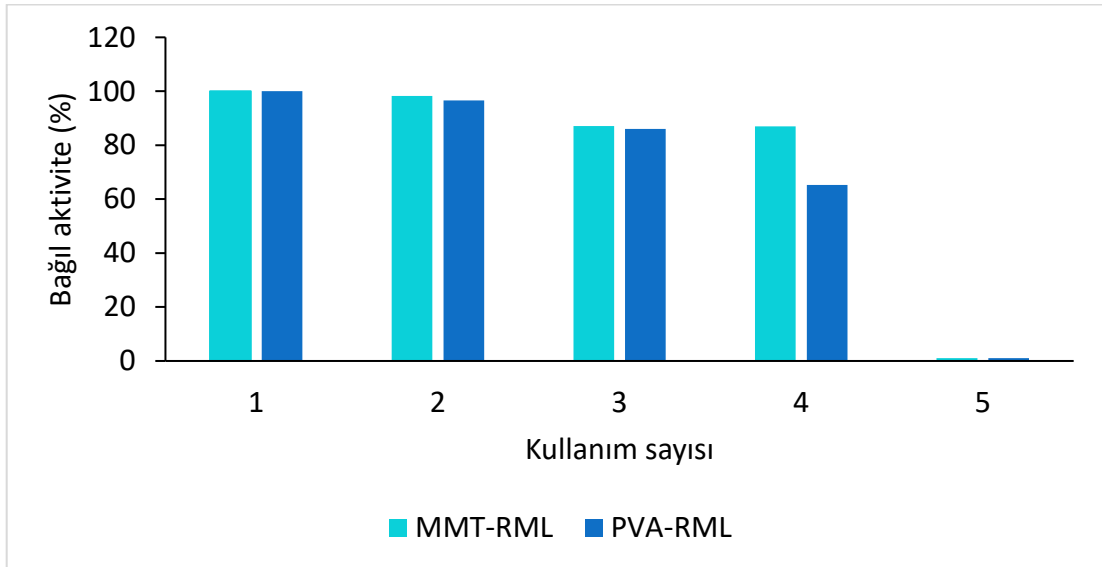
Şekil 5.8 PVA-RML'nin termal kararlılığı

35 ve 45 °C gibi düşük sıcaklıklarda serbest ve immobilize enzimlerin ilk 15 dakika boyunca aktivitelerinde önemli bir değişiklik gözlenmezken, yüksek sıcaklıklarda, beklenildiği gibi, immobilize enzimlerin başlangıç aktivitelerini serbest enzime göre daha başarılı bir şekilde koruduğu, serbest enzimin aktivitesinin ise bu sıcaklıklara dayanamadığı görülmüştür. 55 ve 65 °C'lerde serbest enzim 30 dakikanın sonunda inaktif olurken, MMT-RML bu sıcaklıklarda sırasıyla başlangıç aktivitesinin yaklaşık %86 ve %55'ini korumuştur. Yıldırım ve diğerleri (2019), RML'nin altıgen sıralı nano gözenekli alüminyum oksit membranlarında (RML-Al₂O₃-NP) adsorpsiyonu ile ve önceden soğutulmuş asetonunda mikron büyüklüğünde potasyum sülfat kristalleri (K₂SO₄) üzerinde RML'yi aynı anda çöktürmek suretiyle protein kaplı mikro kristallerle (RML-PCMC'ler) yapılan immobilizasyonu çalışmasında serbest ve immobilize enzim preparatlarının termal kararlılığını 40 °C ve 50 °C'de denemişlerdir. 0-30 saat inkübe edilen enzim preparatlarının aktiviteleri optimum koşullarda incelenmiş ve 40 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonucunda serbest enzimin aktivitesinin %46'sını korurken RML-Al₂O₃-NP ve RML-PCMC'lerin sırasıyla %81 ve

%91 koruduğu tespit edilmiştir. 50 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonucunda ise serbest enzim, RML-Al₂O₃-NP ve RML-PCMC'ler için aktivite kayıpları sırasıyla %93, %21 ve %12 olarak bulunmuştur.

5.1.8 İmmobilize RML'nin Tekrar Kullanılabilirliği

MMT-RML ve PVA-RML optimum koşullar altında tekrar kullanılabilirlik açısından karşılaştırıldı. şekil 5.9'da görüldüğu gibi MMT-RML ve PVA-RML, dört tekrar kullanımdan sonra başlangıç aktivitelerinin sırasıyla % 87'sini ve% 65'ini sergilemiştir. MMT-RML'nin PVA-RML'ye göre daha yüksek bağıl aktivite göstermesi hidrofobik deşteğe adsorpsiyon metoduyla immobilize olan enzimin immobilizasyon sonrası aktif bölgesinin önünde substrat ile bağlanmaya engel teşkil eden ve kapak olarak ifade edilen polipeptid zincirinin ortadan kalkarak enzimin katalize uygun hale gelmesiyle açıklanabilir. Artan yeniden kullanım sayılarına göre hem aktif bölgenin daha fazla korunması hem de adsorpsiyonda etkili bağlanmaların zayıf etkileşimler olmasına rağmen kilin gözeneklerine kümülatif olarak bağlanmış olan enzimin destek materyali üzerinde daha iyi tutunması sebepleri nedeniyle MMT-RML'ye ait bağıl aktivite değerleri PVA-RML'den daha yüksektir.



şekil 5.9 İmmobilize RML'nin tekrar kullanılabilirliği

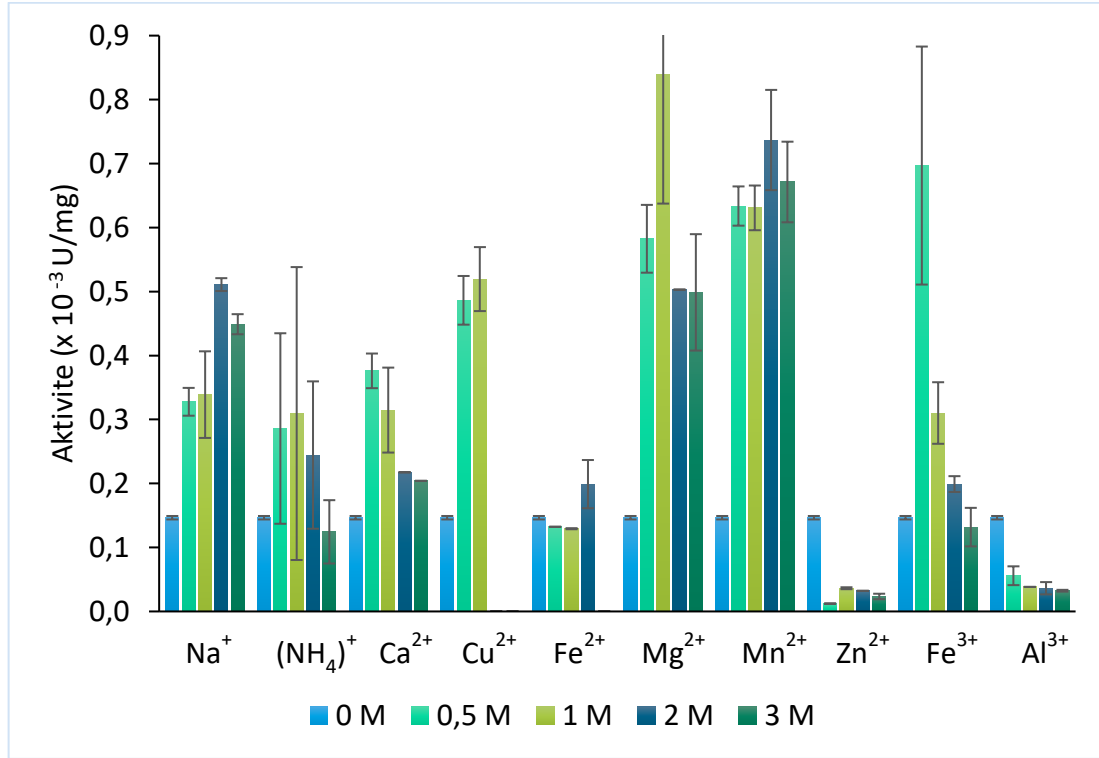
Chen ve diğeri (2017), klorometil işlevli Fe₃O₄ nanoparçacıkları üzerinde immobilize edilmiş *Candida rugosa* lipazının *p*-NPP'nin hidrolizi için 10 kez tekrar kullanıldıktan sonra başlangıç aktivitesinin % 69,8'inden fazlasını koruduğunu göstermiştir. Pitzalis ve diğeri (2018), RM@ZIF-8LR'yi, *p*-nitrofenil bütiratın hidrolizi için yeniden kullandıklarında, ikinci reaksiyon döngüsünde başlangıç aktivitesinin sadece %30'unu koruduğunu ve üçüncü döngüde tamamen inaktif hale geldiğini bildirmiştir. Yildirim ve diğeri (2019), nano gözenekli alüminyum oksit membranları üzerine (RML-Al₂O₃-NP) adsorpsiyon tekniği ile protein kaplı mikro kristaller (RML-PCMC'ler) şeklinde immobilize edilmiş RML'lerin kısmi aktivitelerini 10 kez tekrar kullanımdan sonra başlangıç aktivitelerinin sırasıyla % 84'ü ve %86'sı olduğunu bildirmiştir.

5.1.9 Serbest ve İmmobilize RML'nin Aktivitesi Üzerine İyonların ve Deterjanların Etkisi

Serbest RML'nin aktivitesi üzerine +1, +2 ve +3 değerlikli katyonların farklı konsantrasyonlarının etkisi Şekil 5.10'da verilmiştir. Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ ve Mn²⁺ iyonları, çalışılan tüm konsantrasyonlarında serbest enzimin aktivitesini arttırıcı etki göstermiştir. Na⁺'un 2 M'lık çözeltisi serbest enzimin aktivitesini %348,75 arttırmıştır. Mn²⁺ iyonunun aynı konsantrasyonu serbest enzimin aktivitesini %503 arttırmıştır. Ca²⁺ için 0,5 M'lık konsantrasyonda bu artış %256,72 kadardır. 1 M Mg²⁺ varlığında serbest enzimin aktivitesi %573,05 artış göstermiştir. (NH₄)⁺ ve Fe³⁺'in 0,5, 1 ve 2 M'lık konsantrasyonları serbest enzimin aktivitesinde artışa sebep olurken bu iyonların 3 M'lık çözeltilerinin serbest enzime ilavesi aktiviteyi azaltmıştır. 3M (NH₄)⁺ ve Fe³⁺ için serbest enzimin aktivite değerleri sırasıyla %84,95 ve %90 olarak bulunmuştur. 1M (NH₄)⁺ varlığında serbest enzimin aktivitesi %211,17 iken 0,5 M Fe³⁺ varlığında bu değer % 475,76'ya ulaşmıştır. Cu²⁺ iyonunun 2 ve 3 M konsantrasyonlara sahip çözeltilerinin serbest enzime ilavesinin enzimi inaktive ettiği gözlemlenmiştir. Fe²⁺ iyonunun 2 M'lık çözeltisi serbest enzimin aktivitesinde %135,96'lık artışa sebep olurken 3M konsantrasyona sahip olan çözeltisi enzimi inaktive etmektedir. Zn²⁺ ve Al³⁺ iyonlarının tüm konsantrasyonları serbest enzimi inaktive etmiştir. 0,1465x10⁻³ U/mg olan enzim aktivitesi Zn²⁺ iyonunun 0,5, 1, 2 ve 3 M'lık artan

konsantrasyonlarında sırasıyla $0,0123 \times 10^{-3}$, $0,0353 \times 10^{-3}$, $0,0322 \times 10^{-3}$ ve $0,00234 \times 10^{-3}$ U/mg değerlerine inmiştir. Al^{3+} 'un artan konsantrasyonlarında ise bu değerler sırasıyla $0,0558 \times 10^{-3}$, $0,0384 \times 10^{-3}$, $0,0363 \times 10^{-3}$ ve $0,0324 \times 10^{-3}$ U/mg'a inmiştir. İyonların çeşitli konsantrasyonları varlığında ölçülen enzim aktivitelerinde en yüksek aktivite Mg^{2+} iyonunun 1 M'lık konsantrasyonunda gözlenmiştir. Enzimin iyon varlığı olmadan ölçülen aktivite değeri $0,1465 \times 10^{-3}$ U/mg iken, 1M Mg^{2+} varlığında bu değer yaklaşık 5,7 kat artış göstererek $0,8394 \times 10^{-3}$ U/mg'a ulaşmıştır. Bu sonuçlar metal iyonlarının çok yüksek konsantrasyonlarının enzimin aktif konformasyonunu bozarak inhibe edici etki yaptığını göstermektedir. Özellikle Ca^{2+} iyonunun düşük konsantrasyonlarının lipaz enzimlerinin aktif konformasyonunu sabitleyerek substratla etkileşimini arttırdığı bilinmektedir. Bunun sonucunda Ca^{2+} iyonları aktiviteyi arttırıcı bir etki göstermektedir. Ayrıca Ca^{2+} iyonları lipaz enziminin termal stabilitesini de arttırıcı etkiye sahiptir (Qin, Zhao, Wu, & He, 2016). Serbest RML'nin $0,1465 \times 10^{-3}$ U/mg olan aktivite değeri, Ca^{2+} iyonlarının 0,5, 1, 2 ve 3 M'lık konsantrasyonları varlığında sırasıyla $0,376 \times 10^{-3}$, $0,3147 \times 10^{-3}$, $0,2175 \times 10^{-3}$ ve $0,02041 \times 10^{-3}$ U/mg olarak bulunmuştur. Qin ve diğerleri (2016), 60 °C'de 10 dakikada inaktif olan *Pseudomonas stutzeri* lipazının Ca^{2+} 'un 10 mM'lık çözeltisinin varlığında inaktivasyon süresinin 60 dakikaya çıktığını tespit etmiştir. Qin ve diğerleri, bunun sebebini kalsiyum iyonlarının lipaz enziminin konformasyonunu yeniden düzenleyerek daha yüksek konformasyonel ve termodinamik stabiliteye sahip olmasını sağlayan β -tabakalarının artmasına sebep olmasıyla açıklamaktadır. Qin ve diğerleri ayrıca, lipaz enziminin Ca^{2+} iyonlarının varlığında ilave etkileşimlere girerek, Ca^{2+} iyonları yokluğunda esnek halde olan bir bölgeyi stabilize ederek enzimin açık konformasyonunu sabitlediği ve substratın bağlanma olasılığını arttırdığını ifade etmiştir. Sözü geçen çalışmada, Li^{+} ve Mg^{2+} iyonlarının 1 mM'lık; Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Fe^{2+} iyonlarının 10 mM'lık; Ca^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının ise her iki konsantrasyondaki çözeltilerinin enzim aktivitesini arttırıcı etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Benzer şekilde Komakazu ve diğerlerinin (1986), *Saccharomycopsis lipolytica* lipazı ile yapmış olduğu çalışmada, 0,01 M $CaCl_2$ çözeltisinin enzim aktivitesini arttırıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir. Kalsiyum haricinde Mg, K ve Al'un Cl ile yapmış olduğu bileşikleri enzim aktivitesini arttırıcı

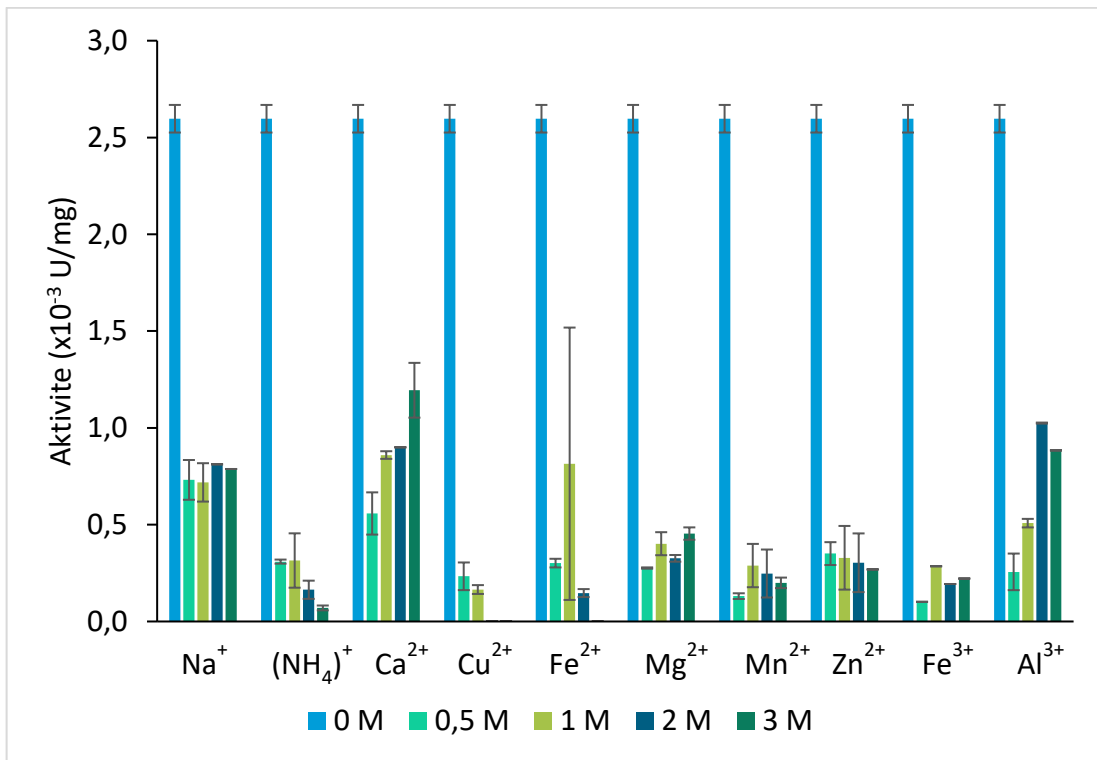
etki göstermiştir. Sharon ve diğerleri (1998), *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 lipazı üzerine Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarının aktive edici etkisi olduğunu bulmuştur.



Şekil 5.10 Serbest RML'nin aktivitesi üzerine katyonların etkisi

Şekil 5.11'de MMT-RML'nin aktivitesine katyonların etkisi verilmiştir. Çalışmada kullanılan katyonların çalışılan tüm konsantrasyonlarının MMT-RML'nin aktivitesini düşürücü etkide bulunduğu gözlemlendi. İyonlar varlığında MMT-RML örneklerinin aktivitelerinde meydana gelen azalmalara rağmen 3M Ca^{2+} varlığında enzim %45,99 aktivite göstermiştir. Bu sonuç, Ca^{2+} iyonlarının lipaz enzimleri için konformasyonel stabiliteye sağlamış olduğu katkıyı destekler niteliktedir. Doğal tabakalı bir alüminosilikat olan montmorillonit, hem katyonları hem de anyonları adsorbe etme yeteneğine sahip iki aktif bölge içerir. Katyon adsorpsiyonu, alüminosilikat tabakalarındaki alkali veya toprak-alkali metal katyonlarının eşdeğer miktarda adsorptif katyonlar ile değiştirilmesi şeklinde gerçekleşen iyon değişim mekanizması ile meydana gelir (Kon'kovaa & Ryseva, 2020). Hidrofobik desteğe adsorbe olduktan sonra aktif konformasyonu sabitlenen RML, çeşitli katyonların varlığında katyon değişim kapasitesine sahip destek üzerinden desorbe olarak substratı ile etkileşmesine engel teşkil eden ve kapak olarak

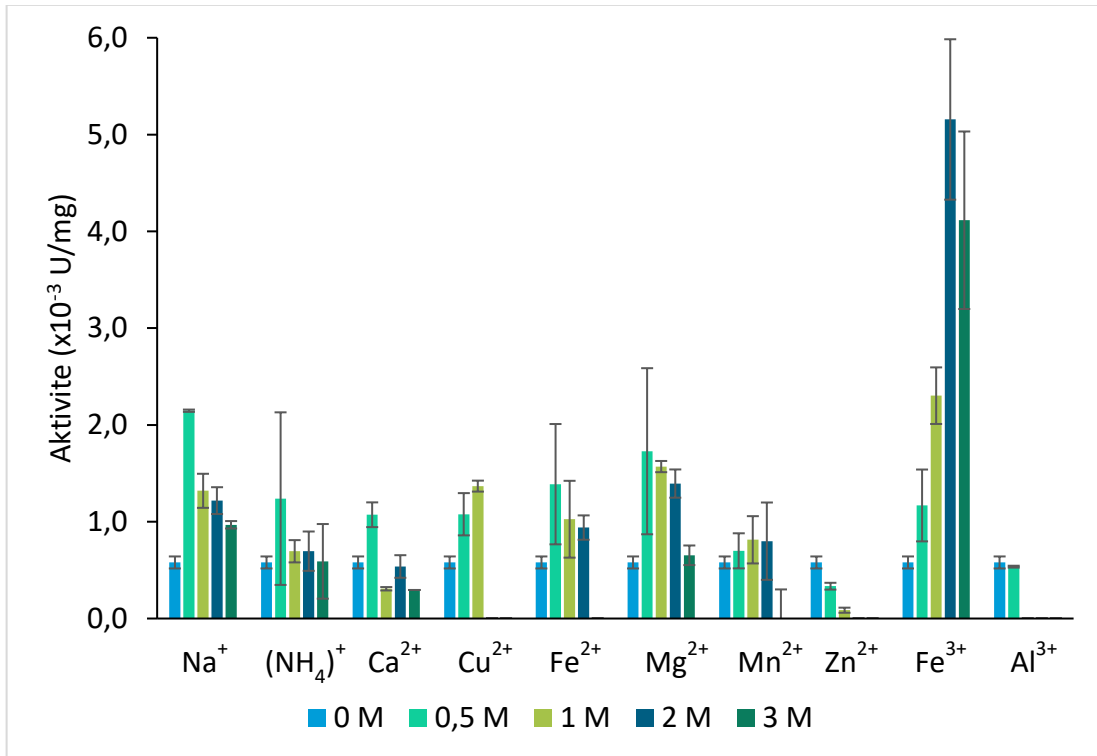
isimlendirilen polipeptid zincirinin aktif bölgesini kapatmasıyla daha az aktif olan konformasyonuna geçiş yapmıştır. Bu desorpsiyon sonucunda katyonların düşük konsantrasyonlarında dahi MMT'nin katyon adsorpsiyonu gerçekleştirmesiyle enzim aktivitesinde azalma meydana gelmiştir. Lipaz aktivitesini arttırıcı etkiye sahip olduğu bilinen Ca^{2+} iyonlarının artan konsantrasyonlarında katyon değişimi ile desorbe olarak serbest hale geçen enzimin aktivitesini kısmen arttırdığı görülmektedir. Ca^{2+} 'nın 3M'lık konsantrasyonunda dahi $1,1942 \times 10^{-3}$ U/mg'lık aktivite değeriyle MMT-RML'nin iyon etkisi öncesindeki $2,5969 \times 10^{-3}$ U/mg'lık aktivitesine erişemediği görülmüştür.



Şekil 5.11 MMT-RML'nin aktivitesi üzerine katyonların etkisi

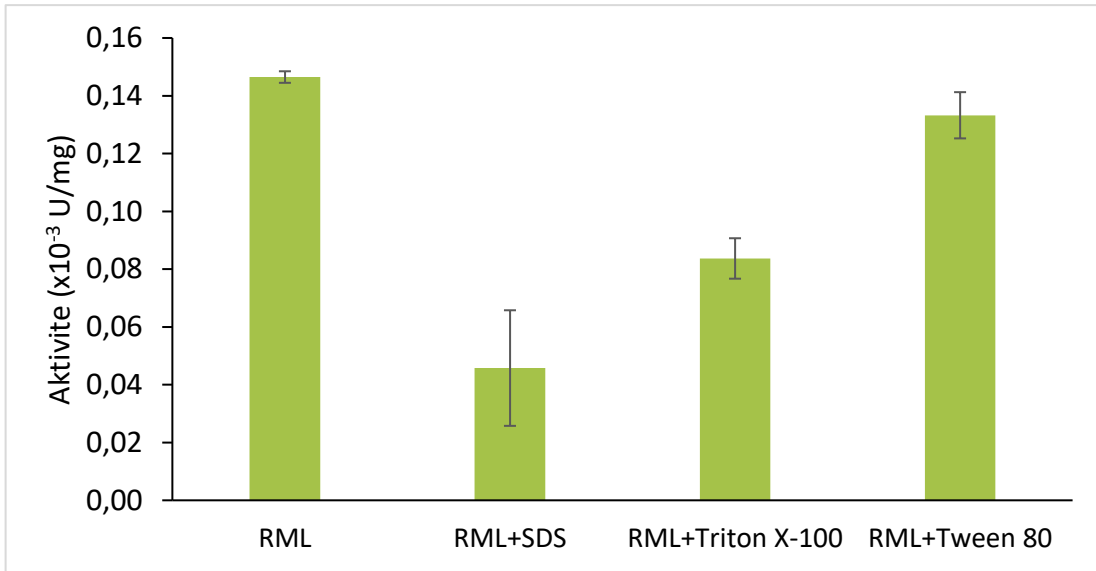
Şekil 5.12'de görüldüğü gibi Na^+ , $(\text{NH}_4)^+$, Mg^{2+} , Mn^{2+} ve Fe^{3+} katyonlarının çalışılan tüm konsantrasyonları PVA-RML'nin aktivitesini arttırıcı etkisi gözlemlendi. Artan bu aktiviteler arasında en yüksek aktivite değeri Fe^{3+} iyonunun 2M konsantrasyonunda gözlenmiş olup bu değer % 889,92 olarak hesaplanmıştır. Na^+ , $(\text{NH}_4)^+$ ve Mg^{2+} 'nin 0,5 M'lık konsantrasyonlarında PVA-RML'nin aktivitesindeki artış sırasıyla %370,59, %213,81 ve %298,32 olmuştur. Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} katyonlarının düşük konsantrasyonları PVA-RML'nin aktivitesini arttırırken

yüksek konsantrasyonlarında aktivitede azalma meydana geldi. Ca^{2+} ve Fe^{2+} iyonlarının 0,5 M konsantrasyonlarında aktivite değerleri %185,07 ve %239,57 olarak bulunmuştur. Cu^{2+} ve Mn^{2+} 'nin 1M'lık çözeltileri kullanıldığında ise PVA-RML'nin aktivitesindeki artış sırasıyla %236,12 ve %140,41 olarak hesaplanmıştır. Zn^{2+} ve Al^{3+} 'un PVA-RML'nin aktivitesi üzerine etkisi için yapılan çalışmalarda ise bu iki katyonun düşük konsantrasyonlarının aktiviteyi azaltıcı, yüksek konsantrasyonlarda ise inaktive edici etkisi gözlemlendi. Aktivitenin en fazla olduğu değer, Fe^{3+} iyonunun 2M'lık konsantrasyonunda gözlemlendi. İyon varlığı olmadan ölçülen aktivite değerinin yaklaşık 8,9 katı olan bu maksimum aktivite değeri $5,1558 \times 10^{-3}$ U/mg olarak ölçüldü. PVA ile uygulanan jelde tutuklama tekniğiyle immobilizasyonda, enzim taşıyıcıya veya membrana bağlanmamış halde jel içerisine tuzaklandığı için iyon varlığında MMT-RML'de görülen desorpsiyon gibi enzimin aktif bölge konformasyonunu engelleyen etmenlerin olmaması nedeniyle özellikle düşük konsantrasyonlarda aktivitelerde azalma meydana gelmemiştir. İyonların PVA-RML'nin aktivitesi üzerine arttırıcı ya da azaltıcı etkileri serbest enzimde görülen etkilere benzer olarak bulunmuştur.



Şekil 5.12 PVA-RML'nin aktivitesi üzerine katyonların etkisi

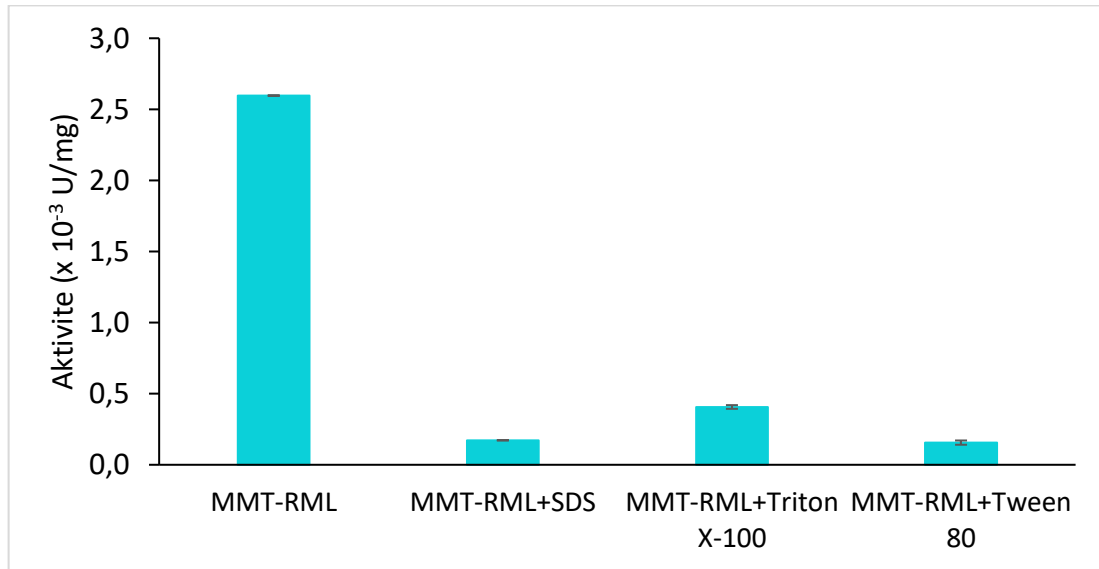
Şekil 5.13'te deterjan etken maddelerinin serbest enzim aktivitesi üzerine etkisi verilmiştir. %1'lik SDS varlığında serbest enzimin aktivitesi $0,046 \times 10^{-3}$ U/mg olarak hesaplandı. Aynı konsantrasyonda Triton X-100 ve Tween 80 ilavesiyle serbest enzimin aktiviteleri sırasıyla $0,084 \times 10^{-3}$ ve $0,113 \times 10^{-3}$ U/mg olarak hesaplandı. Serbest enzim anyonik bir yüzey aktif madde olan SDS ile etkileştikten sonra başlangıç aktivitesinin yalnızca %31,24'ünü koruyabilmiştir. Non-iyonik aktif maddelerden olan Triton X-100 ve Tween 80 ile muamele edildikten sonra ise bu değerler sırasıyla %57,14 ve %90,97 olarak bulunmuştur. Anyonik yüzey aktif maddelerin hidrofilik fonksiyonel grupları nedeniyle lipaz enziminin aktivitesinde azalmaya sebep olması beklenen bir sonuçtur (Qin, Zhao, Wu, & He, 2016).



Şekil 5.13 Serbest RML'nin aktivitesi üzerine deterjan etken maddelerinin etkisi

Şekil 5.14'te deterjan etken maddelerinin MMT-RML'nin aktivitesi üzerine etkisine ait grafik verilmiştir. MMT-RML'nin aktivitesinin deterjan etken maddelerinden etkilendiği, %1'lik Triton X-100 varlığında aktivitesinin %15,65'ini koruyabildiği hesaplandı. Buna rağmen, çalışılan tüm deterjanların MMT-RML'nin inaktivasyonuna karşın serbest enzimin aktivite değerlerinden daha yüksek olduğu görüldü. MMT-RML, kuvvetli bir inhibitör olarak bulunan Tween-80'in %1'lik çözeltisiyle muamele olduktan sonra bile $0,156 \times 10^{-3}$ U/mg'lık aktiviteye sahiptir. Serbest RML ise bu koşullar altında $0,133 \times 10^{-3}$ U/mg aktivite sergilemiştir. Katyon varlığında olduğu gibi, iyon değiştirici etkiye sahip olan

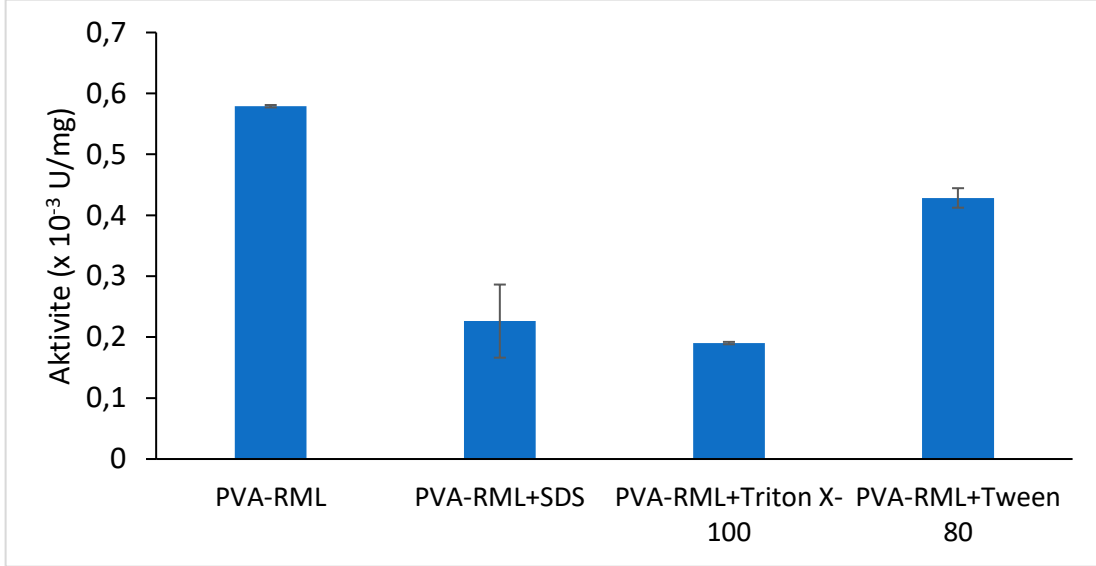
MMT'nin SDS gibi anyonik yüzey aktif madde varlığında, enzimi desorpsiyona uğratarak aktivitesinde azalmaya sebep olduğu düşünülmektedir. Enzimin aktif bölgesinin non-iyonik yüzey aktif maddelerin varlığından etkilendiği söylenebilir. Serbest RML'nin deterjan etken maddeleri olmadan sahip olduğu aktivite değeri $0,1465 \times 10^{-3}$ U/mg, MMT-RML'nin Triton X-100 ile muamele olduktan sonraki aktivite değeri $0,406 \times 10^{-3}$ U/mg'dır. Shibata ve diğerleri (1998), deterjan etken maddelerinin lipaz enziminin N-terminal ucunda bulunan hidrofobik bölgeyi aktive ettiğini vurgulamıştır. Bu etki, MMT'ye immobilize olmuş RML'nin deterjan etken maddeleri ile etkileştikten sonra taşıyıcıdan desorbe olmasına rağmen serbest enzime göre daha yüksek aktivite değerine sahip olmasının nedenini açıklamaktadır.



Şekil 5.14 MMT-RML'nin aktivitesi üzerine deterjan etken maddelerinin etkisi

Şekil 5.15'te görüldüğü gibi deterjan etken maddelerinin PVA-RML'nin aktivitesi üzerine etkisi MMT-RML'ye göre daha az inaktive edicidir. MMT-RML %1'lik SDS ilavesi sonucunda $0,1723 \times 10^{-3}$ U/mg'lık bir aktivite gösterirken, PVA-RML'nin SDS'in aynı konsantrasyonunda aktivitesi $0,2263 \times 10^{-3}$ U/mg oldu. Serbest enzim Tween 80 varlığında başlangıç aktivitesinin %90,97'sini korurken, PVA-RML başlangıç aktivitesinin %74'ünü korumayı başardı. Bu aktivite değerleri serbest enzim ve PVA-RML için sırasıyla $0,1332 \times 10^{-3}$ ve $0,4285 \times 10^{-3}$ U/mg olarak hesaplandı. MMT-RML'ye benzer şekilde, tüm çalışılan deterjanların PVA-RML'nin

inaktivasyonuna karşın serbest enzimin aktivite değerlerinden daha yüksek değerlerde olduğu saptandı. SDS gibi anyonik yüzey aktif maddeler varlığında PVA'nın yapısında bulunan hidroksil grupları H donörü olarak etki etmesinden dolayı PVA-RML'nin aktivitesinin SDS varlığında serbest enzime göre daha az etkilendiği düşünülebilir (Singh, Shukla, & Agrawal, 2020).



Şekil 5.15 PVA-RML'nin aktivitesi üzerine deterjan etken maddelerinin etkisi

Arana-Peña ve diğerleri (2019), sodyumborhidrit ile indirgenmiş oktil-glioksil agaroz taneciklerine RML'nin immobilizasyonunu gerçekleştirmiş ve immobilize RML'nin aktivitesi üzerine Triton X-100'ün %4 (v/v)'lük konsantrasyonunu denemişlerdir. 37 °C'de 30 dakika inkübasyonu sonunda immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin %50'sini koruduğu görülmüştür.

5.1.10 Serbest ve İmmobilize RML'nin Aktivasyon Enerjileri

Serbest ve immobilize RML'lerin aktivasyon enerjileri Arrhenius denkleminde yararlanılarak hesaplandı ve sonuçlar kcal/mol cinsinden Tablo 5.2'de verildi. Serbest RML'ye ait aktivasyon enerjisi 2,801144 kcal/mol olarak bulunurken montmorillonit K-10 üzerine adsorpsiyon tekniğiyle immobilizasyon sonrası enzimin aktivasyon enerjisinin düşerek 0,929398 kcal/mol'e ulaştığı hesaplandı. Jelde tutuklama ile immobilizasyondan sonra ise oluşan PVA-RML örneklerinin aktivasyon enerjisinin 5,05609 kcal/mol değerine çıktığı gözlemlendi.

Tablo 5.2 Serbest ve immobilize enzimlerin aktivasyon enerjileri

Serbest RML (kcal/mol)	MMT-RML (kcal/mol)	PVA-RML (kcal/mol)
2,8011	0,9294	5,0561

Bu sonuçlara göre adsorpsiyon yöntemi ile enzimin aktif bölgesine substratın ulaşmasının serbest enzime göre daha kolay olduğu ve enzim-substrat modelinin daha rahat olduğu sonucuna varıldı.

5.1.11 Serbest ve İmmobilize RML'nin Kinetik Parametreleri

Serbest ve immobilize edilmiş lipazların hidrolitik aktivitesi, substrat olan *p*-NPP'nin değişken başlangıç konsantrasyonları kullanılarak incelendi. K_m ve V_{max} gibi kinetik parametrelerin hesaplanması için Michaelis-Menten denklemi kullanıldı.

Tablo 5.1'deki veriler kinetik parametrelerin karşılaştırmasını göstermektedir. K_m değeri serbest enzim için 3,9 mM olmasına rağmen, MMT-RML'nin K_m değeri 0,22 mM olarak hesaplandı. PVA-RML'ye ait K_m değeri olan 4,0 mM ile serbest enzimin K_m değeri arasında anlamlı bir fark görülmemektedir. Bu sonuçlar, substrat moleküllerinin MMT-RML'nin aktif bölgesine erişiminin hızlandırıldığını ve böylece substrat afinitesinin artmasına yol açtığını gösterdi. Serbest RML için V_{max} değeri 0,35 U/mg protein olarak hesaplandı. MMT-RML ve PVA-RML için ise V_{max} değerleri serbest enzime göre bir miktar daha yüksek olacak şekilde sırasıyla 0,47 ve 0,40 U/mg protein olarak bulundu. Tablo 5.3'te gösterildiği gibi, PVA-RML hemen hemen serbest RML ile aynı katalitik verimi sergilerken MMT-RML, serbest RML'den 23,8 kat daha yüksek katalitik etki gösterdi. Literatürde *p*-NPP'ye karşı serbest RML için tahmini K_m değeri 1,13 mM olarak bulunmuştur (Takó, ve diğerleri, 2017). Badjugar ve diğerleri (2017), RML'nin HMC:CHI desteğine immobilizasyonunu gerçekleştirmiştir. Serbest ve immobilize RML için K_m değerlerini sırasıyla yaklaşık olarak 7,34 ve 6,36 mM, V_{max} değerlerini ise sırasıyla yaklaşık olarak 65,79 ve 80,65 $\mu\text{mol/mg/dk.}$ olarak bulmuşlardır. İmmobilizasyon sonrası katalitik etkinlik %141,45 olurken yarılanma ömrü yaklaşık 1,44'ten 16,65 güne çıkmıştır. Yildirim ve diğerleri (2019), nano gözenekli alüminyum oksit

membranları üzerinde immobilize edilmiş RML'nin K_m ve V_{max} değerlerini, sırasıyla *p*-NPP için 2,69 mM ve 0,55 U/mg protein olarak belirlemiştir. Bu çalışmada katalitik aktivite serbest enzime göre sırasıyla 2,3 ve 3,9 kat artış göstermiştir.

Tablo 5.3 Serbest ve immobilize enzimlerin kinetik parametreleri

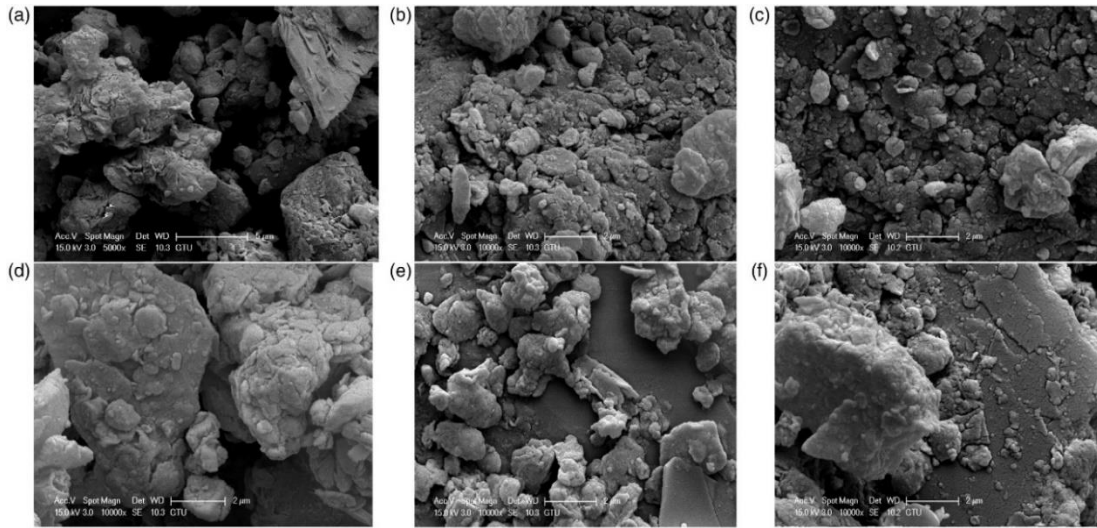
Enzimin formu	K_m (mM)	V_{max} (U/mg protein)	Katalitik etki oranı (V_{max}/K_m)immobilize /(V_{max}/K_m)serbest	$t_{1/2}$ (saat)
Serbest RML	3,9	0,35	-	14,2
MMT-RML	0,22	0,47	23,8	48,3
PVA-RML	4,0	0,40	1,1	105,1

Serbest ve immobilize lipazın yarılanma ömürleri 35 °C'de 0 ila 24 saat arasındaki çeşitli zaman aralıklarıyla araştırıldı. Tablo 5.3'te görüldüğü gibi, her iki immobilize lipaz formu, serbest enziminkinden önemli ölçüde daha yüksek bir yarılanma ömrü göstermiştir. 7 saatlik inkübasyon süresinden sonra, serbest lipazın başlangıç aktivitesinin % 35'ini kaybetmiş olmasına rağmen her iki immobilize lipaz başlangıç aktivitelerinin tümünü muhafaza etmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra başlangıç aktivite kaybı serbest lipaz için % 54 iken MMT-RML ve PVA-RML için karşılık gelen başlangıç aktivite kayıpları sırasıyla % 12 ve % 5 olmuştur. Serbest RML, MMT-RML ve PVA-RML için hesaplanan $t_{1/2}$ değerleri sırasıyla 14,2, 48,3 ve 105,1 saattir. Bu sonuçlar, MMT-RML ve PVA-RML'nin yarılanma ömürlerinin, serbest lipazdan sırasıyla yaklaşık 3,4 ve 7,4 kat daha yüksek olduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçlar, lipazın PVA içinde kapsüllenmesinin, denatürasyon veya deaktivasyondan korumak için bir barınak oluşturduğunu açıkça göstermektedir. Enzim kalabalıklaşması ayrıca enzim stabilitesi üzerinde pozitif veya negatif etkiye sahip olabilir (Zaak, ve diğerleri, 2017). Lipaz molekülleri PVA-RML'de birbirine yakın olabilir ve bu nedenle enzim stabilitesi artabilir ya da substratın enzimin aktif bölgesine ulaşması zorlaşabilir. Mohammadi ve diğerleri (2015), serbest RML'nin 50 °C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra başlangıç

aktivitesinin %85'ini kaybettiğini, kovalent olarak immobilize formları, SBA-RML ve silika-RML'nin 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra tüm başlangıç aktivitelerini koruduğunu bildirmiştir. de Vasconcellos ve diğerleri (2012), iyon değişimi sonrası zeolit P'yi RML için immobilizasyon taşıyıcısı olarak kullanmıştır. Serbest RML'nin başlangıç aktivitesinin %40'ını kaybettiğini 44 °C'de 60 dakikalık inkübasyon sonrası immobilize RML aynı koşullarda başlangıç aktivitesinin tamamını korumuştur.

5.1.12 İmmobilize RML'lerin Taramalı Elektron Mikroskopisi

Şekil 5.16, immobilizasyondan önce ve sonra montmorillonit K-10'un SEM görüntülerini göstermektedir. Yetersiz sonuçlardan dolayı PVA-RML'nin SEM görüntüleri verilmemiştir. İmmobilizasyon öncesi montmorillonit K-10'un yüzey morfolojisi (Şekil 5.16 (a – c)), yüzeyi lipaz molekülleri ile yüklendiğinde (Şekil 5.16 (d-f)) önemli değişiklikler gösterdi.

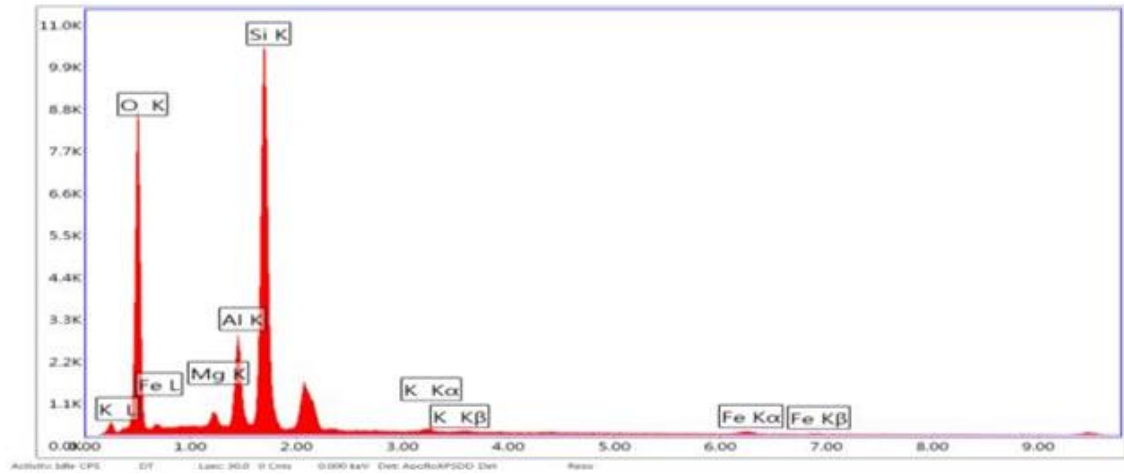


Şekil 5.16 MMT (a-c) ve MMT-RML'nin (d-f) SEM görüntüleri

Şekil 5.17 MMT'nin immobilizasyondan önce, Şekil 5.18 ise immobilizasyondan sonraki EDS analiz sonuçlarını göstermektedir. EDS'nin sonucu Si, O, Al'un immobilizasyon öncesi montmorillonit K-10'daki ana elementler olduğunu göstermektedir. Lipaz immobilizasyonundan sonra, montmorillonit K-10'da C, N, P ve S elementlerinin bulunduğu gözlemlendi. Sonuçlar, enzimin, montmorillonit K-10'a başarıyla immobilize olduğunu gösterdi.

EDS1	Mag:	Takeoff:	Live Time:	Amp Time:12.8	Resolution:
kV:	1000	31.1	30		124.3
15					

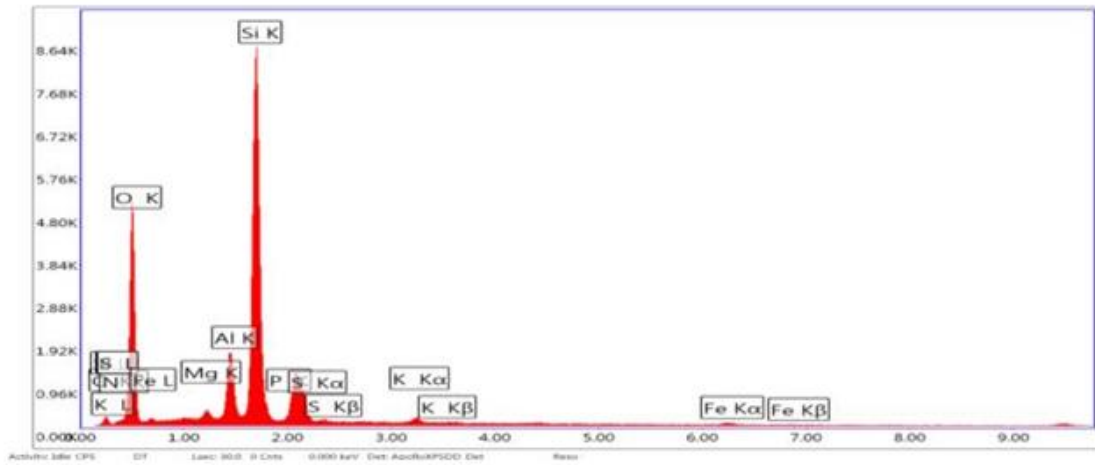
Element	Kütle %	Atomik %	Net Int.	Net Int. Error
O	51,92	65,8	1753,91	0,01
Mg	1,74	1,45	126,72	0,03
Al	7,96	5,98	641,75	0,01
Si	35,42	25,57	2828,08	0
K	0,82	0,42	36,63	0,1
Fe	2.15	0,78	29,93	0,17



Şekil 5.17 MMT'nin EDS analiz sonuçları

EDS1 kV: 15	Mag: 1000	Takeoff: 31.1	Live Time: 30	Amp Time:12.8	Resolution: 124.3
-------------------	--------------	------------------	------------------	------------------	----------------------

Element	Kütle %	Atomik %	Net Int.	Net Int. Error
C	5,87	9,84	21,81	0,08
N	2,11	3,03	11,3	0,17
O	39,45	49,61	784,35	0,01
Na	4,46	3,9	158,65	0,03
Mg	0,32	0,27	17,72	0,18
Al	8,93	6,66	548,14	0,01
Si	30,95	22,17	1866,15	0,01
P	3,07	2	125,72	0,01
S	2,48	1,55	105,45	0,07
K	0,76	0,39	25,7	0,14
Fe	1,59	0,57	16,73	0,24



Şekil 5.18 MMT-RML'nin EDS analiz sonuçları

Bu çalışmada, RML hafif koşullar altında adsorpsiyon ve tuzaklama yöntemi kullanılarak başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon verimleri sonuçları değerlendirildiğinde tezde çalışılan MMT-RML ve PVA-RML için immobilizasyon verimleri sırasıyla %76,5 ve %44 ile Yildirim ve diğerlerinin (2019) yapmış olduğu RML'nin alüminyum oksit ve protein kaplı mikrokristallere immobilizasyonu çalışmasına göre her iki immobilize form için de daha yüksek bağlanma yüzdesine sahiptir. Yildirim ve diğerlerinin (2019) çalışmasında bağlanma yüzdeleri sırasıyla %33,8 ve %25,1 olarak bulunmuştur. İmmobilizasyon sonrası enzimin optimum pH değeri her iki immobilize form için asidik bölgeye doğru kayma eğilimi göstermiştir. Serbest enzim için 7,5 olan optimum pH değeri immobilizasyon sonrası her iki immobilize form için de 7'ye inmiştir. Optimum pH'daki kaymaların taşıyıcı materyal ve enzim arasındaki etkileşimlerden etkilendiği bilinmektedir. MMT'ye glikoz oksidaz enziminin immobilizasyonu ile de enzimin optimum pH'ının 5,5'ten 4'e kaymış olması bu bilgiyi desteklemektedir (Seleci, ve diğerleri, 2012). Aynı zamanda serbest RML'nin 7 olarak bulunan optimum pH değeri silika ile aktifleştirilmiş destekler kullanıldığında pH 8'e yükselmiştir (Mohammadi, Habibi, Gandomkar, & Yousefi, 2018). Bu çalışmaya kıyasla MMT-RML'nin pH değişikliklerinden daha az etkilendiği söylenebilir. MMT-RML ve PVA-RML, Mohammedi ve diğerlerinin hazırlamış olduğu immobilize silika RML preparatlarına göre düşük pH değerlerinde daha yüksek aktivite göstermiştir (Mohammadi, ve diğerleri, 2015). Çalışmada bulunan optimum sıcaklık değerleri serbest RML, MMT-RML ve PVA-RML için sırasıyla 35, 25 ve 45 °C'dir. Bu sonuçlar Abdul Manan ve diğerlerinin (2018) yapmış olduğu çalışma ile kıyaslandığında MMT-RML ve PVA-RML'nin daha düşük sıcaklıklarda daha yüksek aktivite sergilediği sonucunu vermektedir. Abdul Manan ve diğerlerinin çalışmasında bulunan optimum sıcaklık koşulu olan 50 °C'de dahi immobilize RML, MMT-RML ve PVA-RML'nin bu koşullardaki aktivitesine göre daha düşük aktivite göstermiştir. Tampon konsantrasyonlarının immobilize RML'nin aktivitesi üzerine literatürde benzer bir çalışmaya rastlanmazken tezde çalışılan her üç RML formu için optimum tampon konsantrasyonu 50 mM olarak bulunmuştur. 0,1 M pH 7,5 sodyum-fosfat tamponunda ise aktivite değerleri RML, MMT-RML ve PVA-RML için sırasıyla %53,34, %74,33 ve %45,09 olarak bulunmuştur. Kronecki ve diğerleri (2020), 1 M

pH 7 sodyum-fosfat tamponunun enzimi destabilize edici etkisi olduğunu ve bu etkinin pH 5-9 1 M NaCl ile giderilebileceğini vurgulamıştır. Depolama kararlılıkları incelendiğinde İmmobilize RML'lerin 3 hafta sonunda hala başlangıç aktivitelerinin %80'ini koruduğu görülmüştür. Michaux ve diğerleri (2010), yaptıkları çalışmada 1 ay sonunda immobilize RML'nin başlangıç aktivitesinin yaklaşık %70'ini koruyabildiğini göstermişlerdir. İmmobilizasyondan sonra RML'nin termal stabilitesi önemli ölçüde artış göstermiştir. MMT-RML 65 °C'de 30 dakika inkübasyon sonrası bile başlangıç aktivitesinin yaklaşık %55'ini korurken aynı koşullarda PVA-RML'nin başlangıç aktivitesinin yaklaşık %35'ini sergilediği görülmüştür. Mohammedi ve diğerleri (2018), 65 °C'de inaktivasyona sokulduktan sonra immobilize enzimlerin başlangıç aktivitelerinin %62-28 aralığında korunduğunu tespit etmiştir. İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirlikleri incelendiğinde MMT-RML ve PVA-RML için sırasıyla dört tekrar kullanımdan sonra başlangıç aktivitelerinin % 87'sini ve %65'ini korudukları görülmüştür. MMT-RML'nin, PVA-RML'den daha iyi tekrar kullanılabilirlik performansı sergilediği tespit edilmiştir. Pitzalis ve diğerleri (2018), RM@ZIF-8LR'nin ikinci reaksiyondan sonra başlangıç aktivitesinin ancak %30'unu koruduğunu ve üçüncü tekrar kullanımda ise inaktif olduğunu bildirmiştir. Mohammedi ve diğerleri (2015), dördüncü kullanımda SBA-RML ve silika-RML için sırasıyla başlangıç aktivitelerinin %74 ve %65'ini koruduğunu bildirmişlerdir. Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ ve Mn²⁺ iyonları, çalışılan tüm konsantrasyonlarında serbest enzimin aktivitesini arttırıcı bir etki göstermiştir. (NH₄)⁺, Fe³⁺'in 0,5, 1 ve 2 M'lık konsantrasyonları ve Fe²⁺ iyonunun 2 M'lık konsantrasyonu serbest enzimin aktivitesinde artışa sebep olmuştur. Na⁺, NH₄⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ ve Fe³⁺ katyonlarının çalışılan tüm konsantrasyonları PVA-RML'nin aktivitesini arttırıcı etkisi gözlemlenmiştir. Ca²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺ katyonlarının düşük konsantrasyonları da PVA-RML'nin aktivitesini arttırmıştır. %1'lik Tween 80 ilavesiyle PVA-RML'nin aktivitesinin yaklaşık %74'ünü korumaya devam ettiği görülmüştür. RML, MMT-RML ve PVA-RML için aktivasyon enerjileri sırasıyla 2,8011, 0,9294 ve 5,0561 kcal/mol olarak bulunmuştur. MMT'ye immobilizasyonu sonrası RML'nin aktivasyon enerjisinde 3,014 katlık bir azalma meydana gelmiştir. K_m değerleri RML, MMT-RML ve PVA-RML için sırasıyla 3,9, 0,22 ve 4 mM olarak bulunmuştur. RML'nin MMT'ye immobilizasyonu sonrası K_m değerindeki azalma

17,73 kat kadardır. Badjugar ve diğeri (2017), immobilizasyon sonrası RML'nin K_m değeriindeki azalmayı yalnızca 1,15 kat olarak bulmuşlardır. Yildirim ve diğeri (2019) ise immobilizasyon sonrası K_m değerinin yalnızca 2,69 mM'a kadar indiğini gözlemleyebilmiştir. RML, MMT-RML ve PVA-RML için maksimum reaksiyon hızları U/mg protein cinsinden sırasıyla 0,35, 0,47 ve 0,4 olarak hesaplanmıştır. Yildirim ve diğeri (2019), immobilize RML için V_{max} değerini 0,55 U/mg protein olarak hesaplamıştır. Katalitik etkinlik açısından MMT'ye immobilize olmuş RML'nin serbest enzime göre 23,8 kat artış gösterdiği görülmektedir. RML, MMT-RML ve PVA-RML için yarılanma ömürleri sırasıyla 14,2, 48,3 ve 105,1 saat olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar PVA-RML'nin yarısının bozulması için geçen sürenin serbest RML'ninkine oranının 7,4 kat daha uzun olduğunu göstermektedir. MMT-RML için ise bu oran serbest enzime göre 3,4'tür. Yildirim ve diğeri (2019), 40 °C'de yarılanma ömürlerini serbest enzim için 19, immobilize enzimler için ise 78 ve 87 saat olarak hesaplamıştır. Bu sonuçlar göz önüne alındığında PVA-RML'nin yarısının bozulması için geçmesi gereken zamanın çok daha uzun olduğu söylenebilir.

Bu tez çalışmasında, endüstriyel öneme sahip RML'nin doğal ve non-toksik desteklere, kolay uygulanabilir, düşük maliyetli iki farklı teknikle immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Immobilizasyon işlemleri sonucu bağlanma literatürdeki örnek çalışmalara göre oldukça etkin bir şekilde gerçekleşmiştir. pH değişimlerinden az etkilenen ve düşük sıcaklıklarda dahi yüksek aktiviteye sahip bu iki immobilize RML formu, optimum sıcaklık koşulları yüksek olan benzer immobilize lipazların bu optimum koşullarında dahi daha yüksek aktivite sergilemiştir. Uzun süre depolanabilme kapasitesi, tekrar kullanılabilirliği ve yüksek termal stabilitesiyle literatürdeki diğer benzer çalışmaların bir adım ötesinde olan bu iki immobilize RML pek çok iyon ve yüzey aktif maddeden minimum düzeyde etkilenmiş, özellikle PVA-RML'nin aktivitesi pek çok katyon varlığında artış göstermiştir. MMT'ye immobilize olan RML'nin aktif konformasyonunun sabitlenmesi ile aktivasyon enerjisinde önemli ölçüde azalma meydana gelmesine rağmen PVA'ya immobilize olan enzim için böyle bir avantajdan söz edilememektedir. Bunun önüne geçmek için PVA'ya immobilize edilmeden önce enzimin farklı yöntemlerle aktif konformasyonuna sabitlenmesi denenebilir. Aktivasyon enerjisinin azalmasına

sebeup olan aktif konformasyona geçiş ile benzer bir etkiyle MMT'ye immobilizasyon sonucu RML'nin K_m değerinde önemli ölçüde bir azalma meydana gelmiştir. V_{max} değerlerinde immobilizasyon sonrasında çok önemli bir farklılık gözlenmezken MMT'ye immobilizasyon sonrası enzimin katalitik etkinliği önemli ölçüde artış göstermiştir. Her iki immobilize formun yarılanma ömürleri serbest enzime göre artış gösterirken PVA-RML'de bu artış göz ardı edilemeyecek kadar fazla olmuştur.

Yüksek tampon çözelti konsantrasyonundan minimum düzeyde etkilenmesi, yüksek sıcaklıklarda dahi başlangıç aktivitesini koruması, aktivasyon enerjisi ve K_m değerinin düşüklüğü, katalitik etkinliğinin ve yarılanma ömrünün serbest enzime göre yükselmesi MMT-RML'nin başarılı bir immobilize enzim olduğunu göstermektedir. PVA-RML için ise bu stnlkler katyon varlığında göstermiş olduğu dayanıklılık, düşük sıcaklıklarda dahi yüksek enzimatik aktiviteye sahip olması ve oldukça yüksek yarılanma ömrüdür.

İmmobilizasyon ile hidroliz reaksiyonlarında serbest enzime göre çeşitli parametrelerde üstünlüklerin elde edilmesi endüstriyel açıdan değerlendirildiğinde özellikle gıda, deterjan, ilaç gibi sektörlerde enzimin aktivasyon enerjisinin ve K_m değerlerinin azalması ile reaksiyon sürelerinin kısaltılması ve reaksiyonun kolaylaşması, immobilize enzimin reaksiyon ortamından kolaylıkla uzaklaştırılabilmesi, ürün oluşumunun kontrol altına alınması ve atık sıvı miktarlarının azaltılması, tekrar kullanımda aktivitede kayıpların en aza indirilmesi ve enzimin yarılanma ömründe artışla maliyetin azaltılması, enzimin üretim koşullarına dayanıklılık göstermesi, düşük ve yüksek sıcaklıklarda aktivitede artış meydana gelmesi ile üretim veriminin arttırılması, enzimin kararlılığının artması ile çok basamaklı ve sürekli işlemlere uygulanabilirliğinin artması gibi açılardan umut vericidir.

Çalışmada elde edilen sonuçların yararlılığı göz önünde bulundurularak kullanılmış olan immobilizasyon metodlarının geliştirilmesi, enzimin farklı taşıyıcılara immobilize edilmesi, substrat spesifikliklerinin belirlenmesi, hidroliz reaksiyonunun deterjan, gıda ve ilaç endüstrisi gibi endstrelere olan katkılarının incelenmesi, lipaz enziminin hidrolizden farklı olarak esterifikasyon, transesterifikasyon, asidoliz, aminoliz ve alkoliz reaksiyonları ile immobilizasyonun üstünlüklerinin test edilmesi

ile devam ettirilebilir. Reaksiyon çeşitliliği üstünlüğünün immobilizasyon ile devam ettiği durumlarda transesterifikasyonla immobilize enzim ile biyodizel üretimi, süt ve süt ürünleri ile alkollü içeceklerin üretimi ve aroma artırımına faydası, yağ analoglarının ve sağlıklı yiyeceklerin üretilmesi; esterifikasyonla zirai kimyasalların ve kozmetik krem ve yağların üretimi gibi endüstriyel ölçekte immobilize RML preparatlarının çeşitli parametreleri incelenebilir.

- Abdul Manan, F., Attan, N., Widodo, N., Aboul-Enein, H. Y., & Wahab, R. (2018). *Rhizomucor miehei* lipase immobilized on reinforced chitosan-chitin nanowhiskers support for synthesis of eugenyl benzoate. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 48(1), 92-102.
- Adnan, M., Li, K., Xu, L., & Yan, Y. (2018). X-Shaped ZIF-8 for Immobilization *Rhizomucor miehei* lipase via encapsulation and its application toward biodiesel production. *Catalysts*, 8(3), 96.
- Ahanibarough, M. (2016). Tabakalı montmorillonit kilin yeni biyoorganik ve fonksiyonel polimerik türevlerinin nanosentezi, karakterizasyonu ve biyomühendislik uygulamaları. *Yüksek Lisans Tezi*. Ankara: Hacettepe Üniversitesi.
- Aktümsek, A., Gökalp, Ö. G., Çakmak, Y. S., & Zengin, G. (2018). *Temel biyokimya*. Ankara: Nobel.
- Aljawish, A., Heuson, E., Bigan, M., & Froidevaux, R. (2019). Lipase catalyzed esterification of formic acid in solvent and solvent-free systems. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101221.
- Arana-Peña, S., Mendez-Sanchez, C., Rios, N. S., Ortiz, C., Gonçalves, L. R., & Fernandez-Lafuente, R. (2019). New applications of glyoxyl-octyl agarose in lipases co-immobilization: Strategies to reuse the most stable lipase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 989-997.
- Arana-Peña, S., Rios, N. S., Mendez-Sanchez, C., Lokha, Y., Carballares, D., Gonçalves, L. R., & Fernandez-Lafuente, R. (2020a). Coimmobilization of different lipases: Simple layer by layer enzyme spatial ordering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 856-864.
- Arana-Peña, S., Rios, N. S., Mendez-Sanchez, C., Lokha, Y., Gonçalves, L. R., & Fernández-Lafuente, R. (2020b). Use of polyethylenimine to produce immobilized lipase multilayers biocatalysts with very high volumetric activity using octyl-agarose beads: Avoiding enzyme release during multilayer production. *Enzyme and Microbial Technology*, 109535, 1-11.
- Aydın Karaağaç, R. (2019). *Sarocladium strictrum* T4 izolatu ile steril olmayan kültür koşulları altında kayısı posası vasatında pektinaz enziminin üretimi. *Doktora Tezi*. Erzurum: Atatürk Üniversitesi.
- Badgujar, V. C., Badgujar, K. C., Yeole, P. M., & Bhanage, B. M. (2017). Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase on a polymeric film for synthesis of important fatty acid esters: kinetics and application studies. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(10), 1463-1478.

- Bakır, S., Akbulut, A., Kapkaç, F., Karahan, D., & Çetin, C. (2012). *Türkiye bentonit envanteri*. Ankara: Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü Envanter Serisi-204.
- Basso, A., & Serban, S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis*, 479, 1-20.
- Bastem, E. S. (2019). Eupatilin, gardenin a, eupatorin flavon türevi bileşiklerinin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve hCA II) ile asetilkolinesteraz ve bütürlkolinesteraz enzimleri üzerine etkilerinin araştırılması. *Doktora Tezi*. Erzurum: Atatürk Üniversitesi.
- Baykal, E., Vardar, G., Attar, A., & Altıkatoglu Yapaoz, M. (2020). Complexes of glucose oxidase with chitosan and dextran possessing enhanced stability. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 1-6. doi:https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1719515
- Binhayeeding, N., Yunu, T., Pichid, N., Klomklao, S., & Sangkharak, K. (2020). Immobilisation of *Candida rugosa* lipase on polyhydroxybutyrate via a combination of adsorption and cross-linking agents to enhance acylglycerol production. *Process Biochemistry*(95), 174-185.
- Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Enzymes. A. Blanco, & G. Blanco içinde, *Medical Biochemistry* (s. 153-157). Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-803550-4.00008-2
- Borrelli, G. M., & Trono, D. (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 20774-20840.
- Bunn, C. W. (1948). Crystal structure of polyvinyl alcohol. *Nature*, 161, 929-930.
- Cacciotti, I., Lombardelli, C., Benucci, I., & Esti, M. (2019). Clay/chitosan biocomposite systems as novel green carriers for covalent immobilization of food enzymes. *Journal of Materials Research and Technology*, 8(4), 3644-3652.
- Cacicedo, M. L., Manzo, R. M., Municoy, S., Bonazza, H. L., Islan, G. A., Desimone, M., . . . Castro, G. R. (2019). Immobilized enzymes and their applications. R. Singh, R. Singhania, A. Pandey, & C. Larroche içinde, *Advances in Enzyme Technology* (s. 169-200). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-444-64114-4.00007-8
- Champe, P. C., & Harvey, R. A. (1997). *Biyokimya* (2. Baskı b.). (A. Tokullugil, M. Dirican, & E. Ulukaya, Çev.) İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
- Chen, X., Li, J., Deng, L., Pedersen, J., Li, L., Guo, Z., . . . Xu, X. (2018). Biodiesel production using lipases. U. T. Bornscheuer içinde, *Lipid Modification by Enzymes and Engineered Microbes* (s. 203-239). AOCS Press. doi:10.1016/B978-0-12-813167-1.00010-4
- Chen, Z., Liu, L., & Yang, R. (2017). Improved performance of immobilized lipase by interfacial activation on Fe₃O₄@PVBC nanoparticles. *RSC Advances*, 7, 35169-35174.

- Çakmak, B. (2019). Sülfosalisilik asit türev komplekslerinin karbonik anhidraz izoenzimleri üzerinde inhibisyon etkilerinin incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*. Dumlupınar Üniversitesi.
- Çiftçi, H. (2019). Bir ilaç taşıyıcı sistemi olarak montmorillonit/manyetit nano-kompozit sentezi ve karakterizasyonu. *Doktora Tezi*. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Dal Magro, L., de Moura, K., Backes, B., de Menezes, E., Benvenuto, E., Nicolodi, S., . . . Rodrigues, R. C. (2019). Immobilization of pectinase on chitosan-magnetic particles: Influence of particle preparation protocol on enzyme properties for fruit juice clarification. *Biotechnology Reports*, 24, e00373. doi:10.1016/j.btre.2019.e00373
- de Albuquerque, T. L., Rueda, N., dos Santos, J. C., Barbosa, O., Ortiz, C., Binay, B., . . . Fernandez-Lafuente, R. (2016). Easy stabilization of interfacially activated lipases using heterofunctional divinyl sulfone activated-octyl agarose beads. Modulation of the immobilized enzymes by altering their nanoenvironment. *Process Biochemistry*, 51, 865–874.
- de Vasconcellos, A., Paula, A. S., Luizon Filho, R. A., Farias, L. A., Gomes, E., Aranda, D. A., & Nery, J. G. (2012). Synergistic effect in the catalytic activity of lipase *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolites for the production of biodiesel. *Microporous and Mesoporous Materials*, 163, 343-355.
- DeMerlis, C. C., & Schoneker, D. R. (2003). Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and Chemical Toxicology*, 41, 319–326.
- Elgharbawy, A. A., Riyadi, F., Alam, M., & Moniruzzaman, M. (2018). Ionic liquids as a potential solvent for lipase-catalysed reactions: A review. *Journal of Molecular Liquids*, 251, 150-166.
- Fang, S.-M., Wang, H.-N., Zhao, Z.-X., & Wang, W.-H. (2012). Immobilized enzyme reactors in HPLC and its application in inhibitor screening: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2(2), 83-89.
- Fernandez-Lopez, L., Rueda, N., Bartolome-Cabrero, R., Rodriguez, M. D., Albuquerque, T. L., dos Santos, J. C., . . . Fernandez-Lafuente, R. (2016). Improved immobilization and stabilization of lipase from *Rhizomucor miehei* on octyl-glyoxyl agarose beads by using CaCl₂. *Process Biochemistry*, 51(1), 48-52.
- Ganguly, S., Dana, K., Mukhopadhyay, T., & Parya, T. (2011). Organophilic nano clay: A comprehensive review. *Transactions of the Indian Ceramic Society*, 70(4), 189-206.
- Gholamzadeh, P., Mohammadi Ziarani, G., & Badiei, A. (2017). Immobilization of lipases onto the SBA-15 mesoporous silica. *Biocatalysis and Biotransformation*, 35(3), 131-150.
- Gómez de Segura, A., Alcalde, M., Plou, F. J., Remaud-simeon, M., Monsan, P., & Ballesteros, A. (2003). Encapsulation in LentiKats of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299, and its effect on product selectivity. *Biocatalysis and Biotransformation*, 21(6), 325-33.

- Guisan, J. M. (2013). *Immobilization of enzymes and cells* (3. Baskı b.). Londra: Human Press.
- Gül, Ü. D. (2013). Fungal lipazlar ve endüstride kullanım alanları. *Afyon Kocatepe University Journal of Science and Engineering*, 13, 1-8.
- Gündüz Balpetek, F., & Gülümser, T. (2016). Ev tipi deterjan yapılarındaki bazı bileşenlerin tekstil malzemelerinin beyazlığı üzerine etkileri. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 22(7), 597-604.
- Hames, D., & Hooper, N. (2006). *Biyokimya* (3. Baskıdan Çeviri b.). (Y. Tutar, H. Geçkil, & M. Karataş, Çev.). Leeds: Nobel Akademik Yayıncılık.
- Han, Z.-l., Han, S.-y., & Zheng, S.-p. (2009). Enhancing thermostability of a *Rhizomucor miehei* lipase by engineering a disulfide bond and displaying on the yeast cell surface. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(1), 117.
- Hettiarachchy, N. S., Feliz, D. J., Edwards, J. S., & Horax, R. (2018). The use of immobilized enzymes to improve functionality. R. Y. Yada içinde, *Proteins in Food Processing (Second Edition)* (s. 569-597). Woodhead Publishing. doi:10.1016/B978-0-08-100722-8.00022-X
- Hronská, H., Mastihubá, V., Tokořová, S., & Rosenberg, M. (2016). Semicontinual synthesis of alkyl galactosides using β -galactosidase entrapped in polyvinylalcohol hydrogel. *Biocatalysis and Biotransformation*, 34(5), 219-225.
- Huang, J., Zhao, Q., Chen, L., Zhang, C., Bu, W., Zhang, X., ... Yang, Z. (2020). Improved production of recombinant *Rhizomucor miehei* lipase by coexpressing protein folding chaperones in *Pichia pastoris*, which triggered ER stress. *Bioengineered*, 11(1), 375-385.
- Huth, H.-U., & Rath, H. (2005). *U.S/Washington, DC Patent No. 6,960,627*.
- İskender, E. (2019). *Geobacillus stearothermophilus* AH22 bakterisi membranına bağlı lipazın karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*. Rize: Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi.
- Jacob, J., & Suthindhiran, K. (2019). Immobilisation of lipase enzyme onto bacterial magnetosomes for stain removal. *Biotechnology Reports*, 25, 1-7.
- Junior, J., Ferrarezi, A., Borges, J., Rossi, J., Bocchini, D., Gomes, E., ... Boscolo, M. (2020). Ultrasound affects the selectivity and activity of immobilized lipases applied to fatty acid ethyl ester synthesis. *Acta Scientiarum. Technology*, 42, e46582-e46582. doi:10.4025/actascitechnol.v42i1.46582
- Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlıoğlu, M., Başpınar, N., & Tiftik, A. M. (2013). *Biyokimya*. Ankara: Nobel Yayın.
- Karagözlü, C., & Karagözlü, N. (2004). Süt endüstrisinde deterjan ve dezenfektan kalıntılarının önemi. *HR. Ü.Z.F.Dergisi*, 8(3/4), 73-81.
- Karahan, F. (2019). Afinite kromatografisi yöntemiyle sığır akciğerinden saflaştırılan anjiotensin konverting enzim (ACE EC 3.4.15.1) üzerine hipertansiyonu önleyici bazı etken maddelerin in vitro etkilerinin araştırılması. *Doktora Tezi*. Van: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi.

- Karakuş, E., Özler, A., & Pekyardimci, Ş. (2008). Noncovalent immobilization of pectinesterase (*Prunus armeniaca* L.) onto bentonite. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 36(6), 535-550.
- Kaur, J., Choudhar, S., Chaudhari, R., Jayant, R. D., & Joshi, A. (2019). Enzyme-based biosensors. K. Pal, H.-B. Kraatz, A. Khasnobish, S. Bag, I. Banerjee, & U. Kuruganti içinde, *Bioelectronics and Medical Devices* (s. 211-240). Cambridge: Woodhead Publishing. doi:10.1016/B978-0-08-102420-1.00013-3
- Ke, C., Fan, Y., Su, F., & Xu, L. (2018). Recent advances in enzyme immobilization. *Chinese Journal of Biotechnology*, 34(2), 188-203.
- Keha, E., & Küfrevioğlu, Ö. (2018). *Biyokimya*. Erzurum: Aktif Yayınevi.
- Kırışan, M. (2015). ZnO/Montmorillonit nanokompozitinin sentezi ve bazı organik kirleticilerin fotokatalitik-ozonlama prosesi ile gideriminde kullanım etkinliğinin incelenmesi. *Doktora Tezi*. Erzurum: Atatürk Üniversitesi.
- Komakazu, G., Ota, Y., & Minoda, Y. (1986). Role of lipase activators produced by *Saccharomycopsis lipolytica* and calcium ion in its lipase reaction. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1, 2531-2536.
- Kon'kovaa, T. V., & Ryseva, A. P. (2020). Inversion of montmorillonite ion-exchange characteristics. *Colloid Journal*, 82(2), 130-135.
- Kornecki, J. F., Carballares, D., Morellon-Sterling, R., Siar, E., Kashefi, S., Chafiaa, M., . . . Fernandez-Lafuente, R. (2020). Influence of phosphate anions on the stability of immobilized enzymes. Effect of enzyme nature, immobilization protocol and inactivation conditions. *Process Biochemistry*, 95, 288-296.
- Kotogán, A., Zambrano, C., Kecskeméti, A., Varga, M., Szekeres, A., Papp, T., . . . Takó, M. (2018). An organic solvent-tolerant lipase with both hydrolytic and synthetic activities from the oleaginous fungus *Mortierella echinosphaera*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1129.
- Kumar, A., Gudiukaite, R., Gricajeva, A., Sadauskas, M., Malunavicius, V., Kamyab, H., . . . Pant, D. (2020). Microbial lipolytic enzymes-promising energy-efficient biocatalysts in bioremediation. *Energy*, 192, 116674.
- Liu, D.-M., & Dong, C. (2020). Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications. *Process Biochemistry*, 92, 464-475.
- Liu, J., Ma, R.-T., & Shi, Y.-P. (2020). Recent advances on support materials for lipase immobilization and applicability as biocatalysts in inhibitors screening methods"-A review. *Analytica Chimica Acta*, 1101, 9-22.
- Liu, S. (2017). Enzymes. S. Liu içinde, *Bioprocess Engineering (Second Edition)* (s. 297-373). Amsterdam: Elsevier. doi:doi.org/10.1016/B978-0-444-63783-3.00007-1
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

- Marín-Suárez, M., Méndez-Mateos, D., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2019). Reuse of immobilized lipases in the transesterification of waste fish oil for the production of biodiesel. *Renewable Energy*, 140, 1-8.
- Math, R. K., Kambiranda, D., Yun, H., & Ghebreyessus, Y. (2020). Binding of cloned Cel enzymes on clay minerals related to the pI of the enzymes and database survey of cellulases of soil bacteria for pI. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 84(2), 238-246.
- Mehdizade, R. (2019). Manyetik p-Sulfokalik[8]aren oktakarboksilik asit türevinin sentezi ve lipaz immobilizasyonunda kullanılması. *Yüksek Lisans Tezi*. Konya: Selçuk Üniversitesi.
- Michaux, F., Zoumpantioti, M., Papamentzelopoulou, M., Ste'be', M. J., Jean, L. B., & Xenakis, A. (2010). Immobilization and activity of *Rhizomucor miehei* lipase. Effect of the matrix properties prepared from nonionic fluorinated surfactants. *Process Biochemistry*, 45, 39-46.
- Mohammadi, M., Ashjari, M., Dezvarei, S., Yousefi, M., Babaki, M., & Mohammadi, J. (2015). Rapid and high-density covalent immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase using a multi component reaction: Application in biodiesel production. *RSC Advances*, 5(41), 32698-32705.
- Mohammadi, M., Habibi, Z., Gandomkar, S., & Yousefi, M. (2018). A novel approach for bioconjugation of *Rhizomucor miehei* lipase (RML) onto amine-functionalized supports; application for enantioselective resolution of rac-ibuprofen. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 523-531.
- Murray, R. K., Bender, D. A., Botham, K. M., Rodwell, V. W., & Weil, P. (2015). *Harper'in biyokimyası* (29. Baskı b.). (G. G. Akdoğan, B. Ersöz, & N. Turgan, Çev.) İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Nair, A. R., & Chellapan, G. (2020). Improving operational stability of thermostable *Pythium myriotylum* secretory serine protease by preparation of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50(2), 107-115.
- National Center for Biotechnology Information. (2019, 2 14). 2020 tarihinde U.S. National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/6QPP> adresinden alındı
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2013). *Lehninger biyokimyanın ilkeleri* (5. Baskıdan Çeviri b.). (Y. Elçin, Çev.). Ankara: Palme Yayıncılık.
- Niezgoda, N., & Gliszczynska, A. (2019). Lipase catalyzed acidolysis for efficient synthesis of phospholipids enriched with isomerically pure *cis*-9,*trans*-11 and *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid. *Catalysts*, 9(12), 1012.
- Önal, S., & Telefoncu, A. (2003). Comparison of chitin and Amberlite IRA-938 for α -galactosidase immobilization. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 31(1), 19-33.

- Öztürk, H., Pollet, E., Phalip, V., Güvenilir, Y., & Avérous, L. (2016). Nanoclays for lipase immobilization: Biocatalyst characterization and activity in polyester synthesis. *Polymers*, 8(12), 1-17.
- Pencreac'h, G., & Baratti, J. C. (1996). Hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate in *n*-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(6), 417-422.
- Peters, G. H., Toxvaerd, S., Ande, K., & Svendsen, A. (1999). Analysis of the dynamics of *Rhizomucor miehei* lipase at different temperatures. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 16(5), 1003-1018.
- Pitzalis, F., Carucci, C., Naseri, M., Fotouhi, L., Magner, E., & Salis, A. (2018). Lipase encapsulation onto ZIF-8: A comparison between biocatalysts obtained at low and high zinc/2-methylimidazole molar ratio in aqueous medium. *ChemCatChem*, 10(7), 1578-1585.
- Qin, S., Zhao, Y., Wu, B., & He, B. (2016). A calcium-ion-stabilized lipase from *Pseudomonas stutzeri* ZS04 and its application in resolution of chiral aryl alcohols. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(7), 1456-1466.
- Rajasekar, V., Tambe, A., & Datla, A. (2013). Immobilization and characterization of recombinant *Candida antarctica* lipase B on poly(glycidyl methacrylate-terdivinyl benzene-ter-ethylene dimethacrylate) beads, "DILBEADS™TA". *Biocatalysis and Biotransformation*, 31(2), 79-88.
- Rebroš, M., Pilniková, A., Šlmčíková, D., Weignerová, L., Stloukal, R., Křen, V., & Rosenberg, M. (2013). Recombinant α -L-rhamnosidase of *Aspergillus terreus* immobilization in polyvinylalcohol hydrogel and its application in rutin derhamnosylation. *Biocatalysis and Biotransformation*, 31(6), 329-334.
- Rodrigues, R. C., Virgen-Ortíz, J. J., dos Santos, J. C., Berenguer-Murcia, Á., Alcantara, A. R., Barbosa, O., ... Fernandez-Lafuente, R. (2019). Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. *Biotechnology Advances*, 37, 746-770.
- Sadana, A., & Henley, J. P. (1987). Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, 30(6), 717-723.
- Sakurada, I. (1985). *Polyvinyl alcohol fibers*. New York: Marcel Dekker.
- Salgın, S., Çakal, M., & Salgın, U. (2020). Kinetic resolution of racemic naproxen methyl ester by magnetic and non-magnetic cross-linked lipase aggregates. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50(2), 148-155.
- Salis, A., Sanjust, E., Solinas, V., & Monduzzi, M. (2005). Commercial lipase immobilization on Accurel MP 1004 porous polypropylene. *Biocatalysis and Biotransformation*, 23(5), 381-386.
- Sanjay, G., & Sugunan, S. (2008). Acid activated montmorillonite: An efficient immobilization support for improving reusability, storage stability and operational stability of enzymes. *Journal of Porous Mater*, 15, 359-367.

- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V., & Sumana, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *American Institute of Chemical Engineers*, 34(1), 5-28.
- Seghal Kiran, G., Nishanth Lipton, A., Kennedy, J., Dobson, A., & Selvin, J. (2014). A halotolerant thermostable lipase from the marine bacterium *Oceanobacillus* sp. PUMB02 with an ability to disrupt bacterial biofilms. *Bioengineered*, 5(5), 305-318.
- Seleci, M., Ag, D., Yalcinkaya, E. E., Odaci Demirkol, D., Guler, C., & Timur, S. (2012). Amine-intercalated montmorillonite matrices for enzyme immobilization and biosensing applications. *RSC advances*, 2(5), 2112-2118.
- Shahedi, M., Yousefi, M., Habibi, Z., Mohammadi, M., & As'habi, M. (2019). Co-immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase and *Candida antarctica* lipase B and optimization of biocatalytic biodiesel production from palm oil using response surface methodology. *Renewable Energy*, 141, 847-857.
- Sharifi, M., Karim, A. Y., Nanakali, N., Salihli, A., Aziz, F., Hong, J., . . . Falahati, M. (2019). Strategies of enzyme immobilization on nanomatrix supports and their intracellular delivery. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38(9), 1-17.
- Sharon, C., Nakazato, M., Ogawa, H. I., & Kato, Y. (1998). Lipase-induced hydrolysis of castor oil: Effect of various metals. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21(6), 292-295.
- Shibata, H., Kato, H., & Oda, J. (1998). Calcium ion-dependent reactivation of a *Pseudomonas* lipase by its specific modulating protein, LipB. *The Journal of Biochemistry*, 123(1), 136-141.
- Singh, C. P., Shukla, P. K., & Agrawal, S. L. (2020). Ion transport studies in PVA: NH₄CH₃COO gel polymer electrolytes. *High Performance Polymers*, 32(2), 208-219.
- Singh, D., & Singh, M. (2012). Development of antibiotic and debriding enzyme-loaded PLGA microspheres entrapped in PVA gelatin hydrogel for complete wound management. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 40(5), 345-353.
- Sneha, H., Beulah, K., & Murthy, P. S. (2019). Enzyme immobilization methods and applications in the food industry. M. Kuddus içinde, *Enzymes in Food Biotechnology* (s. 645-658). Londra: Academic Press.
- Soares, J. C., Moreira, P. R., Queiroga, A. C., Morgado, J., Malcata, F. X., & Pintado, M. E. (2011). Application of immobilized enzyme technologies for the textile industry: A review. *Biocatalysis and Biotransformation*, 29(6), 223-237.
- Subinya, M., Steudle, A. K., Jurkowski, T. P., & Stubenrauch, C. (2015). Conformation and activity of lipase B from *Candida antarctica* in bicontinuous microemulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 131, 108-114.
- Şengel, B. Ş. (2007). Deterjan katkı maddesi olarak mikrobiyal kaynaklı lipaz üretim koşullarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi.

- Takó, M., Kotogán, A., Papp, T., Kadaikunnan, S., Alharbi, N. S., & Vágvölgyi, C. (2017). Purification and properties of extracellular lipases with transesterification activity and 1,3-regioselectivity from *Rhizomucor miehei* and *Rhizopus oryzae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(2), 277-288.
- Telefoncu, A. (1997). *Enzimoloji, Lisansüstü yaz okulu*. İzmir: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi.
- Tunç Odabaş, M. T. (2019). Ohmik ısıtma destekli hidrodistilasyon yöntemi ile karanfil, tarçın ve defne esansiyel yağlarının elde edilmesi ve enkapsülasyonu. *Doktora Tezi*. İzmir: Ondokuz Mayıs Üniversitesi.
- Tunç, Ç. (2006). Poli(metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat) hidrojeli kullanılarak β -galaktosidazın kovalent bağlanma yöntemiyle immobilizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*. Ankara: Gazi Üniversitesi.
- Ulker, C., Gokalp, N., & Guvenilir, Y. (2016). Immobilization of *Candida antarctica* lipase B (CALB) on surface-modified rice husk ashes (RHA) via physical adsorption and cross-linking methods. *Biocatalysis and Biotransformation*, 34(4), 172-180.
- Ulutürk, C. (2012). Pullulanazın farklı taşıyıcılarda immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*. İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi.
- Urrutia, P., Arrieta, R., Alvarez, L., Cardenas, C., Mesa, M., & Wilson, L. (2018). Immobilization of lipases in hydrophobic chitosan for selective hydrolysis of fish oil: The impact of support functionalization on lipase activity, selectivity and stability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 674-686.
- Verdasco-Martín, C. M., Garcia-Verdugo, E., Porcar, R., Fernandez-Lafuente, R., & Otero, C. (2018). Selective synthesis of partial glycerides of conjugated linoleic acids via modulation of the catalytic properties of lipases by immobilization on different supports. *Food Chemistry*, 245, 39-46.
- Verma, N., Thakur, S., & Bhatt, A. (2012). Microbial lipases: Industrial applications and properties (A review). *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(8), 88-92.
- Vogel, K. (2018). Analytics of enzymes. C. S. Nune, & V. Kumar içinde, *Enzymes in Human and Animal Nutrition Principles and Perspectives* (s. 441-455). Londra: Academic Press.
- Wahba, M. I. (2020). Enhancement of the mechanical properties of chitosan. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 31(3), 350-375.
- Wu, X. Y., Jääskeläinen, S., & Linko, Y.-Y. (1996). Purification and partial characterization of *Rhizomucor miehei* lipase for ester synthesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 59(2), 145-158.
- Yadav, M. G., Vadgama, R. N., Kavadia, M. R., Odaneth, A., & Lali, A. M. (2019). Production of pentaerythritol monoricinoleate (PEMR) by immobilized *Candida antarctica* lipase B. *Biotechnology Reports*, 23, 1-9.

- Yadav, N., Narang, J., Chhillar, A. K., & Pundir, C. S. (2018). Preparation, characterization, and application of enzyme nanoparticles. C. V. Kumar içinde, *Methods in Enzymology* (Cilt 609, s. 172-196). Cambridge: Elsevier.
- Yalçın, E. (2010). Bentonit killer üzerinde etilen glikol monoetil eter adsorpsiyonu. *Yüksek Lisans Tezi*. Ankara: Ankara Üniversitesi.
- Yıldırım, D. (2010). *Mucor miehei* ve *Pseudomonas sp.* lipazlarının aktifleştirilmiş florisil desteğe glutaraldehit ve polisüksinimid üzerinden ayrı ayrı immobilizasyonu ve immobilize lipazın esterleşme reaksiyonlarında kullanımı. *Doktora Tezi*. Adana: Çukurova Üniversitesi.
- Yıldırım, D., Baran, E., Ates, S., Yazici, B., & Tukul, S. (2019). Improvement of activity and stability of *Rhizomucor miehei* lipase by immobilization on nanoporous aluminium oxide and potassium sulfate microcrystals and their applications in the synthesis of aroma esters. *Biocatalysis and Biotransformation*, 37(3), 210-223.
- Yousefi, M., Marciello, M., Guisan, J., Fernandez-Lorente, G., Mohammadi, M., & Filice, M. (2020). Fine modulation of the catalytic properties of *Rhizomucor miehei* lipase driven by different immobilization strategies for the selective hydrolysis of fish oil. *Molecules*, 25(3), 545.
- Yücel, Y., Demir, C., Dizge, N., & Keskinler, B. (2014). Methods for lipase immobilization and their use for biodiesel production from vegetable oil. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 36(11), 1203-1211.
- Zaak, H., Siar, E.-H., Kornecki, J. F., Fernandez-Lopez, L., Pedrero, S. G., Virgen-Ortíz, J. J., & Fernandez-Lafuente, R. (2017). Effect of immobilization rate and enzyme crowding on enzyme stability under different conditions. The case of lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads. *Process Biochemistry*, 56, 117-123.
- Zaitsev, S. Y., Savina, A. A., & Zaitsev, I. S. (2019). Biochemical aspects of lipase immobilization at polysaccharides for biotechnology. *Advances in Colloid and Interface Science*, 272, 102016.
- Zhang, W., Yang, H., Liu, W., Wang, N., & Yu, X. (2017). Improved performance of magnetic cross-linked lipase aggregates by interfacial activation: A robust and magnetically recyclable biocatalyst for transesterification of jatropha oil. *Molecules*, 22(12), 2157.
- Zhong, L., Feng, Y., Wang, G., Wang, Z., Bilal, M., Lv, H., . . . Cui, J. (2020). Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 207-222.
- Zhong, N., Chen, W., Liu, L., & Chen, H. (2019). Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase onto the organic functionalized SBA-15: Their enzymatic properties and glycerolysis efficiencies for diacylglycerols production. *Food Chemistry*, 271, 739-746.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

İletişim Bilgisi: ozdmr.ece@gmail.com

Makaleler

1. Ozdemir Babavatan, E., Yildirim, D., Peksel, A. & Binay, B. (2020). Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase onto montmorillonite K-10 and polivinyl alcohol gel. *Biocatalysis and Biotransformation*, 38(4), 274-282.

Konferans Bildirileri

1. Özdemir Babavatan, E., Peksel, A. and Binay, B., "Immobilization and characterization of *Rhizomucor miehei* lipase onto different supports," in 1. *Eurasia Biochemical Approaches & Technologies Congress*, 2018.